

VALUTAZIONE DI CEPPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* DI CAMPO E VACCINALI TRAMITE METODICA MULTI LOCUS VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS ANALYSIS (MLVA): RISULTATI PRELIMINARI

Stefani E., Matucci A., Gastaldelli M., Cristovao Borges L., Righetti V., Vianello S., Tondo A., Catania S.

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

Summary

Mycoplasma synoviae (MS) can cause important economic losses in poultry industry. MS infection can be transmitted vertically from breeders to offspring or horizontally among animals from the same farm or from different ones. MS causes synovitis and respiratory diseases mainly in chickens and turkeys. In chicken layers, MS is associated to EAA (Eggshell Apex Abnormality). Strengthening of biosecurity policies, antibiotic treatment and vaccination are the main control strategies applied in the poultry industry. In Italy, two vaccine strains are licensed: MS1 (Nobilis MS live, MSD Animal Health Inc.) and MS-H (Vaxsafe MSH; Bioproperties Ltd., Ringwood, Victoria, Australia) this latter is the most used in industry. Discrimination between vaccine and field strains is crucial in the MS vaccination programs. In the last few years, different molecular typing techniques have been developed to address this issue. The sequence analysis of the conserved tract of the variable lipoprotein and hemagglutinating A (*vlhA*) gene (GTS *vlhA*) is one of the most applied typing methods although in some geographical areas it was shown not to be able to correctly discriminate vaccine from field strains. Other molecular methods were described, but they are all based on sequence analysis. Recently, a MLVA (Multi- Locus Variable Number of tandem repeats) protocol was published. This method showed a good discriminatory power, and it is more economic and rapid than sequence-based typing methods. We then decided to investigate its discriminatory power in particular to distinguish vaccine from field MS strains. In this study, we analyzed 117 field strains collected from 2012 and 2021 and 45 MS-H-like strains isolated from vaccinated chickens. Respect to the previously published protocol, our approach consisted in the analysis of 6 tandem repeats *loci* (6 *loci*-MLVA). The 117 field strains were clustered into 19 GTs (genotypes) while the 45 MS-H-like strains were all described as GT3, the same genotype of the reference MS-H vaccine strain. No field strains were co-clustered with the vaccine-like ones. Differently, GTS-*vlhA* grouped the field strains into 14 different types, and MS-H like strains into a unique type (C3-13). However, it classified as C3-13 one known field strain isolate. In conclusion, our preliminary data showed that the 6 *loci*-MLVA is an economic diagnostic tool that may rapidly distinguish MS-H-like from field strains.

INTRODUZIONE

Mycoplasma synoviae (MS) è un microrganismo considerato patogeno e che può provocare ingenti 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 sinoviti e forme respiratorie principalmente in polli e tacchini, nelle galline ovaiole è correlato al calo di deposizione e del peso medio delle uova e può anche dare origine all'anormalità dell'apice dell'uovo (EAA) con conseguenti perdite economiche (1). Per contenere l'impatto negativo di MS e della sua diffusione, vengono applicate negli allevamenti strategie di potenziamento della biosicurezza, mentre in caso di positività eventuali trattamenti antibiotici possono contribuire a mitigare l'impatto dell'infezione sulle performance. Nella specie pollo, per ridurre sia l'infezione che la trasmissione possono essere applicati piani vaccinali con ceppi vivi e attenuati. In Italia, attualmente risultano essere autorizzati due differenti vaccini commerciali, il vaccino MS1 (Nobilis MS live, MSD Animal Health Inc.) ed il vaccino MS-H (Vaxsafe MSH; Bioproperties Ltd., Ringwood, Victoria, Australia). Quest'ultimo risulta essere quello maggiormente utilizzato nel settore avicolo italiano (galline ovaiole o polli riproduttori). Distinguere routinariamente tra ceppo vaccinale e ceppi di campo diventa quindi fondamentale nei programmi di controllo diagnostico. Nel corso degli ultimi anni, differenti metodiche molecolari sono state messe a punto a tale scopo. 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 è utilizzato per distinguere i ceppi vaccinali da quelli di campo, ma, è stato più volte dimostrato (4-5), che in alcune aree geografiche non sempre è in grado di discriminare i ceppi in maniera corretta a causa della presenza di ceppi selvatici che presentano lo stesso tipo del ceppo vaccinale. Per MS sono state pubblicate anche altre metodiche molecolari come MLST (Multi-Locus Sequence Typing) (6, 7), basate sull'amplificazione e sequenziamento di diversi geni *housekeeping* che risultano avere un alto potere discriminatorio, ma i tempi di analisi ed i costi associati, possono rappresentare un limite per la loro applicazione in sistemi routinari di screening. Recentemente è stata pubblicata una metodica molecolare MLVA (Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis) (5) che oltre ad avere un buon potere discriminatorio nel differenziare i ceppi di MS si è rivelata utile per la discriminazione tra ceppi vaccinali e ceppi di campo. Il metodo MLVA si basa sull'amplificazione di determinati *loci* di DNA contenenti un numero caratteristico di *tandem repeats* (TR). Dalla dimensione finale dell'amplificato si deduce il numero di TR nel *locus* amplificato. La combinazione del numero di TR presenti in ogni *locus* di ogni campione analizzato definisce lo specifico profilo genotipico GT. Questa metodica, grazie anche all'impiego di strumentazioni di elettroforesi capillare che rendono la valutazione del numero di TR presenti nei *loci* sempre più precisa e rapida, risulta essere più economica e rapida delle precedenti e quindi un ulteriore strumento laboratoristico per il controllo e verifica dei gruppi vaccinati. Nel presente lavoro viene valutato l'impiego di un protocollo MS-MLVA parzialmente modificato per discriminare ceppi di MS isolati da gruppi di animali provenienti da allevamenti vaccinati e non.

MATERIALI E METODI

Selezione dei campioni

Sono stati selezionati 117 ceppi di MS di campo provenienti da allevamenti non

vaccinati pervenuti tra il 2012 e il 2021 nei nostri laboratori e 45 ceppi di MS “reisolati” da allevamenti di pollo vaccinati pervenuti tra il 2015 e il 2017.

Come ceppi di riferimento sono stati utilizzati i ceppi vaccinali MS-H (Vaxsafe MSH), MS1(Nobilis® MS Live) e il ceppo WVU1853 (Tabella 1). Le specie avicole incluse nel lavoro sono: pollo, tacchino e un fenicottero (ceppi di campo) (Tabella 2), pollo per i ceppi vaccinali. I ceppi di campo provengono soprattutto dall'Italia (Tabella 2).

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.

MLVA

La genotipizzazione dei ceppi di MS è stata eseguita seguendo il protocollo a pannello modificato di Kreizinger et. al., 2018 (MLVA a 6 *loci*) (5). I *loci* MS319 e MS578 identificati nel protocollo originale non sono stati inclusi, mentre MS547, MS834 e MS837 sono stati amplificati con set di primer modificati nel *reverse* (Tabella 3). È stato inoltre identificato, usando “Tandem Repeats Finder program” (Benson 1999), ed inserito un ulteriore *locus* (MS531). L'amplificazione dei vari *loci* è stata eseguita con il kit Promega Go Taq Polymerase in un volume di 20 μ l utilizzando 5 μ l di 5x Buffer, 2,5 μ l of MgCl₂, 1 μ l di dNTPs 10 mM, 0,2 μ l di Taq Polymerase e 1 μ l di ogni primer (10 mM). Il ciclo di amplificazione utilizzato prevedeva uno *step* a 95°C per 5' seguito da 35 cicli a 95°C per 30 sec, 56°C per 30 sec e 72°C per 45 sec. L'elongazione finale è di 72°C per 5 min. Per il *locus* MS531 la temperatura di annealing è di 58°C. La lunghezza degli ampliconi è stata valutata con l'elettroforesi capillare Qiaexcel Advanced Systems (Qiagen) utilizzando il kit Qiaexcel DNA Resolution kit e il metodo OM800 secondo le istruzioni suggerite dalla ditta. Il marker di lunghezza e di allineamento utilizzati sono stati il QX size marker 50-800 bp e il QX alignment marker 15 bp/1kb (Qiagen). Per ogni *locus* di ciascun ceppo è stato assegnato un numero corrispondente al numero di TR presenti, dedotto dalle dimensioni dell'amplificato e confermato dal sequenziamento. Alla stringa numerica che ne deriva è stato assegnato un GT (genotyping) numerico (Tabella 4).

*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). La reazione di PCR è stata eseguita 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'. Ad ogni ceppo analizzato mediante analisi GTS-*vlhA* è stato assegnato un “tipo” rappresentato da una lettera dell'alfabeto corrispondente al numero di amminoacidi che compongono la regione ricca in proline (PRR) e la regione in 3' come precedentemente descritto (2, 3, 8 e 9).

Sequenziamento

Il sequenziamento degli amplificati di interesse è stato effettuato 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 (10).

RISULTATI

Sono stati sottoposti a tipizzazione 45 campioni di “reisolati” MS derivanti da allevamenti noti per essere stati vaccinati con ceppo MS-H ed ulteriori 117 ceppi di MS provenienti da allevamenti non vaccinati (campioni di campo) (Tabella 2). pervenuti nei nostri laboratori tra il 2012 e il 2021. Sono state impiegate due metodiche molecolari, GTS-*vlha* già descritta (2-3) e una nuova metodica MLVA a 6 *loci*. I campioni di campo analizzati provengono per la maggior parte da allevamenti italiani e comprendono specie e categorie produttive differenti (Tabella 2).

Il protocollo MLVA prevede l’amplificazione di 6 regioni contenenti dei putativi TR (Tabella 3) e la valutazione del numero di TR dedotto dalle dimensioni ottenute dall’amplificazione nei vari *loci* con elettroforesi capillare è stato confermato anche tramite sequenziamento. Le combinazioni (GT) ottenute dal conteggio dei TR presenti nei vari *loci* può essere apprezzato in Tabella 4. GT1, GT2 e GT3 sono stati associati ai genotipi di WVU1853, MS1 e MS-H rispettivamente (Tabella 1), ed utilizzati come riferimenti. Tutti i campioni “reisolati” vaccinali MS-H sono risultati tipo C3-13 con metodica GTS-*vlha* e GT3 con metodica MLVA a 6 *loci* come atteso (Figura1). I campioni di campo di MS vengono suddivisi in 14 tipi in base alla metodica GTS-*vlha*, e in 19 GT in base alla metodica MLVA (Figura 1). I GT numericamente più rappresentati della maggior parte dei ceppi di campo analizzati sono GT4 (28 ceppi, 23.7%) e GT6 (26 ceppi, 22%) (Figura 1). Gli altri GT risultano numericamente meno rappresentati. Come si può notare in Figura 1, e come già riportato anche per la metodica MLST (9), in un medesimo GT si possono trovare differenti GTS e viceversa. Il GT6, uno dei genotipi numericamente più rappresentato, viene suddiviso in ben 8 tipi dalla metodica GTS-*vlha*, mentre il GT4 è popolato solo da ceppi D ed F. In Figura 1, è interessante anche notare come nessuno dei ceppi di campo analizzati risulta invece GT2 o GT3, genotipi associati ai ceppi vaccinali autorizzati nel territorio italiano (Tabella 1). Il ceppo MS isolato da Fenicottero risulta secondo la tipizzazione GTS-*vlha* appartenere al tipo C3-13 (sequenza del gene *vlha* omologa al ceppo MS-H) mentre con la metodica MLVA a 6 *loci* viene classificato con genotipo GT8.

Tabella 1: Ceppi MS utilizzati come riferimento del presente lavoro e loro relative tipizzazioni.

Sample ID	Tipo (<i>vlhA</i>)	GT (MLVA)
WVU1853	A	1
MS1	A	2
MS-H	C3-13	3

Tabella 2: Anno, provenienza e categoria produttiva dei ceppi MS di campo analizzati

ANNO	ITALIA			GIORDANIA	LIBANO	SPAGNA	TAIWAN	TUNISIA	TOTALE
	Pollo	Fenicottero	Tacchino	Pollo	Pollo	Pollo	Pollo	Pollo	ANNO
2012	6		1					2	9
2013	7		5	2	2		1		17
2014	10	1	5						16
2015	14		2			1			17
2016	9		3			3			15
2017	6		2						8
2018	4		2						6
2019	5								5
2020	7		5						12
2021	12								12
TOTALE	80	1	25	2	2	4	1	2	117

Tabella 3: Sequenza dei primer e caratteristiche dei *loci* del protocollo MLVA a 6 geni.

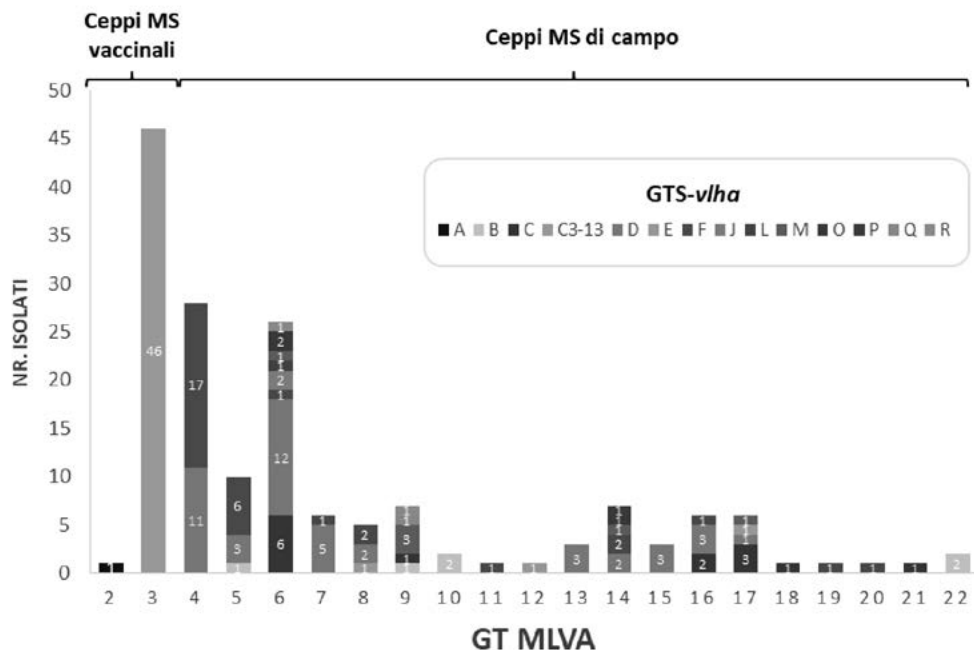
Locus	Posizione nel genoma (bp)	Lunghezza TR (bp)	Sequenza del TR	Lunghezza amplificato (bp)	Sequenza primer
MS233	223491-223538	9	AAAATACCR	150-160	<i>MS233tr6-F*</i> TTAGACTACTACGATCTAAAAGCCTTG <i>MS233tr6-R*</i> CCTGGTGCAACTGCAGATGC
MS531	531545-532059	15	TTTTGATCTAAAAA	500-530	<i>MS531tr16-F</i> TATCAAAAATTCTAATGAAAATGTGAAA <i>MS531tr16-R</i> TGATAYGAAGGAATTATGAATGRCC
MS547	547242-547576	12	GAYGAAGAAGAA	150-160	<i>MS547tr17-F*</i> GATTATTAGATGAAGACGATT <i>MS547tr17-R</i> CCGATTCAACGCATGTATCATT
MS682	681627-681638	12	TCTGATTTTCT	320-370	<i>MS682tr21-F</i> GATCTAGTTGATTGATAAATCTTGAAGG <i>MS682tr21-R</i> GCTTCAACAACCTTAAAGCTGATGC
MS834	833877-833917	21	TTATGTTTAT- CAATTCATT	221	<i>MS834tr23-F*</i> GGCAATTC AAGGATTTATTGAGCA <i>MS834tr23R</i> AAGAAGCGATACTTAGATCAGGACAC
MS837	837499-837529	15	TTTATATTACATT	242	<i>MS837tr24-F*</i> GCACTTATATTTCTGTGATAGTTG <i>MS837tr24-R</i> AGCAATCCGCAAATGTTGC

* Kreizinger et. al., 2018 (5)

Tabella 3: Numero di TR per ogni locus e corrispondente GT. (0 = no amplificazione)

GT	MS223	MS531	MS547	MS682	MS834	MS837
1	2	2	2	2	1	0
2	2	2	2	2	1	1
3	1	1	2	3	1	1
4	2	1	2	1	0	0
5	2	0	2	1	0	0
6	2	0	2	1	1	1
7	2	0	2	1	0	1
8	2	1	2	1	0	1
9	2	0	0	1	0	0
10	2	1	2	2	1	0
11	2	0	2	2	0	0
12	2	0	2	3	0	0
13	1	1	2	1	1	1
14	2	1	2	1	1	1
15	1	1	2	1	0	0
16	2	0	0	1	0	1
17	2	0	0	1	1	1
18	2	0	2	4	1	1
19	2	0	1	1	1	1
20	2	0	1	1	1	0
21	1	0	2	1	0	0
22	2	3	2	3	0	1

Figura 1: Distribuzione del numero di ceppi MS in base alla tipizzazione ottenuta con metodica MLVA a 6 loci e GTS-*vlha*, il numero interno alla barra indica il numero di ceppi. Sono stati inclusi anche i ceppi di riferimento MS-H (GT3) e MS1 (GT2).



DISCUSSIONE

Nel presente studio abbiamo impiegato una nuova metodica MLVA a 6 loci su 117 ceppi di MS provenienti da allevamenti non vaccinati pervenuti nei nostri laboratori tra il 2012 e il 2021 e su 45 ceppi di MS “reisolati” da allevamenti vaccinati pervenuti tra il 2015 e il 2017, con l’obiettivo di dimostrare la capacità discriminatoria della metodica MLVA nei confronti dei differenti isolati, ma anche tra questi ultimi ed i ceppi vaccinali utilizzabili nel territorio italiano. Il protocollo MLVA da noi implementato deriva da quello pubblicato da Kreizinger et. al., 2018 (5) ma modificato in alcuni loci e primer di amplificazione. La metodica MLVA, a differenza delle comuni metodiche di tipizzazione (MLST e GTS-*vlha*), si basa sulla valutazione della dimensione degli amplificati e nella routine, non prevede una fase di sequenziamento consentendo quindi una più rapida processazione ed analisi del campione. La refertazione del campione può essere eseguita in giornata rendendo il metodo utile come sistema di controllo su gruppi di animali vaccinati. Questo protocollo MLVA ha un potere discriminatorio simile alla metodica GTS-*vlha* suddividendo i ceppi di MS di campo analizzati in 19 GT contro i 14 tipi GTS-*vlha*. I GT maggiormente rappresentati dai ceppi di MS da noi analizzati sono il GT4 e il GT6. La distribuzione dei GT ottenuti con il protocollo MLVA a 6 loci rispetto al GTS-*vlha* ci fa notare come uno stesso GT possa essere diviso in più tipi

e viceversa. Questa osservazione è già stata riscontrata anche in altri lavori (4 e 9) e suggerisce che l'analisi epidemiologica ed una genotipizzazione dovrebbero sempre preferibilmente essere associate all'utilizzo di più metodiche per meglio classificare un ceppo. Tra i ceppi di campo analizzati abbiamo inserito il ceppo di fenicottero già discusso in Catania et al, 2016 (4). Questo ceppo di MS, isolato da un fenicottero presente in un parco zoologico locale e non vaccinato, è risultato dopo analisi GTS-*vlha* possedere lo stesso tipo C3-13 del ceppo vaccinale MS-H. Già in altri lavori (4 e 5) è stato evidenziato che la tipizzazione GTS-*vlha* non sempre riesce a discriminare i ceppi di MS di campo da quelli vaccinali. La metodica MLVA a 6 loci assegna a questo ceppo il genotipo GT8, differente dal GT3 che è invece associato al MS-H ed ai suoi "resiolati". Questo risultato conferma quello ottenuto con l'analisi MLST (9) che attribuiva al campione MS di fenicottero l'ST131, differente dall'ST vaccinale (ST43) classificandolo dunque, come già proposto in precedenza, ceppo di campo.

Allo stesso tempo la metodica tipizza correttamente i 45 ceppi di MS "reisolati" da allevamenti vaccinati assegnando loro il genotipo GT3, lo stesso genotipo appartenente al ceppo vaccinale MS-H. Su tali basi il metodo risulta essere un ottimo candidato per le attività di monitoraggio e screening dei gruppi avicoli vaccinati finalizzato ad individuare l'effettiva presenza del ceppo vaccinale, ma nel contempo evidenziare eventuali infezioni di campo. Per quanto riguarda il ceppo vaccinale MS live abbiamo un'ottima discriminazione sul ceppo di riferimento, mentre occorrerà avere una maggiore casistica sui gruppi vaccinati con tale ceppo che purtroppo attualmente non abbiamo.

CONCLUSIONE

I nostri risultati suggeriscono che il protocollo MLVA a 6 loci è una metodica rapida, economica che permette la chiara discriminazione tra ceppi vaccinali e ceppi di campo. Tale metodica in particolare riesce a coniugare le necessità di rapidità ed efficacia per gli screening di valutazione di effettiva vaccinazione ed eventuale infezione con ceppi di campo, superando i limiti della metodica GTS-*vlhA* (false attribuzioni a ceppi vaccinali) ed evitando passaggi di sequenziamento tipici della metodica MLST. Ulteriori indagini di approfondimento per una completa validazione sono in corso.

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. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Moronato ML, Cecchinato M, Facchetti G, Mainenti M, Gobbo F, Catania S. Application of different laboratory techniques to monitor the behaviour of a *Mycoplasma synoviae* vaccine (MS-H) in broiler breeders. *BMC Vet Res*. 2018 Nov 20;14(1):357
9. Stefani E., Matucci A., Tondo A., De Grandi G., dal Pra M., Gastaldelli M., Catania S. Tipizzazione molecolare di isolate italiani di *Mycoplasma Synoviae*: risultati preliminari. *Atti della società di Patologia Aviare 2020: LIX Convegno Annuale e V Simposio Scientifico*. 193-204.
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.