

Studio sulla correlazione tra forme anatomopatologiche, genetica e ceppi di Map nella paratubercolosi ovina

De Grossi Luigi *Istituto Zooprofilattico del Lazio e della Toscana M. Aleandri
Sezione di Viterbo*

L'ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA:
PRINCIPALI RISULTATI E LORO TRASFERIBILITÀ OPERATIVA
21 giugno 2018 Roma dell'IZS



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Argomenti

Dati preliminari

Scopo del progetto

Generalità su Malattia e Map

Materiali e metodi

Risultati

Discussione , conclusioni e ricaduta



Dati preliminari





MAP ovino

- Ottimo modello per CD
- Poco studiato soprattutto in Italia
- Pochissimo isolato in Italia e Europa
- Ceppi isolati - soprattutto su razze da carne e in paesi lontani es. Australia , NZ.
- Centro di Referenza di Piacenza dell'IZSLER ha solo 2 ceppi (Tra cui i nostri)
- Non si conosce l'associazione tra severità e forma clinica e anatomopatologica della malattia e ceppo del MAP



Scopo del progetto

- La conoscenza dei ceppi circolanti negli ovini nei nostri territori
- Eventuale associazione con diverse forme patologiche
- Verificare polimorfismi del gene SCL11A1 e loro correlazione con resistenza /sensibilità alla malattia



Generalità su malattia e Map



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*.*





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

ZOONOSI?

Morbo di Crohn

PRO:

- similitudini delle due patologie
- positività colturale da alcuni pazienti
- rilevazione di IS900 da pazienti CD
- patogenicità dei ceppi *Map* isolati da CD per i ruminanti

CONTRO:

- scarso numero di isolamenti
- rilevazione di IS900 dai controlli
- variabilità dei dati della PCR + IS900
- dati epidemiologici non significativi





- 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.)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Generalità su Malattia e Map

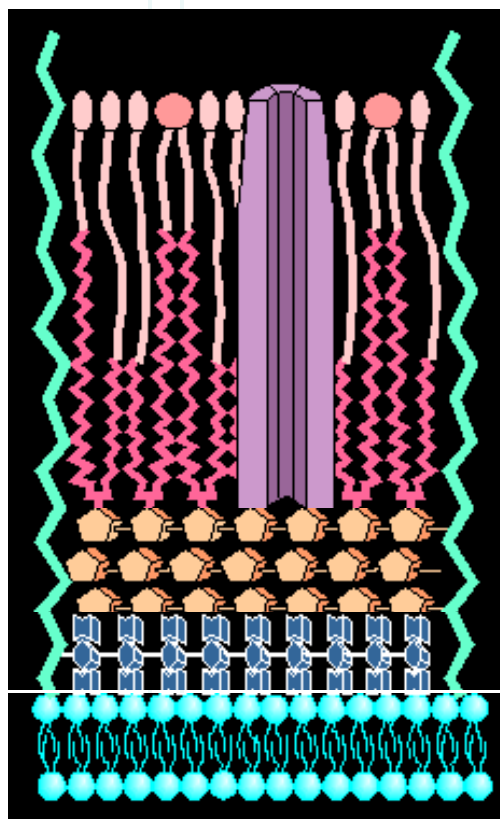
Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis (Map)

- Bacillo di piccole dimensioni (0,5 -1 μm)
- Aerobio, immobile, non produce flagelli, capsule o spore
- Gram positivo, Alcool-acidoresistente
- Parete ricca di lipidi e polisaccaridi

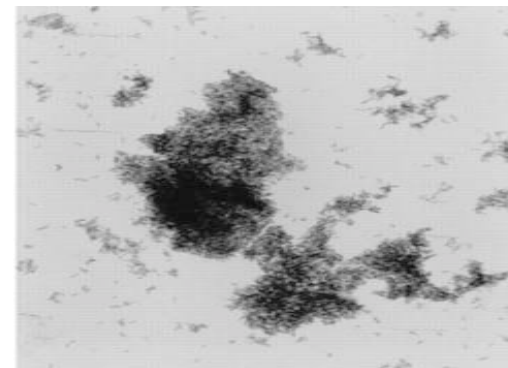
Acidi micoici

Arabinogalattani
Peptidoglicani

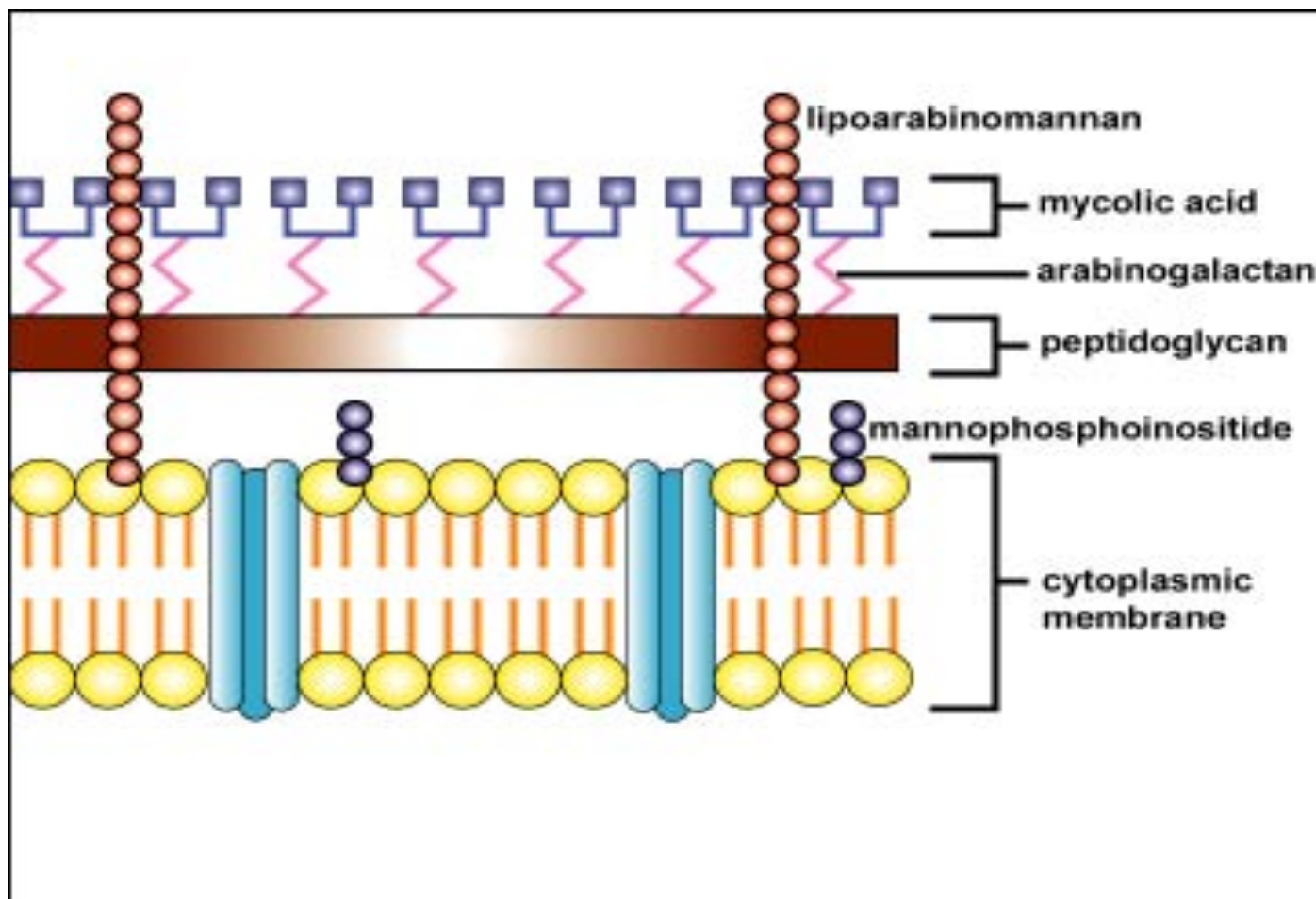
Membrana plasmatica



Aggregato



AGENTE EZIOLOGICO: struttura



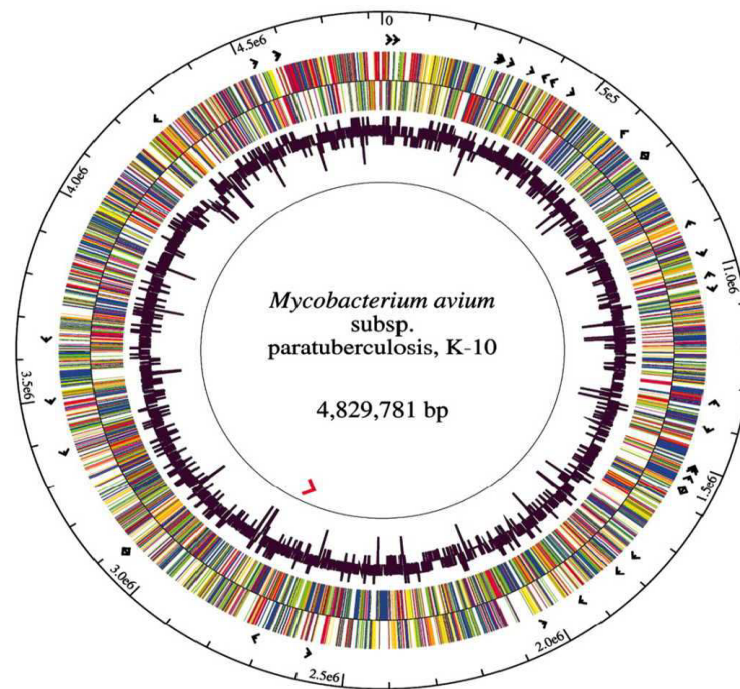
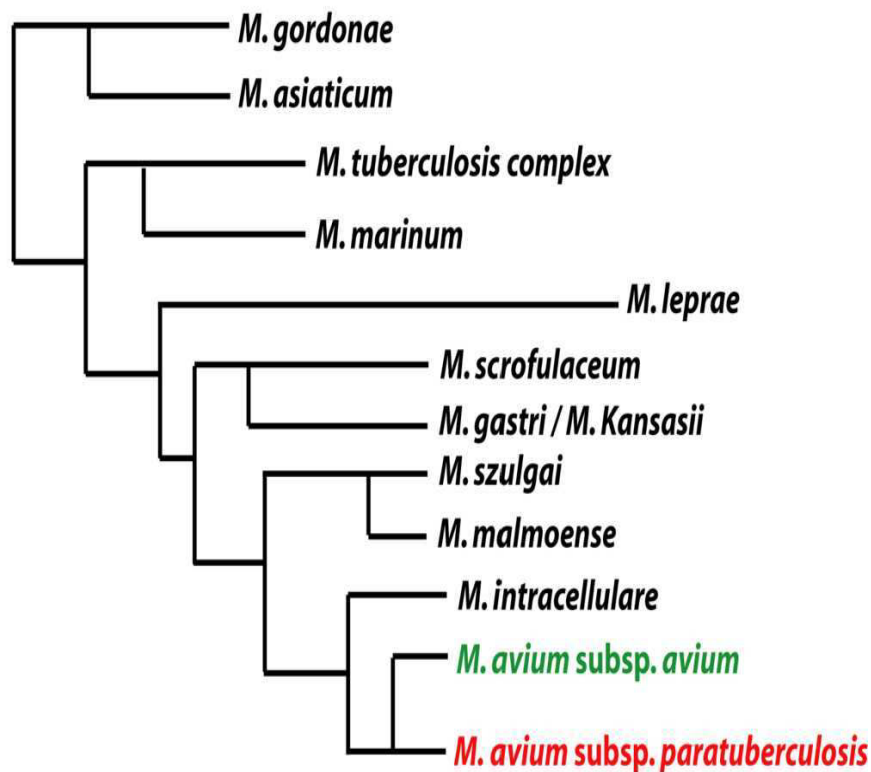


I quattro strati della parete cellulare conferiscono a ***M.a. paratuberculosis*** due caratteristiche molto importanti:

- 1) **Acido-alcool resistenza**, che costituisce la base per il riconoscimento dei micobatteri secondo la colorazione di Ziehl-Neelsen.
- 2) **Sopravvivenza in ambienti sfavorevoli** per periodi di tempo elevati



AGENTE EZIOLOGICO: Classificazione



6% (289 kb) del genoma
esclusivo di Map

4,83 mbp di cui 4,54 mbp 96-100% omologia con Maa



caratteristiche antigeniche

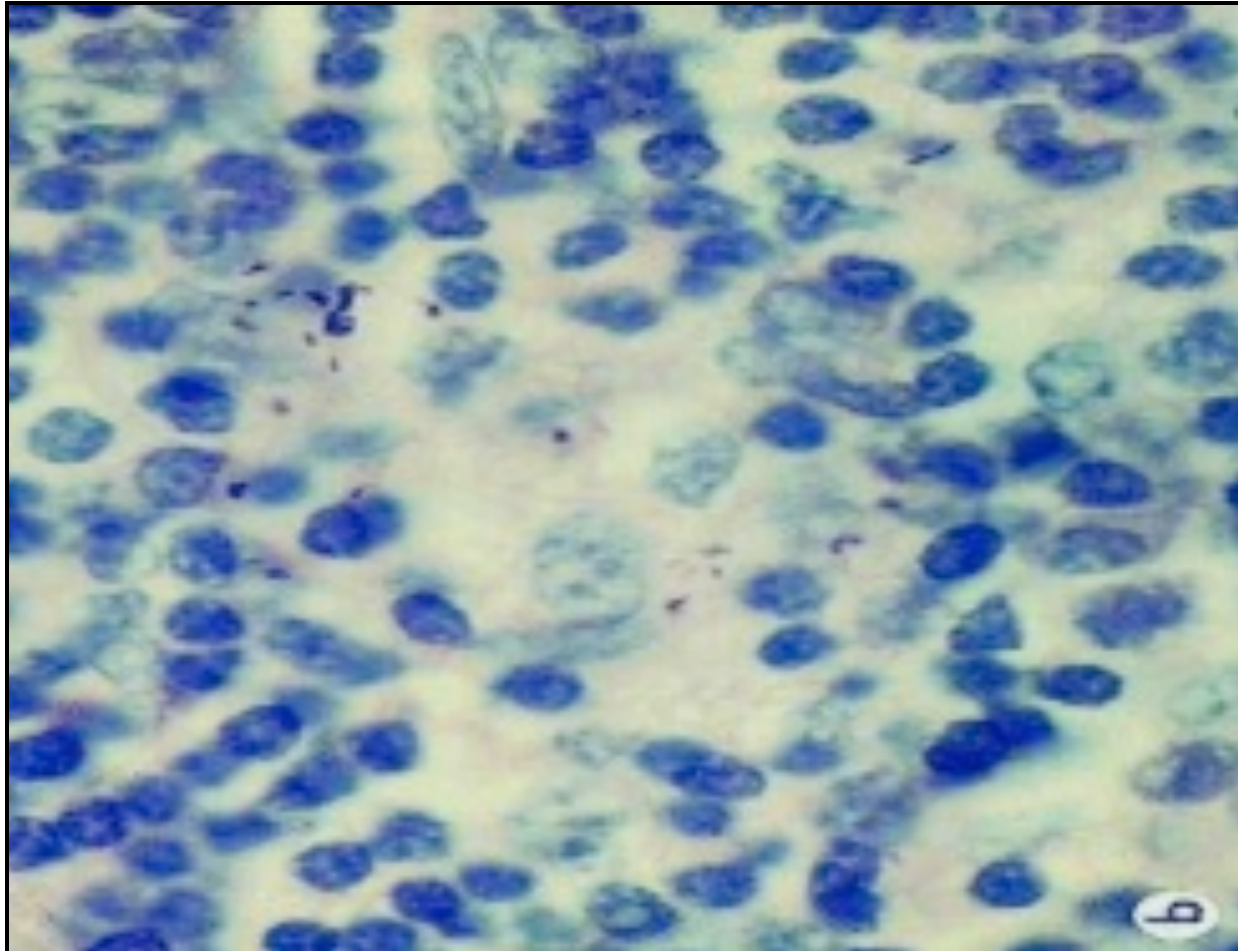
unico sierotipo

individuato almeno 44 componenti
antigeniche la maggior parte delle quali
comuni ad altri micobatteri

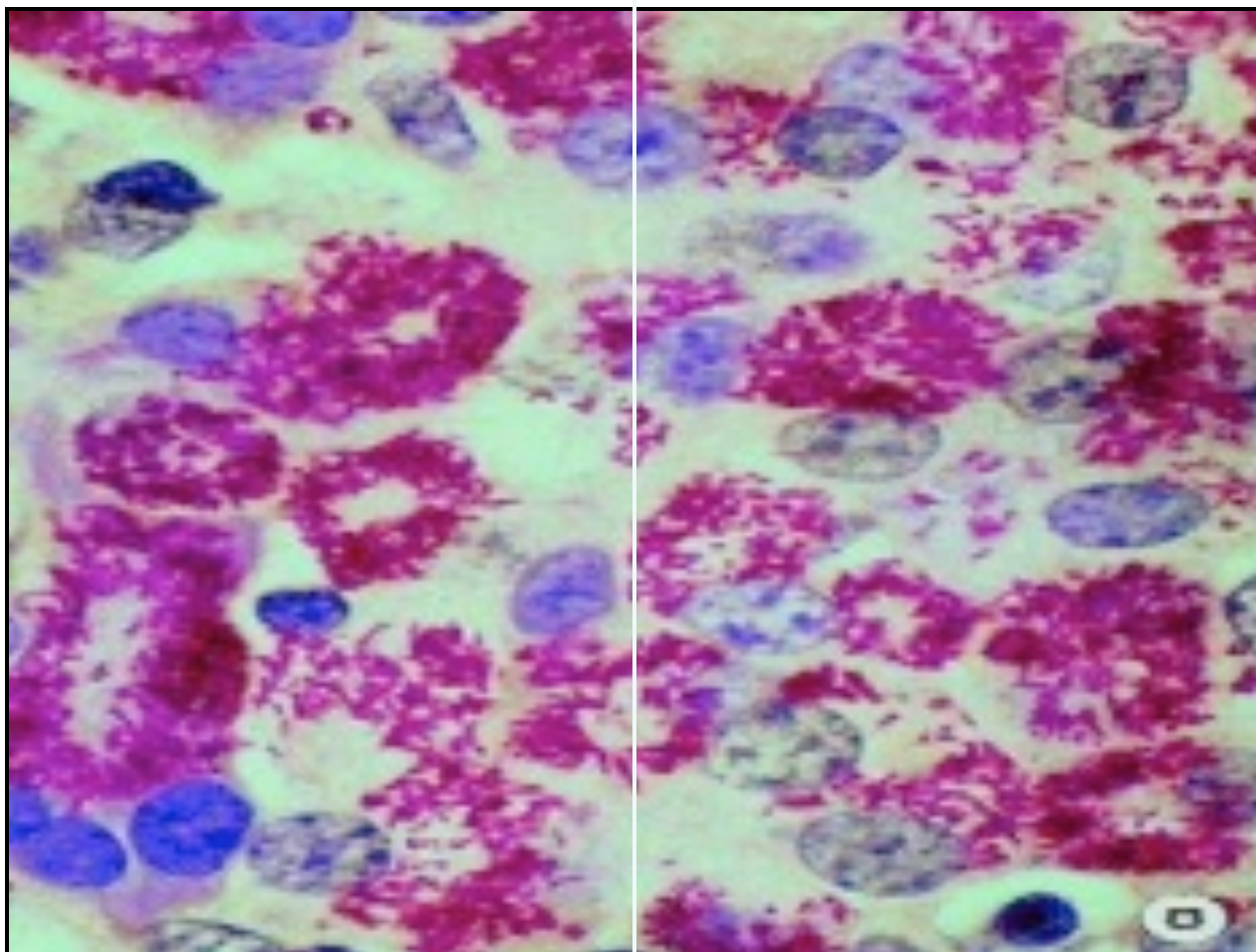
distinzione genomica mediante IS 900
e IS1311 per distinguere i Tipi



Bacilli acido alcool resistenti in ovini



Bacilli acido alcool resistenti in bovini





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Ceppi di MAP

	Tipo I	Tipo II	Tipo III
	S	C	I
crescita	Molto lenta	lenta	Molto lenta
pigmentazione	presente	assente	assente
Preferenza d'ospite	Pecore	assente	capre
Distribuzione geografica	Limitata	globale	spagna
IS 1311 pcr rga	ovino	bovino	ovino



CRESCITA E SVILUPPO

- Lenta crescita (4-16 settimane)
- Colonie piccole (1-2 mm)
lisce, lucide, solitamente non pigmentate



CEPPI OVINI



Crescita molto lenta (fino a 40 settimane)
Colonie molto piccole e a volte pigmentate

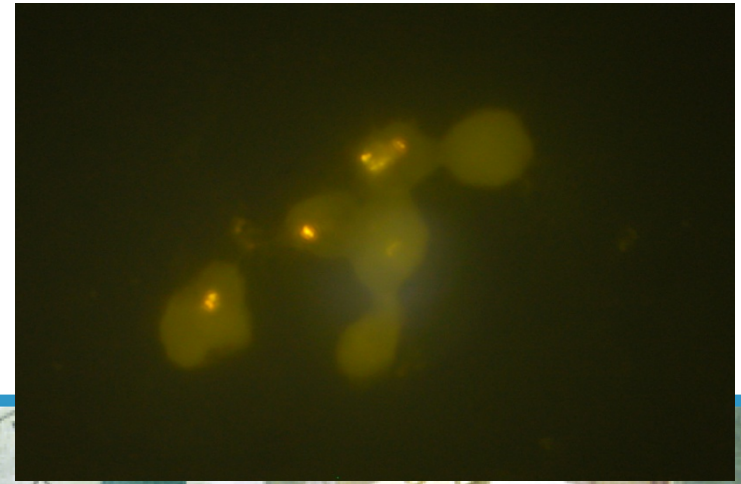
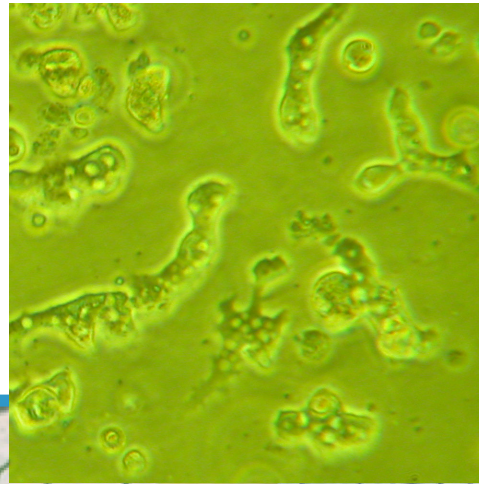
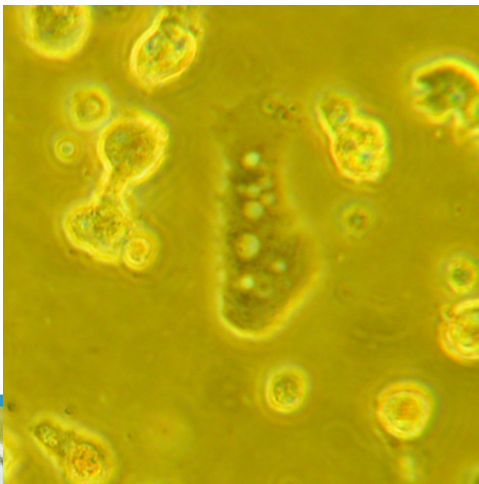


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

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





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Resistenza e sopravvivenza

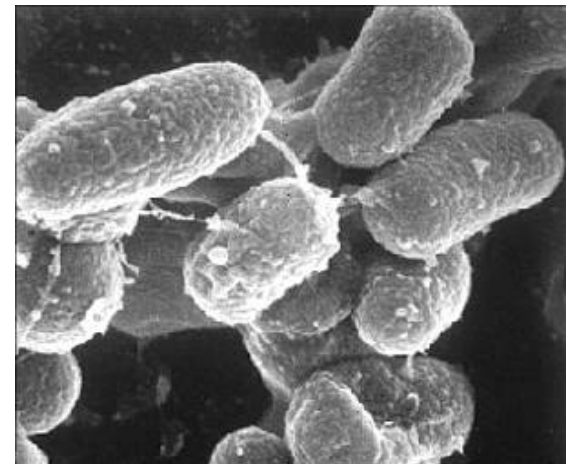
1210 gg **suolo**

336 gg **acqua stagnante**

330 gg **feci**

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

163 gg **acqua di fiume**



SEQUENZE DI INSERZIONE

- Le sequenze di inserzione (IS) sono piccoli segmenti di DNA (<2.5kb) mobili in grado di inserirsi in siti multipli del genoma.

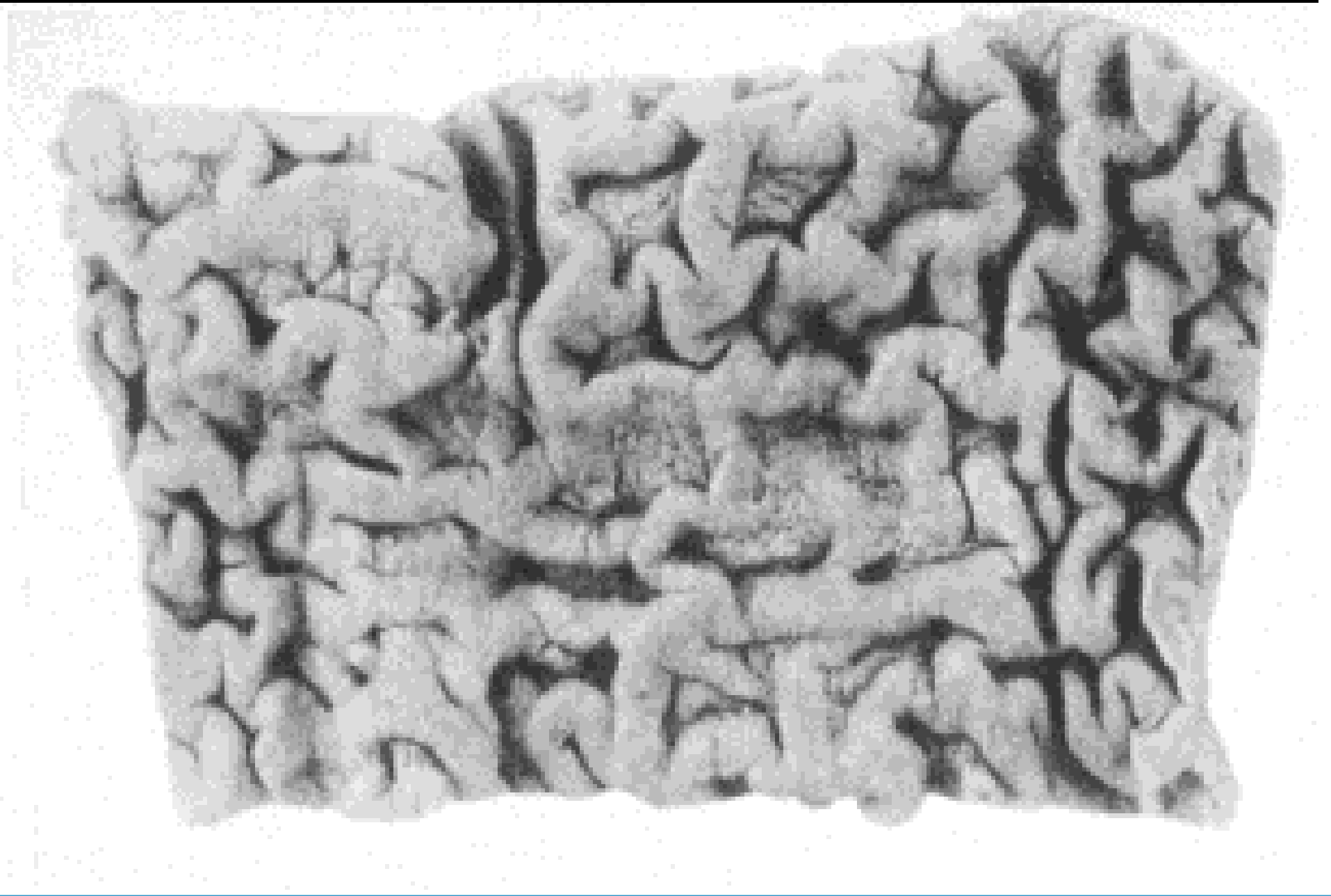
Sequenze d'inserzione di *Map*

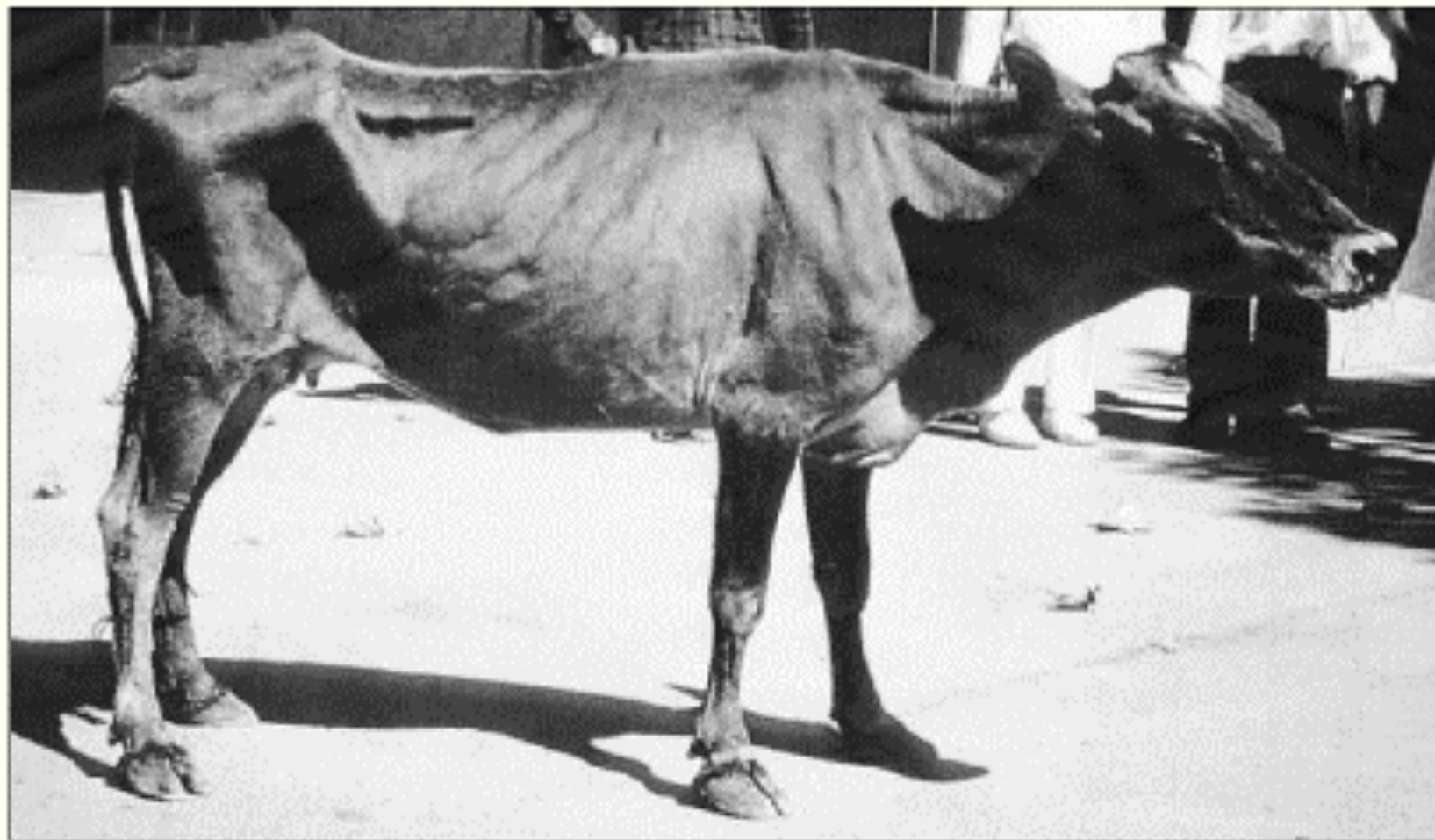
- Il genoma di *Map* contiene 20 diversi elementi IS

IS900	IS_Map02	IS_Map07	IS_Map12
IS1311	IS_Map03	IS_Map08	IS_Map13
IS_Mav2	IS_Map04	IS_Map09	IS_Map14
IS_Mpc1	IS_Map05	IS_Map10	IS_Map15
IS_Map01	IS_Map06	IS_Map11	IS_Map16

- Possono essere **SPECIE SPECIFICHE**
- Presenti in **NUMERO** e **POSIZIONI** variabili nel genoma









Materiali e metodi





5 Allevamenti:

- 4 di ovini razza sarda
- 1 caprini razza sahanen

Prelievi:

- 601 campioni di sangue con e senza edta
- 417 feci prelevati dal retto

Gli allevamenti erano già conosciuti come positivi da precedenti indagini e uno negativo che ci è servito come controllo.



Materiali e metodi



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

- Sieri analizzati con il metodo Elisa (IDvet)
- alcune feci di animali positivi con diverso SP% sono state testate da qPCR IS900.
- Tutti i campioni fecali positivi sono stati testati utilizzando un metodo colturale non automatizzato con terreni solidi e liquidi.
- Come terreno solido è stato usato l'HEYM (Harrold's Egg Yolk Medium) con Caf, Anv-cm e Anv-sm e usando come controllo il ceppo ATCC 19698 bovino.



Materiali e metodi

Nel metodo colturale liquido sono stati usati :

Middlebrook **7H9+** (BD Diagnostics) integrato con tuorlo d'uovo, mycobactina (IDvet) e una miscela di antibiotici PANTA PLUS (BD Diagnostics) (modificato da Pozzato et al., 2010).



Materiali e metodi



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Questo metodo, che è basato su una prima sedimentazione, poi incubazione di 24 ore e centrifugazione è stato **ulteriormente modificato da noi**, che abbiamo cambiato le provette classiche con le Falcon con tappo a vite, lasciando molta aria e rimboccando con terreno nuovo periodicamente, superando i problemi di evaporazione e addensamento del terreno che risultava ancora valido dopo mesi di incubazione.

Tempi anche molto più lunghi delle 12 settimane consigliate.

A 12 settimane di incubazione, tutti i campioni fecali erano **Negativi**.





Periodicamente , tempo 0 e ogni 20-40 giorni, le colture liquide sono state testate con **qPCR IS900**.

I positivi a questo primo qPCR sono stati ulteriormente testati da **qPCR F57** per confermare i deboli positivi con CT alto e poi da **PCR DMC** per determinare il tipo (I o II), (Collins et al, 2002) (Tab.2.) Abbiamo anche stabilito una procedura per estrarre dai terreni liquidi per PCR.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Materiali e metodi

Tab.1	SAMPLES	SERA	FAECES	TISSUES
	COLLECTED SAMPLES	603	419	4
	TESTED SAMPLES	603	24	4



Materiali e metodi

Tab 2. CULTURAL METHODS	SOLID	LIQUID
COLTURAL METHOD	HEYM-ANV-SM¹ HEYM-ANV-CM² HEYM-CAF³	Middlebrook 7H9+⁴
MAP STRAIN (positive control)	ATCC 19698	ATCC 19698

¹ Herrold's Egg Yolk Medium – Nalidixic Acid–Vancomycin–without Mycobactin J

² Herrold's Egg Yolk Medium – Nalidixic Acid–Vancomycin–Mycobactin J

³ Herrold's Egg Yolk Medium-Cloramphenicol

⁴ BD Diagnostics





Gene SCL11A1

Gene SCL11A1 (prima conosciuto come Nramp1) è noto influenzare la resistenza naturale al *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* in diverse specie. In alcune specie sono state anche trovate specifiche mutazioni associate alla resistenza.

83 camp di sangue di ovini positivi	}	esaminati per mutazioni- SNIPS
83 camp di sangue di ovini negativi		



RISULTATI



RISULTATI

- Quattro greggi sono risultati positivi a MAP.
- Uno è stato confermato negativo.
- 86 campioni di siero sono risultati positivi al test Elisa per MAP.
- 17 campioni di feci provenienti dagli stessi soggetti, con alto valore % S / P (> 100), e 7 negativi sono stati selezionati per essere coltivati in mezzo liquido e solido e la coltura liquida è stata analizzata mediante qPCR (Tab.3).





RISULTATI

Infine sono stati coltivati 28 campioni, tra cui feci e tessuti, e 12 di questi erano positivi alla qPCR IS 900 per MAP.

Sei ceppi sono risultati di tipo I (S) rispettivamente da due greggi e quattro pecore. (Tab.4)



Tab 3

SAMPLES	SPECIES	CULTURAL SAMPLES	ELISA	qPCR IS900	qPCR F57	PCR TYPE
<u>FLOCK N°1</u>	OVINE	<u>1.FAECES</u> <u>2.FAECES</u> <u>3.FAECES</u> <u>4.FAECES</u>	POSITIVE	NEGATIVE NEGATIVE NEGATIVE NEGATIVE		
<u>FLOCK N°2</u>	OVINE	<u>1.FAECES</u> <u>2.FAECES</u> <u>3.FAECES</u> <u>4.FAECES</u> <u>5.FAECES</u>	POSITIVE	NEGATIVE POSITIVE NEGATIVE POSITIVE POSITIVE	NEGATIVE POSITIVE NEGATIVE POSITIVE POSITIVE	/ OVINE STRAIN / OVINE STRAIN /
<u>FLOCK N°3</u>	OVINE	<u>1.FAECES</u> <u>2.FAECES</u> <u>3.FAECES</u> <u>4.FAECES</u> <u>5.FAECES</u> <u>6.FAECES</u>	NEGATIVE	NEGATIVE NEGATIVE NEGATIVE NEGATIVE NEGATIVE NEGATIVE		
<u>FLOCK N°4</u>	CAPRINE	<u>1.FAECES</u> <u>2.FAECES</u>	POSITIVE	NEGATIVE POSITIVE	/ NEGATIVE	/ /
<u>FLOCK N°5</u>	OVINE	<u>1.FAECES</u> <u>2.FAECES</u> <u>3.FAECES</u> <u>4.FAECES</u> <u>5.FAECES</u>	POSITIVE	NEGATIVE NEGATIVE NEGATIVE POSITIVE POSITIVE	NEGATIVE NEGATIVE NEGATIVE POSITIVE POSITIVE	/ / / / OVINE STRAIN
<u>FLOCK N°5</u> TISSUE	OVINE	<u>1.LYMPH NODE</u> <u>1. I.C .VALVE</u> <u>1.FAECES</u> <u>2.LYMPH NODE</u> <u>2. I.C .VALVE</u> <u>2.FAECES</u>	POSITIVE	POSITIVE POSITIVE POSITIVE POSITIVE POSITIVE POSITIVE	POSITIVE POSITIVE POSITIVE / / /	OVINE STRAIN OVINE STRAIN OVINE STRAIN / / /



Tab. 4

SUMMARY RESULTS

SAMPLES	CULTURAL SAMPLES	ELISA POSITIVE FLOCKS	POS qPCR IS900	POS qPCR F57	PCR TYPE I OVINE STRAINS
TOTAL	28 from 24 animals	4	12 from 8 animals	8 from 6 animals	6 from 2 flocks and 4 animals





Gene SCL11A1

Dalle analisi genetiche e confronto tra polimorfismi dei positivi e negativi , ad oggi non è risultato nulla di statisticamente significativo. Approfondimenti sono ancora in corso.



Esami anatomopatologici e istologici

1° ovino:

Esame anatomopatologico:

linfonodi mandibolari e meseraici aumentati di volume,
enterite con anse cerebroidi e congestione renale.

esame istologico: tecnica ematossilina eosina
dell'intestino e della valvola ileo-cecale:
grave enterite granulomatosa diffusa e un quadro
microscopico riferibile a paratubercolosi;
colorazione di Ziehl-Neelsen positiva.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Esami anatomopatologici e istologici

2° ovino:

Esame anatomopatologico:

lieve iperplasia dei linfonodi meseraici,
enterite e congestione renale.

ELISA su siero positività % S/P pari a 147%.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Esami anatomopatologici e istologici

Esame istologico :

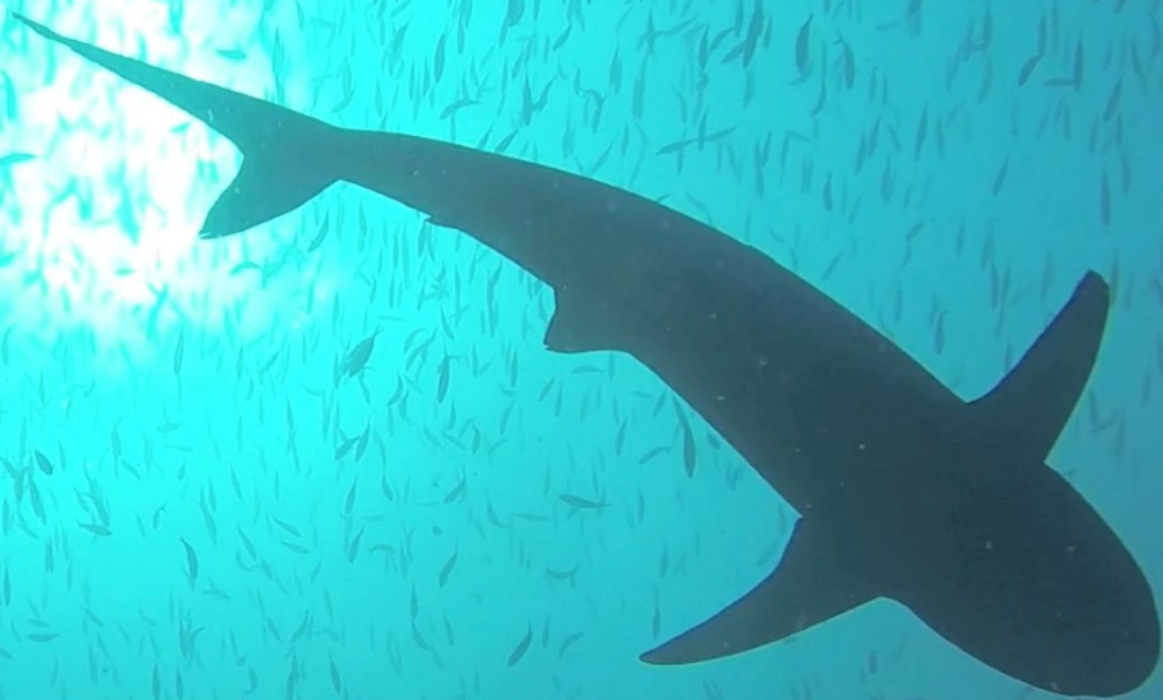
Intestino e valvola ileo-cecale -enterite catarrale, caratterizzata dalla presenza di infiltrati infiammatori nella lamina propria, costituiti da linfociti, plasmacellule e eosinofili, con presenza di ascessi nelle cripte e focolai multipli di necrosi.

No lesioni riferibili a paratubercolosi

Colorazione di Ziehl-Neelsen - Negativa.



CONCLUSIONI





CONCLUSIONI

I sistemi automatizzati richiedono attrezzature costose e sono adatti a grandi numeri di colture.

Questo metodo di coltura su terreno liquido 7H9+ è poco costoso, può essere facilmente adottato da laboratori che non hanno accesso ad attrezzature sofisticate e può essere utilizzato anche su uno o pochi campioni.





CONCLUSIONI

Il nostro studio ha messo in evidenza la possibilità di impiegare questo terreno per ottenere la crescita dei ceppi ovinì di Map a partire sia da feci che da organi come confermato dagli studi di tipizzazione dei ceppi di *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* che siamo riusciti ad ottenere.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dalla presente ricerca rappresentano uno dei pochi ceppi ovini isolati in Italia;

Ulteriori analisi dovrebbero essere condotte per studiare l'origine e l'epidemiologia dei ceppi di tipo I circolanti in Italia, usando terreni solidi o semisolidi dove il map ovino cresce.



CONCLUSIONI

- Ciò permetterebbe di subtipizzare ulteriormente i ceppi puri di Map Ovini
- correlarli con gli altri isolati nel mondo
- con quelli umani e con le diverse forme patologiche negli animali.
- Potrebbero essere usati per lo studio e allestimento di eventuali vaccini.





CONCLUSIONI

- Per realizzare piani di risanamento e controllo della paratubercolosi maggiormente efficaci specie dove allevamento ovino e bovino coesiste come nelle nostre regioni del Lazio e della Toscana.



Grazie per l'attenzione !

