

Ricerca Corrente IZS SA 04/11

Responsabile Dr.ssa Tola Sebastiana

(sebastiana.tola@izs-sardegna.it)

Scadenza del progetto 14/03/2014

Determinazione della vitalità del *Mycoplasma agalactiae* in campioni di latte ovino mediante immunocattura

Relazione finale

Dott.ssa Sebastiana Tola

Responsabile U.O.n° 1




Ricerca finanziata dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali; Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti

Indice generale ed elenco

Introduzione	pag	4
Materiali e metodi	pag	5
Risultati	pag	9
Discussione	pag	10
Bibliografia	pag	12

Elenco dei collaboratori

U.O. n°1

-  -Dr.ssa Tola Sebastiana- Dirigente sanitario-Coordinamento
-  -Dr.ssa Cillara Grazia- Tecnico di laboratorio- Analisi di laboratorio
-  -Dr.ssa Giovanna Sanna- Biotecnologa borsista- Ricerca e analisi di laboratorio

Sommario

Con questa ricerca abbiamo sviluppato un nuovo metodo per rilevare la presenza di *Mycoplasma agalactiae* vivi. Anticorpi policlonali contro due proteine di membrana esterna (P80 e P55) di *M. agalactiae* sono stati coniugati covalentemente a biglie magnetiche (BM) per formare BM-Ab80 e BM-Ab55. I micoplasmi sono stati catturati mediante la formazione di uno specifico legame antigene-anticorpo e concentrati mediante cattura magnetica. La cattura immunomagnetica è stata utilizzata per isolare e concentrare *M. agalactiae* in diluizioni seriali decimali e in campioni di latte contaminati artificialmente in modo da applicare, successivamente, la PCR. Un frammento da 375-bp è stato amplificato utilizzando un set di primers specifici per *M. agalactiae*. Il “limit of detection” del metodo IMC-PCR è risultato essere compreso tra 10 e 10² CCU/ml, quando i micoplasmi sono stati risospesi in PBS, e di 10² - 10³ CCU/ml quando i micoplasmi sono stati risospesi in latte ovino. In questo studio, abbiamo applicato il metodo IMC-PCR anche a 516 campioni di latte provenienti da allevamenti con sospetta agalassia contagiosa. La sua performance è stata confrontata con quella ottenuta dalla semina dei campioni di latte in piastre di agar Hayflick, terreno selettivo per micoplasmi. Questa ricerca ha dimostrato, per la prima volta, l'uso di un metodo di IMC-PCR rapido e affidabile per evidenziare la presenza di *M. agalactiae* vivi e vitali in campioni di latte ovino.

Abstract

In this study, a method to detect viable *Mycoplasma agalactiae* was developed. Polyclonal antibodies against two *M. agalactiae* membrane surface proteins (P80 and P55) were covalently conjugated to magnetic beads (MBs) to form MB-Ab80 and MB-Ab55. *M. agalactiae* cells were captured by a specific antigen-antibody reaction and magnetic separation. Immunomagnetic capture (IMC) was used to isolate and concentrate *M. agalactiae* in serial decimal dilutions and in artificially contaminated milk to facilitate subsequent detection by PCR. A 375-bp fragment of *M. agalactiae* was amplified by using a pair of *M. agalactiae*-specific primers in PCR. The limit of detection of IMC-PCR method ranged from 10 to 10²CCU/ml when mycoplasmas were resuspended in PBS and from 10² to 10³ CCU/ml when mycoplasmas were resuspended in uncontaminated ovine milk. This study also describes the application of IMC-PCR method to test for *M. agalactiae* in 516 milk samples collected from sheep with suspected contagious agalactia. Its performance was evaluated relative to culture. This report has demonstrated for the first time, the effective use of rapid and reliable IMC combined with PCR assay for detection of viable *M. agalactiae* in routine sheep milk samples.

INTRODUZIONE

Il *Mycoplasma agalactiae*, batterio privo di parete appartenente alla classe *Mollicutes*, è ritenuto il principale agente eziologico responsabile dell'agalassia contagiosa (AC) nei piccoli ruminanti. La malattia ha una distribuzione cosmopolita anche se è prominente nel bacino Mediterraneo (Corrales *et al.*, 2007). AC è caratterizzata principalmente da mastite, artrite e cheratocongiuntivite e, occasionalmente da aborto e polmonite. Le infezioni riconducibili a *M. agalactiae* possono causare agalassia e, pertanto, riduzione della produzione di latte e formaggio e, conseguentemente, delle importanti perdite economiche specialmente in quelle aree la cui economia è largamente basata sull'allevamento dei piccoli ruminanti. A causa della sua importanza in medicina veterinaria, l'AC è inserita dal World Organization for Animal Health (OIE) nell'elenco delle malattie sottoposte a denuncia. La notifica della malattia deve essere fatta dagli stati membri in accordo con le linee guida inserite nel OIE Terrestrial Animal Health Code (<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>; chapter 2.7.5). Poiché l'AC si diffonde velocemente all'interno di un allevamento, è essenziale una rapida identificazione degli animali infetti e un loro isolamento. Tuttavia, le procedure standard di laboratorio utilizzate per identificare il *M. agalactiae* negli animali infetti sono lunghe e richiedono da 1 a 2 settimane di tempo. Il metodo standard prevede la semina dei campioni, provenienti da animali con sospetta AC (latte, tampone auricolare/nasale/oculare e liquido sinoviale), in piastre di agar Hayflick per 7 giorni a 37°C e la successiva identificazione delle tipiche colonie ad uovo fritto mediante tecniche biochimiche, sierologiche o, sempre più spesso, tramite PCR (Dedieu *et al.*, 1995; Foddai *et al.*, 2005; Tola *et al.*, 1996; Subramanian *et al.*, 1998) o real-time PCR (Lorusso *et al.*, 2007; Fitzmaurice *et al.*, 2008; Oravcova *et al.*, 2009). In modo da abbreviare i tempi di diagnosi, i ricercatori dell'IZS della Sardegna hanno sviluppato un metodo semplice e rapido per estrarre il DNA dai campioni di latte ovino; DNA utilizzato per la diagnosi di *M. agalactiae* mediante PCR. Tale metodo permette di ridurre i tempi di refertazione passando da 7-14 giorni a 5 ore (Tola *et al.*, 1997). Tuttavia, l'identificazione di *M. agalactiae* mediante PCR non dà informazioni sulla vitalità e, perciò, sull'infettività dei micoplasmi in quanto il metodo non permette di discriminare il DNA proveniente dalle cellule morte da quelle vive. La possibilità di differenziare tra cellule batteriche vive e morte rappresenta un importante obiettivo per la diagnosi basata sulla PCR poiché è noto che il DNA può persistere nei campioni anche dopo la perdita della vitalità delle cellule (Josephson *et al.*, 1993). Pertanto, a causa della presenza di cellule morte nel campione, la PCR DNA-dipendente potrebbe sovrastimare il numero dei batteri o dare dei falsi positivi a meno che non si applichi, prima della PCR, una concentrazione o separazione selettiva dei microrganismi vitali.

In uno dei nostri precedenti studi, abbiamo identificato e caratterizzato le proteine di membrana esterna del *M. agalactiae* analizzando la risposta immunitaria di pecore infette naturalmente (Tola *et al.*, 1997). Tra i principali antigeni immunodominanti caratterizzati a livello molecolare, le proteine P80, P48 e P30 sono risultate proteine stabili (Rosati *et al.*,

1999; Tola *et al.*, 2001; Fleury *et al.*, 2001) mentre le altre appartengono alla famiglia delle lipoproteine variabili di superficie soggette ad alta frequenza di variazione di struttura e grandezza (Glew *et al.*, 2000; Santona *et al.*, 2002) ed espresse con notevole variabilità tra gli isolati di *M. agalactiae* (Solsona *et al.*, 1996; Tola *et al.*, 1996). In un altro precedente lavoro, abbiamo descritto l'allestimento e l'utilizzo di un kit ELISA basato su proteine ricombinanti (rELISA) prodotte a partire dai geni degli antigeni immunodominanti P80 e P55 del *M. agalactiae*. I risultati dell'rELISA hanno confermato la specificità e immunogenicità dei due antigeni, riconosciuti dagli anticorpi prodotti da pecore infette naturalmente fin dalle prime fasi di infezione (Fusco *et al.*, 2007). La proteina P55 è una proteina fortemente immunoreattiva, è presente fin dai primi stadi d'infezione ed è espressa in oltre l'85% dei ceppi analizzati. La P80 è una lipoproteina stabile, conservata nell'ambito degli isolati provenienti da diverse regioni italiane (Tola *et al.*, 2001). In un altro studio, abbiamo osservato che entrambe le proteine di membrana non sono presenti nelle brodocolture inattivate con il calore (Tola *et al.*, 1999), suggerendo che tali antigeni potrebbero essere utilizzati come biomarkers per differenziare i micoplasmi vivi da quelli morti.

Recentemente, nella routine dei laboratori di microbiologia veterinaria, si sta diffondendo l'uso di nano particelle magnetiche rivestite di specifici anticorpi allo scopo di estrarre e concentrare microrganismi target a partire da diverse matrici alimentari. La cattura immunomagnetica (IMC), combinata con metodi colturali o molecolari, è utilizzata per l'isolamento e identificazione di batteri patogeni come *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ed *Escherichia coli* (Spanova *et al.*, 2000; Uyttendaele *et al.*, 2000; Favrin *et al.*, 2003). Al contrario, nessun metodo di IMC è stato sviluppato per l'isolamento di *M. agalactiae*.

Gli obiettivi di questa ricerca sono stati: 1) sviluppare un metodo di IMC utilizzando la combinazione di anticorpi policlonali anti-P55 e -P80 prodotti in agnello, 2) valutare la performance del metodo, 3) utilizzare il metodo IMC-PCR per isolare i micoplasmi vivi da campioni di latte positivamente, combinando la capacità dell'IMC di differenziare i micoplasmi vivi da quelli morti con la specificità e sensibilità della PCR e, 4) isolare i micoplasmi vivi nei campioni di latte ovino appartenenti alla routine.

MATERIALI e METODI

Ceppi di *Mycoplasma agalactiae* e condizioni di crescita

Gli isolati di *M. agalactiae* utilizzati in questa ricerca sono riportati nella Tabella 1. Tutti i ceppi inclusi in questo studio appartengono ad una ceppoteca di isolati provenienti da focolai di AC sviluppati in Italia. Ciascun isolato è stato fatto crescere in 100 ml di brodo di Hayflick a 37°C in agitazione fino alla fase logaritmica di crescita.

Preparazione dell'inoculo di *M. agalactiae*

In modo da determinare il numero di cellule batteriche inoculate un ciascun campione positivamente, abbiamo allestito delle diluizioni seriali decimali a partire da colture di *M. agalactiae* in fase log. di crescita. Un ml di ciascuna coltura è stata dispersa nel primo tubo di un set di 10 provette contenenti 9 ml di brodo di Hayflick. Dopo 3 min di vortex, 1 ml della prima diluizione è stato trasferito nella seconda provetta. La procedura è stata ripetuta altre 8 volte in modo da ottenere una serie di diluizioni decimali. Il numero delle cellule inoculate, stimato in base all'ultima diluizione seriale evidenziante sviluppo di micoplasmi, è stato espresso in Colony Changing Units (CCU/ml).

Risospensione dei micoplasmi in phosphate-buffered saline (PBS) e in latte ovino

Un ml di brodocoltura, prelevato dalle 10 diluizioni seriali, è stato utilizzato per 1) determinare la sensibilità del metodo IMC, risospendendo i micoplasmi in PBS e 2) determinare la sensibilità del metodo IMC, risospendendo i micoplasmi in latte prelevato da un gregge senza storia clinica riconducibile ad A.C.

Nel primo caso i micoplasmi, contenuti nel millilitro prelevato, sono stati pellettati mediante centrifugazione a 12.000 rpm per 30 min e risospesi in un ml di PBS pH 7.4; nel secondo caso, i micoplasmi pellettati sono stati risospesi in 1 ml di latte ovino. Le rimanenti brodo colture seriali sono state incubate a 37°C per 5 giorni in modo da determinare il numero dei micoplasmi vivi inoculati in ciascun campione, espresso in CCU/ml.

Produzione dei sieri iperimmuni anti-P80 e anti-P55

In questo lavoro abbiamo utilizzato due sieri policlonali prodotti in agnello. Come descritto da Tola *et al.* (2001), le bande proteiche corrispondenti alla P80 e alla P55 del *M. agalactiae* sono state elettroeluite dal gel SDS-PAGE colorato con Blu-Coomassie, concentrate e inoculate in due differenti agnelli.

Attivazione delle biglie super-para-magnetiche

In questa ricerca sono state utilizzate le biglie DynabeadsMyOne carboxylic acid (Invitrogen, Dynal AS, Oslo, Norway). L'attivazione delle biglie è stata effettuata utilizzando la soluzione idrofobica N-cyclohexyl-N-(2-morpholinethyl) carbodiimide methyl-p-toluensulfonate (CMC, Sigma, St. Louis, Mo) che migliora la resa e l'orientamento degli anticorpi immobilizzati. In breve, 300 µl di DynabeadsMyOne, corrispondenti a 3 mg, sono stati lavati due volte in un uguale volume di 0.01 M NaOH e altre tre volte con acqua deionizzata. Le biglie, dopo la loro cattura con una barra magnetica (DynaMag™-2, Dynal), sono state incubate a 4° C per 30 min con 300 µl di 25 mM 2-(n-morpholino)ethanesulfonic acid (MES, Sigma) pH 6.0. A questo punto, le biglie sono state messe a contatto con gli anticorpi in modo da creare dei legami tra i gruppi carbossilici attivati delle biglie e i gruppi amminici degli anticorpi.

Legame degli anticorpi anti P-80 e anti-P55 con le biglie magnetiche attivate

I sieri policlonali contro le proteine P80 e P55 del *M. agalactiae* sono stati diluiti 1/100, 1/500, 1/1000, 1/1500 e 1/2000 con 25 mM MES pH 6.0. La loro assorbanza è stata valutata spettrofotometricamente a 280 nm. Un ml di ciascuna diluizione è stato mescolato con cura con le Dynabeads attivate e incubato a temperatura ambiente (t.a.) per 1 ora in leggera agitazione. Le miscele di Dynabeads e diluizioni di siero P80/P55 sono state poste per 1 min a contatto con la barra magnetica. Dopo la lettura spettrofotometrica a 280 nm di ciascun surnatante, abbiamo scelto la diluizione con la maggiore differenza tra la prima e la seconda lettura. Le particelle magnetiche rivestite di anticorpi anti P80/P55 sono state incubate a t.a. per 15 min con 1 ml di 0.05 M Tris-HCl pH 7.4 in leggera agitazione. A questo punto, le biglie sono state lavate quattro volte con PBS contenente 0.1% di albumina bovina sierica (BSA, Sigma) e conservate a 4°C per 6 mesi.

Cattura immunomagnetica (IMC) di *M. agalactiae* risospesi in PBS

Un ml dei campioni di PBS inoculati con quantità decrescenti di micoplasmi sono stati processati mediante IMC utilizzando 10 µl di biglie rivestite di anticorpi anti-P80 e 10 µl di particelle magnetiche rivestite di anticorpi anti-P55. Dopo un'incubazione a 37°C per 1 ora in leggera agitazione, i complessi micoplasmi-particelle magnetiche sono stati separati dalla sospensione, lavati tre volte con PBS contenente 0.05% Tween 20 (PBST) e risospesi in 100 µl di TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). A questo punto, i campioni sono stati incubati a 100 °C per 15 min e centrifugati a 7.500 rpm per 5 min. Cinque µl di supernatante sono stati utilizzati in ciascuna reazione di PCR.

Cattura immunomagnetica (IMC) di *M. agalactiae* risospesi in latte ovino

In modo da massimizzare l'efficienza di cattura dei micoplasmi dal latte con il nuovo metodo IMC, abbiamo combinato differenti percentuali di latte (dal 95% al 5%) con il PBST (dal 5% al 95%). I micoplasmi, provenienti dalle diluizioni seriali decimali, sono stati risospesi in 1 ml di latte contenente quantità crescenti di PBST e processati mediante separazione immunomagnetica utilizzando le biglie rivestite di anticorpi anti-P80 e anti-P55, come descritto prima.

Amplificazione del DNA mediante PCR

Un frammento da 375-bp, derivato dalla sequenza riportata da Tola *et al.* (1996), è stato amplificato utilizzando il primer forward FS1 (5'-AAAGGTGCTTGAGAAATGGC-3') e il primer reverse FS2 (5'-GTTGCAGAAGAAAGTCCAATCA-3'). La miscela di PCR (25 µl) è stata preparata con 5 µl di template di DNA, 1U di Taq DNA polimerasi (Roche), 1X PCR buffer, 4 mM MgCl₂, 0.62 mM di ciascun deossinucleotide trifosfato e 24 pmoli di ciascun primer. La reazione di PCR è stata effettuata nel termociclatore GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). I campioni sono stati sottoposti ad una denaturazione iniziale a 94°C per 5 min seguita da 30 cicli di denaturazione a 94°C per 1 min, annealing a 57°C per 1 min

ed estensione a 65°C per 1 min e da un'estensione finale a 65°C per 10 min. Gli ampliconi sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su un gel di agarosio all' 1.2% colorato con Sybr®Safe (Invitrogen) e visualizzati al transilluminatore.

Immunocattura di cellule vive di *M. agalactiae* da campioni routinari di latte ovino

In questa ricerca, abbiamo analizzato 516 campioni di latte ovino raccolti nel periodo 2012-2013 e provenienti da 61 allevamenti con sospetta agalassia contagiosa: 473 campioni di latte sono stati registrati presso l'accettazione dell'IZS della Sardegna da 6 a 48 ore dal prelievo, mentre 43 campioni sono stati consegnati dopo 3 o più giorni. Un' aliquota di 850 µl di ciascun campione di latte è stata diluita con 150 µl di PBST a miscelata con cura con 10 µl di biglie rivestite con anticorpi anti-P80 e 10 µl di biglie rivestite con anticorpi anti-P55. Dopo un'incubazione di 1 ora a 37°C in leggera agitazione, i complessi micoplasmi-biglie sono stati processati come descritto prima.

Come test comparativo è stato utilizzato il metodo colturale: tutti i 516 campioni di latte sono stati seminati in piastre di agar Hayflick, incubati a 37°C per 5 giorni in camera umida ed osservati con il microscopio a luce invertita Axiovert della Zeiss.

SDS-PAGE e Immunoblotting

La separazione delle proteine totali del pool dei 5 isolati di *M. agalactiae*, utilizzati in questa ricerca, è stata effettuata mediante corsa elettroforetica in SDS-PAGE. I gels sono stati preparati in modo da avere un "separating gel" ad una concentrazione finale di acrylamide/bisacrylamide (Bio-Rad, 37.5: 1) al 12% e uno "stacking gel" al 4%. 20 µg di proteine totali sono stati solubilizzati in 20 µl di loading buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerolo e 0.01% Bromophenol Blue), bolliti per 5 min e raffreddati a 20 °C.

I campioni sono stati fatti correre in un Vertical Stab Gel Apparatus (Bio-Rad) contenente 800 ml di running buffer (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS; pH 8.3) a 200 Volts per 1 ora. La mobilità elettroforetica delle proteine dei campioni è stata valutata in relazione alla mobilità elettroforetica degli standards molecolari utilizzati, costituiti da una miscela di proteine con peso molecolare compreso tra 14.4 e 97.4 kDa (Promega). Le proteine, dopo la corsa elettroforetica, sono state colorate con una soluzione allo 0.25% di Blue Comassie R 250 (Sigma) in 25% di isopropanolo (Sigma) e 10% di acido acetico (Carlo Erba) o processate per l'immunoblotting.

I gels, dopo la corsa elettroforetica, sono stati tenuti per 15 min in 300 ml di transfer buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina, 20% metanolo). Successivamente le proteine sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa da 0.45 µm (Sigma) mediante un SemiDry Apparatus (Bio-Rad) a 15 Volts per 1 ora. Ogni membrana di nitrocellulosa è stata incubata per un' ora a temperatura ambiente (t.a.) in PBS pH 7.4 contenente 2% di skim milk (Difco, Detroit, USA).

Le nitrocellulose sono state messe ad incubare a 37 °C per 1 ora con il siero anti-P80 e anti P-55 diluiti 1:1500 in PBS-2% skim milk. Dopo 4 lavaggi di 10 min ciascuno con PBS-2% skim milk a t.a. ed in leggera agitazione, le membrane sono state incubate a 37°C per 1 ora con immunoglobuline anti-IgG di pecora coniugate con fosfatasi (Sigma) diluite in PBS-2% skim milk. Dopo 4 ulteriori lavaggi di 10 min ciascuno in PBS-2% skim milk, le membrane sono state messe a contatto con il substrato di sviluppo della fosfatasi contenente BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolo fosfato/nitro-blu-tetrazolio). Dopo lo sviluppo del colore, le nitrocellulose sono state lavate con H₂O distillata e asciugate all'aria.

RISULTATI

Produzione di sieri policlonali e preparazione di biglie rivestite con anticorpi anti-P80 e anti-P55

Le bande corrispondenti alla P80 e P55 sono state elettroeluite dai gel SDS-PAGE colorati con Blu-Coomassie, concentrate (Figura 1) e inoculati in due differenti agnelli, come descritto da Tola *et al* (2001). Come mostrato dall'immunoblotting in Figura 2, gli anticorpi IgG prodotti contro la P80 riconoscono solo questo antigene; al contrario, il siero iperimmune prodotto contro la P55 riconosce anche altri antigeni di medio e basso peso molecolare a significare che tutte queste proteine hanno determinanti antigenici comuni. La diluizione ottimale dei due sieri iperimmuni da utilizzare con le biglie magnetiche (BM) carbossilate per formare BM-Ab80 e MB-Ab-55 è stata 1:1500. La quantità ottimale di BM-Ab80 e MB-Ab-55 che permette la migliore cattura di micoplasmi nei campioni positivizzati è stata di 10 µl.

Sensibilità dell'IMC-PCR

Per determinare il "limit of detection" del nuovo metodo, abbiamo applicato l'IMC-PCR a campioni di PBS e latte positivizzati con differenti concentrazioni di micoplasmi (da 10 a 10¹⁰ CCU/ml). Il metodo è stato applicato a 5 isolati di *M. agalactiae* e al ceppo di referenza PG2 (Tabella 1). Il numero minimo di micoplasmi che può essere rilevato dopo 30 cicli di PCR è determinato dalla visualizzazione della banda di amplificazione da 375-bp. La sensibilità dell'IMC-PCR è risultata essere tra 10-10² CCU/ml per i campioni di micoplasmi risospesi in PBS e tra 10²-10³ CCU/ml per i micoplasmi risospesi in latte. Questi valori sono stati ottenuti partendo dalla miscela costituita da 850 µl di latte e 150 µl di PBST.

Applicazione dell'IMC-PCR ai campioni di latte ovino della routine

In questa ricerca abbiamo seminato 516 campioni di latte in piastre di agar Hayflick; contemporaneamente tutti i campioni sono stati sottoposti all'analisi IMC-PCR. All'esame colturale, 296 campioni (57.4%) sono risultati positivi. In base alle linee guida inserite nel OIE Terrestrial Animal Health Code, un campione è positivo all'esame colturale se, nelle piastre di semina, si osservano le tipiche colonie ad uovo fritto. In questa ricerca abbiamo

confermato l'appartenenza delle colonie alla specie *M. agalactiae* mediante PCR. Cento-settanta-sette campioni (34.3%) sono risultati negativi mentre i rimanenti 43 campioni (8.3%) sono risultati dubbi all'esame colturale. Abbiamo considerato dubbio un campione quando lo sviluppo di altri batteri era tale da non permettere la visualizzazione delle colonie di micoplasmi. Tutti i campioni dubbi appartenevano al gruppo dei campioni di latte consegnati per l'analisi molti giorni dopo il prelievo. Questi campioni sono stati esclusi dall'analisi IMC-PCR. Pertanto il numero complessivo dei campioni sottoposti all'IMC-PCR è stato di 473. Come si evince dalla Figura 3, dei 296 campioni positivi all'esame colturale, 287 sono risultati positivi mentre 9 negativi all'IMC-PCR. I campioni negativi all'esame colturale sono risultati negativi anche all'IMC-PCR.

DISCUSSIONE

L'agalassia contagiosa (AC) è una malattia soggetta a notifica a Regione e Comune, in base al Decreto n°54/2009 della Regione Sardegna, visto il Regolamento di Polizia Veterinaria approvato con D.P.R. n° 380/1059 e in accordo con la Direttiva 82/894/CE e successive modifiche ed integrazioni. La notifica della malattia deve essere fatta il più presto possibile in modo da adottare tutte le misure sanitarie atte a limitare o prevenire la sua diffusione. L'intervallo di tempo compreso tra il sospetto clinico e la notifica di malattia dipende dalle tecniche di laboratorio utilizzate per la diagnosi di *M. agalactiae*. Il metodo colturale è la tecnica comunemente utilizzata per l'isolamento dei micoplasmi (Nicholas & Baker, 1998). L'isolamento delle colonie di micoplasmi e la loro successiva identificazione mediante test biochimici e/o sierologici hanno come controindicazione l'eccessiva durata temporale (da 1 a 2 settimane) e la notevole laboriosità (Bradbury, 1998; Poumarat, 1998; Poveda, 1998). Per tali motivi, sono stati fatti molti tentativi per sviluppare sistemi alternati all'esame colturale, basati sull'amplificazione del DNA dei micoplasmi mediante PCR (Dedieu *et al.*, 1995; Foddai *et al.*, 2005; Tola *et al.*, 1996; Subramanian *et al.*, 1998). Le PCR standardizzate sono state applicate sia a campioni congiuntivali, nasali, sinoviali e tessutali che a campioni di latte (Tola *et al.*, 1997). L'accertamento diagnostico del *M. agalactiae* nei campioni di latte mediante PCR è risultato più sensibile rispetto al metodo tradizionale e molto più rapido, riducendo il tempo di diagnosi a circa 5 ore (Tola *et al.*, 1997).

Con questa ricerca, abbiamo sviluppato un metodo di separazione immunomagnetica combinandolo con la tecnica PCR (Tola *et al.*, 1996), in modo da allestire una nuova IMC-PCR per rilevare la presenza di *M. agalactiae* vivi in campioni di latte positivamente e in campioni clinici. Anticorpi policlonali specifici verso due proteine di membrana esterna (P80 e P55) sono stati coniugati con biglie magnetiche carbossilate. Come si evince dalla Figura 2, il siero policlonale anti-P55 riconosce altre proteine di membrana del *M. agalactiae*, in modo particolare una proteina da 26 kDa. In un precedente studio, Santona *et al.* (2002) hanno osservato che la sequenza N-terminale della P55 era identica alla proteina AvgC codificata dal

gene *avgC* (Flitman-Tene *et al.*, 2000). Il sistema *avg* del *M. agalactiae* è costituito da un cluster di quattro geni che codificano una famiglia di lipoproteine di superficie caratterizzata da un'alta frequenza di variazione di fase e dimensione (Flitman-Tene *et al.*, 2000). Glew *et al.* (2000) hanno identificato, in *M. agalactiae*, un'altra famiglia di lipoproteine variabili di superficie indicata con *Vpmas*. Gli autori hanno, inoltre, scoperto che quattro geni *vpma*: *vpmaX*, *vpmaY*, *vpmaU* e *vpmaZ*, erano identici a quattro geni *avg*: *avgA*, *avgB*, *avgC* e *avgD*. In particolare, *avgC* corrispondeva al gene *vpmaU*. Il gene *avgC* (*vpmaU*) è di 717 bp di lunghezza e codifica per una proteina di circa 26 kDa di peso molecolare. Pertanto la combinazione dei due sieri policlonali permette il legame degli anticorpi con gran parte delle proteine della membrana esterna del *M. agalactiae* rendendo possibile la cattura dei micoplasmi vivi e vitali.

Le BM-Abs prodotte sono state utilizzate per catturare 5 isolati di *M. agalactiae* e il ceppo di Referenza PG2 in diluizioni seriali decimali, in campioni di latte positivamente artificialmente e in campioni di latte da campo. Come ci si aspettava, la migliore efficienza di cattura è stata ottenuta con le colture risospese in PBS, con un "limit of detection, LOD" compreso tra $10-10^2$ CCU/ml. Quando il metodo è stato applicato ai campioni di latte positivamente, il LOD è risultato di 10^2-10^3 CCU/ml; con un effetto matrice 10 volte più alto rispetto alle colture risospese in PBS. Il fatto che la sensibilità del metodo IMC-PCR sia risultata inferiore rispetto alla PCR applicata al DNA estratto direttamente dal latte (Tola *et al.*, 1997), secondo il nostro parere, deve essere attribuito più al metodo di estrazione del DNA dai complessi micoplasma-biglie che dalla presenza di sostanze inibenti la Taq polimerasi nel latte (Bickley *et al.*, 1996). Uno degli obiettivi di questa ricerca era sviluppare un metodo semplice e veloce per arrivare a diagnosticare la presenza di *M. agalactiae* vivi nel latte clinico. Il metodo di bollitura è senz'altro molto semplice a discapito, però, di una perdita di sensibilità. Altri autori hanno applicato dei metodi sofisticati di estrazione del DNA direttamente dal latte, ottenendo un LOD di 350 CFU/ml, ossia $3,5 \times 10^2$ CFU/ml (Becker *et al.*, 2012) o di circa 250 cellule di *M. agalactiae*/25 ml di latte, corrispondenti a 10^2 CFU/ml (Oravcova *et al.*, 2009). Questi autori, però, erano più interessati alla messa a punto di una real-time PCR che a differenziare i micoplasmi vivi da quelli morti, principale obiettivo della nostra ricerca.

La seconda parte della ricerca aveva come scopo quello di applicare il metodo standardizzato di IMC-PCR ai campioni di latte provenienti da allevamenti con sospetta agalassia contagiosa. Dei 516 campioni di latte ovino analizzati nel periodo 2012-2013, 473 sono pervenuti nei nostri laboratori nell'arco di 24-48 ore, mentre 43 dopo 3-10 giorni. Pur applicando l'IMC-PCR a tutti i campioni, dall'analisi finale abbiamo escluso i 43 campioni in quando la crescita di altri batteri in terreno di Hayflick, contenente penicillina, impediva l'osservazione delle colonie ad uovo-fritto al microscopio ottico. Il confronto tra i risultati ottenuti con il metodo colturale e con l'IMC-PCR ha evidenziato che solo 9 campioni sono sfuggiti a quest'ultima analisi. Tali falsi-negativi campioni li abbiamo riscontrati in 9 allevamenti diversi. È importante sottolineare che, in caso di sospetta agalassia contagiosa,

consigliamo di recapitare presso l'IZS della Sardegna un numero di campioni pari al 5-10% del gregge.

In conclusione, con questa ricerca si è messo a punto un sistema di immunocattura in grado di differenziare i micoplasmi vivi da quelli morti. Il metodo è stato standardizzato con il ceppo di referenza di *M. agalactiae* (PG2) e con 5 isolati provenienti da diverse regioni italiane. Il metodo di IMC combinato con la PCR ha permesso di rilevare la presenza di micoplasmi vivi nei campioni di latte ovino contaminati artificialmente e in quelli clinici. Il metodo è semplice e rapido e permette di arrivare alla diagnosi di agalassia contagiosa in circa 6 ore.

BIBLIOGRAFIA

- Bradbury JM** (1998) Identification of mycoplasmas by immunofluorescence. *In: Mycoplasma protocols*, Miles R.J. and Nicholas R.A.J. eds. Humana Press, Totowa, USA, 119-125.
- Bickley J, Short JK, McDowell DG & Parker HC** (1996). Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**: 153-158.
- Corrales JC, Esnal A, De la Fe C, Sanchez A, Assuncao P, Poveda JB & Contreras A** (2007) Contagious agalactia in small ruminants. *Small Rumin. Res.* **68**: 154-166
- Dedieu L, Mady V & Lefevre PC** (1995) Development of two PCR assays for the identification of mycoplasmas causing contagious agalactia. *FEMS Microbiol. Letters* **129**: 243-249.
- Favrin SJ, Jassim SA & Griffiths MW** (2003) Application of a novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for the detection of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Int. J. Food Microbiol.* **85**: 63-71.
- Fitzmaurice J, Sewell M, King CM, McDougall S, McDonald WL & O'keefe JS** (2008) A real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma agalactiae*. *N. Z. Vet. J.* **56**: 233-236.
- Fleury B, Bergonier D, Berthelot X, Schlatter Y, Frey J & Vilei EM** (2001) Characterization and analysis of a stable serotype-associated membrane protein (P30) of *Mycoplasma agalactiae*. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2814-2822.
- Flitman-Tene R, Levisohn S, Lysnyansky I, Rapoport E & Yogev D** (2000). A chromosomal region of *Mycoplasma agalactiae* containing vsp-related genes undergoes in vivo rearrangement in naturally infected animals. *FEMS Microbiol. Lett.* **191**:205-212.
- Foddai A, Idini G, Fusco M, Rosa MN, de la Fe C, Zinellu S & Tola S** (2005) Rapid differential diagnosis of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* on a multiplex-PCR and a PCR-RFLP. *Mol. Cell. Probes* **19**: 207-212.
- Fusco M, Corona L, Onni T, Marras E, Longheu C, Idini G & Tola S** (2007) Development of a sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant antigens for rapid detection of antibodies against *Mycoplasma agalactiae* in sheep. *Clin. Vacc. Immunol.* **14**: 420-425.
- Glew MD, Papazisi L, Poumarat F, Bergonier D, Rosengarten R & Citti C** (2000) Characterization of a multigene family undergoing high-frequency DNA rearrangements

- and coding for abundant variable surface proteins in *Mycoplasma agalactiae*. *Infect. Immun.* **68**: 4539-4548.
- Josephson KL, Gerba CP & Pepper IL** (1993) Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3513-3515.
- Lorusso A, Decaro N, Greco G, Corrente M, Fasanella A & Buonavoglia D** (2007). A real-time PCR assay for detection and quantification of *Mycoplasma agalactiae* DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3747-3751.
- Nicholas RAJ & Baker SE** (1998) Recovery of mycoplasmas from animals. *In: Mycoplasma protocols*, Miles R.J. and Nicholas R.A.J. eds. Humana Press, Totowa, USA, 37-44.
- Oravcova K, Lopez-Enriquez L, Rodriguez-Lazaro D & Hernandez M** (2009) *Mycoplasma agalactiae* p40 gene, a novel marker for diagnosis of contagious agalactia in sheep by real-time PCR: assessment of analytical performance and in-house validation using naturally contaminated milk samples. *J. Clin. Microbiol.* **47**: 445-450.
- Poumarat R** (1998) Identification of mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF Dot). *In: Mycoplasma protocols*, Miles R.J. and Nicholas R.A.J. eds. Humana Press, Totowa, USA, 113-118.
- Poveda JB** (1998) Biochemical characteristics in mycoplasma identification. *In: Mycoplasma protocols*, Miles R.J. and Nicholas R.A.J. eds. Humana Press, Totowa, USA, 69-78.
- Rosati S, Pozzi S, Robino P, Montinaro B, Conti A, Fadda M & Pittau M** (1999) P48 major surface antigen of *Mycoplasma agalactiae* is homologous to a *malp* product of *Mycoplasma fermentans* and belongs to a selected family of bacterial lipoprotein. *Infect. Immun.* **67**: 6213-6216.
- Santona A, Carta F, Fraghì P & Turrini F** (2002) Mapping antigenic sites of an immunodominant surface lipoprotein of *Mycoplasma agalactiae*, AvgC, with the use of synthetic peptides. *Infect. Immun.* **70**: 171-176.
- Solsona M, Lambert M & Poumarat F** (1996) Genomic, protein homogeneity and antigenic variability of *Mycoplasma agalactiae*. *Vet. Microbiol.* **50**: 45-58.
- Spanova A, Rittich B, Karpiskova R, Cechova L & Skapova D** (2000) PCR identification of *Salmonella* cells in food and stool samples after immunomagnetic separation. *Bioseparation* **9**: 379-384.
- Subramaniam S, Bergonier D, Poumarat F, Capaul S, Schlatter Y, Nicolet J & Frey J** (1998) Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. *Mol Cell Probes* **12**: 161-169.
- Tola S, Idini G, Manunta D, Galleri G, Angioi A, Rocchigiani AM & Leori G** (1996) Rapid and specific detection of *Mycoplasma agalactiae* by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* **50**: 77-84.
- Tola S, Idini G, Manunta D, Casciano I, Rocchigiani AM, Angioi A & Leori G** (1996) Comparison of *Mycoplasma agalactiae* isolates by pulsed field gel electrophoresis, SDS-PAGE and immunoblotting. *FEMS Microbiol. Lett.* **143**: 259-265.
- Tola S, Manunta D, Cocco M, Turrini F, Rocchigiani AM, Idini G, Angioi A & Leori G** (1997) Characterization of membrane surface proteins of *Mycoplasma agalactiae* during natural infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**: 355-362.
- Tola S, Angioi A, Rocchigiani AM, Idini G, Manunta D, Galleri G & Leori G** (1997) Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* **54**: 17-22.

- Tola S, Manunta D, Rocca S, Rocchigiani AM, Idini G, Angioi PP & Leori G (1999)** Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines. *Vaccine* **17**: 2764-2768.
- Tola S, Crobeddu S, Chessa G, Uzzau S, Idini G, Ibba B & Rocca S (2001)** Sequence, cloning, expression and characterisation of the 81-kDa surface membrane protein (P80) of *Mycoplasma agalactiae*. *FEMS Microbiol. Letters* **202**: 45-50.
- Uyttendaele M, Van Hoorde I & Debevere J (2000)** The use of immunomagnetic separation (IMS) as a tool in a sample preparation method for direct detection of *Listeria monocytogenes* in cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **54**: 205-212.