

IDENTIFICAZIONE DI SPECIE DI MICOPLASMI AVIARI MEDIANTE DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (DGGE)

Brustolin M., Battanolli G., Qualtieri K., Bilato D., Iob L., Catania S.,

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale Dell'Università 10, 35020, Legnaro (PD); scatania@izsvenezie.it

Summary

Mycoplasmas are important pathogens and commensal in the poultry industries and they are cause of considerable economical losses. *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma meleagridis* (MM) and *Mycoplasma iowae* (MI) are the most important causes of mycoplasmosis in the poultry worldwide but other species could infect avian species, especially in backyard flocks (which are generally less investigated than industrial farms).

In this short paper we would like to focus our attention on the use of Denaturing Gel Gradient Electrophoresis (DGGE). This molecular technique is based on the different migration of amplicon under denaturing conditions in a polyacrylamide gel. The denaturing gradient results from the combination of "high temperature" and different concentration of urea and formamide in the gel.

Our study is focused on the 16S rDNA semi-conserved region, with a specific primer for the *Mollicutes*. Different Mycoplasmas pointed out unique patterns depending on the nucleotide composition and therefore the power needed to denature it during the electrophoretic run.

DGGE allows to obtain more information with a single analysis, such as the identification and characterization of single or multiple infections in the same animal and evidence of hypothetical new mycoplasma species.

Moreover the comparison between DGGE results and those obtained with other techniques (specific PCR, sequencing and IFAT) demonstrate that DGGE can be used as a useful tool in avian Mycoplasmosis diagnosis.

INTRODUZIONE

I micoplasmi, appartengono alla classe dei *Mollicutes*, rappresentano i più piccoli microorganismi in grado di replicare autonomamente. Il loro genoma può variare da 600 a più di 2000 Kb. Differiscono dagli altri batteri in particolare per le loro piccole dimensioni e per la totale assenza di parete cellulare. Sono ampiamente diffusi in natura e possono parassitare un'ampia varietà di specie viventi quali mammiferi, rettili, pesci, artropodi e piante (4).

Sono considerati "organismi difficili da coltivare" a causa delle loro esigenze metaboliche e dei loro lunghi tempi di crescita in vitro.

In campo aviario sono oltre 20 le specie conosciute, anche se solamente alcune rivestono un ruolo economicamente importante, quali *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma iowae* (MI), *Mycoplasma meleagridis* (MM).

Con l'introduzione delle metodologie biomolecolari la diagnostica per tali patogeni è nettamente migliorata, ma se da un lato sono stati ridotti i tempi di risposta, dall'altro è diminuita la possibilità di eseguire ulteriori indagini

di approfondimento tipiche della microbiologia classica, ancor'oggi effettuate normalmente per altri patogeni batterici di più semplice coltivazione. L'utilizzo della PCR per la ricerca di una specie di *Mycoplasma* (sono attualmente disponibili PCR specifiche solo per i patogeni di maggior interesse) risulta essere determinante se supportata da un corretto sospetto diagnostico, in tali casi permette di pervenire ad una corretta diagnosi. Però contestualmente la stessa metodica può essere inefficace in caso di errato sospetto di specie, ed inoltre impedisce la dimostrazione di eventuali coinfezioni, eliminando anche la possibilità di esecuzione di ulteriori indagini sul ceppo isolato.

Attualmente nell'isolamento dei micoplasmi aviari il manuale OIE prevede un'incubazione in brodo fino a due settimane seguite da altre due settimane per l'eventuale crescita in agar. Poiché i micoplasmi non sono distinguibili su base biochimica risulta necessario eseguire metodiche aggiuntive per l'identificazione della specie isolata quali l'immunofluorescenza, l'inibizione della crescita, l'utilizzo di PCR specie specifiche che naturalmente aumentano ancor di più i tempi di risposta.

La DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) è una tecnica elettroforetica che permette di separare degli amplificati in base alla loro sequenza e non al loro peso molecolare. Il limite teorico di tale tecnica è quello di identificare fino ad una singola mutazione puntiforme (2). Il principio si basa sulla diversa mobilità di una doppia elica parzialmente denaturata in un supporto solido, la denaturazione stessa dipende a sua volta dalla sequenza nucleotidica. A tale riguardo è opportuno ricordare che l'appaiamento delle basi GC si basa su 3 legami idrogeno molto più stabili del doppio legame idrogeno presente tra le basi AT. Su tali presupposti alcuni Autori hanno effettuato studi di comparazione della migrazione di un tratto del 16S rDNA, regione conservata dei batteri (3). Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare su isolati di campo l'applicabilità della metodica DGGE, quale potenziale metodo per l'identificazione di differenti specie di micoplasmi,.

MATERIALI E METODI

I campioni pervenuti presso il nostro laboratorio sono stati sottoposti ad isolamento per micoplasmi mediante l'utilizzo di terreno "*Mycoplasma Experience*" sia in brodo, sia in agar. Brevemente, i brodi vengono incubati a 37°C al 5% CO₂ e valutati giornalmente per variazioni di pH e torbidità. Nel caso si verifichi una variazione, o allo scadere delle 2 settimane di incubazione, i brodi vengono seminati nel medium agarizzato per la valutazione della presenza di colonie. La via microbiologica classica procede con la valutazione della presenza di colonie più o meno tipiche in agar e l'eventuale conservazione del ceppo, le colonie sospette vengono identificate attraverso l'immunofluorescenza, PCR specifiche oppure tramite sequenziamento del tratto conservato 16S rDNA (1).

La nostra metodica DGGE prevede, in caso di presenza di colonie sospette, un'estrazione del DNA con kit commerciale *GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit* (Sigma-Aldrich, St.Louis MO) direttamente dal brodo di coltura.

L'acido nucleico viene amplificato mediante PCR, il cui target è un tratto codificante per il 16S rRNA. Si utilizza un forward primer universale batterico addizionato di una quarantina di GC necessarie quale ancora per la successiva

corsa elettroforetica, e un reverse primer specifico per la classe dei *Mollicutes*. (2,3)

Gli amplificati vengono sottoposti ad una elettroforesi a 60°C per 17 ore con una differenza di potenziale di 200V su un supporto di poliacrilammide a concentrazione uniforme ma con un gradiente di concentrazione di urea e formamide.

Per la lettura dei risultati è necessario utilizzare dei controlli positivi (ceppi di riferimento) che fungono da pattern di paragone.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In totale 738 campioni di specie aviare sono stati analizzati con metodica microbiologica classica per ricerca micoplasmi. In particolare 621 campioni provenivano da specie quali pollo, tacchino e gallina faraona, 53 campioni da specie “minori” quali fagiano, starna, anatra, struzzo ed infine 64 provenienti da specie avicole di nicchia quali galliformi, columbiformi, falconiformi, passeriformi. Della totalità dei campioni conferiti 188 hanno mostrato positività per *Mycoplasma spp.*. In particolare 172 campioni positivi appartenevano a specie quali il pollo, il tacchino e la faraona, 10 campioni positivi sono stati dimostrati negli avicoli definiti minori ed infine 6 positività nelle specie di nicchia.

Per quanto riguarda i campioni provenienti dalle specie pollo, tacchino e faraona, le positività rilevate sono ascrivibili nella maggioranza dei casi a *Mycoplasma synoviae* con 106 isolamenti ed al *Mycoplasma gallisepticum* con 39 isolamenti, di particolare interesse risultano essere le 7 positività evidenziante per *Mycoplasma meleagridis*. Altre specie di micoplasmi evidenziate nella specie pollo sono state il *Mycoplasma iners*, il *Mycoplasma gallinarum* ed il *Mycoplasma gallinaceum*. Inoltre, da altre specie avicole, sono stati isolati ed identificati ulteriori specie di micoplasma quali il *M. columborale*, *M. glycyphilum*, *M. buteonis*.

Per quanto riguarda l'identificazione di specie, la metodica DGGE ha costantemente confermato i risultati delle metodiche di riferimento utilizzate. Inoltre ha permesso una corretta identificazione delle specie coinvolte in alcuni specifici casi di coinfezioni.

Dai risultati da noi ottenuti possiamo affermare che la metodica DGGE può essere utilizzata quale tecnica per l'identificazione di specie del genere *Mycoplasma* in campioni di campo provenienti da allevamenti avicoli sottoposti a ricerca micoplasmi con metodica microbiologica. La scelta di affiancare la metodica microbiologica classica alla biologia molecolare risulta essere un buon compromesso sia in termini di tempo che di specificità. Infatti la sua versatilità permette di identificare in un'unica amplificazione la presenza di diverse specie di micoplasma, comprese quelle considerate “minori” e per cui non si hanno ad oggi PCR specifiche, nonché di infezioni miste, solitamente non identificate a causa della specificità delle metodiche biomolecolari normalmente utilizzate. Va ricordato infine che tale metodica essendo intrinsecamente basata su di una metodica microbiologica permette di rilevare solo organismi vitali nel terreno di coltura utilizzato per l'isolamento consentendo inoltre ulteriori approfondimenti diagnostici sul ceppo isolato.

BIBLIOGRAFIA

1. Johansson K. E., Heldtander M. U. K., Pettersson B. Characterization of Mycoplasmas by PCR and Sequence Analysis with Universal 16S rDNA Primers. *Mycoplasma Protocols*. Edited By Miles R., Nicholas R. Humana Press. 1998 145-165.
2. McAuliffe L, Ellis R. J., Ayling R. D., Nicholas R. A. Differentiation of Mycoplasma species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003 41, 4844-4847.
3. McAuliffe L., Ellis R. J., Lawes J. R., Ayling R. D., Nicholas R. A. 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for the detecting and differentiating mycoplasma species. *Journal of Medical Microbiology*. 2005 54,731-739.
4. Razin S., 1992 *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. American society for microbiology.