



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Il Terreno Herrold's Medium Agar

Dott.ssa Paola Scaramella, Dott. Gabriele Pietrella

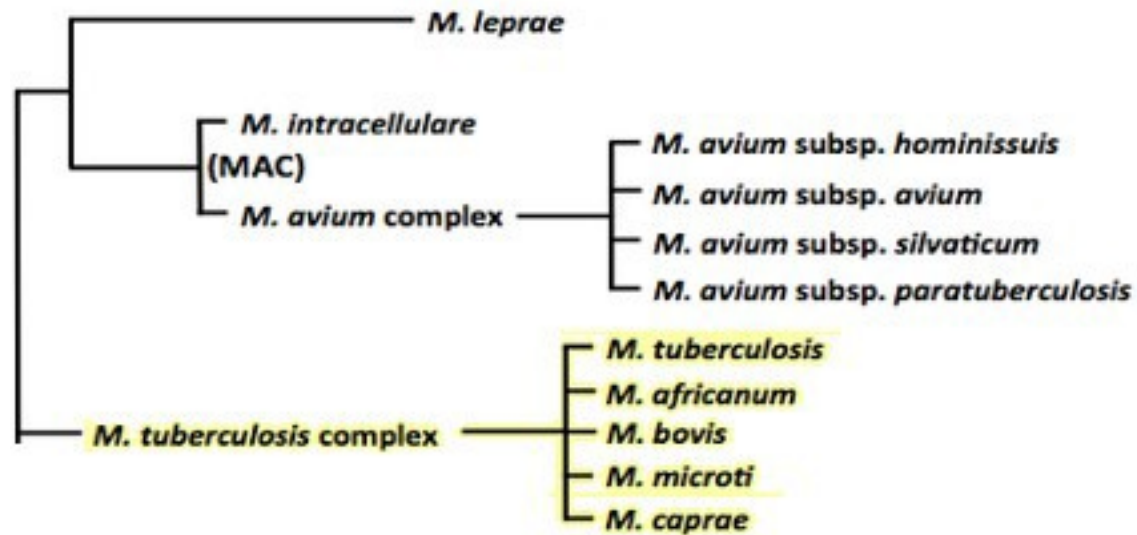
Direzione Operativa Sierologia
Lab. Piani di Profilassi

6 settembre 2016

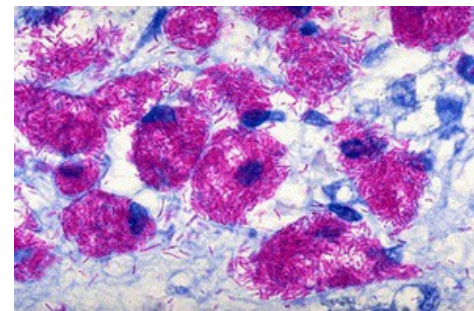
IZS del Lazio e della Toscana M. Aleandri
Via Appia Nuova 1411, Roma



Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP)



- Ordine *Actinomycetales*
- Famiglia *Mycobacteriaceae*
- Genere *Mycobacterium*

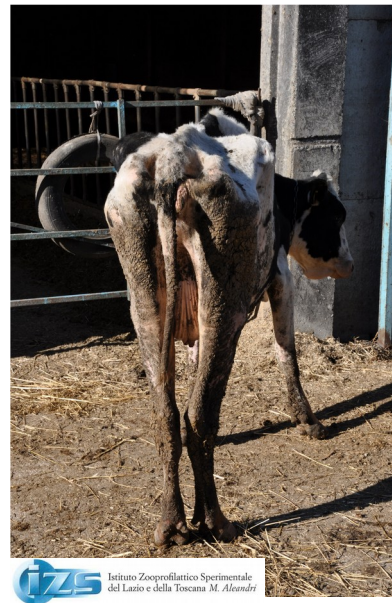


- Gram +
- forma bastoncellare (0.5-1 μ m)
- immobili
- aerobi
- non sporigeni
- fortemente acido resistenti
- lenta crescita (8 – 16 settimane)



Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP)

- La paratubercolosi è una malattia infettiva contagiosa che colpisce in particolare i ruminanti domestici e selvatici.
- Comporta diminuzione della produzione latte, ipofertilità, edema intermandibolare. In seguito compare la diarrea e negli stadi terminali anoressia, edema nella regione addominale, grave e progressivo scadimento delle condizioni generali fino alla morte.
- Possibile ruolo zoonosico di MAP nel Morbo di Crohn dell'uomo in virtù delle similitudini dei sintomi e delle lesioni.



Metodi diagnostici

ELISA



**ESAME
BIOMOLECOLARE**



**ESAME
COLTURALE**



ESAME MICROSCOPICO



Herrold's medium agar (HMA)

Terreno solido raccomandato per l'isolamento selettivo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Componenti terreno:

- Peptone caseina (azoto, amminoacidi, peptidi)
- Cloruro di sodio (equilibrio osmotico)
- Estratto carne (vitamine, carboidrati, composti azotati)
- Verde malachite (selettivo per micobatteri)
- Anfotericina B (inibitore funghi e muffe)
- Tuorlo d'uovo (acidi grassi e proteine)
- Glicerolo (acidi grassi e proteine)
- Piruvato di sodio (fonte energetica per metabolismo batterico)
- Agar
- H₂O distillata
- **Micobactina J**



Micobactina J

- Sideroforo endogeno prodotto dalla maggior parte dei micobatteri diversi dal MAP
- Permette il trasporto nella cellula batterica dello ione ferro, fattore di crescita essenziale per il MAP

3 tipologie di terreno Herrold's:

- 2 flask terreno Herrold's modificato con Micobactina (**CM**)
- 1 flask terreno Herrold's modificato con Cloramfenicolo (**CAF**)
- 1 flask terreno Herrold's senza Micobactina (**SM**)

Nuovo lotto terreno

- semina per controllo fertilità (CEPPO ATCC 19698)
- semina per controllo sterilità



Esame colturale da feci e tamponi ambientali

- pesare 2 g di feci con la bilancia analitica e porle in bustine di plastica sterili
- aggiungere 35 ml di H₂O distillata sterile ed omogenizzare (Stomacher)
- trasferire tutto il surnatante in provette tipo Falcon da 50 ml sotto cappa a flusso laminare
- centrifugare a 1700 g per 20'
- eliminare il surnatante ed aggiungere 15 ml di HPC e 15 ml di terreno BHI



HPC (cloruro di esadecilpiridinio):

- tensioattivo decontaminante
- disaggregante "clumps" batterici tipici del MAP
- facilità separazione componente vegetale

BHI (Infuso cuore-cervello): brodo di arricchimento generico

- Vortexare ed incubare over-night in termostato a 37°C



Esame colturale da feci e tamponi ambientali

- Centrifugare a 1700 g per 20'
- Eliminare il surnatante ed aggiungere 1 ml di H₂O distillata sterile sotto cappa a flusso laminare
- Seminare 0,2-0,3 ml di sospensione in ogni singola flask di terreno Herrold's
- Effettuare movimenti rotatori della flask per ottenere una semina confluyente su tutto il terreno
- Avvitare i tappi delle flask senza stringerli (evaporazione condensa) e incubare in termostato a 37°C
- Dopo 7 giorni avvitare i tappi e proseguire l'incubazione



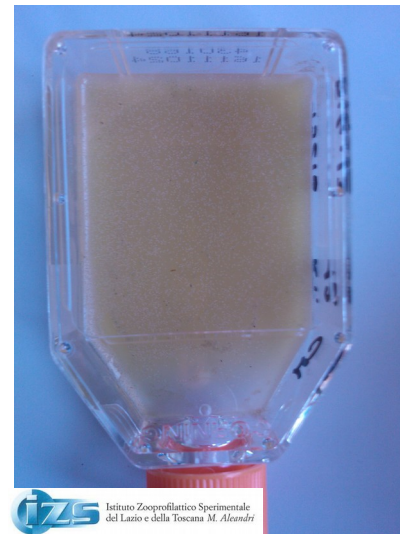
Esame culturale da organi e tessuti

- Individuare area con lesioni tipiche
(per la matrice intestino, se necessario, sciacquare area con H₂O distillata sterile)
- Eseguire un raschiamento del tessuto, evitando tessuto connettivo e grasso, e raccogliere 1 gr di materiale da porre in bustine di plastica sterili
- Aggiungere 8 ml di HPC 0,75% ed omogenizzare 20' allo Stomacher
- Porre il surnatante in una provetta tipo Falcon da 50 ml sotto cappa a flusso laminare
- Incubare a 37°C in termostato over-night
- I passaggi successivi seguono lo stesso procedimento relativo alla matrice feci/tamponi ambientali



Interpretazione dei risultati

- 1° lettura ad un mese dalla semina e le successive ogni 15 gg per un totale di 3 mesi
- morfologia: colonie inizialmente molto piccole (1 mm), da incolore a bianche, traslucide, convesse a superficie liscia e brillante
- le flask in cui è presente un inquinamento da parte di muffe/funghi maggiore del 75%, vengono eliminate e la semina ripetuta
- Lettura delle colture:
 - + (<10 colonie/flask) = **basso escretore**
 - ++ (tra 10 e 49 colonie/flash) = **medio escretore**
 - +++ (tra 50 e 99 colonie/flask) = **alto escretore**
 - ++++ (> 100 colonie/flask) = **super escretore**
- conferma con esame microscopico da colonie (colorazione Ziehl-Neelsen)



Herrold's medium agar (HMA)

Vantaggi:

- Gold standard per l'identificazione di MAP



Svantaggi:

- Lunghi tempi di crescita (1 - 3 mesi)
- Rischio inquinamento da muffe/funghi



Confronto con altri metodi:

- ELISA: specifico (100%) ma mediamente sensibile (50-80%)
- PCR: Ottima specificità ma rischio falsi negativi (presenza sostanze inibenti)



GRAZIE DELL'ATTENZIONE

Dott.ssa Paola Scaramella, Dott. Gabriele Pietrella

Direzione Operativa Sierologia
Lab. Piani di Profilassi

Il Terreno Herrold's Medium Agar

6 settembre 2016

IZS del Lazio e della Toscana M. Aleandri
Via Appia Nuova 1411, Roma

