

## TECNOLOGIE INNOVATIVE PER LA RICERCA E LA DIAGNOSTICA IN CONIGLICOLTURA

Fabrizio Agnoletti

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Treviso  
fagnoletti@izsvenezie.it

EFSA  
ECDC  
EMEA  
EC



COSTI DI  
PRODUZIONE  
NORMATIVE SUL  
BENESSERE  
etc.... etc.....

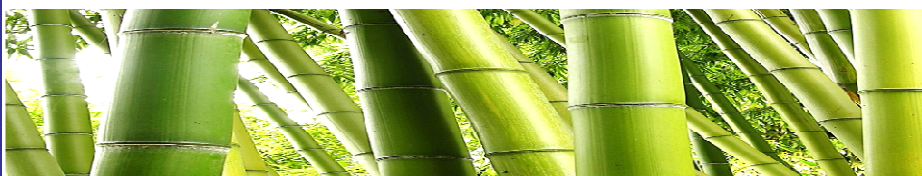


INCOGNITE PER LA CONIGLICOLTURA

### QUALI STRATEGIE, NON SOLO PER LA SOPRAVVIVENZA, MA ANCHE PER LO SVILUPPO?

- miglioramento del management e della produttività
- igiene e biosicurezza
- minori densità
- maggior benessere
- modelli alternativi di allevamento
- strategie di marketing e trasformazione del prodotto
- prebiotici, probiotici, acidificanti, oli essenziali, enzimi

.....  
**ma anche modulazione della flora intestinale**





### MODULAZIONE DELLA FLORA INTESTINALE

Combes S., Fortun-Lamothe L., Cauquil L., Gidenne T. 2011., *Piloter l'écosystème digestif du lapin: pourquoi, quand et comment? In Proc.: 14° Journées de la recherche cunicole, 22-23 November 2011, Le Mans, France, 33-48.*



- Batteri:  $1 \times 10^{11}$ - $10^{12}$  ufc/g
- Batteri archei:  $1 \times 10^7$  ufc/g
- Lieviti:  $1 \times 10^6$  ufc/g
- Protozoi
- **80-90% delle sequenze batteriche trovate nel cieco non sono state identificate dalle banche dati disponibili**



Convegno ASIC « Nuove sfide sanitarie nella conigliicoltura moderna » - Treviso, 20 aprile 2012




**Enormi possibilità di indagine**



**Difficoltà di indagine e scarse possibilità di ricadute pratiche nel breve-medio periodo**

Convegno ASIC « Nuove sfide sanitarie nella conigliicoltura moderna » - Treviso, 20 aprile 2012

**COME MUOVERSI IN QUESTA CONOSCENZA NEBULOSA?**

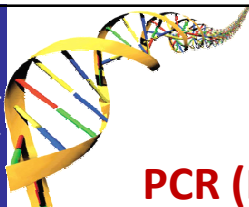


**NON CONOSCIAMO TUTTI I MICRORGANISMI CHE COLONIZZANO IL CIECO DEL CONIGLIO ....**

**MA NE CONOSCIAMO ALCUNI E CONOSCIAMO I PATOGENI**

## 1° ESEMPIO

# Monitoraggio di famiglie/generi/specie batteriche target mediante *real-time* PCR

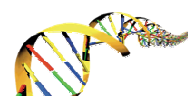


## PCR (Polymerase Chain Reaction)

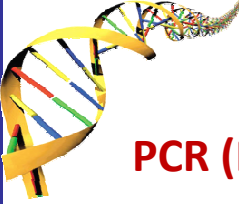
### amplificazione di una sequenza target di DNA

A cosa serve?

- Rilevare la presenza di materiale genetico appartenente a un determinato microrganismo
- Rilevare la presenza di specifici geni (es. fattori di virulenza, geni predisponenti la resistenza agli antibiotici...etc)



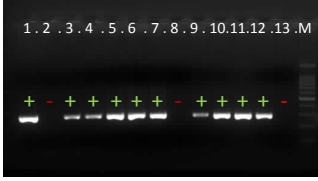
Convegno ASIC « Nuove sfide sanitarie nella coniugolitura moderna » - Treviso, 20 aprile 2012



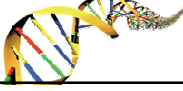
## PCR (Polymerase Chain Reaction)

- non e' quantitativa
- solo presenza/assenza del frammento di DNA ricercato!
- specifica ma non molto sensibile

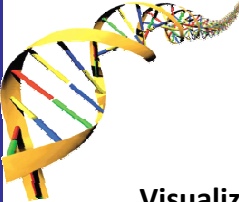
Campione



RISULTATO:  
1,3,4,5,6,7,9,10,11,12 **POSITIVI**  
2,8,13 **NEGATIVI**



Convegno ASIC « Nuove sfide sanitarie nella coniugolitura moderna » - Treviso, 20 aprile 2012

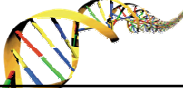


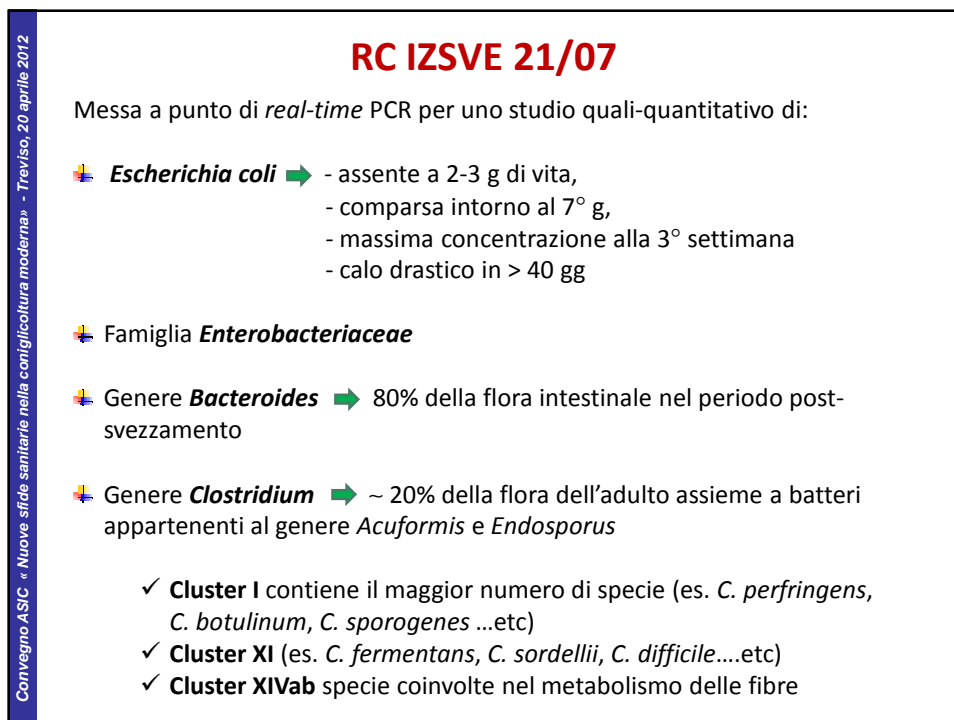
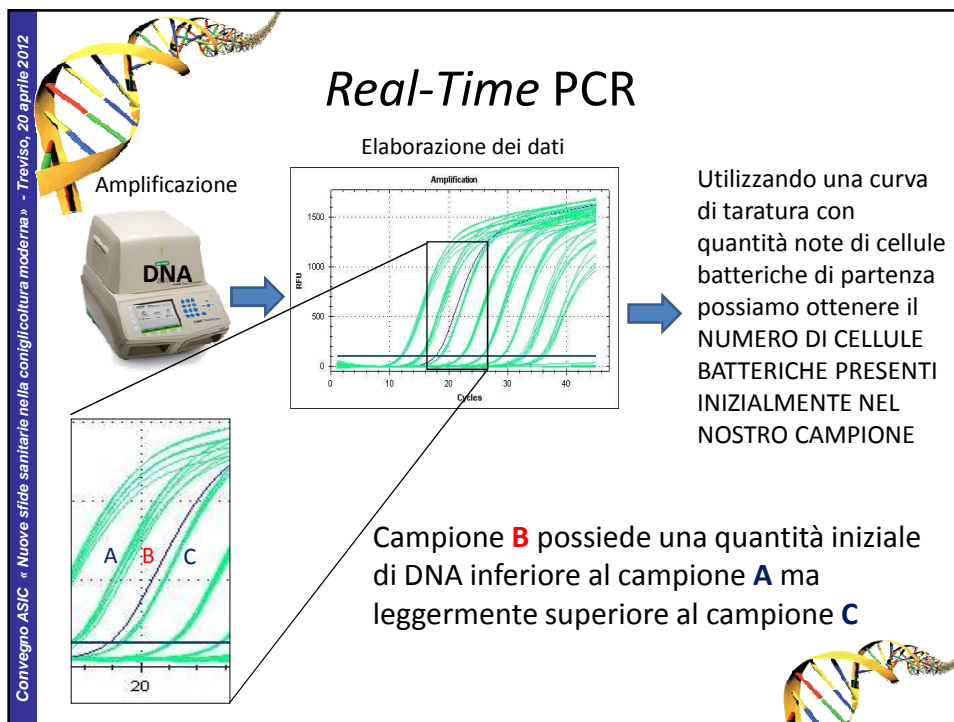
## Real-Time PCR

### Visualizzazione in tempo reale dell'amplificazione

“Tempo” di comparsa dell'amplificazione proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione!

- PRESENZA/ASSENZA della sequenza ricercata
- SPECIFICA
- **MOLTO SENSIBILE:** rilevazione di piccole quantità iniziali di DNA target
- **QUANTITATIVA:** si può risalire alla quantità iniziale di materiale





**-FASI-****1.MESSA A PUNTO DELL'ESTRAZIONE DEL DNA DA CONTENUTO CIECALE**

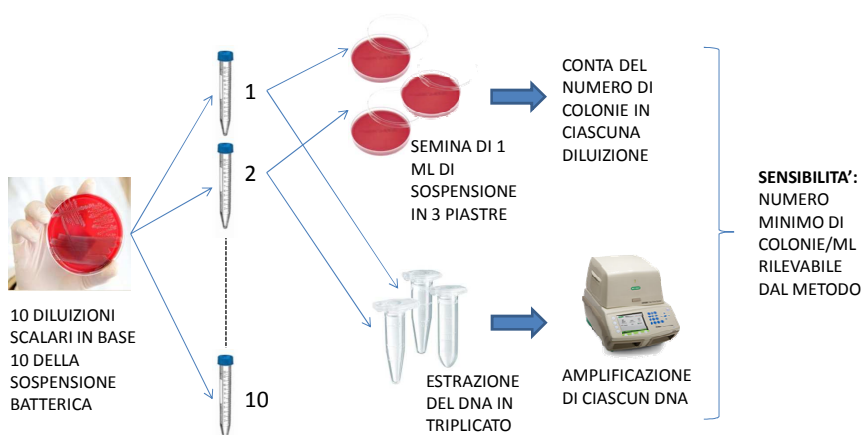
**2.MESSA A PUNTO DEI PROTOCOLLI DI REAL TIME-PCR.** Valutazione delle condizioni ottimali di amplificazione attraverso l'utilizzo di controlli positivi

**3.VALUTAZIONE DELLA SPECIFICITA' DELLA METODICA.** Attraverso l'utilizzo di un pannello di 40 ceppi sia di riferimento che di campo isolati nel laboratorio

- ✓ PROVE DI INCLUSIVITA'- amplificazione presente per tutti i microrganismi appartenenti al genere/specie ricercato
- ✓ PROVE DI ESCLUSIVITA'- amplificazione presente SOLO nei microrganismi appartenenti alla genere/specie ricercato

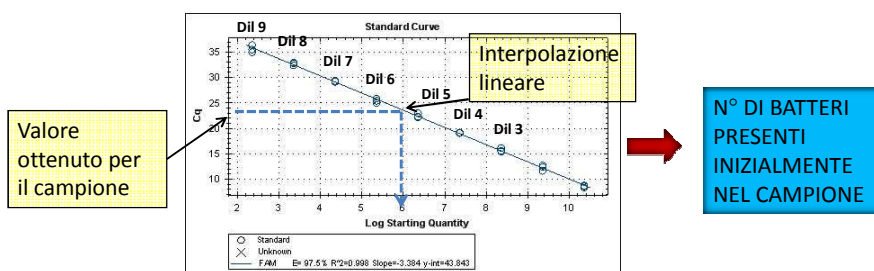
**4. VALUTAZIONE DELLA RIPETIBILITA' DEL METODO.**

Esecuzione delle prove in triplicato utilizzando tre diverse concentrazioni di DNA controllo positivo

**5. VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITA' DEL METODO.**

## 6. CREAZIONE DELLA CURVA DI TARATURA PER LA QUANTIFICAZIONE IN UN CAMPIONE IGNOTO

- Estrazione del DNA in triplicato da diluizioni a concentrazione nota di microorganismo
- amplificazione di ciascun DNA in triplicato (9 dati per diluizione)
- Creazione di una retta di taratura  $\Rightarrow$  il ciclo a cui si osserva l'amplificazione è correlato al numero di batteri presenti nel campione

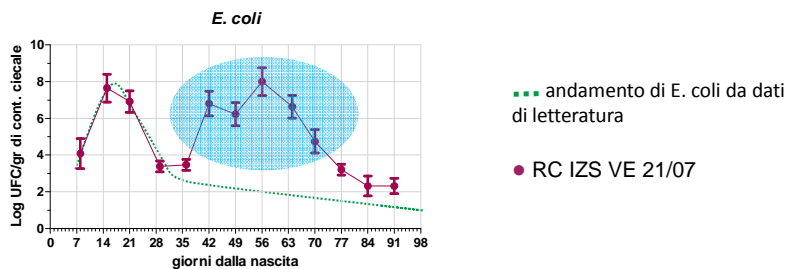


## Applicazione delle metodiche ad uno studio di campo

- CAMPIONI.** 130 contenuti ciecali da animali sani sacrificati a 8, 15, 21, 29, 36, 42, 49, 56, 64, 70, 77, 84 e 91 giorni dalla nascita (10 animali per gruppo)
- ALLEVAMENTO.**
- Estrazione del DNA in dupplicato e amplificazione in triplicato (6 dati per campione), quantificazione di:
  - ✓ *Escherichia coli* e famiglia *Enterobacteriaceae*
  - ✓ *Bacteroides spp*
  - ✓ *Clostridium spp* : cluster I, XI e XIVab

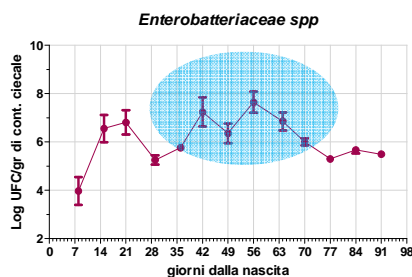


### -STUDIO DI CAMPO- Quantificazione di *Escherichia coli*



- ✓ Nei soggetti fino ai 35 giorni di vita i dati sono perfettamente concordanti con quanto riportato in letteratura
- ✓ 42-63 giorni aumento della concentrazione  $\Rightarrow$  comparsa di patologia enterica concomitante al cambiamento del regime alimentare

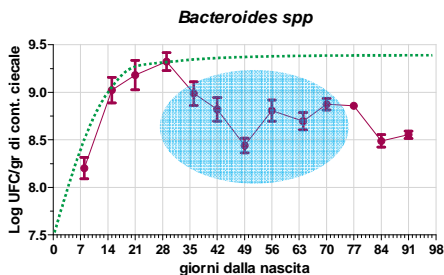
### -STUDIO DI CAMPO- Quantificazione di batteri appartenenti alla famiglia *Enterobacteriaceae*



- ✓ Risultato sovrapponibile a quanto ottenuto per *E. coli*  $\Rightarrow$  enterobatteriacee maggiormente presente nel cieco?

### -STUDIO DI CAMPO- Quantificazione di batteri appartenenti genere *Bacteroides*

RC IZS  
VE  
21/07



--- andamento dei batteri del genere *Bacteroides* da dati di letteratura

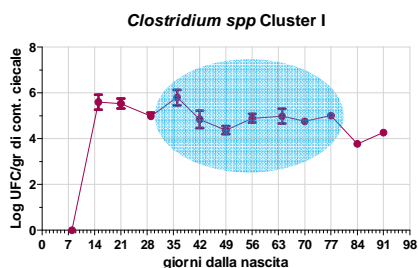
● RC IZS VE 21/07

80% della flora  
ciecale di un  
soggetto adulto  
sano

- ✓ Presente già in elevate quantità a partire dai 7 giorni
- ✓ Aumento costante fino ai 28 giorni di vita
- ✓ Calo dopo i 30 giorni concomitante con la comparsa di patologia enterica ⇒ alterazione del normale microbiota ciecale?

### -STUDIO DI CAMPO- Quantificazione di batteri appartenenti al genere *Clostridium cluster I*

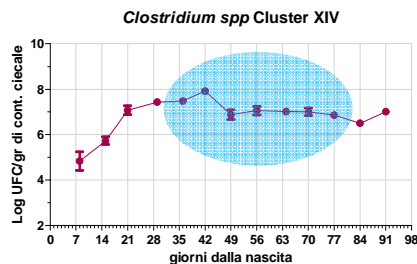
RC IZS  
VE  
21/07



- ✓ Assenti in tutti soggetti di 7 giorni di vita ⇒ da dati di letteratura presenti solo nel post-svezzamento
- ✓ 14-91 settimane: meno rappresentati del genere *Bacteroides*  $10^6$  vs  $10^9$  dato concordante con quanto riportato in letteratura
- ✓ Lieve calo dopo i 30 giorni di vita ⇒ alterazione della flora?  
⇒ patologia enterica non causata da Clostridium Cluster I

RC IZS  
VE  
21/07

**-STUDIO DI CAMPO-**  
**Quantificazione di batteri appartenenti al genere**  
***Clostridium cluster XIV***



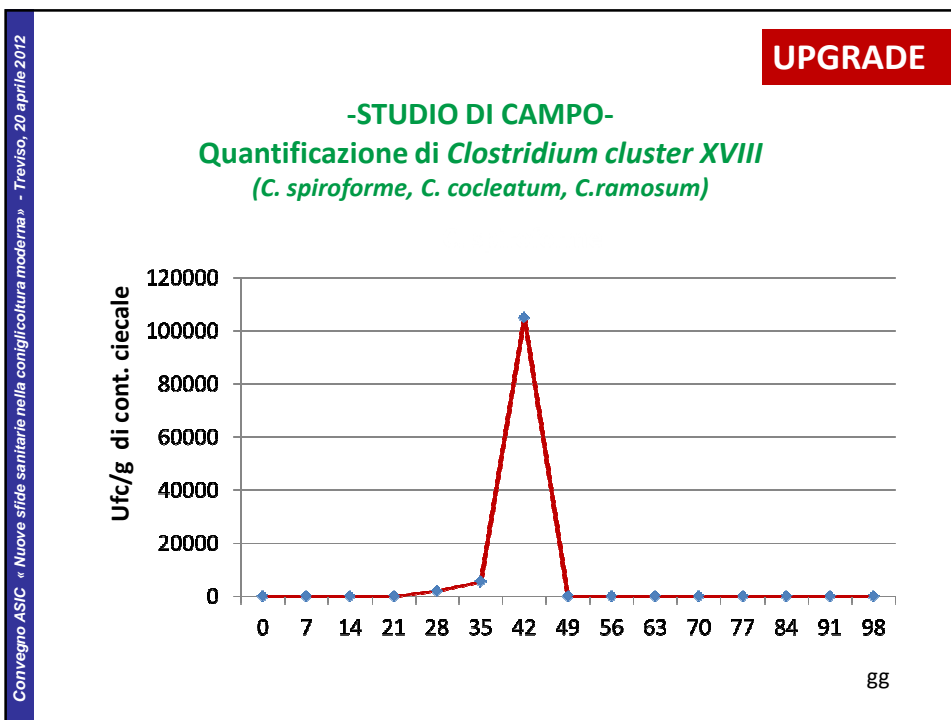
- ✓ Presenti fin dai primi 7 giorni di vita
- ✓ In costante aumento fino ai 40 giorni
- ✓ Lieve calo della concentrazione concomitante alla comparsa di problemi enterici

RC IZS  
VE  
21/07

**-STUDIO DI CAMPO-**  
**Quantificazione di batteri appartenenti al genere**  
***Clostridium cluster XI***

- ✓ No trend di distribuzione ⇒ carica batterica altamente variabile tra i 10 soggetti di ogni gruppo
- ✓ Interpretazione dei dati mirata al singolo soggetto con supporto dell'esame autoptico/ batteriologico

| Età (giorni) | Negativi/totale (%) | Positivi/totale (%) | UFC/gr media±DS           |
|--------------|---------------------|---------------------|---------------------------|
| 8            | 10/10 (100%)        | 0/10 (0%)           | /                         |
| 15           | 5/10 (50%)          | 5/10 (50%)          | 2.4±1.54x10 <sup>5</sup>  |
| 21           | 8/10 (80%)          | 2/10 (20%)          | 2.23±1.36x10 <sup>4</sup> |
| 29           | 10/10 (100%)        | 0/10 (0%)           | /                         |
| 36           | 10/10 (100%)        | 0/10 (0%)           | /                         |
| 42           | 8/10                | 2/10                | 2.42±1.6x10 <sup>6</sup>  |
| 49           | 10/10 (100%)        | 0/10 (0%)           | /                         |
| 56           | 9/10                | 1/10 (10%)          | 6.65x10 <sup>4</sup>      |
| 64           | 8/10                | 2/10 (20%)          | 2.42±0.22x10 <sup>6</sup> |
| 70           | 9/10                | 1/10 (10%)          | 6.09x10 <sup>3</sup>      |
| 77           | 9/10                | 1/10 (10%)          | 1x10 <sup>3</sup>         |
| 84           | 9/10                | 1/10 (10%)          | 4.97x10 <sup>3</sup>      |
| 91           | 10/10 (100%)        | 0/10 (0%)           | /                         |

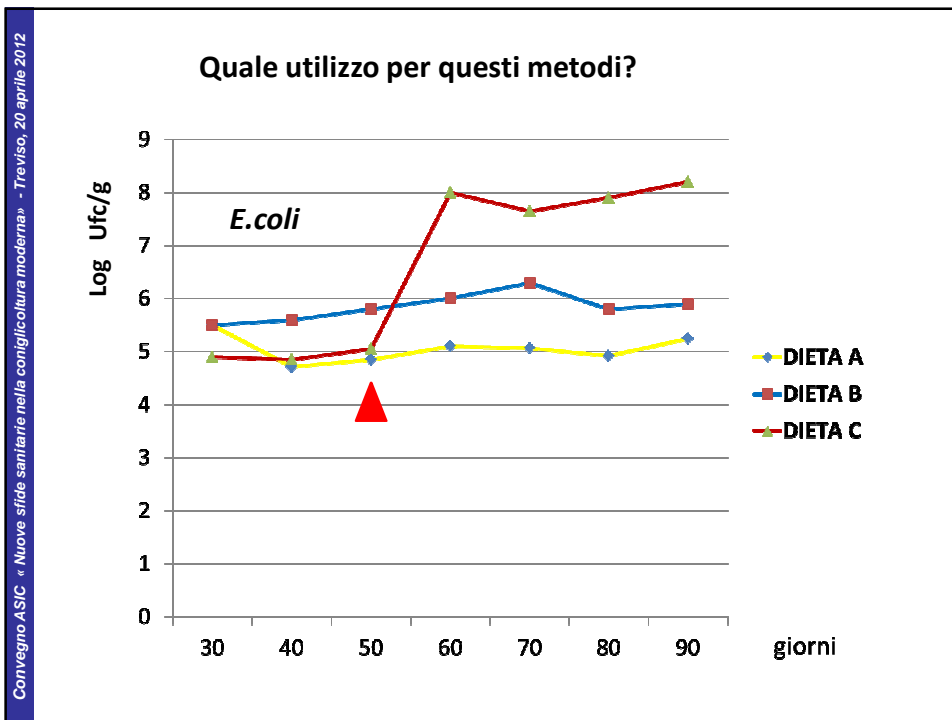
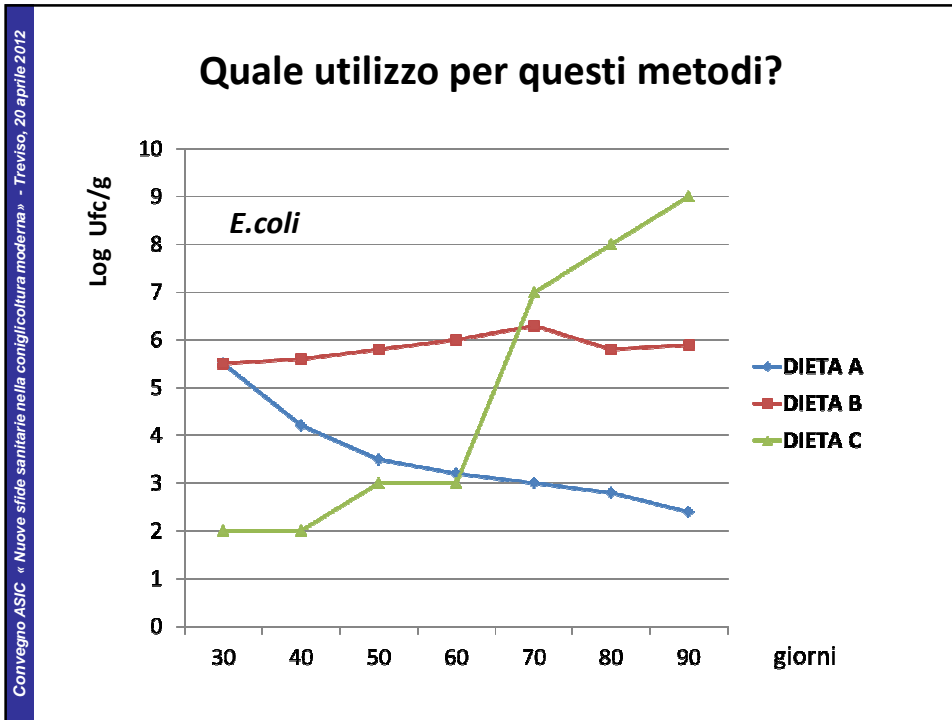


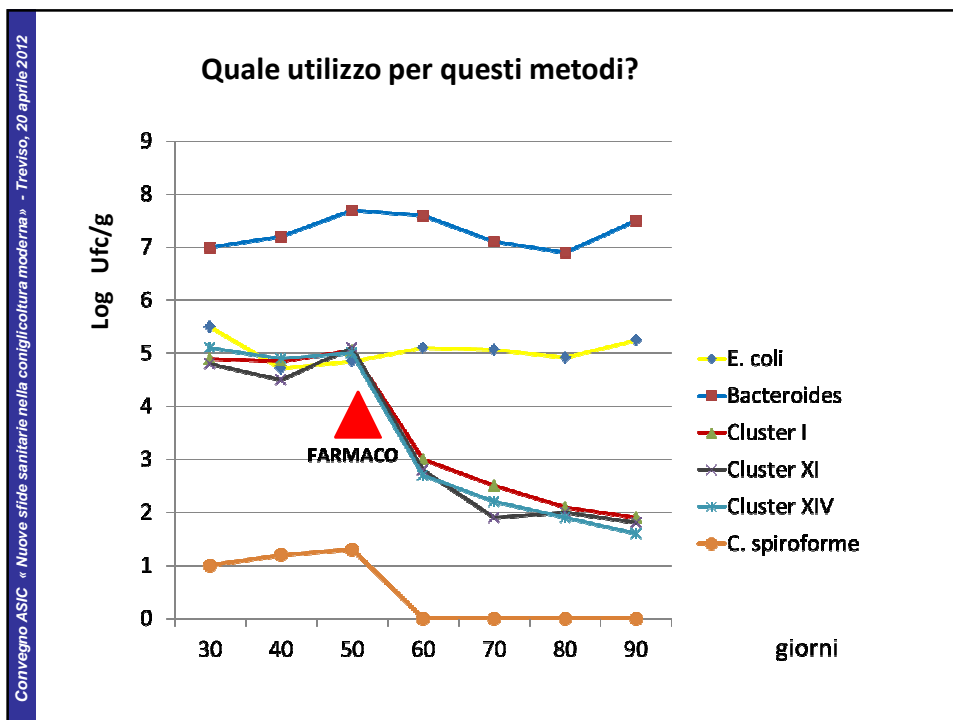
Convegno ASIC « Nuove sfide sanitarie nella conigliocultura moderna » - Treviso, 20 aprile 2012

## Il lavoro continua ....

In corso di sviluppo *Real time* PCR per genere *Enterococcus*

ma difficoltà col genere *Lactobacillus*  
 (fattori di inibizione nelle feci di coniglio)



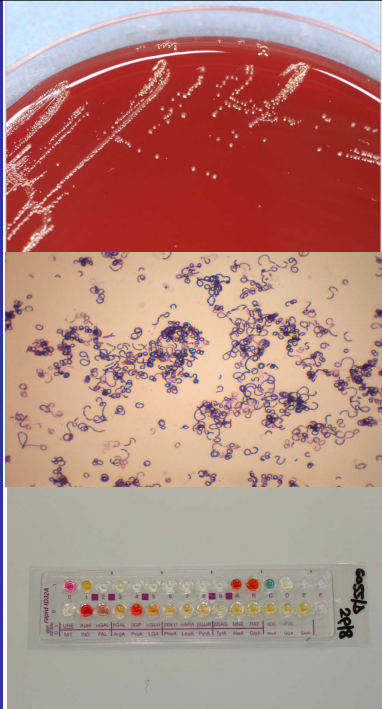


Convegno ASIC « Nuove sfide sanitarie nella conigliocultura moderna » - Treviso, 20 aprile 2012

## 2° ESEMPIO

**LA SPETTROMETRIA DI MASSA APPLICATA  
ALL'IDENTIFICAZIONE BATTERICA E  
ALL'EPIDEMIOLOGIA**

Convegno ASIC « Nuove sfide sanitarie nella conglicoltura moderna » - Treviso, 20 aprile 2012

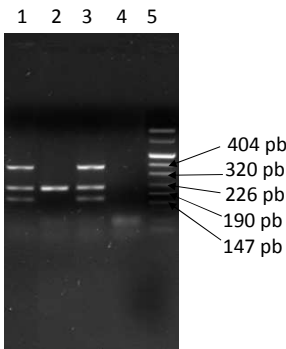


**IDENTIFICAZIONE BATTERICA BASATA SU:**

- caratteristiche morfologiche delle colonie
- morfologia dei batteri
- capacità di utilizzazione di determinati substrati (enzimi)

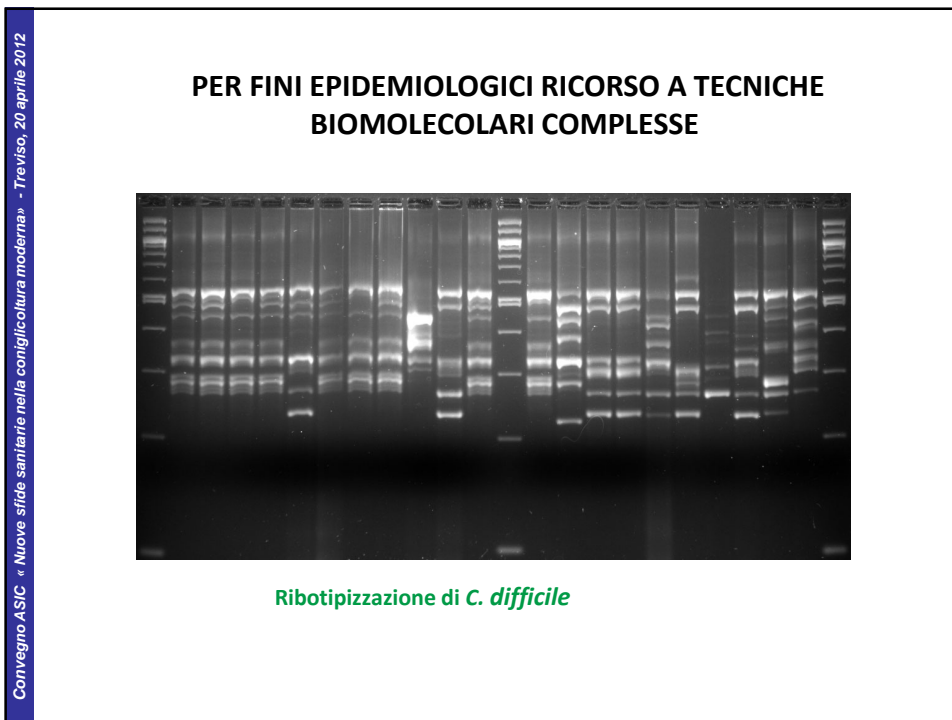
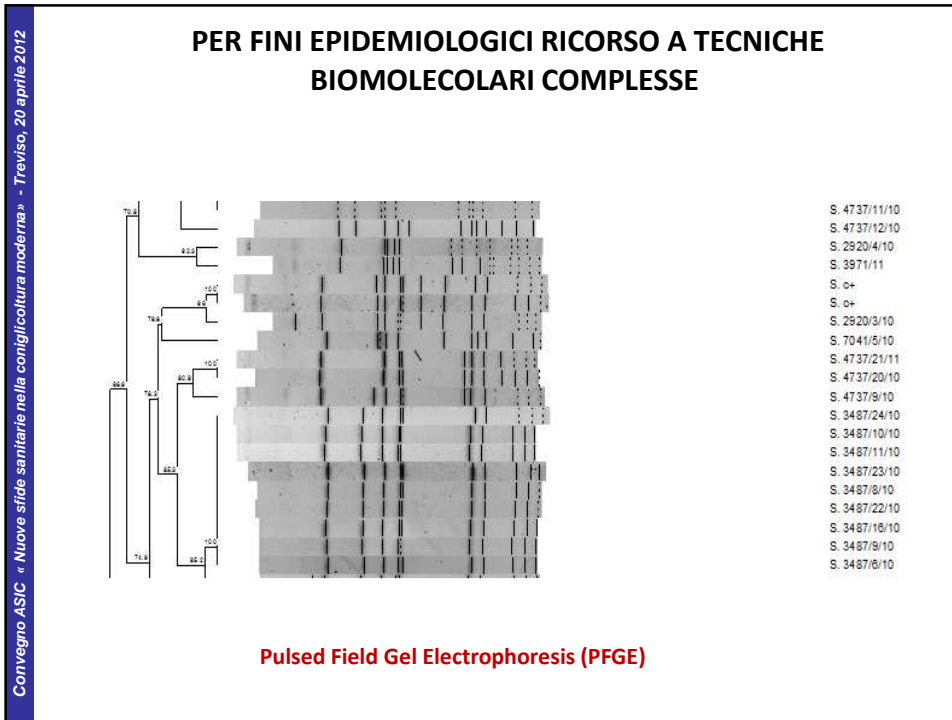
Convegno ASIC « Nuove sfide sanitarie nella conglicoltura moderna » - Treviso, 20 aprile 2012

**ULTERIORE EVOLUZIONE GRAZIE ALLA BIOLOGIA MOLECOLARE**



1. ATCC 51697: *tcdB* (161 pb) + *tpi* (226 pb) + *tcdA* (379 pb)
2. Ceppo di campo: *tpi* (*triosofosfoisomerasi*)
3. Ceppo di campo: *tcdA* + *tpi* + *tcdB*
4. Controllo negativo
5. Marker di peso molecolare

Multiplex PCR per l'identificazione di specie di *C. difficile* e la ricerca dei geni codificanti le tossine A e B



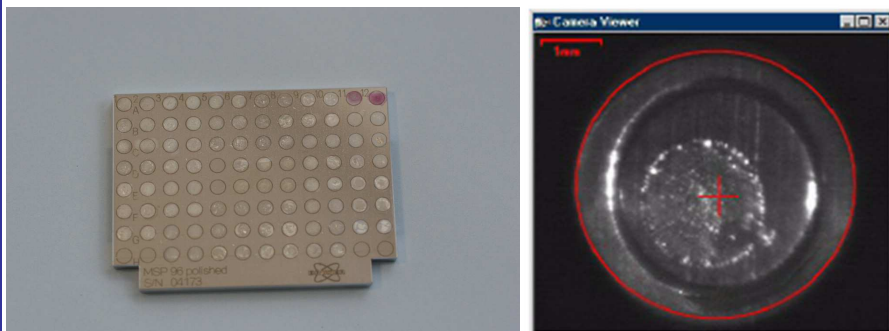


**Oggi la spettrometria di massa consente  
un cambiamento radicale dei laboratori  
di batteriologia**

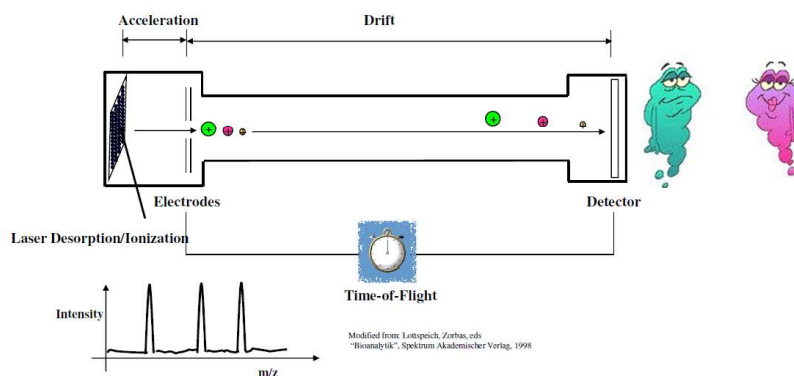


**Come funziona:**

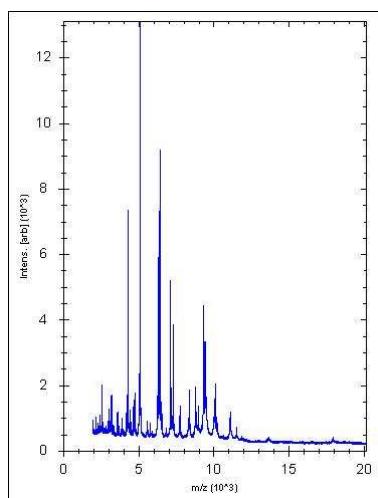
**Un laser colpisce lo spot batterico e determina  
la produzione di ioni +**

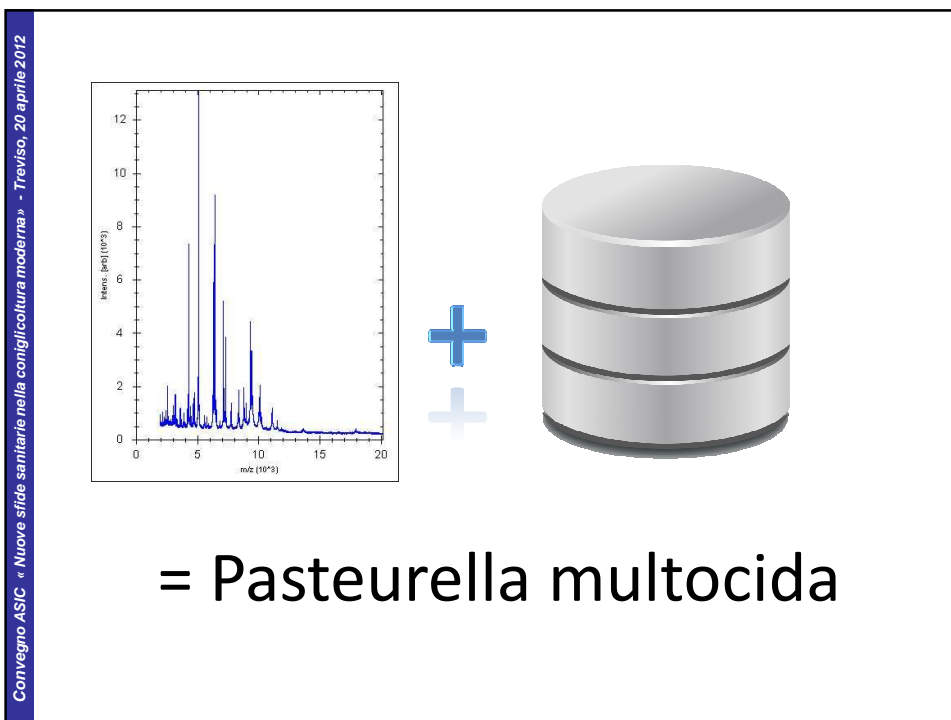


**Gli ioni+ percorrono il tubo di volo in un tempo inversamente proporzionale alla massa e colpiscono un detector che dà origine ad uno spettro**

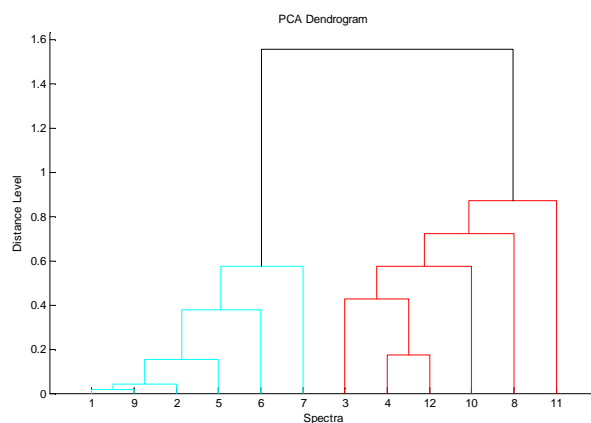


**Analisi delle proteine ribosomiali mediante spettrometria di massa:  
GLI SPETTRI SONO SPECIE-SPECIFICI**

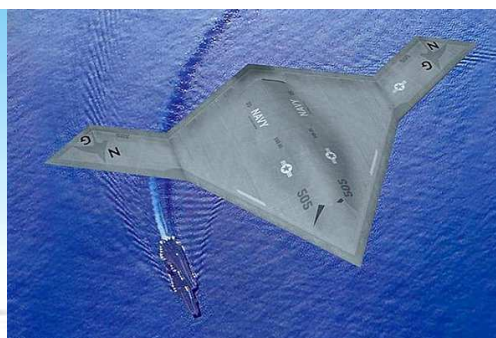




## NON SOLO IDENTIFICAZIONE MA POSSIBILITA' DI ELABORAZIONE DEGLI SPETTRI E VALUTAZIONE DELL'OMOLOGIA DEGLI ISOLATI



**L'EVOLUZIONE TECNOLOGICA CI FORNISCE STRUMENTI SOFISTICATI PER DIAGNOSTICARE E STUDIARE LE PATOLOGIE. BISOGNA PERÒ LAVORARE SULLE RICADUTE APPLICATIVE DI QUESTE NUOVE OPPORTUNITA'.**



Convegno ASIC « Nuove sfide sanitarie nella coriicoltura moderna » - Treviso, 20 aprile 2012

Fabrizio Agnoletti  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Treviso, Italy  
[fagnoletti@izsvenezie.it](mailto:fagnoletti@izsvenezie.it)  
[www.izsvenezie.it](http://www.izsvenezie.it)



**GRAZIE PER L'ATTENZIONE!**

