

Ricerca corrente IZS VE 13/18

Rilevazione e simultanea tipizzazione di micoplasmi aviari mediante array in fase liquida

Responsabile scientifico: Salvatore Catania

I micoplasmi sono microrganismi unicellulari privi di parete cellulare, comunemente considerati, a causa delle loro esigenze metaboliche, organismi di difficile coltivazione. Alcune specie possono essere considerate commensali, mentre altre presentano spiccate caratteristiche di patogenicità. Tra le oltre 20 specie di *Mycoplasma* isolate negli uccelli, alcune determinano nel settore avicolo industriale perdite economiche piuttosto importanti. Specie diverse, come ad esempio *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS), *M. iowae* e *M. meleagridis*, sono responsabili di forme cliniche caratteristiche.

La ricerca di questi microrganismi con metodiche biomolecolari ha permesso un miglioramento in termini di rapidità e di sensibilità diagnostica; tuttavia, tali metodiche non forniscono indicazioni sull'espressione proteica, e quindi sui meccanismi inerenti la biologia stessa del microrganismo (ad es. immunoevasione). La rilevazione dei micoplasmi d'interesse zootecnico, mediante riconoscimento di specifiche proteine/antigeni, rappresenta un'importante sfida diagnostica, poiché potrebbe affiancarsi in maniera complementare alle attuali metodiche. Le metodiche classiche d'identificazione proteica presentano protocolli complessi e tempistiche lunghe che non sono sempre compatibili con le richieste diagnostiche.

Queste limitazioni potrebbero essere superate con l'impiego della metodica array in fase liquida. Il sistema utilizza una serie di biglie (fino a 100) caratterizzate da uno spettro di emissione e che possono essere covalentemente legate ad anticorpi specifici. La biglia coniugata è in grado di legarsi all'antigene presente nel campione. L'antigene viene a sua volta riconosciuto da un secondo anticorpo analita –specifico marcato con biotina che viene successivamente rivelato e quantificato dopo aggiunta della molecola reporter (streptavidina-PE). I vantaggi della metodica array in fase liquida sono la capacità di eseguire test multiplex e modulabili in funzione delle richieste diagnostiche, l'impiego di ridotti volumi di campione, il basso consumo di reagenti, l'uso di campioni senza particolari pretrattamenti, la relativa facilità di utilizzo, l'elevata sensibilità e la possibilità di automatizzare il processo. Il maggior svantaggio è rappresentato dal costo dello strumento che non costituisce in realtà una limitazione nel presente progetto in quanto lo strumento è già in uso presso il nostro laboratorio.

Obiettivi:

- Messa a punto e standardizzazione della metodica array in fase liquida per la rilevazione antigeni dei micoplasmi aviari;
- Standardizzazione delle metodiche di coniugazione degli anticorpi con i reagenti necessari per l'implementazione del saggio;
- Produzione, selezione e conservazione di anticorpi mono e policlonali nei confronti di proteine epitopiche (membrane strutturali) di *M. gallisepticum* e *M. synoviae*;
- Valutazione delle performance del metodo e confronto con metodiche già validate (DGGE)