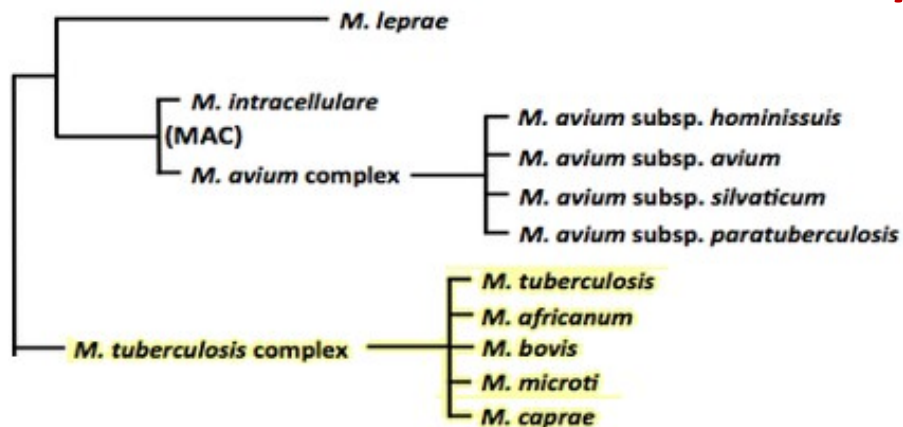


PCR tradizionale e Real-Time nel rilevamento di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: metodiche a confronto

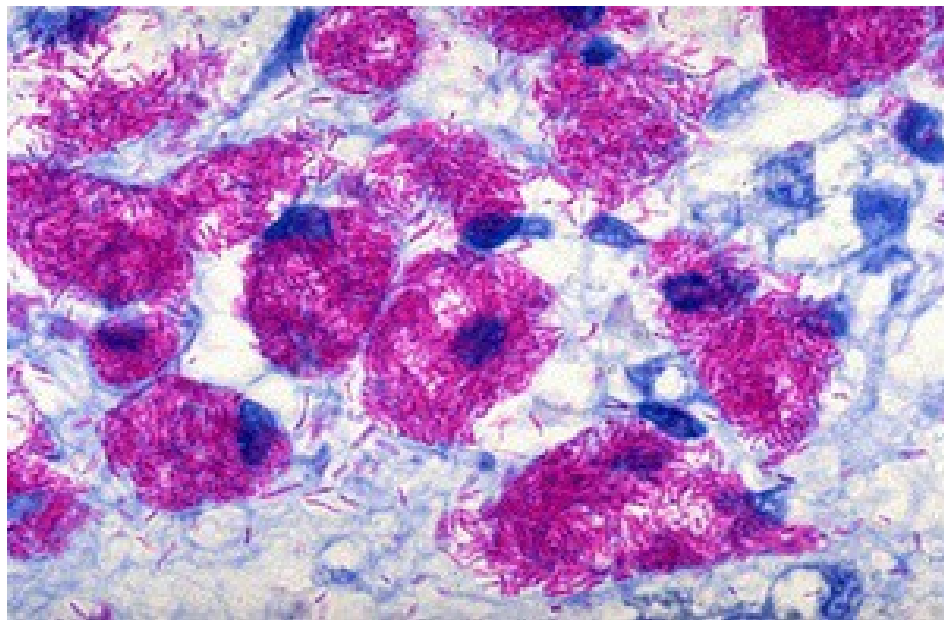


Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP)



- Ordine *Actinomycetales*
- famiglia *Mycobacteriaceae*
- genere *Mycobacterium*.

- Gram +
- di forma bastoncellare (0.5-1 mm)
- Immobili
- Aerobi
- non sporigeni
- fortemente acido resistenti
- lenta crescita (da 8 a 16 settimane)



Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP)

- La Paratubercolosi è una malattia infettiva e contagiosa che colpisce in particolare i ruminanti domestici e selvatici;



- Il periodo di incubazione della malattia può variare da alcuni mesi a diversi anni;
- La malattia compare generalmente in animali di 3-5 anni di età, più frequentemente in prossimità del parto;
- Comporta diminuzione della produzione latte, ipofertilità, anemia, febbre intermittente, edema intermandibolare. In seguito compare la diarrea e negli stadi terminali si ha anoressia, edema nella regione dell'addome,, grave e progressivo scadimento delle condizioni generali, fino alla morte.
- possibile ruolo zoonosico di Map nel Morbo di Crohn, viste le apparenti similitudini dei sintomi e delle lesioni.



Metodi diagnostici

ELISA



ESAME COLTURALE



ESAME MICROSCOPICO



Metodi diagnostici

Nella diagnosi del MAP vanno tenuti in considerazione alcuni fattori:

a) la durata del periodi di incubazione;

b) l'elevata prevalenza di animali con infezione subclinica che possono diffondere il patogeno attraverso sia la via oro-fecale che il colostro/latte contaminato

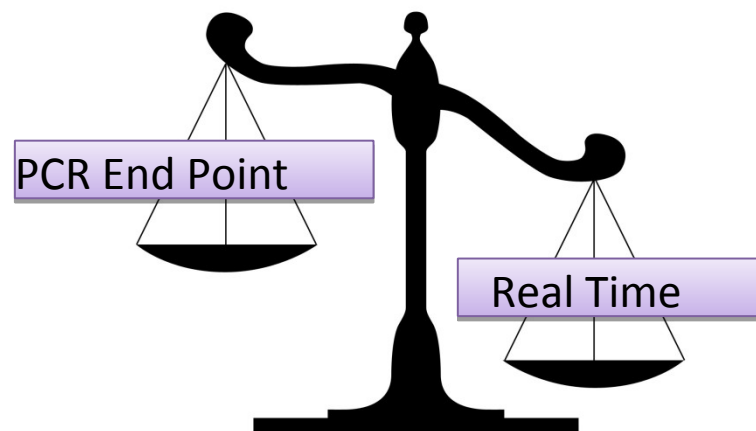
c) difficoltà di diagnosticare la malattia e lo stato d'infezione quando clinicamente si ha un quadro clinico asintomatico o subclinico (periodo finestra)

l'ELISA può portare a falsi negativi come anche l'esame colturale, quest'ultimo effettuato sulle feci, latte, colostro e sangue.



Metodiche molecolari

metodiche molecolari sempre più specifiche, sensibili e con tempi di risposta brevissimi



- La PCR End point fornisce solo una stima qualitativa della presenza di frammenti genici nel DNA da analizzare;
- La PCR Real time permette anche una valutazione quantitativa del DNA presente;
- Minor rischio d'inquinamento nei vari step del processo;
- Tempi di risposta molto più brevi.



Target molecolari

•IS900

fa parte della famiglia delle sequenze d'inserzione IS100 ed è il trasposone che caratterizza il *M. paratuberculosis*;

presente dalle 15 alle 20 copie per cromosoma batterico e perciò questa caratteristica aumenta notevolmente la sensibilità di metodi molecolari

•I'F57

specifico per *M. paratuberculosis*;

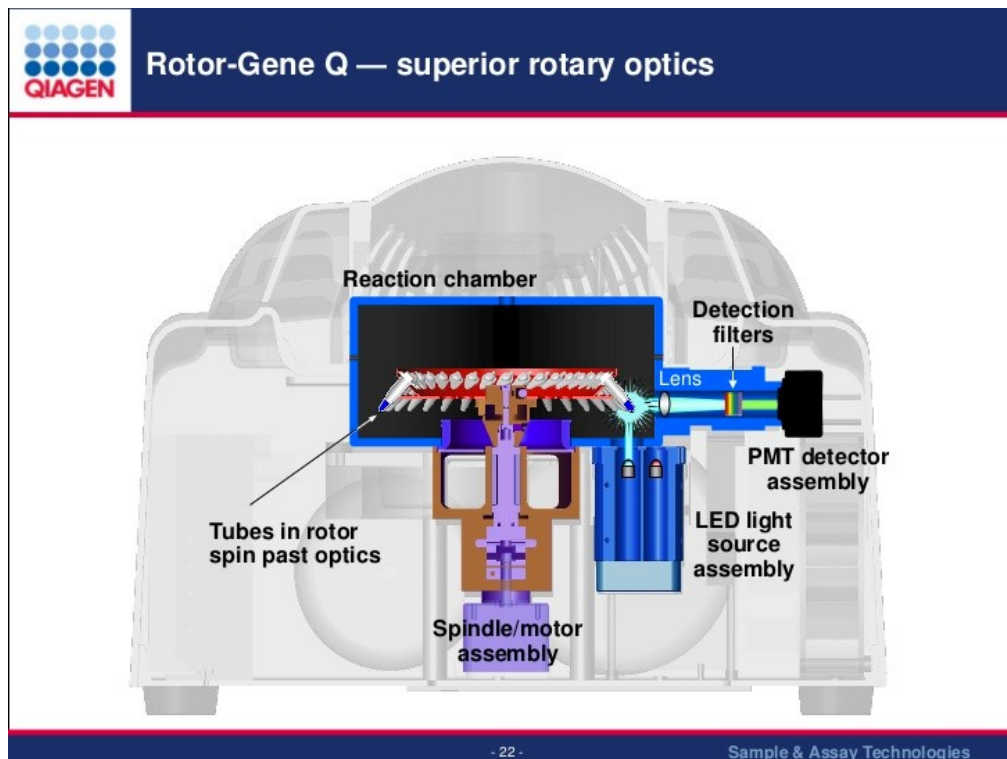
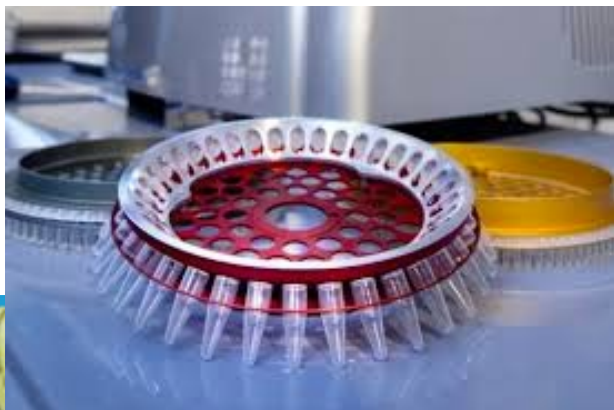
non considerato come target principale per lo sviluppo di protocolli di Real Time PCR, perché presente in singola copia all'interno del cromosoma di MAP e quindi la sensibilità del metodo può risultare inferiore



PCR Real Time

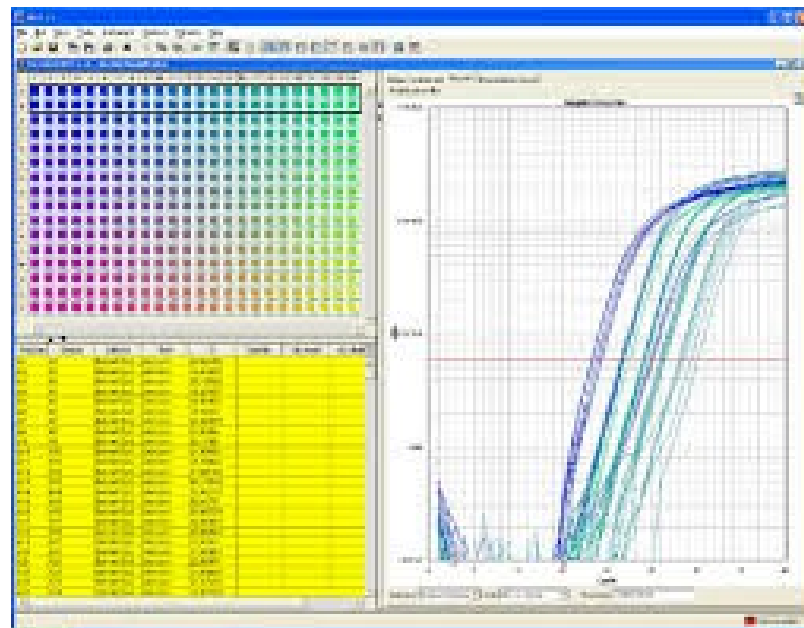
In commercio presenti diversi kit d'amplificazione e diversi apparecchi con varianti e performance differenti

ROTOR GENE Q (Qiagen)



PCR Real Time

ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystem)



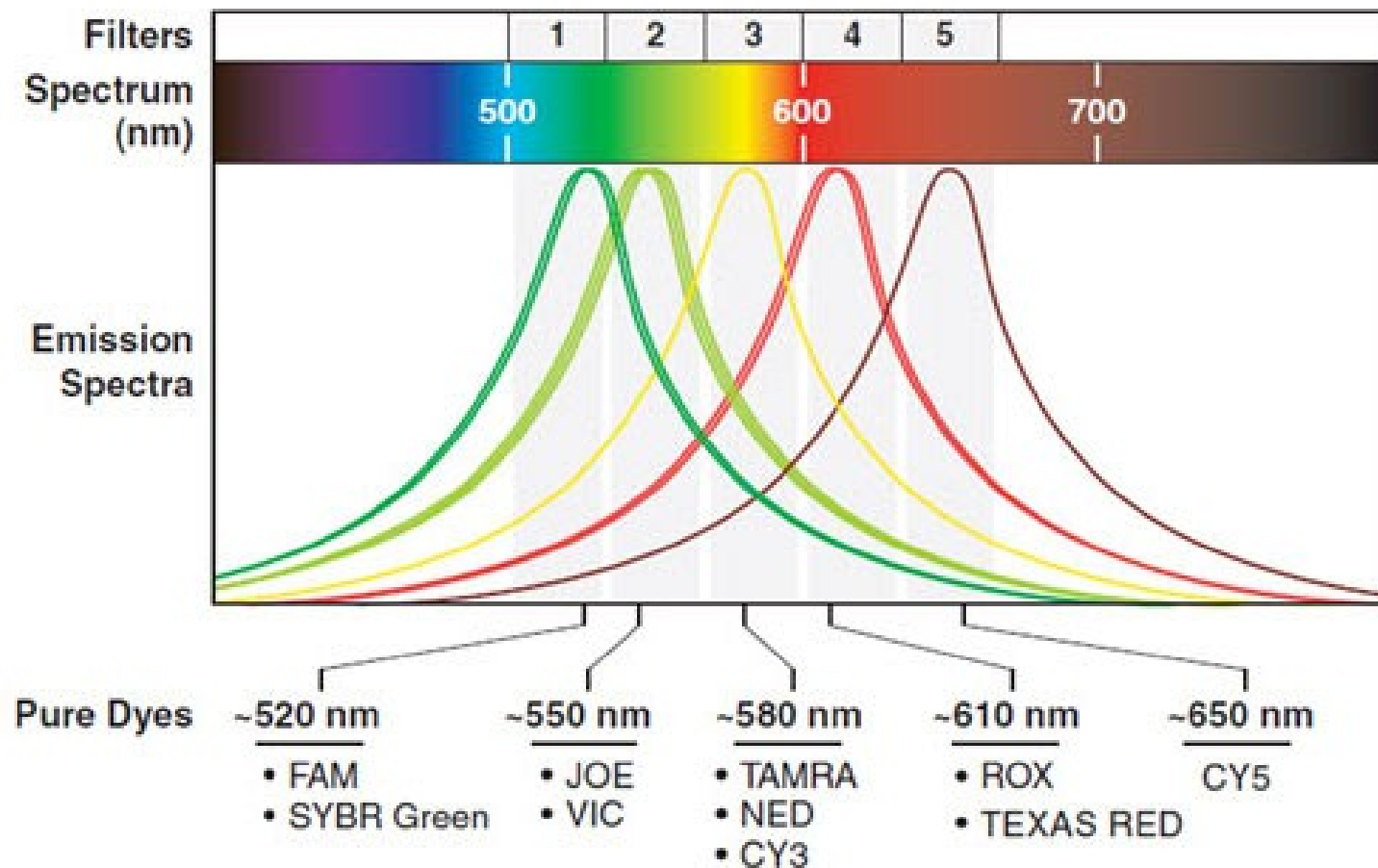
PCR Real Time

Kit amplificazione:

- CTRL interno d'estrazione o d'amplificazione;
- profili d'amplificazione differenti;
- canali d'acquisizione segnale differenti;
- diverse performance su stessi apparecchi.



canali d'acquisizione

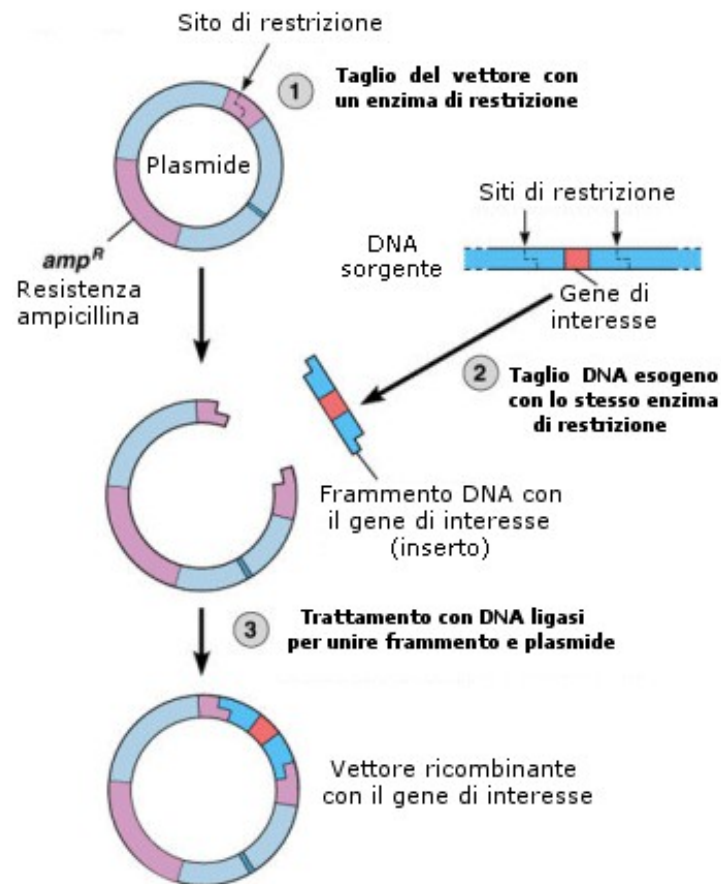


Per l'elaborazione della curva standard sono state effettuate diluizioni scalari in base 10 del **plasmide ricombinante PCR®II-TOPO®-IS900** in modo tale da ottenere un numero scalare di molecole target/μl.

1°PASSAGGIO SPERIMENTALE:

COSTRUZIONE DEL PLASMIDE RICOMBINANTE

Il plasmide ricombinante (PCR®II-TOPO®-IS900) è stato ottenuto clonando una porzione di 499 bp di IS900 all'interno del plasmide PCR®II-TOPO® (TOPO TA Cloning® Kit Dual Promoter, Invitrogen).



PCR Real Time Quantitativa

Le cellule batteriche utilizzate per il mantenimento del plasmide ricombinante sono di E.Coli, rese chimicamente competenti con dicloruro di magnesio.

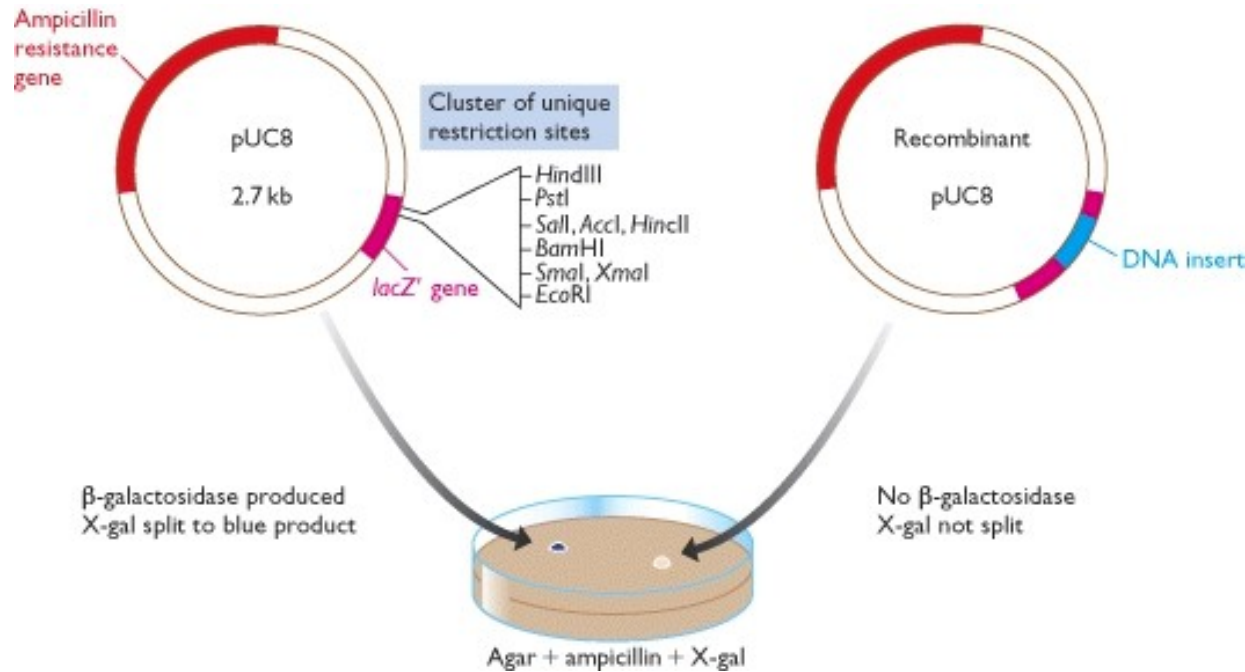
selezione del plasmide ricombinante:

crescita su terreno solido selettivo contenente Ampicillina e Xgal, che permette lo screening colonie bianche/blu;



PCR Real Time Quantitativa

E. coli, che sono in grado di produrre l'enzima β -galattosidasi (codificata dal gene *lacZ* dell'operone *lac*), vengono trasformati dall'assorbimento del vettore plasmidico, che contiene un inserti nella regione codificante del gene *lacZ*



Una volta trasformati, i batteri aventi un plasmide risultano incapaci di produrre l'enzima β -galattosidasi che può scindere l'X-gal presente nel terreno a base di agar, e si generano così delle colonie bianche (blu solo nel caso non portino il plasmide).



PCR Real Time Quantitativa

- **X-gal** (bromo-cloro-indolil-galattopiranoside):

composto organico consistente in una molecola di galattosio legata ad un indolo sostituito;

utilizzato per localizzare visivamente le colonie di lieviti o di *Escherichia coli* che sono state trasformate dal vettore plasmidico.

- **ampicillina**

all'interno del DNA ricombinanti è presente un gene marcatore di resistenza agli antibiotici, che permettono una facile selezione delle cellule ospiti contenenti il plasmide



2° PASSAGGIO SPERIMENTALE:

CALCOLO NUMERO DI COPIE DEL PLASMIDE RICOMBINANTE

- Il plasmide ricombinante PCR®II-TOPO®-IS900 è stato impiegato per effettuare diluizioni scalari in base 10;
- per ogni diluizione scalare è stata calcolata la concentrazione del plasmide ricombinante mediante lettura spettrofotometrica;
- le concentrazioni del plasmide ricombinante PCR®II-TOPO®-IS900, relative alle diluizioni scalari esaminate, sono state impiegate per il calcolo del numero delle molecole plasmidiche;

La formula presa in considerazione per il calcolo del numero delle molecole del plasmide/μl è la seguente:

$$\frac{\text{x grammi/ } \mu\text{l di plasmide ricombinante}}{\text{numero di copie di plasmide ricombinante}}$$



PCR Real Time Quantitativa

diluizioni scalari in base 10 del plasmide ricombinante ed i corrispondenti Ct medi e numero di molecole target/ μ l con apparecchiatura ABI PRISM®7900

Diluizioni scalari di pCR [®] II-TOPO [®] -IS900	Ct medi	N° di molecole target/ μ l
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Tal Quale	13,63	4×10^8
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Diluizione 10^{-1}	16,40	4×10^7
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Diluizione 10^{-2}	19,77	4×10^6
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Diluizione 10^{-3}	23,15	4×10^5
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Diluizione 10^{-4}	25,72	4×10^4
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Diluizione 10^{-5}	28,89	4×10^3
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Diluizione 10^{-6}	33,57	4×10^2
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Diluizione 10^{-7}	34,29	4×10^1
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Diluizione 10^{-8}	40	4



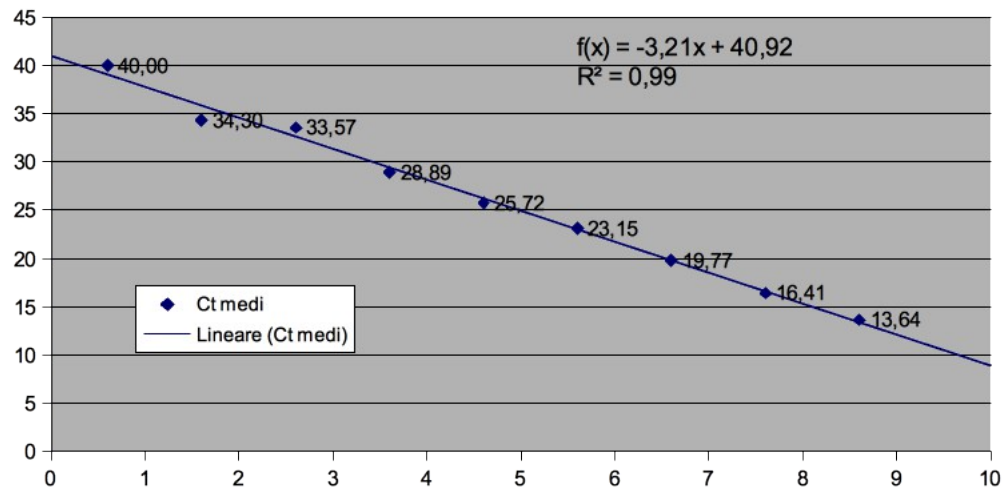
PCR Real Time Quantitativa

ari in base 10 del plasmide ricombinante ed i corrispondenti Ct medi e numero di molecole target/ μ l con l'apparecchiatura R

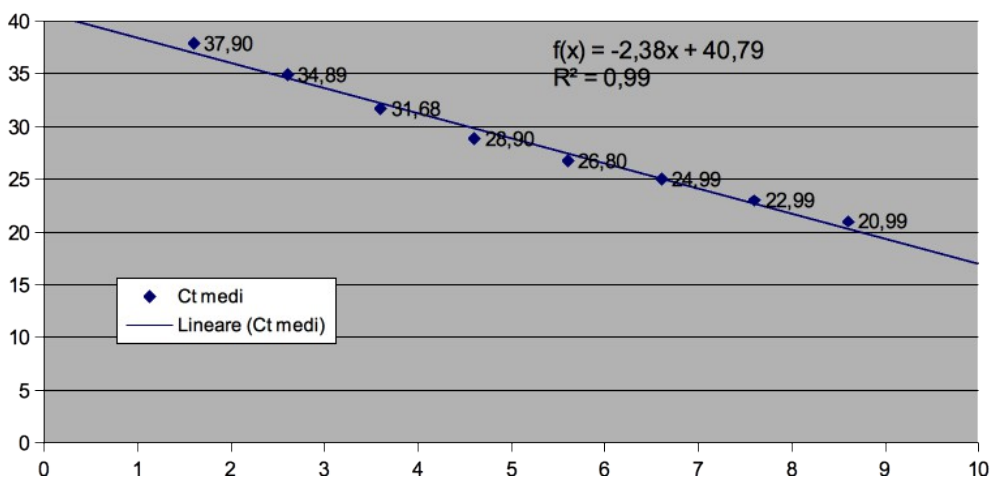
Diluizioni scalari di pCR [®] II-TOPO [®] -IS900	Ct medi	N° di molecole target/ μ l
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Tal Quale	20,99	4×10^8
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Diluizione 10^{-1}	22,99	4×10^7
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Diluizione 10^{-2}	24,99	4×10^6
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Diluizione 10^{-3}	26,80	4×10^5
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Diluizione 10^{-4}	28,90	4×10^4
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Diluizione 10^{-5}	31,68	4×10^3
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Diluizione 10^{-6}	34,89	4×10^2
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Diluizione 10^{-7}	37,90	4×10^1
pCR [®] II-TOPO [®] -IS900 Diluizione 10^{-8}	0	4



3° PASSAGGIO SPERIMENTALE: COSTRUZIONE CURVA STANDARD

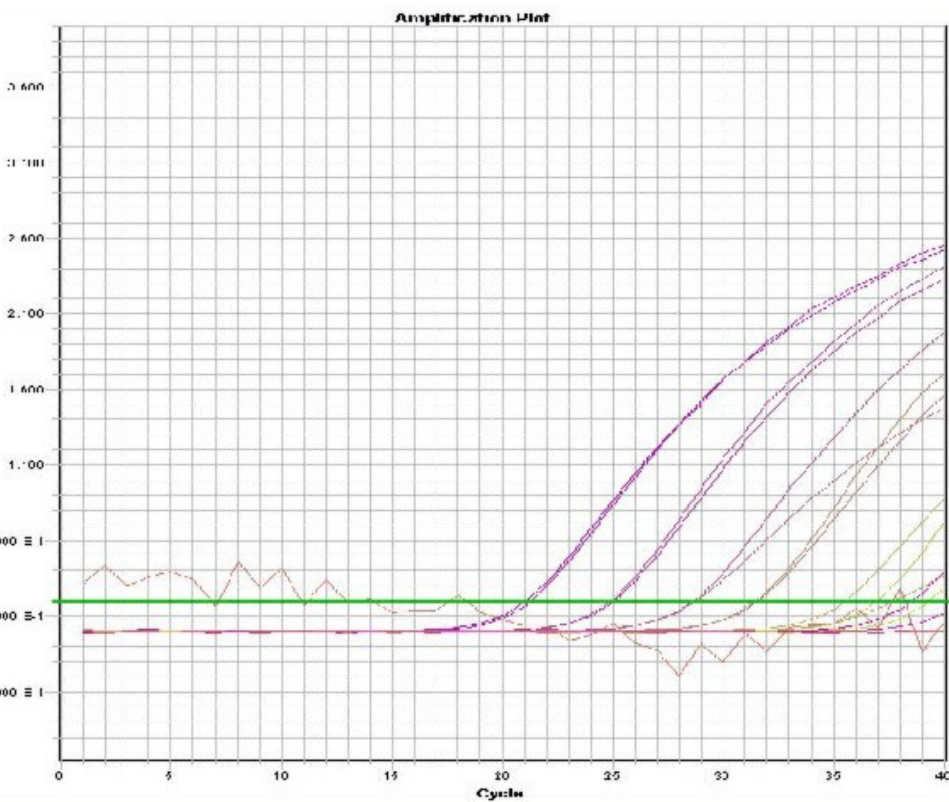


curva standard apparecchiatura
ABI PRISM®7900 (Applied BioSystems)

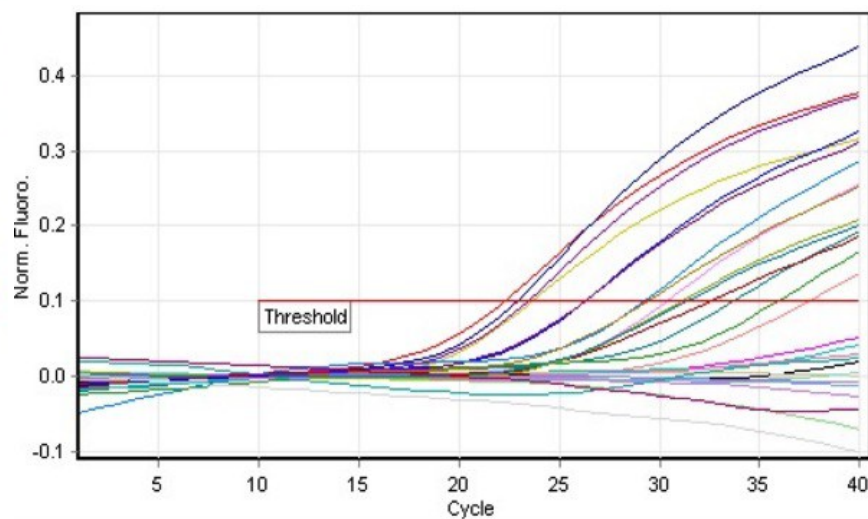


curva standard Rotor-Gene Q (Qiagen)





Amplificati curva standard apparecchiatura ABI
PRISM®7900 (Applied Biosystem).



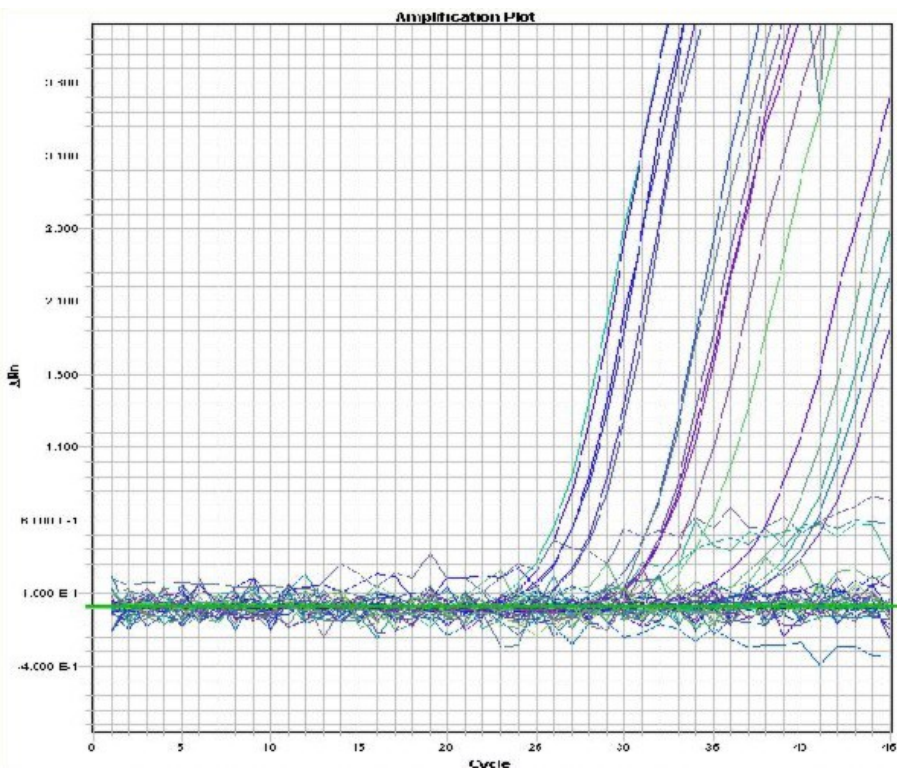
Amplificati curva standard apparecchiatura ROTOR
GENE Q (QIAGEN).



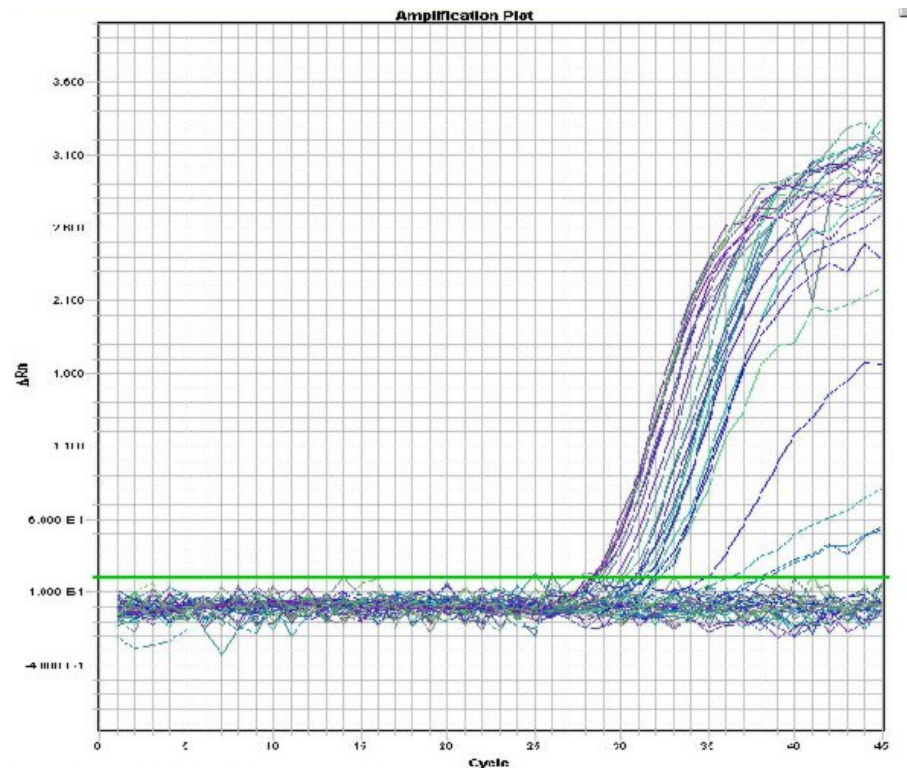
CONFRONTO METODICHE qReal Time PCR CON APPARECCHIATURA ABI PRISM®7900 (Applied Biosystem)

	qReal Time Protocollo Centro di Referenza Nazionale	qReal Time kit ADIAVET	qReal Time kit INGENETIX
% Positività colostri	0	0	0
Ct medi colostri	0	0	0
UFC colostri	-	-	-
% Positività feci	60	70	83,33
Ct medi feci	27,07	28,84	26,73
UFC feci	2,9 x 10 ³	2,25 x 10 ³	3,59 x 10 ³
% Positività organi	58,33	90	100
Ct medi organi	32,40	32,99	33,09
UFC organi	1,104 x 10 ³	8,66 x 10 ³	6,8 x 10 ¹





**Amplificazioni campioni esaminati con apparecchiatura ABI
PRISM®7900 (Applied Biosystem)**



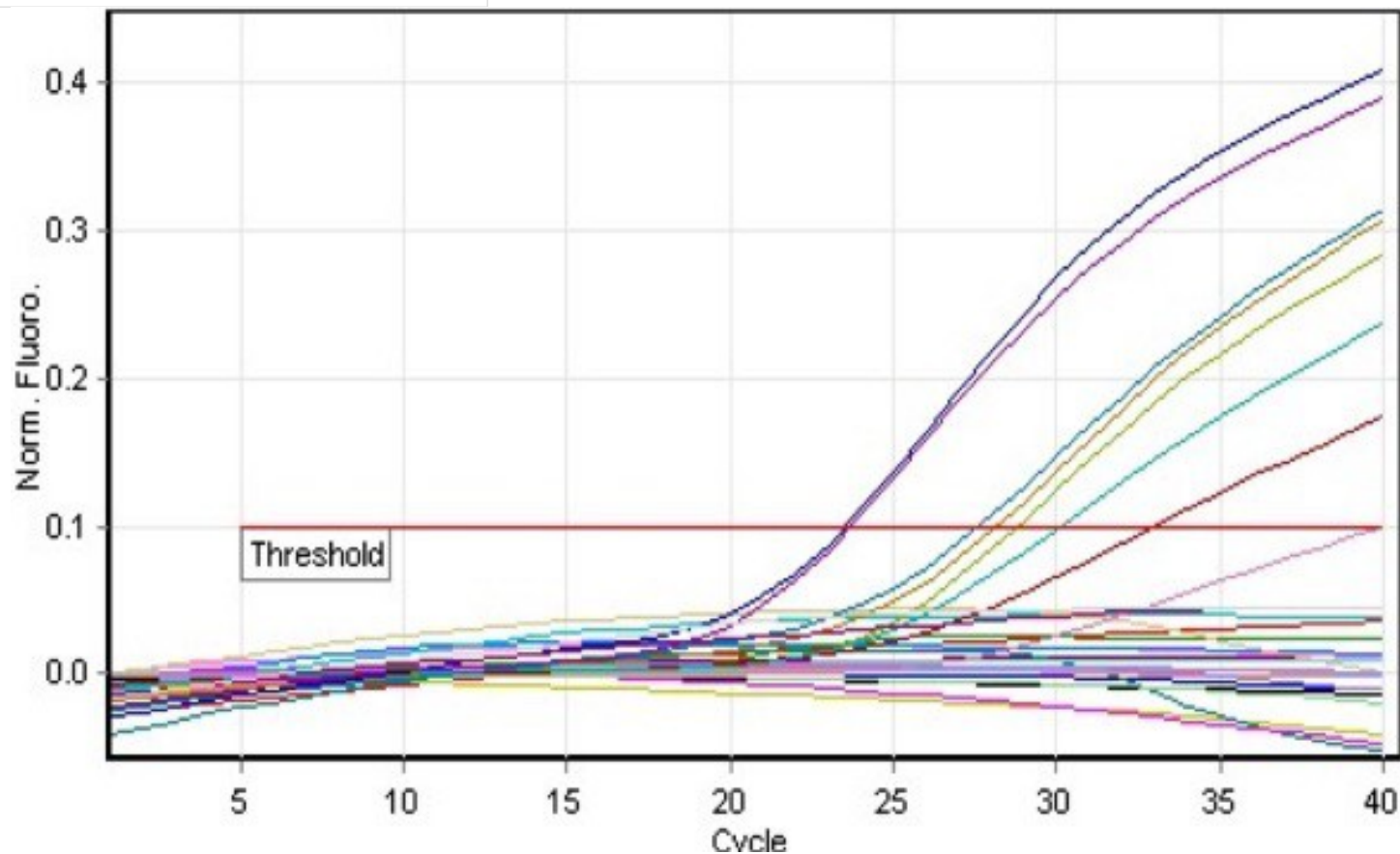
**Amplificazioni controlli interni dei campioni
analizzati con apparecchiatura ABI PRISM®7900
(Applied Biosystem)**



CONFRONTO METODICHE qReal Time PCR CON APPARECCHIATURA ROTOR GENE Q (QIAGEN)

	qReal Time Protocollo Centro di Referenza Nazionale	qReal Time kit ADIAVET	qReal Time kit INGENETIX
% Positività colostri	0	0	Non compatibile
Ct medi colostri	0	0	Non compatibile
UFC colostri	-	-	Non compatibile
% Positività feci	60	70	Non compatibile
Ct medi feci	31,57	24,81	Non compatibile
UFC feci	$4,91 \times 10^4$	$2,76 \times 10^4$	Non compatibile
% Positività organi	41,66	75	Non compatibile
Ct medi organi	36,29	32,03	Non compatibile
UFC organi	$3,70 \times 10^3$	$4,67 \times 10^2$	Non compatibile





**Amplificazioni campioni esaminati con
apparecchiatura ROTOR GENE Q (QIAGEN)**

