

Infezione sperimentale di capre con un ceppo atipico di *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* isolato in Giordania: confronto tra differenti metodi diagnostici

Anna Rita D'Angelo⁽¹⁾, Andrea Di Provvido⁽¹⁾, Gabriella Di Francesco⁽¹⁾, Flavio Sacchini⁽¹⁾, Chiara De Caro⁽¹⁾, Robin A.J. Nicholas⁽²⁾ & Massimo Scacchia⁽¹⁾

Riassunto

Sono state infettate sperimentalmente 10 capre con un micoplasma identificato con metodi biomolecolari come *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, ceppo Irbid, isolato da capre in un focolaio di agalassia contagiosa nel nord della Giordania e definito atipico per la sua peculiarità sierologica. Due gruppi di animali infettati rispettivamente per via endotracheale e aerosol sono stati posti in contatto con un terzo gruppo di capre. A sei settimane dall'infezione alcuni animali, sia infettati sia posti in contatto, hanno manifestato febbre, scolo nasale, seguiti da grave sintomatologia respiratoria e poliartrite. Dagli animali deceduti o sacrificati, perché giunti al termine della sperimentazione, sono stati effettuati prelievi di organi. Dopo una descrizione dei quadri clinici ed anatomo-istopatologici, sono stati messi a confronto gli esiti degli isolamenti microbiologici e delle prove immunoistochimiche effettuate sugli organi prelevati.

Parole chiave

Diagnosi, Capra, Giordania, Immunoistochimica, Isolamento microbiologico, *Mycoplasma*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.

Introduzione

I micoplasmi appartenenti al cluster *mycoides* sono agenti patogeni di bovini, caprini e ovini. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, Large Colony type (*Mmm*LC) e *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* provocano, nei piccoli ruminanti, setticemia, artrite, mastiti e polmoniti mentre *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*) nelle capre è causa primaria di polmonite (16).

*Mmm*LC ed *Mmc* sono geneticamente indistinguibili ed è per questo che l'International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the Taxonomy of the *Mollicutes* sta valutando la proposta di raggruppare *Mmm*LC e *Mmc* come una unica sottospecie denominata *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. Per tale motivo in questo lavoro sarà adottato il nome di *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.

Mmc è uno tra i più diffusi agenti patogeni nei paesi nei quali si allevano piccoli ruminanti (6, 11); nei focolai di malattia la mortalità può raggiungere il 90% (15). Probabilmente la sua presenza e i danni zootecnici da esso causati sono sottostimati in considerazione del fatto che non tutti i Paesi sono in grado di diagnosticare infezioni da micoplasmi (19).

(1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Via Campo Boario, 64100 Teramo, Italia
a.dangelo@izs.it

(2) Mycoplasma Group, Veterinary Laboratory Agency, Department of Bacterial Diseases, Woodham Lane, Weybridge, Addlestone, Surrey KT15 3NB, Regno Unito

Poco si conosce sulla diffusione delle micoplasmosi nei Paesi del Medio Oriente. Nella Giordania settentrionale sono stati isolati *Mycoplasma* del cluster *Mycooides* da allevamenti di pecore e capre affetti da polmonite e sintomatologia riferibile ad agalassia contagiosa; tra questi è stato isolato un *Mycoplasma*, ceppo Irbid, che, sebbene abbia caratteristiche genetiche riferibili a *Mmc*, non mostra inibizione della crescita al contatto con antisieri specifici di riferimento contro *Mmc* ed *Mmm*LC. (1,7)

Nelle capre infettate sperimentalmente per via respiratoria, si osservano febbre, anoressia, leggera congiuntivite, gonfiore alle articolazioni e lesioni polmonari (7).

Scopo del presente lavoro è stato quello di determinare, sia in animali sperimentalmente infettati sia in quelli infettatisi per via naturale, la distribuzione di *Mmc* in diversi tessuti e di mettere a confronto la sensibilità diagnostica dell'isolamento microbiologico (IM) e della prova immunostochimica (IIC).

Materiali e metodi

Infezione delle capre

Il ceppo "Irbid" di *Mmc*, utilizzato per l'infezione, è stato identificato mediante Polimerase Chain Reaction (PCR) e *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE) (4, 9). Per l'infezione è stata inoculata una coltura pura del micoplasma ad una concentrazione di 10⁸ unità formanti colonie (UFC) per ml (7).

Sono state utilizzate 10 capre in buon stato di salute, di sesso femminile, di razza meticcia derivante da incroci con Saanen × Camosciata × Garganica, di età compresa tra 1 e 2 anni e provenienti da un unico allevamento. Le capre sono risultate sieronegative per *Mmc* al test di fissazione del complemento, al test ELISA ed al *latex agglutination test* (LAT) (3). L'isolamento e l'evidenziazione di *Mycoplasma* spp. da tamponi nasali, mediante prove batteriologiche e di PCR (8, 12), sono risultati negativi.

Gli animali sono stati alloggiati nello stabulario di massima sicurezza dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" (IZS A&M). La

sperimentazione è stata effettuata nel rispetto della normativa vigente riguardante il benessere animale (2).

In accordo con il disegno sperimentale, le capre sono state divise random nei seguenti tre gruppi:

- **Gruppo 1** composto da due animali infettati mediante sondino tracheale, con 10 ml della sospensione di *Mmc* (IET); (10, 18);
- **Gruppo 2** costituito da tre animali infettati per via aerogena, con un apparecchio per aerosol non ad ultrasuoni (Mister Baby linea Family), con lo stesso quantitativo di inoculo utilizzato per il primo gruppo (AER); la nebulizzazione dell'agente infettante è stata condotta in un locale chiuso, fisicamente separato da quello dove sono stati stabulati gli animali dopo l'infezione;
- **Gruppo 3** formato da cinque animali, posti in contatto con gli altri 2 gruppi, lo stesso giorno dell'infezione di questi ultimi, allo scopo di indurre la malattia per via naturale (CONT).

Il protocollo anestetico utilizzato per l'infezione degli animali dei gruppi 1 e 2 ha previsto l'utilizzo di una miscela contenente 0,2 mg/kg di xilazina cloridrato (Bayer) e 1 mg/kg di ketamina cloridrato (Intervet) inoculata tramite un catetere endovenoso nella vena giugulare destra. Nel gruppo 1 è stata utilizzata, inoltre, una soluzione di anestetico locale (lidocaina cloridrato al 2%-Fort Dodge) per ridurre il riflesso della deglutizione. Gli animali sono stati sacrificati, previa anestesia generale, mediante inoculazione endovenosa di Tanax[®] sotto il controllo dei veterinari responsabili della sperimentazione.

Prelievo campioni

Gli animali sono stati sacrificati al manifestarsi della sintomatologia clinica e, in assenza di questa, sono stati abbattuti al 56° giorno post-infezione o post-contatto, in accordo con il protocollo sperimentale che prevedeva l'abbattimento degli animali a due mesi dall'infezione.

Nel corso dell'esame anatomico-patologico sono stati prelevati i campioni dai lobi apicale, cardiaco, diaframmatico e accessorio del polmone destro e sinistro, da cuore, fegato,

rene, milza, tessuto articolare del carpo e del metacarpo, utero, vagina, placenta e mammella. Inoltre sono stati prelevati campioni di linfonodi prescapolari, retrofaringei, iliaci, mediastinici, peribronchiali e sopramammari.

Isolamento microbiologico

L'isolamento è stato effettuato su porzioni di tessuto di circa 1,5 cm³, prelevati sterilmente (12). I campioni sono stati processati secondo il seguente metodo interno:

- il materiale, sospeso in 10 ml di brodo triptosio, è stato sottoposto a disgregazione meccanica mediante Stomacher®;
- l'omogenato, posto in provette sterili con fondo a V, è stato centrifugato a 1400×g per 15 minuti a 4°C.

Dopo centrifugazione il surnatante, raccolto con una siringa, è stato filtrato utilizzando filtri Millipore da 45 µm e quindi seminato, in quantità di 10 gocce, sia in brodo sia su terreno CCPP agarizzato (20). Le colture sono state poste in incubazione a 37°C in atmosfera al 5-10% di CO₂ per 7 gg. Giornalmente è stata effettuata la lettura, sia delle piastre sia dei brodi, per evidenziare l'eventuale crescita del micoplasma. In caso di negatività nelle piastre e crescita nei brodi di coltura, 10 gocce di questi ultimi sono state seminate su piastre di CCPP Agar ed incubate con le modalità sopra descritte.

I campioni positivi sono stati sottoposti a tipizzazione molecolare mediante PCR (8).

Istologia

Campioni di tessuto degli organi prelevati sono stati fissati in formalina tamponata neutra al 10%. Dai campioni fissati, disidratati sottovuoto ed inclusi in paraffina sono state ottenute sezioni istologiche dello spessore di 5 µm colorate con Ematossilina-Eosina (E-E).

Immunoistochimica

La colorazione immunoistochimica è stata effettuata, utilizzando il Kit "Streptavidin Biotin Complex Peroxidase" (StreptABC-Perox)(Dako), su tutte le sezioni istologiche di polmone e linfonodo e in generale, sulle sezioni istologiche degli organi risultati

positivi all'isolamento dell'agente eziologico. Come anticorpo primario è stato utilizzato un siero iperimmune di coniglio prodotto a partire dallo stesso ceppo utilizzato per l'infezione (IZS A&M) e diluito 1:200 in una soluzione tamponata di Tris 0,15M a pH 7.6 contenente il 5% di latte scremato in polvere (13). Per i controlli negativi è stato utilizzato un siero di coniglio negativo per *Mmc* (IZS A&M). Come anticorpo secondario è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale clone RG-96 biotinilato (Sigma).

Risultati

Clinica ed anatomopatologia

Tutti gli animali del gruppo 1 hanno presentato grave sintomatologia respiratoria ed evidenti lesioni anatomico-patologiche a carico del polmone e delle articolazioni. La capra n. 1 è stata sacrificata al manifestarsi della sintomatologia respiratoria al 30° giorno dall'infezione, mentre la n. 2 è deceduta al 24° giorno evidenziando, oltre ai sintomi respiratori, linfadenite.

Nel gruppo 2 solo la capra n. 4, deceduta al 44° giorno, ha manifestato sintomatologia respiratoria mentre le capre n. 3 e n. 5, sacrificate entrambe al 56° giorno, hanno evidenziato rispettivamente zoppia e lieve scolo nasale. Solo la capra n. 5 ha presentato lesioni riferibili a polmonite, pleurite e linfadenite.

Le capre del gruppo 3, ad eccezione dei n. 9 e 10 decedute rispettivamente al 38° e 43° giorno, sono state sacrificate al 56° giorno. Gli animali n. 8, 9 e 10 hanno manifestato sintomatologia respiratoria con tosse mentre negli animali n. 6 e 7 si è evidenziato solo scolo nasale. All'esame autoptico polmonite sierofibrinosa di gravità variabile ed interessante differenti lobi polmonari era presente in 8 animali su 10 mentre, nella capra n. 9, si sono riscontrate anche pleurite, pericardite e linfadenite; quest'ultima alterazione era presente anche nell'animale n. 10.

I risultati degli esami clinici ed anatomopatologici sono riassunti in Tabella I.

Tabella I
Sintomi clinici e lesioni anatomopatologiche

Gruppo e n° capra	Metodo d'infezione	Giorni nei quali si è avuta piressia >40°C	Sintomi clinici	Giorni dall'infezione alla morte/sacrificio	Lesioni anatomo-patologiche					
					Liquido pleurico	Liquido peri-cardico	Peri-cardite	Polmo-nite	Poli-artrite	Linfo-adenite
1 n° 1	IET	14-21	Dispnea, tosse, zoppia	30	+	+	+	+	+	-
1 n° 2	IET	15-21	Dispnea, tosse, zoppia	24	+	+	+	+	+	+
2 n° 3	AER	No	Zoppia	56	-	-	-	-	-	-
2 n° 4	AER	No	Dispnea	44	-	+	-	-	-	+
2 n° 5	AER	16-21	Lieve scolo nasale	56	+	+	-	+	-	+
3 n° 6	CON	No	Lieve scolo nasale	56	-	-	-	+	-	+
3 n° 7	CON	14-17	Lieve scolo nasale	56	-	-	-	+	-	-
3 n° 8	CON	No	Lieve dispnea, tosse	56	-	-	-	+	-	-
3 n° 9	CON	32-38	Dispnea, tosse	38	+	-	+	+	-	+
3 n° 10	CON	37-43	Dispnea, tosse	43	-	-	-	+	-	+

IET infettati per via endotracheale
 AER Infettati per via aerogena con aerosol non ad ultrasuoni
 CON Infettati per contatto
 + presenza
 - assenza

Istologia

Le lesioni istologiche, laddove presenti, sono state riscontrate principalmente a livello polmonare.

Nel gruppo 1 la capra n. 1 ha evidenziato infiammazione fibrino-cattarrale a livello bronchiale ed alveolare, fibrosi settale (Figura 1), focolai necrotici (Figura 2) e necrosi coagulativa prevalentemente sui lobi apicali e cardiaci destri; la capra n. 2 ha mostrato pleurite fibrinosa ad evoluzione cronica (Figura 3), polmonite necrotizzante, presenza di capillari neoformati e pericardite fibrinosa con flogosi acuta neutrogranulocitaria.

Nel gruppo 2 la capra n. 4 ha mostrato alveolite interstiziale ed essudazione sierofibrinosa, con cellule infiammatorie negli alveoli e nei bronchioli (Figura 4) e piccole aree

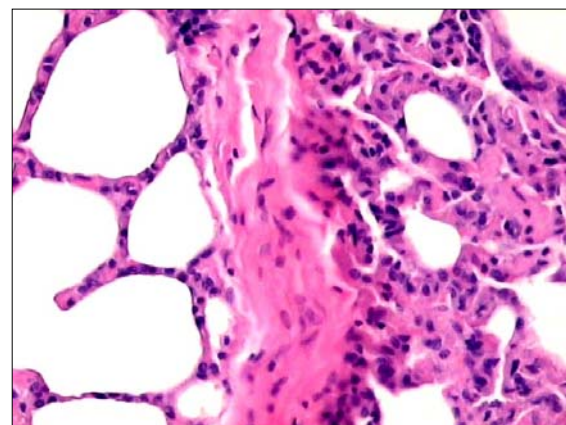


Figura 1
 Polmone: al centro fibrosi del setto alveolare, a destra area di atelettasia degli alveoli e a sinistra area di enfisema alveolare vicariante Capra n. 1 (gruppo 1) (Ematossilina-Eosina40x)

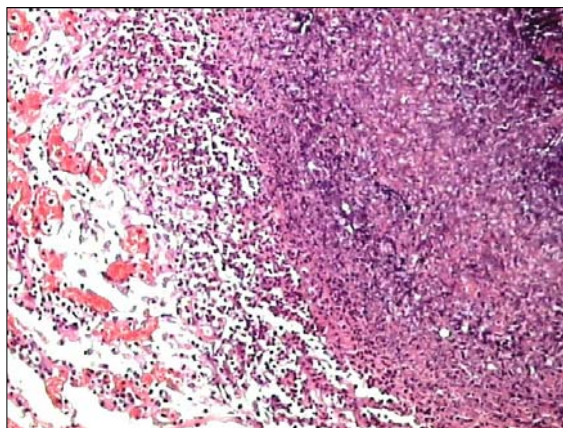


Figura 2
Polmone: area necrotica con cellule
infiammatorie degenerate
Capra n. 1 (gruppo 1)
(Ematossilina-Eosina 10x)

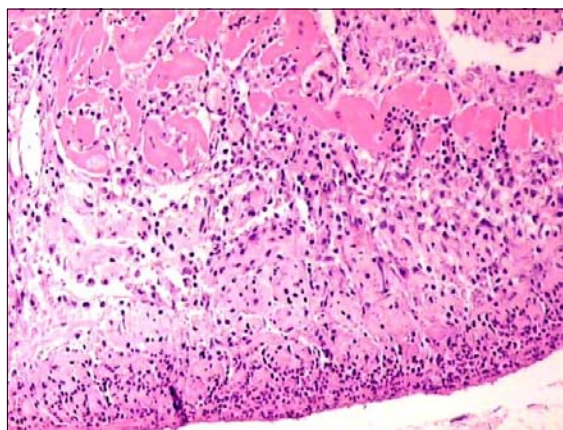


Figura 3
Polmone: pleurite fibrinosa
Capra n. 2 (gruppo 1)
(Ematossilina-Eosina 10x)

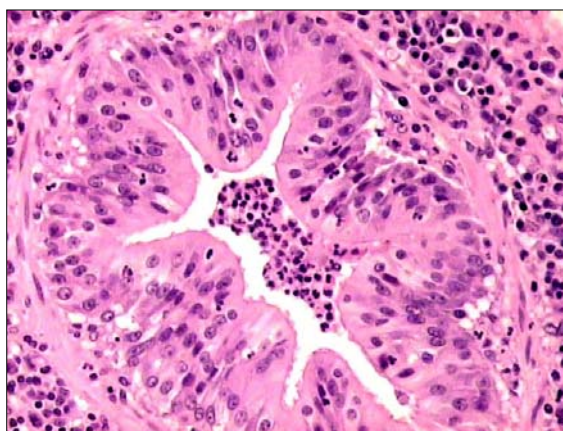


Figura 4
Polmone: essudazione sierofibrinosa e cellule
infiammatorie nei bronchioli
Capra n. 4 (gruppo 2)
(Ematossilina-Eosina 40x)

di iperplasia del Tessuto Linfoide Bronco-Associato (BALT) (Figura 5); le capre n. 3 e 5 non hanno evidenziato lesioni significative nonostante il fatto che, nell'animale n. 5, fossero state osservate lesioni polmonari macroscopiche.

Nel gruppo 3 la capra n. 9 ha presentato fibrosi settale, alveolite desquamativa macrofagica, edema interlobulare ed enfisema vicariante, atelettasia, bronchiolite sierofibrinosa, pleurite fibrinosa ed iperplasia del linfonodo mediastinico. Nelle capre n. 6, 7, 8 e 10 non erano presenti lesioni significative.

Negli altri organi esaminati non si sono evidenziati lesioni riconducibili ad infezione da micoplasmi.

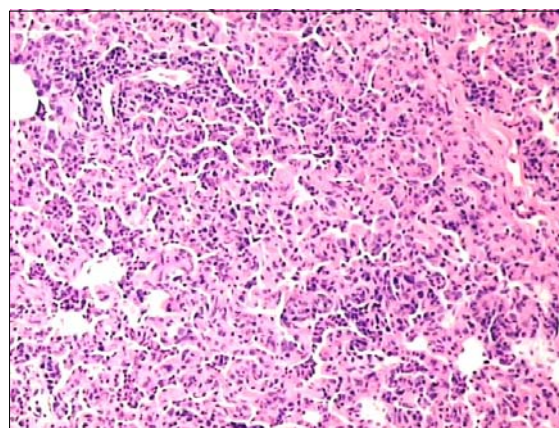


Figura 5
Polmone: iperplasia del tessuto linfoide bronco-associato
Capra n. 4 (gruppo 2)
(Ematossilina-Eosina 10x)

Isolamento e immunostochimica

Mmc è stato isolato (Figura 6) da tutte le capre di tutti e tre gruppi ad esclusione della n. 5 nella quale, come già detto, sono state riscontrate lesioni polmonari.

Nel gruppo 1 la localizzazione immunostochimica, intracellulare ed extracellulare, di *Mmc* è stata evidenziata solo nella capra n. 2 a livello polmonare, nelle aree di necrosi (Figura 7), nei lumi alveolare e bronchiolare (Figura 8), nell'epitelio di rivestimento alveolare e bronchiolare (Figura 9) e nella pleura (Figura 10), e, a livello cardiaco, nell'infiltrato infiammatorio neutrogranulocitario (Figura 11).

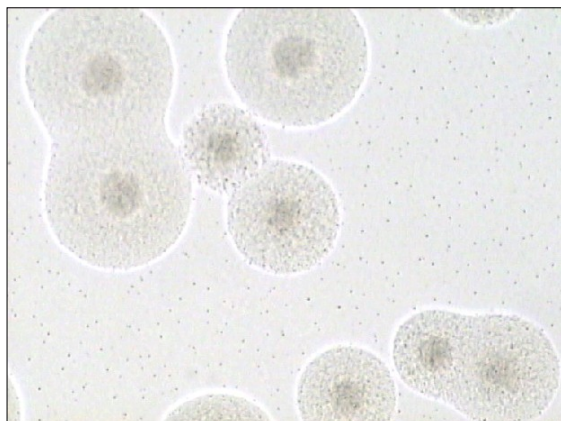


Figura 6
Colonie di *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in terreno CCPP agarizzato (10x)

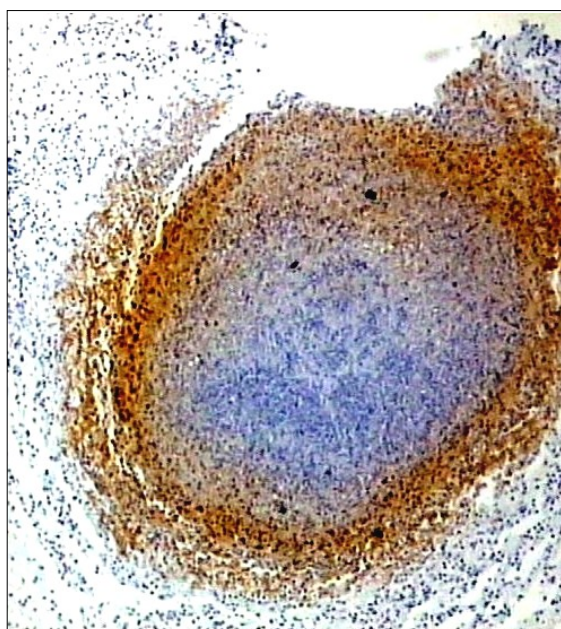


Figura 7
Polmone: colorazione immunohistochemica positiva nell'area di necrosi
Capra n. 2 (gruppo 1)
(Streptavidina biotina complex perossidasi 5x)

Nel gruppo 2 *Mmc*, è stato isolato solo dai linfonodi retrofaringei delle capre n. 3 e 4 mentre la positività antigenica è stata riscontrata esclusivamente nell'animale n. 4, a livello polmonare, nell'essudato catarrale dei lumi bronchiolare ed alveolare e nell'epitelio bronchiolare; gli organi della capra n. 5 sono risultati negativi ad entrambi gli esami.

Nel gruppo 3 la localizzazione immunohistochemica è stata rilevata esclusivamente nelle capre n. 9 e 10, a livello polmonare, nelle aree

di necrosi, nel citoplasma dei macrofagi e neutrofili (Figura 12 e 13), nell'infiltrato infiammatorio subpleurico e nel BALT.

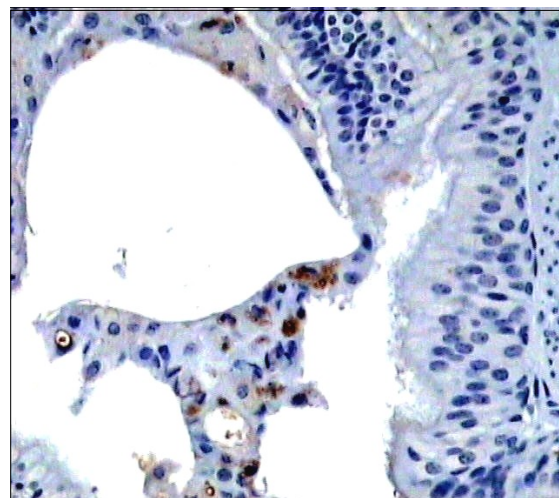


Figura 8
Polmone: colorazione immunohistochemica positiva delle cellule dell'essudato catarrale del lume bronchiolare
Capra n. 2 (gruppo 1)
(Streptavidina biotina complex perossidasi 20x)

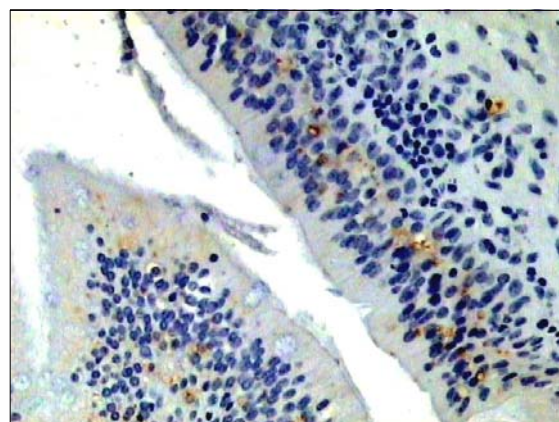


Figura 9
Polmone: colorazione immunohistochemica positiva nelle cellule dell'epitelio bronchiolare
Capra n. 2 (gruppo 1)
(Streptavidina biotina complex perossidasi 20x)

I risultati dell'isolamento e della localizzazione immunohistochemica del *Mycoplasma* sono messi a confronto nella Tabella II.

Discussione

Le indagini istologiche hanno evidenziato lesioni caratteristiche riferibili a micoplasmosi respiratorie dei caprini che non possono però essere definite patognomoniche (5, 14, 17).

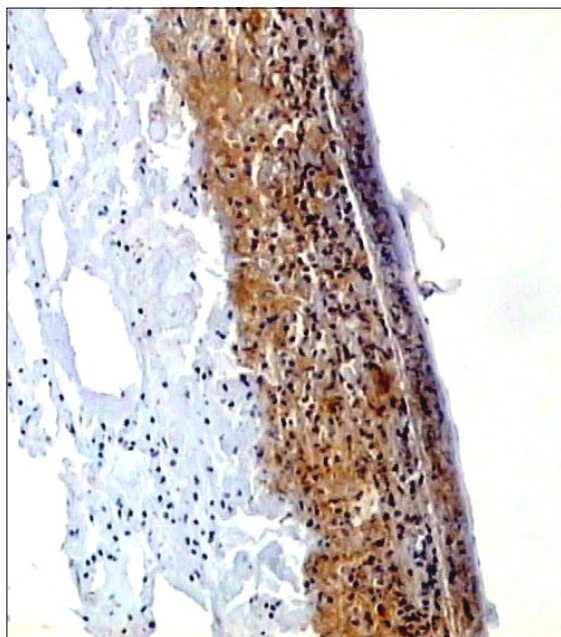


Figura 10
Polmone: colorazione immunoistochimica
positiva nell'infiltrato infiammatorio subpleurico
Capra n. 2 (gruppo 1)
(Streptavidina biotina complex perossidasi10x)

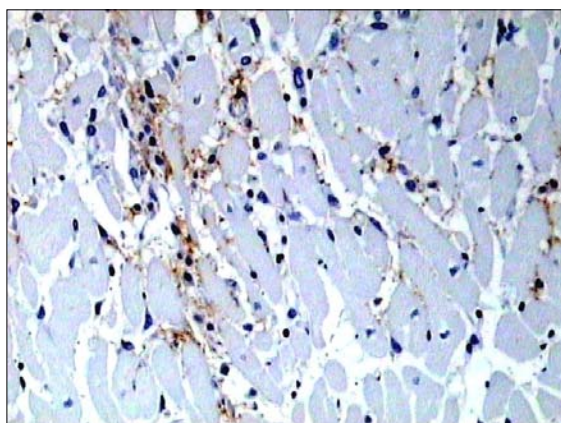


Figura 11
Cuore: colorazione immunoistochimica positiva
nell'infiltrato infiammatorio neutrogranulocitario
Capra n. 2 (gruppo 1)
(Streptavidina biotina complex perossidasi 20x)

I risultati ottenuti evidenziano il polmone quale organo di elezione sia per l'isolamento microbiologico sia per la localizzazione immunoistochimica del *Mycoplasma*; il campionamento effettuato da più distretti polmonari ha naturalmente aumentato la possibilità di successo diagnostico. I linfonodi retrofaringei, mediastinici e peribronchiali si sono rivelati distretti di elezione soprattutto per l'isolamento microbiologico.

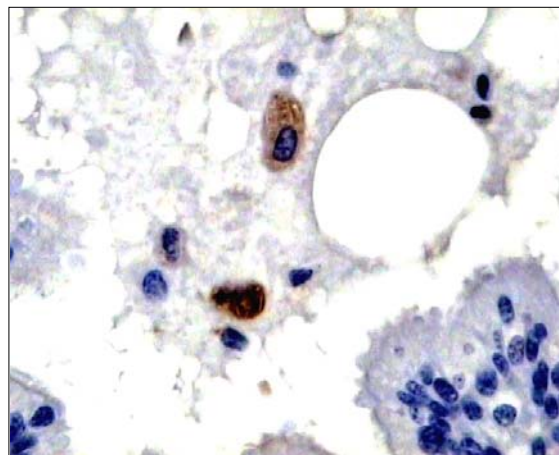


Figura 12
Polmone: colorazione immunoistochimica
positiva nel citoplasma dei macrofagi
Capra n. 9 (gruppo 3)
(Streptavidina biotina complex perossidasi40x)

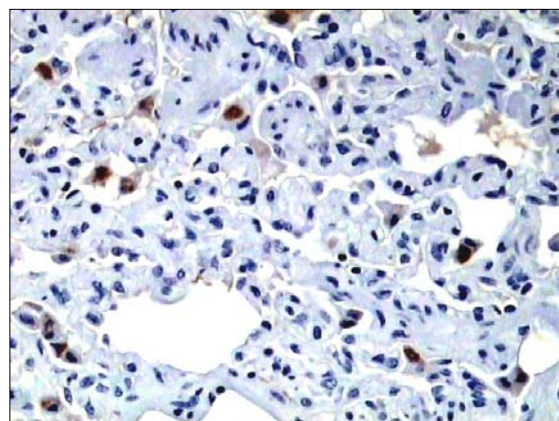


Figura 13
Polmone: colorazione immunoistochimica
positiva delle cellule neutrogranulocitarie
Capra n. 10 (gruppo 3)
(Streptavidina biotina complex per ossidasi 20x)

Negli organi in cui si è riscontrata sia positività all'isolamento microbiologico sia al test immunoistochimico l'antigene è stato localizzato nel citoplasma delle cellule infiammatorie, specialmente macrofagi, e nelle aree di necrosi come già descritto (14, 16, 17). La localizzazione citoplasmatica consegue l'attivazione delle cellule fagocitarie da parte del *Mycoplasma* seguita, nelle fasi più avanzate dell'infezione, da un rilascio, nelle aree di necrosi, di frammenti di *Mycoplasma* derivati dalla digestione enzimatica operata dai macrofagi. Infatti la colorazione immunoistochimica può rivelare non solo microrganismi intatti, ma anche frammenti di

Tabella II

Risultati isolamento microbiologico ed immunoistochimica

Nelle caselle color lilla si evidenzia la positività all'isolamento microbiologico

Nelle caselle color viola si evidenzia la positività alla colorazione immunoistochimica

Organi testati	Gruppo 1				Gruppo 2						Gruppo 3									
	N° 1 30 gg		N° 2 24 gg		N° 3 63 gg		N° 4 44 gg		N° 5 63 gg		N° 6 63 gg		N° 7 63 gg		N° 8 63 gg		N° 9 38 gg		N° 10 43 gg	
	IM	IIC	IM	IIC	IM	IIC	IM	IIC	IM	IIC	IM	IIC	IM	IIC	IM	IIC	IM	IIC	IM	IIC
Lobo apicale dx	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
Lobo apicale sx	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Lobo diaframmatico dx	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
Lobo diaframmatico sx	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Lobo cardiaco dx	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Lobo cardiaco sx	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Lobo accessorio dx	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Lodo medio dx	+	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Linfonodo mediastinico	-	-	+	+	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	+	-	+	/
Linfonodo peribronchiale	-	-	+	-	-	-	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	+	-	+	/
Linfonodo prescapolare	-	-	+	-	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	/	+	-	+	-
Linfonodo retrofaringeo	/	/	+	/	+	-	+	-	-	/	-	-	-	/	+	/	+	-	-	/
Linfonodo iliaco	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	/	+	-	-	/
Cuore	-	-	+	+	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	/	-	/	/	/
Pericardio	-	-	+	+	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	/	+	-	-	/
Fegato	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	/	-	/	+	-
Milza	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	/	-	-	+	-
Rene	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	/	+	-	+	-
Mammella	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	+	/	/	/
Vagina	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	+	/	/	/
Utero	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	+	/	/	/
Placenta	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	/	+	-	-	/
Articolazioni	+	-	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

IM isolamento microbiologico
IIC colorazione immunoistochimica
+ presenza
- assenza
/ non effettuato

essi purché conservino il loro potere antigenico. Ciò spiegherebbe la negatività all'isolamento microbiologico e la positività all'esame immunoistochimico riscontrati nell'animale n. 4.

La positività all'isolamento microbiologico e la contemporanea mancata evidenziazione immunoistochimica di *Mmc* sembrano dimostrare una minor sensibilità di quest'ultima prova.

Conclusioni

Si può concludere che le due tecniche in esame, utilizzate in parallelo, possono accrescere la "sensibilità diagnostica" al fine di una valutazione complessiva sullo stato d'infezione di un allevamento. L'isolamento microbiologico ha il vantaggio, non sfruttando proprietà antigeniche, di permettere una diagnosi anche in presenza, come in questo caso, di ceppi di mycoplasma atipici.

Laddove il microrganismo è presente, anche in forma non vitale, la metodica immunostochimica è efficace e, permettendo di studiare la localizzazione del patogeno nelle diverse popolazioni cellulari, è strumento utile per meglio comprendere la patogenesi della malattia.

Un'ultima considerazione riguarda l'impiego della tecnica immunostochimica in particolari condizioni climatico-ambientali sfavorevoli per l'isolamento microbiologico, come quelle che si osservano in alcune aree del continente africano ed asiatico. La scarsa resistenza del

Mycoplasma nell'ambiente esterno, l'estrema difficoltà nel mantenere temperature di refrigerazione durante il trasporto dei campioni e la distanza tra il sito di prelievo ed il laboratorio, spesso rilevanti, sono elementi che indirizzano verso l'utilizzo del metodo immunostochimico che si avvale esclusivamente della formalina al 10% per la conservazione del campione.

Bibliografia

1. Al-Momani W. & Nicholas R.A.J. 2006. Small ruminant mycoplasmas with particular reference to the Middle East. *Vet Bull*, **76**, 1-11.
2. Anon. 1992. Decreto legislativo 27 gennaio 1992, n.116. Attuazione della direttiva (CEE) n. 609/86 in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. Suppl. ordinario alla *Gazz Uff*, **40**, 18 febbraio (www.unife.it/ricerca/ricerca-nazionale/tutela-animali-utilizzati-a-fini-sperimentali/decreto-legislativo-27-gennaio-1992-n.116 ultimo accesso 7 Giugno 2010).
3. Ayling R.D., Regalla J. & Nicholas R.A.J. 1999. A field test for detecting antibodies to *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC using the latex slide agglutination test. In *Mycoplasmas of ruminants: pathogenesis, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, Vol. 3 (L. Stipkovitz, R. Rosengarten & J. Frey, eds). EC. EC Brussels, EUR 18756, 155-158.
4. Bashiruddin J.B. 1998. PCR and RFLP methods for the specific detection and identification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. In *Mycoplasma protocols* (R.J. Miles & R.A.J. Nicholas, eds). Humana Press, Totowa, 37-44.
5. Cottew G.S. 1979. Pathogenicity of the subspecies *mycoides* of *Mycoplasma mycoides* for cattle, sheep and goats. *Zentralbl Bacteriol Orig A*, **245** (1-2), 164-170.
6. DaMassa A.J., Wakenell P.S. & Brooks D.L. 1992. Mycoplasmas of goats and sheep. *J Vet Diag Invest*, **4** (1), 101-113.
7. Di Provvio A., Scacchia M., Varasano V., Churchward C., De Caro C., Al-Momani W., Di Francesco G., Ayling R.D., Lelli R. & Nicholas R.A. 2009. Experimental infection of goats with an unusual strain of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* isolated in Jordan. *J Comp Pathol*, **14**, 121-126.
8. Hotzel H., Sachse K. & Pflutzner H. 1996. A PCR scheme for differentiation of organisms belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Vet Microbiol*, **49** (1-2), 31-43.
9. McAuliffe L., Ellis R., Lawes J., Ayling R.D. & Nicholas R.A.J. 2005. 16S r DNA and DGGE: a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *J Med Microbiol*, **54**, 1-9.
10. March J.B., Harrison J.C. & Borich S.M. 2002. Humoral immune responses following experimental infection of goats with *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. *Vet Microbiol*, **84** (1-2), 29-45.
11. Nicholas R.A.J. 2002. Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. *Small Ruminant Res*, **45**, 145-149.
12. Nicholas R.A.J. & Baker S.E. 1998. Recovery of mycoplasmas from animals. In *Mycoplasma protocols* (R.J. Miles & R.A.J. Nicholas, eds). Humana Press, Totowa, 37-44.
13. Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. 1994. Immunohistochemistry. American Registry of Pathology, Washington, DC, Volume 23, 247-255.
14. Rodriguez F., Kennedy S., Bryson T.D., Fernandez A., Rodriguez J.L. & Ball H.J. 1996. An immunohistochemical method of detecting *Mycoplasma* species antigens by use of monoclonal antibodies on paraffin sections of pneumonic bovine and caprine lungs. *Zentralbl Veterinarmed B*, **43** (7), 429-438.

15. Rodriguez J.L., Poveda J.B., Oros J., Herraiez P., Sierra M.A. & Fernandez A. 1995. High mortality in goats associated with the isolation of a strain of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type). *Zentralbl Veterinarmed B*, **42** (10), 587-593.
16. Rodriguez J.L., DaMassa A.J., Oros J., Rodriguez F., Herraiez P. & Fernandez A. 1997. Immunohistochemical and microbiological study of the oropharyngeal region of goats experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* cluster strains. *Aust Vet J*, **75** (10), 753-755.
17. Rodriguez J.L., Gutierrez C., Brooks D.L., DaMassa A.J., Oros J. & Fernandez A. 1998. A pathological and immunohistochemical study of goat kids undergoing septicaemic disease caused by *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type). *Zentralbl Veterinarmed B*, **45** (3), 141-149.
18. Rosendal S. 1983. Susceptibility of goats and calves after experimental inoculation or contact exposure to a Canadian strain of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* isolated from a goat. *Can J Comp Med*, **47** (4), 484-490.
19. World Organisation for Animal Health (Office International des Épizooties: OIE) 2008. Contagious agalactia. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, Paris, 992-999.
20. World Organisation for Animal Health (Office International des Épizooties: OIE) 2008. Contagious caprine pleuropneumonia. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, Paris, 1000-1002.