

## TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI ISOLATI ITALIANI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE*: RISULTATI PRELIMINARI

Stefani E., Matucci A., Tondo A., De Grandi G., Dal Pra M., Gastaldelli M., Catania S.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCTI Verona-Vicenza, via San Giacomo 5, 37157 Verona (VR), Italia.*

### Summary

*Mycoplasma synoviae* (MS) is an important pathogen in intensive poultry industry causing consistent economic losses. MS infection determines airsacculitis and infectious synovitis in chickens and turkeys and is associated to EAA (Eggshell Apex Abnormality) in chicken layers. Control of MS dissemination comprises biosecurity measures, antibiotic treatments and vaccination. Molecular typing techniques represent an important tool to expand the knowledge of MS epidemiology and to investigate the circulating field strains. For many years, MS typing was carried out by sequence analysis of the conserved tract of the variable lipoprotein and hemagglutinating A (*vlhA*) gene (GTS *vlhA*). Although such approach displays sufficient discriminatory power to easily differentiate unrelated strains, it is not adequate to describe genetic relatedness between close strains. Multi-locus sequence typing (MLST) has a greater discriminatory power and is considered a useful tool to infer the clonality and evolutionary relatedness of field strains. In this study, GTS *vlhA* and a MLST scheme based on 7 housekeeping genes (*adh*, *atpG*, *efp*, *gmk*, *nagC*, *ppa*, *recA*) were used to describe the genetic profile of MS field strains (123) collected from 2010 to 2020. The GTS *vlhA* method could differentiate the samples into 6 known (B, C, C3-13, D, F, M) and 4 novel types (O, P, Q and R). Differently, MLST distinguished 16 known and 37 new sequence types (ST). *Minimum spanning trees* were constructed to describe the relationship between our samples and others isolated in different countries and previously described and to investigate the relation between ST and time of isolation or host. Interestingly, ST 21 was the one observed with higher frequency over the observational period and showed the broader distribution among the considered countries. Finally, MLST proved a more reliable tool for correctly differentiate vaccinal from field strains. In conclusion, both MS typing methods can be considered valid tools for epidemiologic evaluation and pathogen containment of circulating field strains.

### INTRODUZIONE

*Mycoplasma synoviae* (MS) è un microrganismo considerato patogeno e possibile causa di importanti perdite economiche nell'industria avicola. Può trasmettersi sia per via verticale dai riproduttori alla progenie, che orizzontale tra individui dello stesso allevamento e diversi allevamenti. MS causa sinusite e forme respiratorie principalmente in polli e tacchini, nelle galline ovaiole può anche dare origine all'anormalità dell'apice dell'uovo (EAA) con conseguenti perdite economiche (1). Gli strumenti finalizzati al contenimento della diffusione di MS attualmente a nostra disposizione, risultano essere la biosicurezza, l'invio al macello dei gruppi di animali risultati MS positivi ed infine i trattamenti antibiotici che possono contribuire a mitigare l'impatto dell'infezione sulle performance, ma non possono tuttavia eliminare la possibilità

di diffusione. In particolare, nel campo della biosicurezza risulta fondamentale la conoscenza del patogeno poiché solamente attraverso un'approfondita conoscenza delle vie di trasmissione è possibile trovare sistemi atti a contrastarne la diffusione. Ad esempio, identificare la possibile sorgente dell'infezione e la modalità di diffusione rappresentano una parte integrante nella gestione del sistema finalizzato ad imparare dal passato per prevenire futuri focolai. Sicuramente la diagnosi precoce risulta molto utile per il controllo dei focolai di MS e, associata alla tipizzazione di tipo molecolare, può diventare un valido strumento per differenziare i ceppi di MS circolanti e quindi anche le possibili fonti di diffusione. Nel corso degli ultimi anni, differenti metodiche molecolari sono state messe a punto per poter discriminare i differenti ceppi di MS. Il metodo di più ampio impiego è stato sicuramente quello proposto da Bencina et al., 2001 (2) e successivamente perfezionato da Hammond et al., 2009 (3) che prevede l'analisi GTS (gene targeted sequencing) della regione conservata al 5' del gene *variable lipoprotein and hemagglutinin A* (*vlhA*), presente in singola copia nel genoma di MS. Questo metodo possiede un alto potere discriminatorio ed è sicuramente molto utile per differenziare ceppi non correlati tra loro ma, vista l'elevata pressione selettiva a cui è sottoposto il gene *target* risulta difficile stabilire una correlazione evolutiva tra i ceppi (4). Per questo, recentemente, sono state introdotte nuove metodiche molecolari come le metodiche MLST (Multi-Locus Sequence Typing), MLVA (Multiple-Locus Variable-tandem repeats Analysis) e il Core Genome Multi-Locus Sequence Typing (cgMLST) (4, 5, 6 e 7). Le metodiche MLST basate sull'analisi di geni *housekeeping* rappresentano una risorsa molto utile perché consentono una condivisione dei dati ottenuti. La metodica MLST basata sull'analisi di 7 geni (4) è a tutt'oggi quella che ha avuto una maggior diffusione proprio grazie alla disponibilità di un database pubblico (*PubMLST*) in cui è possibile analizzare le sequenze e condividere in maniera univoca eventuali nuovi profili genetici identificati. I sette geni di interesse (*adhA*, *atpG*, *efp*, *gmk*, *nagC*, *ppa*, *recA*) vengono amplificati e sequenziati e ogni differente sequenza allelica viene identificata da un numero univoco. La combinazione di questi alleli crea un "sequence type" (ST) numerico che identifica il ceppo MS analizzato. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare ed analizzare, tramite analisi GTS sulla regione conservata del gene *vlhA* (GTS *vlhA*) e MLST con protocollo a 7 geni, i ceppi circolanti nel territorio italiano dal 2010 al 2020 al fine di fornire utili spunti applicativi per la corretta scelta della tipologia di analisi da effettuare e dare quindi una panoramica del contesto italiano.

## MATERIALI E METODI

### *Selezione dei campioni*

Sono stati selezionati 123 ceppi di MS provenienti sia da allevamenti industriali che rurali pervenuti tra il 2010 e il 2020 ed un isolato del ceppo vaccinale MS-H impiegato come controllo. Le specie di derivazione dei campioni sono gallina, pollo, tacchino ed un fenicottero. Tra i campioni scelti sono presenti anche 4 campioni (IZSVE/1231/D13/61, IZSVE/368/D14/2, IZSVE/9684/VR19, IZSVE/5076/VR20) provenienti da allevamenti vaccinati con MS-H. Sono stati estrapolati dal database *PubMLST* (<https://pubmlst.org/msynoviae>) i dati relativi agli ST di 134 campioni provenienti da altri Stati. In particolare: 53 isolati di provenienza USA, 29 dall'Ungheria, 16 dalla Cina, 4 dalla Spagna, 3 dalla Repubblica Ceca, Ucraina, Austria, Russia e Slovenia, 2 da Australia, Canada, Giordania, Libano, Romania e Tunisia, 1 da Argentina, Brasile, Israele, Serbia e Taiwan.

### *Estrazione del DNA*

Il DNA genomico dei ceppi di MS selezionati è stato estratto utilizzando l'estrattore Maxwell 16 System e il kit Maxwell 16 Blood Purification System seguendo le istruzioni suggerite dal produttore.

### *PCR-GTS *vlhA**

I *primer* utilizzati per l'amplificazione della regione conservata al 5' del gene *vlhA* sono descritti in Hammond et. al., 2009 (3), impiegando la GoTaq® DNA Polymerase secondo le istruzioni suggerite dal produttore. Il ciclo di amplificazione prevede un ciclo di attivazione dell'enzima di 95°C per 5', seguito da 36 cicli di amplificazione (95°C per 1', 62°C per 1' e 72°C per 8') e da un ciclo finale di 72°C per 8'.

### *MLST*

Per eseguire l'analisi MLST sono stati amplificati 7 geni housekeeping (*adk*, *atpG*, *efp*, *gmk*, *nagC*, *ppa*, *recA*) utilizzando le coppie di *primer* descritte da El-Gazzar et al. (4). L'amplificazione è stata eseguita con il kit qPCR Sybr Fast Universal (ditta Merck) utilizzando lo strumento CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System. Il protocollo di amplificazione prevede uno *step* a 95°C per 5' seguito da 35 cicli a 95°C per 1', 54°C per 30" e 72°C per 1,30'.

### *Sequenziamento*

Gli amplificati ottenuti dalla metodica GTS-*vlhA* e MLST sono stati sequenziati su entrambi i filamenti per il gene di interesse impiegando il kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (v. 2.0 Applied Biosystems) su sequenziatore automatico ABI PRISM 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Gli elettroferogrammi ottenuti sono stati valutati e analizzati tramite il software BioEdit Sequence Alignment Editor V7.2.6.1 (8). La tipizzazione mediante analisi GTS-*vlhA* è stata effettuata analizzando la lunghezza della regione ricca in proline (PRR) come descritto in Bencina et al., 2001 (2), e la regione in 3' (3). Le sequenze alleliche ottenute sono state codificate utilizzando il *database PubMLST*). La sequenza numerica formata dal tipo di allele identificato in ogni locus corrisponde ad un determinato ST depositato nel database. Le sequenze alleliche e gli ST non presenti nel *PubMLST* sono stati depositati e codificati. La correlazione tra i differenti ceppi è stata evidenziata creando un MST (*minimum spanning tree*) costruito usando l'algoritmo goeBURST full MST (9) in programma PHYLOViZ 2.0 usando la stringa dei 7 alleli identificati in ogni ceppo. Per la definizione di *Clonal complex* abbiamo inserito un *cut-off* di 2 differenze alleliche.

### *Calcolo dell'indice di diversità di Simpson*

L'indice di diversità di Simpson è stato calcolato utilizzando la formula  $D=1-[(n(n-1)/N(N-1))]$  dove n è il numero di campioni per ogni categoria e N è il numero totale di campioni di tutte le categorie.

## **RISULTATI**

Sono stati analizzati 123 campioni italiani con metodica GTS *vlhA* e con metodica MLST pervenuti dal 2010 al 2020 (vedi Tabella 1) e il ceppo vaccinale MS-H. Tutti i campioni analizzati sono risultati positivi dopo amplificazione e analisi di sequenza del gene *vlhA* e dei 7 geni *housekeeping* utilizzati nella metodica MLST.

**Tabella 1:** Campioni di MS italiani analizzati e riassunto dei risultati ottenuti dopo tipizzazione GTS (vlhA) e MLST (ST).

<i>ID CAMPIONE</i>	<i>vlhA</i>	<i>ST</i>	<i>Specie</i>	<i>Clonal Complex</i>
<b>MS-H</b>	C3 -13	43	-	CC9
<b>IZSVE/2010/5711</b>	C3 -13	131*	Fenicottero	Singleton
<b>IZSVE/6643/D11/1f</b>	P°	105*	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/6642/D11/3f</b>	P°	105*	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/7106/D11/12</b>	D	127*	Gallina	CC7
<b>IZSVE/1760/D12/4fil aexp</b>	C	10	Pollo	Singleton
<b>IZSVE/5715/D12/4</b>	F	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/806/D12/14</b>	F	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/1306/D12/24fil</b>	F	21	Pollo	CC3
<b>IZSVE/1806/D12/15fil</b>	D	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/70/D12/4fil</b>	F	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/1805/D12/3</b>	F	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/1203/D12/2</b>	F	21	Tacchino	CC3
<b>IZSVE/5619/D12/5f</b>	O°	63	Gallina	CC1
<b>IZSVE/86/D12/2fil</b>	D	121*	Pollo	CC7
<b>IZSVE/4109/D13/1f</b>	F	21	Tacchino	CC3
<b>IZSVE/6455/D13/25f</b>	D	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/4515/D13/3f</b>	F	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/2211/D13/1f</b>	F	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/2094/D13/10</b>	F	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/1231/D13/61<sup>#</sup></b>	C3 -13	43	Pollo	CC9
<b>IZSVE/1711/D13/2f</b>	O°	63	Gallina	CC1
<b>IZSVE/4663/D13/2f</b>	D	66	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/3757/2d aexp</b>	D	68	Gallina	CC1
<b>IZSVE/4498/D13/2f</b>	D	71	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/5914/D13/5d</b>	F	83	Pollo	CC1
<b>IZSVE/5914/D13/1</b>	F	83	Pollo	CC1
<b>IZSVE/4828/D13/1f</b>	M	112*	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/4444/D13/23f</b>	D	116*	Gallina	CC7
<b>IZSVE/6681/D13/7f</b>	D	125*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/5524/D13/6f aexp</b>	Q°	135*	Gallina	CC1

<b>IZSVE/4004/D13/3 dil</b>	O°	139*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/3441/D14/2d p</b>	F	21	Pollo	CC3
<b>IZSVE/150/D14/11d</b>	F	21	Pollo	CC3
<b>IZSVE/5575/D14/5F</b>	F	21	Tacchino	CC3
<b>IZSVE/589/D14/1</b>	M	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/151/D14/1d pplo</b>	P°	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/368/D14/2#</b>	C3 -13	43	Pollo	CC9
<b>IZSVE/5817/D14/1f</b>	M	60	Pollo	CC1
<b>IZSVE/149/D14/16f aexp</b>	O°	63	Gallina	CC1
<b>IZSVE/3413/D14/1F</b>	D	71	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/4418/D14/6f a</b>	D	106*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/494/D14/17f</b>	D	113*	Gallina	CC3
<b>IZSVE/1353/D14/1f</b>	D	113*	Tacchino	CC3
<b>IZSVE/6259/D14/33D</b>	D	113*	Gallina	CC3
<b>IZSVE/6365/D14/2F</b>	F	114*	Gallina	Singleton
<b>IZSVE/6399/D14/1F</b>	F	120*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/590/D14/1f a</b>	D	121*	Pollo	CC7
<b>IZSVE/2974/D14/1f</b>	D	128*	Tacchino	CC7
<b>IZSVE/6709/D14/1f aexp</b>	P	138*	Tacchino	Singleton
<b>IZSVE/5662/D15/2f a</b>	F	21	Pollo	CC3
<b>IZSVE/5665/D15/1f a</b>	F	21	Pollo	CC3
<b>IZSVE/390/D15/3f</b>	D	71	Gallina	CC1
<b>IZSVE/2705/D15/11f</b>	D	71	Gallina	CC1
<b>IZSVE/740/D15/17 d aexp</b>	F	72	Gallina	CC3
<b>IZSVE/2519/D15/1f aexp</b>	F	72	Tacchino	CC3
<b>IZSVE/4599/D15/2</b>	D	73	Gallina	CC3
<b>IZSVE/1684/D15/18f</b>	D	73	Pollo	CC3
<b>IZSVE/5871/D15/2f a</b>	D	74	Pollo	Singleton
<b>IZSVE/2518/D15/1f aexp</b>	M	84	Gallina	CC1
<b>IZSVE/2376/D15/1f A</b>	D	86	Gallina	Singleton
<b>IZSVE/3622/D15/2f a</b>	D	86	Gallina	Singleton
<b>IZSVE/5872/D15/3</b>	B	88	Gallina	CC1
<b>IZSVE/5502/D15/3 f a</b>	F	107*	Pollo	CC3
<b>IZSVE/5872/D15/3f a</b>	B	108*	Pollo	CC1

<b>IZSVE/3400/D15/1f</b>	D	115*	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/1687/D15/1f</b>	D	118*	Pollo	CC3
<b>IZSVE/2775/MAV16/1 f a</b>	F	21	Pollo	CC3
<b>IZSVE/3490/MAV16/25f a</b>	P°	63	Gallina	CC1
<b>IZSVE/1074/MAV16/15</b>	D	71	Gallina	CC1
<b>IZSVE/1196/MAV16/1f a</b>	D	71	Pollo	CC1
<b>IZSVE/MAV16/1988/34f</b>	D	71	Gallina	CC1
<b>IZSVE/MAV16/2953/28</b>	D	71	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/MAV16/3483/6f</b>	D	71	Gallina	CC1
<b>IZSVE/MAV16/1903/1f</b>	D	71	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/1925/MAV16/36</b>	F	72	Pollo	CC3
<b>IZSVE/1466/MAV16/ 4</b>	D	74	Gallina	Singleton
<b>IZSVE/MAV16/3007/1</b>	C	85	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/554/MAV16/1</b>	C3 -13	110*	Pollo	CC8
<b>IZSVE/1722/MAV16/5</b>	C	120*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/MAV16/1973/1f</b>	D	125*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/400/MAV16/12</b>	Q°	132*	Gallina	Singleton
<b>IZSVE/2316/MAV16/1 f a</b>	O°	133*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/1807/MAV16/2 F</b>	O°	133*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/754/MAV17/5F</b>	D	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/1595/MAV17/3fa ref</b>	P°	63	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/470/MAV17/71f a</b>	D	111*	Pollo	CC3
<b>IZSVE/303/MAV17/23F</b>	D	113*	Pollo	CC3
<b>IZSVE/2005/MAV17/1f</b>	F	114*	Tacchino	Singleton
<b>IZSVE/3681/MAV17/1 II d a</b>	P°	117*	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/1594/MAV17/3f a</b>	C	122*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/3301/MAV17</b>	C	123*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/3214/MAV17</b>	C	124*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/2395/MAV17/2F</b>	D	129*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/3035/MAV17/1f</b>	F	130*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/3304/MAV17/10f a</b>	Q°	132*	Gallina	Singleton
<b>IZSVE/3816/MAV17/5fa</b>	P°	133*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/1588/MAV18/3fa</b>	F	71	Gallina	CC1
<b>IZSVE/1027/MAV18/1</b>	F	71	Tacchino	CC1

<b>IZSVE/1034/MAV18/1</b>	D	71	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/1021/MAV18/1</b>	O°	126*	Gallina	Singleton
<b>IZSVE/7241/VR19/1</b>	D	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/9641/VR19</b>	D	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/10139/VR19</b>	D	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/9684/VR19#</b>	C3 -13	43	Gallina	CC8
<b>IZSVE/11098/VR19</b>	Q°	60	Gallina	CC1
<b>IZSVE/11373/VR19</b>	D	63	Gallina	CC1
<b>IZSVE/3377/MAV19</b>	F	72	Gallina	CC3
<b>IZSVE/MAV19/346</b>	D	119*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/115/MAV19/1fa</b>	O°	133*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/10559/VR19</b>	C	136*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/252MAV19/1f</b>	P°	137*	Gallina	Singleton
<b>IZSVE/6702/VR20</b>	D	21	Tacchino	CC3
<b>IZSVE/5076/VR20#</b>	C3 -13	43	Pollo	CC9
<b>IZSVE/6701/VR20</b>	R°	60	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/6706/VR20</b>	C	88	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/6699/VR20</b>	C	122*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/6704/VR20</b>	C	122*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/2347/VR20</b>	F	140*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/370/VR20</b>	C	141*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/3570/VR20</b>	C	141*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/4742/VR20/2</b>	F	142*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/6700/VR20/1</b>	C	143*	Tacchino	CC3
<b>IZSVE/6707/VR20/1</b>	O°	144*	Gallina	CC1

Nota:

° nuovi tipi ottenuti dopo analisi di sequenza del gene *vlhA*

\*nuovi ST identificati e depositati nel database

# campione proveniente da allevamenti vaccinati

*Tipizzazione basata sul sequenziamento della regione conservata del gene vlhA*

L'analisi di sequenza della regione conservata del gene *vlhA* differenzia i 123 ceppi MS analizzati in 10 tipi: B, C, C3-13, D, F, M, O, P, Q e R (Tabella 1). Tra questi i tipi O, P, Q e R presentano una lunghezza del PRR di 31, 27, 24, 37 amminoacidi rispettivamente e risultano essere di nuova identificazione. L'indice di diversità di Simpson calcolato sui 123 campioni ha un valore di 0.78. Il tipo più rappresentato nella nostra selezione di campioni è il D (44 campioni) seguito dal tipo F (31 campioni). Il tipo

C3-13 attribuito al ceppo vaccinale MS-H è stato riscontrato in campioni provenienti da animali vaccinati ma in due casi, nel campione IZSVE/2010/5711 già discusso in Catania et al., 2016 (10) e nel campione IZSVE/554/MAV16/1, tale tipo non è associato ad animali vaccinati.

### MLST

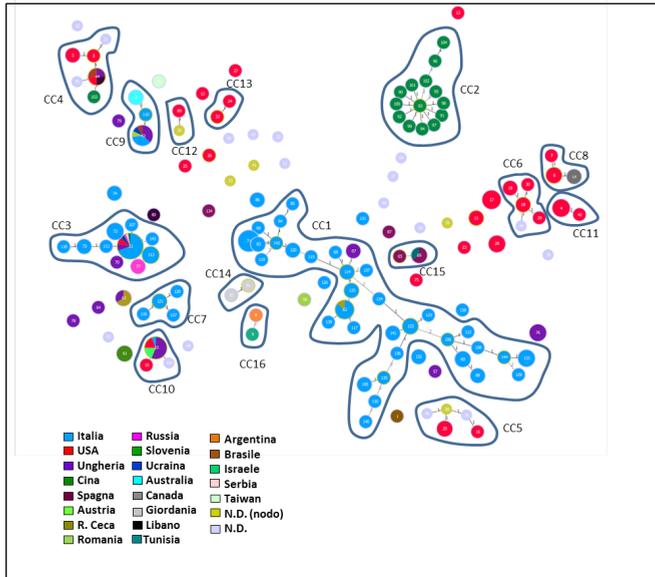
La metodica MLST differenzia i 123 campioni italiani analizzati in 53 ST di cui 37 sono di nuova assegnazione (da ST 105 a 144) (Tabella 1). Tra questi ultimi, alcuni ST derivano da nuove combinazioni alleliche mentre altri presentano nuovi alleli nei geni *adk* (30-31-32-33), *gmk* (28), *nagC* (54-55-57-58), *ppa* (25) e *recA* (34-35-36-37). Tutte le nuove combinazioni e i nuovi alleli sequenziati sono stati depositati nel database *PubMLST*. L'indice di diversità di Simpson ha un valore di 0.93. Per evidenziare la correlazione che sussiste tra i campioni italiani analizzati e il contesto mondiale sono stati estrapolati dal database *PubMLST* i dati relativi a ST di 134 campioni provenienti da 20 Stati. La relazione che si instaura tra i vari ST si può apprezzare nel *minimum spanning tree* (MST) di Figura 1. Abbiamo ottenuto 16 Clonal Complex (CC) e 44 singleton (ST non raggruppabili per similarità allelica). I 123 ceppi italiani analizzati si distribuiscono nei CC: 1, 3, 7, 9 e 10 e in quattro singleton. I 53 ceppi USA si distribuiscono in 9 CC e 10 singleton e condividono ST 10 e ST 21 con i ceppi Italiani. ST 21 risulta essere la combinazione allelica più condivisa tra i vari Stati analizzati e infatti lo ritroviamo in ben 8 differenti Paesi (Italia, USA, Ungheria, Ucraina, Serbia, Austria, Russia e Tunisia). Per gli altri Paesi sono presenti nel database un numero limitato di isolati tipizzati, per cui risulta difficile fare delle considerazioni solide.

L'evoluzione temporale dei ceppi Italiani dal 2010 al 2020 si può apprezzare nel grafico MST di Figura 2. Come si può notare, gli ST 21, ST 71 e ST 63 vengono isolati in quasi tutti gli anni analizzati e sono numericamente rappresentativi della maggior parte dei ceppi analizzati (Tabella 1). Gli altri ST sono meno rappresentati.

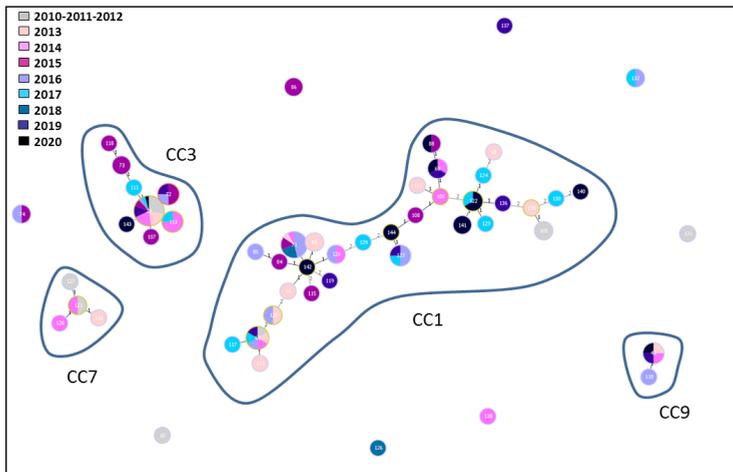
La metodica MLST, avendo un *Simpson Index* più alto, riesce a differenziare i ceppi analizzati in molti più ST rispetto ai tipi derivanti dall'analisi GTS *vlhA* (53 ST contro 10 tipi). E' interessante notare comunque, come già riportato per *Mycoplasma gallisepticum* (11), che a un medesimo genotipo GTS possono essere associati differenti ST e viceversa. Infatti negli ST 21, ST 71, ST 120, ST 133, ST 60 e ST 88 troviamo differenti tipi GTS *vlhA*, e, ad esempio, a campioni con tipo D sono stati assegnati diversi ST.

Tutti i campioni provenienti da allevamenti in cui era stata effettuata la vaccinazione per MS analizzati in questo studio presentano ST 43 e appartengono al CC9 come l'isolato di riferimento MS-H, inoltre è interessante notare che il GTS *vlhA* risulta essere C3-13 dato peraltro già noto (Tabella 1). Di particolare interesse, invece, risultano essere i due isolati IZSVE/2010/5711 e IZSVE/554/MAV16/1, la metodica GTS *vlhA* li classifica come C3-13 mentre l'analisi MLST assegna ai due campioni ST 131 ed ST 110.

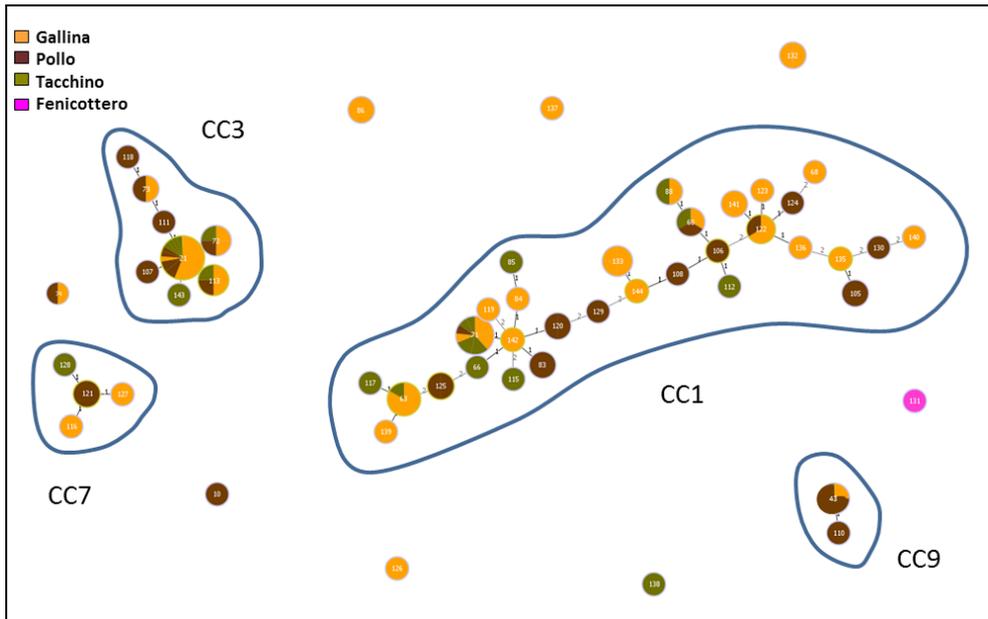
In figura 3, si può apprezzare la distribuzione degli ST rispetto alla specie.



**Figura 1:** MST dei campioni italiani nel contesto mondiale. Il numero scritto all'interno dei cerchi rappresenta il valore ST. Il numero presente nelle linee che collegano i vari ST rappresenta la distanza allelica. La grandezza dei cerchi è proporzionale al numero dei campioni che appartengono a quel ST. Il colore dei cerchi indica Lo Stato di appartenenza.



**Figura 2:** MST dei campioni italiani in cui vengono evidenziati gli anni di isolamento. Il numero scritto all'interno dei cerchi rappresenta il valore ST. Il numero presente nelle linee che collegano i vari ST rappresenta la distanza allelica. La grandezza dei cerchi è proporzionale al numero dei campioni che appartengono a quel ST. Il colore dei cerchi indica l'anno di isolamento del ceppo MS analizzato.



**Figura 3:** MST dei campioni italiani in cui vengono evidenziati le specie di appartenenza. Il numero scritto all'interno dei cerchi rappresenta il valore ST. Il numero presente nelle linee che collegano i vari ST rappresenta la distanza allelica. La grandezza dei cerchi è proporzionale al numero dei campioni che appartengono a quel ST. Il colore dei cerchi la specie aviaria di provenienza dei ceppi.

## DISCUSSIONE

Nel presente studio abbiamo tipizzato con le due metodiche GTS *vlhA* e MLST un totale di 123 ceppi di MS conferiti nel decennio 2010- 2020 per comprendere le specificità dei ceppi circolati nel territorio e rendere facilmente trasferibile il potenziale utilizzo delle metodiche. Una metodica di tipizzazione molecolare riproducibile e con un buon potere discriminatorio può contribuire ad espandere la conoscenza nell'epidemiologia di MS ed essere un valido strumento per implementare i piani di controllo ed eradicazione del patogeno. Il metodo di tipizzazione GTS *vlhA* ha un alto potere discriminatorio (indice di Simpson = 0.78) e riesce a differenziare i 123 ceppi Italiani analizzati in 10 tipi secondo classificazione di Bencina et al.,2001 (2). Di questi, 4 risultano di nuova identificazione, confermando che le proteine di superficie subiscono una maggiore pressione selettiva (11) e possono dare origine a nuovi tipi. Come già visto in precedenza (10) la metodica GTS *vlhA* in certi casi, non è in grado di distinguere il ceppo di campo dal ceppo vaccinale. Nel nostro studio infatti sono due i campioni di campo che potrebbero essere erroneamente classificati identici al ceppo vaccinale (tipo C3-13) senza esserlo realmente (IZSVE/2010/5711 e IZSVE/554/MAV16/1) (Tabella 1). Il metodo di tipizzazione MLST a "7 geni" (3) ha un potere discriminatorio più alto rispetto al GTS *vlhA* (Indice Simpson 0.93) e

riesce infatti a differenziare i 123 ceppi italiani in 53 ST. Inoltre il metodo MLST sembra in grado di distinguere i ceppi vaccinali (MS-H) da quelli di campo in maniera univoca. Tutti gli isolati provenienti da allevamenti vaccinati con MS-H di questo studio ricadono nel ST 43 come il ceppo vaccinale, mentre i due campioni IZSVE/2010/5711 e IZSVE/554/MAV16/1 risultano essere classificati come ST 131 e ST 110 rispettivamente (Tabella 1) e quindi non possono essere considerati identici al ceppo del vaccino in questione. Al ceppo vaccinale MS-live, invece, è stato assegnato l'ST 44 che, ad oggi, non è stato riscontrato nei campioni italiani analizzati.

Sono stati pubblicati altri metodi di tipizzazione MLST per MS (5) ma, per il momento, solo il metodo MLST basato sull'analisi di 7 geni (4) è disponibile nel database pubblico *PubMLST*. La presenza di un database consente non solo di consultare, ma anche di depositare e condividere nuove combinazioni alleliche e nuovi alleli che hanno dato origine a nuovi ST classificando gli isolati in modo univoco e uguale per tutti. Il database *PubMLST* consente anche di confrontare i nostri dati con quelli degli isolati provenienti da altri Stati (Figura 1). Tutti i ceppi disponibili ad oggi su *PubMLST* vengono differenziati in 144 ST differenti che sono raggruppabili in 16 CC e 44 singleton. Gli stati numericamente più rappresentati sono Italia (123 ceppi), USA (54 ceppi), Ungheria (26 ceppi) e Cina (16 ceppi). È interessante notare che il CC1, il più numeroso, contiene solo isolati di origine Europea e il CC2 solo ceppi di origine Cinese, suggerendo con le dovute cautele l'origine ancestrale non comune tra i ceppi rinvenuti nei due CC. Di particolare interesse è sicuramente l'ST 21. Questa combinazione allelica viene attualmente condivisa da ben 8 Stati: Italia, USA, Ungheria, Ucraina, Serbia, Austria, Russia e Tunisia, è l'ST quantitativamente più presente nei ceppi italiani oggetto di questo studio (Tabella 1) e si ritrova in quasi tutti gli anni (Figura 2) a suggerire che sia un ceppo MS estremamente adattato al territorio. Inoltre ST 21 insieme a ST 71, ST 120, ST 133, ST 60 e ST 88, è una di quelle combinazioni alleliche in cui l'analisi GTS *vlhA* riesce a individuare diversi tipi. Questa osservazione suggerisce che l'analisi dei ceppi MS dovrebbe essere effettuata utilizzando metodiche di tipizzazione il più possibile adatte al quesito diagnostico, e lo studio epidemiologico potrebbe o dovrebbe essere effettuato utilizzando entrambe le metodiche di tipizzazione (4). In tal senso l'analisi MLST potrebbe essere utilizzata per posizionare il ceppo isolato all'interno della popolazione, mentre l'analisi GTS *vlhA* potrebbe differenziare ulteriormente la popolazione clonale (4) oppure trovare un sistema misto come proposto da Clavijo et al., 2019 (13) per *Mycoplasma Hyorhinis*.

Infine, dai dati in nostro possesso non si evidenziano specifiche relazioni tra ST e specie o indirizzo produttivo (Figura 3). Gli ST ritrovati in un numero maggiore di ceppi MS come il 21, 63 e 71 sono stati isolati sia da galline, polli che tacchini.

## CONCLUSIONE

In conclusione le due metodiche di tipizzazione di MS valutate in questo studio si rivelano validi strumenti per una valutazione epidemiologica dei ceppi circolanti nel nostro territorio. Una costante analisi dei dati di tipizzazione nel tempo potrà divenire un valido supporto per meglio comprendere ed interpretare le eventuali correlazione tra i differenti focolai e quindi aiutarci a meglio costruire i sistemi o le strategie di contenimento della diffusione del patogeno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Catania, S., Bilato, D., Gobbo, F., Granato, A., Terregino, C., Iob, L., and Nicholas, R. A. (2010). Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian diseases*, 54(2), 961-964.
2. Benčina, D., Drobnič-Valič, M., Horvat, S., Narat, M., Kleven, S. H., and Dovč, P. (2001). Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin. *FEMS microbiology letters*, 203(1), 115-123.
3. Hammond, P. P., Ramírez, A. S., Morrow, C. J., and Bradbury, J. M. (2009). Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing. *Veterinary microbiology*, 136(1-2), 61-68.
4. El-Gazzar, M., Ghanem, M., McDonald, K., Ferguson-Noel, N., Raviv, Z., and Slemmons, R. D. (2017). Development of multilocus sequence typing (MLST) for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 61(1), 25-32.
5. Dijkman, R., Feberwee, A., and Landman, W. J. (2016). Development and evaluation of a multi-locus sequence typing scheme for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Pathology*, 45(4), 426-442.
6. Kreizinger, Z., Sulyok, K. M., Bekő, K., Kovács, Á. B., Gróznér, D., Felde, O., Marton S, Bányai K., Catania S., Bencina D. and Gyuranecz, M. (2018). Genotyping *Mycoplasma synoviae*: Development of a multi-locus variable number of tandem-repeats analysis and comparison with current molecular typing methods. *Veterinary microbiology*, 226, 41-49.
7. Ghanem, M., and El-Gazzar, M. (2018). Development of *Mycoplasma synoviae* (MS) core genome multilocus sequence typing (cgMLST) scheme. *Veterinary microbiology*, 218, 84-89.
8. 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.
9. Francisco, Alexandre P., et al. "Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach." *BMC bioinformatics* 10.1 (2009): 152.
10. Catania, S., Gobbo, F., Ramirez, A. S., Guadagnini, D., Baldasso, E., Moronato, M. L., and Nicholas, R. A. (2016). Laboratory investigations into the origin of *Mycoplasma synoviae* isolated from a lesser flamingo (*Phoeniconaias minor*). *BMC veterinary research*, 12(1), 1-7.
11. Matucci A., Stefani E., Tondo A., Dal Pra M., Quaranta E., Paladino A., Bekò K., Gyuranecz M. and Catania S. Genotipizzazione di *Mycoplasma gallisepticum* tramite metodica MLST: risultati preliminari su campioni da IZSVe. *Atti della Società Italiana di Patologia Aviare* 2019 pag 149-157.
12. Cooper JE and Feil EJ. Multilocus sequence typing—what is resolved? *Trends Microbiol.* 2004;12(8): 373–377.
13. Clavijo, M. J., Sreevatsan, S., Johnson, T. J., and Rovira, A. (2019). Molecular epidemiology of *Mycoplasma hyorhinis* porcine field isolates in the United States. *PloS one*, 14(10).