

LO STRANO CASO DI UN CEPPPO DI *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* CHE SFUGGE ALLA RIVELAZIONE MEDIANTE PCR *END POINT*

Matucci A.¹, Stefani E.¹, Gavazzi L.², Tondo A.¹, Picchi M.¹, Cristovao Borges L.¹, Bottinelli M.¹, Merenda M.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, via Bovolino 1/C, 37060 Buttapietra (VR);

² Veterinario Aziendale Gruppo Amadori, Via Del Rio n.400, 47522 San Vittore di Cesena (FC)

Summary

Mycoplasma gallisepticum (MG) represents an important pathogen for the poultry industry resulting in large economic losses. MG infects chickens, turkeys and other avian species. The constant use of molecular tests for MG detection and the maintenance of the “MG-free” status of breeder flocks over time are fundamental for the control of this pathogen. Two specific PCRs targeting different portions of the *mgc2* gene of MG are reported in the OIE Terrestrial Manual chapter 3.3.5 (Ver. May 2021): a real-time PCR protocol and an *end point* one. It is reported here the case of a MG strain (IZSVE/9428/VR19) that was detected by the real-time protocol only. As a consequence, an alternative *primer* for the *end point* PCR protocol was developed and tested as well. This MG strain was isolated from tracheal swabs collected from turkeys, and subsequently identified through the 16s rRNA-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) protocol. The *mgc2* nucleotide sequence analysis, carried out employing our alternative *primer*, revealed the presence of a deletion of 30 bases at the *end point* PCR reverse *primer* annealing region. Our finding highlights that the *mgc2* gene, which codifies for a cythadesin, can be subjected to mutations in PCR-specific sites undermining the detection of this pathogen. It follows that “non-typical” strains which go undetected can potentially spread both within and among flocks.

INTRODUZIONE

Mycoplasma gallisepticum (MG) è una delle specie di *Mycoplasma* considerate più impattanti per il settore avicolo, con importanti ripercussioni sia dal punto di vista sanitario che economico. MG è diffuso in tutto il mondo, infettando principalmente le specie pollo e tacchino. Tuttavia, il patogeno è stato rilevato in altre specie avicole, come la quaglia, il fagiano e l’oca. MG è in grado di diffondersi orizzontalmente attraverso contatto diretto tra animali, con aerosol, polveri e penne. Inoltre, MG può essere trasmesso verticalmente nell’uovo [1]. La malattia a cui il patogeno è storicamente associato è la “Chronic Respiratory Disease” (CRD), caratterizzata da un’inflammatione cronica delle vie aeree, in particolare dei sacchi aerei. Tale processo flogistico ha come conseguenza una minor deposizione di uova, una riduzione della conversione della massa ponderale ed un generale aumento dello scarto al macello nelle linee da carne. Solitamente, il tacchino risulta più sensibile a MG rispetto al pollo [2].

A livello industriale, il mantenimento di gruppi di riproduttori “*Mycoplasma-free*”

risulta la strategia migliore per il contenimento di questo patogeno; ciò viene attuato attraverso un'implementazione di elevati livelli di biosicurezza in allevamento e attraverso un continuo monitoraggio della presenza del patogeno con analisi di laboratorio eseguite con cadenza minima quindicinale [3]. Essendo la rapidità dell'esito un requisito importante in questa fase produttiva, la PCR è considerata la metodica di elezione, seppur sia corretto ricordare che l'isolamento *in vitro* rappresenta il *gold standard* per la rilevazione diretta del microrganismo [4]. Il gene target specie-specifico per MG è *mgc2* (codificante per una citoadesina), il quale viene amplificato sia con protocolli *end point* PCR che real-time PCR [4,5]. Questi protocolli sono riportati anche nel manuale degli animali terrestri del World Organisation for Animal Health (OIE) al Cap 3.3.5, recentemente aggiornato. Il gene *mgc2*, inoltre, è un target ottimale per la differenziazione e la genotipizzazione di MG [6–8].

Qui viene presentato un caso di positività per MG in un allevamento di tacchini industriali ove la metodica *end point* in uso presso i nostri laboratori si è rivelata inefficace e quindi considerata “cieca” nell'identificazione del patogeno a causa di mutazioni sul sito di legame del *primer reverse*. L'utilizzo di una PCR alternativa con un nuovo *primer reverse* ha reso possibile identificare la zona della sequenza *mgc2* interessata da mutazione e successivamente rilevare la presenza di MG nei campioni analizzati.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Da un allevamento di tacchini sono stati conferiti presso il Laboratorio Micoplasmi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) 3 campioni di trachee con richiesta diagnosi per sospetto MG ed eventuale tipizzazione del gene *mgc2*. Gli animali presentavano una forma respiratoria lieve che si manifestava con leggera tosse associata a scarsi rantoli. Il responsabile sanitario dell'allevamento riporta che all'esame necroscopico si sono avute scarse evidenze di aerosacculiti fibrinose.

Isolamento da brodocolture

Le trachee conferite sono state campionate, inviate al laboratorio in terreno di trasporto (Avian Mycoplasma Liquid Medium, Mycoplasma Experience®) e coltivate mediante procedura interna basata sul manuale OIE per animali terrestri, con incubazione a 37° C al 5% di CO₂ in terreno liquido PPLO (BD Difco ®) e Avian Mycoplasma Liquid Medium. La coltura è stata controllata giornalmente fino a cambiamento di colore e/o torbidità del brodo.

Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto dalle brodocolture sospette positive con Maxwell DNA LEV Blood DNA Kit in strumentazione Maxwell-16 ® Instrument (Promega) secondo le istruzioni suggerite dalla ditta.

16s rDNA DGGE (gel elettroforesi in gradiente denaturante)

Il DNA estratto dagli isolati di trachea, e dai ceppi NCTC 10115 di *M. gallisepticum* e NCTC 10124 di *M. synoviae* è stato amplificato con *primer* specifici per la regione V3 del gene 16S. Gli amplificati ottenuti sono stati separati in gel di poliacrilammide

formato da un gradiente lineare di urea dal 60% al 30%, posto in buffer TAE preriscaldato a 60° C. La corsa elettroforetica denaturante ha una durata di circa 17 ore. Il gel è stato poi colorato con SYBR™ Safe DNA stain (ThermoFisher) e rivelato con l'analizzatore di immagini Gel Doc™ XR System (Bio Rad). L'identificazione del campione in esame è stata assegnata in base alla sovrapposizione del profilo elettroforetico con gli standard MG e MS [9].

PCR end point Mycoplasma gallisepticum

Il DNA estratto è stato amplificato utilizzando *primer* specifici (Tab. 1) già descritti [10] per il gene *mgc2* (GenBank accession number U34842, Fig. 1). Il kit di amplificazione impiegato è Fast Start™ Taq DNA polimerasi (Merck) ed è stato utilizzato il termociclatore GeneAmp® PCR System 9600 (Applied Biosystems) impiegando come controllo positivo DNA da ceppo MG 6/85. Il ciclo prevedeva una denaturazione iniziale a 95 °C per 10 min seguito da 40 cicli a 95 °C per 45 sec, 54 °C per 1 min, e 72 C° per 1 min, estensione finale a 72 °C per 7 min. Per la visualizzazione il prodotto di amplificazione è stato utilizzato un sistema di elettroforesi capillare QIAxcel Advanced System (Qiagen). La dimensione dell'amplificato è di circa 237-303 bp.

PCR real time Mycoplasma gallisepticum

Per la rivelazione di MG in PCR real-time è stata amplificata una zona genica di *mgc2* situata al 5' rispetto al PRR (Fig.1). Sono stati utilizzati *primer* e sonda descritti in letteratura [4] e riportati in Tab. 1. L'amplificazione è stata eseguita con il kit Path ID™ qPCR Master Mix Kit (Life Technologies) impiegando lo strumento CFX96 Detection System (Bio Rad) col seguente protocollo: denaturazione iniziale a 95 °C per 10 min seguito da 40 cicli a 95 °C per 15 sec, 60 °C per 1 min.

PCR alternativa Mycoplasma gallisepticum (PCR MG600)

Per la PCR alternativa di MG è stata amplificata una regione più ampia del gene *mgc2* similmente a quanto descritto per la PCR *end point* impiegando i *primer* descritti in Tab.1. L'amplificazione è stata eseguita col seguente protocollo: una denaturazione iniziale a 95 °C per 10 min seguito da 40 cicli a 95 °C per 45 sec, 52 °C per 1 min, e 72 C° per 2 min, estensione finale a 72 °C per 7'. L'amplicone di questa PCR misura circa 600 bp (Fig.1).

Sequenziamento genico e analisi bioinformatica

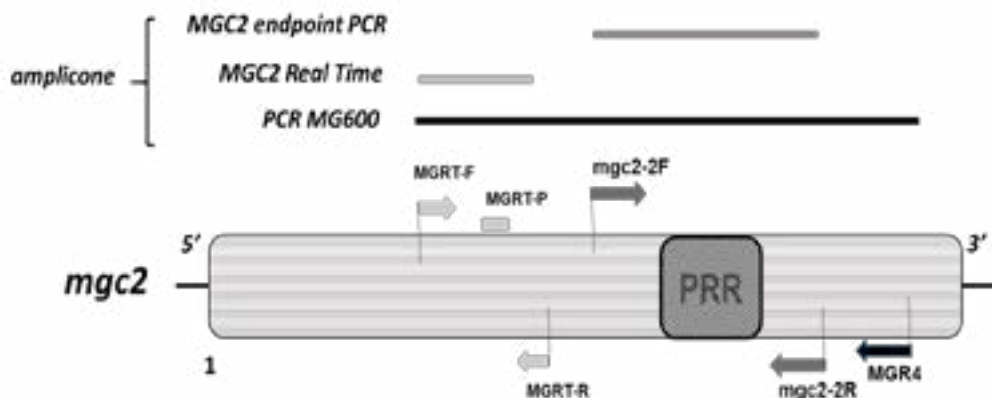
I campioni amplificati sono stati sequenziati su entrambi i filamenti impiegando BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v 2.0 (ThermoFisher) su sequenziatore automatico ABI PRISM 3500XL Genetic Analyzer (ThermoFisher). I sequenziamenti sono stati analizzati mediante software BioEdit Sequence Alignment Editor V7.2.6.1 (10) e le sequenze sono state analizzate con BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e programma "Megablast". L'albero Neighbour-Joining (NJ) è stato prodotto sfruttando il tool Blast Tree View [11]. Le sequenze sono state anche comparate usando l'allineamento multiplo attraverso Clustal (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) con sequenze derivanti da GenBank. La sequenza del campione IZSVE/9428/VR19 è stata depositata in GenBank con *accession number* MZ751779.1.

Tabella 1. sequenza di *primer* e sonde e dimensioni amplificato delle PCR impiegate.

PCR	Primer Fw	Primer Rv	Sonda	amplificato*
MGC2 <i>end point</i>	Mgc2-F- CGCAATTTGGTC- CTAATCCCCAACA	Mgc2-R- TAAACCCACCTC- CAGCTTTATTTC	-	237-303
MGC2 Real Time	MGRT-F- TTGGGTTTAGG- GATTGGGATT	MGRT-R- CCAAGGGATTCA- ACCATC	MGRT-P-** TxR-TGATGATC- CAAGAACGTGAA- GAACACC -BHQ1	
MGC2 MG600	MGRT-F	MGR4- AAGTTCATGCGGT- TGGACC	-	599

*: bp \pm 10% errore derivante da elettroforesi capillare, **: TrX: Texas Red

Figura 1 Rappresentazione schematica della regione del gene *mgc2* amplificata dalle PCR impiegate, PRR è la sequenza codificante una regione proteica ricca di proline (*proline-rich region*).



RISULTATI

Le trachee conferite sono state campionate e sottoposte a procedura di isolamento. Dei tre campioni analizzati, solamente uno ha determinato un viraggio del terreno di coltura, ed è quindi stato successivamente identificato come MG mediante analisi PCR 16S-rDNA e separazione DGGE (fig. 2A). Per determinare il genotipo mediante analisi di sequenza del gene *mgc2* il DNA di tale campione è stato sottoposto a PCR *end point* MG specifica risultato però negativo all'amplificazione (fig. 2B) rendendo dunque impossibile proseguire con l'analisi. Una seconda PCR MG-specifica di tipo real time è stata impiegata per testare il medesimo DNA estratto, evidenziando stavolta un'amplificazione a circa 20 cicli soglia (Ct, Fig. 3C). Quest'ultimo dato è concorde con il risultato dell'identificazione con metodica DGGE ma differisce da quello ottenuto con metodica *end point*. Al fine di capire il motivo del fallimento di quest'ultima metodica PCR e poter sequenziare anche la porzione gene *mgc2* che comprende il PRR (*proline-rich region*) di questo isolato, è stato disegnato un nuovo

primer reverse prossimo al 3' del gene *mgc2*. Tale *primer* è stato disegnato allineando differenti sequenze nucleotidiche di *mgc2* di MG già depositate in GenBank e valutando quale fosse la regione maggiormente conservata ove costruire tale sequenza. Il *primer forward* impiegato in questa PCR alternativa (PCR MG600) è stato mantenuto quello in uso dalla metodica real time (MGRT). Con questa PCR *end point* alternativa si ottiene un amplicone di circa 600 bp (Fig. 2D) che è stato successivamente sottoposto a sequenziamento. La sequenza ottenuta ha evidenziato nella zona di appaiamento col *primer reverse* della metodica *end point* descritta da Garcia et al. (*mgc2-R*) una mancanza di 21 su 25 basi (Fig. 3A) che impedisce l'amplificazione del ceppo in esame. Per evidenziare eventuali similarità con sequenze depositate in database GenBank, la sequenza è stata sottoposta ad analisi Blast ed il risultato è stato riportato come distanza evolutiva nell'albero NJ di Fig. 3B evidenziando la presenza di alcune sequenze molto simili a quella in esame appartenenti a due ceppi MG identificati in Brasile (isolate 2011/UFGM3 GenBank: KJ019174.1, 2011/UFGM2 GenBank: KJ019173.1) e un ceppo MG isolato in Australia (strain Au97019 GenBank: AY556302.1). L'allineamento di queste sequenze evolutivamente più vicine e quelle dei ceppi vaccinali 6/85 e Ts-11, tuttavia evidenzia una mancanza di 30 bp al 3' solo nella sequenza di *mgc2* del ceppo isolato dai tacchini da noi analizzato (Fig. 3C e 3A)

Figura 2 Risultati di amplificazione PCR. A) 16S-rDNA DGGE, B) PCR MGC2 *end point*, C) PCR Real time MGC2, D) PCR MG600.

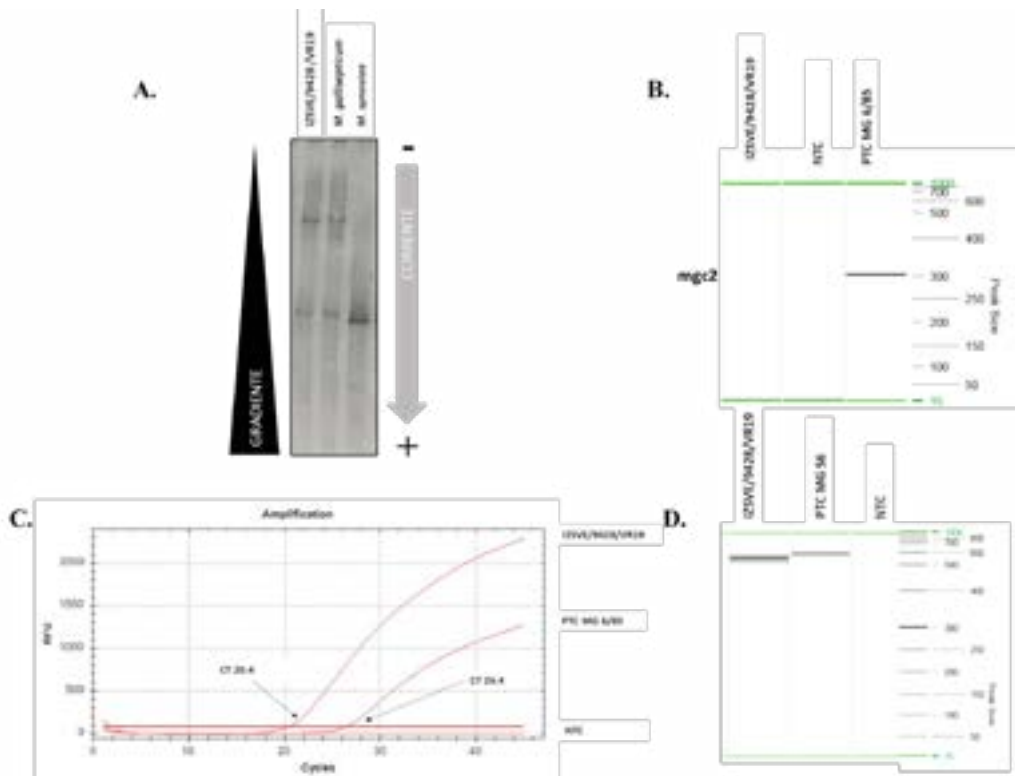
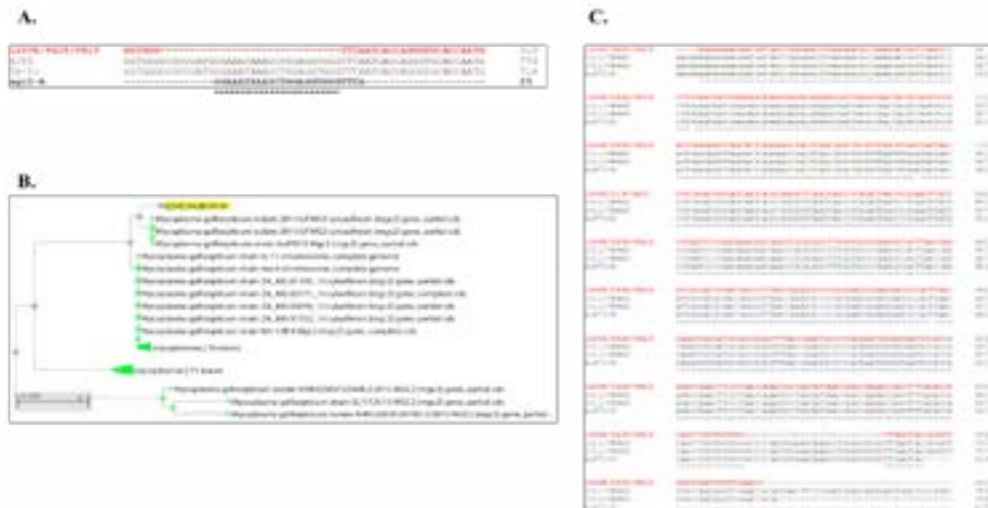


Figura 3 Analisi della sequenza del campione IZSVE/9429/VR19. A) Appaiamento con sequenza complementare inversa del *primer* *mgc2-R*, ceppo vaccinale 6/85 e Ts-11, B) albero Neighbour-Joining, in basso la scala di distanza, C) allineamento Clustal delle sequenze maggiormente simili.



DISCUSSIONE

Le perdite economiche collegate ad infezioni di MG sono ampiamente conosciute [3,12]. Infatti, secondo il nuovo Regolamento EU 2016/429, MG e *M. meleagridis* sono classificati come patogeni lettera D. Inoltre, MG ed *M. synoviae* sono riportati nel manuale degli animali terrestri, in particolare nel capitolo OIE 3.3.5 “Micoplasmosi aviarie” (<https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>) che definisce gli standard per i test diagnostici al fine di contribuire alla diagnosi, prevenzione ed il controllo di tali malattie in ambito internazionale. Attualmente, la principale strategia di contenimento delle infezioni da micoplasmi (MG incluso) in ambito industriale si basa sul mantenimento di gruppi di riproduttori “*Mycoplasma free*” associato a specifiche e stringenti misure di biosicurezza. Ciò mira ad evitare la trasmissione verticale del patogeno con conseguente diffusione di questo sul territorio. Al tale scopo, è suggerita l’attuazione di un monitoraggio degli animali con cadenza quindicinale utilizzando metodiche diagnostiche rapide e specifiche. Seppur la coltivazione in brodo del patogeno sia il *gold standard* per la diagnosi di micoplasmosi, i test molecolari costituiscono comunque una soluzione efficiente per il monitoraggio degli animali. Il gene *target* di MG, che conferisce specificità e sensibilità a metodi PCR, è quello codificante per la citoadesina *mgc2*. Tale gene ha evidenziato stabilità genetica anche dopo numerosi passaggi *in vitro* [10]; inoltre, sono noti i polimorfismi in lunghezza della sequenza [8] del gene, il quale risulta quindi utile anche per analisi di genotipizzazione [6]. L’impiego nella routine di laboratorio di una PCR MG specifica di tipo *end point* robusta con *primer* già descritti ha permesso sinora di

evidenziare correttamente infezioni di MG e poterne eseguire la genotipizzazione mediante analisi di sequenza della porzione genica codificante la citoadesina. L'analisi PCR real time MG specifica descritta da Raviv et al. [4] amplifica una zona di *mgc2* più corta di quella *end point* che non comprende il PRR, rendendola non adatta per la genotipizzazione di MG. La possibilità di impiegare due metodiche PCR ha permesso di confermare la presenza di MG nei campioni isolati *in vitro*, anche se è stato necessario lo sviluppo di una terza PCR (MG600) per definirne la sequenza e proseguire con la genotipizzazione.

Il ritrovamento di un ceppo di MG con una importante delezione di basi nel sito di legame del *primer* ci insegna che fare affidamento su un solo target molecolare potrebbe non essere sempre una scelta adeguata. Infatti, il nostro lavoro mostra come una PCR considerata negli anni molto solida non ha correttamente identificato un campione positivo per MG. Pertanto, risulta fondamentale per i laboratori diagnostici avere a disposizione vari protocolli di analisi, come l'isolamento e le metodiche molecolari. Inoltre, l'uso di diversi protocolli di amplificazione specifici con target genici peculiari consente di ridurre il margine di errore anche se non è possibile eliminare del tutto l'errore legato all'insorgenza di mutazioni, soprattutto quando si ha a che fare con microrganismi come i micoplasmi, la cui variabilità genetica risulta essere una scelta evolutiva vincente. Lo sviluppo di una nuova PCR *end point* (MG600), da validare su un ampio gruppo di campioni, ha reso possibile identificare correttamente e descrivere il patogeno, che si configura come caso unico ed insolito, almeno nel nostro territorio. È importante evidenziare che, se avessimo avuto a disposizione solamente il protocollo di PCR *end point* per gli *screening* quindicinali dei gruppi di riproduttori, la rilevazione di questo specifico ceppo non sarebbe potuta avvenire. Ne consegue che il ceppo avrebbe potuto diffondersi liberamente fintantoché la sintomatologia clinica non avrebbe destato sospetti tali da richiedere l'impiego di metodiche differenti per raggiungere la diagnosi.

CONCLUSIONI

Sebbene la forma clinica associata ai campioni di tacchini conferiti non fosse caratterizzata dalla presenza di gravi lesioni o sintomi, è stato possibile identificare un nuovo ceppo di *M. gallisepticum* in grado di eludere una metodica di rilevazione PCR riportata nel manuale OIE. Per la corretta diagnosi di questo ceppo è stato necessario adottare un approccio multidisciplinare. Ne è emersa la necessità, in un prossimo futuro, di ripensare ai protocolli di amplificazione basati su questa regione genica e di valutare la messa a punto di PCR multi-target in modo da limitare la possibilità di incorrere in falsi negativi. Come evidenziato in questo lavoro, un corretto approccio diagnostico può evitare la diffusione di patogeni in allevamento con conseguenti perdite economiche e può salvaguardare lo stato sanitario degli animali.

BIBLIOGRAFIA

1. Levisohn, S.; Kleven, S.H. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). *Rev. Sci. Tech.* 2000, 19, 425–442.
2. Ley DH *Mycoplasma gallisepticum* infection. *Dis. Poult.* 2008, 807–45., doi:10.7150/ijms.8938.

3. Feberwee, A.; De Wit, S.; Dijkman, R. Clinical expression, epidemiology and monitoring of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*: an update. Clinical expression, epidemiology and monitoring of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*: an update. 2021, doi:10.1080/03079457.2021.1944605.
4. Raviv, Z.; Kleven, S.H. The development of diagnostic real-time TaqMan PCRs for the four pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Dis.* 2009, *53*, 103–107, doi:10.1637/8469-091508-Reg.1.
5. García, M.; Ikuta, N.; Levisohn, S.; Kleven, S.H. Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Dis.* 2005, *49*, 125–132, doi:10.1637/7261-0812204R1.
6. Matucci, A.; Stefani, E.; Gastaldelli, M.; Rossi, I.; De Grandi, G.; Gyuranecz, M.; Catania, S. Molecular differentiation of mycoplasma gallisepticum outbreaks: A last decade study on italian farms using gts and mlst. *Vaccines* 2020, *8*, 1–15, doi:10.3390/vaccines8040665.
7. Rodio, S.; Moronato, M.L.; Sattin, E.; Matucci, A.; Gobbo, F.; Catania, S. *Mycoplasma gallisepticum* nel settore avicolo: studio dei ceppi circolanti negli ultimi tre anni. In Proceedings of the Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria – LIII Convegno Annuale; Salsomaggiore Terme, Italy, 2014; pp. 189–191.
8. Ferguson, N.M.; Hepp, D.; Sun, S.; Ikuta, N.; Levisohn, S.; Kleven, S.H.; García, M. Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies. *Microbiology* 2005, *151*, 1883–1893, doi:10.1099/mic.0.27642-0.
9. Catania, S.; Gobbo, F.; Ramirez, A.S.; Guadagnini, D.; Baldasso, E.; Moronato, M.L.; Nicholas, R.A.J. Laboratory investigations into the origin of *Mycoplasma synoviae* isolated from a lesser flamingo (*Phoeniconaias minor*). *BMC Vet. Res.* 2016, *12*, doi:10.1186/s12917-016-0680-1.
10. Lysnyansky, I.; García, M.; Levisohn, S. Use of *mgc2*-polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for rapid differentiation between field isolates and vaccine strains of *Mycoplasma gallisepticum* in Israel. *Avian Dis.* 2005, *49*, 238–245, doi:10.1637/7285-10020R.
11. Saitou, N.; Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987, *4*, 406–425, doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
12. Ley, David H., H.W.Y.J. *Mycoplasma gallisepticum* infection. *Dis. Poult.* 2008, *12*, 807–834.