

## GENOTIPIZZAZIONE DI *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* TRAMITE METODICA MLST: RISULTATI PRELIMINARI SU CAMPIONI ISOLATI DA IZSVE

Matucci A.<sup>1</sup>, Stefani E.<sup>1</sup>, Tondo A.<sup>1</sup>, Dal Prà M.<sup>1</sup>, Quaranta E.<sup>2</sup>, Paladino A.<sup>1</sup>, Bekő K.<sup>3</sup>, Gyuranecz M.<sup>3</sup>, Catania S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT1 Via San Giacomo 5, 37157 Verona (VR), Italia

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCS5 Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italia

<sup>3</sup>Institute for Veterinary Medical Research, Centre for Agricultural Research, Hungarian Academy of Sciences, Hungária körút 21, Budapest 1143, Hungary

### Summary

*Mycoplasma gallisepticum* (MG) causes chronic respiratory disease and decrease hatchability in many avian species, resulting in economic losses to the poultry industry. Nowadays, there is strong demand for efficient epidemiological investigation tools to distinguish MG strains in order to control pathogen spreading and disease. For this purpose, the Multilocus Sequence Typing (MLST) genotyping method has been recently developed (8) using a specific six *loci* analysis on housekeeping genes (*atpG*, *dnaA*, *fusA*, *rpoB*, *ruvB*, *uvrA*). The aim of this study was to test with MLST a total of 77 MG positive samples, collected during 2010-2018 in the Mediterranean area and previously analysed at IZSVE through mycoplasma culture, identification and Gene Targeted Sequencing (GTS) genotyping of the *mgc2* gene (MGA\_0932) (9). In our samples we found four new alleles in three *loci* and seventeen new Sequence Types (ST) were assigned. Analysis of MG vaccine ST confirmed ST14 for MG 6/85 and ST49 for TS-11, respectively grouped in Orange and Pink *mgc2* GTS groups, as expected. However, inside a *mgc2* GTS group different ST could be found, pointing out that MLST resolution is greater compared to GTS. Only two ST from Spanish chickens (ST15 and ST32) grouped into different GTS genotype, indicating a different evolution of structural and housekeeping genes. MLST evolutionary relatedness analysis indicates three major ST to be considered as putative clonal complex: ST112, ST26 and ST105. A sample was analysed after a total of 100 cultural passages and the ST (along with GTS) was costantly found. Overall these results demonstrate that MLST method is solid and reproducible, it gives a higher resolution in respect of single gene GTS and could be implemented for epidemiological studies of both vaccine and field MG strains.

### INTRODUZIONE

*Mycoplasma gallisepticum* (MG) è un patogeno ampiamente diffuso che colpisce numerose specie avicole, può trasmettersi per via orizzontale (contatto diretto, aerosol, polveri, penne) ma la via principale di trasmissione è verticale da animale infetto alla progenie attraverso l'uovo (1). Crea tipicamente un quadro clinico respiratorio con sinusiti ed aerosacculiti con conseguente mortalità, ritardo nella crescita e scarti al macello oltre a mortalità embrionale. E' dunque un importante capitolo di perdite economiche per l'industria avicola (2). Per far fronte alla problematica sono disponibili sul mercato europeo vaccini vivi attenuati come il 6/85 (Nobilis® MG 6/85, MSD Animal Health) o il ts-11 (Vaxsafe® MG, Bioproperties Pty Ltd.). Risulta utile in ambito epidemiologico e

di sorveglianza sanitaria poter identificare e correlare i ceppi circolanti con i focolai di infezione ed inoltre poter differenziare i ceppi *wild* da quelli vaccinali. Differenti metodi molecolari sono stati messi a punto per identificare i ceppi (3,4,5), e quelli che risultano di maggiore interesse sono basati sul sequenziamento di particolari regioni geniche (*gene targeted sequencing*: GTS), come *mgc2* (CDS MGA\_0932) (6) e 16S-23S rRNA-IGSR (7) ma non consentono una standardizzazione elevata dei dati ottenuti. Tra i metodi di genotipizzazione basati su sequenza con alto potere discriminatorio e sicuramente standardizzabile troviamo la metodica MLST (*multi locus sequence typing*), che si basa sull'analisi di mutazioni nella sequenza di un set scelto di geni *housekeeping*. Brevemente, ad ogni differente gene con specifiche mutazioni viene assegnato un numero che definisce un allele del gene stesso, la sequenza di alleli assegnati al set di geni creano un "sequence type" numerico (ST) univoco che identifica il ceppo di MG analizzato. Scopo di questo studio è stato quello di valutare la metodica MLST applicata a *Mycoplasma gallisepticum* e pubblicata recentemente (8) su campioni conferiti all'Istituto Zooprofilattico delle Venezie (IZSVE) dal 2010 con differente provenienza geografica (bacino mediterraneo) e sottoposti ad isolamento e tipizzazione mediante analisi di sequenza del gene *mgc2* (9). Contestualmente è stata valutata la stabilità genetica che questa metodica riesce a rivelare nel tempo impiegando un ceppo dopo vari passaggi in coltura.

## **MATERIALI E METODI**

### *Selezione dei campioni*

Per lo studio in oggetto sono stati selezionati i seguenti campioni: i vaccini MG 6/85 e MG TS-11, il ceppo ATCC 19610, 76 campioni di campo provenienti da (58) polli, (13) tacchini, (2) oca, (2) faraona, (1) quaglia di differente categoria produttiva e precedentemente tipizzati mediante analisi di sequenza del gene *mgc2* e raggruppati/classificati come colore (Pink, Orange, Light-blue, etc..) secondo quanto precedentemente descritto (9). I campioni di MG selezionati per il presente studio sono rappresentanti dei principali genotipi storicamente evidenziati in IZSVE dal 2010: nr. 20 Green, nr. 20 del genotipo Pink (*ts-11 like*), nr. 12 Light blue, nr. 11 Orange (MG 6/85) e Orange-like (orange con 3bp di *mismatch*), nr. 12 Grey e Grey-like (Grey con delezione di 24 bp), solo 1 Black.

### *Isolamento da brodocolture*

I ceppi selezionati sono stati coltivati mediante procedura interna (PDP DIA 014 rev. 01-9/11) basata sul manuale OIE [cap 2.7.4 del 2013 e cap 2.7.5 del 2014], con incubazione a 37° C al 5% di CO<sub>2</sub> in terreno liquido. La coltura è stata controllata giornalmente fino a cambiamento di colore e torbidità.

### *Estrazione del DNA*

Il DNA genomico dei ceppi MG è stato estratto con metodo manuale impiegando il kit "QIAmp DNA mini KIT" (Qiagen) seguendo le istruzioni del kit per estrazioni da brodocoltura.

### *PCR MLST a 6 geni*

Sono stati amplificati 6 geni *housekeeping* (*atpG*, *dnaA*, *fusA*, *rpoB*, *ruvB*, *uvrA*) impiegando le coppie di *primer* descritte (8) con il kit qPCR Kapa FAST (Kapa Biosystem), su *real time* PCR BioRad CFX (BioRad) acquisendo il segnale di fluorescenza del *SYBR*

*green* in fase di reazione di elongazione. Il ciclo impiegato è stato: 95° C per 5' di attivazione, 35 cicli di 95° C per 1', 56° C per 30", 72° C per 1'.

#### *Sequenziamento ed analisi di sequenza*

I campioni amplificati nella precedente fase sono stati sequenziati su entrambi i filamenti per ogni gene impiegando BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (v 2.0 Applied Biosystems) su sequenziatore automatico ABI PRISM 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state valutate ed analizzate mediante software BioEdit Sequence Alignment Editor V7.2.6.1 (10) ed allineate con software MEGA7 mediante funzione ClustalW con un database di sequenze rappresentative dei differenti alleli già pubblicati per ognuno dei sei geni e già depositate in GenBank. Per ogni campione, in base alla sequenza numerica formata dal tipo di allele identificato in ogni *locus*, è stato assegnato l'ST del ceppo secondo quanto già pubblicato. Per combinazioni non presenti nelle 57 totali sinora descritte (8) sono stati assegnati nuovi ST partendo dal numero 100. La correlazione tra i differenti ceppi dopo assegnazione di ST è stata evidenziata creando un MST (*minimum spanning tree*) costruito usando l'algoritmo goeBURST full MST (11) in programma PHYLOViZ 2.0 usando la stringa dei 6 alleli identificati in ogni ceppo.

## **RISULTATI**

Per quanto riguarda gli ST evidenziati nei campioni di riferimento, ts-11, MG 6/85 ed ATCC 19610, sono stati confermati gli stessi risultati MLST già pubblicati (8), rispettivamente: ST49, ST14 ed ST1. Tutti i campioni MG sottoposti al presente studio si sono inoltre dimostrati positivi per l'espressione/amplificazione dei sei geni *housekeeping* di interesse per eseguire l'analisi MLST. In tabella 1 sono riportati tutti gli ST assegnati nei campioni IZSVe del bacino mediterraneo analizzati ed inoltre i nuovi ST assegnati nel presente studio, derivanti sia da nuove combinazioni alleliche, sia da nuovi alleli sequenziati nei geni *fusA*, *rpoB* e *uvrA*. In tabella 2 sono riportati i singoli campioni sottoposti ad analisi, la loro provenienza geografica, la specie e il genotipo *mgc2* e ST assegnato. Dai risultati ottenuti si può evidenziare che:

1. Nei campioni analizzati sono stati identificati 36 differenti ST, 17 dei quali (da ST100 a ST116) sono di nuova assegnazione. ST1 è stato evidenziato solamente col ceppo ATCC 19610 vista anche la provenienza statunitense. ST101 è stato ritrovato solo in una farafona italiana precedentemente classificata con un genotipo *mgc2* poco rappresentato.
2. Mentre all'interno dei genotipi *mgc2* può essere considerato normale ritrovare ST differenti, è interessante notare che in ST15 ed ST32 sono stati invece ritrovati differenti genotipi *mgc2*.
3. Il ceppo vaccinale MG 6/85 risulta allocato nell'ST14 ed è classificato come genotipo Orange. Gli altri ceppi presenti nel medesimo ST possiedono lo stesso genotipo Orange e provengono da allevamenti con vaccinazione MG 6/85.
4. Il genotipo Pink che includeva anche il ceppo vaccinale TS-11, mostra al suo interno differenti ST, di cui i maggioritari risultano essere ST49 (24%) ed ST34 (19%). È interessante notare come il ceppo vaccinale TS-11 è classificato come ST49, e gli altri isolati appartenenti a questo ST provengono da allevamenti con tale tipo di vaccino.
5. I genotipi Grey, Light-blue e Green risultano frammentati con differenti ST anche se si può ritrovare un ST prevalente in essi (rispettivamente ST51, ST27 ed ST24).

Per rappresentare la distanza evolutiva dei vari ST identificati sotto forma di differenze alleliche, i dati MLST sono stati rappresentati mediante costruzione di un MST (figura 1). I nodi di maggiore intesse, perché putativi “genotipi ancestrali” di differenti ST con limitate differenze alleliche, risultano essere ST112 e ST26 ed ST105.

Per dimostrare la stabilità della metodica MLST impiegata, ovvero che il metodo analizza zone geniche non soggette a variazioni di sequenza durante numerosi passaggi colturali, il campione IZSVE/2012/1731-31f di tacchino da carne con origine Italia e genotipizzato Pink è stato mantenuto in coltura liquida per 100 passaggi successivi totali ed ha evidenziato in MLST il mantenimento di un profilo ST23 e genotipo Pink.

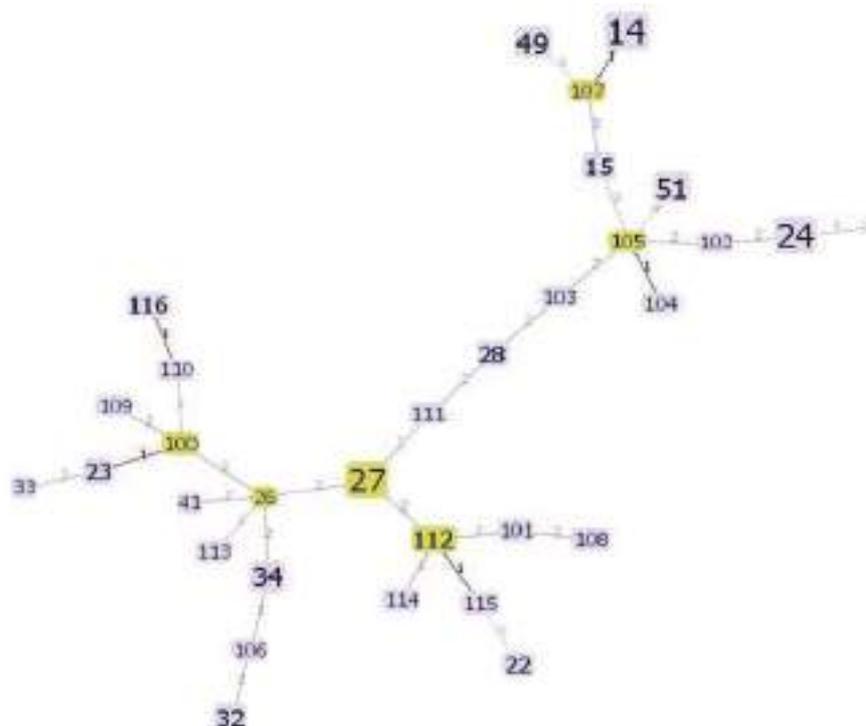
**Tabella 1:** profili ST di genotipizzazione mediante MLST ottenuti dai campioni conferiti in IZSVe 2010-2018. In grassetto gli ST di nuova assegnazione, in sfondo grigio nuovi alleli trovati nel presente studio e depositati su GenBank con numero di accesso provvisorio MN195114-MN195117.

<i>ST</i>	<i>atpg</i>	<i>dnaa</i>	<i>fusa</i>	<i>rpob</i>	<i>ruvb</i>	<i>uvra</i>
<i>1</i>	1	1	1	1	1	1
<i>6</i>	2	1	16	13	2	6
<i>8</i>	3	2	10	9	1	1
<i>14</i>	5	8	6	3	5	10
<i>15</i>	5	8	10	9	5	10
<i>18</i>	7	2	1	13	1	16
<i>22</i>	7	17	4	16	19	16
<i>23</i>	8	1	1	5	2	13
<i>24</i>	8	1	10	9	1	1
<i>26</i>	8	1	16	4	2	12
<i>27</i>	8	1	16	15	1	12
<i>28</i>	8	3	10	6	1	12
<i>32</i>	8	5	10	7	1	15
<i>33</i>	8	5	16	5	2	13
<i>34</i>	8	5	16	7	2	12
<i>39</i>	9	5	16	17	1	15
<i>41</i>	10	5	16	4	2	12
<i>49</i>	13	11	14	8	9	2
<i>51</i>	15	3	7	12	2	11
<b><i>100</i></b>	8	1	1	5	2	12
<b><i>101</i></b>	2	1	16	17	2	5
<b><i>102</i></b>	3	3	10	9	1	1
<b><i>103</i></b>	5	3	10	9	1	12
<b><i>104</i></b>	5	13	10	9	2	1
<b><i>105</i></b>	5	3	10	9	2	1
<b><i>106</i></b>	8	5	10	7	2	1
<b><i>107</i></b>	5	8	14	3	5	10
<b><i>108</i></b>	2	1	8	22	2	5
<b><i>109</i></b>	8	1	21	23	2	12
<b><i>110</i></b>	8	1	8	17	20	12
<b><i>111</i></b>	8	13	16	6	1	12
<b><i>112</i></b>	2	1	16	15	1	5
<b><i>113</i></b>	5	1	16	6	2	18
<b><i>114</i></b>	2	5	16	15	1	12
<b><i>115</i></b>	2	1	4	15	1	5
<b><i>116</i></b>	8	1	8	17	20	5

**Tabella 2:** campioni di MG analizzati descritti per specie ed origine e rispettivo profilo di genotipizzazione mediante MLST su 6 geni (ST) e tipo dopo analisi di sequenza *mgc2*.

<i>ID ceppo</i>	<i>Specie</i>	<i>Paese di origine</i>	<i>mgc2 tipo</i>	<i>ST</i>
<i>ATCC 19610</i>	coltura cellulare	nd	violet	<i>1</i>
<i>IZSVE/2016/3063-1</i>	pollo	Spagna	pink	<i>15</i>
<i>IZSVE/2012/1731-31f</i>	tacchino	Italia	pink	<i>23</i>
<i>IZSVE/2013/380-9f</i>	tacchino	Italia	pink	<i>23</i>
<i>IZSVE/2013/7016-10fp</i>	tacchino	Italia	pink	<i>26</i>
<i>IZSVE/2013/3963-9f</i>	goose	Italia	pink	<i>33</i>
<i>IZSVE/2013/6687-22f</i>	pollo	Italia	pink	<i>34</i>
<i>IZSVE/2013/3457-5d</i>	tacchino	Italia	pink	<i>34</i>
<i>IZSVE/2014/4852-1f</i>	tacchino	Italia	pink	<i>34</i>
<i>IZSVE/2014/4853-1d</i>	tacchino	Italia	pink	<i>34</i>
<i>IZSVE/2016/115-2f</i>	pollo	Spagna	pink	<i>39</i>
<i>IZSVE/2013/5575-28dp</i>	pollo	Albania	pink	<i>41</i>
<i>IZSVE/2012/2546-2d</i>	pollo	Italia	pink	<i>49</i>
<i>IZSVE/2013/2857-1f</i>	pollo	Italia	pink	<i>49</i>
<i>IZSVE/2013/3185-5f</i>	pollo	Italia	pink	<i>49</i>
<i>IZSVE/2013/4957-5d</i>	pollo	Italia	pink	<i>49</i>
<i>MG TS-11</i>	vaccino	nd	pink	<i>49</i>
<i>IZSVE/2014/6082-8f</i>	quaglia	Italia	pink	<i>100</i>
<i>IZSVE/2013/4693-4f</i>	pollo	Italia	pink	<i>107</i>
<i>IZSVE/2014/6259-35fp</i>	pollo	Italia	pink	<i>109</i>
<i>IZSVE/2015/5870-1fp</i>	faraona	Italia	pink	<i>110</i>
<i>IZSVE/2016/400-12f</i>	pollo	Italia	pink	<i>111</i>
<i>IZSVE/2018/202-14d</i>	pollo	Spagna	orange like	<i>105</i>
<i>IZSVE/2012/1626-2f</i>	pollo	Spagna	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2012/6164-1d</i>	pollo	Spagna	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2012/6166-1f</i>	pollo	Spagna	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2014/1779-12f</i>	pollo	Spagna	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2014/3462-14f</i>	pollo	Spagna	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2014/3462-16f</i>	pollo	Spagna	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2014/2741-1f</i>	pollo	Portogallo	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2014/2743-3f</i>	pollo	Portogallo	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2018/1839-47f</i>	pollo	Spagna	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2018/1844-1f</i>	pollo	Italia	orange	<i>14</i>
<i>MG 6/85</i>	vaccino	nd	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2010/D/3037-1</i>	pollo	Italia	Light blue	<i>27</i>
<i>IZSVE/2010/D/3038-2</i>	pollo	Italia	Light blue	<i>27</i>
<i>IZSVE/2010/D/3283-2</i>	pollo	Italia	Light blue	<i>27</i>
<i>IZSVE/2011/2247-10d</i>	pollo	Italia	Light blue	<i>27</i>

<b>ID ceppo</b>	<b>Specie</b>	<b>Paese di origine</b>	<b>mgc2 tipo</b>	<b>ST</b>
IZSVE/2012/4464-5f	pollo	Italia	Light blue	27
IZSVE/2010/D/2646-3	tacchino	Italia	Light blue	27
IZSVE/2010/D/2647-2	tacchino	Italia	Light blue	27
IZSVE/2016/3541-1fp	pollo	Italia	Light blue	113
IZSVE/2013/3914-2f	goose	Italia	Light blue	114
IZSVE/2011/6488-2d	tacchino	Italia	Light blue	115
IZSVE/2017/514-1f	tacchino	Italia	Light blue	116
IZSVE/2018/229-1f	tacchino	Italia	Light blue	116
IZSVE/2017/2479-8f	pollo	Spagna	grey like	32
IZSVE/2012/6194-14	pollo	Iraq	grey	18
IZSVE/2012/6194-5	pollo	Iraq	grey	18
IZSVE/2013/561-1f	pollo	Giordania	grey	22
IZSVE/2013/566-1fp	pollo	Giordania	grey	22
IZSVE/2013/3188-1f	pollo	Spagna	grey	32
IZSVE/2012/3057-1d	pollo	Spagna	grey	51
IZSVE/2012/3057-2d	pollo	Spagna	grey	51
IZSVE/2012/3058-1d	pollo	Spagna	grey	51
IZSVE/2012/3058-2d	pollo	Spagna	grey	51
IZSVE/2012/3616-2f	pollo	Italia	grey	112
IZSVE/2013/3791-1fp	tacchino	Italia	grey	112
IZSVE/2015/980	pollo	Spagna	green	6
IZSVE/2011/5595-2d	pollo	Italia	green	8
IZSVE/2013/4360-1f	pollo	Spagna	green	15
IZSVE/2013/4360-2f	pollo	Spagna	green	15
IZSVE/2013/3061-1f	pollo	Italia	green	24
IZSVE/2014/3164-2f	pollo	Spagna	green	24
IZSVE/2014/6088-1dp	pollo	Spagna	green	24
IZSVE/2015/2061-6f	pollo	Spagna	green	24
IZSVE/2015/2063-2f	pollo	Spagna	green	24
IZSVE/2015/388-7D	pollo	Spagna	green	24
IZSVE/2015/388-8f	pollo	Spagna	green	24
IZSVE/2017/3571-2dp	pollo	Spagna	green	24
IZSVE/2016/2581-3	pollo	Spagna	green	28
IZSVE/2017/2479-5f	pollo	Spagna	green	28
IZSVE/2014/6088-2f	pollo	Spagna	green	32
IZSVE/2011/5595-8f	pollo	Italia	green	102
IZSVE/2012/1183-4d	pollo	Spagna	green	103
IZSVE/2012/1216-4f	pollo	Spagna	green	104
IZSVE/2013/1772-2f	pollo	Spagna	green	106
IZSVE/2016/852-1f	tacchino	Italia	green	108
IZSVE/2010/2458-1f	faraona	Italia	black	101



**Figura 1:** rappresentazione *minimum spanning tree* (full MST 5 Locus Variant level) dei dati MLST dei campioni analizzati, il numero nei nodi rappresenta l'ST mentre il numero nel tratto di *link* le differenze alleliche tra i due ST collegati.

## DISCUSSIONE

L'analisi MLST dei campioni di riferimento conferma la riproducibilità della metodica applicata su *Mycoplasma gallisepticum* di recente pubblicazione (8). Inoltre si dimostra un'analisi solida riuscendo ad evidenziare un profilo ST costante sino a 100 passaggi in coltura, dimostrando che la regione analizzata dei geni interessati non accumula mutazioni casuali evidenziabili che ne fanno variare l'ST. La metodica in studio, applicata a campioni già genotipizzati impiegando analisi di sequenza del gene *mgc2* e raggruppati per gruppi omologhi (9), rende possibile una differenziazione genotipica superiore in quanto all'interno dei gruppi di colore si ritrovano differenti ST. Purtroppo occorre segnalare che sono stati evidenziati due *sequence type* (ST15 e ST32) appartenenti ad area geografica e provenienza definita (Spagna filiera industriale) che possono avere genotipo *mgc2* differente andando ad indicare che la ulteriore analisi di sequenza di più geni (in questo caso *housekeeping*) riesce a dare informazioni complementari rispetto una analisi GTS di un gene strutturale come la citoadesina. In questo caso ad esempio il risultato può risultare utile per un'analisi epidemiologica specifica e localizzata della circolazione di particolari ST. Ad esempio la maggiore prevalenza di ST14 (ceppo vaccinale 6/85) in galline ovaiole nella penisola iberica rispetto a ST49 (ceppo TS-11) in Italia,

potrebbe essere spiegato dalla differente tipologia di vaccinazione tra queste due zone geografiche, in Spagna è autorizzato solamente il vaccino ceppo 6/85.

L'analisi dei dati MLST riferita agli ST identificati (figura 1) è in grado inoltre di evidenziare anche la “vicinanza evolutiva” tra più ceppi identificati mediante algoritmo goeBURST (che si basa sulla computazione di differenze tra i profili numerici). Attualmente dai dati in nostro possesso solamente ST112 e ST26 risultano possibili candidati ad essere considerati Complessi Clonali (CC), in quanto con due sostituzioni alleliche (*Dual Locus Variant*) originano almeno 4 nuovi ST, mentre per ST105 che graficamente potrebbe apparire un buon candidato è opportuno segnalare che necessita di maggiori sostituzioni alleliche per generare nuovi “rami”. ST26 appartiene al genotipo Pink mentre ST112 a genotipo Grey ed entrambi risultano numericamente poco rappresentati nei campioni e genotipi analizzati, inoltre mentre gli ST discendenti più vicini ad ST26 risultano dello stesso genotipo *mgc2* (Pink) con la sola eccezione di ST27, mentre da ST112 non discende direttamente nessun genotipo Grey ma prevalentemente ST appartenenti al genotipo Light-blue. Per ST105 che appartiene al genotipo definito Orange-like, gli ST più prossimi sono tutti di genotipo Green.

## CONCLUSIONI

La metodica MLST aumenta la potenza risolutiva della genotipizzazione mediante GTS ponendo le basi per una valutazione epidemiologica puntuale nel tempo e nello spazio della trasmissione di MG. Tale metodica, affiancata da una collezione continua dei dati potrà quindi permettere di meglio comprendere le correlazioni tra focolai, sistemi di diffusione e mantenimento di tale importantissimo patogeno gettando le basi all'implementazione puntuale delle misure di biosicurezza nei sui confronti.

## BIBLIOGRAFIA

1. Levisohn, S., and S. H. Kleven. “Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*).” *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* 19.2 (2000): 425-434.
2. Ley, David H., and H. W. Yoder Jr. “*Mycoplasma gallisepticum* infection.” *Diseases of poultry* 12 (2008): 807-834.
3. Gharaibeh, Saad, et al. “Molecular characterization of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from Jordan.” *Avian diseases* 55.2 (2011): 212-216.
4. Ferguson, Naola M., et al. “Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies.” *Microbiology* 151.6 (2005): 1883-1893.
5. Sulyok, Kinga M., et al. “Development of Molecular Methods for Rapid Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine Strains from Field Isolates.” *Journal of clinical microbiology* 57.6 (2019): e01084-18.
6. Lysnyansky, Inna, Maricarmen Garcia, and Sharon Levisohn. “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 diseases* 49.2 (2005): 238-245.
7. Raviv, Ziv, et al. “The *Mycoplasma gallisepticum* 16S–23S rRNA intergenic

- spacer region sequence as a novel tool for epizootiological studies.” *Avian diseases* 51.2 (2007): 555-560.
8. Bekő, Katinka, et al. “Genotyping *Mycoplasma gallisepticum* by multilocus sequence typing.” *Veterinary microbiology* 231 (2019): 191-196.
  9. 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” *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria* 2014 pag. 189-191.
  10. Hall, Tom A. “BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.” *Nucleic acids symposium series*. Vol. 41. No. 41. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999.
  11. Francisco, Alexandre P., et al. “Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach.” *BMC bioinformatics* 10.1 (2009): 152.