



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana,
Sezione di Viterbo

FIRENZE 15 dicembre 2011

IMPIEGO DELLA PCR NELLA SEZIONE DI VITERBO

Dott. Luigi De Grossi

LA MALATTIA



PARATUBERCOLOSI

*La paratubercolosi o malattia di Johne è una malattia **infettiva contagiosa a carattere cronico**, che colpisce principalmente l'apparato digestivo di ruminanti domestici e selvatici.*

***lungo periodo di incubazione** alcuni mesi o anni e provoca un' enterite cronica.*

*E' sostenuta dal **Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis**.*

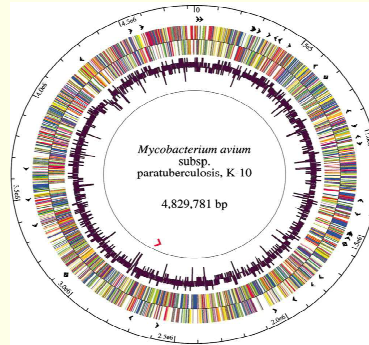
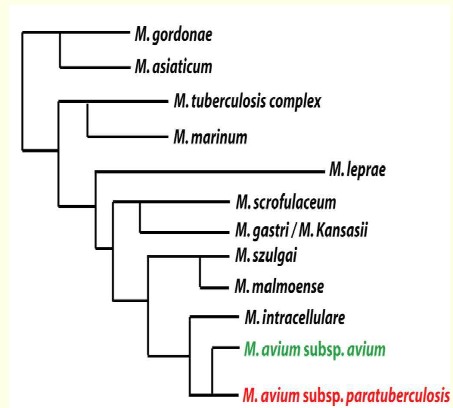


storia

- **1895** prima descrizione
Johne e Frothingham. enterite pseudotubercolare.
- **1906** Nell'Annual Report del del Principal of the Royal Veterinary College, **J.Mc.Fadyean** coniò il termine "**Johne's disease**".
- **1923** prima edizione del ***Bergey's Manual of Determinative Bacteriology***, "***Mycobacterium.a.paratuberculosis***
- **1990** *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis* (Thorel et al.)



AGENTE EZIOLOGICO: Classificazione

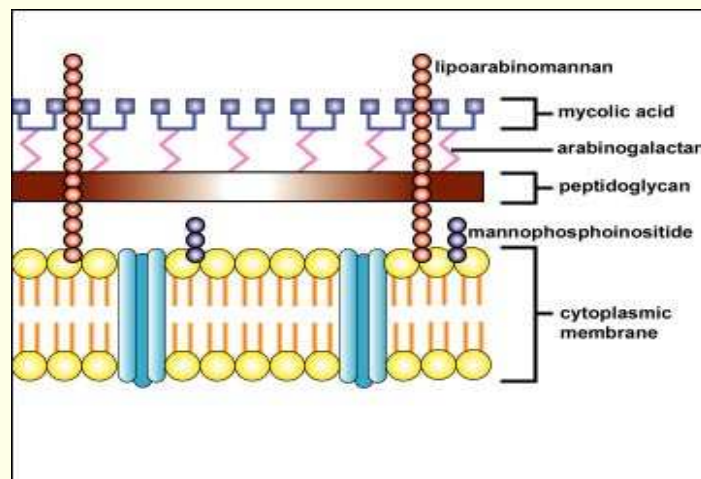


- **IS900**
- **IS1311**
- **ISMav2**
- **IS_Map02**

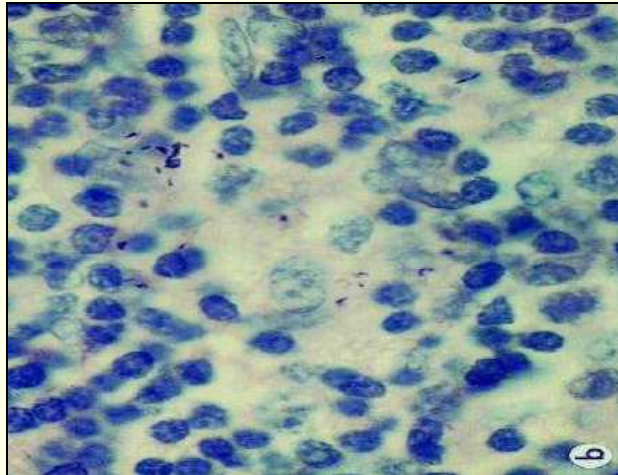
• 6% (289 kb) del genoma esclusivo di Map

4,54 mbp 96-100% omologia con Maa

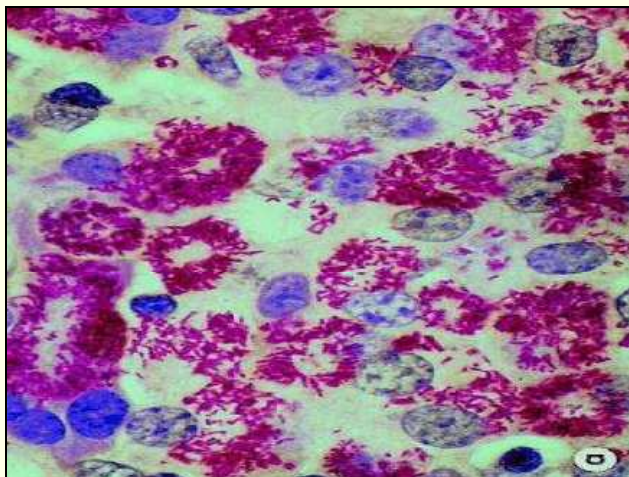
AGENTE EZIOLOGICO: struttura



***Foto : Bacilli acido alcool
resistenti in ovini***



***Foto 1: Bacilli acido alcool
resistenti in bovini***



CRESCITA E SVILUPPO

- Lenta moltiplicazione 15-24 ore rispetto ai 15 –30 minuti delle *Enterobacteriacee*.
- Coltivazione difficoltosa che richiede terreni complessi con mycobactina
- tempi molto lunghi anche più di 8 mesi.

LA RESISTENZA



Resistenza e sopravvivenza

resistenza alla luce solare

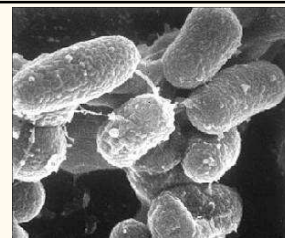


Resistenza alla pasteurizzazione

**l'ipoclorito di sodio, non inattivano
rapidamente il micobatterio**

**IL FREDDO (Richards e Thoen, 1977).
TOLLERANZA VERSO**

Resistenza e sopravvivenza



1210 gg **suolo**

336 gg **acqua stagnante**

330 gg **feci**

252 gg **liquame a 5°C , 98 gg a 15 °C**

163 gg **acqua di fiume**



sensibilità

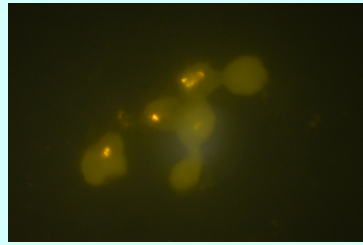
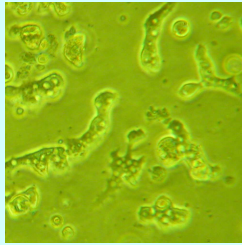
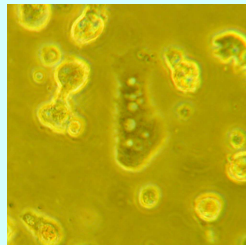
- composti fenolici,
- basi forti che denaturano proteine (idrossido di sodio al 2%),
- agenti che modificano i gruppi funzionali come metalli pesanti, agenti alchilanti e ossidanti, sono attivi su *M.a.paratuberculosis* in un mezzo acquoso

AMBIENTE



AMBIENTE

- Presenza del MAP all'interno di *amoebae free-living* (*Acanthamoeba polyfagica*)
- I *biofilms* si formano all'interno di tubature in plastica o gomma e rappresentano importanti siti di replicazione del MAP. Ne aumentano inoltre la resistenza agli stress chimici rispetto alla forma libera in ambiente acquatico



ACQUE



INFEZIONE E PATOGENESI



PATOGENESI

- penetrazione per via orale



- attecchimento a livello valvola I. C. e ileo distale
- moltiplicazione nei macrofagi
- diffusione macrofagi infetti



- localizzazione al tenue prossimale
- intensa moltiplicazione di *Map*



Disseminazione

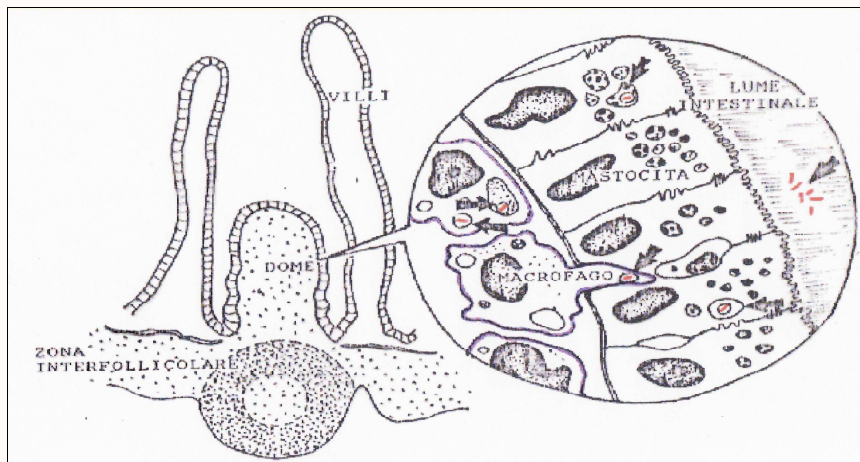


- *FECI*



fegato, mammella, utero
rene, polmoni, cuore, linfonodi

Infezione e patogenesi



Infezione e patogenesi

Due fasi principali della malattia:

- Fase tubercoloide:
Risposta tipo Th1- imm. cell.mediata

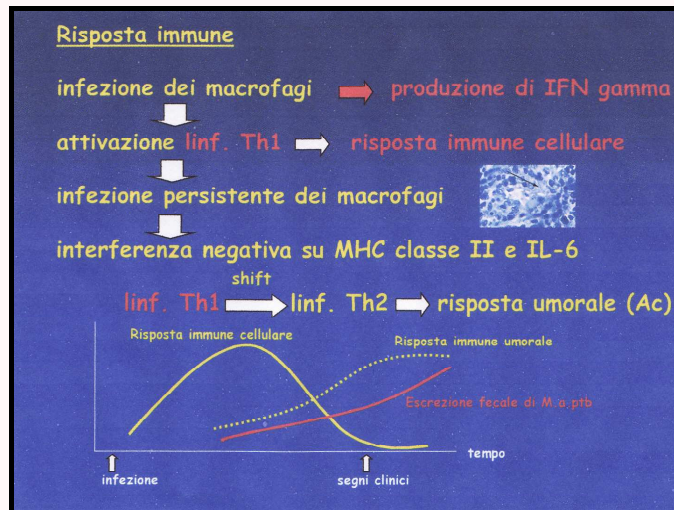
EFFICACE



- Fase lepromatosa:
Risposta tipo Th2- imm. umorale

INEFFICACE

Infezione e patogenesi



Infezione e patogenesi

TRASMISSIONE

- Orizzontale
via oro-fecale è la più importante: feci, colostro latte, alimenti, acqua .
- Verticale
in gravidanza nel feto.

Infezione e patogenesi

- **Animali adulti > 2 anni :più resistenti all'infezione**
- **animali giovani ,max recettività 0-6 mesi**
- **Esistono altri fattori che influiscono nell'acquisizione e nello sviluppo della malattia, come il tempo d'esposizione ai batteri e la risposta dell'ospite.**

FATTORI CONDIZIONANTI



animale recettivo → *infetto*

subclinico

ammalato

acidità del terreno
alte produzioni
infestazioni concomitanti
stress ambientali
errori alimentari
parto

ELIMINAZIONE DI *Map*

feci (10^8 micobatteri/g)

latte e colostro

feto (immunotolleranti)

embrioni

seme

Colostro e Latte come fonte di infezione

- Il 35% delle bovine con forma clinica
- Il 10% delle bovine con forma subclinica

Eliminano il *Map* con colostro e latte

- In caso di prelievi non igienici il colostro ed il latte possono essere contaminati da materiale fecale



SOLO ALCUNI ANIMALI SI AMMALANO

Map



resistente



recettivo

carica infettante

età

immunità

predisposizione genetica



Epidemiologia

M.a.paratuberculosis è un patogeno obbligato degli animali e gli ospiti d'eccellenza sono i ruminanti domestici (bovini, caprini e ovini).

3 tipi

- 1 ovino (S),
- 2 bovino (C)
- 3 bisonte (B)



ruminanti selvatici:

**Cervo, alce, lama, muflone, daino, Capriolo,
Stambecco, Alpaca, Bisonte, ecc.**

Bufalo?

Trasmissione interspecie.

altre specie domestiche monogastriche

- **cavalli**, (Larsen et al., 1972),
- **mul**i (Eveleth e Gifford, 1943),
- **suini** (Larsen et al., 1971)
- **galline** (*Larsen et al.*, 1981).

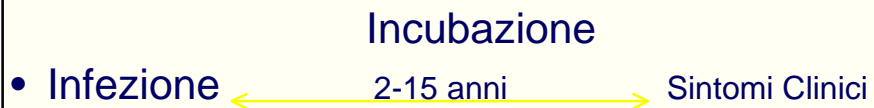
SPECIE NON RUMINANTI SELVATICI

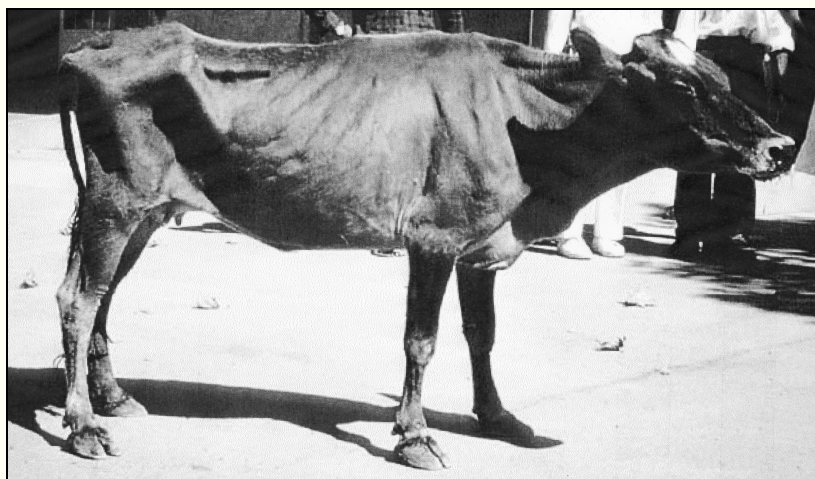
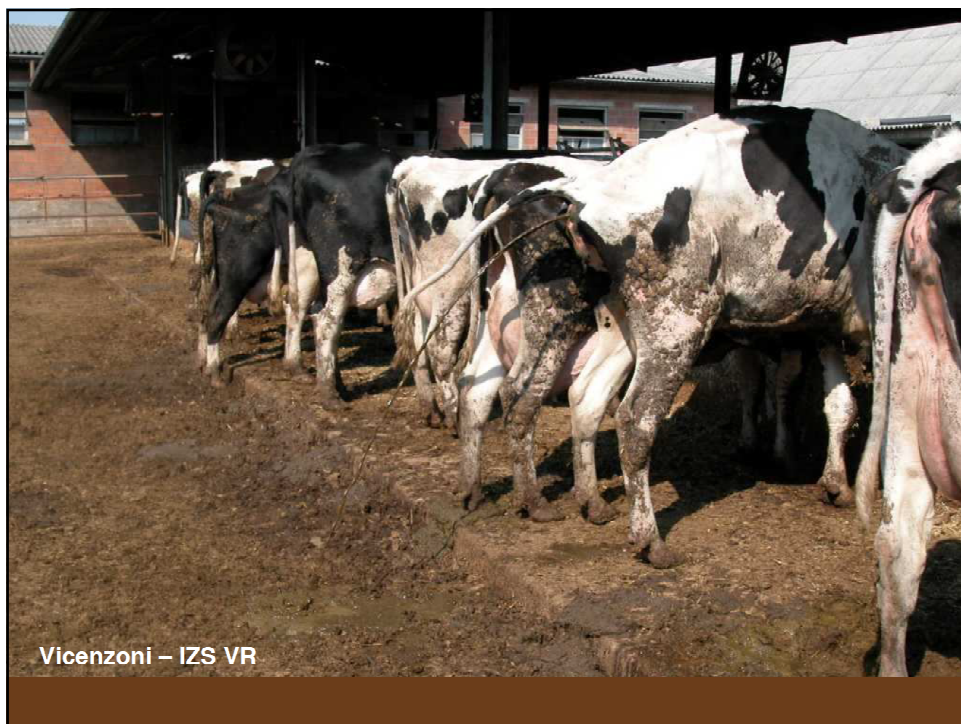
| | |
|---------------|------------------------------------------|
| •PRIMATI | SCIMMIA, UOMO? |
| •CARNIVORI | DONNOLA, VOLPE, GATTO SELVATICO,FURETTO |
| •ALTRE SPECIE | GIRAFFA,ORSO,CINGHIALE,RINOCERONTE,TASSO |
| •RODITORI | RATTO, TOPO, ARVICOLA |
| •UCCELLI | TACCOLA, CORVO |
| •INVERTEBRATI | LOMBRICHI, DITTERI, SCARAFAGGI |
| •LAGOMORFI | LEPRE, CONIGLIO SELVATICO |



Quadro clinico

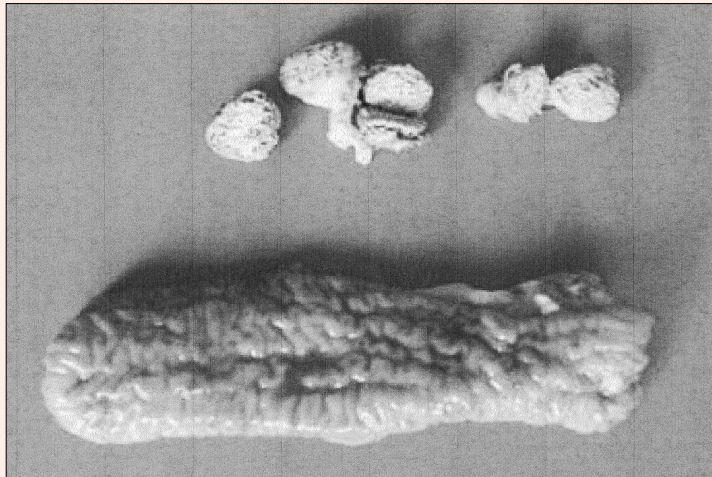
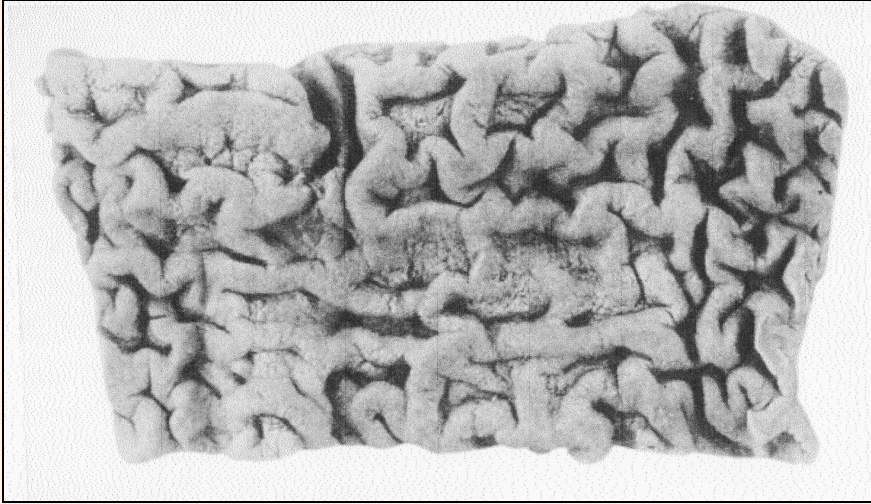
Malattia cronica ⇒ dimagrimento progressivo,

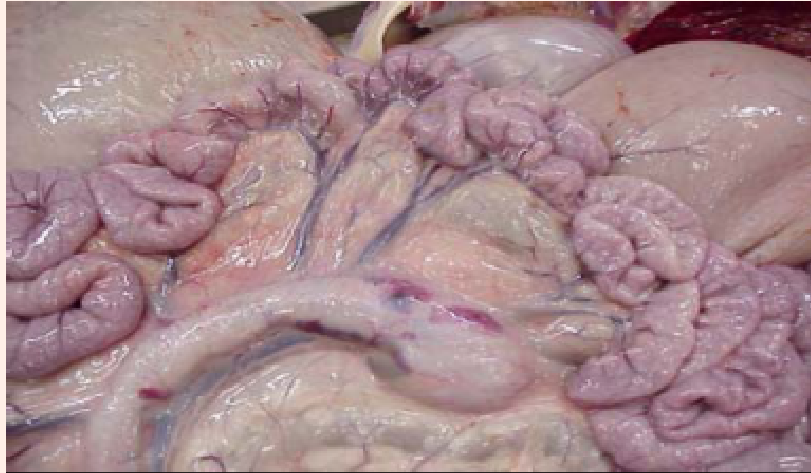












ZOONOSI ?

PERCHE' PREOCCUPARSI

- *Impatto economico*
- *Diffusione in aumento*
- *Scarsa sensibilità dei test*
- *Assenza di terapie efficaci*
- *Uso controverso della vaccinazione*
- *Estrema resistenza nell'ambiente*
- *Contaminazione della catena alimentare*
- *Sospetto ruolo zoonosico*

Metodi diagnostici più usati

TEST ELISA (scarsa sensibilità)

*PCR (scarsa sensibilità e
<sp. ELISA)*

COLTURE FECALI (tempi lunghi)

Ricerche



materiali e metodi

- 83 Pecore da riforma della provincia di Viterbo
- Prelievi presso il mattatoio di :
SANGUE
LINFONODI MESERAICI
VALVOLA ILEOCALE
INTESTINO
FECI
- Annotazione azienda di provenienza



• ANALISI MOLECOLARE -PCR

• kit Estrazione :QIAamp DNA minikit

• Estrazione da FECEI e TESSUTI

• 1 g in 20 ml acqua distillata →



• Lisi meccanica

• (Fast Prep)

• Lisi chimica

• (Kit Adiavet, AdiaGene)

• ANALISI MOLECOLARE -PCR

• PCR qualitativa per MAP-IS900

• Analisi della sequenza di inserzione IS 900

• (Kit Adiavet paratube-AdiaGene)

• Amplificazione- GeneAmp PCR System 9700 della Perkin-Elmer

• Ciclo:

• 37°C per 30 secondi

• 94°C per 5 minuti

• 94°C per 15 secondi

• 62°C per 30 secondi

• 72°C per 40 secondi

• 72°C per 10 minuti

• Mantenuta a 10 °C

45 volte

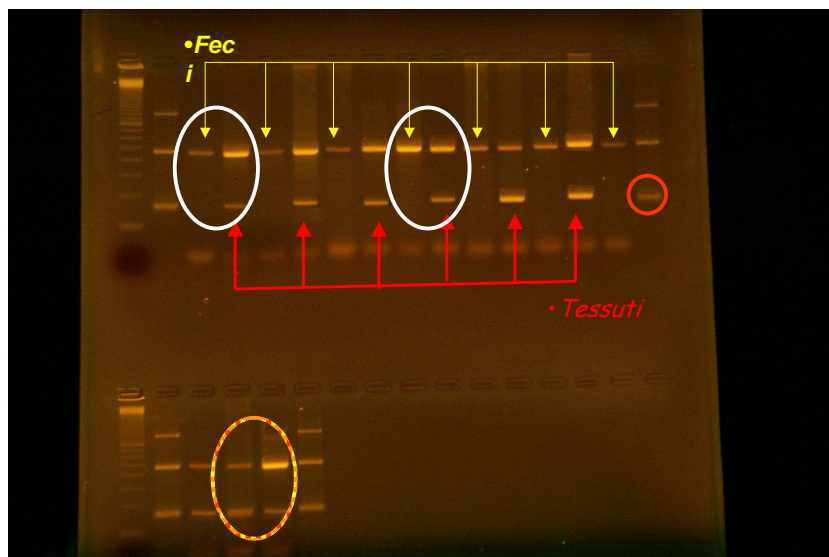


•ANALISI MOLECOLARE -PCR



•Elettroforesi su gel di agarosio

- Gel di Agarosio all'1.3% (1.3 gr. Agarosio+100mL buffer)
- Aggiunto di 8 μ l di bromuro d'etidio (1mg/L)
- Caricato con 10 μ l dell'amplificato
- Corsa: 1.5 ore a 3.4 volts /cm
- Leggere il gel sotto i raggi UV



RISULTATI

| Metodiche campioni | Sieri in ELISA | Tessuti in PCR | Feci in PCR |
|-----------------------|-------------------|----------------|-------------|
| 10 | + | + | + |
| 45 | - | - | - |
| 8 | + | + | - |
| 7 | - | + | - |
| 2 | ? | + | - |
| 3 | + | - | - |
| 8 | ? | - | - |
| TOT.83 | 21 | 27 | 10 |

•Animali con segni clinici di malattia

•Animali sani

•Animali "low shedder "

• Animali con stato preclinico

•Animali con basso titolo di risposta anticorpale? Inizio risposta immunitaria umorale?

• Falsi Positivi

