

PROVA INTERLABORATORIO PER LE MASTITI DELL'IZS LAZIO E TOSCANA:

DIECI ANNI DI ATTIVITA'...ED ALTRO ANCORA

LE POS PER LA DIAGNOSI DI MASTITE E LE LINEE GUIDA PER IL PRELIVO DEL LATTE

Roma - 4 DICEMBRE 2018

Daniele Andreana Nicla





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Indice

- *Linee guida per il prelievo di campioni di latte per la diagnostica delle mastiti - IL CIP 004*
- *Linee guida per il prelievo di campioni di latte di massa - IL CIP 002*





Indice

- *POS CIP 005 INT Isolamento e identificazione di microrganismi mastidogeni*
- *POS CIP 001 INT Mycoplasma spp (esame colturale)*
- *POS CIP 012 INT Prototheca spp, Prototheca zopfii, Prototheca wickeramii (esame colturale - ricerca)*
- *POS CIP 015 INT Streptococcus agalactiae (esame colturale - ricerca)*
- *POS CIP 016 INT Staphylococcus aureus (esame colturale - UFC)*
- *POS CIP 017 INT Staphylococcus aureus (esame colturale - ricerca)*
- *POS CIP 014 INT Mycoplasma bovis, Mycoplasma agalactiae (PCR)*





SERVIZI E MODULISTICA

- Carta dei servizi
- Tariffario e modalità pagamenti
- Modulistica e referti on line
- Conferimento campioni**
- Prove accreditate
- Autocontrollo
- Rabbia
- Vaccini stabulogeni
- Servizio Identificazione Insetti

FORMAZIONE E BIBLIOTECA

OSSERVATORIO EPIDEMIOLOGICO

RICERCA E COOPERAZIONE INTERNAZIONALE

SICUREZZA ALIMENTARE

SANITÀ E BENESSERE ANIMALI

COMUNICAZIONE

NEWS

SANITA' ANIMALE:

- [Indicazioni per il prelievo ed il conferimento dei campioni](#)

Rabbia:

- [Determinazione anticorpi nei confronti del virus della rabbia](#)
- [Rabies antibody detection in vaccinated animals](#)

Mastiti:

- [Linee guida per il prelievo di campioni di latte per la diagnostica delle mastiti](#)



ALIMENTI E PRODOTTI CORRELATI:

- [Quantità minime indicative per campioni di alimenti e prodotti correlati prelevati in regime di Autocontrollo^{\(rev15\)}](#)
- [Istruzioni per la consegna in autocontrollo di alimenti per l'uomo e animali, campioni da superfici e carcasse per prove microbiologiche^{\(rev1\)}](#)
- [CAMPIONI DI ALIMENTI PRELEVATI PRESSO IMPRESE ALIMENTARI^{\(rev1\)}](#)
- [CAMPIONI PRELEVATI DA CARCASSE PRESSO IMPIANTI DI MACELLAZIONE^{\(rev1\)}](#)
- [CAMPIONI DA SUPERFICI PRELEVATI DA AMBIENTI DI PRODUZIONE E MANIPOLAZIONE ALIMENTARI^{\(rev1\)}](#)

- [Linee guida per il prelievo di campioni di latte di massa :](#)
 - [MODULO PRELIEVO CAMPIONI LATTE DI MASSA^{\(rev0\)}](#)

- [Determinazione degli Enterococchi nelle acque destinate al consumo umano](#)



Scopi

Prelievo sia eseguito nel rispetto di norme igieniche al fine di ridurre al minimo tutte le contaminazioni ambientali che potrebbero alterare e/o invalidare la prova.

Eeguire un corretto campionamento manuale del latte di capezzolo/individuale per la ricerca microbiologica di agenti mastidogeni, per la corretta conservazione, trasporto e consegna dei campioni al laboratorio di prova.

E' destinato al personale dell'IZSLT e all'utenza (veterinari, tecnici, allevatori ecc...) con l'obiettivo di garantire la qualità dei servizi erogati dall'Istituto e la sicurezza degli operatori in tutte le fasi di processo del campione.



Riferimenti

*Microbiological Procedures for the
Diagnosis of Bovine Udder Infection and
Determination of Milk Quality - **National
Mastitis Council** a Global Organization for
Mastitis Control and Milk Quality. Fourth
Edition. **Chapter Sample Collection and
Handling page 1.***





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Linee guida per il prelievo di campioni di latte per la diagnostica delle mastiti - IL CIP 004

Moduli allegati

I campioni effettuati dall'utenza devono essere accompagnati dalla richiesta del veterinario che deve includere le seguenti informazioni:

- Ragione sociale allevamento
- data del prelievo
- specie animale (bovina/ovina/caprina/asinina/bufalina)
- tipologia di campione (capezzolo/individuale)
- Stato del campione (fresco/congelato)
- Breve anamnesi con eventuali informazione sullo stato sanitario dell'allevamento relativamente alle patologie mammarie (analisi di controllo nell'ambito di un piano di profilassi per microrganismi contagiosi, verifica post-trattamento, o post-partum)
- Elenco con i numeri progressivi di prelievo e corrispondente numero di matricola sanitaria o codice aziendale dell'animale.
- Analisi richieste
- (N.B. la richiesta di ricerca di *Mycoplasma* spp deve essere esplicitata)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Linee guida per il prelievo di campioni di latte per la diagnostica delle mastiti - **IL CIP 004**

Campionamento

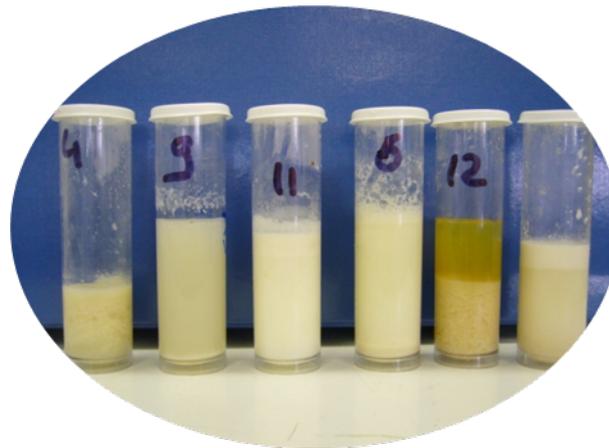
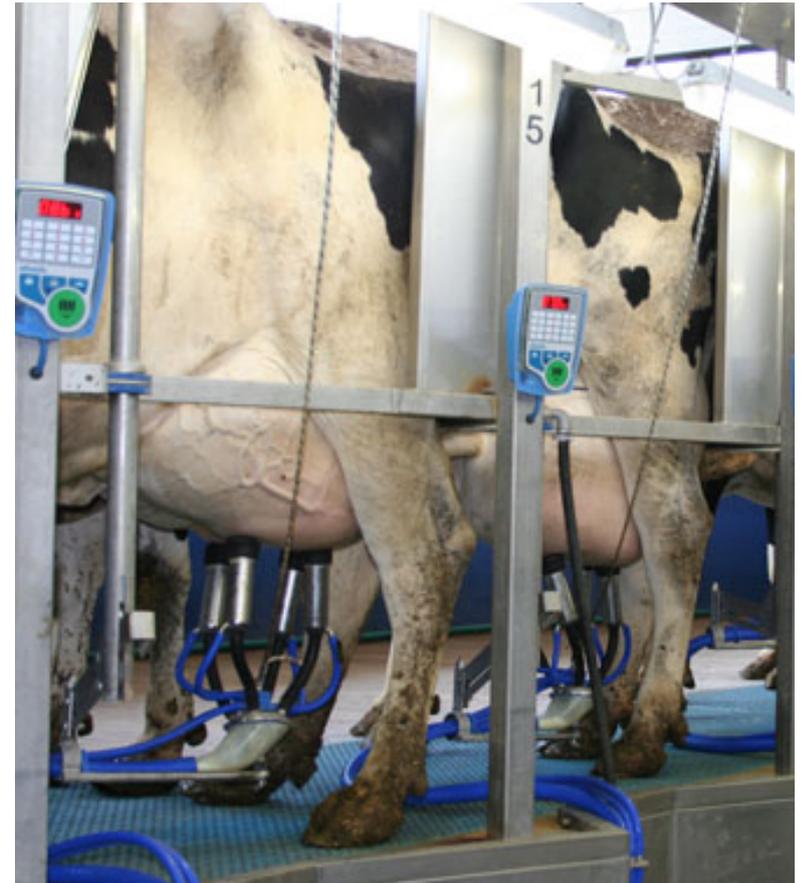
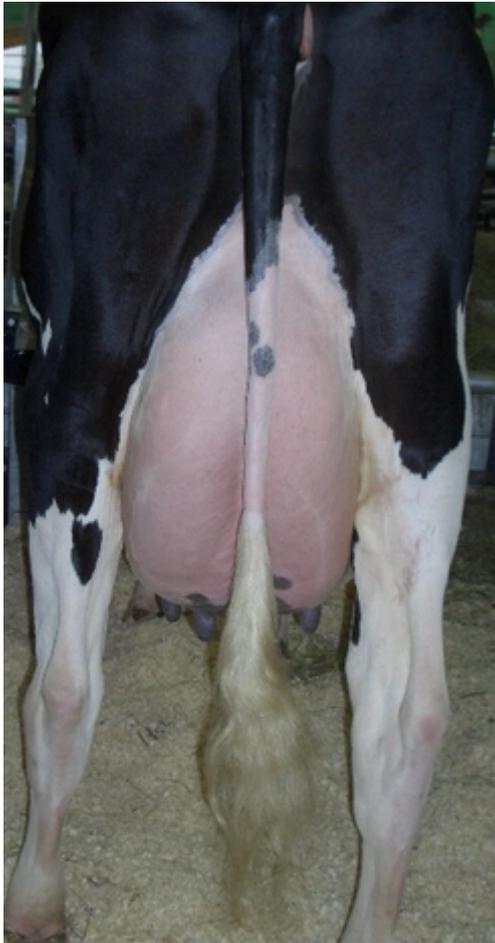




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Linee guida per il prelievo di campioni di latte per la diagnostica delle mastiti - **IL CIP 004**

Campionamento





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

*Linee guida per il prelievo di campioni di latte di massa - **IL CIP 002***

Scopo

eseguire un corretto campionamento manuale del latte di massa da sottoporre ad analisi, della corretta conservazione, trasporto e consegna dei campioni al laboratorio di prova.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

*Linee guida per il prelievo di campioni di latte di massa - **IL CIP 002***

Potenzialità del latte di massa

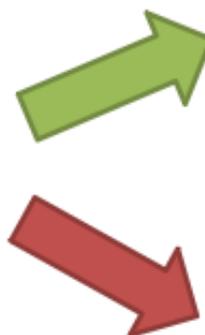
- Rappresenta una matrice poco costosa e facilmente fruibile dal laboratorio
- Indicatore di rischi sanitari
 - ✓ sanità animale
 - ✓ sicurezza alimentare
- Indicatore per il controllo sanitario della mandria nei piani di controllo e risanamento
- Alcune indicazioni su l'uso prudente del farmaco



Potenzialità del latte di massa

- Analisi chimico-fisiche (**sanità**, **contaminazioni**)

Grasso, Proteine, Lattosio
Cellule Somatiche
Punto crioscopico
Urea



Sostanze inibenti
Aflatossine M1
PCB
Metalli pesanti
Pesticidi

Trattamenti illeciti (es. cortisonici)

- Analisi reologiche (lattodinamografia)



Potenzialità del latte di massa

- Ricerche Anticorpali

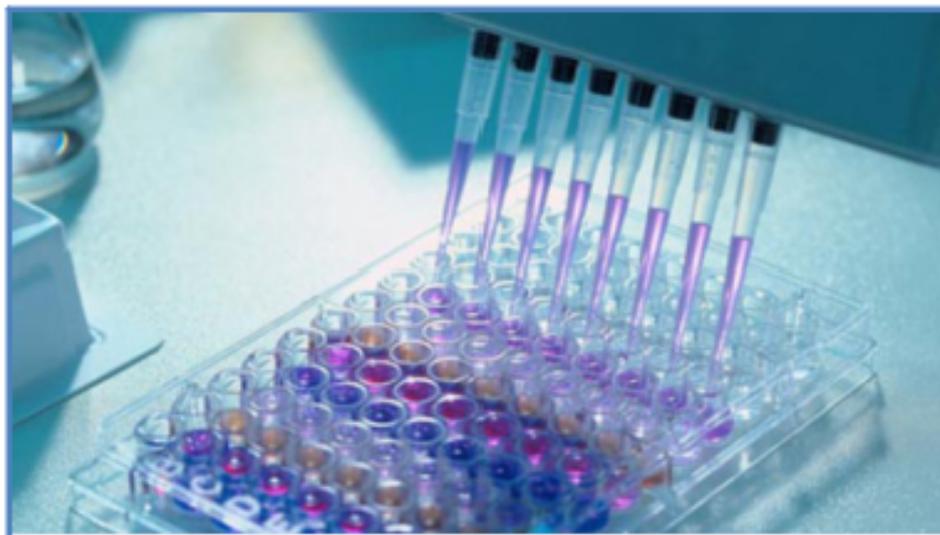
Brucellosi

IBR

BVD

Mycobacterium avium spp paratuberculosis

Virus Schmallenberg



Potenzialità del latte di massa

- Analisi microbiologiche (colturali e biomolecolari)

CBT e coliformi

Salmonella spp, Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni, VTEC

*Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Mycoplasma spp.
Prototheca spp.*

Germi mastidogeni ambientali ???





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Linee guida per il prelievo di campioni di latte di massa - **IL CIP 002**



Conservazione, trasporto e consegna



- POS CIP 005 INT *Isolamento e identificazione di microrganismi mastidogeni*
- POS CIP 001 INT *Mycoplasma spp (esame colturale)*
- POS CIP 012 INT *Prototheca spp, Prototheca zopfii, Prototheca wickerhamii (esame colturale - ricerca)*
- POS CIP 015 INT *Streptococcus agalactiae (esame colturale - ricerca)*
- POS CIP 016 INT *Staphylococcus aureus (esame colturale - UFC)*
- POS CIP 017 INT *Staphylococcus aureus (esame colturale - ricerca)*
- POS CIP 014 INT *Mycoplasma bovis, Mycoplasma agalactiae (PCR)*



POS CIP 005 INT *Isolamento e identificazione di microrganismi mastidogeni*

2007

Scopo: descrivere le modalità operative e le responsabilità per l'isolamento e l'identificazione di microrganismi mastidogeni



Riferimenti: Laboratory handbook on bovine mastitis (National Mastitis Council 1999)

Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th edition, 2004 OIE



POS CIP 005 INT Isolamento e identificazione di microrganismi mastidogeni

8.5: Identificazione di batteri GRAM positivi

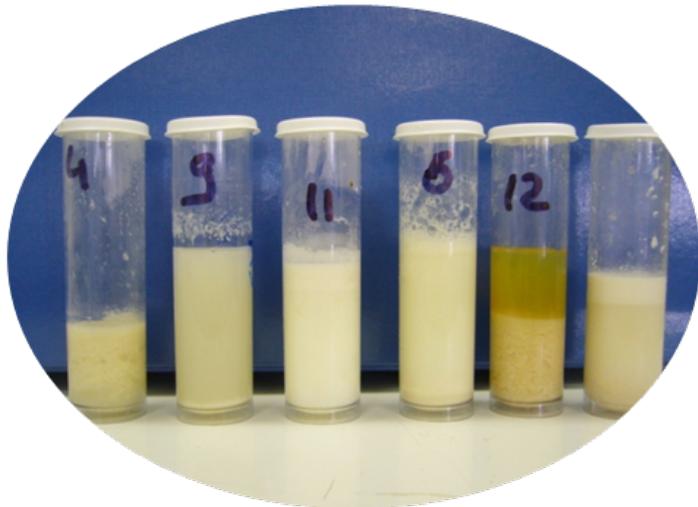
8.6: identificazione di batteri GRAM negativi

8.7: Altri microrganismi (Prototheca spp. e Mycoplasma spp.)



POS CIP 001 INT *Mycoplasma spp* (esame colturale)

Scopo: descrivere le modalità operative e le responsabilità per l'isolamento di microrganismi del genere *Mycoplasma spp* mediante esame colturale.



Mastiti cliniche
bovine: 1,5%
45/2946

Principio: si basa sull'isolamento del microrganismo su terreni selettivi ed in particolari condizioni di incubazione e la possibilità di identificarlo attraverso il riconoscimento di colonie con aspetto caratteristico.

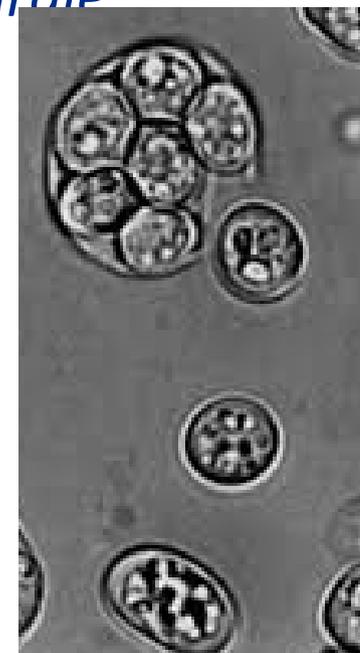
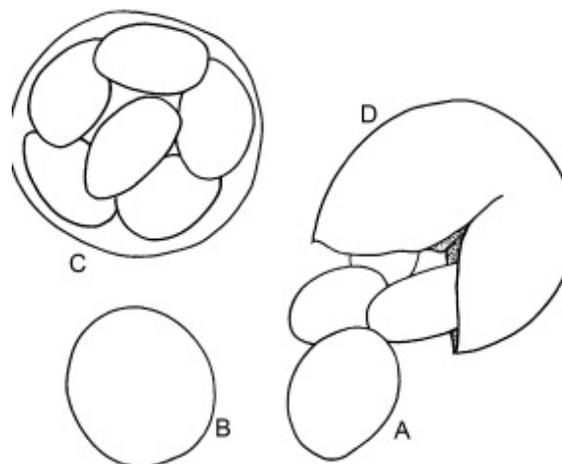


POS CIP 012 INT *Prototheca* spp, *Prototheca zopfii*, *Prototheca wickeramii* (esame colturale - ricerca)

Scopo: descrivere le modalità operative e le responsabilità per l'isolamento e l'identificazione di *Prototheca* spp, *Prototheca zopfii* e *Prototheca wickeramii* mediante esame colturale

Principio del metodo:

si basa sulla capacità di crescita dei microrganismi in oggetto attraverso appositi substrati nutritivi e la possibilità di identificarli univocamente attraverso l'osservazione della morfologia macroscopica e l'insieme di test biochimici.



POS CIP 012 INT *Prototheca* spp, *Prototheca zopfii*, *Prototheca wickerhamii* (esame colturale - ricerca)



POS CIP 012 INT *Prototheca* spp, *Prototheca zopfii*, *Prototheca wickerhamii* (esame colturale - ricerca)

API 20 C AUX
API 20 STREP

Specie	Test glucosio (GLU)	Test glicerolo (GLYG)	Test trealosio (TRE)
<i>P. zopfii</i>	+	+	-
<i>P. wickerhamii</i>	+	+	+
<i>P. spp</i>	+	-	-

GLYG!!!!

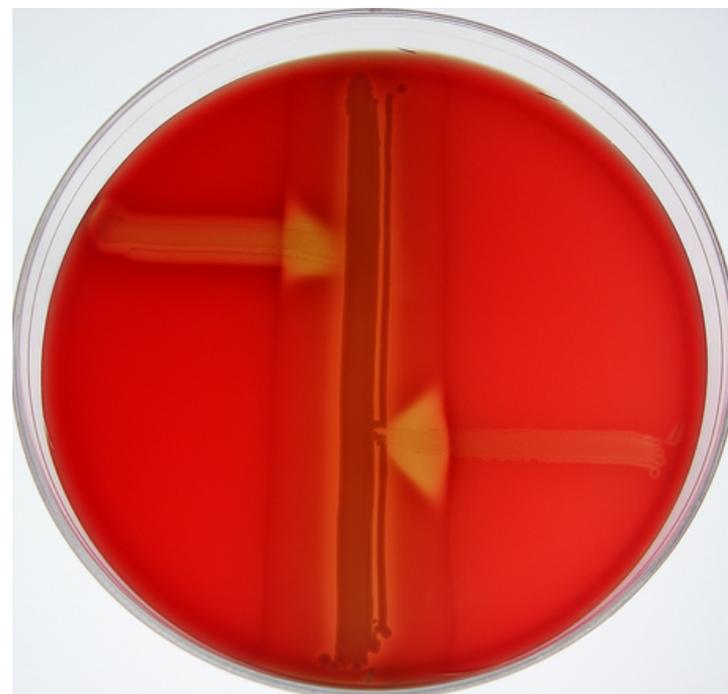


POS CIP 015 INT *Streptococcus agalactiae* (esame colturale - ricerca)

Scopo: descrivere le modalità operative e le responsabilità per l'isolamento e l'identificazione fenotipica di *S. agalactiae*

Principio del metodo:
si basa sull'isolamento del microrganismo in terreni non selettivi e selettivi differenziali.

- Esame microscopico
 - CAMP test
 - Test biochimici
- Tipizzazione sierologica (Streptococcal Grouping kit)



POS CIP 016 INT *Staphylococcus aureus* (esame colturale - UFC)

Scopo: descrivere le modalità operative e le responsabilità per la enumerazione di *S. aureus* mediante la conta di colonie su Baird Parker con plasma di coniglio e fibrinogeno (BP+RPF).

Principio del metodo:

Si basa sulla capacità del microrganismo di sviluppare la coagulasi su terreno solido selettivo

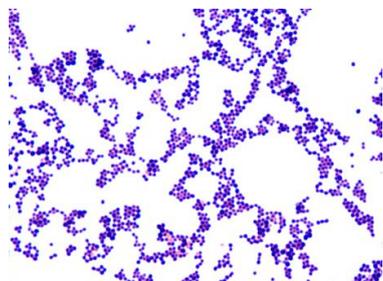


Predittività!!



POS CIP 017 INT *Staphylococcus aureus* (esame colturale - ricerca)

Scopo: descrivere le modalità operative e le responsabilità per la ricerca di *S. aureus* mediante semina diretta su terreno solido selettivo BP addizionato con plasma di coniglio e fibrinogeno (BP+RPF).



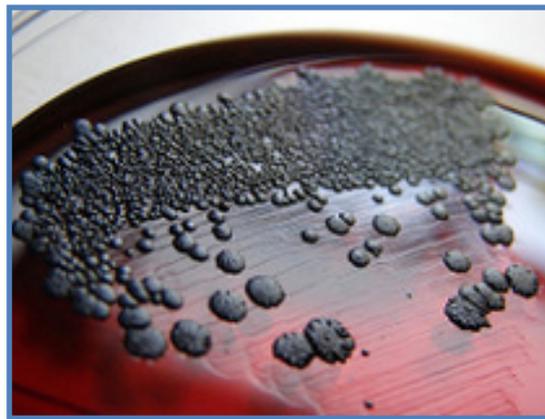
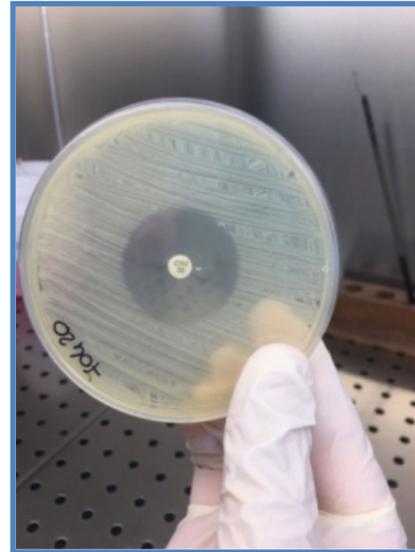
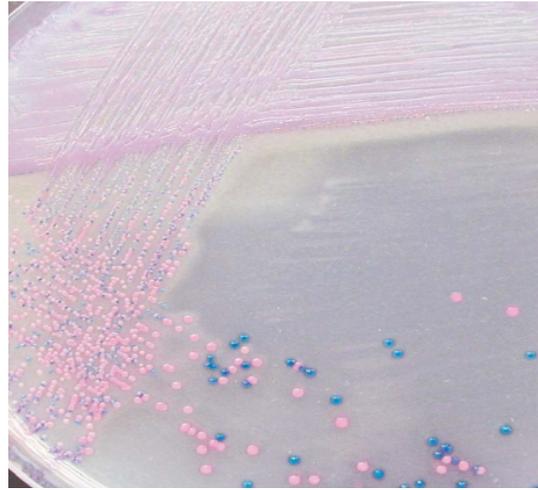
Principio del metodo:
Si basa sulla capacità del microrganismo di sviluppare la coagulasi su terreno solido selettivo





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

Procedure future

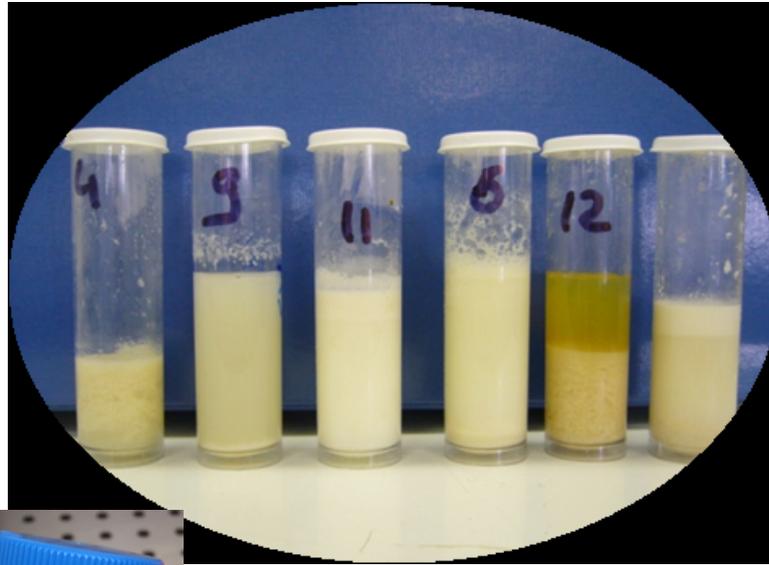
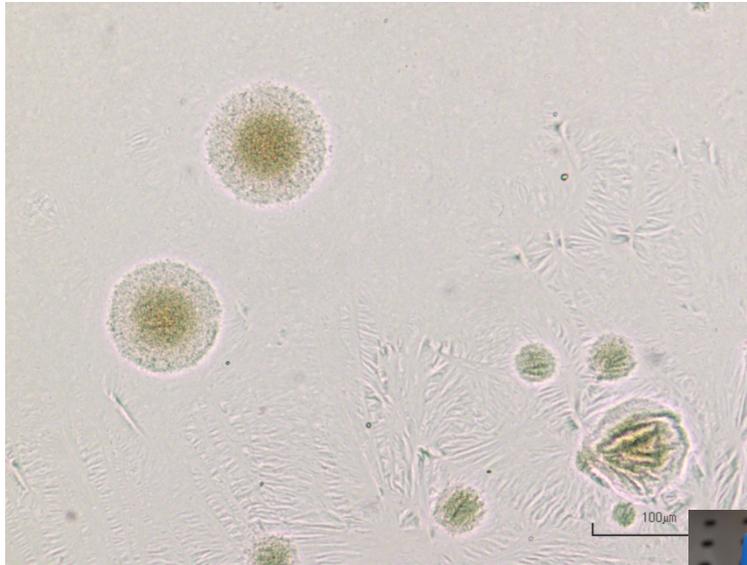




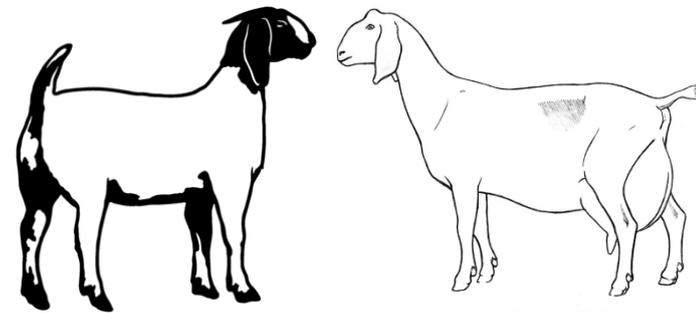
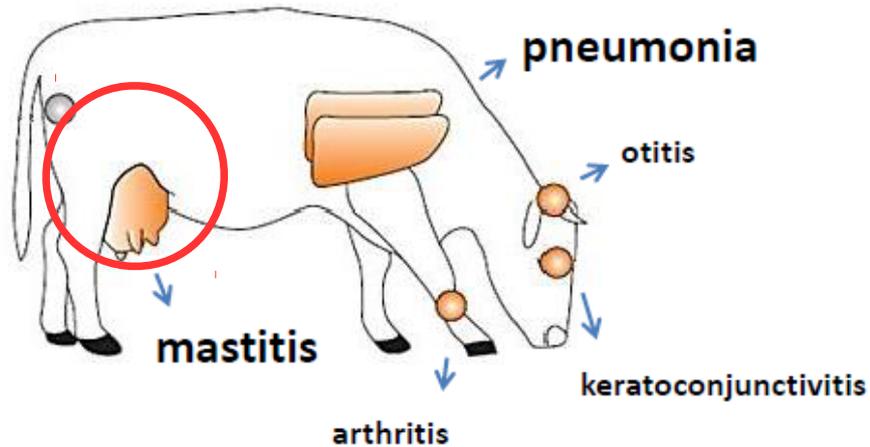
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



POS CIP 014 INT *MYCOPLASMA BOVIS*, *MYCOPLASMA AGALACTIAE* (PCR)



POS CIP 014 INT MYCOPLASMA BOVIS, MYCOPLASMA AGALACTIAE (PCR)



Micoplasmi mastitogeni

***M. bovis*,**

M. bovigentialium, *M. californicum*, *M. canadense*,

Micoplasmi mastitogeni

***M. agalactiae*,**

M. mycoides *subsp. mycoides*,
M. capricolum *subsp. capricolum*,
M. mycoides *subsp. capri*, *M. putrefaciens*





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

POS CIP 014 INT *MYCOPLASMA BOVIS*, *MYCOPLASMA AGALACTIAE* (PCR)

1. Estrazione DNA da latte

Refrigerazione

Centrifugazione
(specie nel latte ovino)

Scrematura





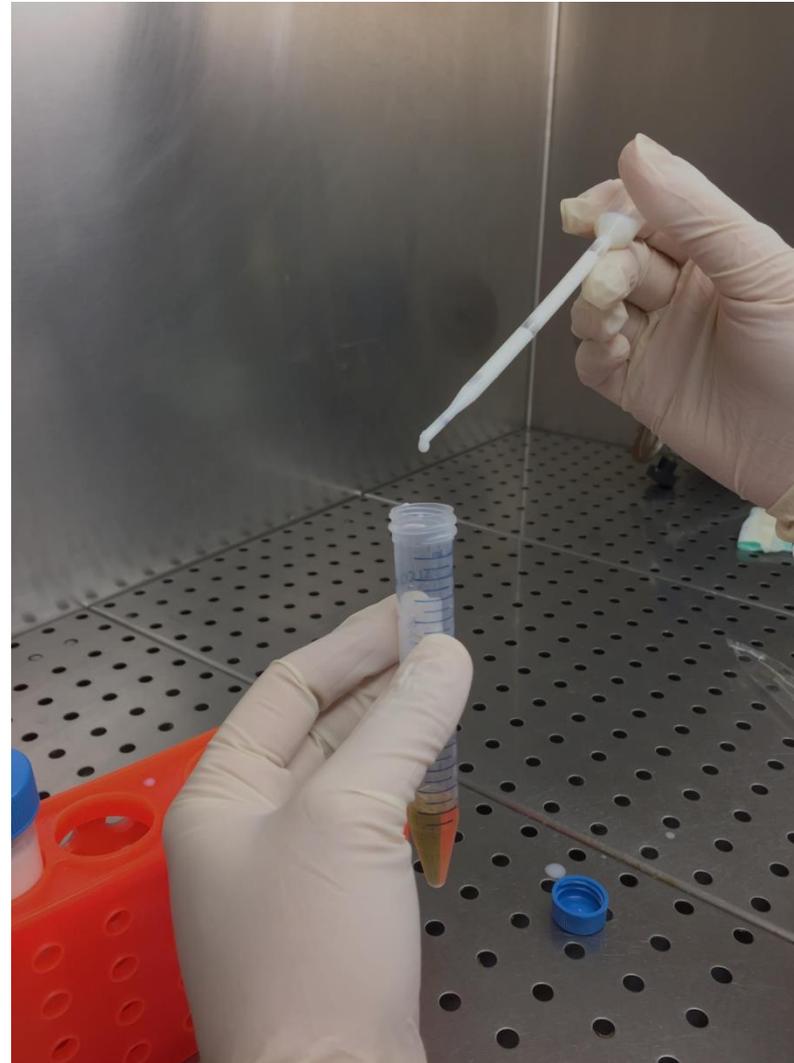
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

POS CIP 014 INT *MYCOPLASMA BOVIS*, *MYCOPLASMA AGALACTIAE* (PCR)

1. Estrazione DNA da latte

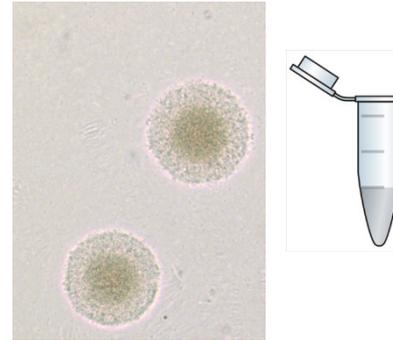
Allestimento brodocolture

Incubazione

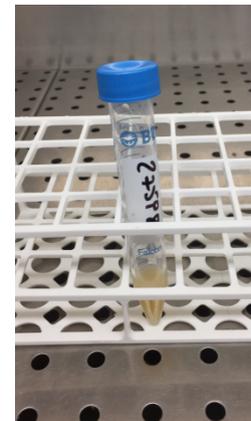


POS CIP 014 INT *MYCOPLASMA BOVIS*, *MYCOPLASMA AGALACTIAE* (PCR)

2. Estrazione DNA da colonia su HFMA



3. Estrazione DNA da brodocolture di HFMB



Centrifugazione e raccolta sovrinatante



POS CIP 014 INT *MYCOPLASMA BOVIS*, *MYCOPLASMA AGALACTIAE* (PCR)

Estrazione del DNA tramite legame alla membrana di silice (*Spin column*)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

POS CIP 014 INT *MYCOPLASMA BOVIS*, *MYCOPLASMA AGALACTIAE* (PCR)

Protocollo di amplificazione tratto da Foddai et al., 2005



Molecular and Cellular Probes 19 (2005) 207–212

Molecular
and Cellular
Probes

www.elsevier.com/locate/ymcpr

Rapid differential diagnosis of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* based on a multiplex-PCR and a PCR-RFLP

A. Foddai^a, G. Idini^a, M. Fusco^a, N. Rosa^a, C. de la Fe^b, S. Zinellu^a, L. Corona^a, S. Tola^{a,*}

^aIstituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna 'G. Pegreffi', Via Duca degli Abruzzi 8, 07100 Sassari, Italy

^bUnit of Epidemiology and Preventive Medicine, Veterinary Faculty, University of Las Palmas, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

Received 30 June 2004; accepted for publication 24 November 2004

96

Brief Communications

J Vet Diagn Invest 19:96–98 (2007)

Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR

Giovanna Masala,¹ Rosaura Porcu, Cinzia Daga, Stefano Denti,
Giuliana Canu, Cristiana Patta, Sebastiana Tola





POS CIP 014 INT *MYCOPLASMA BOVIS*, *MYCOPLASMA AGALACTIAE* (PCR)

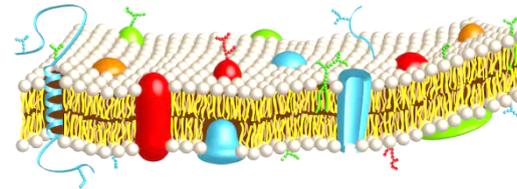
1. PCR per ricerca *M. bovis*: *end-point singola*

mb-mp81: gene codificante la lipoproteina di membrana (P80) specie-specifica appartenente a *M. bovis*

mb-mp1 F: 5'-TATTGGATCAACTGCTGGAT-3'

mb-mp1 R: 5'-AGATGCTCCACTTATCTTAG-3'

Amplificato: 447 bp



2. PCR per ricerca *M. agalactiae*: *end-point duplex*

ma-mp81: gene codificante la lipoproteina di membrana (P80) specie-specifica appartenente a *M. agalactiae*

ma-mp1F: 5'-AGCAGCACAAAACCTCGAGA-3'

ma-mp1R: 5'-AACACCTGGATTGTTTGAGT-3'

ma-mp2 F: 5'-GGTGTAGATCTCCTTGTTTC-3'

ma-mp2 R: 5'-TACTTAGCAGGATCCTTTGA-3'

Amplificati: 176 bp e 317 bp



POS CIP 014 INT *MYCOPLASMA BOVIS*, *MYCOPLASMA AGALACTIAE* (PCR)

2 Mix di reazione

1 Protocollo di amplificazione

Tabella 1: Preparazione della master mix e condizioni di reazione per la ricerca e/o identificazione di *M. bovis*

Mix di reazione (48µl) + DNA estratto (2 µl) = 50 µl		Protocollo di amplificazione	
Reagenti	Concentrazione finale		
dH ₂ O	/	94°C x 5'	1 ciclo
Buffer	1x		
MgCl ₂	1,5 mM	94°C x 1'	
dNTPs	0,2 mM	54°C x 1'	35 cicli
mb-mp1F	0,2 µM	65°C x 30''	
mb-mp1R	0,2 µM		
Taq Polimerasi	0,75U	68°C x 15'	1 ciclo

Tabella 2: Preparazione della master mix e condizioni di reazione per la ricerca e/o identificazione di *M. agalactiae*

Mix di reazione (48µl) + DNA estratto (2 µl)= 50 µl		Protocollo di amplificazione	
Reagenti	Concentrazione finale		
dH ₂ O	/	94°C x 5'	1 ciclo
Buffer	1x		
MgCl ₂	1,5 mM		
dNTPs	0,2 mM	94°C x 1'	
ma-mp1F	0,125 µM	54°C x 1'	35 cicli
ma-mp1R	0,125 µM	65°C x 30''	
ma-mp2F	0,2 µM		
ma-mp2R	0,2 µM	68°C x 15'	1 ciclo
Taq Polimerasi	0,75U		

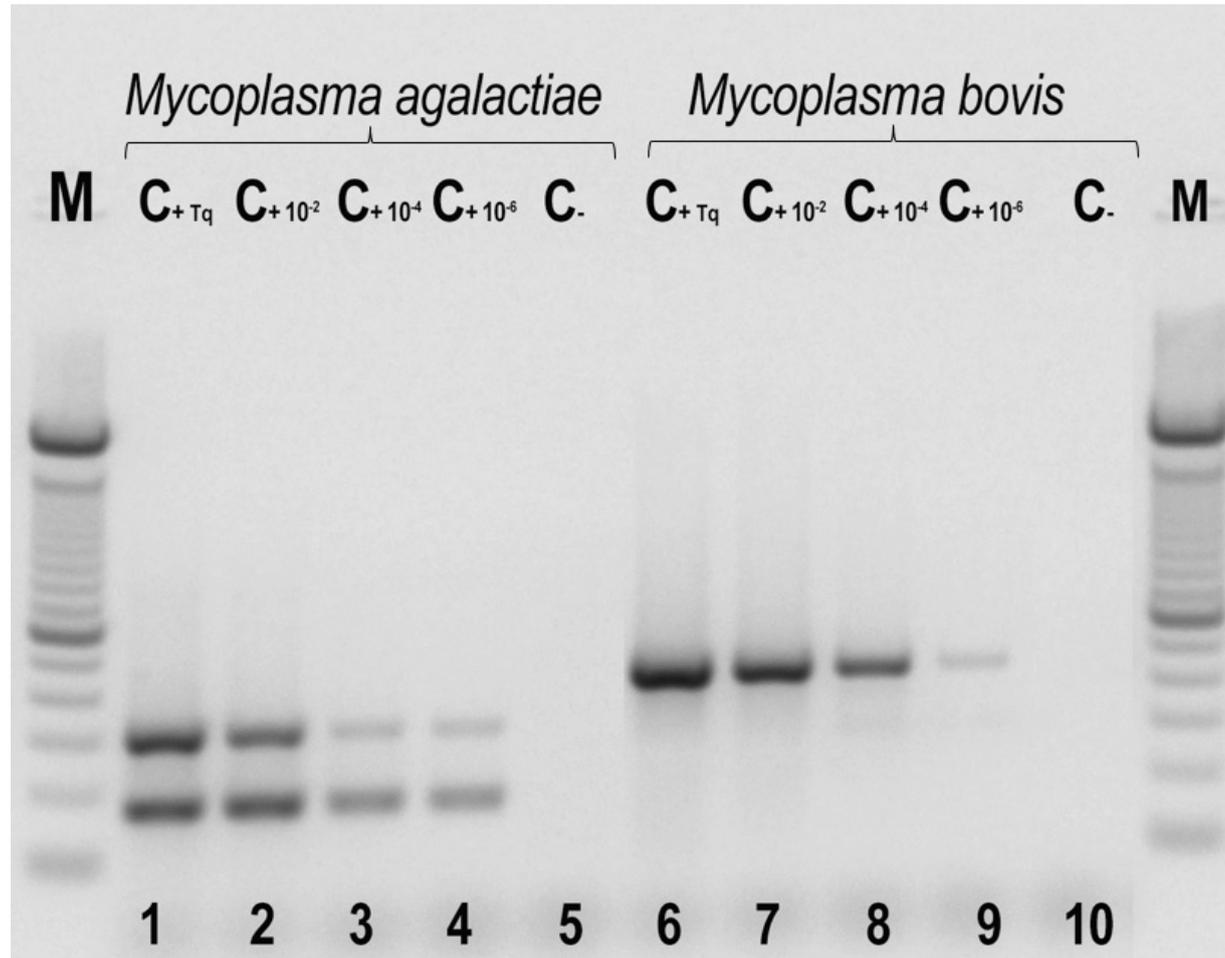


POS CIP 014 INT *MYCOPLASMA BOVIS*, *MYCOPLASMA AGALACTIAE* (PCR)

Corsa elettroforetica

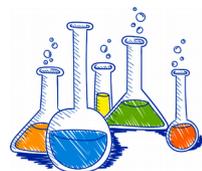
✓ C+ *M. agalactiae*
ATCC 35890

✓ C+ *M. bovis*
ATCC 25523



Ricerca Micoplasmi (PCR) - Obiettivi futuri

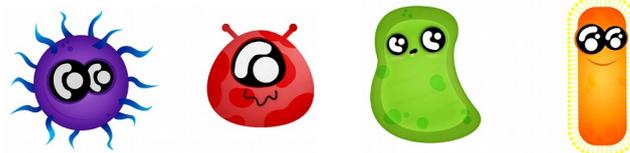
x **Revisione protocolli di amplificazione**



x **Estrazione DNA direttamente da latte**



x **Allestimento PCR altre specie di micoplasmi responsabili di mastite**





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

Grazie per l'attenzione

