



SOCIETÀ ITALIANA DI DIAGNOSTICA DI LABORATORIO VETERINARIA

XVII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.

VOLUME DEGLI ATTI

*Pacengo di Lazise (VR), 28 - 30 Settembre 2016
Hotel Parchi del Garda*

**SOCIETÀ ITALIANA
DI DIAGNOSTICA DI LABORATORIO VETERINARIA**

XVII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.

Pacengo di Lazise (VR)

Hotel Parchi del Garda

28 - 30 Settembre 2016

VOLUME DEGLI ATTI

INDICE

PREFAZIONE	7
COMITATI	9
PROGRAMMA FINALE	11
RELAZIONI AD INVITO	17
COMUNICAZIONI LIBERE	25
POSTER 01 BENESSERE ANIMALE	101
POSTER 02 EPIDEMIOLOGIA/ANALISI E COMUNICAZIONE DEL RISCHIO	109
POSTER 03 GENOMICA	127
POSTER 04 IMMUNOLOGIA E VACCINI	147
POSTER 05 SANITÀ ANIMALE	155
POSTER 06 SICUREZZA ALIMENTARE	251
POSTER 07 ZONOSI/MALATTIE TRASMESSE DA VETTORI	325
INDICE DEGLI AUTORI	349

032 DEVELOPMENT OF A REAL-TIME PCR FOR DETECTION OF MYCOPLASMA AGALACTIAE IN BULK TANK MILK SAMPLES AND EPIDEMIOLOGY OF INFECTION IN SARDINIA

Keywords: Mycoplasma agalactiae, Real-Time PCR, Epidemiology

Carta T.^[1], Mannu F.^[2], Fadda M.^[1], Ibba I.^[3], Muggianu D.^[3], Turrini F.^[2], Pittau M.^[1], Chessa B.^[1]

^[1]Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari ~ Sassari ~ Italy, ^[2]Nurex s.r.l. ~ Sassari ~ Italy,

^[3]Associazione Regionale Allevatori Sardegna (ARAS) ~ Oristano ~ Italy

SUMMARY:

In this work the Mycoplasma agalactiae p48 gene was used as a diagnostic marker for contagious agalactia (CA) of sheep and goats by Real-Time PCR. The p48 gene encodes an invariable, constantly expressed, immunodominant surface lipoprotein belongs to the basic membrane protein family. The Real-Time PCR test based on p48 resulted specific and sensible. The test performance were evaluated on bulk tank milk samples collected from 1064 ovine and 66 goat farms in sardinian region. 4.8% of sheep farms and 4.5 % of goat farms tested positive. Our results showed that the test based on the p48 gene can be used on bulk tank milk for detection and epidemiological surveillance of Mycoplasma agalactiae infections.

INTRODUZIONE:

L'Agalassia Contagiosa (AC) è una malattia cosmopolita ad andamento epidemico che colpisce i piccoli ruminanti. L'agente eziologico è il Mycoplasma agalactiae. La malattia provoca mastiti, con brusche riduzioni della produzione di latte, artriti, cheratoconjuntiviti e aborto. I danni economici causati dalla AC sono molto rilevanti, per questo è compresa nella lista delle malattie soggette a denuncia nel regolamento di polizia veterinaria. Il trattamento antibiotico permette solo un miglioramento dello stato generale degli animali trattati che continuano comunque a eliminare micoplasmici con il latte. In numerosi paesi sono in atto piani di eradicazione e di controllo ma, a causa della rapida diffusione e della lunga persistenza negli allevamenti infetti, gli strumenti di profilassi sanitaria e immunizzante non permettono di controllare in maniera soddisfacente la diffusione della patologia (Bergonier et al. 1997; Corrales et al., 2007). La disponibilità di metodiche diagnostiche che permettano una rapida ed economica identificazione degli allevamenti in cui Mycoplasma agalactiae continua a circolare può rappresentare un valido strumento per il monitoraggio epidemiologico e per approntare misure di profilassi sanitaria più efficaci.

Scopo di questo lavoro è stato quello di allestire un kit diagnostico in Real-Time PCR basato sul gene codificante per la lipoproteina P48 di Mycoplasma agalactiae e mettere a punto un protocollo di estrazione automatizzato a partire da 300 µl di latte di massa. Il sistema, dopo validazione in vitro, è stato utilizzato per un'indagine epidemiologica su allevamenti ovini e caprini in Sardegna.

Approximate gene copy number	pVax/p48 in TE dilution	pVax/p48 in Milk dilution
	CT value ±SEM	CT value ±SEM
1x10 ⁷	12,92 ±0,46	16,87 ±0,05
1x10 ⁶	16,45 ±0,11	20,12 ±0,66
1x10 ⁵	19,70 ±0,18	23,18 ±0,51
1x10 ⁴	23,62 ±0,56	26,47 ±1,06
1x10 ³	26,08 ±0,13	29,86 ±1,34
1x10 ²	29,92 ±0,40	31,44 ±0,78
1x10 ¹	32,68 ±1,09	33,30 ±0,59
1	35,71 ±0,99	N/A

Tab.1- Valori medi di CT su un totale di 3 repliche per ciascuna diluizione

MATERIALI E METODI:

- Costruzione delle sonde e Real-Time PCR

Primers e sonda sono stati costruiti sulla sequenza del gene p48 di Mycoplasma agalactiae, una lipoproteina di membrana immunodominante, sempre espressa e non variabile (Rosati et al., 1999). Un altro set di primers e sonda è stato costruito sul gene codificante per la β-actina dei ruminanti (GenBank IDAY141970) che è stato scelto come controllo interno della reazione.

Le concentrazioni di primers e sonde sono state aggiustate per ottenere il miglior segnale di fluorescenza e il minimo background aspecifico. È stata così allestita una multiplex Real-Time PCR con sonda MGB-p48 e con sonda marcata HEX per la β-actina come controllo interno più i rispettivi primers. Tutte le reazioni sono state approntate in un volume di 25 µl che comprendeva: Buffer 10X, dNTPs (10mM), MgCl2 (25mM), Primer forward (10 µM), Primer reverse (10 µM), sonda MGB P48 (100 nM), sonda β-actina (100 nM), Gold TaqMan (1.25 U) e 5µl di DNA (50 ng/µl). Per l'amplificazione è stato utilizzato il termociclatore Cfx (Biorad) con il seguente programma: 40 cicli di 95°C per 15 sec, 57°C per 30 sec e 72°C per 30 sec.

- Test di sensibilità e specificità

La specificità del sistema è stata valutata attraverso amplificazione di 20 ng di DNA genomico estratto da diversi isolati di campo e ceppo di referenza PG2 di Mycoplasma agalactiae e da altre specie di micoplasmici: M. spumans, M. arthritidis, M. bovis, M. capricolum, M. Gypis, M. hominis, M. mycoides subsp. capri, M. salivarum, M. congiuntivae.

La sensibilità del test è stata valutata attraverso diluizioni scalari di un plasmide (pVAX1) in cui era stato clonato il gene p48. Le diluizioni sono state fatte in parallelo in H2O milliQ e in latte (da cui è stato estratto il DNA con il sistema automatizzato descritto in seguito) e successivamente amplificate in tre PCR indipendenti per ogni diluizione.

- Scelta e raccolta campioni di latte di massa ed estrazione automatizzata del DNA

L'indagine biomolecolare descritta in questo lavoro è stata condotta su campioni di latte massale destinati al laboratorio dell'Associazione Regionale Allevatori della Sardegna (ARAS) per i controlli di qualità. I campioni sono stati raccolti tra la primavera del 2014 e quella del 2015 da 1064 aziende ovine (8,5% degli allevamenti) e 63 aziende caprine distribuite nell'isola (Fig. 1a).

Per l'estrazione del DNA da latte di massa è stato utilizzato un estrattore automatico per acidi nucleici sviluppato dalla Nurex s.r.l. Il processo di estrazione è basato sull'utilizzo di biglie paramagnetiche ad alta affinità per gli acidi nucleici. L'efficienza dell'estrazione è stata valutata comparando il sistema con analoghi commerciali automatizzati o su colonnina. Il campione di latte massale utilizzato per l'estrazione è stato di 300 µl. Il DNA estratto è stato successivamente amplificato seguendo il protocollo descritto.

Una quota degli allevamenti positivi al test p48 sono stati ricon-

trollati attraverso indagine microbiologica e PCR con primers specifici (Tola et al., 1996) su latte individuale e di massa per confermare la positività.

La visualizzazione della distribuzione geografica degli allevamenti, dei campioni e dei risultati della Real-Time PCR è stata effettuata tramite software GIS (ESRI ARCGIS 10.3)

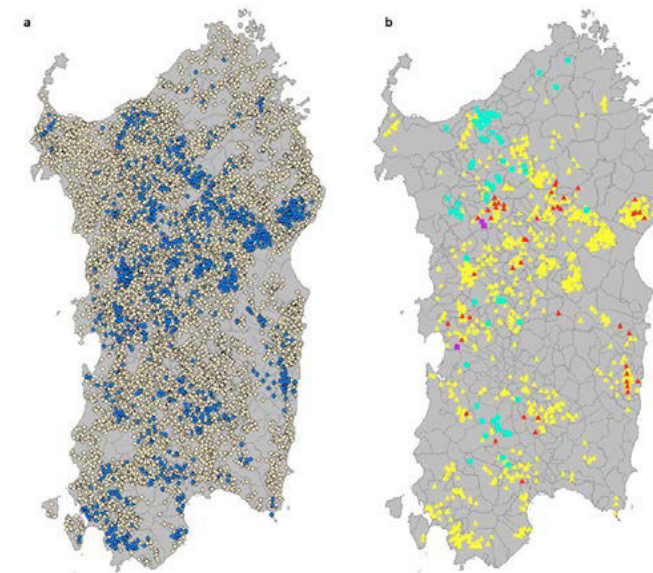


Fig. 1 - Mappe GIS degli allevamenti e risultati della Q-PCR a) in grigio sono raffigurati gli allevamenti totali, in blu gli allevamenti testati; b) in giallo sono raffigurati gli allevamenti ovini negativi e in rosso quelli positivi; in verde gli allevamenti caprini negativi mentre in viola quelli positivi.

RISULTATI E CONCLUSIONI:

In questo lavoro è stato utilizzato il gene codificante per la P48 di Mycoplasma agalactiae come marker diagnostico per l'agalassia contagiosa delle pecore e delle capre.

Il test impiegato ha mostrato elevata specificità, avendo amplificato solamente il DNA proveniente da M. agalactiae. Nessun segnale è stato rilevato per gli altri micoplasmici utilizzati nella prova, compreso il M. bovis. I risultati del test di sensibilità (Tab.1) hanno evidenziato che l'amplificazione si realizzava quando il numero di copie del gene bersaglio era tra 1 e 10 per le diluizioni del plasmide in TE e superiori a 10 per le diluizioni con il latte; il coefficiente di regressione (R2) era di 0,994 e di 0,943 rispettivamente.

Sono risultati positivi 51 allevamenti ovini e 3 caprini, pari rispettivamente al 4,8 % ed al 4,5% degli esaminati (Tab.2 e Fig.2b).

Gli allevamenti positivi sottoposti a controllo microbiologico e PCR specifica su latte individuale e di massa hanno confermato la presenza di M. agalactiae.

Dal punto di vista epidemiologico, la distribuzione delle zone infette e indenni risulta a gruppi, costituendo clusters meglio evidenziabili nelle aree più campionate, sia per i comparti ovino che caprino che risultano altresì sovrapponibili come esiti.

I risultati ottenuti in questo lavoro dimostrano che il test basato sul gene p48 è specifico e sensibile e può essere utilizzato sul latte di massa come strumento di monitoraggio epidemiologico delle infezioni sostenute da Mycoplasma agalactiae al fine di realizzare un sistema di controllo sanitario permanente e ottimizzare le misure di profilassi di questa patologia a elevato impatto economico sul territorio.

Province	Total N° of flocks	Total N° of ewes	N° of tested flocks	N° of ewes	N° PCR positive flocks	% PCR positive flocks
SS	2.914	843.301	183	57.774	17	9.28
OT	865	151.784	20	7.885	0	0
NU	2.819	725.170	337	85.244	9	2.67
OG	520	66.087	66	14.856	8	12.1
OR	2.357	518.955	174	55.294	9	5.17
VS	700	224.374	50	16.827	3	6
CI	708	147.007	71	12.857	0	0
CA	1.704	428.761	143	39.938	5	3.5
	12.587	3.105.439	1064	290.675		

Tab. 2 - Numero degli allevamenti testati e numero dei positivi nelle diverse province sarde.

BIBLIOGRAFIA:

Bergonier D., et al. 1997 - Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot. 16, 848-873.
Corrales J.C., et al. 2007 - Small Rumin. Res. 68, 154-166.
Rosati S., et al. 1999 - Infect. Immun. 67, 6213-6216.
Tola et al., 1997 - Vet Microbiol. Jan;54(1):17-22.

