

COMUNICAZIONE 16

UTILIZZO DELLA RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) PER DIFFERENZIARE CEPPI DI *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* VACCINALI DA CEPPI DI CAMPO

F. Paganelli, L. Fiorentini, R. Leonelli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione diagnostica di Forlì

Parole chiave: *Mycoplasma gallisepticum*, Random Amplified Polymorphic DNA, vaccino

Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to differentiate *Mycoplasma gallisepticum* vaccines and field strains

Key words: *Mycoplasma gallisepticum*, Random Amplified Polymorphic DNA, vaccine

Summary: *Mycoplasma gallisepticum* (MG) is the most economically significant mycoplasma pathogen of poultry, and has a world-wide distribution. Control of MG infection in poultry can be obtained through eradication, treatment, or vaccination programs. In Italy 2 MG vaccine strains (ts-11, 6/85) are commercially available.

Molecular analysis of MG field isolates can provide important epidemiological information of determining the source of the infection. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis is a molecular technique that allows for differentiation of MG at the strain level.

Correspondence: Francesca Paganelli, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna- Sezione diagnostica di Forlì- Via Marchini 1- 47100 Forlì. E-mail forli@bs.izs.it

Introduzione

La micoplasmosi da *Mycoplasma gallisepticum* (MG) è una patologia prevalentemente respiratoria del pollame, nota da molto tempo e ancora oggi non risolta. Nel nostro paese, infatti, negli ultimi anni ha avuto una recrudescenza nel pollo e nel tacchino causando gravi perdite economiche (4). Il controllo dell'infezione da MG può essere ottenuto con l'eradicazione, il trattamento farmacologico o programmi di vaccinazione. Nel nostro paese sono registrati due vaccini vivi non patogeni: 6/85 e ts-11.

La differenziazione dei ceppi vaccinali rispetto a quelli di campo è molto importante per poter identificare problemi correlati alla vaccinazione, per identificare ceppi di campo responsabili della patologia presente o per indagini epidemiologiche.

I ceppi di MG possono essere distinti sulla base dello studio della patogenicità e della caratterizzazione genotipica e fenotipica (5).

È possibile dimostrare la diversità dei ceppi vaccinali rispetto ai ceppi di campo utilizzando una RAPD (*random amplified polymorphic DNA*); si utilizza una *kit* commerciale contenente 6 *primers* che permette di ottenere un *patterns* di bande differente fra i ceppi vaccinali e i ceppi di campo (1).

Materiali e metodi

Ceppi di *Mycoplasma*. Sono stati impiegati nella prova 3 ceppi di MG isolati da galline leggere, non vaccinate. Un ceppo di MG isolato da riproduttori pesanti, non vaccinati, e un ceppo di MG isolato da galline ovaiole vaccinate con il 6/85. Tutti i soggetti osservati presentavano una sintomatologia e lesioni anatomopatologiche riferibili a micoplasmosi. Sono stati infine utilizzati i due ceppi vaccinali utilizzati in Italia: ts-11 e il 6/85.

Identificazione MG. Tutti i ceppi studiati sono stati identificati tramite una *polymerase chain reaction* (PCR), previa estrazione del DNA a partire da campioni di essudato tracheale o tamponi tracheali (3). Il protocollo di PCR utilizzato è quello descritto da Lauerman *et al.* (2). Il campione (100-2000 ng/5µl) è stato aggiunto ai reagenti necessari che fanno parte della Platinum TaqPCRx DNA Polymerase (Invitrogen®, USA). Fungono da innesco alla reazione di amplificazione il *primer* "forward" MG-F

5'GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC3' e il *primer* "reverse" MG-R 5' GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC 3'.

La reazione avviene in un termociclatore automatizzato (*Tpersonal*™, Biometra, Germany) secondo il seguente profilo di amplificazione: 5 minuti a 94°C seguito da 35 cicli costituiti da 3 *step*: 94°C per 30 secondi, 55°C per 30 secondi, 72°C per 1 minuto; al termine dei cicli 1 minuto a 72°C per eventuali estensioni. Il prodotto amplificato se positivo per MG presenta un frammento di 185 bp (3).

RAPD analisi. Il DNA estratto viene sottoposto ad una ulteriore PCR utilizzando il *kit* commerciale Ready-to-go RAPD Analysis (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) il quale contiene un *set* di 6 *primers*. Per ogni campione si eseguono 6 reazioni distinte per ogni *primer* utilizzato (Tabella 1) aggiungendo i reagenti necessari previsti dal protocollo di esecuzione del *kit*. I campioni vengono posti nel termociclatore dove si esegue un ciclo a 95°C per 5 minuti seguito da 45 cicli costituiti da tre *step*: 1 minuti a 95°C, 1 minuti a 36°C e 2 minuti a 72°C. Infine 1 ciclo a 4°C fino a quando non si rimuovono i campioni dal termociclatore.

I frammenti di DNA amplificati vengono separati tramite una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% con aggiunta di bromuro di etidio. I gel vengono osservati al transilluminatore ad UV comparando fra loro i vari *patterns* ottenuti riferendosi sempre al *marker* Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus (1).

Tabella 1: Sequenza dei primers per RAPD
Table 1: Sequence of RAPD analysis primers

RAPD PRIMERS	
1	5'-d [GGTGC GGAA]-3'
2	5'-d [GTTTCGCTCC]- 3'
3	5'-d [GTAGACCCGT]- 3'
4	5'-d [AAGAGCCCGT]- 3'
5	5'-d [AACGCGCAAC]- 3'
6	5'-d [CCCGTCAGCA]- 3'

Risultati

I *primers* 1 e 5 non presentano differenze sostanziali fra i vari ceppi analizzati, mentre il *primer* 6 e la combinazione dei *primers* 3 e 4 presentano una buona

discriminazione fra i ceppi di MG identificati. I profili ottenuti con il *primer* 6 presentano per tutti i ceppi da 1 a 3 bande di maggiore intensità nel *range* fra 350-2000 bp. La banda a 350 bp è comune a tutti gli isolati di MG, anche nei due vaccini.

I profili di amplificazione ottenuti con la combinazione dei due *primers* 3 e 4 sono differenti rispetto a quelli prodotti dal *primers* 6, ma si presentano comunque in un *range* compreso fra 350 e 2000 bp. Anche questi *primers* determinano da 1 a 3 bande di maggiore intensità, fra cui una banda a 820 bp comune a tutti gli amplificati considerati. I ceppi di MG analizzati presentano un *patterns* di bande diverso rispetto ai due vaccini considerati, non ci sono analogie sostanziali. E' molto chiara la differenza fra i ceppi vaccinali di MG e i ceppi di campo.

Discussione

La possibilità di separare i vari ceppi di MG richiede di considerare le similitudini e le differenze per una varietà di caratteristiche. La RAPD non è altro che un sistema di analisi che si avvale di *primers* specifici e di una PCR per dimostrare differenze *random* presenti nel genoma del microrganismo. Nei profili di amplificazione ottenuti per poter classificare i ceppi in esame si prendono in considerazione sia le bande specifiche ed uniche di un singolo campione sia le bande comuni a più campioni studiati. Il *primer* 6 e i *primers* 3-4 producono una banda comune a tutti gli MG identificati, rispettivamente a 350 bp e 820 bp. Sebbene non sia stata dimostrata la specificità di queste bande per MG, l'assenza di esse richiede comunque un'ulteriore controllo al fine di identificare l'MG in esame. Con i due profili ottenuti, con i due *set* di oligonucleotidi, è molto chiara la differenza fra i ceppi di campo analizzati e i due vaccini considerati.

L'utilizzo dei 2 *set* di *primers* permette di discriminare maggiormente i ceppi di MG rispetto all'utilizzo di un solo oligonucleotide.

Sebbene sia presente una discrepanza fra i differenti *primers* utilizzati, la separazione dei ceppi di MG è valorizzata dall'utilizzo multiplo di *set* di *primers* e da una procedura interna di controllo.

E' molto importante la scelta dei *primers*, infatti i *primers* 1 e 5 del *kit* si sono dimostrati non necessari per la differenziazione dei ceppi di MG (1). Questa metodica si è dimostrata molto utile soprattutto per comparare ceppi di campo con i ceppi vaccinali utilizzati sul territorio. Si ottengono dei *patterns* molto differenti a livello delle bande di maggiore intensità, facili da distinguere. Sicuramente la RAPD può essere usata con facilità nelle procedure diagnostiche per differenziare ceppi di campo da ceppi vaccinali, in modo da risolvere possibili problemi d'interpretazione diagnostica o per studiare l'andamento epidemiologico della patologia nei gruppi colpiti.

Ringraziamenti

Si ringrazia per la preziosa collaborazione il personale tecnico della Sezione IZSLER di Forlì.

Bibliografia

1. Charlton B.R., Bickford A.A., Walker R.L., Yamamoto R. (1999). "Complementary randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis patterns and primer sets to differentiate *Mycoplasma gallisepticum* strains". *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 158-161.
2. Lauerman L.H., Hoer F.J., Sharpton A.R., Shan S.M., Saten V.L. (1993). "Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*". *Avian Diseases*, 37, 829-834.
3. Paganelli F., Massi., Tosi G. (2002). "Applicazione del metodo polymerase chain reaction alla diagnosi di *Mycoplasma gallisepticum* e di *Mycoplasma synoviae*" *Large Animals Review*, anno 8, numero 6, bimestrale 2002.
4. Stipkovits L., Kempf I. (1996). "Mycoplasmosis in Poultry". *Rev. sci. tech. off. int. Epiz.*, 15, 1495-1525.
5. Yogev D., Levisohn S., Kleven SH., Halachmi D., Razin S. (1988). "Ribosomal RNA gene probes to detect intraspecies heterogeneity in *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*". *Avian Diseases*, 32, 220-231.