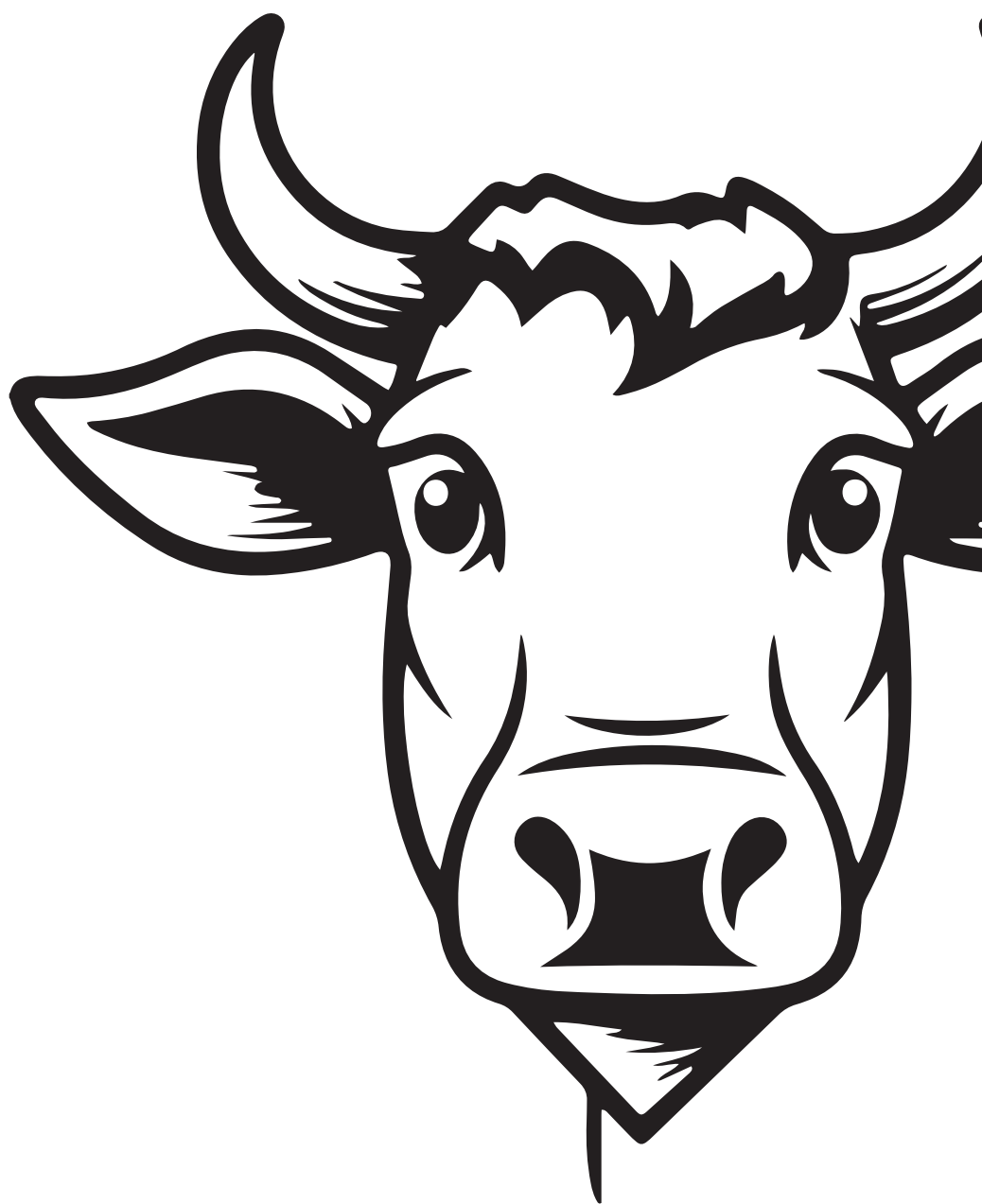


# emma qPCR – Una soluzione innovativa per l'identifica- zione della mastite clinica nella pratica veterinaria.

Christoph Kunas, Stephanie Walker  
ender diagnostics ag, 2024



# 1. Riassunto

L'identificazione rapida e accurata dei patogeni è fondamentale per un trattamento mirato e basato su prove di efficacia delle mastiti cliniche. Attualmente sono disponibili diversi test da utilizzare negli ambulatori veterinari o negli allevamenti, ma esistono notevoli differenze in termini di tempo e qualità dei risultati.

In questo studio sono stati confrontati 5 diversi metodi di analisi su 95 campioni: emma qPCR, microbiologia classica e il test C hanno fornito un'individuazione concreta del patogeno, mentre i test A e B indicavano solo lo stato Gram e avevano un tasso di individuazione significativamente inferiore. In 90 minuti, emma qPCR è stato di gran lunga il test più veloce e l'unico metodo adatto a rilevare *Mycoplasma* spp. Questi risultati dimostrano le differenze di qualità tra i test e sottolineano l'importanza di un metodo diagnostico adeguato per il trattamento della mastite basato sull'evidenza.

## 2. Introduzione

Per trattare in modo mirato la mastite clinica nelle vacche da latte, oltre al quadro clinico è fondamentale una diagnosi rapida e precisa degli agenti patogeni. È pratica comune utilizzare un trattamento antibiotico iniziale contemporaneamente al prelievo del campione. Per invertire questo processo e basare il trattamento sulla diagnosi, sono disponibili diversi test che possono essere eseguiti nello studio veterinario o, in alcuni casi, nelle aziende agricole. Il più rapido di questi test è l'innovativa soluzione diagnostica emma (ender molecular mutiplex approach). Consente ai veterinari di generare un risultato qPCR nel proprio ambulatorio entro 90 minuti, grazie al quale è possibile individuare i patogeni più importanti (cfr. Figura 1) in modo paragonabile alle diagnosi consolidate e, inoltre, è possibile rilevare il micoplasma. Tutti i test in loco hanno il vantaggio di poter generare un fatturato aggiuntivo nello studio e di non dover più spedire i campioni ai laboratori specializzati, il che significa che il risultato diagnostico e la conoscenza della situazione clinica sono in una sola mano.

In questo studio sono stati confrontati 5 metodi di analisi utilizzati per la diagnosi della mastite clinica negli ambulatori veterinari, mediante l'analisi parallela di 95 campioni di latte.

## 3. Materiale e metodi

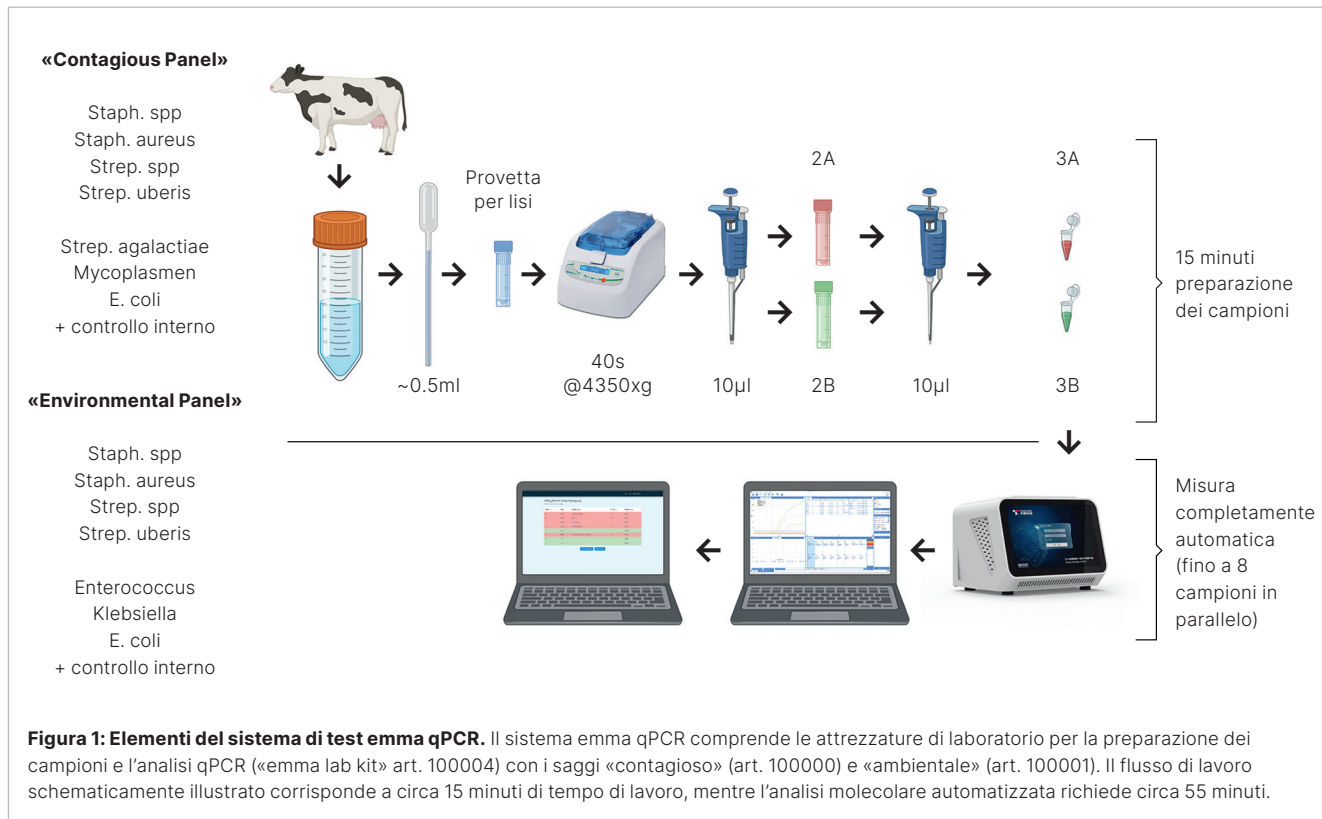
95 campioni di latte provenienti da vacche con sintomi di mastite clinica sono stati analizzati in parallelo utilizzando il sistema emma qPCR, la microbiologia classica e tre test rapidi disponibili in commercio. La tabella 1 fornisce una panoramica di questi metodi.

**Tabella 1: Visione metodi utilizzati**

	Microbiologia	Test A	emma PCR	Test B	Test C
Principio del test	Microbiologia	Lateral Flow	RT-PCR	Terreno di coltura	Microbiologia
Incubazione	24 ore	7,5 ore	Non necessario	12 ore	24 ore
Durata del test	Fino a 72 ore	8 ore	1,5 ore	12 ore	24 ore
Differenziazione	Patogeno / Gruppor di patogeni	Gram-positivi	Patogeno / Gruppor di patogeni	Gram-positivi / Gram-negativi	Patogeno / Gruppor di patogeni
Valutazione	Ottica, biochimica	Ottica (strisce reattive)	Automatica, semiquantitativa	Ottica (Cambiamento di colore)	Ottica (Crescita)

## Emma qPCR

Il campione di latte è stato lisato in un omogeneizzatore, seguito da una qPCR con il pannello «ambientale» o «contagioso», entrambi riguardanti diversi gruppi di batteri. La procedura è stata eseguita secondo le istruzioni del produttore (IFU). I pannelli vengono selezionati dal veterinario prima del test sulla base delle condizioni cliniche della vacca e della situazione patogena prevalente (vedi figura 1). Dopo 55 minuti, l'identificazione del patogeno è stata eseguita da una valutazione automatica basata su cloud.



## Analisi microbiologica

Il campione di latte è stato sparso su una piastra di Petri e incubato a 37 °C per 24 ore. L'agente patogeno è stato identificato mediante morfologia, colorazione di Gram, subcoltura su agar selettivo e ulteriori test biochimici quali catalasi, coagulasi e ossidasi.

### Test A

Il campione di latte è stato incubato in un brodo di arricchimento a 37°C per 7,5 ore. Successivamente, i patogeni gram-positivi sono stati rilevati mediante un cambiamento di colore della striscia reattiva. Il test è stato eseguito secondo le istruzioni del produttore.

### Test B

Il campione di latte è stato incubato in due brodi diversi a 37°C per 12 ore. I patogeni Gram-positivi e Gram-negativi sono stati rilevati da un cambiamento di colore. Il test è stato eseguito secondo le istruzioni del produttore.

### Test C

Il campione di latte è stato piastrato su una piastra di Petri con tre diversi terreni di coltura (selettivi) e messo in incubazione a 37°C per 24 ore. I patogeni sono stati identificati in base alla loro crescita e morfologia sui diversi settori. Il test è stato eseguito secondo le istruzioni del produttore.

## Analisi dei dati e confronti

Sette campioni sono stati esclusi dall'analisi a causa di risultati non validi con il test emma qPCR. Secondo le istruzioni dell'IFU, questo risultato porta a un test di follow-up, che non è stato effettuato in questo caso per motivi di tempo.

Nella valutazione dei risultati, sono stati confrontati il tasso di rilevamento dei campioni positivi, lo stato Gram dei patogeni e l'identificazione dei patogeni dei vari test.



emma  
by ender

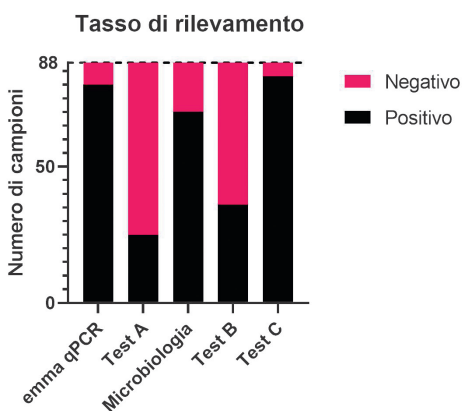


## 4. Risultati

### Tasso di rilevamento e stato di Gram

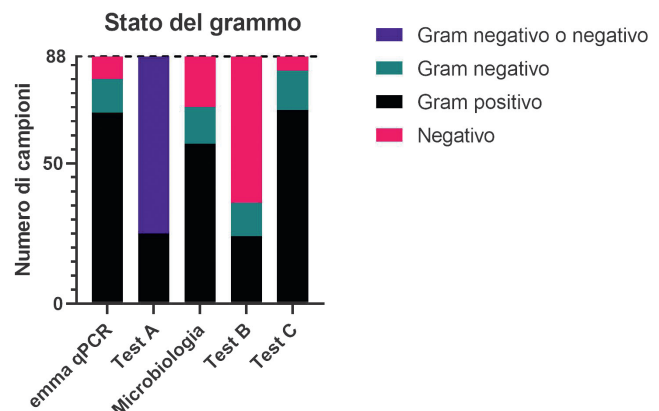
Il tasso di rilevamento dei patogeni è stato più alto con il sistema emma qPCR e il test C (90,9% e 94,3%), seguiti dalla microbiologia classica (79,5%). I test A e B sembravano avere una capacità di rilevamento significativamente inferiore (28,4% e 40,9%; vedi Figura 2a).

La percentuale di batteri Gram-positivi rilevati è stata simile per il sistema emma qPCR, la microbiologia classica e il test C (77,3%, 65% e 78,4%), mentre i test A e B hanno dato risultati significativamente inferiori (28,4% e 27,3%). Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nelle proporzioni di batteri gram-negativi (test C 15,9%; microbiologia classica 14,8%, emma qPCR e test B 13,6%). Con il test A non è possibile rilevare batteri gram-negativi (vedi Figura 2b).



**Figura 2 a) Tassi di rilevamento dei diversi metodi.**

La microbiologia classica, il sistema emma qPCR e il test C hanno ottenuto un tasso di rilevamento significativamente più elevato rispetto ai test A e B.

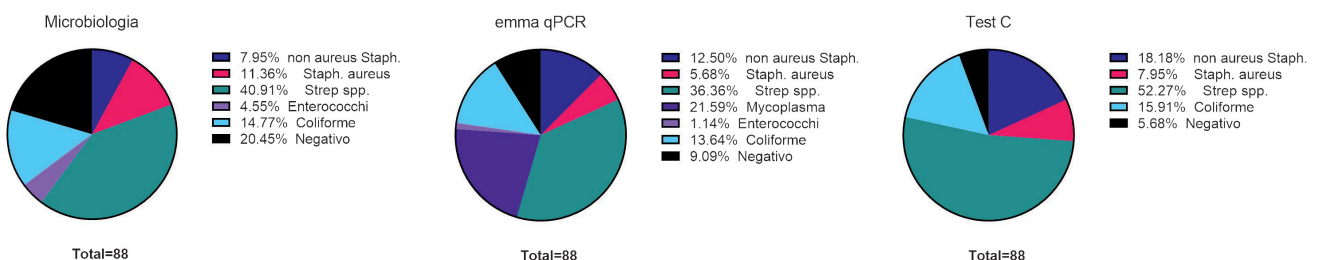


**Figura 2 b) Stato Gram dei patogeni rilevati.**

Il test A non è in grado di distinguere tra risultati negativi e Gram-negativi, mentre non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nella percentuale di risultati Gram-negativi con gli altri quattro metodi di analisi. La microbiologia classica, il sistema emma qPCR e il test C hanno rilevato un numero significativamente maggiore di patogeni gram-positivi rispetto ai test A e B.

### Identificazione dei patogeni

Il sistema emma qPCR, la microbiologia classica e il test C forniscono risultati con identificazione dei patogeni. Il rilevamento di Staphylococcus aureus, Staphylococcus non aureus, Streptococcus spp. e batteri coliformi non differiva in modo statisticamente significativo. L'Enterococcus spp. è stato rilevato nel 4,5% dei campioni in microbiologia classica e nell'1,1% con emma qPCR, mentre non è stato ottenuto alcun rilevamento con il test C. Il sistema emma qPCR è stato l'unico test in grado di rilevare il Mycoplasma spp. (rilevato in 19 degli 88 campioni; 21,6%).



**Figura 3: Distribuzione delle specie patogene rilevate.**

Non sono state riscontrate differenze significative nell'individuazione di Staphylococcus aureus, Staphylococcus non aureus e Streptococcus spp. e batteri coliformi. Il sistema emma qPCR e la microbiologia classica hanno rilevato un numero significativamente maggiore di Enterococcus spp. rispetto al Test C. Il sistema emma qPCR è stato l'unico metodo diagnostico in grado di rilevare le infezioni da Mycoplasma spp.

## 5. Discussione dei risultati

Sono stati confrontati cinque diversi metodi di analisi con tecnologie diverse come la qPCR, la microbiologia o il flusso laterale. Il tasso di rilevamento dei campioni positivi è stato più elevato con l'emma qPCR e il test C, seguiti dalla microbiologia classica. I test A e B hanno mostrato un tasso di rilevamento significativamente inferiore. Il tasso di rilevamento dei patogeni Gram-positivi è stato più alto con emma qPCR, la microbiologia classica e il test C, mentre i test A e B hanno rilevato una percentuale significativamente inferiore. Non sono state riscontrate differenze significative nel tasso di rilevamento dei batteri gram-negativi.

Utilizzando il sistema emma qPCR, la microbiologia classica e il test C, è possibile l'identificazione a livello di specie. Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative, tranne che per *Enterococcus* spp. e *Mycoplasma* spp. *Enterococcus* spp. è stato rilevato più frequentemente con la microbiologia classica che con il test emma qPCR, mentre non è stato ottenuto alcun rilevamento con il test C. La differenza tra microbiologia ed emma qPCR si spiega con il fatto che il pannello ambientale emma qPCR, che include *Enterococcus* spp. è stato utilizzato solo nel 25% dei test. Il sistema emma qPCR è l'unico test in grado di rilevare *Mycoplasma* spp. poiché questo patogeno non cresce nelle condizioni di routine della microbiologia. Il *Mycoplasma* spp. è stato rilevato in 19 degli 88 campioni (21,6%).

Questi risultati indicano notevoli differenze qualitative nei risultati dei diversi test di mastite. Mentre i test A e B hanno ottenuto risultati significativamente peggiori a causa della mancata identificazione del patogeno e del minor tasso di rilevamento dei campioni positivi, i risultati del sistema emma qPCR, della microbiologia classica e del test C hanno dato risultati quasi equivalenti. Questi risultati dimostrano che il test emma qPCR, che può essere utilizzato nella pratica, ottiene risultati comparabili ai test microbiologici consolidati nella pratica, ma in una frazione di tempo.

## 6. Usabilità nella routine

Tutti i sistemi di analisi esaminati si sono dimostrati di facile utilizzo e adatti all'ambiente di pratica, con una preparazione dei campioni che richiede solo pochi minuti in ogni caso (ad esempio, 15 minuti per 8 campioni in parallelo con il sistema emma qPCR). La valutazione ottica dei risultati dei test esaminati può essere soggetta a interpretazioni errate, soprattutto se i test vengono eseguiti da personale non addestrato o che cambia. Questo fattore viene eliminato con il sistema emma qPCR, poiché la valutazione viene eseguita in modo uniforme nella soluzione software basata su cloud e i rapporti di prova standardizzati vengono generati automaticamente.

Tutti i test, ad eccezione del sistema emma qPCR, richiedono un lungo arricchimento di batteri potenzialmente patogeni prima che sia disponibile il risultato del test. Questo non solo richiede molto tempo, ma – a seconda del luogo in cui vengono utilizzati i test – rappresenta anche un rischio per la sicurezza sul lavoro o può essere criticato dalle autorità di controllo.

Il principale vantaggio del sistema emma qPCR è il tempo significativamente più breve necessario per ottenere i risultati. Mentre i test esaminati con l'arricchimento richiedono dalle 8 alle 24 ore, il sistema emma qPCR consente di ottenere i risultati in soli 90 minuti. Questo vantaggio in termini di tempo consente un trattamento (o un non trattamento) rapido e mirato della mastite clinica basato sull'identificazione del patogeno direttamente nella pratica dei veterinari.

## Contatto

**ender diagnostics AG**, Freiburgstr. 251, 3018 Bern, Schweiz

**Web:** [www.emma.vet](http://www.emma.vet) **Mail:** [emma-service@enderdiagnostics.com](mailto:emma-service@enderdiagnostics.com)

**Telefono:** +41 31 552 27 66 (da lunedì a venerdì, dalle 09:00 alle 17:00)