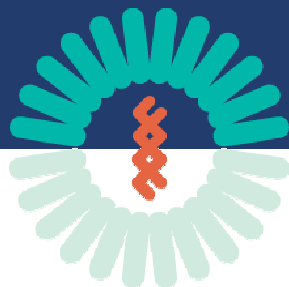


Parco Scientifico e Tecnologico della Sardegna

**PortoConte
Ricerche**



Nuovi marcatori proteici di mastite nei piccoli ruminanti: prospettive per la diagnosi sul campo e nel laboratorio

.....

*Maria Filippa Addis,
Porto Conte Ricerche, Alghero
addis@portocontericerche.it*



Giornata di studio SIPAOC

Cellule somatiche nel latte ovino e caprino – Grosseto, 8 novembre 2013

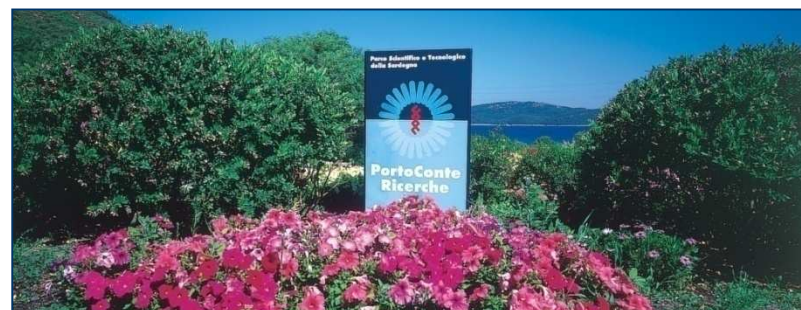
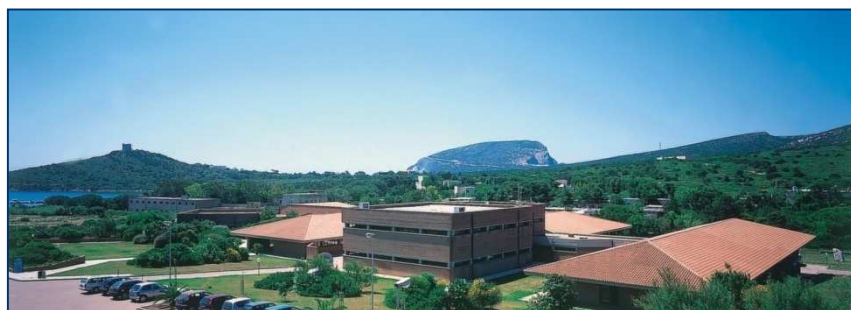
Parco Scientifico e Tecnologico della Sardegna

**Porto Conte
Ricerche**



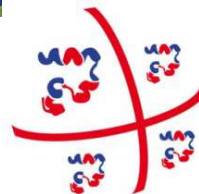
Il Centro di Ricerca

- **Porto Conte Ricerche:** Centro di Ricerca ed Ente Gestore del Parco Scientifico e Tecnologico della Sardegna, con sede a Tramariglio (Alghero)
- **Attività:** Ricerca Industriale, sviluppo di tecnologie, formazione, innovazione in settori tecnologici avanzati e nelle biotecnologie



Parco Scientifico e Tecnologico della Sardegna

**PortoConte
Ricerche**

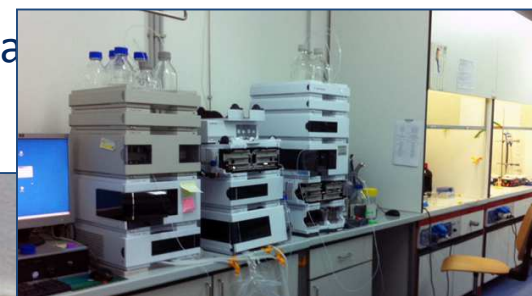


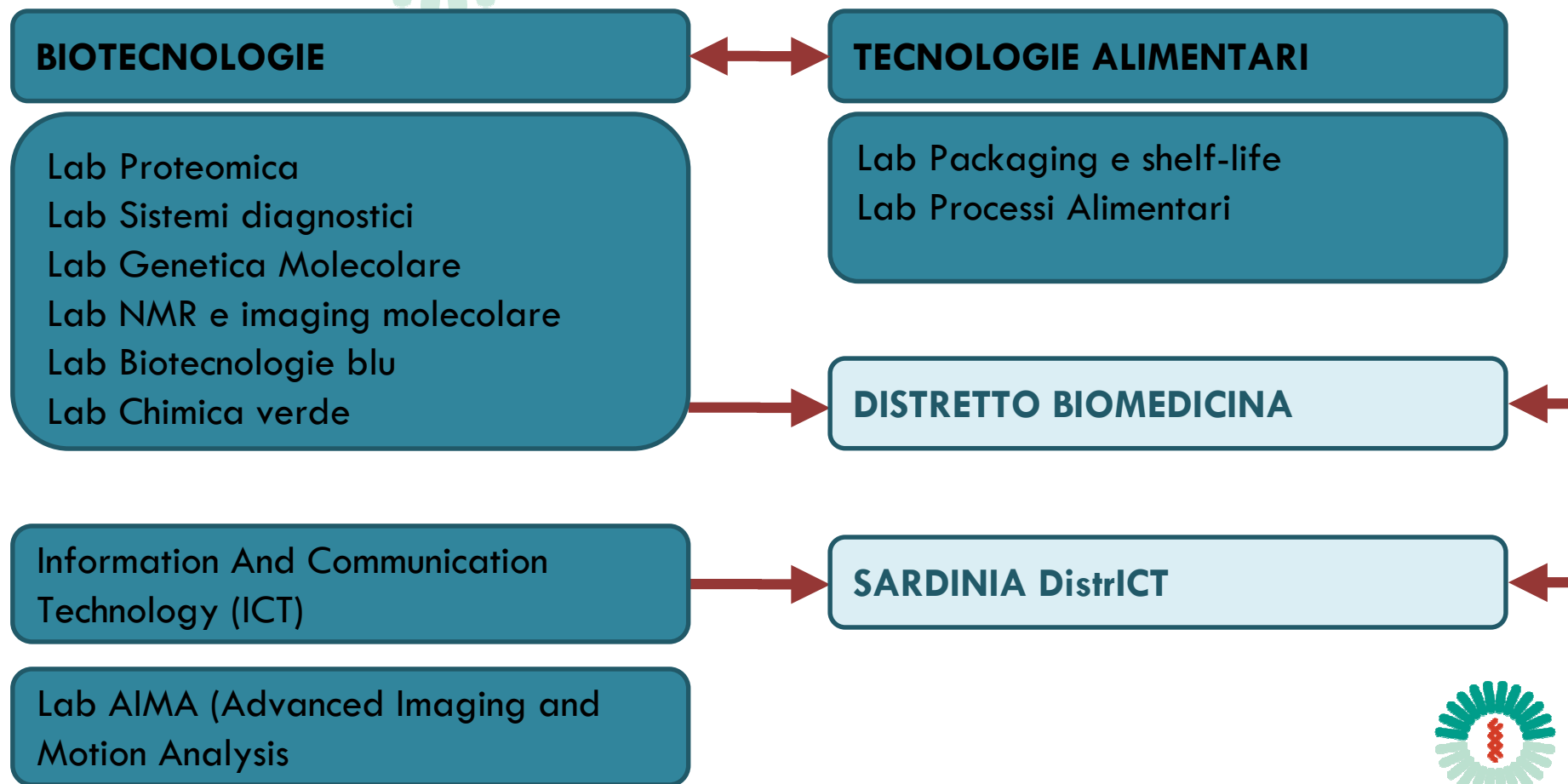
Il Laboratorio di Proteomica



Cosa facciamo:

- Biomarker discovery
- Realizzazione e sviluppo di sistemi diagnostici
- Sviluppo di tecnologie per lo studio del proteoma
- Purificazione, identificazione e caratterizzazione







La problematica: nuovi marker per le mastiti

Necessità di individuare nuovi marcatori di mastite per ovini e caprini, da usare in affiancamento o in alternativa alle cellule somatiche

Dei buoni marcatori devono preferibilmente essere :

- Presenti fin dai primi stadi dell'infezione
- Specifici della mastite
- Possibilmente indipendenti dall'agente eziologico
- Facili da rilevare
- Misurabili sul campo

DNA



mRNA



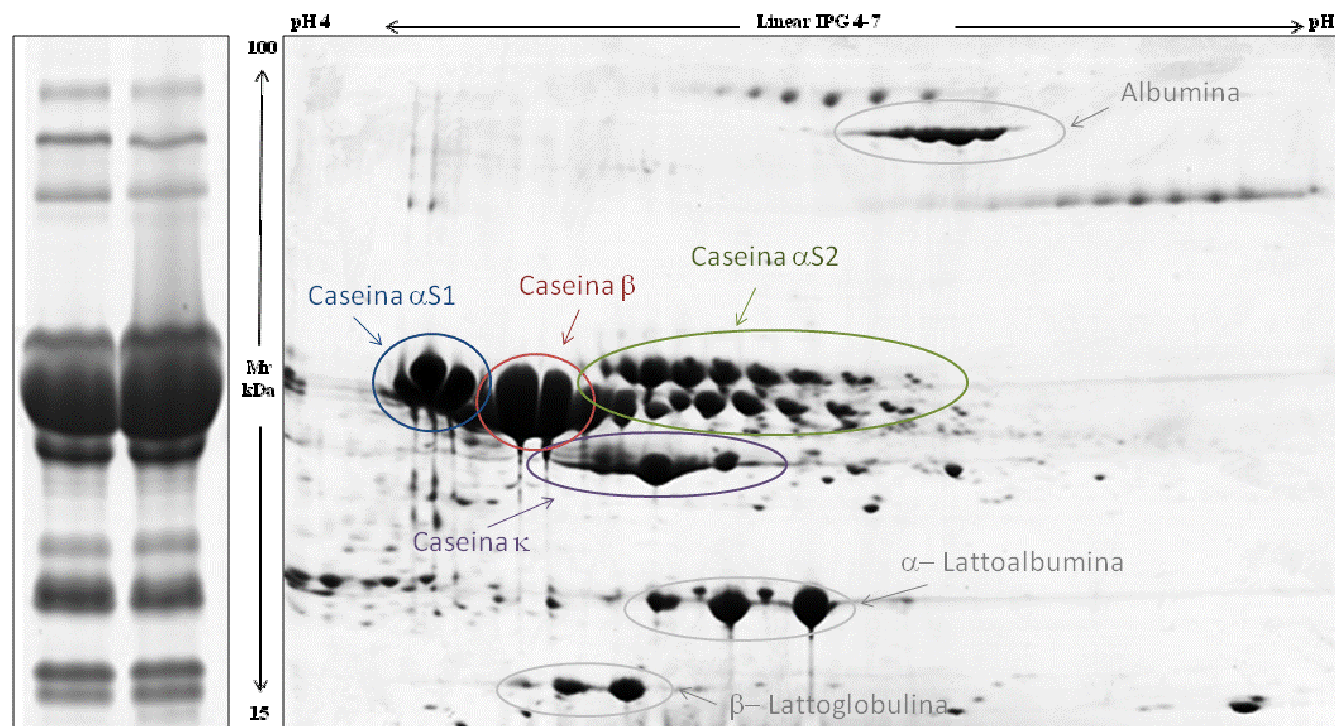
Proteine



La complessità della matrice latte

Il latte è una miscela complessa e sbilanciata costituita per oltre il 98% da poche proteine abbondanti, principalmente **caseine** e alcune **proteine del siero**

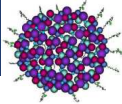
Le proteine che possono costituire dei **marcatori potenziali** sono da ricercare nella piccola percentuale residua di altre proteine, il che presenta problemi significativi per uno studio di tipo proteomico



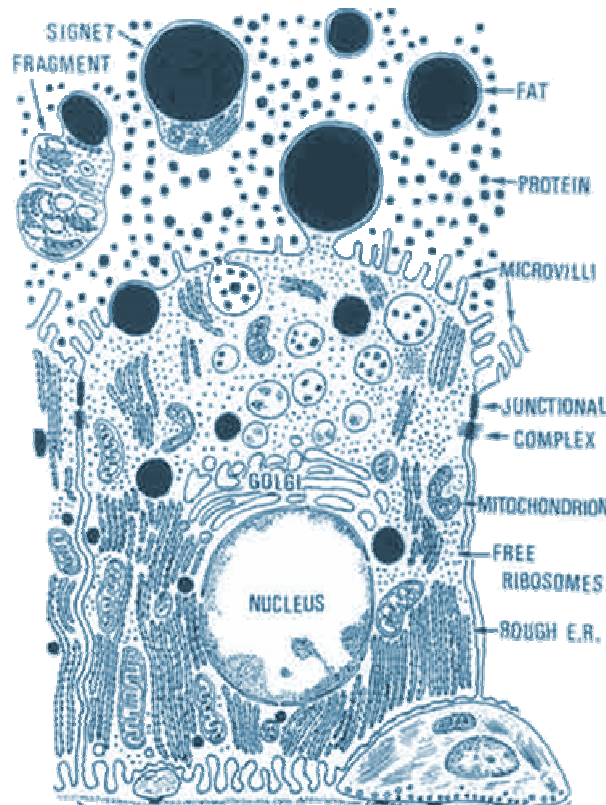
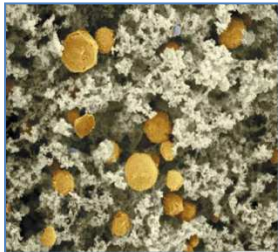
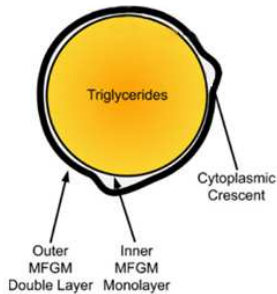
Pisanu, S., Ghisaura, S., Pagnozzi, D., Tanca, A., Biossa, G., Roggio, T., Uzzau, S., Addis, M.F. *Journal of Proteomics*, 2011;

Pisanu, S., Ghisaura, S., Pagnozzi, D., Falchi G., Biossa, G., Tanca, A., Roggio, T., Uzzau, S., Addis, M.F. , *International Dairy Journal*, 2012.

Micella di caseina
(20-300 nm)

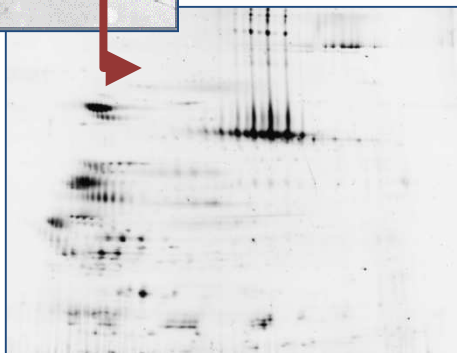
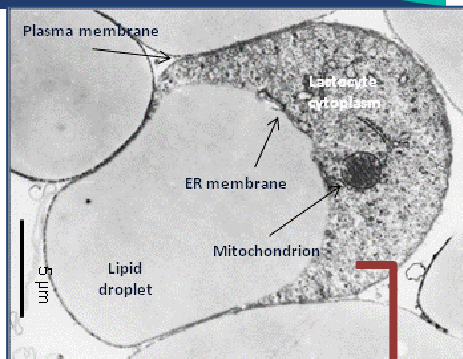


Globulo di grasso
(0,2-15 µm)



- Oltre alle micelle di caseina, un'altra componente importante del latte sono i globuli di grasso, che ne permettono la secrezione e ne evitano la coalescenza
- Non solo lipidi – la loro membrana è ricca di proteine, fra cui alcune molto importanti per la difesa immunitaria del lattante
- La vescicola secretoria che contiene la goccia lipidica include anche frammenti citoplasmatici, abbondanti negli ovini ma ancor più nei caprini

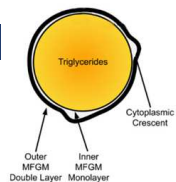
Il globulo di grasso come "spia"?



Poiché i MFG contengono proteine e citoplasma della cellula secernente, è possibile sfruttarli come strumento per "spiare" lo stato di salute dell'epitelio mammario evitando la massa proteica costituita da caseine e proteine abbondanti del siero?

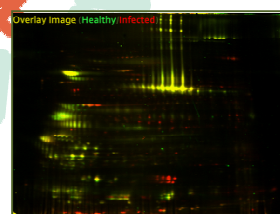
Come cambiano le proteine del globulo in presenza di infezioni batteriche?





Studio proteomico dei campioni di latte

1. Gel based



2D DIGE

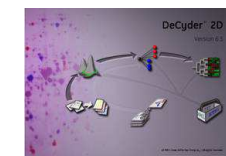
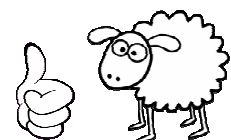


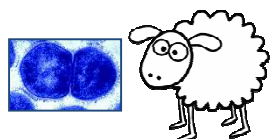
Image analysis



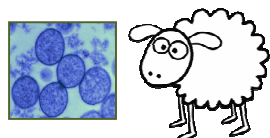
Ion-trap LC-MS/MS



Sane



S. uberis



M. agalactiae

2. Label-free



GeLC-MS/MS



Spectral counting (SpC) e Pathway analysis



3. Validazione sul tessuto



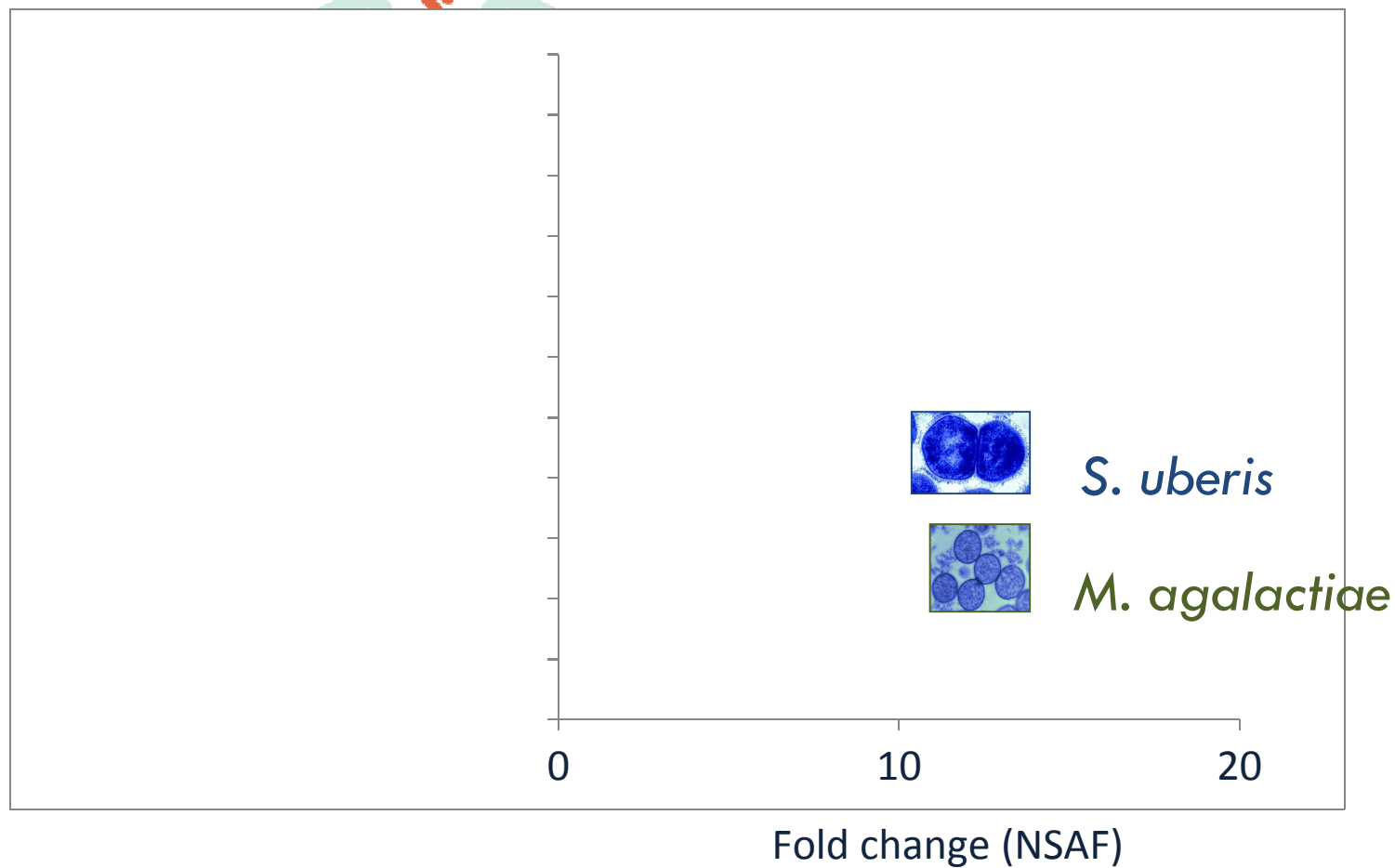
Immunoistochimica e immunomicroscopia confocale



Proteine differenziali

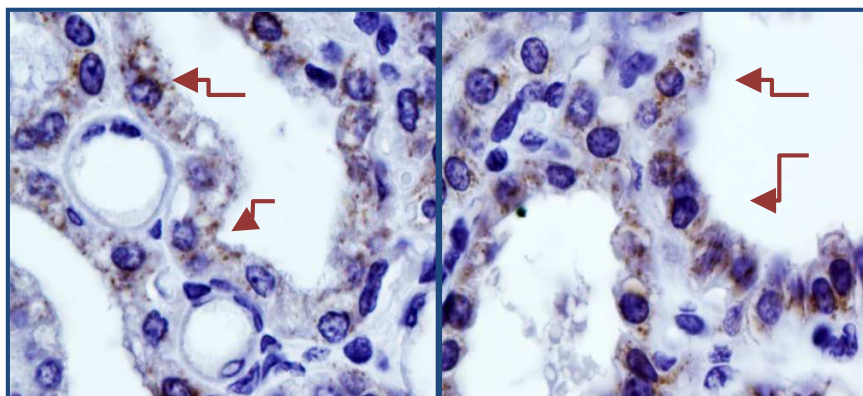
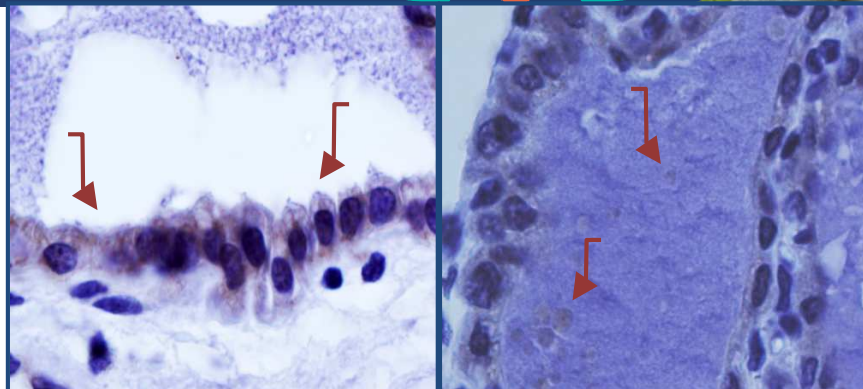


Proteine differenziali malato/sano

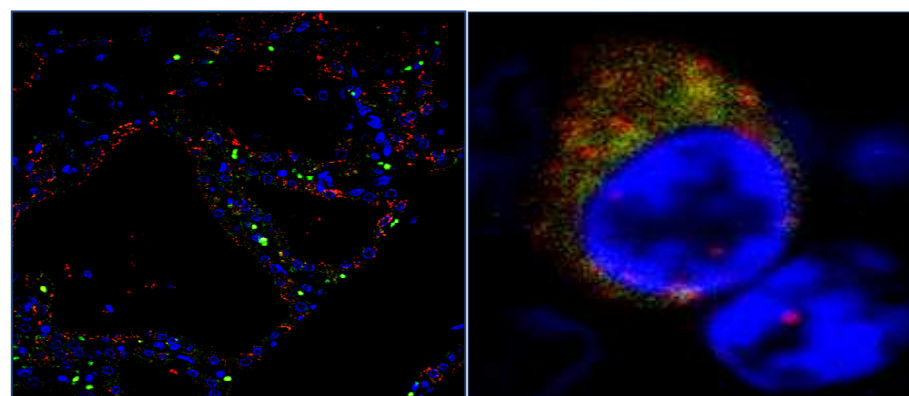
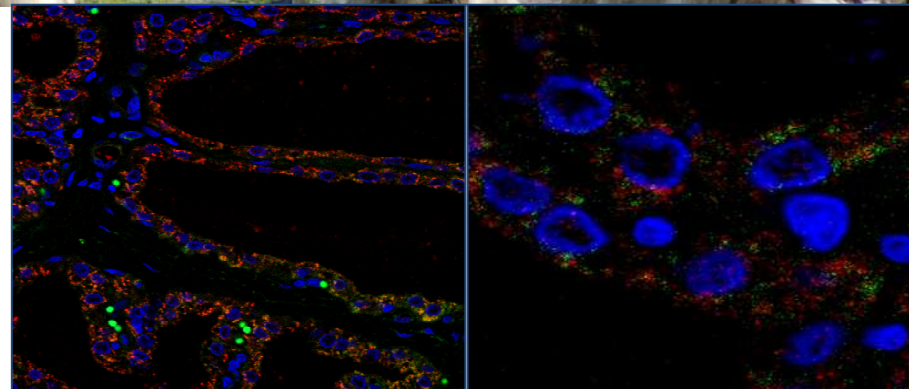




Validazione delle proteine differenziali



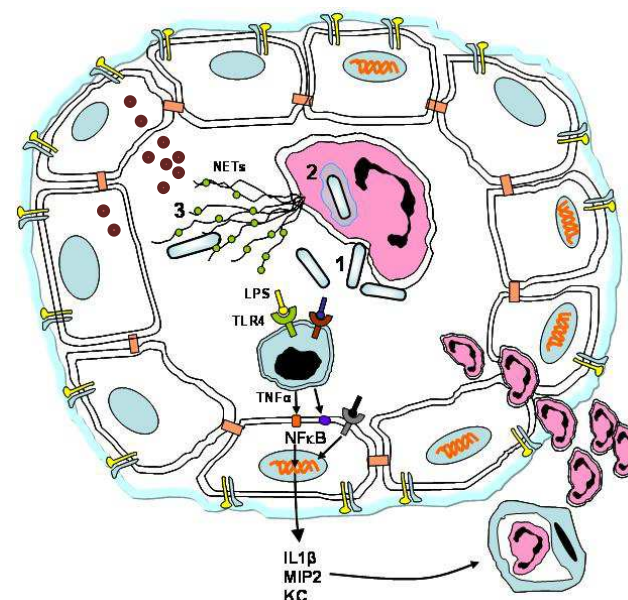
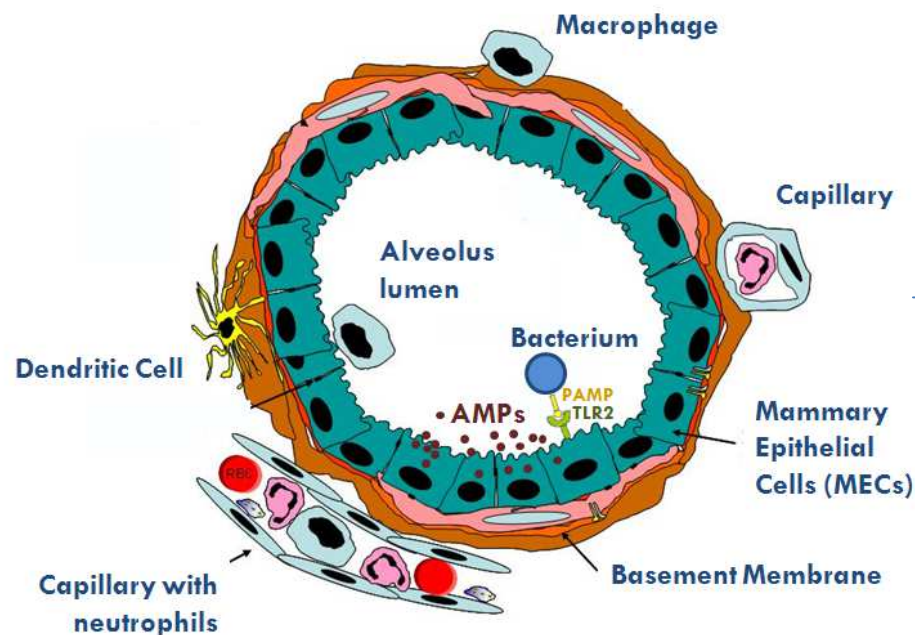
Immunoistochimica sui tessuto mammario prelevato da pecore con mastite subclinica



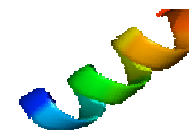
Immunomicroscopia confocale di **proteine differenziali** e **marker epiteliali** su tessuto mammario di pecore con mastite subclinica



Dinamica del processo di rilascio

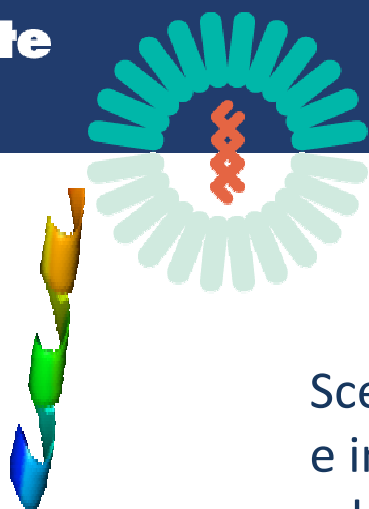


1. I batteri entrano negli alveoli mammari
2. I loro PAMPs interagiscono con TLR-2 sulle cellule epiteliali (MECs)
3. Le MECs producono **proteine antimicrobiche (AMPs)**
4. Le **AMPs** svolgono la loro azione *in situ* e richiamano i neutrofili
5. I neutrofili entrano negli alveoli mammari
6. I neutrofili rilasciano una seconda ondata di **AMPs**



AMPs = Marker di mastite!

Scelta del sistema diagnostico



Marker di mastite

Scelta del marker migliore (processo di validazione)
e individuazione delle piattaforme analitiche più
adatte per la sua valutazione

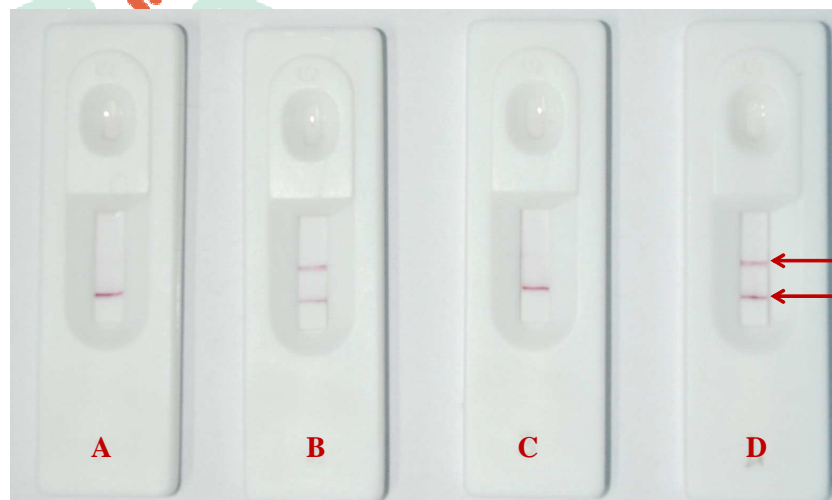


Sul campo



In laboratorio





-

+

-

+

Segnale Positivo
Segnale di Controllo

- **Specifico:** misura molecole rilasciate solo in presenza di infiammazione
- **Sensibile:** possibilità di rilevare i casi di infezione subclinica
- **Portatile:** utilizzabile anche in allevamento senza l'aggiunta di reattivi
- **Rapido:** il test è completo in 10-15 min
- **Facile da interpretare:** non richiede sistemi di lettura o misurazione del segnale
- **Economico:** costi di realizzazione molto bassi

Parco Scientifico e Tecnologico della Sardegna

**PortoConte
Ricerche**



Fase di validazione

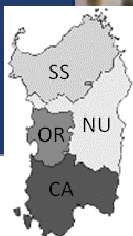


**Associazione Regionale Allevatori
della Sardegna**



Performance del marker e del test diagnostico in allevamenti con bassi ed alti valori delle cellule somatiche da diverse regioni della Sardegna

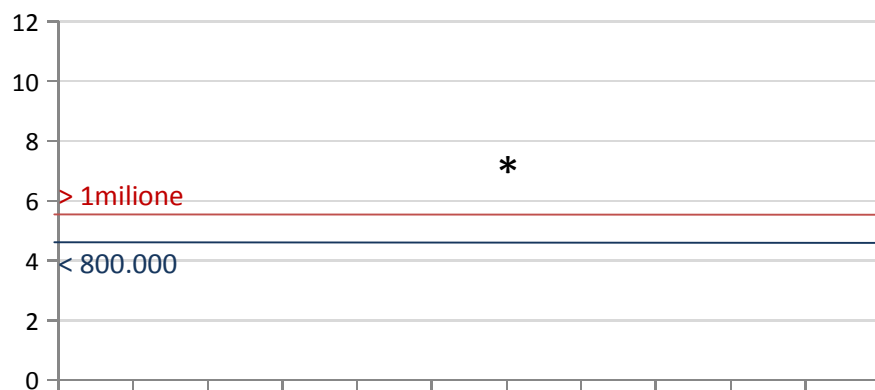




Massal

SCC/1000

Sassari



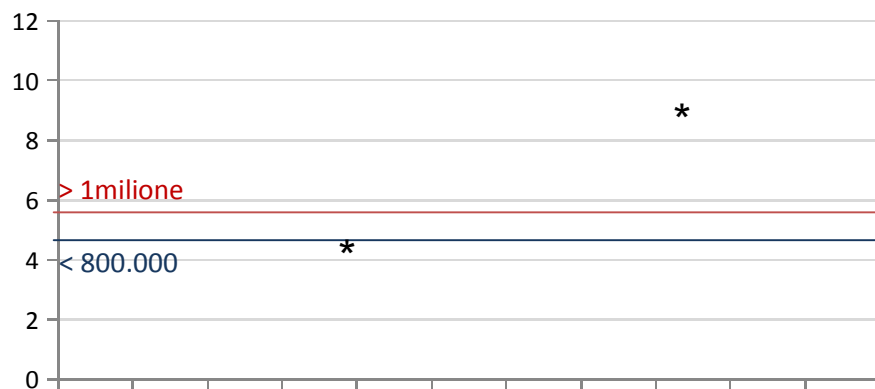
SCC/1000

Nuoro



SCC/1000

Cagliari



SCC/1000

Oristano



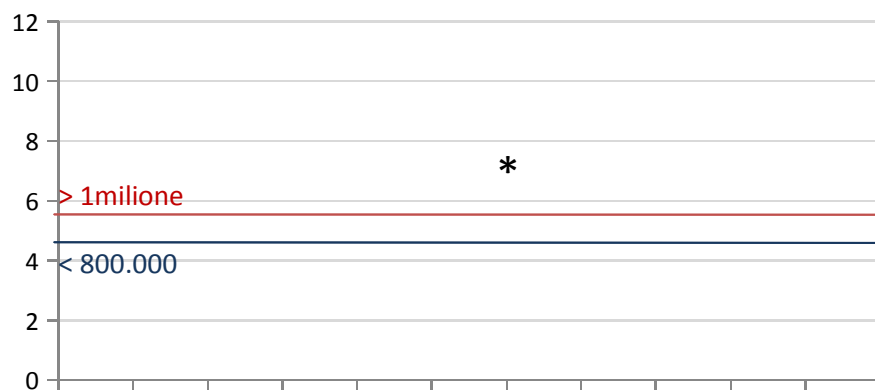
Test positivo

*campione con alta carica batterica



SCC/1000

Sassari



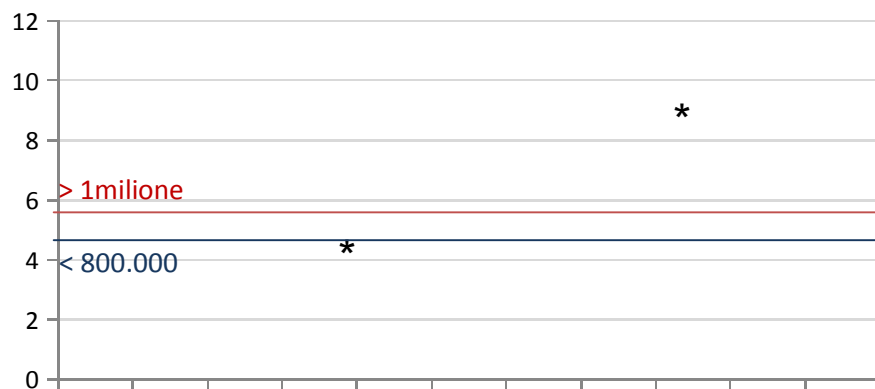
SCC/1000

Nuoro



SCC/1000

Cagliari



SCC/1000

Oristano

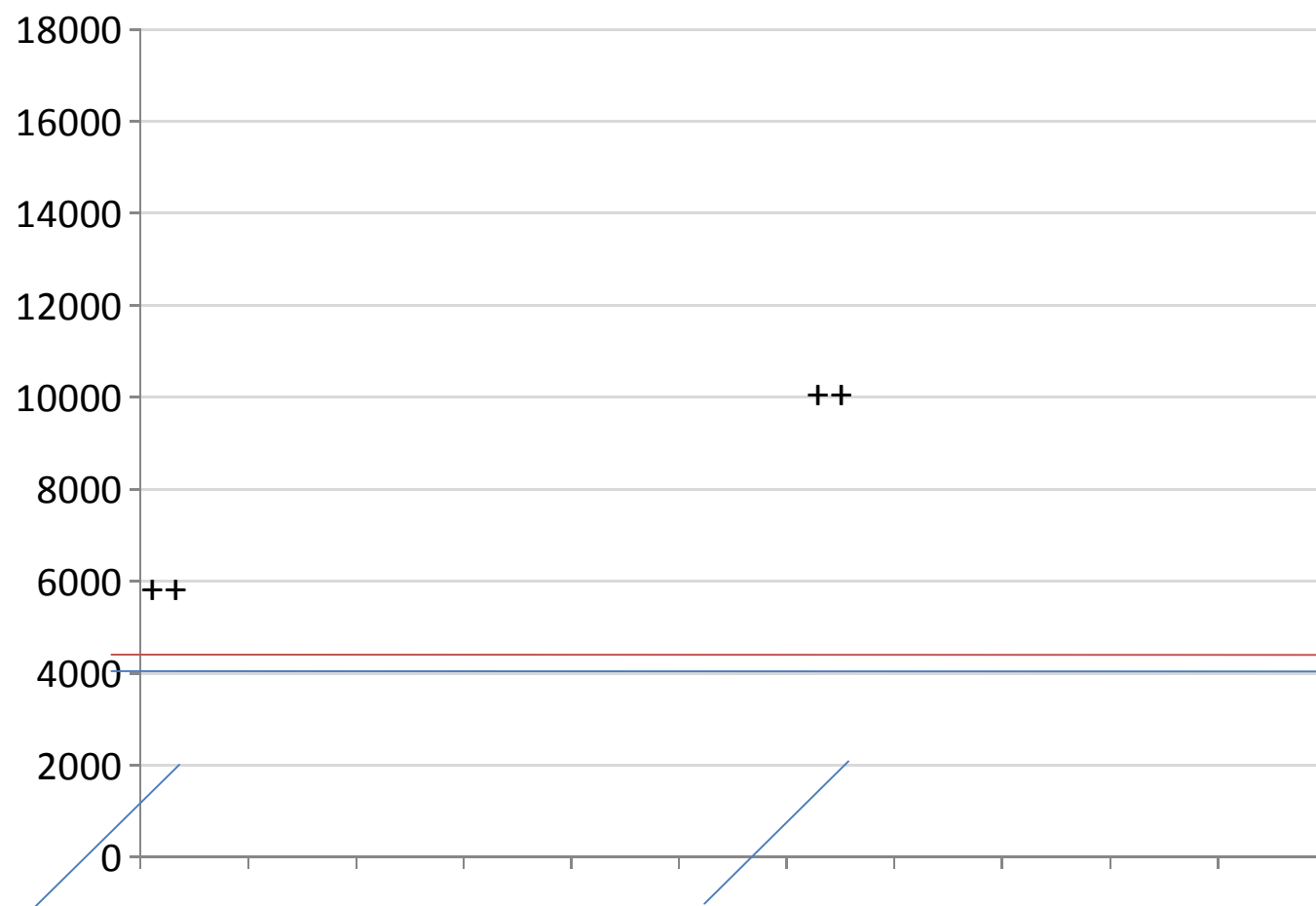




Latte di singoli capi da massali positivi



SCC/1000



> 1milione

< 800.000

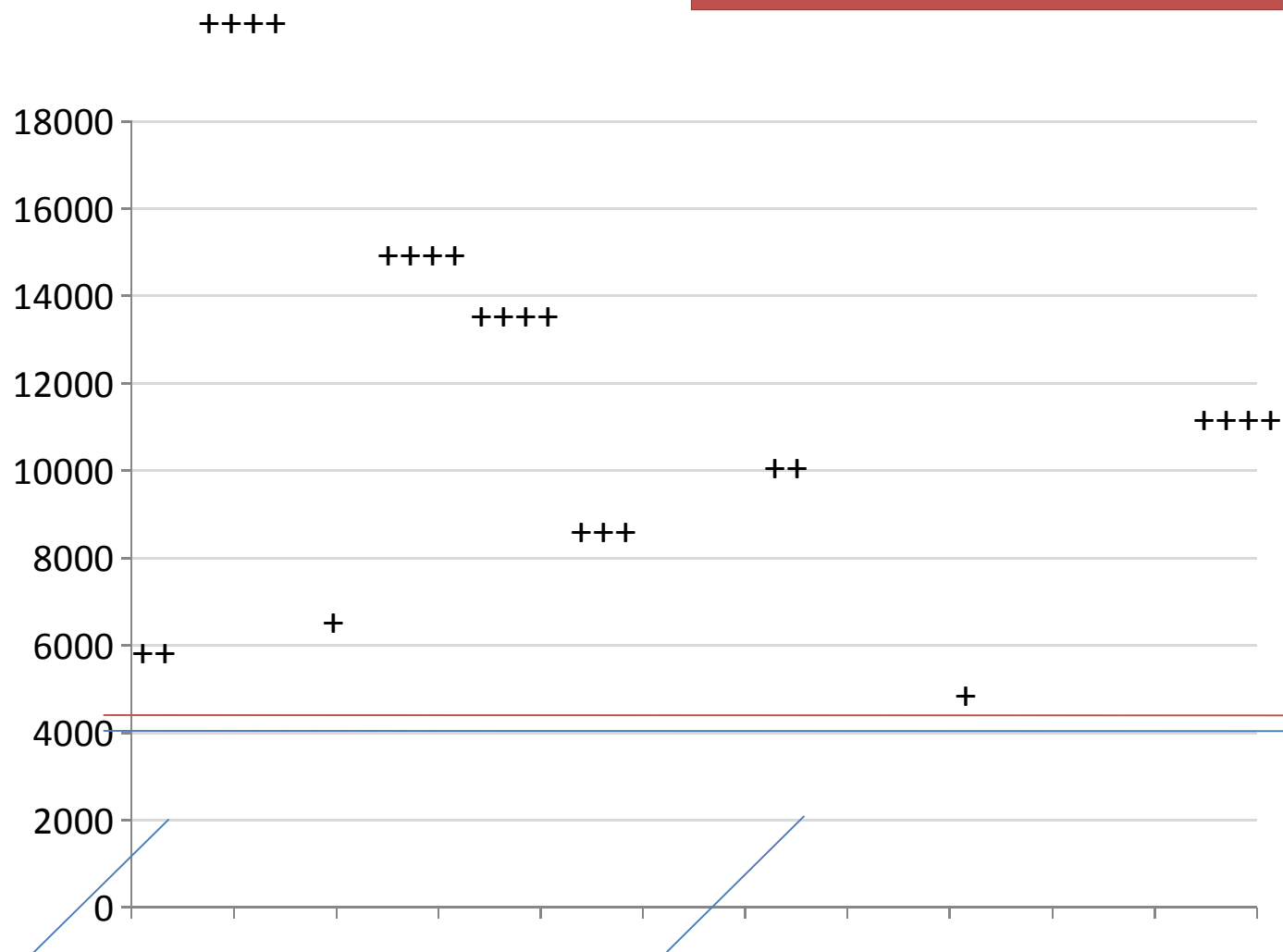


Latte di singoli capi da massali positivi



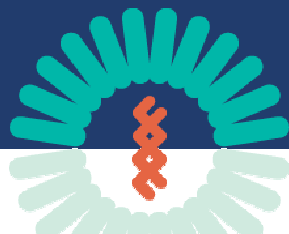
SCC/1000

Test positivo (+ = intensità del segnale)



> 1milione

< 800.000



Performance attuale

Controllo



Basse SCC



Alte SCC



In corso: miglioramento dell'intensità del segnale
per consentire l'interpretazione visiva senza
l'utilizzo di dispositivi di lettura



In laboratorio: il sistema ELISA



È in fase di sviluppo il sistema su piastra ELISA per la misurazione:

- In laboratorio
- Quantitativa
- Su larga scala
- Sensibile
- Automatizzabile

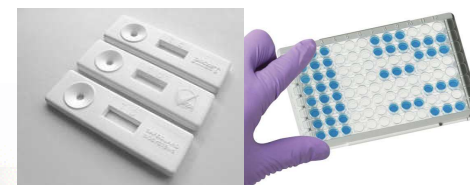
Marker di mastite



Parco Scientifico e Tecnologico della Sardegna

Porto Conte
Ricerche

Biomarker discovery e sviluppo del sistema diagnostico: Conclusioni



● Validazione del sistema

● Sviluppo del sistema diagnostico

● Identificazione del biomarker candidato

● Analisi dei campioni

● Pianificazione dello studio



Problematica

Parco Scientifico e Tecnologico della Sardegna

**PortoConte
Ricerche**

Hanno lavorato con noi

Enti finanziatori



Associazione Regionale Allevatori
della Sardegna



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA SARDEGNA
"G. Pegreff"



**SARDEGNA
RICERCHE**

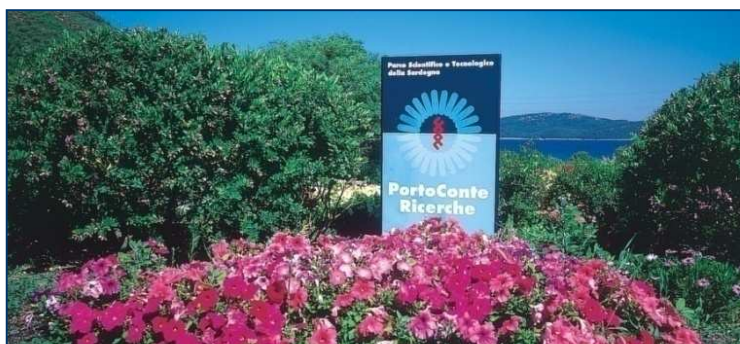


**REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA**



uniss

Dipartimento di Medicina Veterinaria



Grazie!