

Agalassia contagiosa dei piccoli ruminanti: dalla diagnosi all'identificazione degli animali infetti o vaccinati

Tola Sebastiana

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Sardegna*

Videoconferenza del 09-11-2021

Allevamento ovino, caprino e bovino da latte in Sardegna

❖ Pecore di razza *sarda**

3.019.108 (57,13% P.N.)

❖ Capre*

281.569 (41,67% P.N.)

❖ Bovini *

48.944

*Laore 2019.

La raccolta delle informazioni in merito all'allevamento degli ovini, caprini e bovini da latte in Sardegna, è stata eseguita utilizzando i dati estratti dalla BDN dell'Anagrafe Zootecnica



Numeri: 2019



In Sardegna è stato raccolto
il **68,92%** del latte ovino ed
il **57,30%** del latte caprino prodotto in Italia



350 milioni di litri di latte ovino/anno

Agalassia contagiosa

Comparsa
negli anni '80

TRIADE: mastite



Agalassia contagiosa

TRIADAE:
Artrite e congiuntivite

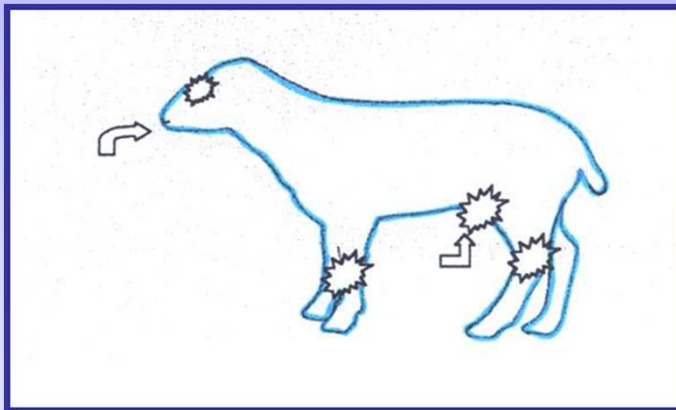


Agalassia contagiosa: diffusione

- Elevato numero di capi
- Alta densità di animali
- Transumanza
- Abigeato
- Gestione (Management) inadeguato
- Diagnostica e profilassi carente

Normativa: agalassia contagiosa degli ovini e dei caprini

- **D.P.R. 8 febbraio 1954, n. 320**
- **Regolamento di polizia veterinaria**



**Malattia infettiva
e diffusiva
soggetta a
provvedimenti
sanitari**

Denuncia delle malattie infettive e diffusive

Art.
2

- La malattia va denunciata, per iscritto, al Sindaco da parte del veterinario (comunale) USL

**Zona infetta da
agalassia
contagiosa**

- **L'amministrazione comunale applica i cartelli ai limiti della zona infetta**
- **E' compito del titolare dell'allevamento infetto custodirli**



Ordinanza del Sindaco

1. La numerazione di tutti gli animali presenti recettivi all'infezione;
2. L'isolamento degli animali ammalati o sospetti da quelli sani;
3. Il divieto di contatto del personale di custodia con animali di luoghi vicini;
4. Il divieto di accesso a persone estranee;
5. L'apposizione di cartelli indicanti la malattia ai limiti della zona infetta, nonché sulle porte dei ricoveri infetti situati dentro la zona;

Ordinanza del Sindaco

6. Il divieto di abbeverare gli animali di cui sopra in corsi d'acqua o vasche con essi comunicanti;
7. Il divieto di trasferire fuori della zona infetta gli animali recettivi e qualsiasi materiale possibile vettore di contagio;
8. Il divieto di introdurre nella zona animali recettivi ;
9. La sospensione del commercio degli animali recettivi;
10. Il divieto di qualsiasi utilizzazione del latte degli animali ammalati;
11. La periodica disinfezione dei ricoveri dove hanno soggiornato gli animali ammalati;
12. Il permesso di spostamento dalla "zona infetta" sarà concesso di volta in volta, a seguito di apposita e motivata domanda, con l'osservanza degli articoli 14 e 15 del Regolamento di Polizia Veterinaria.
13. I proprietari e detentori degli animali recettivi esistenti nella zona infetta, i Vigili Comunali, i Veterinari e gli Agenti tutti della Forza Pubblica sono incaricati di osservare e far osservare le disposizioni di cui alla presente ordinanza.



Regione Autonoma della Sardegna
Assessorato dell'Igiene e Sanità e dell'Assistenza Sociale

Decreto n. 54 del 21.10.2009

COUNCIL DIRECTIVE

of 21 December 1982

on the notification of animal diseases within the Community

82/894/EEC

Ovini e Caprini	
Bluetongue	CRM
Peste dei piccoli ruminanti	CRM
Pleuropolmonite contagiosa dei p.r.	CRM
Vaiolo ovino	CRM
Aborto enzootica (<i>Chlamydia</i>)	CR
<u>Agalassia contagiosa</u>	<u>CR</u>
Visna - Maedi	CR

segue Ovini e Caprini	
CAEV (Artrite-Encefalite Virale Caprina)	CR
Heartwater disease (<i>Ehrlichia ruminantum</i>)	CR
Malattia di Nairobi	CR
Scrapie	CR
Adenomatosi polmonare	CR
Border disease	CR
Micoplasmosi diverse da agalassia contagiosa	CR
<u>Distomatosi</u>	<u>C</u>
Gastro-enterotossiemie	C
Strongilosi polmonare ed intestinale	C

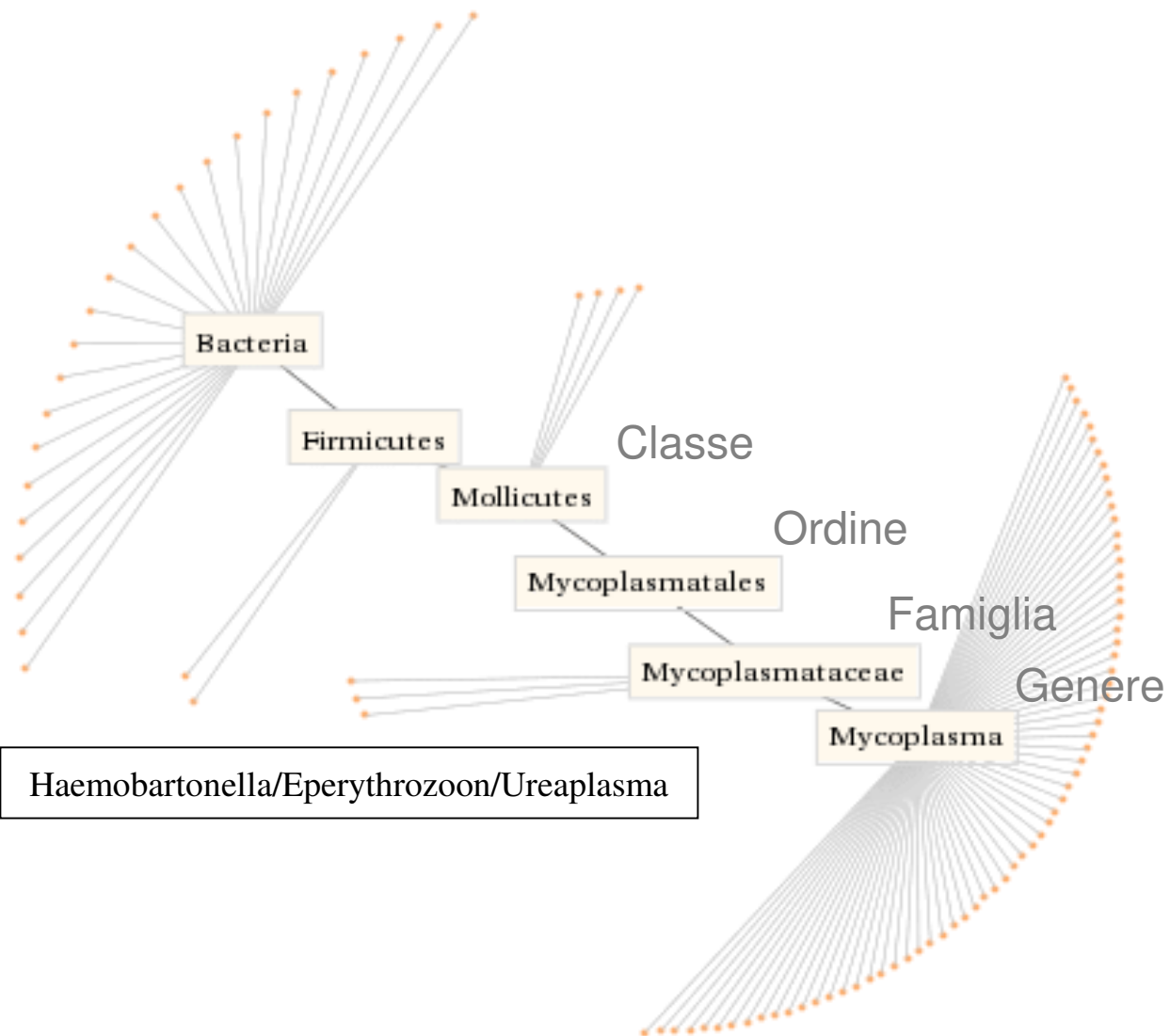
Allegato 1

Micoplasmi dei piccoli ruminanti (agalassia contagiosa)

- *Mycoplasma agalactiae*
- *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*
- *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC*
- *Mycoplasma putrefaciens*
- *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* *

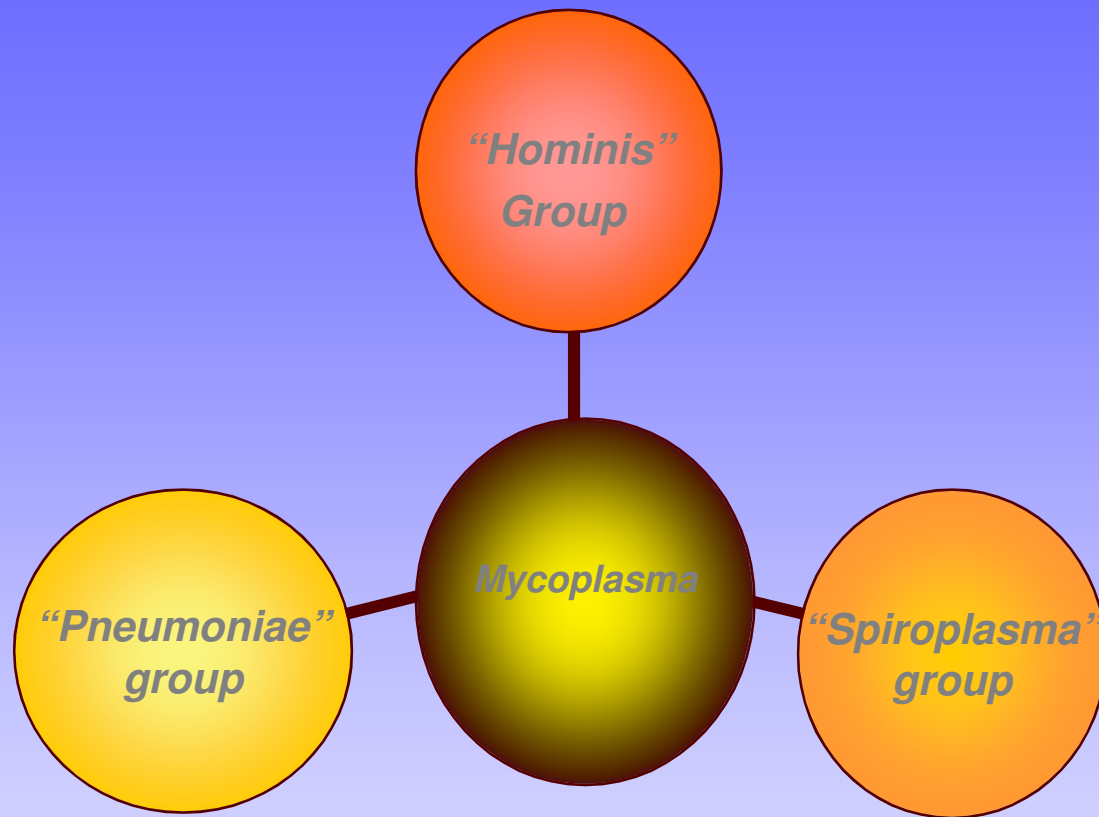
Taxonomic network :

Show as tree

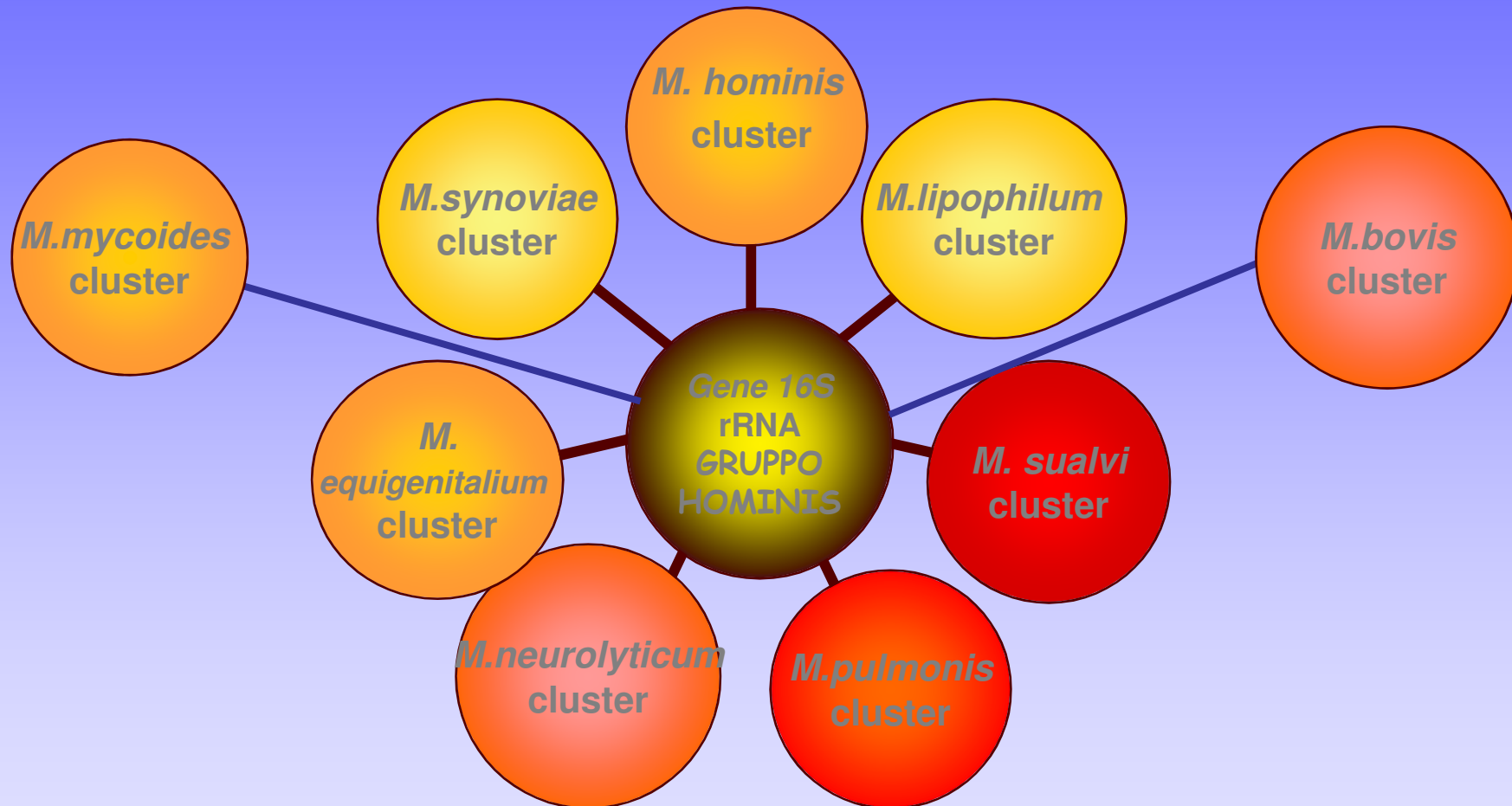


mycoplasma

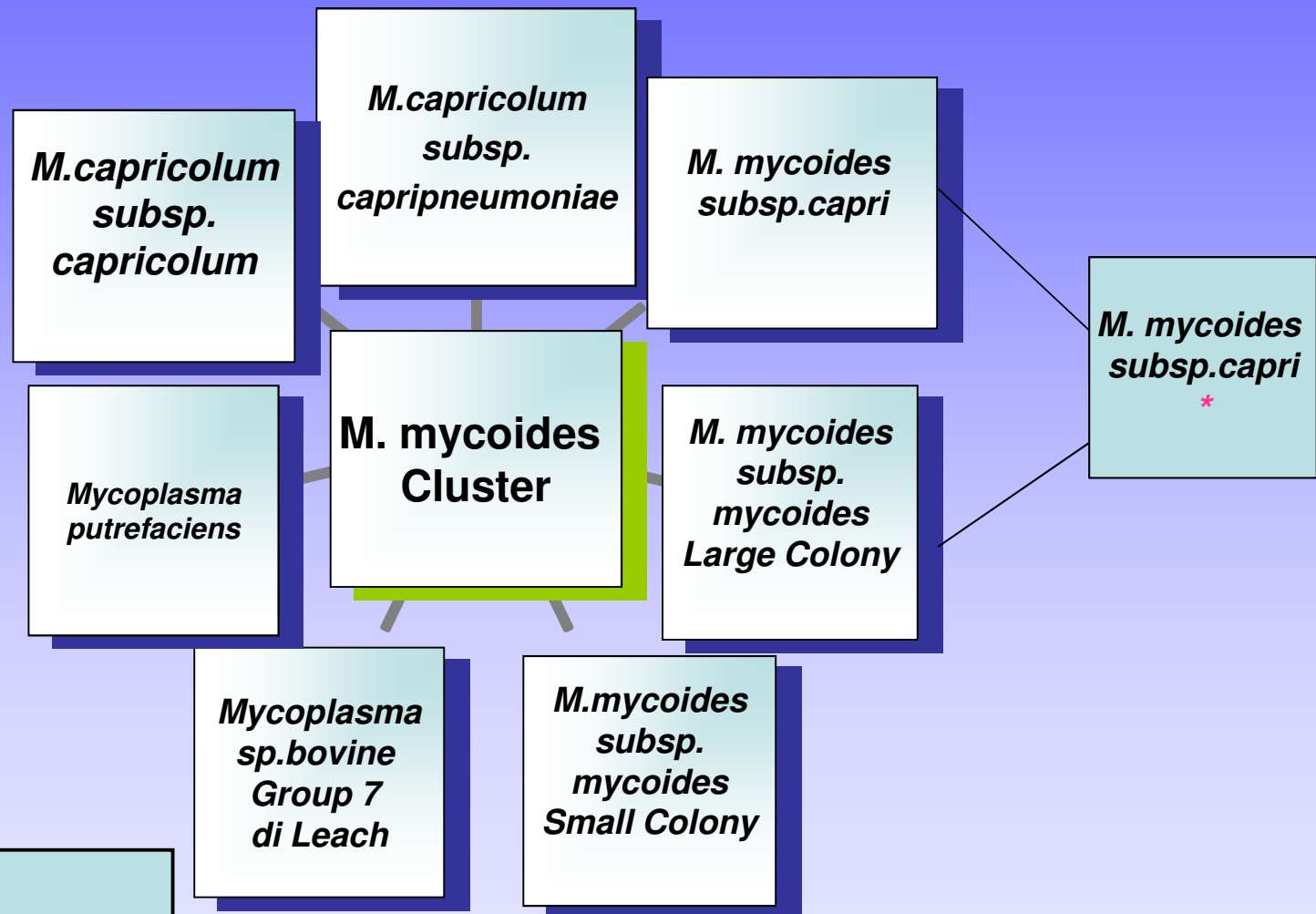
WolframAlpha



Gruppo "hominis", include i seguenti clusters:



*Manso-Silvan et al., 2009



Ora *M. leachii*;
Thiaucourt et al.; 2011


CHAPTER 3.7.3.

CONTAGIOUS AGALACTIA

SUMMARY

Description and importance of the disease: Contagious agalactia is a serious disease syndrome of sheep and goats that is characterised by mastitis, arthritis, keratoconjunctivitis and, occasionally, abortion. Mycoplasma agalactiae (Ma) is the main cause of the disease in sheep and goats, but M. capricolum subsp. capricolum (Mcc), M. mycoides subsp. capri (Mmc) and M. putrefaciens produce a clinically similar disease, more often in goats, which may be accompanied by pneumonia. Ma and Mcc have been isolated from wild small ruminants such as ibex and mountain goats. Antibodies to Mmc and Mcc have been detected in South American camelids (alpacas, llamas and vicunas), but no mycoplasmas have yet been isolated.

Attualmente

 Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna	Modulo M2I 11 016	M2 I 11 016 Data Emissione 20/06/2017 Rev 00 Pag. 1 di 2
COMUNICAZIONE RISULTATI POSITIVI PER MICOPLASMI RESPONSABILI DI AGALASSIA CONTAGIOSA		

Al Responsabile del Servizio Veterinario
di Sanità Animale
ATS Sardegna ASSL Sassari
serv_sanitaanimale@pec.aslsassari.it

*Oggetto: comunicazione risultati delle ricerche diagnostiche per agalassia
contagiosa ai sensi del DPR 08/02/54 n. 320*

Si comunica che dei n.3 campioni di latte, accettazione n. **71430** del **20/10/2021**,

[x] 3 sono risultati positivi alla PCR eseguita sul latte per *Mycoplasma agalactiae*.
Sugli stessi campioni è in corso l'isolamento del micoplasma, per una eventuale
produzione del vaccino stabulogeno.

Si allega rapporto di prova n. 92235 del 22/10/2021

**Il Responsabile del Laboratorio di
Microbiologia Molecolare**
Dr.ssa Sebastiana Tola

Sebastiana Tola

Sassari 22/10/2021

- *M. agalactiae*
- *M. capricolum*
- *M. capri*
- *M. putrefaciens*

REGOLAMENTO (UE) 2016/429 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO

- **Con l'art. 14** della Legge Delega n°53 del 22 aprile 2021, il Governo Italiano adotta (entro 12 mesi) uno o più decreti legislativi per l'adeguamento della normativa nazionale al regolamento (UE) 2016/429 relativo alle «malattie animali trasmissibili e che modifica e abroga taluni atti in materia di sanità animale (“EU Animal Health Law” / “Normativa in materia di sanità animale”).

Gestione del focolaio

- Sintomi clinici
- Conferma di laboratorio
- Intervento terapeutico
- Vaccinazione

Come agire?

- Migliorare il management aziendale
- Ridurre i tempi di diagnosi
 - da latte
 - da siero
- Migliorare il vaccino

Ceppo



Vaccino

Identificazione

Analisi antigeni

Anticorpi

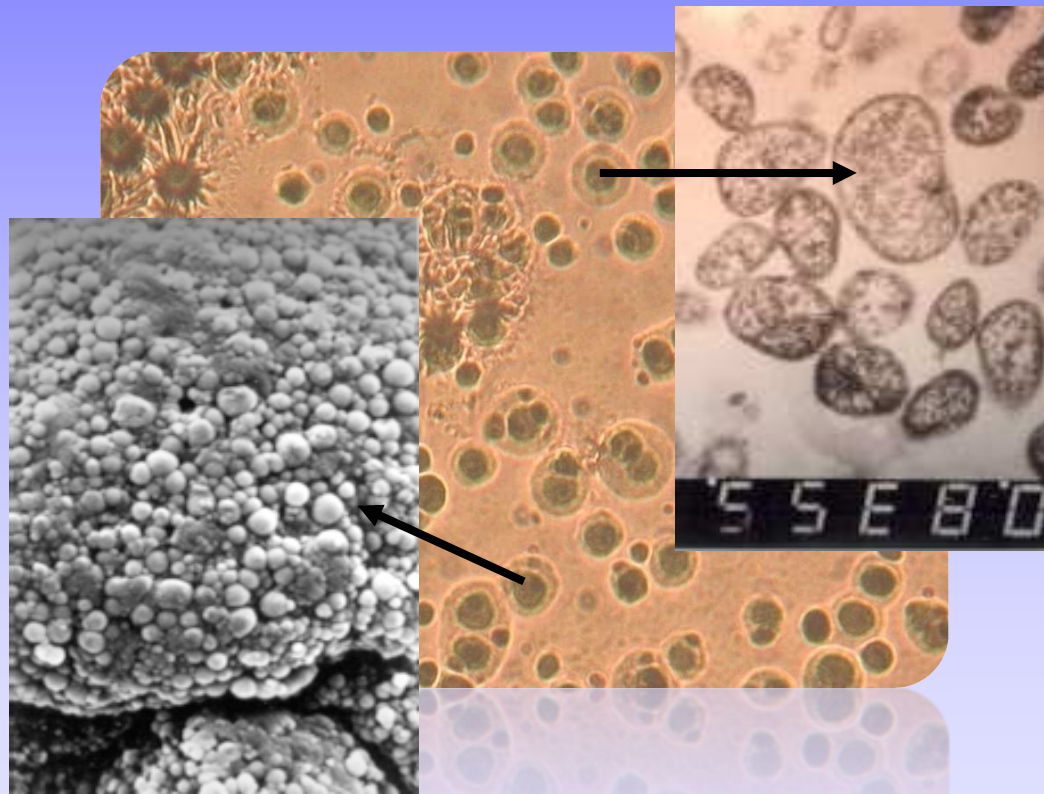
Miglioramento vaccino

Semina dei campioni di latte

- **Terreno di Hayflick modificato:**
 - **PPLO** (Infuso di cuore di bue, peptone, NaCl)
 - **Estratto di lievito**
 - **Siero equino/ serum fraction**
 - **DNA**
 - **Penicillina**



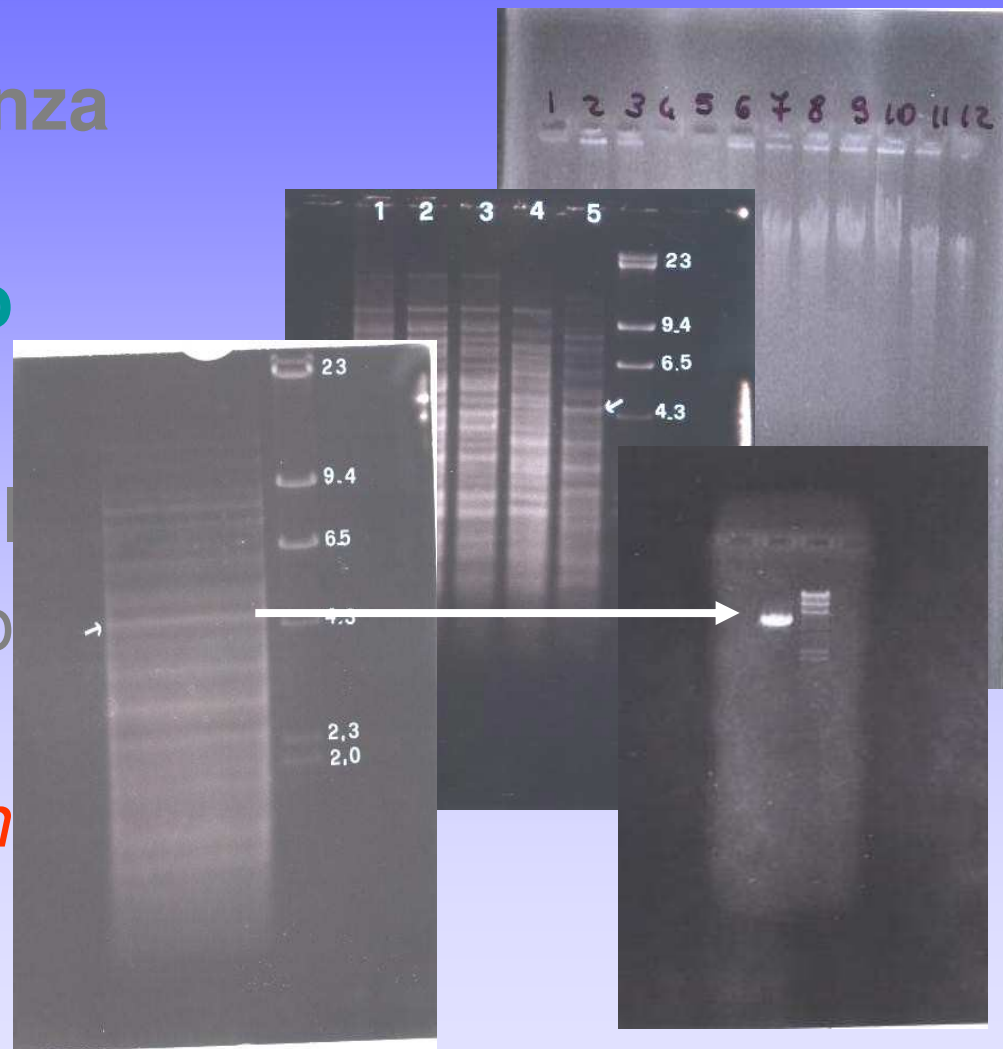
Mycoplasma agalactiae



Estrazione del DNA

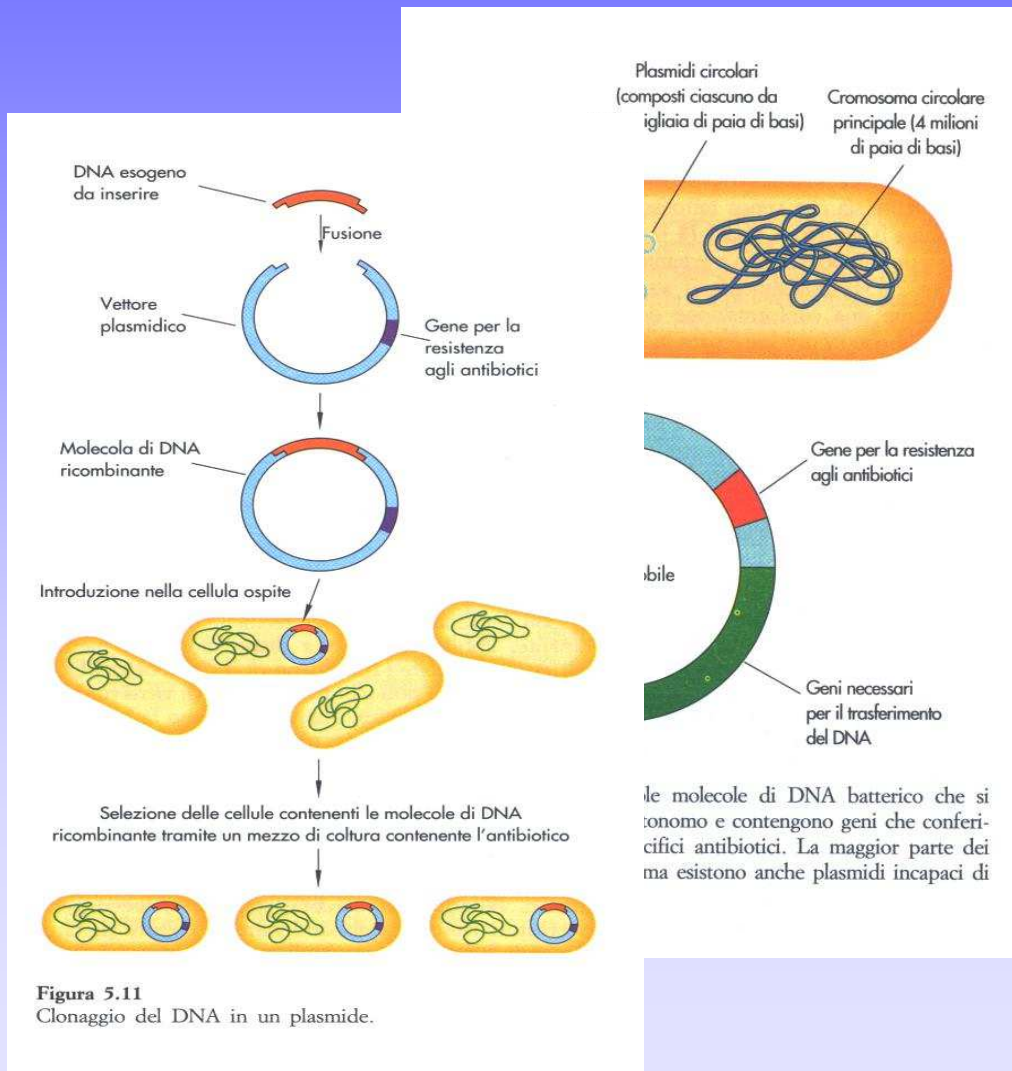
- Ceppo di riferimento PG2
- Ceppi da campo
- Coltura di una coltura
- Estrazione fenolo

Digestione con *Hin*



Clonaggio del frammento

Uso del plasmide pBlueScript (Stratagene)



La banda è sensibile?

358

S. Tola

5.0 Kb
4.5 Kb
4.0 Kb

A B

Fig. 1. Autoradiograph of a Southern blot probed with the 4.5-kb probe. Lane A: *M. agalactiae* strain NU-77; D, *M. agalactiae* strain TE-209; G, *M. agalactiae* strain BO-3; H, *M. agalactiae* strain TR-420.

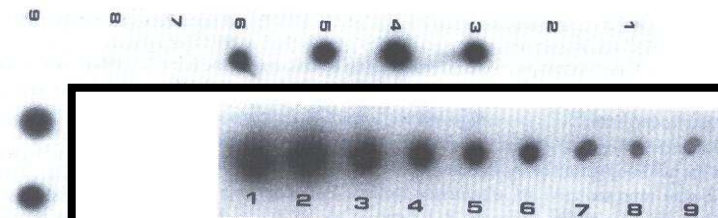


Fig. 3. Dot blot hybridization of 32 P-labeled 4.5 kb probe against various amounts of total *M. agalactiae* DNA. Numbers 1–10 = positive controls corresponding to 500–250–125–60–30–15–7–3.5–1.7–0.8 μ g of DNA.

Fig. 2. Autoradiograph of a dot blot hybridization of a 4.5-kb DNA probe with DNAs from different *Mycoplasma* species. Lane 6 = Lambda *Hind*III-digested DNA. Lanes: 1, *M. capricolum* (California kid strain); 2, *M. mycoides* subsp. *capri* (PG3 strain) and *M. mycoides* subsp. *mycoides*, (LC) (YG strain); 3, *M. arginini* and *M. putrefaciens*; 4, *M. agalactiae* PG2 (type strain); 5, *M. agalactiae* strains TE-103 and TE-290; 6, *M. agalactiae* strains BO-3 and BO-4; 7, *M. agalactiae* strains PA-119, TR-420 and AG-405; 8, *M. agalactiae* strains SS-138, SS-145 and SS-25; 9, *M. agalactiae* strains OR-583 and OR-621; 10, *M. agalactiae* strains NU-1431 and NU-77.

Marcatura del frammento

Sequenza del frammento

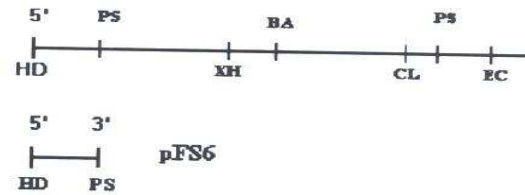
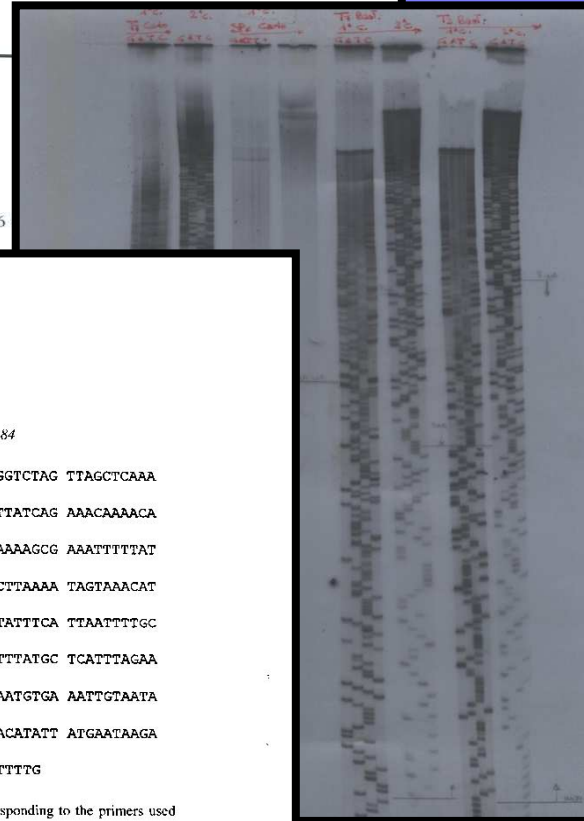


Fig. 1. Restriction maps of the 4.5 kb probe pBT5 and its subclone pFS6. *Clal*; HD, *HindIII*; EC, *EcoRI*; BM, *BamHI*.



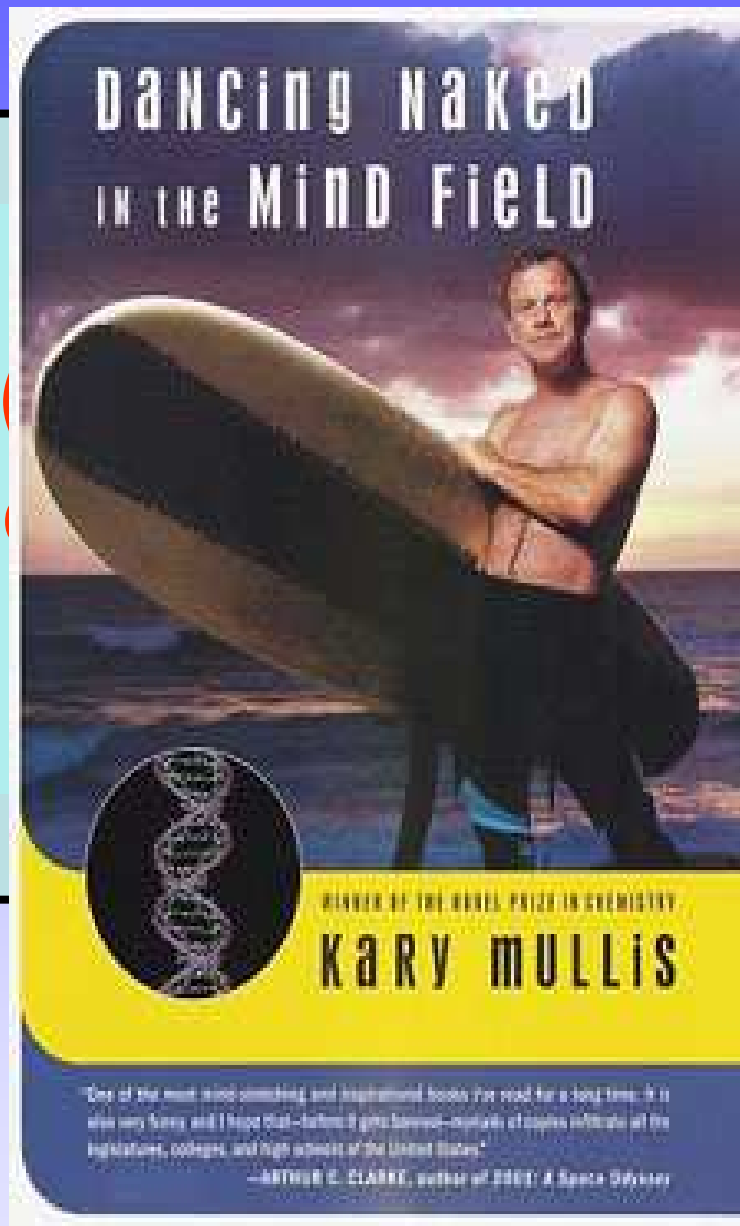
82

S. Tola et al. / Veterinary Microbiology 51 (1996) 77-84

```

1  TATAACTGCG GTTATATCAT CTCACCTTTG CTCATTACGA ACTGGTCTAG TTAGCTCAAA
61  ATCATCAATT ATTTTGACAT TTTTAAAGTA TGTTTGTAT TCTTATCAG AAACAAAACA
121 TCCAGITGAA GAAACTATCA AAGGTGCTTG AGAATGGCA ATTAAAGCG AAATTTTAT
181 TTTATTCATA TGTTTTTGA GCTTAATCTT TAGTTTTTGC TTAATTAAAA TAGTAAACAT
241 TTTAAAAAAA CCATATAAAC AATATTTAAT TATAAAAAIT AATTATTICA TTAATTTTGC
301 AAGAAGGATA AATTGCCATA AAAACGCTAA TTTTGTCCCT AITTTTATGC TCATTAGAA
361 GATATTCAAA TAATACTAAG TTAAATATT ATAATTAAAA TGCAATGTGA AATTGTAATA
421 TTAATAATTA CAATACGCGC ATTGCACATA AAAATATTTA AGGACATATT ATGAATAAGA
481 AAAATAAATT AATGATTGGA CTTCTTCTG CAACTATCCC TATTTTTG
    
```

Fig. 2. Nucleotide sequence of the 528 bp DNA fragment. The sequences corresponding to the primers used for PCR are shown underlined.



Chain Reaction
presentata nel 1983 e di
autore, Kary Mullis,
per la chimica nel
1993

Corsa elettroforetica



Applicazione della PCR ai campioni di latte

20

S. Tola et al. / Veterinary Microbiology 54 (1997) 17–22

Table 1

Results from culture and PCR of sheep milk samples in groups 1 and 2

	Group 1		Group 2	
	culture	PCR	culture	PCR
Positive	153	175	0	0
Negative	204	182	87	87
Total	357	357	87	87

2.5. Microbiological

Conclusione

- **Specificità della PCR**
- **Sensibilità della PCR**
- Diagnosi di Agalassia Contagiosa
DOPO 5-6 ORE



Veterinary Microbiology 41 (1994) 355–361

**veterinary
microbiology**

A species-specific DNA probe for the detection of *Mycoplasma agalactiae*

S. Tola^{*}, P. Rizzu, G. Leori

Istituto Zooprofilattico Sperimentale "G. Pegreffi", Via Duca degli Abruzzi 8, 07100 Sassari, Italy

Veterinary Microbiology 51 (1996) 77–84

Rapid and specific detection of *Mycoplasma agalactiae* by polymerase chain reaction

S. Tola^{*}, G. Idini, D. Manunta, G. Galleri, A. Angioi,
A.M. Rocchigiani, G. Leori

Veterinary Microbiology 54 (1997) 17–22

Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction

S. Tola^{*}, A. Angioi, A.M. Rocchigiani, G. Idini, D. Manunta,
G. Galleri, G. Leori

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi", Via Duca degli Abruzzi No. 8, 07100 Sassari, Italy



Molecular and Cellular Probes 19 (2005) 207–212

**Molecular
and Cellular
Probes**

www.elsevier.com/locate/ymcpr

Rapid differential diagnosis of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* based on a multiplex-PCR and a PCR-RFLP

A. Foddai^a, G. Idini^a, M. Fusco^a, N. Rosa^a, C. de la Fe^b, S. Zinellu^a, L. Corona^a, S. Tola^{a,*}

^a*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi", Via Duca degli Abruzzi 8, 07100 Sassari, Italy*

^b*Unit of Epidemiology and Preventive Medicine, Veterinary Faculty, University of Las Palmas, Las Palmas de Gran Canaria, Spain*

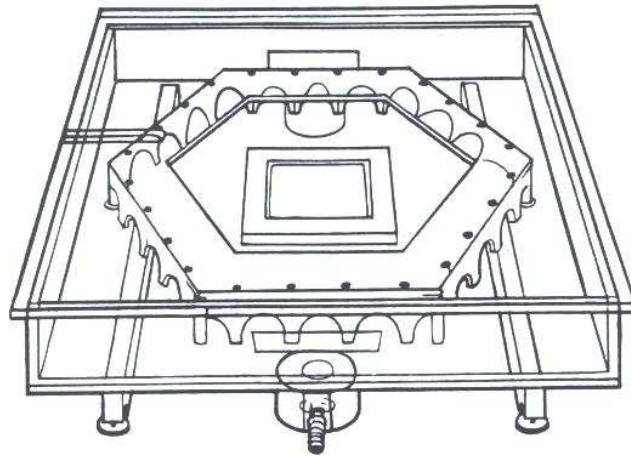
Received 30 June 2004; accepted for publication 24 November 2004

Analisi epidemiologica

- Tutti i ceppi di *M. agalactiae* sottoposti a **Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**

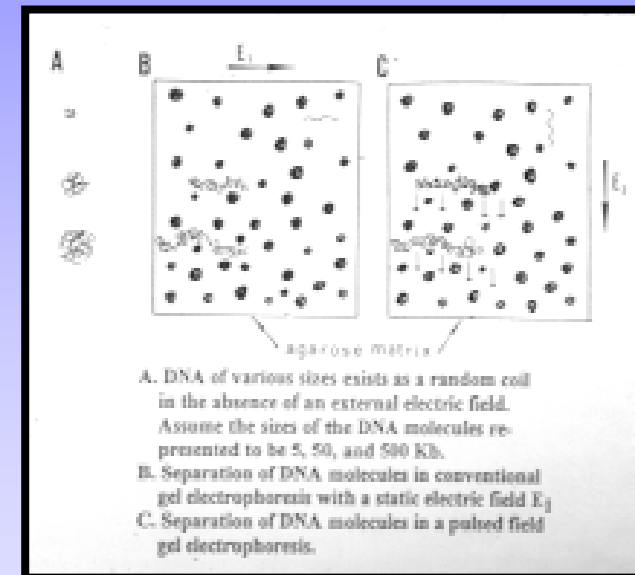
Pulsed Field Gel Electrophoresis

APPENDIX A. SCHEMATIC DIAGRAM OF THE CHEF SYSTEM



C.H.E.F. APPARATUS

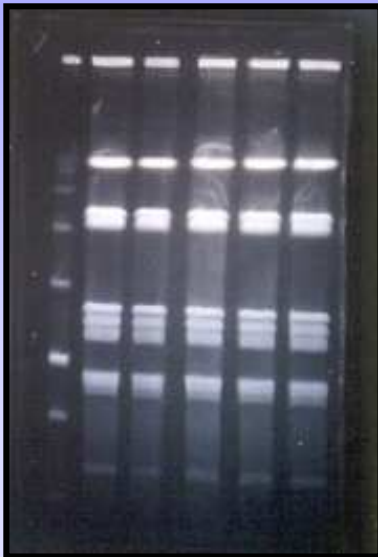
GILBERT CHU, DOUG VOLLRATH, RONALD DAVIS
BIOCHEMISTRY DEPARTMENT
STANFORD UNIVERSITY
STANFORD, CA 94305



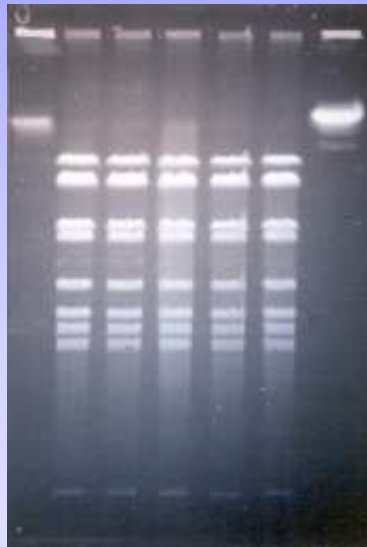
- A. DNA of various sizes exists as a random coil in the absence of an external electric field. Assume the sizes of the DNA molecules represented to be 5, 50, and 500 Kb.
- B. Separation of DNA molecules in conventional gel electrophoresis with a static electric field E_1 .
- C. Separation of DNA molecules in a pulsed field gel electrophoresis.

Pulsed Field Gel Electrophoresis

*Bss*HI



*Sa*II



*Xho*I



Mappa del *Mycoplasma agalactiae*

128

S. Tola et al. / Veterinary Microbiology 80 (2001) 121–130

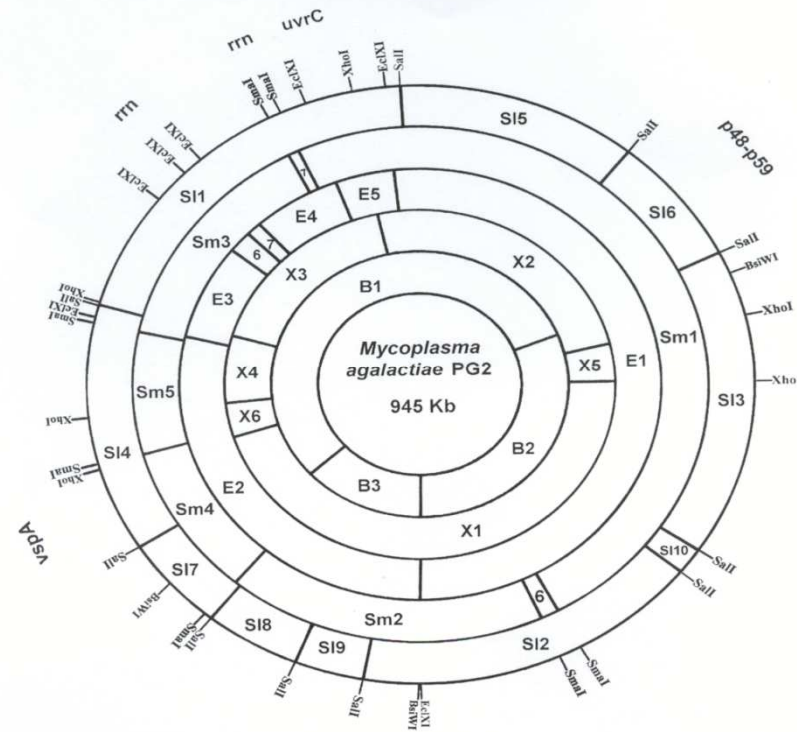
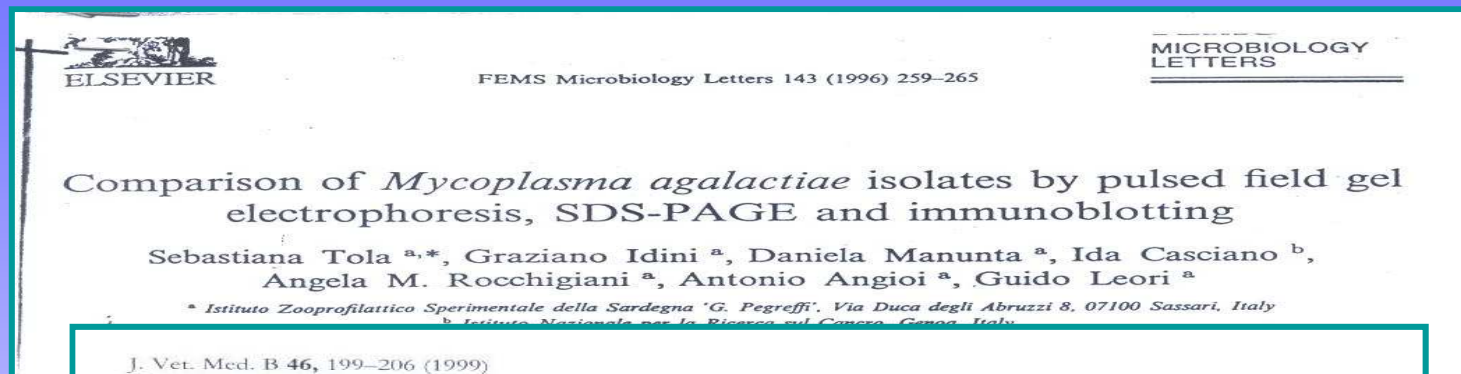


Fig. 1. Restriction fragments separated by gel electrophoresis.

Fig. 2. Physical map of the *M. agalactiae* PG2 chromosome showing *BsiWI*, *XhoI*, *EclXI*, *SmaI* and *Sall* restriction sites. Restriction fragments are identified by numbers, as described in Table 3. Enzyme recognition sites and mapped genes are indicated outside the circle.

Mycoplasma agalactiae

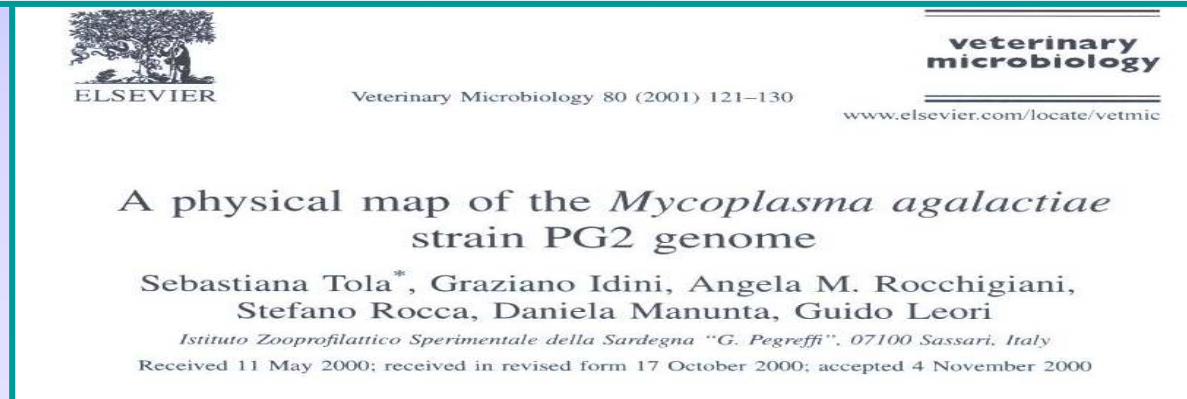


J. Vet. Med. B 46, 199–206 (1999)
© 1999 Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin
ISSN 0931-1793

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna 'G. Pegreffi', Via Duca degli Abruzzi, 07100 Sassari, Italy

Comparison of Restriction Pattern Polymorphism of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* by Pulsed Field Gel Electrophoresis

S. TOLA*, G. IDINI, A. M. ROCCHIGIANI, D. MANUNTA, P. P. ANGIOI, S. ROCCA, M. COCCO
and G. LEORI



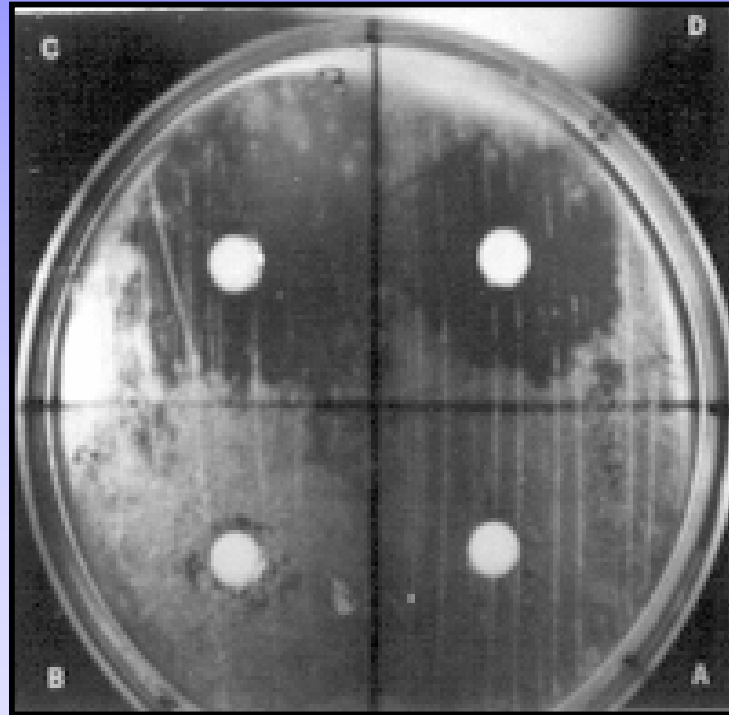
A physical map of the *Mycoplasma agalactiae* strain PG2 genome

Sebastiana Tola*, Graziano Idini, Angela M. Rocchigiani,
Stefano Rocca, Daniela Manunta, Guido Leori

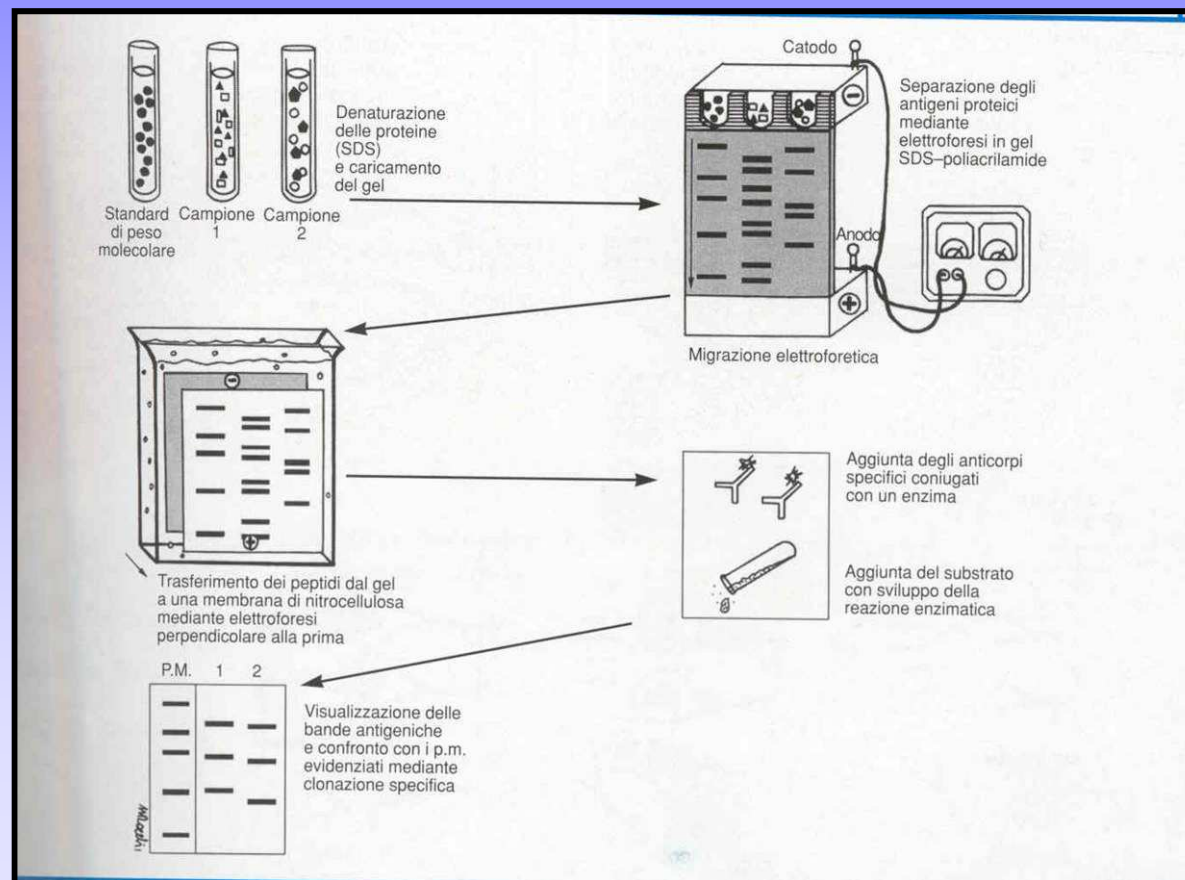
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi", 07100 Sassari, Italy

Received 11 May 2000; received in revised form 17 October 2000; accepted 4 November 2000

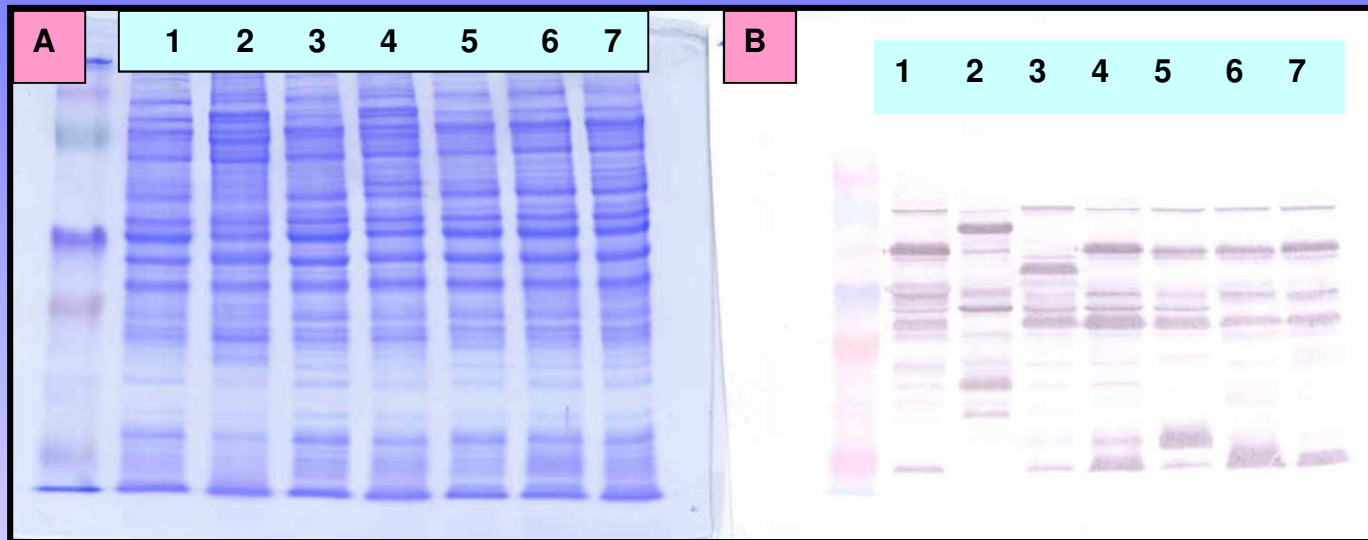
Diagnosi da siero: Inibizione della crescita



Elettroforesi monodimensionale e Immunoblotting

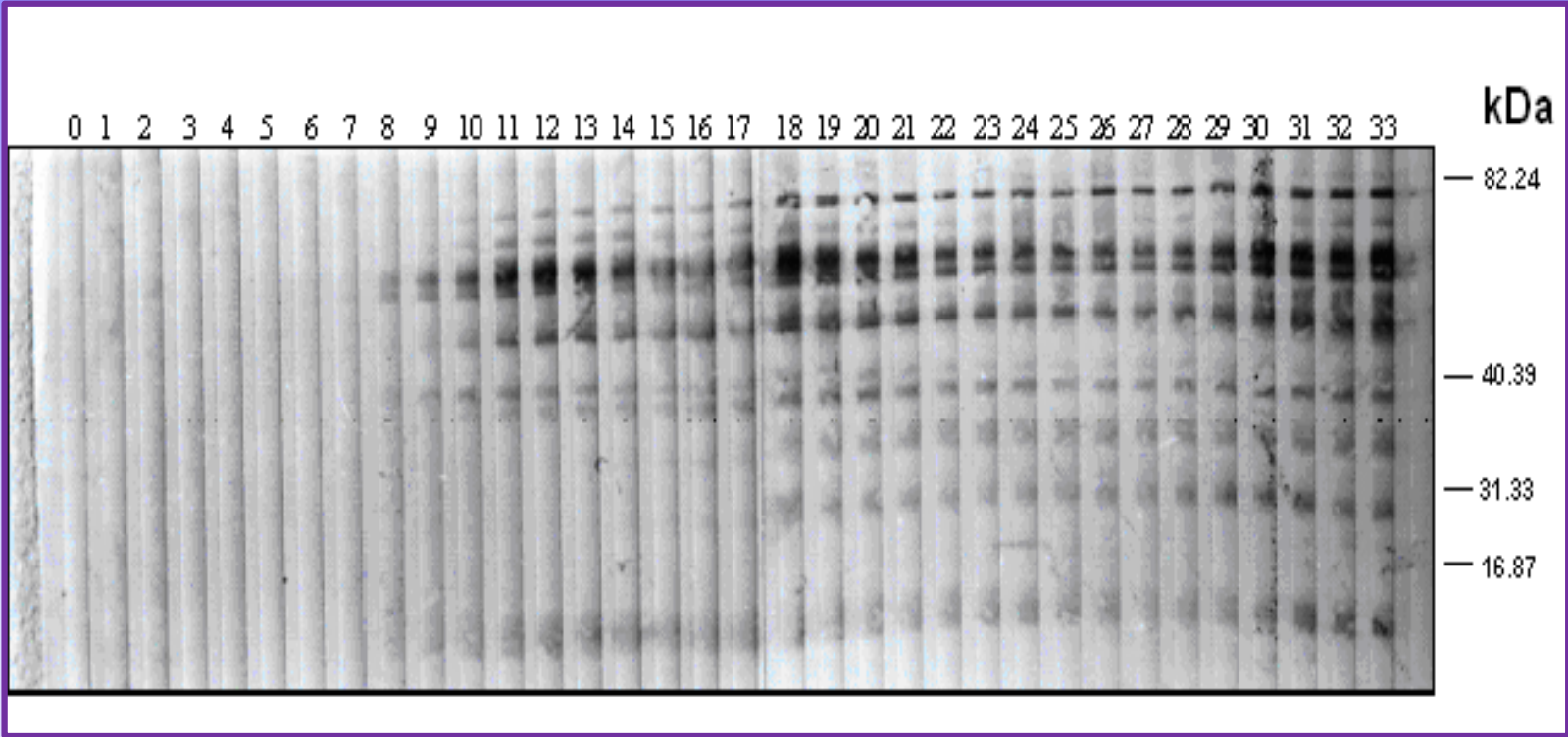


Proteine totali

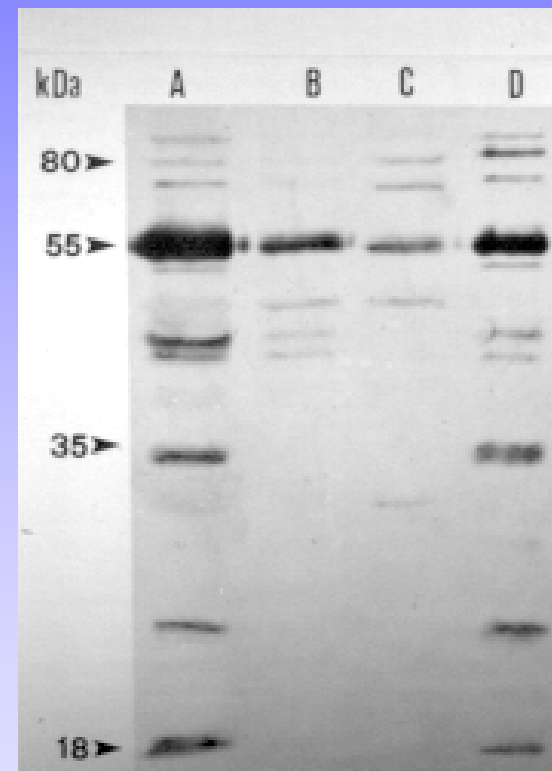
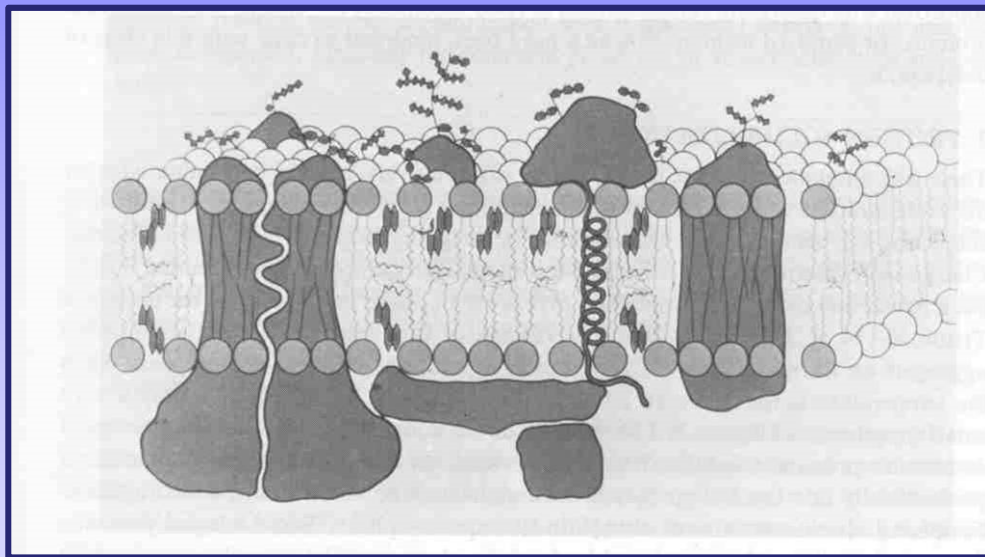


- A) SDS-page colorato con Blue di Coomassie
- B) Immunoblotting con siero di pecora con agalassia contagiosa

Andamento dell'infezione naturale



Proteine di membrana



Analisi predittiva delle proteine

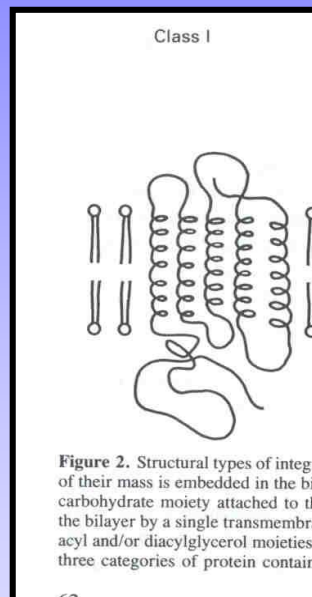
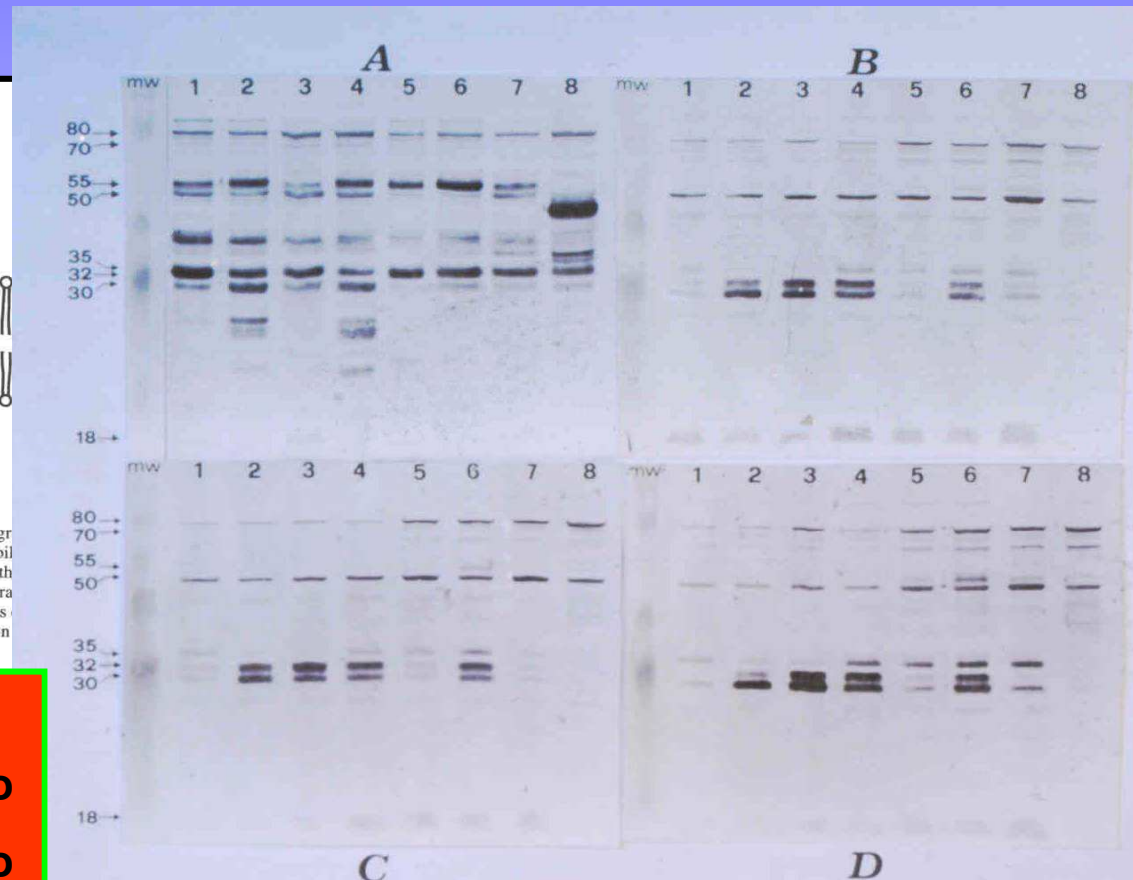


Figure 2. Structural types of integral membrane proteins. Class I: A single transmembrane α -helix. The diagram shows a cross-section of a lipid bilayer with a single α -helix spanning it. The helix is represented by a coiled line, and the lipid tails are shown as wavy lines.



A - Micoplasmi interi

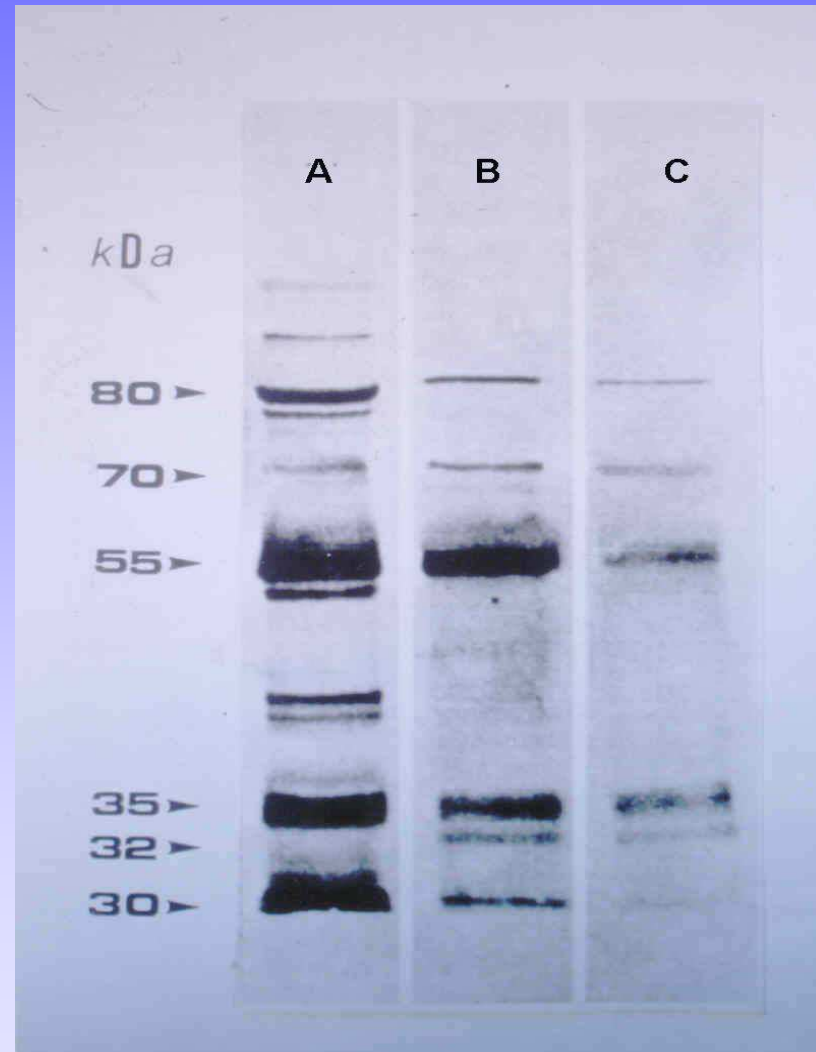
B - Dopo 15' di trattamento

C - Dopo 30' di trattamento

D - Dopo 45' di trattamento

Proteine di superficie

A - Proteine immunogeniche
B - Proteine immunoprecipitate
C - Proteine immunoprecipitate
di micoplasmi tripsinizzati





Questa lipoproteina
è l' "Elongation
factor"

Mycoplasma agalactiae



FEMS Microbiology Letters 154 (1997) 355–362



Characterization of membrane surface proteins of *Mycoplasma agalactiae* during natural infection

Sebastiana Tola ^{a,*}, Daniela Manunta ^a, Monica Cocco ^a, Franco Turrini ^b,
Angela M. Rocchigiani ^a, Graziano Idini ^a, Antonio Angioi ^a, Guido Leori ^a

^a Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi", Via Duca degli Abruzzi 8, 07100 Sassari, Italy

^b Istituto di Biochimica, Torino, Italy

Received 16 June 1997; revised 20 July 1997; accepted 25 July 1997



FEMS Microbiology Letters 202 (2001) 45–50



www.fems-microbiology.org

Sequence, cloning, expression and characterisation of the 81-kDa surface membrane protein (P80) of *Mycoplasma agalactiae*

S. Tola ^{a,*}, S. Crobeddu ^a, G. Chessa ^a, S. Uzzau ^b, G. Idini ^a, B. Ibba ^a, S. Rocca ^a

^a Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi", Via Duca degli Abruzzi 8, 07100 Sassari, Italy

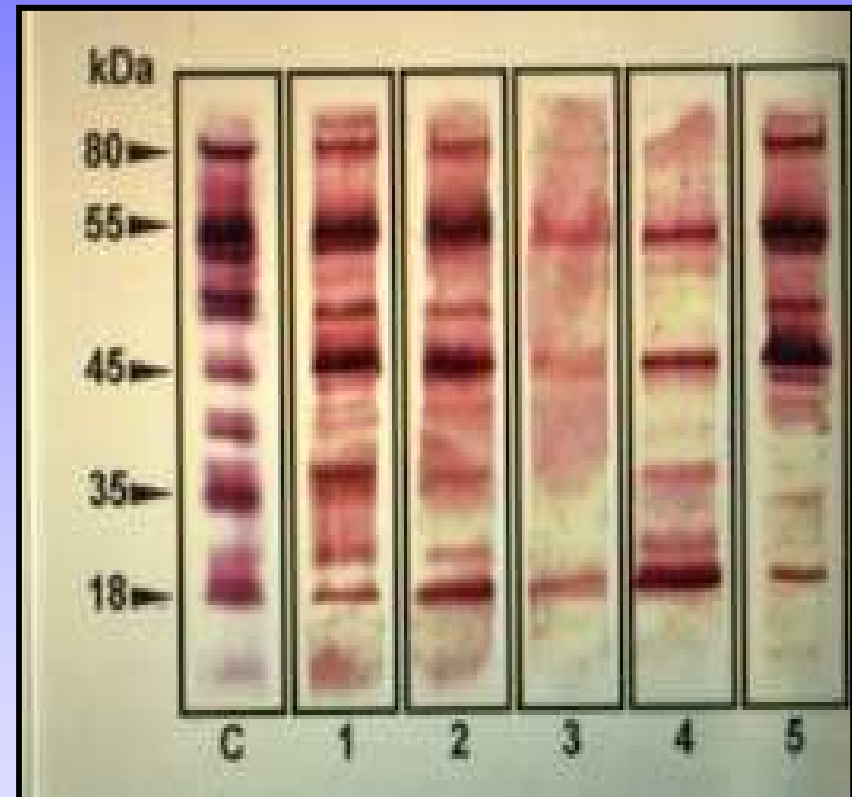
^b Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Viale S. Pietro 43B, 07100 Sassari, Italy

Received 7 February 2001; received in revised form 3 May 2001; accepted 8 May 2001

First published online 15 July 2001

Azione degli inattivanti

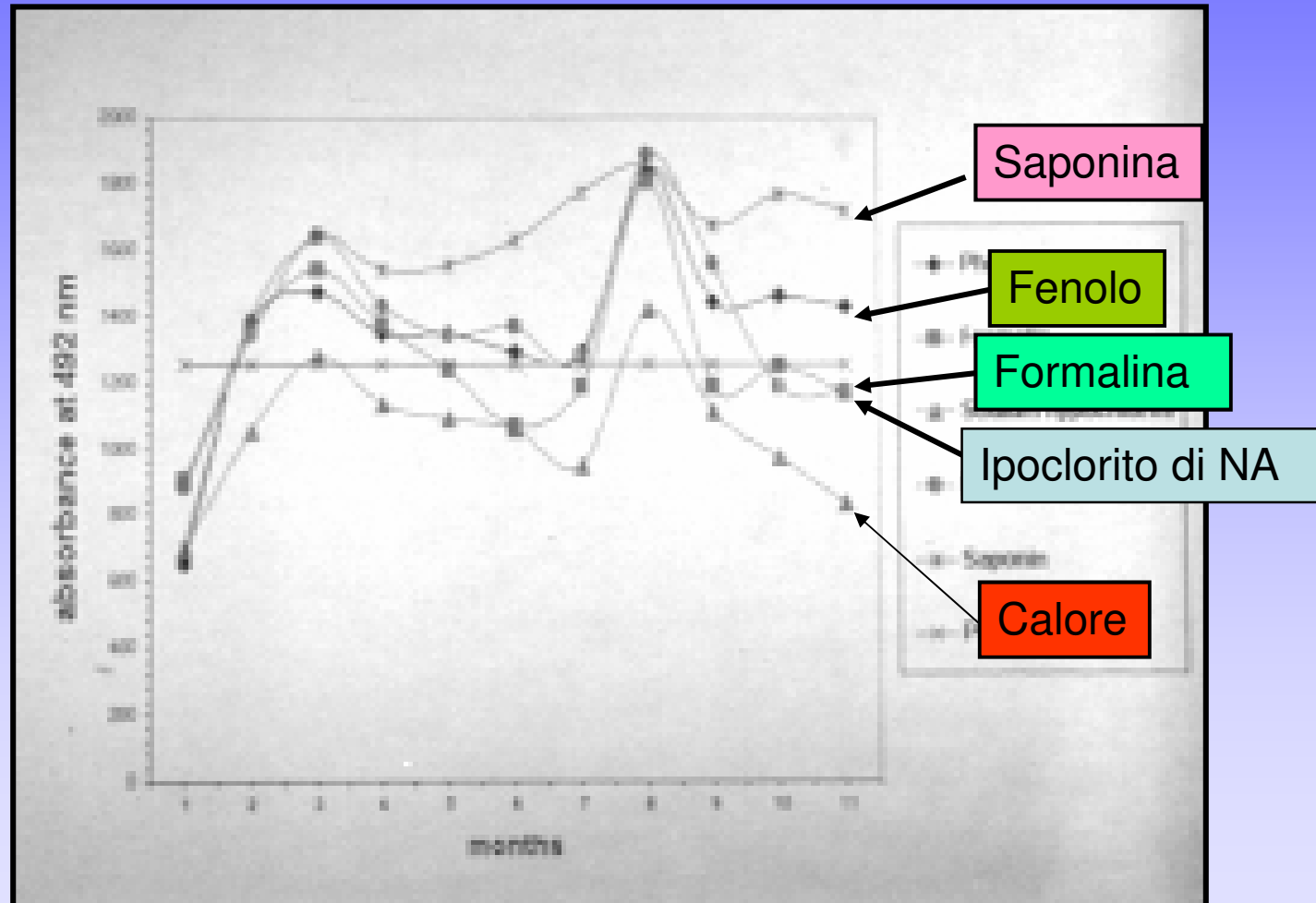
- Fenolo
- Formalina
- Ipoclorito di sodio
- Calore
- Saponina



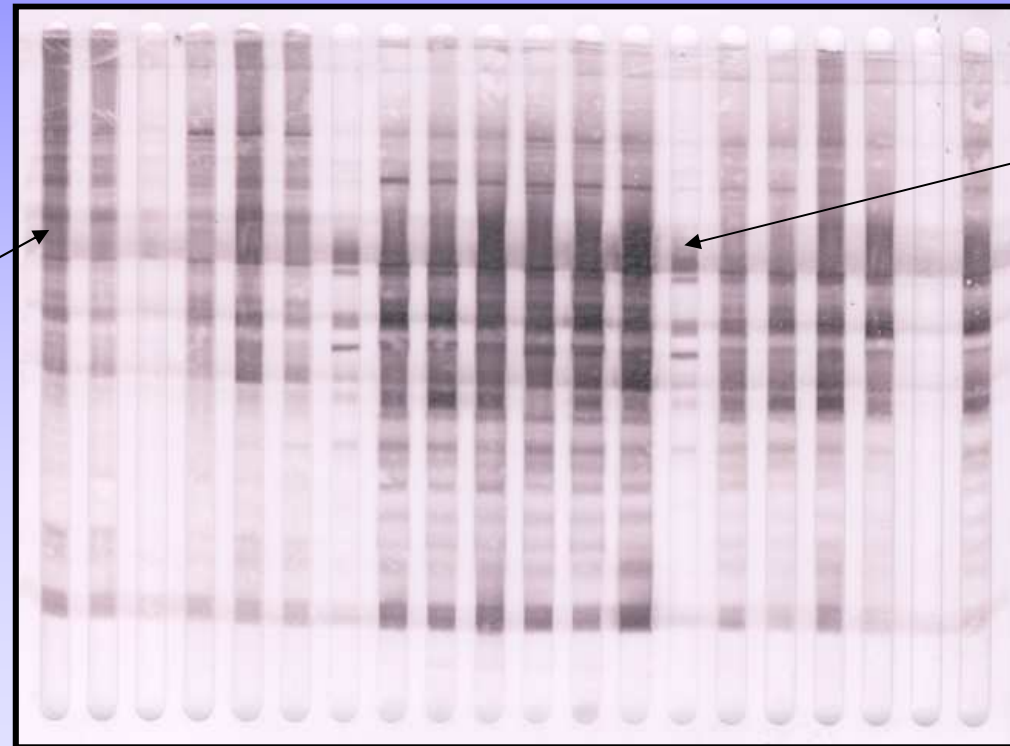
Calendario di vaccinazione

- Prima vaccinazione (maggio)
- Seconda vaccinazione (giugno)
- Richiamo-Booster (**novembre**)
- Challenge (aprile)

Andamento anticorpale complessivo



Diagnosi da siero: Immunoblotting



Vaccino

Naturale

Mycoplasma agalactiae

FATRO ITALIA - VACCINI (OVINI)

OVAX® AGALASSIA

Vaccino inattivato contro l'Aborto Enzootico degli ovini



COMPOSIZIONE

Una dose (2ml) di vaccino contiene: colture inattivate di *Mycoplasma agalactiae* 10⁹ UCC*
Adiuvante: saponina 6 mg.
*UCC= Unità cambiamento di colore

SPECIE DI DESTINAZIONE



Vaccine

agalactiae using

Angioi, G. Leori
ri, Italy

Vaccine

www.elsevier.com/locate/vaccine

Field trial of two dual vaccines against *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type) in goats

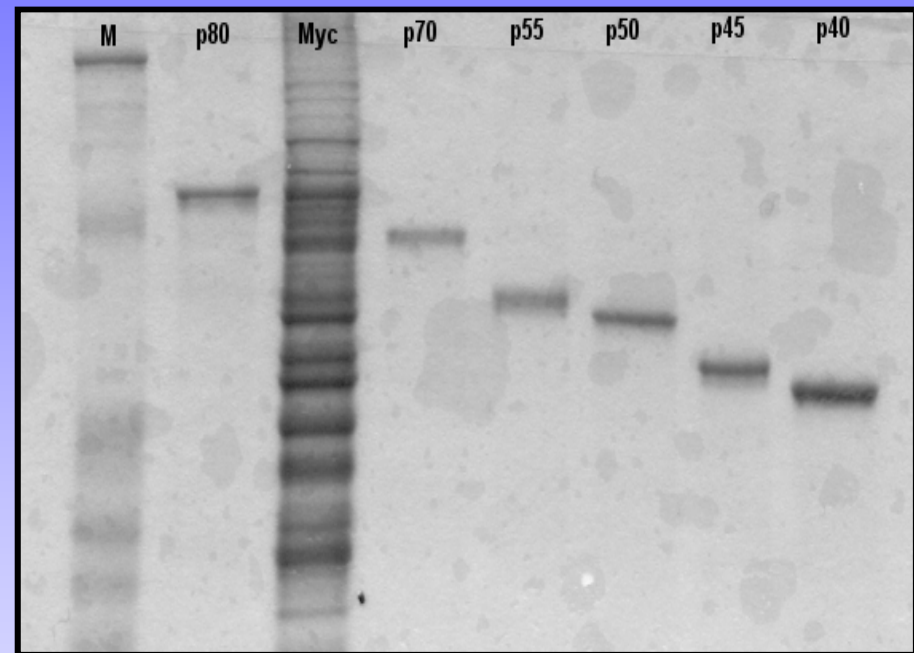
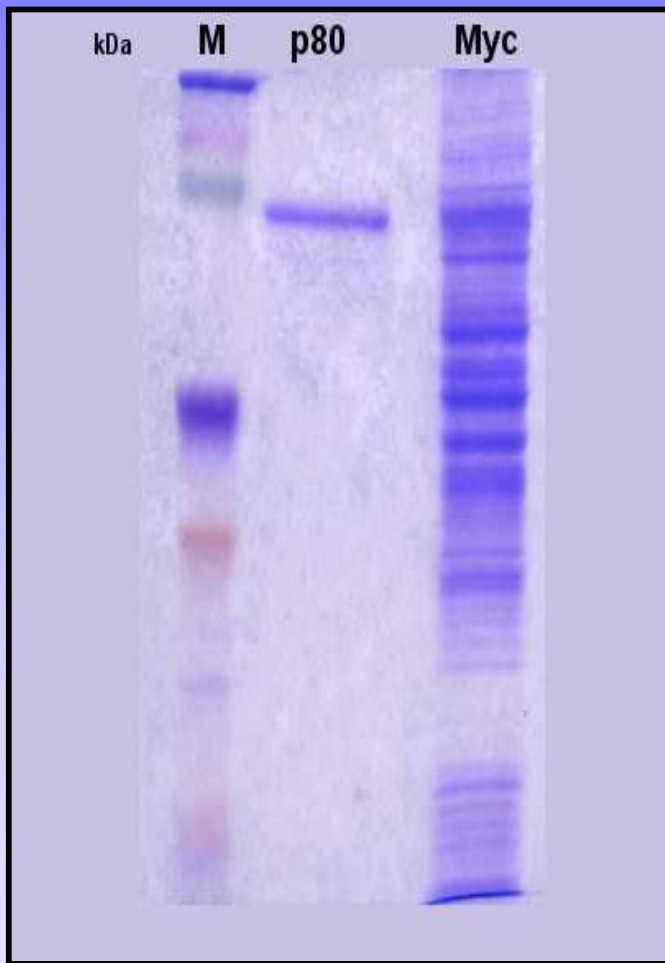
Christian de la Fe^{a,*}, Patricia Assunção^a, Pedro Saavedra^a, Sebastiana Tola^b,
Carlos Poveda^a, José B. Poveda^a

^a Unidad de Epidemiología y Medicina Preventiva, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas, Trasmontaña s/n, 35416 Arucas, Spain

^b Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi", via Duca degli Abruzzi 8, 07100 Sassari, Italy

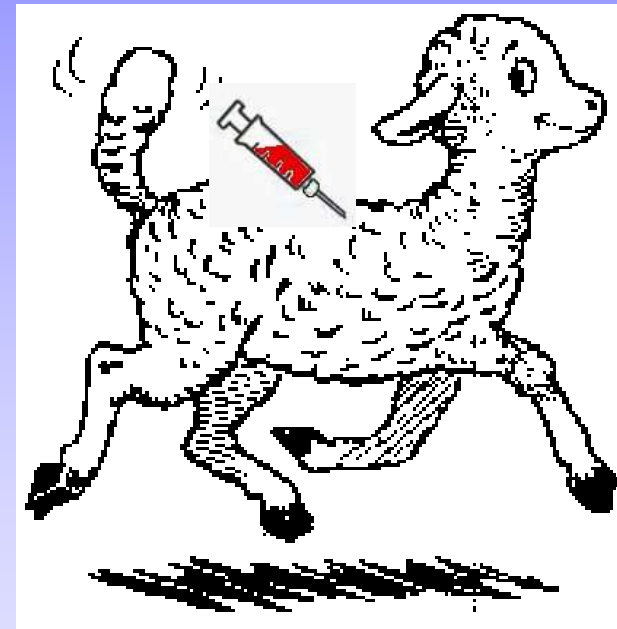
Received 29 June 2006; received in revised form 2 August 2006; accepted 23 November 2006
Available online 8 December 2006

Caratterizzazione delle proteine

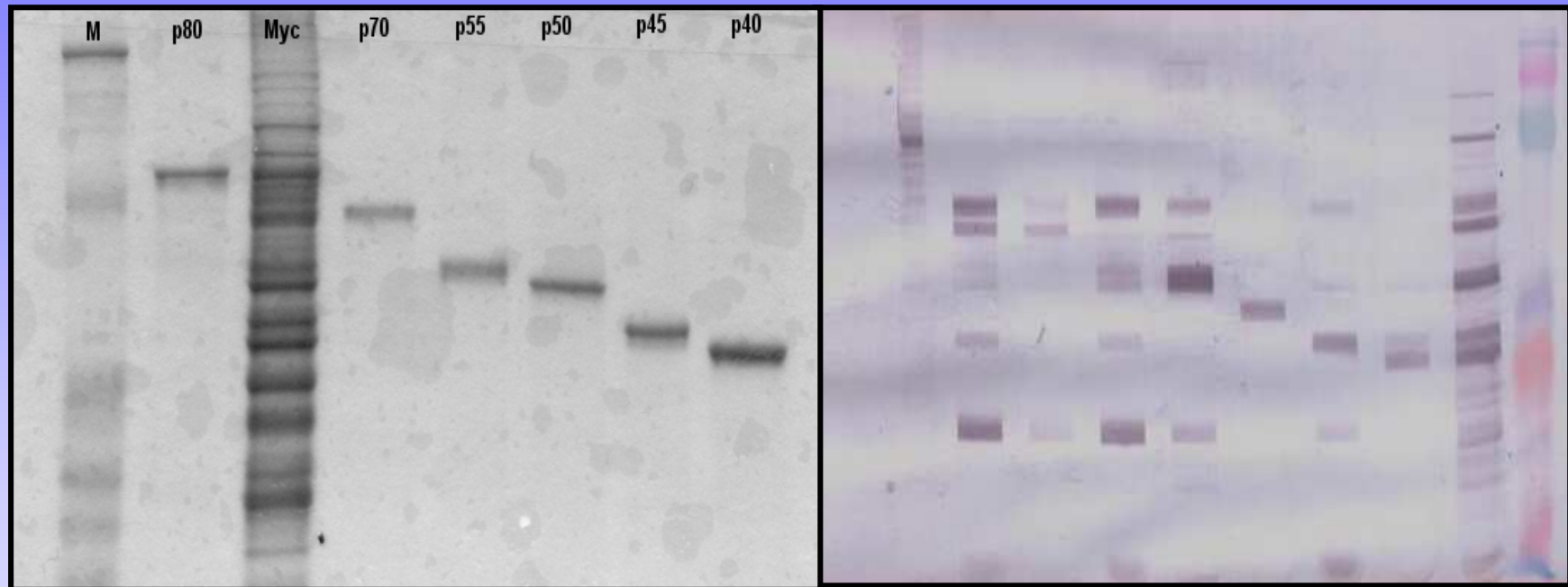


Immunizzazione di agnelli

- 1 inoculo s.c. con adiuvante completo di Freund
- 2 inoculi s.c. con adiuvante incompleto di Freund
- 1 inoculo intramuscolo
- Salasso
- Immunoblotting



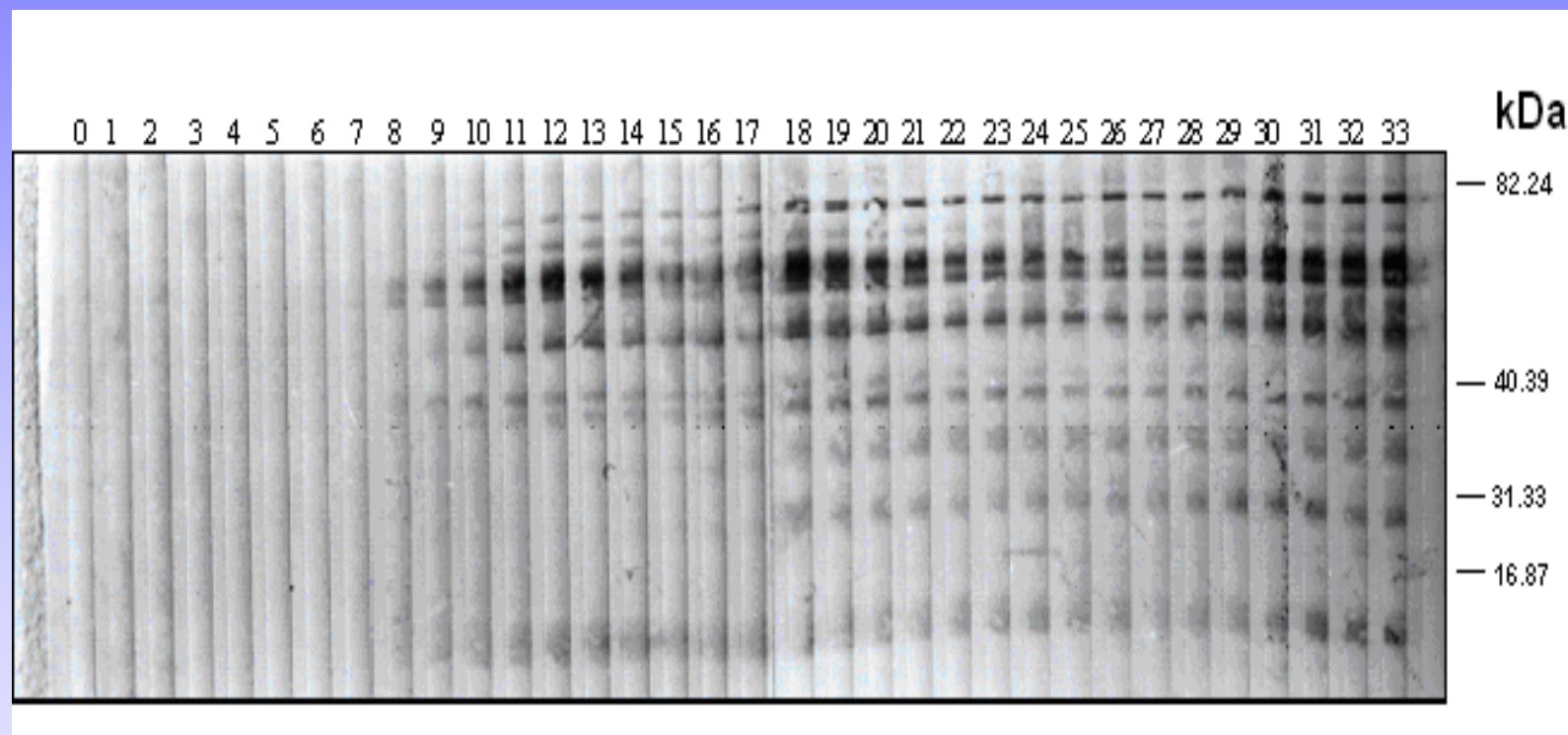
Anticorpi policlonali



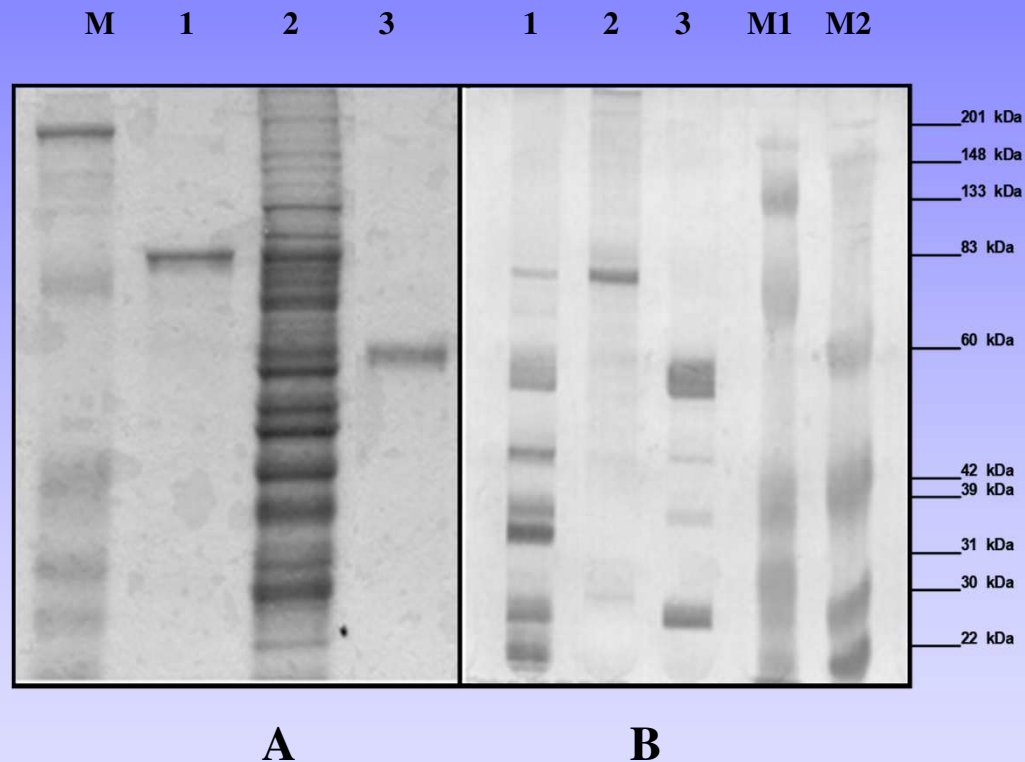
SDS-PAGE

IMMUNOBLOTTING

Espressione antigenica durante l'infezione sperimentale



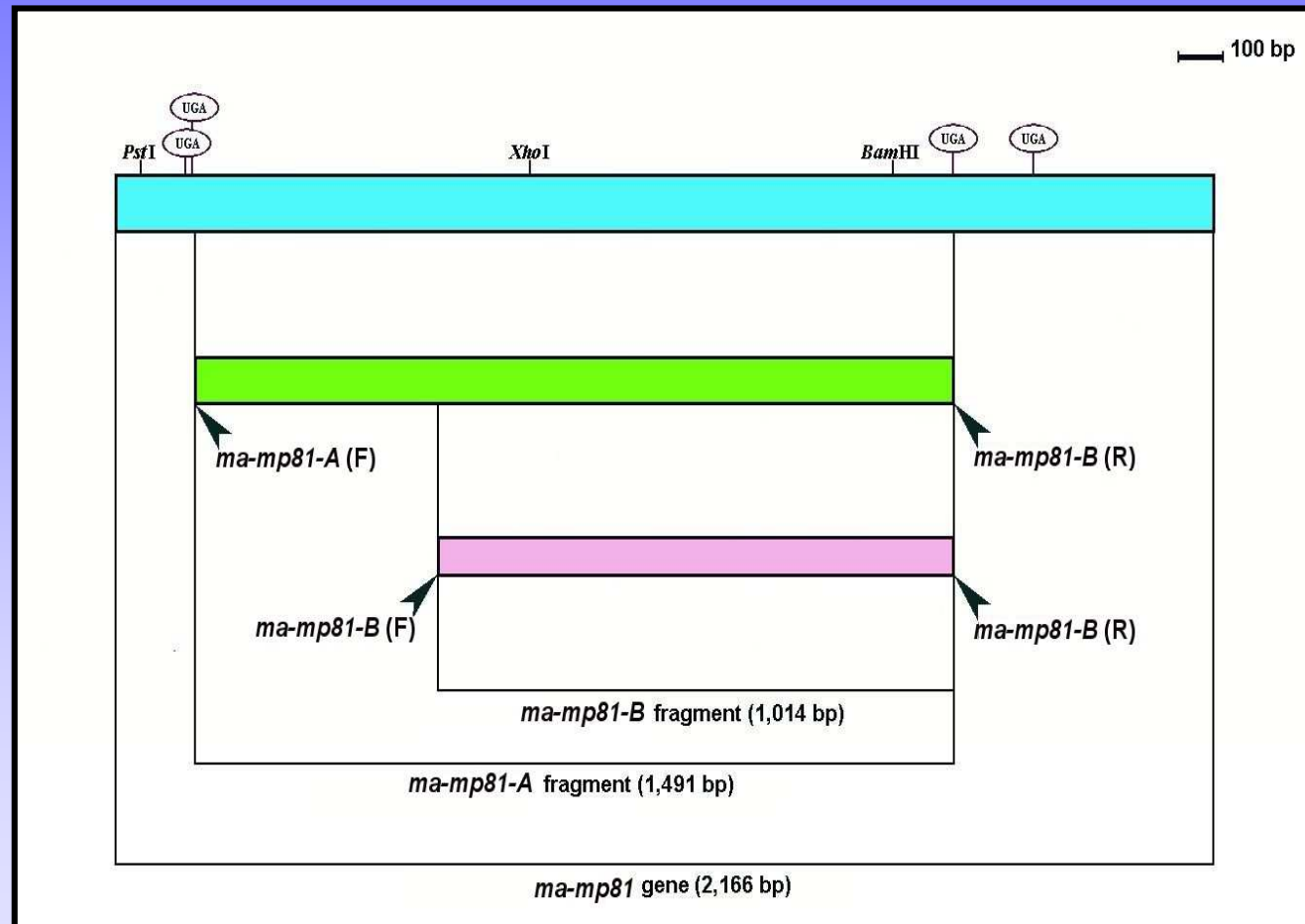
Scelta di due proteine: P81 e P55



Biotecnologia applicata

- Sequenza N-terminale della proteina
- Individuazione del gene
- Inserimento del gene o parte di esso in vettori di clonaggio
- Inserimento in vettori di espressione
- Produzione di proteine ricombinanti

Identificazione del gene *p81*

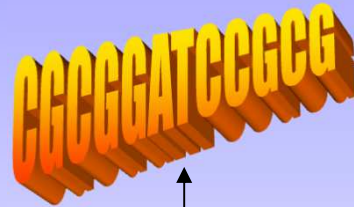


PCR con primers “particolari”

inizio gene



GGAATACAAAGGAATGGGCGACAAGGACAACATAGAG

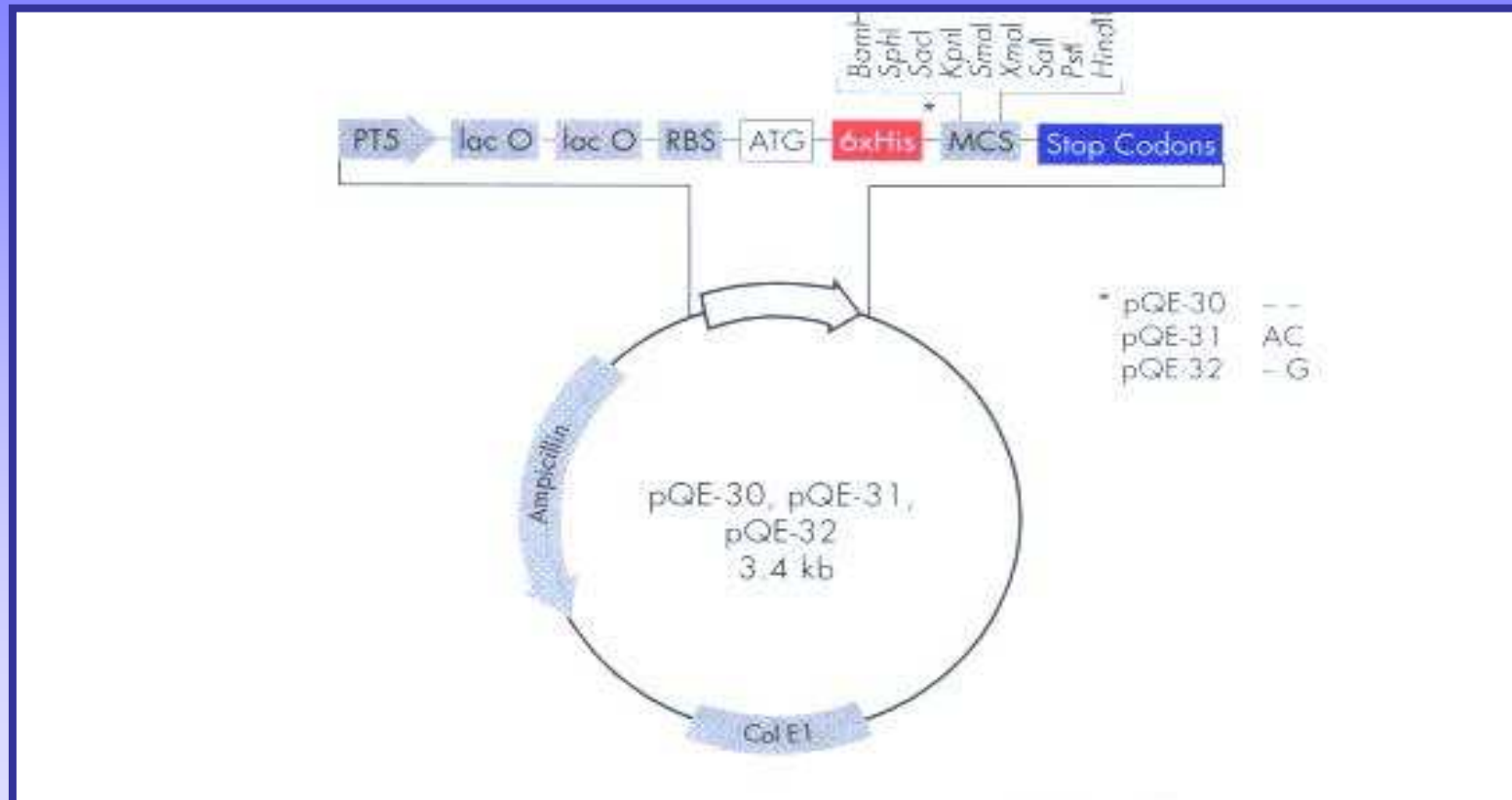


ATGGGCGACAAGGA

BamHI



Plasmide per il clonaggio

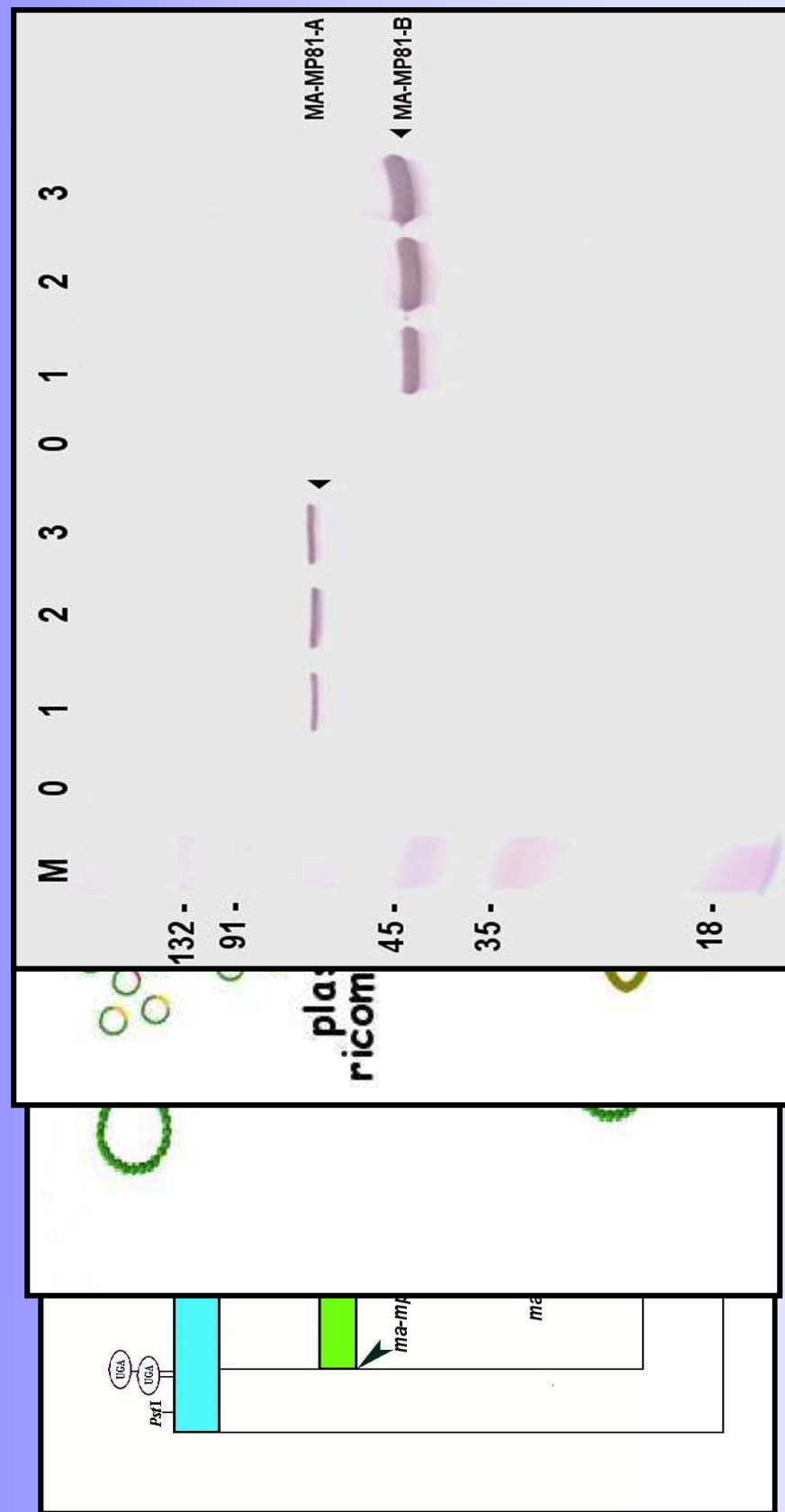


Development of a Sensitive and Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Recombinant Antigens for Rapid Detection of Antibodies against *Mycoplasma agalactiae* in Sheep^{V†}

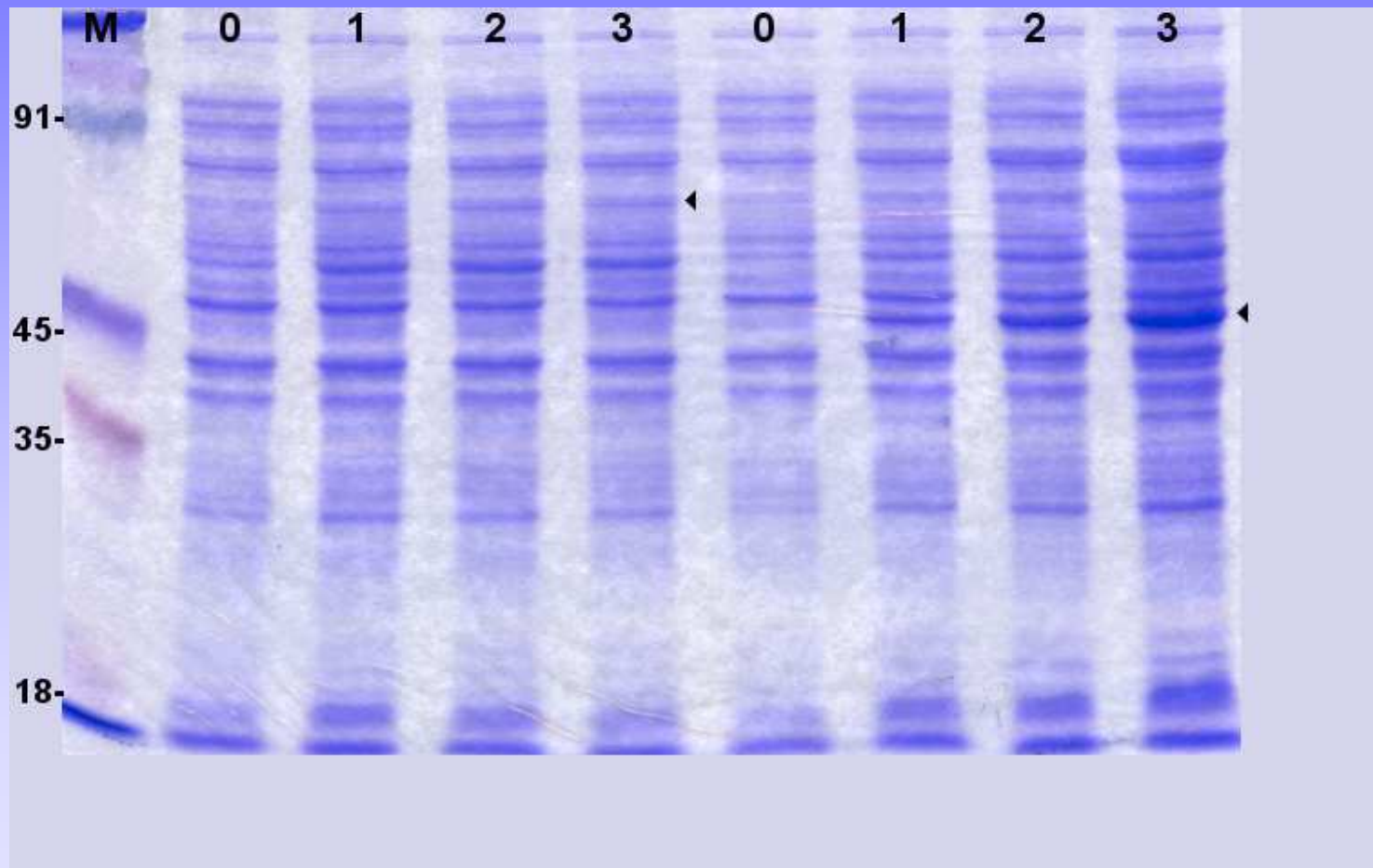
Marisa Fusco,¹ Lucia Corona,¹ Tonianello Onni,¹ Elisabetta Marras,² Carla Longheu,¹ Graziano Idini,¹ and Sebastiana Tola^{1*}

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna G. Pizzardi, 07100 Sassari, Italy,¹ and CNR-4, Edificio 3 Loc. Piscinamedusa, 09010 Pula, Italy,²

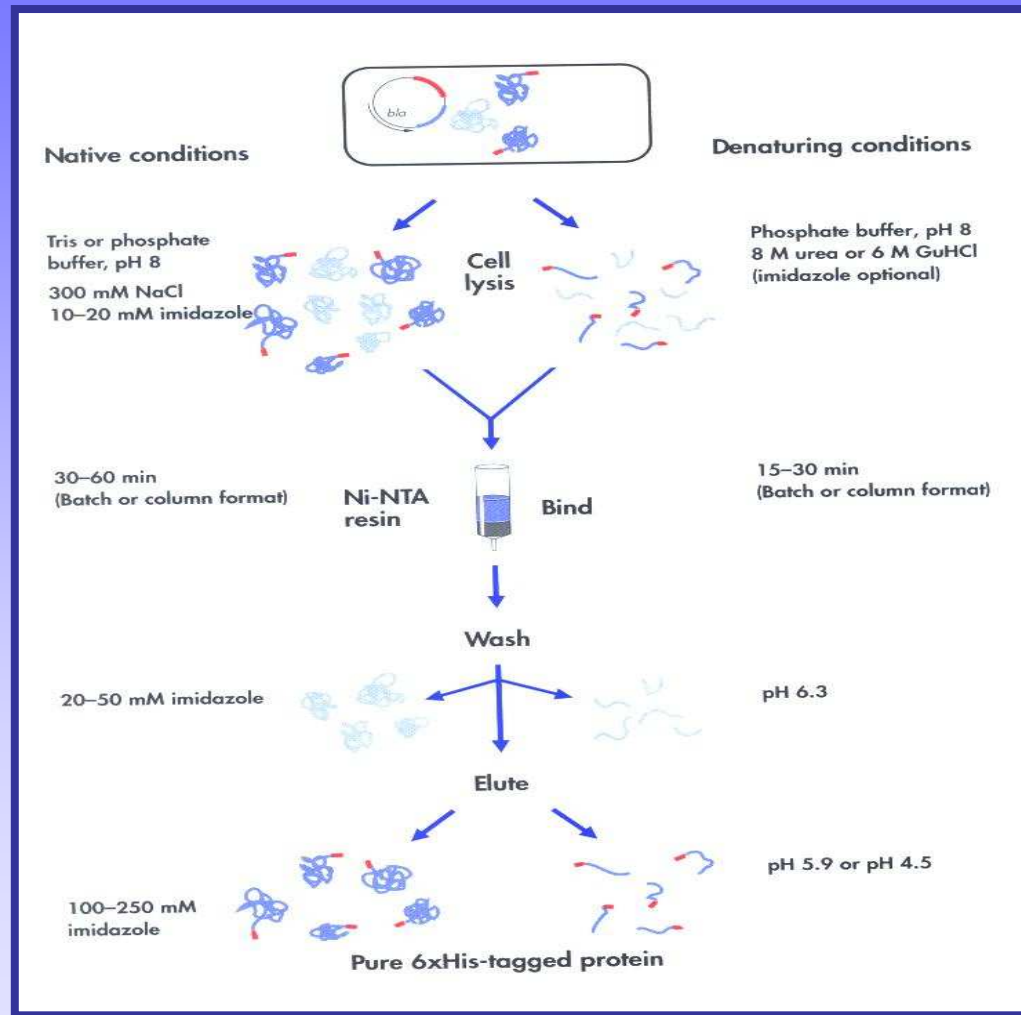
Received 17 November 2006/Returned for modification 4 January 2007/Accepted 22 January 2007

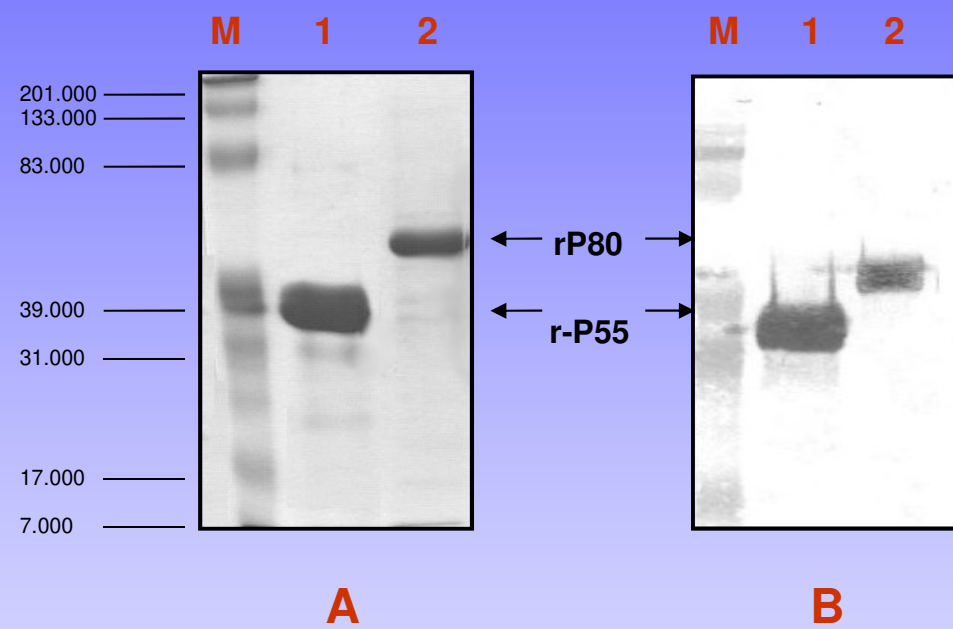


Induzione degli *E.coli*



Purificazione





Allestimento ELISA

- 👉 **Determinazione della concentrazione ottimale delle due proteine**
- 👉 **Sensibilizzazione delle piastre**
- 👉 **Verifica dell'efficacia sia con i sieri dell'infezione sperimentale che con i sieri dell'infezione naturale**

ELISA con “sieri da campo”

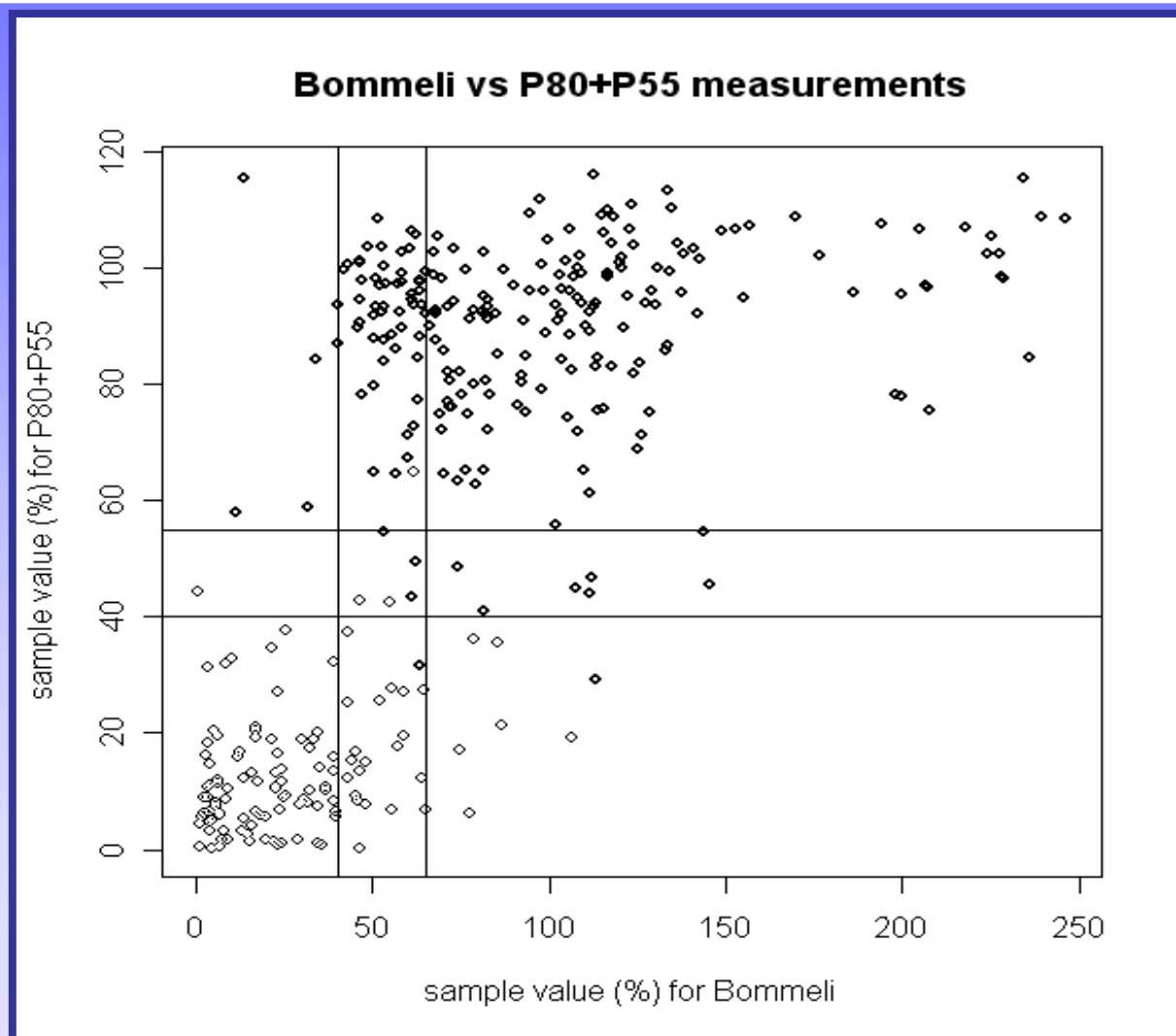
👉 **Sieri analizzati: n. 343**

👉 **Analisi in immunoblotting**

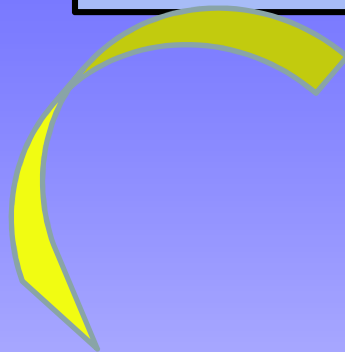
👉 **ELISA ricombinante**

👉 **Standardizzazione dei singoli
passaggi e allestimento di un Kit**

Confronto tra due kit

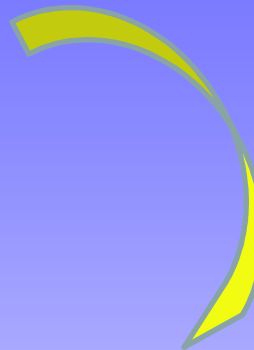


Rapporto di prova



rELISA

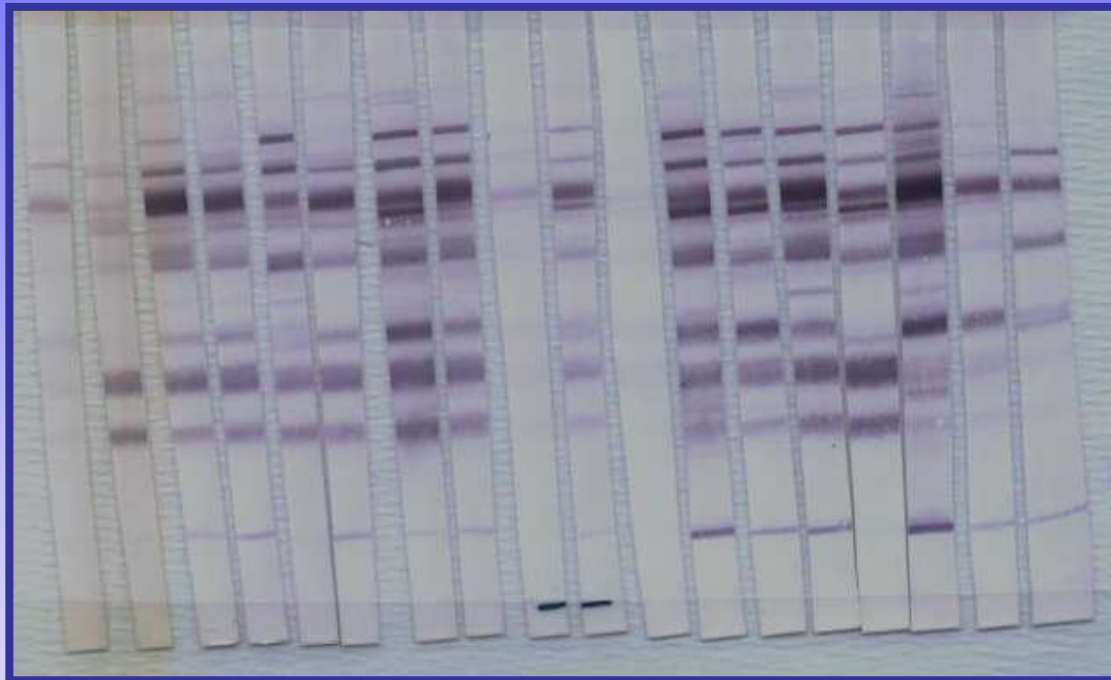
- Positivo
- Negativo



IMMUNOBLOTTING

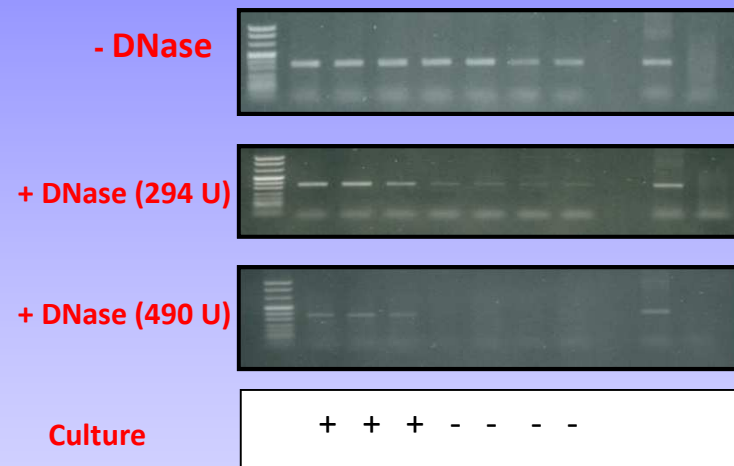
- Positivo da infezione
- Positivo da vaccinazione
- Positivo da vacc.+ infezione
- Negativo

Batteriologia negativa



IB-campioni di latte

Dimostrazione della vitalità dei batteri



- Dimostrare l'infettività del batterio: il DNA può persistere nel campione anche con batteri non vitali (Josephson *et al.* 1993)

Viability

International Dairy Journal 37 (2014) 1–4



Contents lists available at ScienceDirect

International Dairy Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijds



Short communication

Rapid and specific enumeration of viable Bifidobacteria in dairy products based on flow cytometry technology: A proof of concept study

Jing Geng^a, Camille Chiron, Jérôme Combrisson

^aDenovo Research, Centre Daniel Carasso, RD 128, 91767 Palaiseau Cedex, France



J. Dairy Sci. 97:3694–3699

<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7730>

© American Dairy Science Association[®], 2014.

Short communication: Application of an *N*-acetyl-L-cysteine-NaOH decontamination method for the recovery of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from milk of naturally infected cows

L. Bradner,^a S. Robbe-Austerman,[†] D. C. Beitz,^{*‡} and J. R. Stabel^{§§}

^aRoy J. Carver Department of Biochemistry, Biophysics, and Molecular Biology, Iowa State University, Ames 50010

[†]USDA Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), Veterinary Services, Ames, IA 50010

^{*}senior, Iowa State University, Ames 50010

[§]arch Service (ARS), National Animal Disease Center, Ames, IA 50010

International Dairy Journal 34 (2014) 280–286



Contents lists available at ScienceDirect

International Dairy Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijds



Development of an immunomagnetic separation–propidium monoazide–polymerase chain reaction assay with internal amplification control for rapid and sensitive detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 in milk

Lijun Wang^a, Ping Li^a, Youjun Yang^b, Hong Xu^c, Zoraida P. Aguilar^c, Hengyi Xu^{a,*}, Lin Yang^a, Feng Xu^b, Weihua Lai^a, Yonghua Xiong^b, Hua Wei^{a,b}

^aJiangsu Key Laboratory of Food Safety and Technology, Nanjing University, Nanjing 210009, PR China

^bNanjing-Oil Joint Research Institute, Nanjing University, Nanjing 210047, China

^cDepartment of Biology, Texas A&M University, Springdale, AR 72764, USA

Food Microbiology 34 (2013) 418–424



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm



Short communication

Magnetic nano-beads based separation combined with propidium monoazide treatment and multiplex PCR assay for simultaneous detection of viable *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in food products

Youjun Yang^a, Feng Xu^{a,1}, Hengyi Xu^{a,1}, Zoraida P. Aguilar^c, Ruijiang Niu^a, Yong Yuan^a, Jichang Sun^d, Xingyong You^d, Weihua Lai^a, Yonghua Xiong^b, Cuixiang Wan^{b,*}, Hua Wei^{a,*}

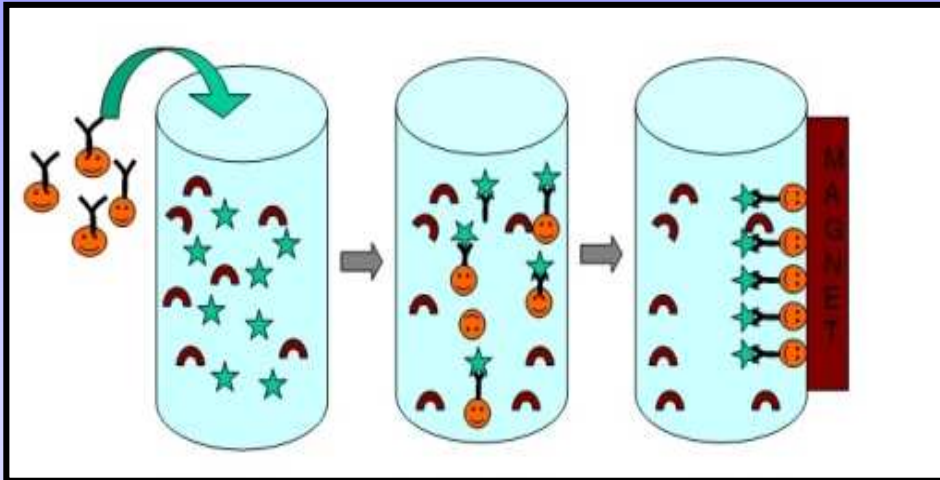
^aState Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanjing University, 235 Nanjing East Road, Nanjing 210047, PR China

^bGuo-Guo Joint Research Institute, 235 Nanjing East Road, Nanjing 210047, PR China

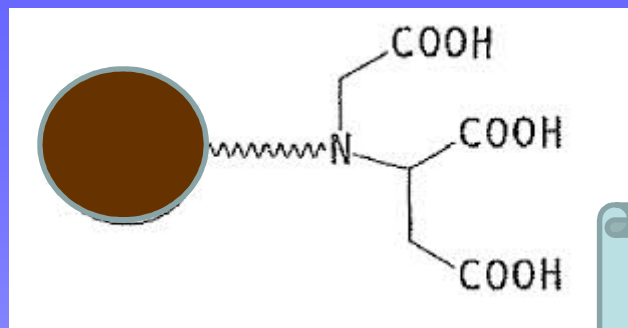
^cOvest NanoTech LLC, 2143 Worth Lane, Springdale, AR 72764, USA

^dNanjing Province Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210000, PR China

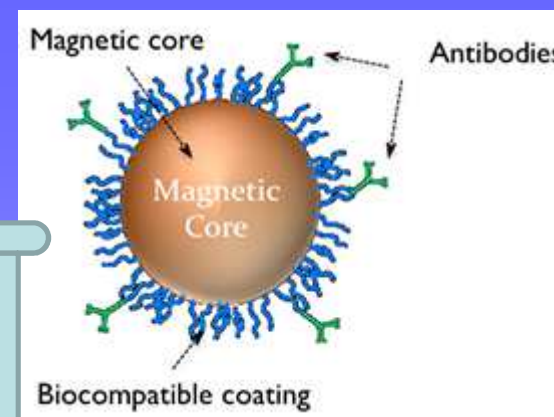
Sviluppare un metodo che permetta di differenziare i micoplasmi vivi da quelli morti



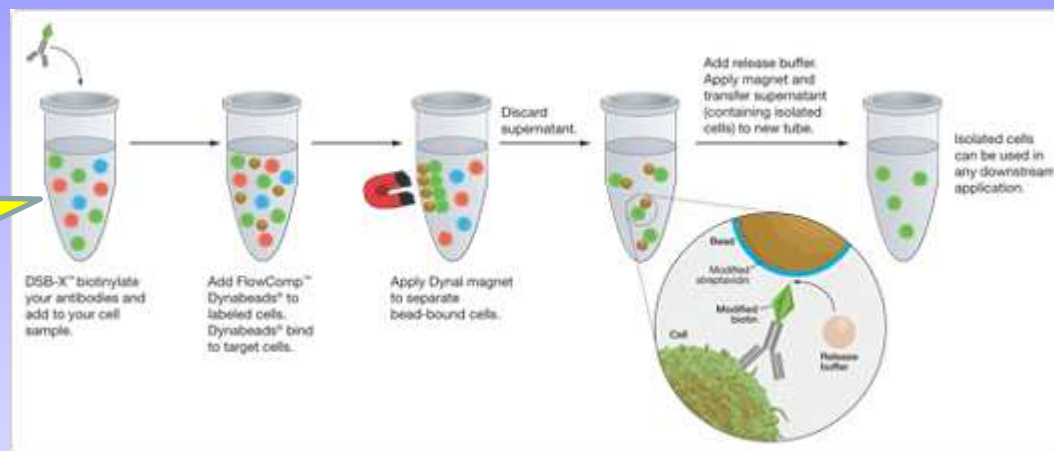
- Legare a nanoparticelle magnetiche anticorpi policlonali anti P80 e P55 per formare MB-Ab80 e MB-Ab55



CMC



**Diluizione
ottimale
sieri
1:1500**



CMC, N-cyclohexyl-N-(2-morpholinethyl)
carbodiimide methyl-p-toluensulfonate

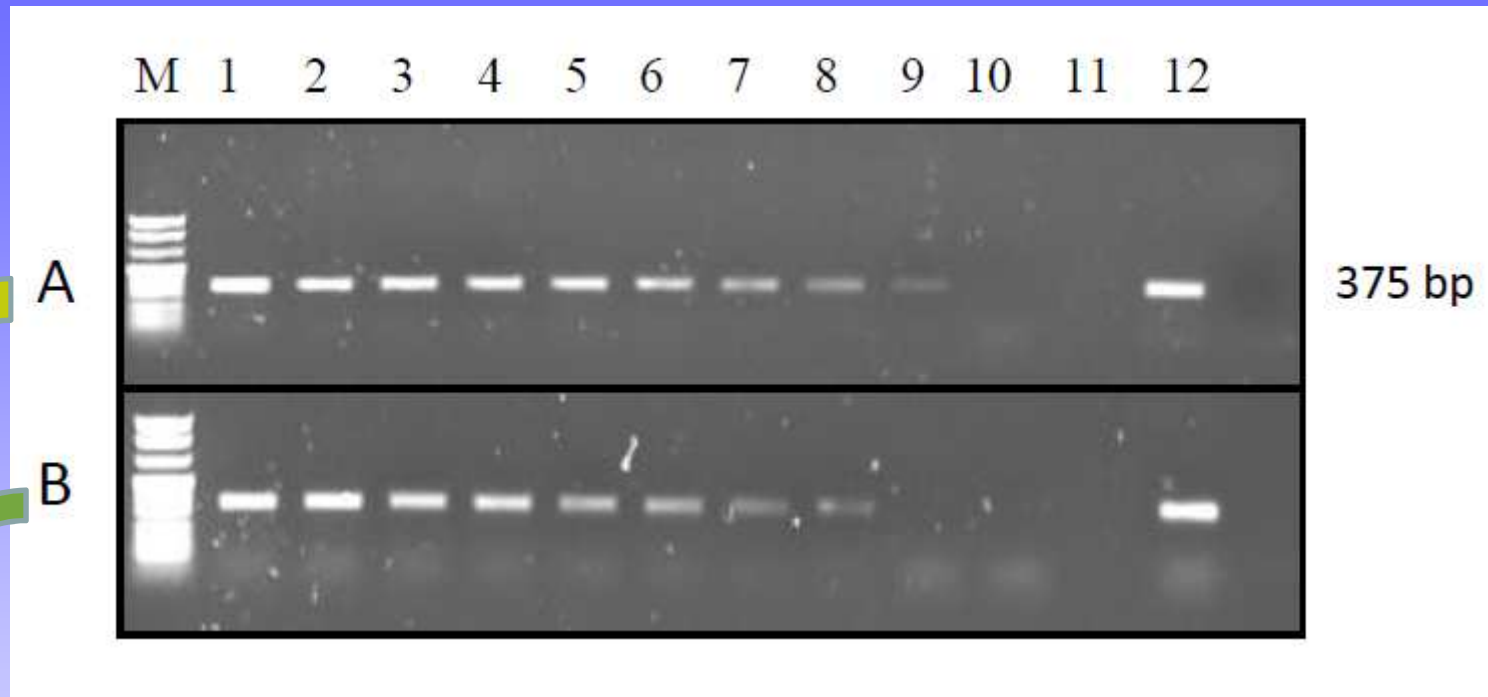
SENSIBILITA' DEL METODO IMC-PCR

PBS

LATTE

Isolate	Year of isolation	Geographic origin (Region/Province)
PG2		
PA119	1993	Sicily/Palermo
TE290	1993	Abruzzo/Teramo
338	1994	Sardinia/Cagliari
1852	2012	Sardinia /Nuoro
70976	2013	Sardinia/Sassari

Estrazione
DNA :
bollitura



LATTE

LOD (limit of detection)= 10^2 - 10^3 CCU/ml

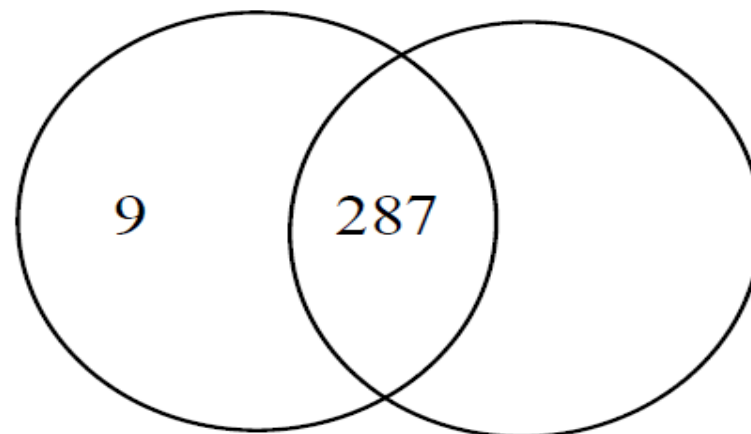
PBS

LOD= 10 - 10^2 CCU/ml

Campioni
di latte:
n=473

Culture +
(n=296)

IMC-PCR +
(n=287)



61
allevamenti

Dopo **circa 6 ore**, siamo in grado di diagnosticare la presenza
nei campioni di latte di **micoplasmi vivi e vitali**



ORIGINAL ARTICLE

**Development of a specific immunomagnetic capture-PCR
for rapid detection of viable *Mycoplasma agalactiae* in
sheep milk samples**

G. Sanna¹, V. Lecca¹, A. Foddai² and S. Tola¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi", Sassari, Italy

² Institute for Global Food Security, Medical Biology Centre, Queen's University Belfast, Belfast, UK



Dal 2004 al 2015



78 ceppi di *Mycoplasma mycoides*

Sindrome **MAKePS** (Thiaucourt & Bolske, 1996)

Capre presenti in Sardegna

Capre Saanen grandi lattifere a Nurallao

Nell'azienda agricola della famiglia Coni questi animali sono stati introdotti per affiancare l'allevamento ovino e bovino. Oggi sono una passione coltivata con grande attenzione alla selezione genetica e allo svezzamento dei capretti

di ELENA GARELLA



▲ Mario Coni con una delle sue capre Saanen.

La famiglia Coni è dedicata all'allevamento da quattro generazioni e ha scelto di allevare la pecora sarda per la produzione di latte e la Bruna e la razza Sarda come bovini da carne.

Forte di un'azienda di grande estensione, 250 ettari, ricca di una zona boschiva, dove i bovini sono tenuti a pascolo brado e una cospicua per il pascolo degli ovini. Per una sorta di scommessa legata all'esigenza di sfruttare a pieno il coefficiente d'allevamento, data la grande estensione, nel 2001 è stato introdotto un nucleo di 30 capre Saanen, scelte perché grandi lattifere.

re. "L'allevamento delle altre specie animali, spiega Mario Coni, è semi-stabulativo, mentre le capre possono essere allevate in stabulazione completa e ci permettono una gestione razionale e semplice. A livello internazionale è una delle razze più selezionate al fine del miglioramento delle performance riproduttive e produttive."

Il latte di capra è interamente venduto a una cooperativa che lo imbuta per il consumo alimentare e l'intenzione della famiglia è di arrivare a 700 - 800 capi, che permetterebbero di ammortizzare al meglio i costi di gestione.

FACILI ALLA MUNGITURA MECCANICA
Le capre sono munte meccanicamente.

RAZIONAMENTO
Capre in lattazione
4 kg di unifed/capo
di cui:
- 2 kg insilato mais
- 1 kg fieno (loietto + medica)
- 1 kg concentrato + integratore + additivi
Capre gravide fino al parto e rimonta
fieno di loietto a volontà
0,6 - 0,7 grammi di concentrato/capo (focce di mais e mangime pellettato)

L'AZIENDA IN BREVE
Azienda Agricola Coni - Nurallao, Cagliari
superficie: 250 ettari di cui:
- 150 ha boschivo come pascolo brado per i bovini
- 30 ha pascolo cespugliato usato per bovini e ovini secondo il periodo dell'anno
70 ha seminativo in rotazione:
- 10 ha frumento, granella
- 60 ha a loietto (70%) e trifoglio (20-30%)

Supplemento INFORMATORE ZOOTECNICO • n. 26 / 2008 • 25



Capre di razza Marciano-Granadina



Capre di razza Maltese

IMPORTANTE

- Identificare e caratterizzare gli isolati

Presenza di micoplasmi nel canale esterno delle orecchie di capre sane e nel seme di maschi asintomatici

(Mercier et al.; 2007; Tardy et al.; 2010; Amores et al.; 2010,2011)



Contents lists available at ScienceDirect

Small Ruminant Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/smallrumres



Short communication

Characterization of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* isolates by SDS-PAGE, immunoblotting and PFGE

L. Corona^a, J. Amores^b, T. Onni^a, C. de la Fe^b, S. Tola^{a,*}

^a Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi", 07100 Sassari, Italy

^b Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Campus de Excelencia Internacional Regional "Campus Mare Nostrum", Universidad de Murcia, Murcia, Spain



Table 1

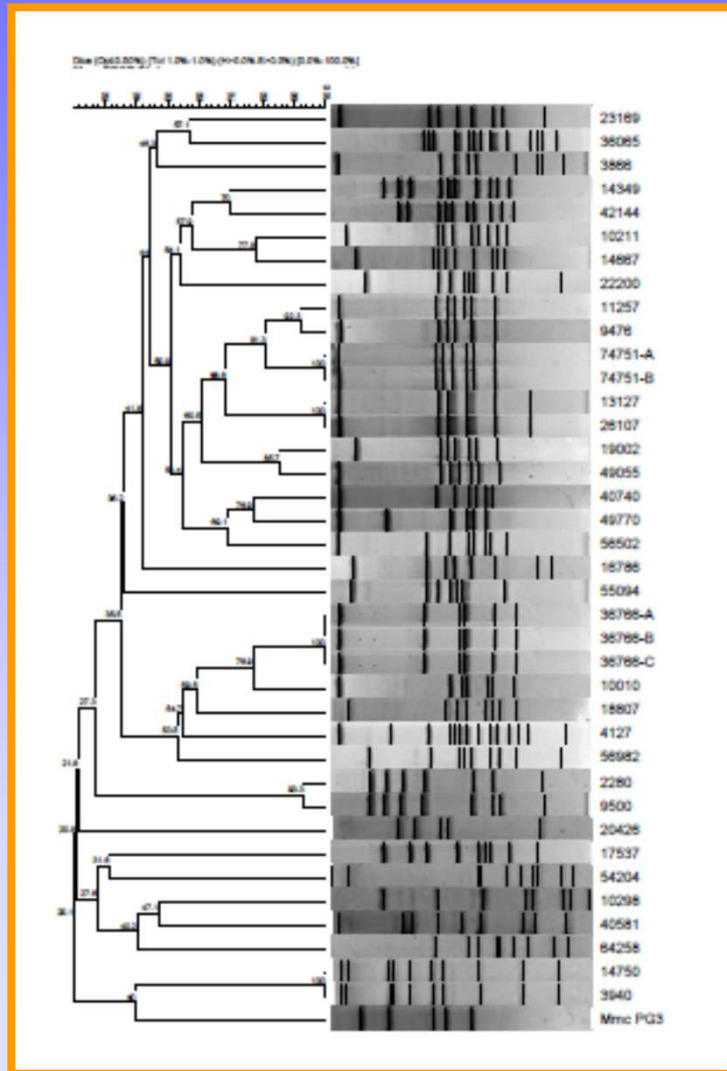
Mycoplasma mycoides subsp. *capri* isolates used in this study.

No	Isolate	Year of isolation	Host	Isolation	Geographical origin (Town/Province)
1	55,094	2004	Goat	Milk	Collinas/Medio Campidano (VS)
2	74,751-A 74,751-B	2004	Goat	Fetus articulation Fetus Lung	Talana/Ogliastra (OG) Talana/Ogliastra (OG)
3	11,257	2005	Goat	Milk	Baunei/Ogliastra (OG)
4	56,982	2006	Goat	Milk	Ittiri/Sassari (SS)
5	49,055	2006	Goat	Lung	Gairo/Ogliastra (OG)
6	19,002	2006	Goat	Lung	Pattada/Sassari (SS)
7	13,127	2006	Sheep	Lung	Barisardo/Ogliastra (OG)
8	3866	2006	Goat	Milk	Marrubiu/Oristano (OR)
9	18,807	2007	Goat	Lung	Talana/Ogliastra (OG)
10	23,169	2007	Goat	Lung	Urzulei/Ogliastra (OG)
11	4127	2007	Goat	Abscess	Ilbono/Ogliastra (OG)
12	36,766-A 36,766-B 36,766-C	2007	Goat	Lung Brain Spleen	Loceri/Ogliastra (OG) Loceri/Ogliastra (OG) Loceri/Ogliastra (OG)
13	26,107	2008	Goat	Skin abscess	Lanusei/Ogliastra (OG)
14	42,144	2008	Goat	Milk	Ozieri/Sassari (SS)
15	49,770	2008	Goat	Abscess	Trei/Ogliastra (OG)
16	9476	2008	Goat	Brain	Villagrande Strisaili/Ogliastra (OG)
17	16,786	2008	Goat	Lung	San Nicola/Sassari (SS)
18	22,200	2008	Goat	Brain	Arzachena/Olbia-Tempio (OT)
19	54,204	2008	Goat	Lung	Osilo/Sassari (SS)
20	64,258	2008	Goat	Lung	Ossi/Sassari (SS)
21	14,750	2008	Goat	Lung	Tortolì/Ogliastra (OG)
22	36,065	2009	Goat	Brain/Lung	Siliqua/Cagliari (CA)
23	40,740	2009	Goat	Milk	Pauli Arborei/Medio Campidano (VS)
24	56,502	2009	Goat	Lung	Gonnosfanadiga/Medio Campidano (VS)
25	3940	2009	Goat	Lung	Tortolì/Ogliastra (OG)
26	14,667	2010	Goat	Brain	Lotzorai/Ogliastra (OG)
27	9500	2010	Goat	Milk	San Basilio/Cagliari (CA)
28	2280	2010	Goat	Milk	Silius/Cagliari (CA)
29	10,211	2010	Goat	Brain	Monteleone R.D/Sassari (SS)
30	10,010	2011	Goat	Brain	Nulvi/Sassari (SS)
31	14,349	2011	Goat	Lung	Martis/Sassari (SS)
32	17,537	2011	Goat	Lung	Nuoro/Nuoro (NU)
33	40,581	2011	Goat	Milk	Oristano/Oristano (OR)
34	20,426	2012	Goat	Lung	Ittiri/Sassari (SS)
35	10,298	2012	Goat	Joint fluid	Arzana/Ogliastra (OG)
PG3 Reference Strain					

ANALISI EPIDEMIOLOGICA

- Tutti i ceppi di *M. mycoides subsp. capri* sottoposti a **Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**

PFGE con *BnI* (Tardy et al., 2007)



35 isolati
33 pulsotipi

Stesso pulsotipo

14750-3940
13127-26107



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic



Proteomic approach for identification of immunogenic proteins of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*[☆]

L. Corona, G. Cillara, S. Tola *

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Poggiorelli", 07100 Sassari, Italy



Arricchimento delle lipoproteine con TX-114

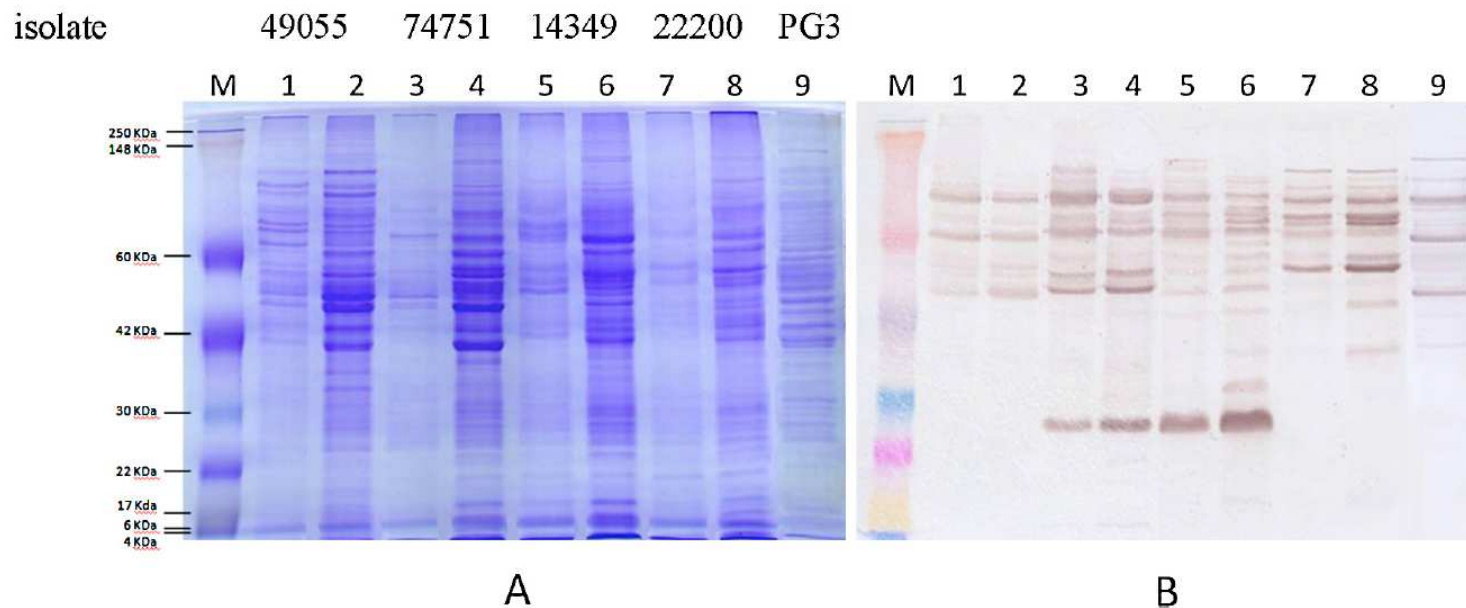
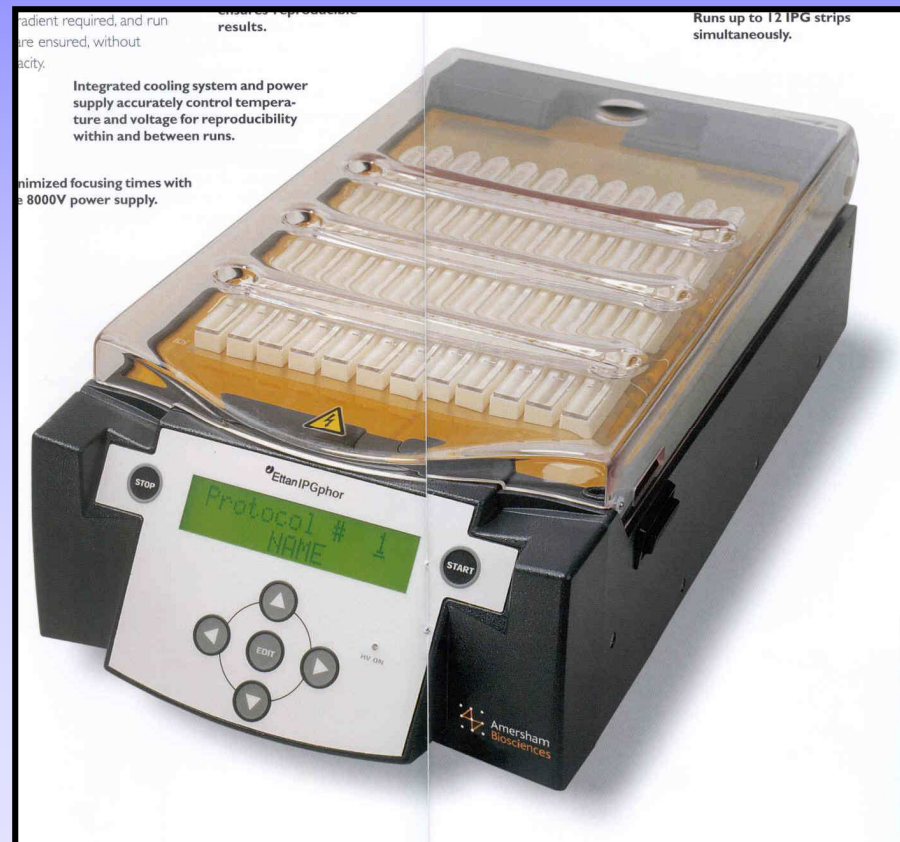
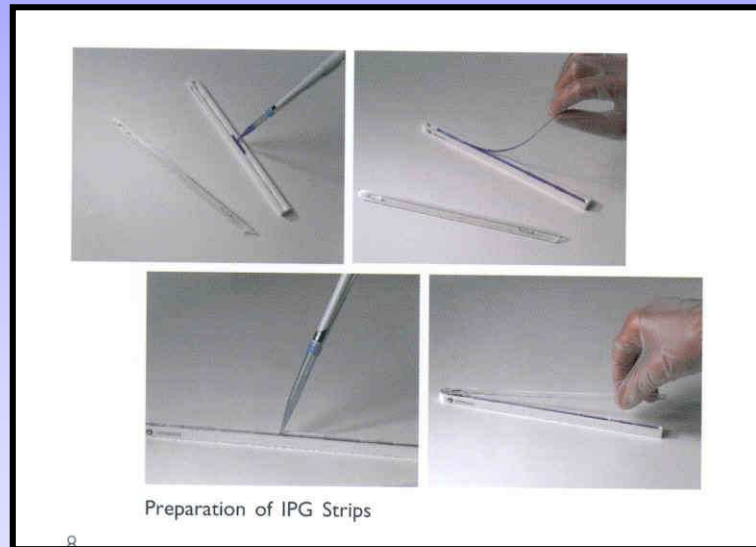


Fig. 1. SDS-PAGE and Western blot analysis of 4 *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* isolates and Reference strain PG3. (A) Comassie G-250-stained gel of whole cell proteins (lanes 1-3-5-7) and TX-114 phase proteins (lanes 2-4-6-8) from Mmc isolate 49055 (lanes 1-2), Mmc isolate 74751 (lanes 3-4), Mmc isolate 14349 (lanes 5-6) and Mmc isolate 22200 (lanes 7-8). Lane 9: whole cell proteins from Reference Strain PG3. (B) Western blot analysis of the same isolates and PG3 against pooled sera from naturally infected goats. The numbers on the left indicate the molecular weight standards (kDa).

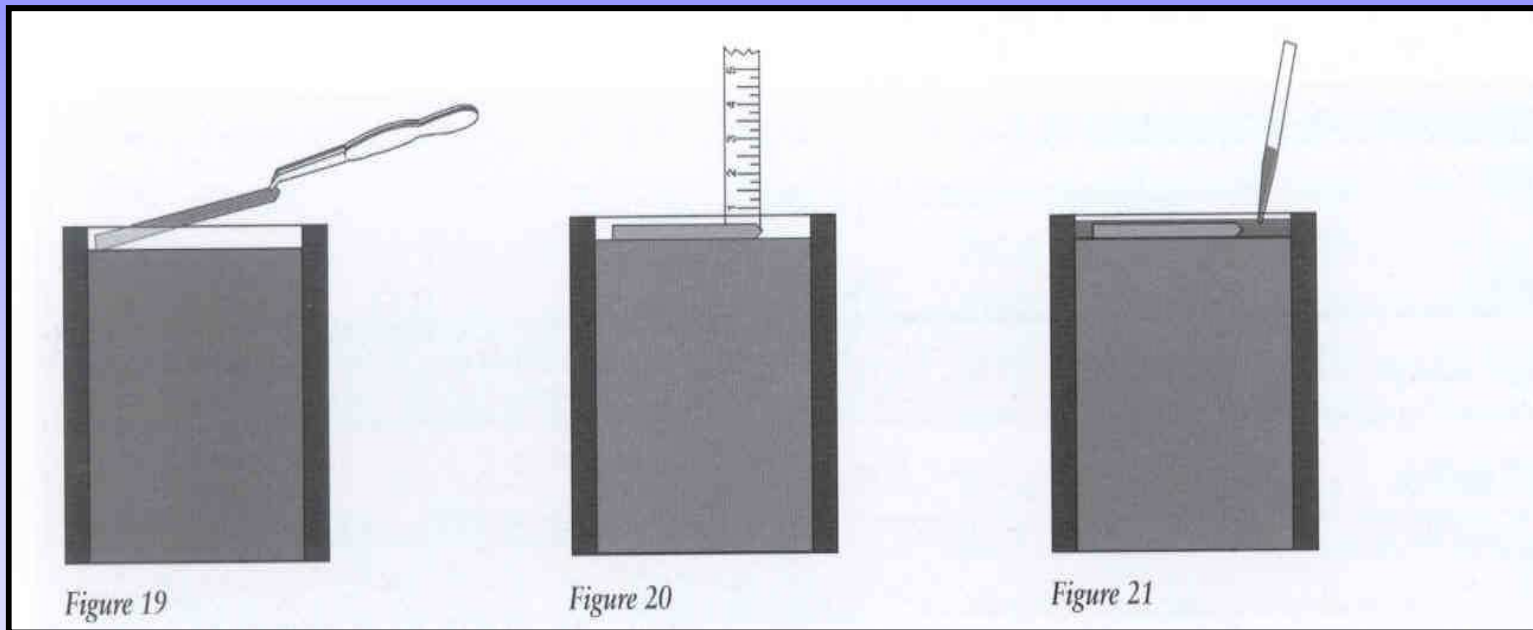
2D-Gel electrophoresis

Immobilized pH gradient (IPG) /prima dimensione

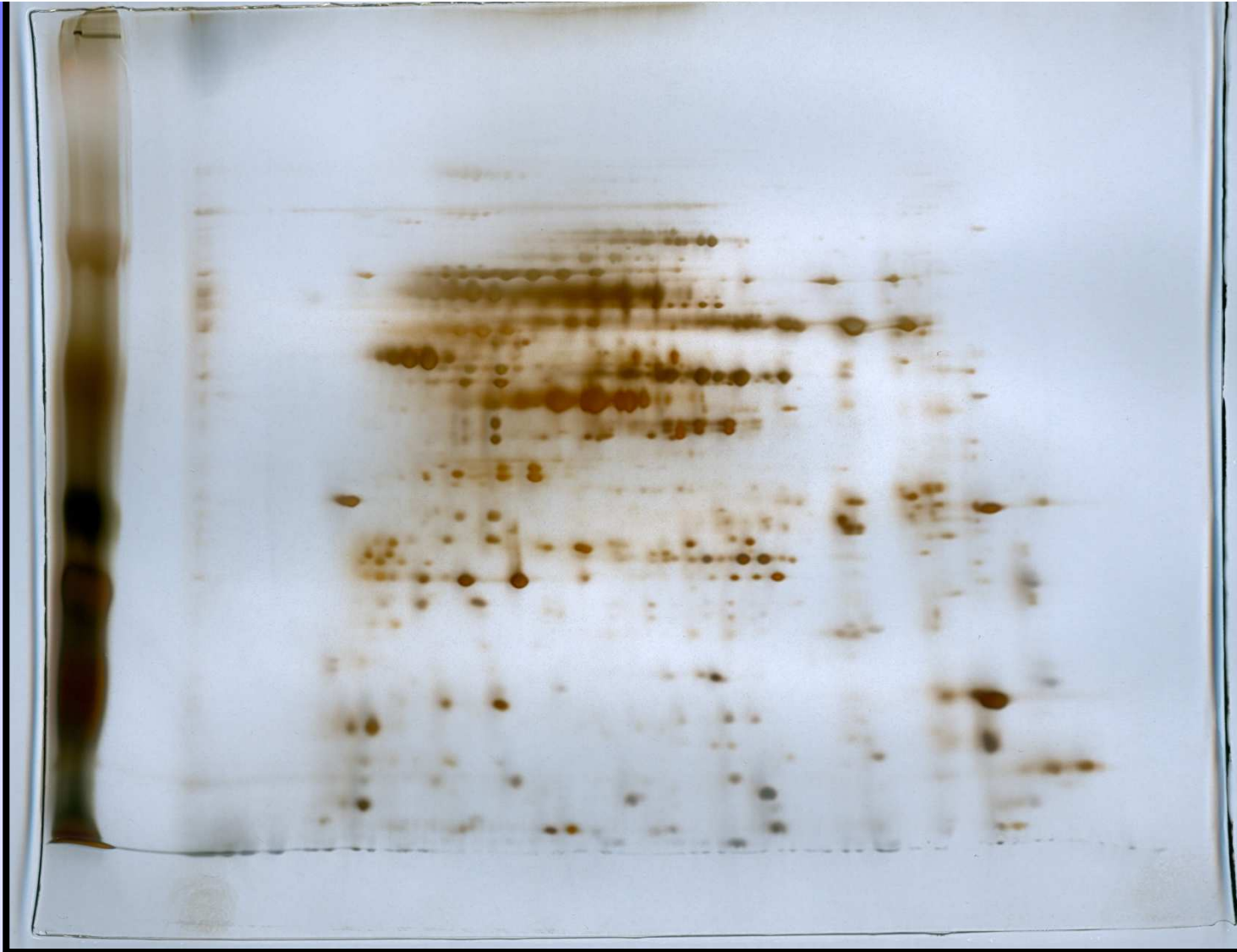


SDS-PAGE

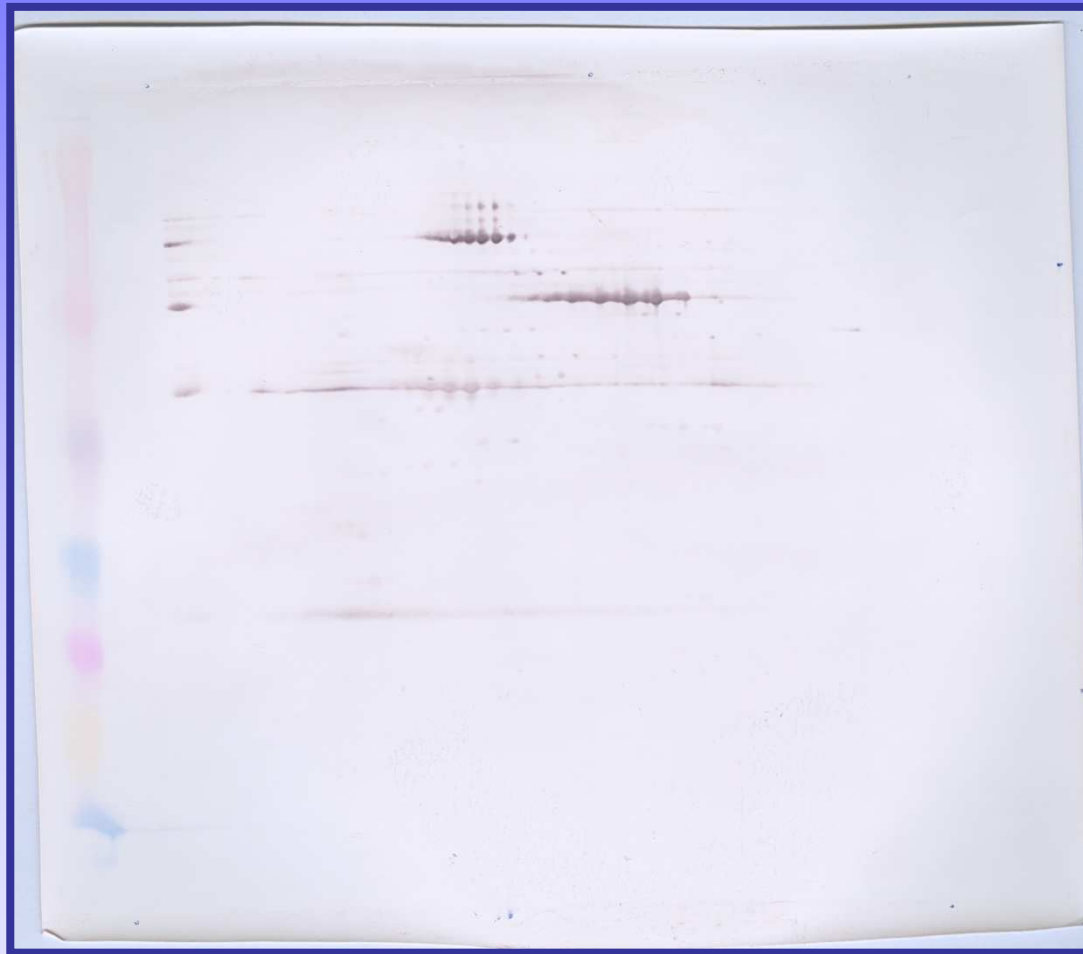
Seconda dimensione



2DE gel stained by MS compatible



Immunoblotting con sieri di capre infette naturalmente



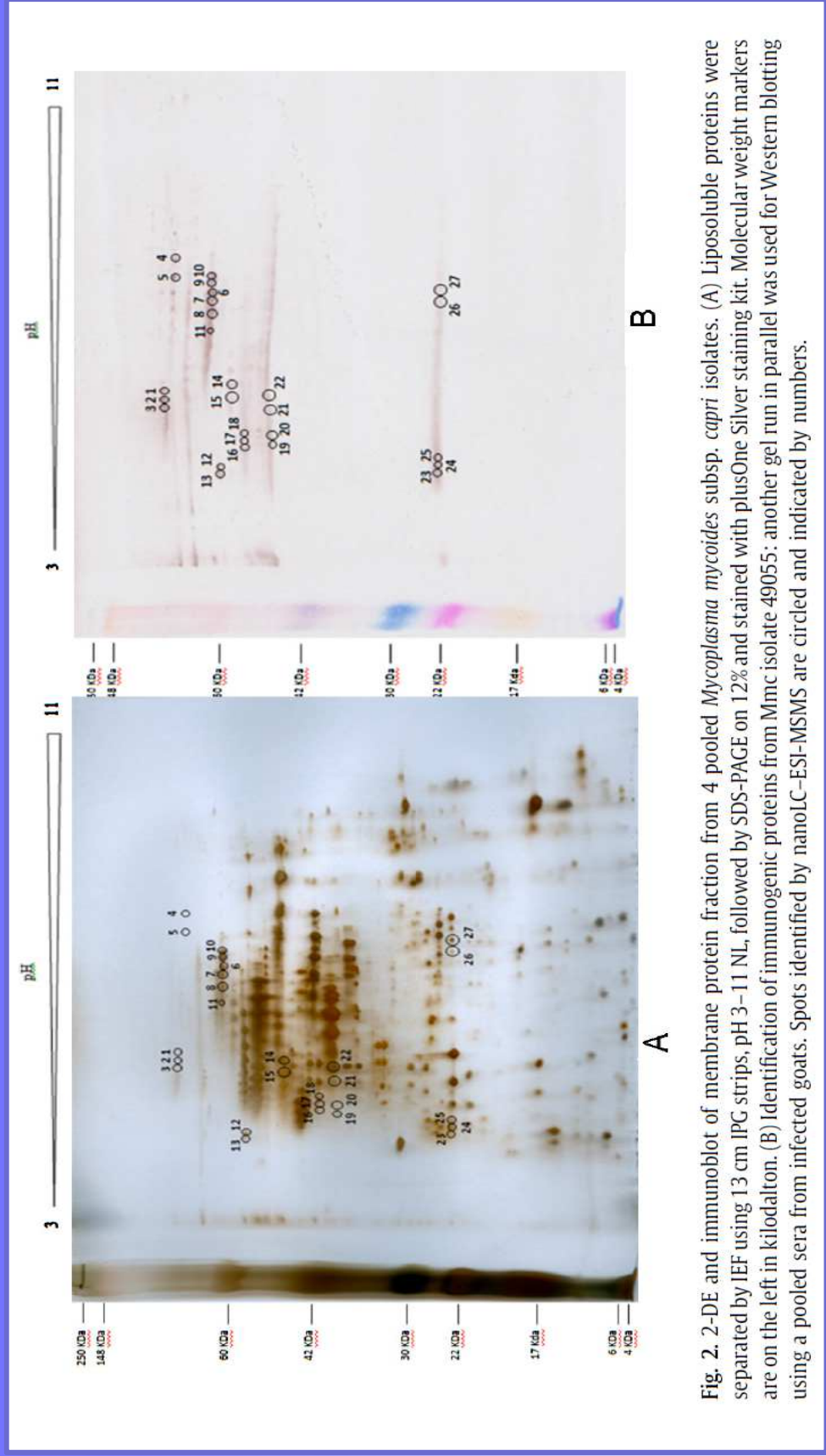
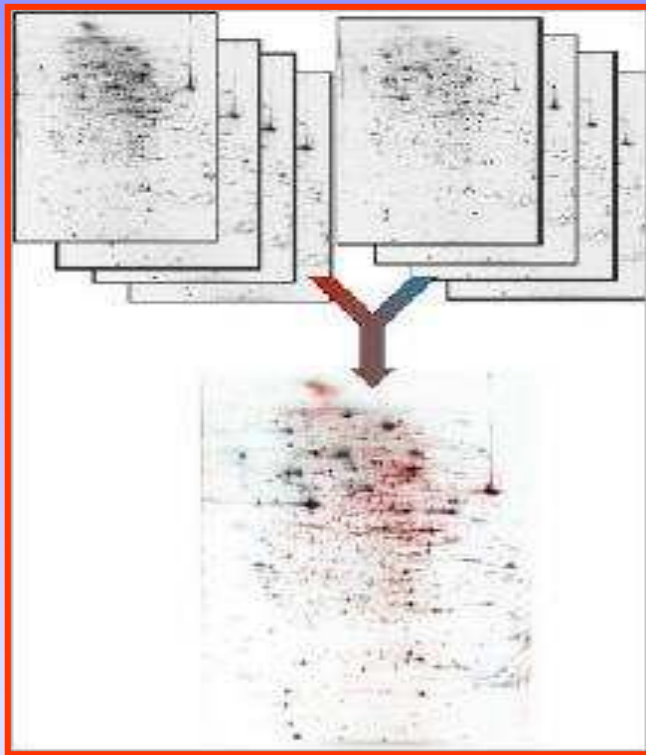


Fig. 2. 2-DE and immunoblot of membrane protein fraction from 4 pooled *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* isolates. (A) Liposoluble proteins were separated by IEF using 13 cm IPG strips, pH 3–11 NL, followed by SDS-PAGE on 12% and stained with plusOne Silver staining kit. Molecular weight markers are on the left in kilodalton. (B) Identification of immunogenic proteins from Mmc isolate 49055: another gel run in parallel was used for Western blotting using a pooled sera from infected goats. Spots identified by nanoLC-ESI-MS/MS are circled and indicated by numbers.

Sequenza degli spot proteici tramite nanoLC-ESI-MSMS



Proteome Factory

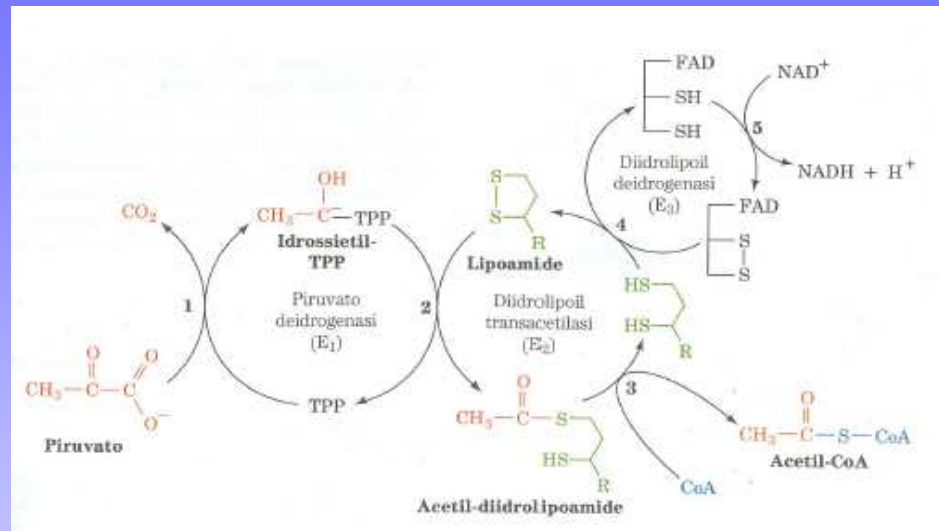
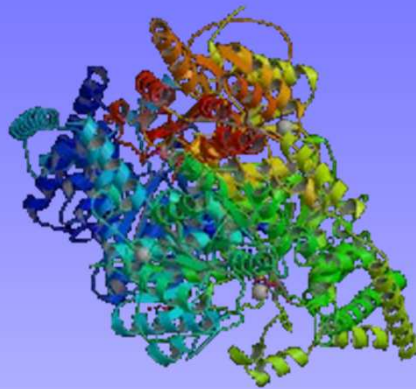
***Magnusstr. 11
D-12489 Berlin
Germany***

Table 1

Identification of immunoreactive proteins of 4 pooled *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* isolates using serum from naturally infected goats.

Spot no.	Protein name	NCBI ID	Species	pI	MW (kDa)	MASCOT score	Peptide match (sequence coverage, %)	PSORTb localization	PSORTb probability
1-2	Dihydrolipoyl dehydrogenase	gi 256385136	Mmc str. GM12	5.53	67.75	1739	30 (50%)	Cytoplasmic	9.97
3	Translation elongation factor G	gi 256383728	Mmc str. GM12	5.29	76.10	2202	53 (63%)	Cytoplasmic	9.97
4-5	Transketolase	gi 256384392	Mmc str. GM12	7.05	72.90	1338	30 (37%)	Unknown	-
6-7-8-9-10-11	Dihydrolipoamide acetyltransferase	gi 256384401	Mmc str. GM12	6.42	46.94	995	17 (36%)	Cytoplasmic	9.67
12-13	Trigger factor	gi 256384284	Mmc str. GM12	4.86	49.11	2667	40 (83%)	Cytoplasmic	7.50
14-15-16	Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring), alpha chain	gi 256384125	MmmSC GM12	5.47	41.87	1377	31 (53%)	Cytoplasmic	9.97
17-18	Phosphate acetyltransferase	gi 256383812	Mmc str. GM12	5.46	35.61	729	15 (43%)	Cytoplasmic	7.50
19-20	Phosphopyruvate hydratase	gi 256384154	Mmc str. GM12	5.32	49.47	647	11 (25%)	Cytoplasmic	9.97
21	Peptide methionine sulfoxide reductase	gi 42561299	MmmSC PG1	5.45	35.75	762	16 (40%)	Cytoplasmic	7.50
22	Translation elongation factor Ts	gi 256383861	Mmc str. GM12	5.47	32.57	986	18 (56%)	Cytoplasmic	9.97
23-24	Inorganic diphosphatase	gi 256384354	Mmc str. GM12	4.92	21.44	759	19 (49%)	Cytoplasmic	9.97
25	FMN-dependent NADH-azoreductase	gi 256383765	Mmc str. GM12	5.48	22.29	707	14 (53%)	Cytoplasmic	7.50
26-27	Adenine phosphoribosyltransferase	gi 256384269	Mmc str. GM12	6.29	19.26	513	10 (37%)	Cytoplasmic	9.97

PDC- Complesso della Piruvato deidrogenasi



Molecular Microbiology (2002) 46(4), 1041–1051

Elongation factor Tu and E1 β subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*

Shatha F. Dallo,[†] T. R. Kannan,[‡] Mark W. Blaylock and Joel B. Baseman^{*}
Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX-78229, USA.

INFECTION AND IMMUNITY, July 2008, p. 3116–3123
0019-9567/08/\$08.00+0 doi:10.1128/IAI.00173-08
Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 76, No. 7

The Surface-Exposed Carboxyl Region of *Mycoplasma pneumoniae* Elongation Factor Tu Interacts with Fibronectin^V

Sowmya Balasubramanian, T. R. Kannan, and Joel B. Baseman^{*}

Department of Microbiology and Immunology, The University of Texas Health Science Center at San Antonio,
7703 Floyd Curl Drive, MC 7758, San Antonio, Texas 78229-3900

a) Identificazione mediante PCR

Species	Primers	Fragment size (bp)	Reference
<i>M. mycoides</i> cluster	P1: 5'-TATATGGAGTAAAAAGAC -3' P2 : 5'-AATGCATCATAAATAATTG-3'	258	Hotzel et <i>al.</i> , 1996
Mmc	P4: 5'-ACTGAGCAATTCCTCTT-3' P6: 5'-TTAATAAGTCTCTATATGAAT-3'	220	Hotzel et <i>al.</i> , 1996
<i>M. mycoides</i> cluster	MMMLC2-L: 5'-CAATCCAGATCATAAAAAACCT-3' MMMLC1-R: 5'-CTCCTCATATTCCCCTAGAA-3'	1,047	Monnerat et <i>al.</i> , 1999
<i>M. mycoides</i> cluster	FusA-F: 5'-TGAAATTTTATAGATGGTGGAGAA-3' FusA-R: 5'-GGTAATTTAATAGTTTCACGATATGAA-3'	781	Manso-Silvan et <i>al.</i> , 2007



Short Communication

Discrimination between *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* using PCR-RFLP and PCR

Grazia Cillara, Maria Giovanna Manca, Carla Longheu, Sebastiana Tola *

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna G. Puggioni, 07100 Sassari, Italy



Scelta del gene

dihydrolipoyl dehydrogenase (*lpdA*)

- **Allineamento** sequenze *Mmc* GM12 (NCBI, nucleotide ID 256385136) e *Mcc* ATCC 27343 (NCBI, nucleotide ID 83319253:275328-277217) tramite **EMBOSS pairwise alignment algorithm**

Table 1
Oligonucleotide primers used in this study.

Target	Sequence	Fragment size (bp)	Reference
<i>fusA</i>	FusA-F: 5'-TCAAATTTTACATGCTGGACAA-3'	781	Manso-Silvan et al., 2007
	FusA-R: 5'-GGTAATTAAATAGTTTCAGGATATGAA-3'		
<i>lpdA</i>	<u>LPD-CL-F:</u> 5'-AGGTGAAGCTGTTGCTTTAG-3'	911	This study
	<u>LPD-CL-R:</u> 5'-TTCCAATAATATGTGCACCTAA-3'		
	<u>LPD-F:</u> 5'-CGATGGAAAAGATCAATGG-3'		
<i>lpdA</i>	<u>LPD-R:</u> 5'-TTGTGTTCAGTTTTTCCT-3'	362/281	This study

Zona conservata

Zona variabile

PCR applicata ai ceppi di referenza

- PG3 *Mycoplasma mycoides* sp. *capri*
- PG1 *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*
small-colony type
- PG50 *Mycoplasma leachii*
- CK *Mycoplasma capricolum* California Kid
- F38 *Mycoplasma capricolum* subsp.
capripneumoniae

PCR-RFLP

911 bp

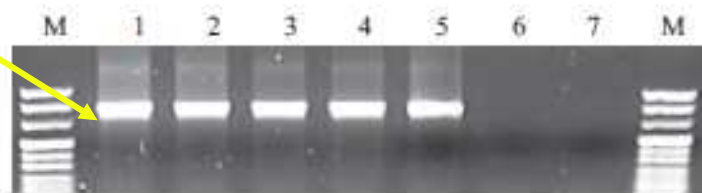


Fig. 1. PCR profile of the dihydrolipoyl dehydrogenase (*lpdA*) gene obtained from seven *Mycoplasma* reference strains. Amplification conditions were initial denaturation for 5 min at 95 °C followed by 30 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 56 °C, and 1.5 min at 72 °C with a final extension step of 10 min at 72 °C. Amplicons were resolved by electrophoresis in 1% agarose gels, stained with SybrSafe DNA gel stain (Invitrogen). Type and reference strains: Lane 1, *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC type; lane 2, *M. capricolum* subsp. *capricolum* CK^T; lane 3, *M. mycoides* PG^T; lane 4, *M. bovine* group 7 PG50; lane 5, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* F38; lane 6, *M. agalactiae* PG2T and lane 7, *M. putrefaciens* KS1T. Lane M, marker VIII (Roche).

Legenda:

- 1- PG3
- 2- CK
- 3- PG1
- 4- PG50
- 5- F38
- 6- PG2
- 7- KS1

PCR-RFLP: zona conservata

❖ Sequenza degli amplificati

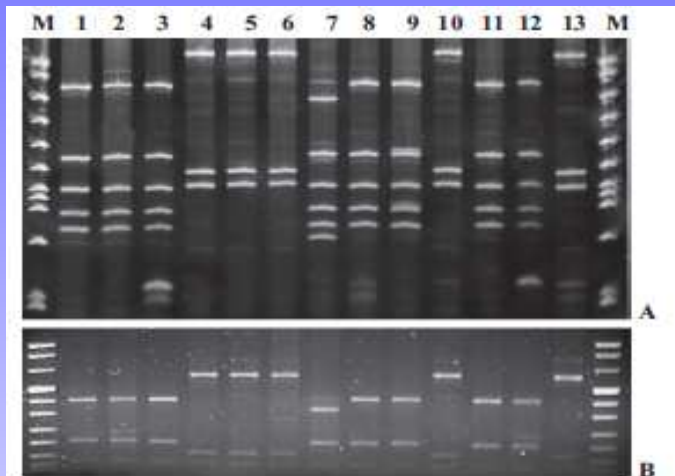
❖ Scelta degli enzimi mediante digestione *in silico* con
<http://www.restrictionmapper.org/>



- FastDigest **PstI**
- FastDigest **SspI**
- FastDigest **EcoRI**
- FastDigest **Clal**

15 min a 37°C

PCR-RFLP: zona conservata



Legenda:

1,2,3,7,8,9,11,12

M. capri

4,5,6,10,13

M. capricolum

78 isolati

27

M. capricolum

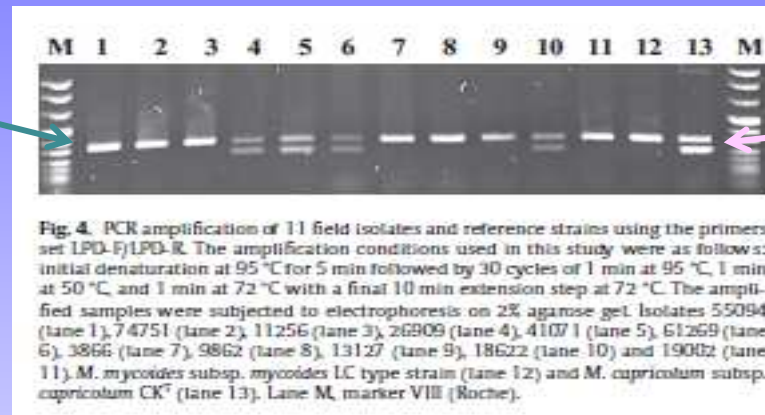
51

M. capri



PCR single tube: zona variable

M. capri



M. capricolum

Single tube PCR

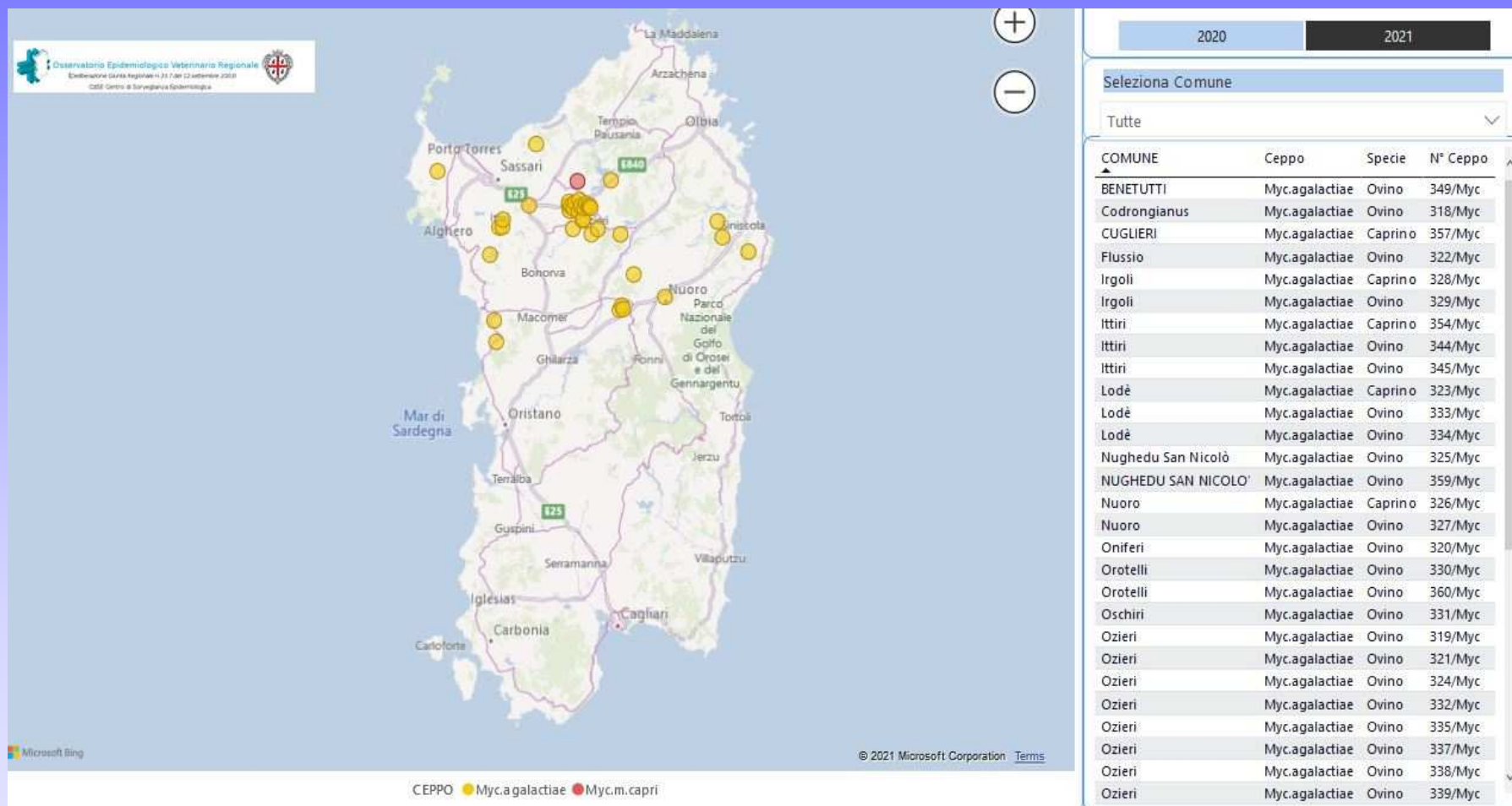
Dal 2020 nel sito dell'IZS Sardegna pubblichiamo le mappe interattive dei ceppi di micoplasmi utilizzati per la preparazione dei vaccini stabulogeni

Aggiornamento al 31 Agosto 2021 delle mappe interattive per localizzare nel territorio regionale i focolai infettivi

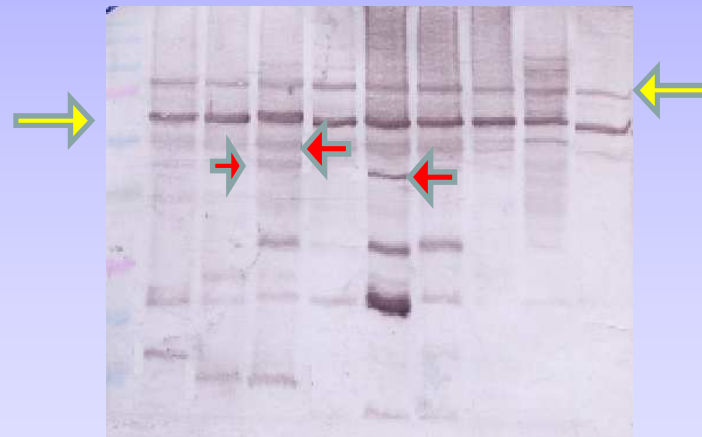
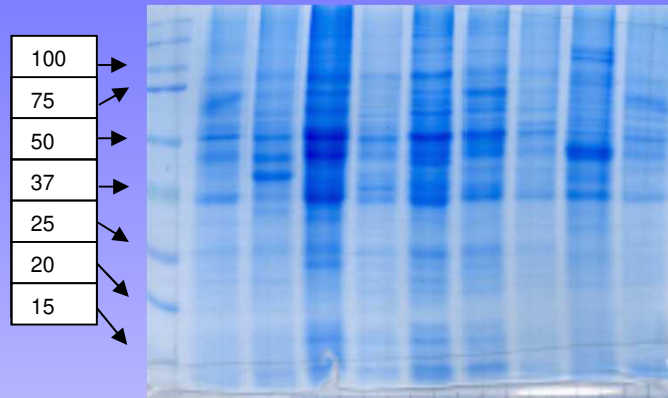
Aggiornamento al 31-08-2021 delle mappe interattive per localizzare nel territorio regionale i focolai di agalassia contagiosa, di mastite stafilococcica e streptococcica, di colibaccilosi, di pasteurellosi e di salmonellosi.

- Mappa interattiva: [Micoplasmi isolati in Sardegna nel 2020-2021](#)
- Mappa interattiva: [Staphylococcus aureus isolati in Sardegna nel 2020-2021](#)
- Mappa interattiva: [Stafilococchi coagulasi negativi isolati in Sardegna nel 2020-2021](#)
- Mappa interattiva: [Streptococchi isolati in Sardegna nel 2020-2021](#)
- Mappa interattiva: [Salmonella abortusovis isolati in Sardegna nel 2020-2021](#)
- Mappa interattiva: [Pasteurella e Mannheimia isolati in Sardegna nel 2020-2021](#)
- Mappa interattiva: [Escherichia coli isolati in Sardegna nel 2020-2021](#)

MAPPA INTERATTIVA MICOPLASMI



1) Individuazione delle proteine immunogeniche costanti e variabili



2) Sequenza aminoacidica delle proteine



Mascot Search Results

Protein View

Match to: [gi|526880545](#) Score: 2539
trigger factor [*Mycoplasma mycoides*]
Found in search of E:\mgf\LTQ_151103B_IZS_Sample3.mgf
Nominal mass (M_r): 49110; Calculated pI value: 4.86
NCBI BLAST search of [gi|526880545](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Deamidated (NQ), Oxidation (M), Phospho (ST)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR
Sequence Coverage: 68%

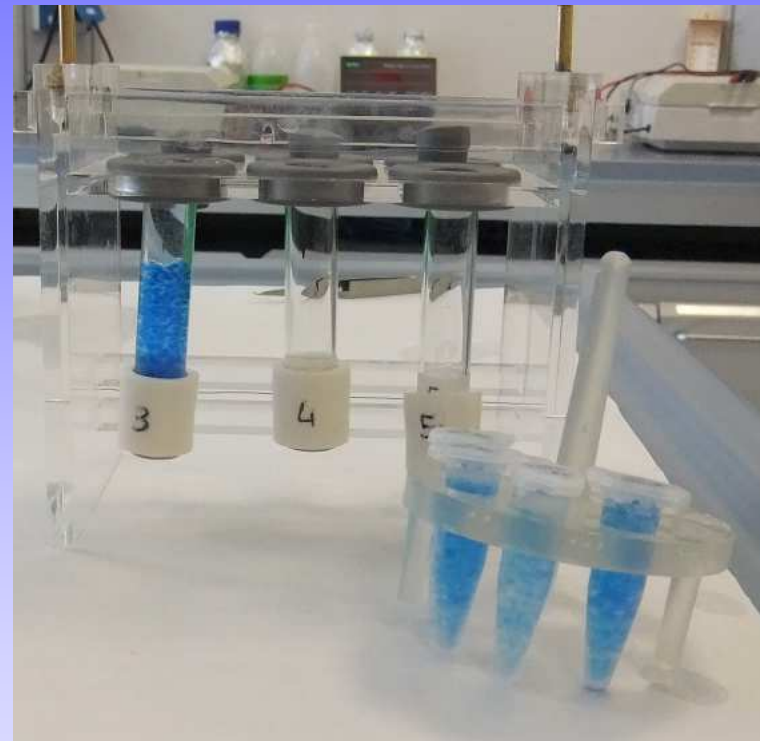
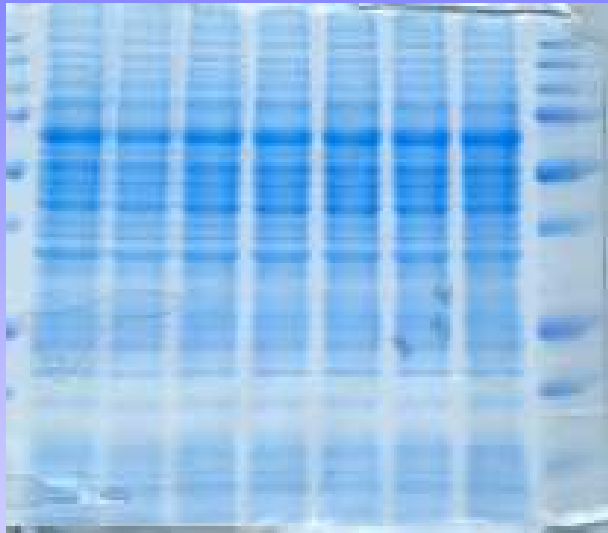
Matched peptides shown in **Bold Red**

1	MIFAQEK FVD	QGQGWTVTI	QDDQWTEFLK	KAKNRLKANL	VVPGFRKGKA
51	PESETAKYLT	PIKIYNEAFK	IVVKPAFDFA	LSQENKIQND	NSPTPVIVKV
101	SDKEIVIDFI	FDLVLELVKG	EYKNITTVKK	PVVEVNQEDV	DNVIDMYRSR
151	FAMQKEKQAD	DQIQKGDIVT	FDFKGYVDDQ	AFEGGEAKDF	VLEIGSNQFV
201	PGFEDSMIGL	KVGENQEINV	KFPPEYIPSL	AGKDAKFVLN	IKNIKEKILP
251	AKDDELVKDL	NLPDITTYEQ	LEQKVKQDVL	EQKTKISKSE	FVESIIDEII
301	KNSEFQIPKT	IIERQIKDVK	KEFEDQLAQQ	KITLDKYKEI	TKITQEEIDE
351	ELKSDATHRI	KSFLVASEIK	NKENIVASEE	AINAKFEEFA	NLYGIEAEKI
401	KSLIDNQAIK	HQVESELLET	FIFENNGN		

2) Sequenza aminoacidica delle proteine

Band N°	Protein name	NCBI ID	Species	pI	MW (kDa)	MASCOT score	Peptide match (sequence coverage, %)	PSORTb localization	PSORTb probability
1	Elongation factor G	gi 256383728	<i>Mmc</i> str. GM12	5.29	76.10	2202	53 (63%)	<i>Cytoplasmic</i>	9..97
2	Trigger factor	gi 256384284	<i>Mmc</i> str. GM12	4.86	49.11	2667	32 (68%)	<i>Cytoplasmic</i>	9.67
3	Branched-chain alpha-keto dehydrogenase subunit E2	gi 516294668	<i>Mmm</i> SC	6.42	47.14	995	20 (48%)	<i>Cytoplasmic</i>	9.67
4	Acetate kinase	gi 503494753	<i>Mmm</i> SC	5.90	44.36	1276	12 (59%)	<i>Cytoplasmic</i>	9.67
5	Pyruvate dehydrogenase Subunit alpha	gi 256384125	<i>Mmm</i> SC	5.47	41.87	1377	31 (53%)	<i>Cytoplasmic</i>	9.97

Concentrazione delle proteine immunogeniche



Sperimentazione animale: ai sensi dell'art. 31 del D. Lgs 26/2014

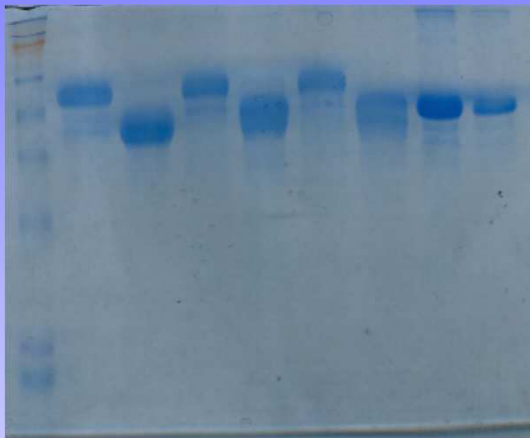
- **Produzione di sieri positivi per l'allestimento di un Kit ELISA.**
 - ❖ Sieri iperimmuni anti-singole proteine
 - ❖ Sieri da infezione sperimentale anti-Mmc/Mcc e *M. putrefaciens*



Il Ministero della Salute DGSAF ha concesso l'autorizzazione n° 1265/2015-PR in data 09-12-2015.

Sieri anti-singole proteine

M 1 2 3 4 5 6 7 8

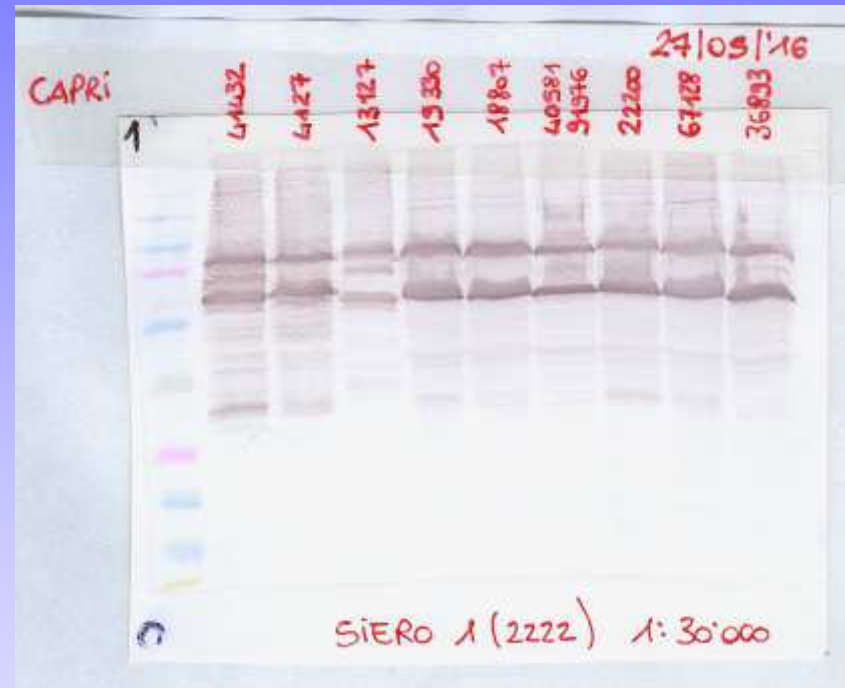


- ❖ 1, 3, 5 = Elongation Factor
- ❖ 4,6,7,8= Trigger factor
- ❖ 2 = Branched-chain alpha-keto dehydrogenase subunit E2

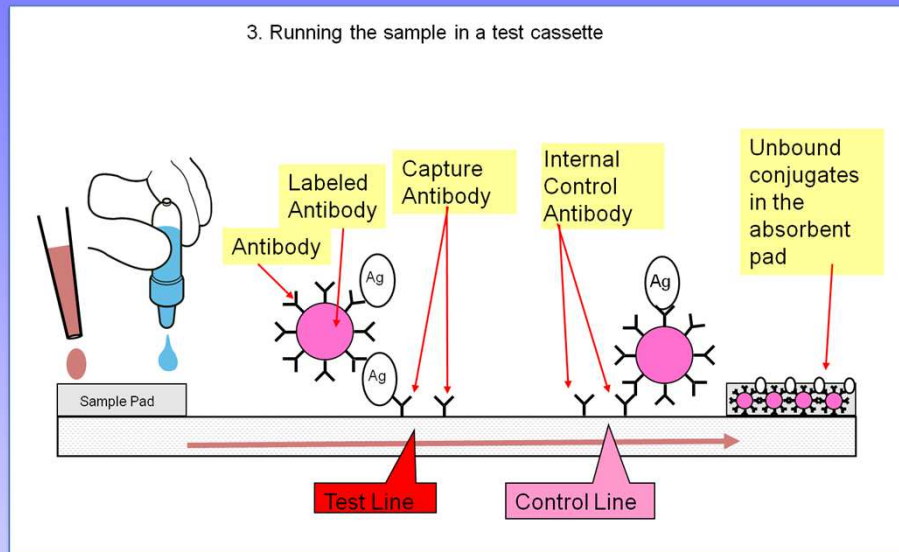


Dr. Gavino Marogna-IZS- Veterinario responsabile dell'esecuzione degli esperimenti

Siero iperimmune anti-EF



Diagnosi rapida di AC mediante Lateral Flow



**Prospettive
future**



Realizzazione «*home-made*»

- Disegnare un supporto adatto alle nostre esigenze
- Produrlo con una stampante 3D a filamento termo-fondibile
- Usare prodotti come l'acido polilattico (PLA) che, in base alle norme EN 13432, è **completamente biodegradabile e compostabile**



Grazie
per l'attenzione!