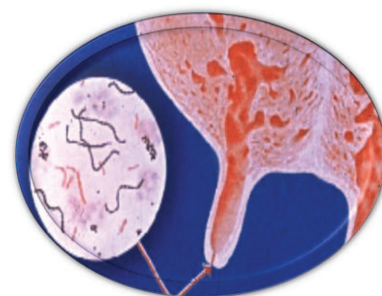


AGGIORNAMENTI SULLE ATTIVITA' DI DIAGNOSTICA DELLE MASTITI

Andreana Tammaro e Patrizia Pietrini





PREPARAZIONE E GESTIONE DELLA PROVA INTER-LABORATORIO PER LE MASTITI

Roma - 3 DICEMBRE 2020

*Andreana Tammaro -Patrizia Pietrini-
Giuseppina Giacinti*



SCOPI

- fornire ai laboratori partecipanti uno strumento di verifica delle prestazioni nella ricerca colturale di agenti mastidogeni in campioni di latte sia di massa che individuale/capezzolo
- individuare le criticità (Es. terreni di coltura - Kit ...)
- uniformare i rapporti di prova tra le diverse Sedi dell'IZSLT
- controllo da parte del laboratorio organizzatore riguardo alle procedure e modalità adottate per la organizzazione, preparazione, spedizione, gestione dei campioni e lo sviluppo delle modalità di elaborazione dei risultati

OBIETTIVI

- migliorare e integrare tale attività sfruttando la casistica, esperienza e confronto.



Modalità operative

- **Laboratori partecipanti IZSLT:** **Lazio Nord** (Viterbo, Rieti), **Lazio Sud** (Latina, Frosinone), **Toscana Nord** (Pisa), **Toscana Centro** (Firenze, Arezzo), **Toscana Sud** (Grosseto, Siena)



- **Frequenza:** annuale

- **Identificazione dei laboratori partecipanti:** codice numerico univoco (CM/01.....CM/08)

- **Identificativo campioni:** AAAA/01 e AAAA/02

RISERVATEZZA!!!



AVVISO CIRCUITO

Carissimi colleghi e colleghe,
questa settimana invieremo il Ring Test annuale per la Prova Inter-laboratorio Mastiti. Come descritto anche nella procedura allegata, i campioni dovranno essere analizzati entro 7 giorni dalla data di ricevimento, e la risposta inviata, per mail, entro il 1°dicembre. Questa prova l'abbiamo considerata come un'esercitazione del corso, i cui risultati saranno discussi nella seconda giornata. Vi ricordiamo in ultimo che i simulati non dovranno essere testati per la ricerca di *Mycoplasma spp* e *Prototheca spp*.

Il calendario delle spedizioni:

Sezione	Data spedizione
Latina	Martedì 17/11 Ritiro direttamente in Istituto Sede Roma
Rieti e Viterbo	Mercoledì 18/11
Grosseto, Firenze, Arezzo, Siena e Pisa	Mercoledì 18/11

Buon RingTest a tutti
Il Laboratorio di Diagnostica delle Mastiti



PROTOCOLLO OPERATIVO



ISTITUTO ZOOFILATTICO SPERIMENTALE
DELL'LAZIO E DELLA TOSCANA
"M. Aleandri"

SEDE CENTRALE - 00178 Roma Capannelle - Via Appia Nuova, 1411
Tel. (06) 790991 (centralino) - Fax (06) 79340724

UOS IGIENE DELLA PRODUZIONE DEL LATTE

Laboratorio accreditato n. 0201

Tel/FAX: 06.79099406

Tel mastiti: 06.79099455

E-mail: lane@izs.it

Roma 16/11/2020

PROTOCOLLO OPERATIVO PROVA INTERLABORATORIO

Materiale inviato:

- Simulato campione latte di massa: cod.: 20/01 latte sterile contaminato con agenti vitali mastidogeni congelato
- Simulato campione di capretto: cod.: 20/02 latte di sterile contaminato con agenti vitali mastidogeni congelato

1. Conservazione dei campioni

I campioni di latte congelati devono essere conservati alla temperatura di -20°C -5°C fino all'esecuzione della prova, da effettuare entro 7 giorni dalla data del ricevimento.

2. Modalità operative

- Scongelare i campioni a temperatura ambiente ed esaminarli nello stesso giorno
- Applicare le procedure in uso per la ricerca di agenti mastidogeni e la ricerca di agenti contagiosi
- Inserire i risultati nella tabella sottostante

Registrazione dei risultati

Data ANALISI	ID. CAMP.	ESITO	NOTE

Cod Sezione:

Inviare la tabella completa di risultati con codice identificativo entro martedì 1 dicembre all'indirizzo di posta elettronica: andrea.tammaro@izs.it



MODALITA' OPERATIVE CAMPIONE DI MASSA 01

Ricerca *S.aureus*: (conta) POS CIP 016 int

Allestire due diluizioni del campione di massa in PTW (-1 e -2); 1 cc di ogni diluizione viene seminato per inclusione con terreno BP-RPF.

Incubare a $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ con lettura 24-48h.

Ricerca *St.agalactiae*:(presenza/assenza) POS CIP 015 int

Allestire una diluizione alla -1 in PTW del campione di massa.

Seminare 0,1 cc di latte tal quale (dil.-1) e 0,1cc della diluizione -1 (dil.-2) su una piastra di terreno agar sangue e una di terreno EMM per spatolamento.

Incubare a $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ con lettura 18-24h.

Ricerca *Prototheca spp,Prototheca zopfii,Prototheca wickerhamii*:(presenza/assenza) POS CIP 012 int (rev...)

Seminare 0,1 cc di latte tal quale (-1) in una piastra di terreno PIA per spatolamento. Incubare a $(30 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ con lettura a 72-96h.



MODALITA' OPERATIVE CAMPIONE DI CAPEZZOLO 02

Ricerca agenti mastidogeni POS CIP 005 INT

Seminare 10 μ L per strisciamento con ansa sterile sulla superficie del terreno AS e 10 μ L su terreno EMM

Incubare a (37 \pm 1) $^{\circ}$ C per 24h in aerobiosi

In assenza di crescita reincubare per altre 24h nelle stesse condizioni

NB: in caso di campioni di latte mastitico si procede alla semina tramite tampone sterile imbibito di latte in esame sui terreni AS ed EMM e in brodo BHI. Incubare a (37 \pm 1) $^{\circ}$ C per 24h. In assenza di crescita a 24h dalla prima semina (diretta) seminare partendo dal brodo BHI nuovamente in AS ed EMM (indiretta).

In caso di richiesta per *S.agalactiae*, *S.aureus*, *Mycoplasma spp.*, *Prototheca spp.* applicare le procedure specifiche:

POS CIP 015 INT

POS CIP 017 INT

POS CIP 012 INT

POS CIP 001 INT

POS CIP 014 INT



CAMPIONI DI PROVA

Sono **preparati** dal laboratorio mastiti seguendo un protocollo interno

Sono **controllati** periodicamente prima e dopo la spedizione per verificare la stabilità e idoneità (purezza e vitalità)

Sono a **disposizione** dei partecipanti per eventuali problemi fino a una settimana dopo la comunicazione del Report finale (previo controllo di vitalità e purezza da parte del laboratorio organizzatore)

Devono essere **analizzati** attenendosi alle procedure emesse dalla DO CIP per le varie tipologie



VALUTAZIONE DEGLI ESITI

Dopo aver eseguito la prova i partecipanti comunicano i risultati inviandoli via e-mail.

Gli organizzatori responsabili delle prove discutono i risultati ed elaborano il **Report finale** inviandolo ai partecipanti.

NB: è possibile da parte dei partecipanti richiedere un nuovo invio in caso di esito non conforme





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

RISERVATEZZA/ASSISTENZA

- al fine di garantire la riservatezza ad ogni partecipante viene associato un **CODICE di laboratorio**.
- Il codice è strettamente riservato e viene comunicato esclusivamente ai contatti degli interessati e può essere **periodicamente cambiato** degli organizzatori .
- Il laboratorio mastiti rimane a disposizione per qualsiasi informazione prima, durante e dopo l'esecuzione del circuito, **SEMPRE**.



CAMPIONI PROVA (simulati)

► *Matrice:*

-Latte pastorizzato o crudo sterilizzato in autoclave

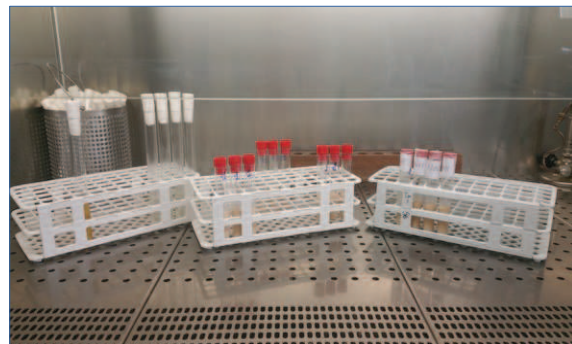
► *Ceppi batterici*

- ceppi ATCC, ceppi provenienti da isolati VLA, ceppi di campo da ceppoteca laboratorio mastiti

► *Tipologia campione:*

-massa

-individuale/capezzolo





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

PREPARAZIONE

Campione massa

viene preparato un simulato cercando di ricreare un campione il più possibile simile alle masse aziendali (presenza di uno o più ceppi “contagiosi” e/o “ambientali”). A tale scopo bisogna applicare le procedure:

- **POS CIP 015 INT**
- **POS CIP 016 INT**
- **POS CIP 012 INT (nuova REV)**



PREPARAZIONE

Campione individuale/ capezzolo

viene preparato inquinando la matrice con uno o più ceppi batterici responsabili di mastite scelti considerando diversi aspetti:

-ceppi con particolari caratteristiche, frequenza di isolamenti, criticità passate..

-verifica interferenze e tipologia di crescita

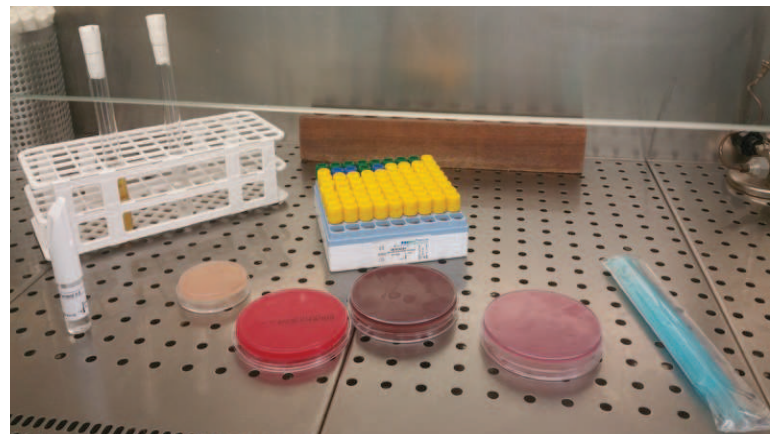
➤ POS CIP 005 INT

➤ POS CIP 015 INT

➤ POS CIP 017 INT

➤ POS CIP 012 INT (nuova REV)

➤ POS CIP 001 INT





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

**Matrice Latte
sterilizzato**

Ceppo
batterico
0,5MF in SF

Serie di
provette con
SF diluizioni
scalari

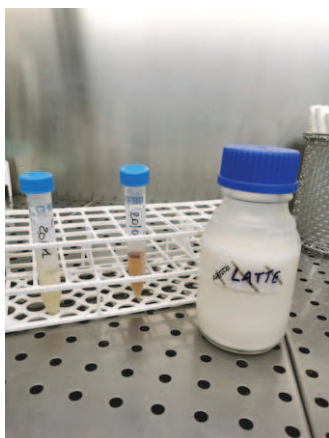
Semina su terreno idoneo in
piastra (scelta
concentrazione)

Inoculo della matrice in
provette (per prove
preliminari)

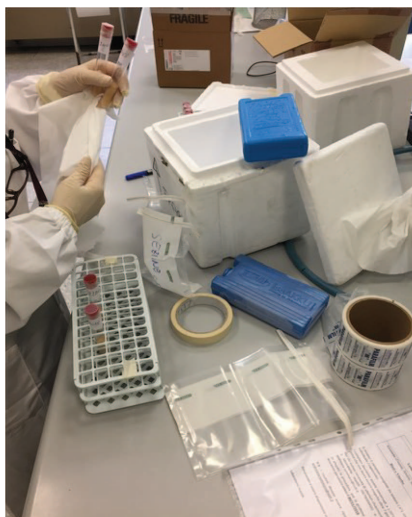
Allestimento del
simulato con 1 o più
ceppi batterici

Simulato aliquotato in
provette (n° 20-30)

Stoccaggio ed
etichettatura
dell'aliquote in
provetta



STOCCAGGIO e CONSERVAZIONE (congelatore a -20°C)

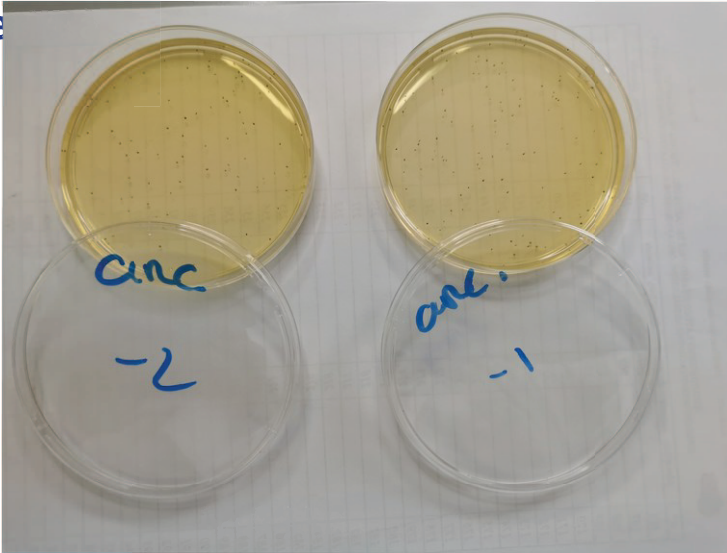
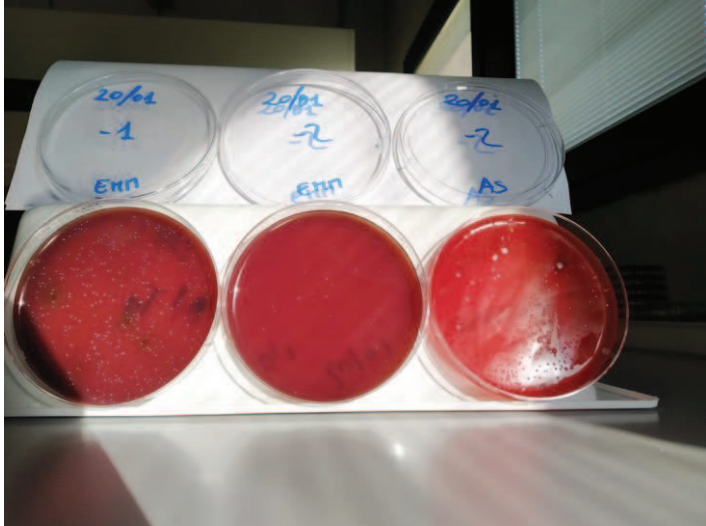


SPEDIZIONE (corriere/autisti)

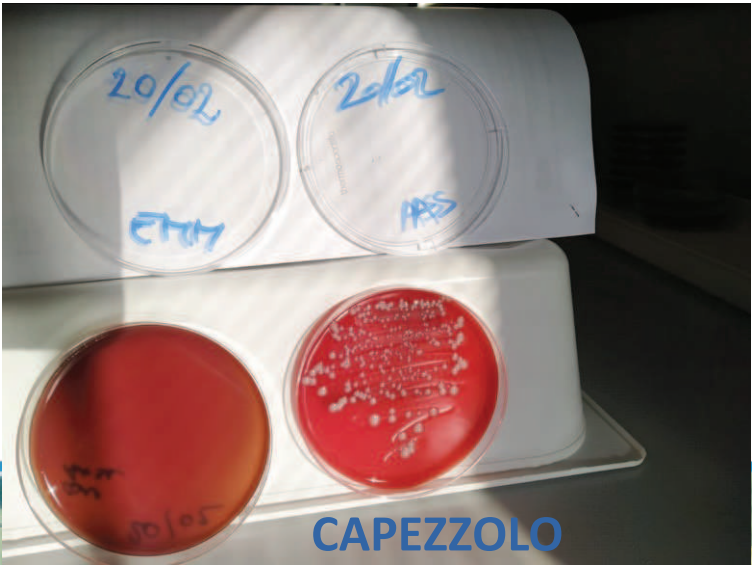
- procedure sicurezza
- procedure accettazione



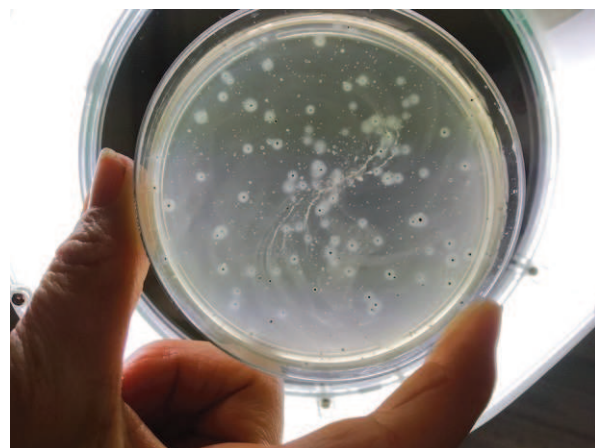
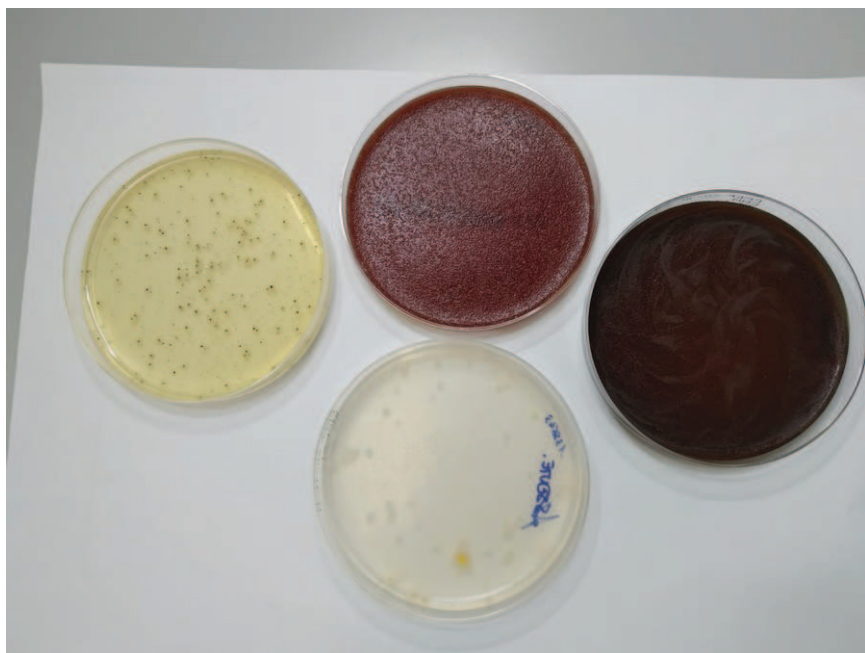
CONTROLLI PERIODICI Prove di vitalità-ste



Data	Esito campione 01 MASSA	Esito campione 02 CAPEZZOLO
12/11/2020	conforme	conforme
17/11/2020	conforme	conforme
23/11/2020	conforme	conforme
01/12/2020	conforme	conforme



**Ma può anche
accadere...**



**...se necessario fare
un isolamento con
triplo striscio!**



Revisione procedura POS CIP 012 **conta ufc**
Revisione procedura POS CIP 005
Revisione procedura POS CIP 014
IN STESURA POS MSSA MRSA

Stesura procedura circuiti interlaboratorio..
Estensione alle mastiti ovi-caprine



Formazione del personale alla preparazione
e organizzazione dei circuiti

PG FOD 001/1 rev. 17

I.Z.S.I.T. "M. Aleandri"

p. 1 di 3

SCHEDA DI ADDESTRAMENTO

Nominativo

Struttura di appartenenza

Ruolo

Divulgare il nostro circuito ad altri IZS



BOZZA REVISIONE PROCEDURA

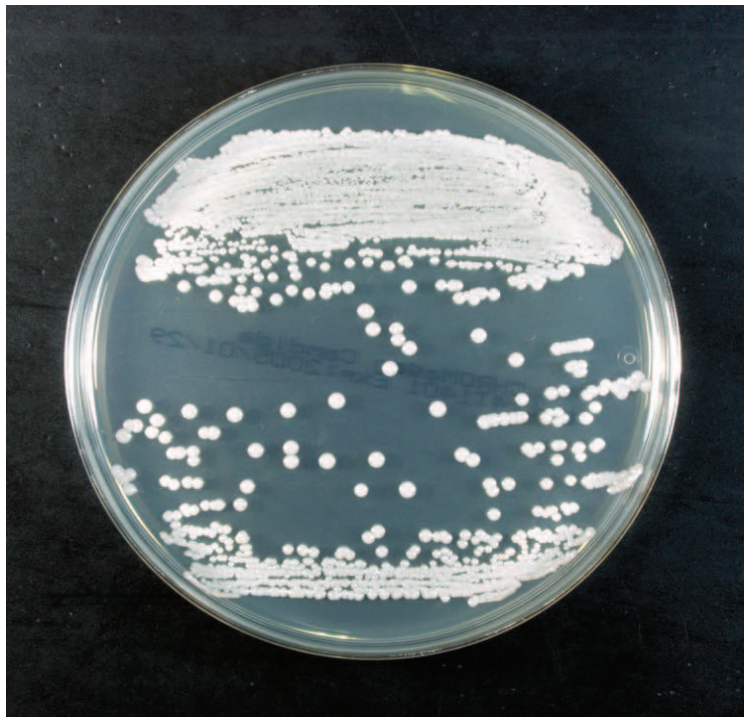
in attesa di pubblicazione

PROTOTHECA SPP, PROTOTHECA ZOPFII, PROTOTHECA WICKERAMII
(ESAME CULTURALE - RICERCA E CONTA UFC)

Rev.	Data di emissione:	Redazione Incaricato Struttura	Verifica Responsabile della prova/Responsabile taratura/attività	Convalida Qualità	Approvazione Responsabile di Struttura
		G. Giacinti	G. Giacinti	S. Amatiste	
03	21/12/2017	A. Tammaro	G. Giacinti	S. Amatiste	S. Guzzo
02	28/02/2014	G. Giacinti	S. Amatiste	S. Amatiste	S. Guzzo
Revisione modalità operative		Estensione dell'espressione del risultato- Ri-validazione Aggiornamento documenti di riferimento			
Aggiornamento modalistica		Aggiornamento in base al modulo per la stesura delle POS MOD 016 rev. 1			



Metodi conservazione ceppi



Gestione ceppoteca batterica

1	N.REG.	PROG.	T.-CAMP.	SPECIE	ISOLATO	AZIENDA	PROV.	ABG	NOTE	DATA	MB	ALTRO
20	10127	1	capezzolo	ovino	s.aureus	ALBA	RM	NO	BH+	03-feb	19	S
21	10127	2	capezzolo	ovino	s.aureus	ALBA	RM	NO	BH+	03-feb	20	S
22	11597	1	capezzolo	bovino	scn	VERA	RM	SI	AH+	06-feb	21	MASTITE
23	15995	16	individuale	bovino	suberis	VERA	VT	SI	zuccheri	21-feb	22	MASTITE
24	13235	2	individuale	bovino	serratia	VERA	VT	SI		13-feb	23	MASTITE
25	13235	1	individuale	bovino	s.aureus	VERA	VT	NO	BH+	13-feb	24	MASTITE
26	13307	212	capezzolo	bovino	scn	VERA	RM	SI - mic		13-feb	25	mic
27	15428	111	capezzolo	bovino	s.dysgalactiae	VERA	RM	SI	zuccheri	19-feb	26	
28	15492	1	individuale	ovino	suberis	VERA	RM	SI	zuccheri	20-feb	27	MASTITE
29	16389	7	individuale	bovino	e.coli	VERA	RM	SI	H-	20-feb	28	MASTITE
30	15492	3	individuale	ovino	s.galactiae	VERA	RM	SI	H-	20-feb	29	MASTITE
31	15154	4	individuale	ovino	e.coli	VERA	VT	SI	H-	21-feb	30	MASTITE
32	16389	10	individuale	bovino	suberis	VERA	RM	SI	zuccheri	21-feb	31	MASTITE
33	14725	31	capezzolo	bovino	s.aureus	VERA	RM	NO	CEFOX S	24-feb	32	
34	17198	1	capezzolo	bufalino	t.pyogenes	VERA	FR	SI		25-feb	33	MASTITE
35	17198	2	capezzolo	bufalino	suberis	VERA	FR	NO		25-feb	34	
36	15995	3	capezzolo	bovino	pseud.luteola	VERA	VT	NO	api	25-feb	35	
37	17779	3	capezzolo	ovino	s.aureus	VERA	GR	NO		28-feb	36	MASTITE
38	17779	2	capezzolo	ovino	suberis	VERA	GR	SI		03-mar	37	MASTITE
39	19186	106	individuale	bovino	s.aureus	VERA	RM	NO	MRSA	03-mar	38	R mrsa
40	17779	1	massa	ovino	s.aureus	VERA	GR	NO	BH+	03-mar	39	
41	20641	1	capezzolo	bovino	s.aureus	VERA	VT	NO	S MEC-	04-mar	40	MASTITE
42	20643	1	capezzolo	bovino	s.aureus	VERA	VT	NO	S MEC-	04-mar	41	MASTITE
43	19185	1	massa	bovino	s.aureus	VERA	RM	NO		09-mar	42	
44	21078	112	capezzolo	bovino	suberis	VERA	RM	SI		05-mar	43	
45	20698	57	individuale	bovino	s.aureus	VERA	RM	NO	coag. pos.	09-mar	44	mec-
46	20698	114	individuale	bovino	s.aureus	VERA	RM	NO	coag. pos.	09-mar	45	mec-
47	20698	163	individuale	bovino	s.aureus	VERA	RM	NO	coag. pos.	09-mar	46	mec-





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Gestione ceppoteca batterica - abg

MB	ALTRO	amp	kan	enr	tetra	ceft	gent	amika	chlor	amoxi/cl	penicill	eryt	clinda	trim/sulf	rifamp	florfen
10	MASTITE	s	s	s	s	s	s	s	s	s						
11	MASTITE															
12																
13		s			s	s					s	s	s	r		
14	CEFOX S															
15	mic			s	s	s	s		s		s	s	s	s	s	
16	atipico	s	s	s	s	s	s	s	s	s				s		
17	CEFOX S															
18	pcr fem+ mec+															
19	S															
20	S															
21	MASTITE			s	s	s	s		s		r	s	s	s	s	
22	MASTITE	s			s	s					s	s	s			
23	MASTITE	r	s	s	r	s	s	s	s	r						
24	MASTITE															
25	mic															
26		s			r	s					s	r	r			
27	MASTITE	s			s	s					s	s	s	s		
28	MASTITE	s	s	s	s	s	s	s	s	s						
29	MASTITE	s			s	s					s	s	s	s		
30	MASTITE	s	s	s	s	s	s	s	s	s						
31	MASTITE	s			s	s					s	s	s			



Gestione ceppoteca Prototheca e miceti

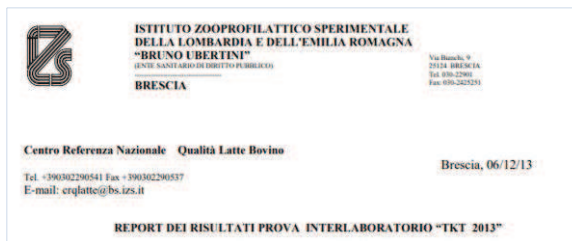
1	MB	AZIENDA	N.REG.	Anno	Tipo campione	quarto	SPECIE	AUX	NOTE	terreno
118	117	Agropoli	80980	2018	individuale		bovino	Candida pelliculosa		SB
119	118	Agropoli	82954/189	2018	individuale		bovino	P.zopfii		PIA
120	119	Agropoli	82954/190	2018	individuale		bovino	P.zopfii		PIA
121	120	Agropoli	82954/191	2018	individuale		bovino	P.zopfii		PIA
122	121	Agropoli	82954/192	2018	individuale		bovino	P.zopfii		PIA
123	122	Agropoli	96515	2018	massa		bovino	P.wickerhamii		PIA
124	123	Agropoli	98372	2018	massa		bovino	P.wickerhamii	API AUX	PIA
125	124	Agropoli	102445	2018	individuale		bovino	P.wickerhamii	API AUX	PIA
126	125	Agropoli	102927	2018	individuale		bovino	P.zopfii	API AUX	PIA
127	126	Agropoli	102927	2018	individuale		bovino	P.ZP	API AUX	PIA
128	127	Agropoli	17754	2019	individuale		bovino	Candida ciferii	SB	SB
129	128	Agropoli	41031	2019	massa		bovino	P.zopfii		PIA
130	129	Agropoli	41858/67	2019	individuale		bovino	P.zopfii		PIA
131	130	Agropoli	41858/93	2019	individuale		bovino	P.zopfii		PIA
132	131	Agropoli	36494/1	2019	capezzolo	1\1	bovino	Candida Famata	SB	SB
133	132	Agropoli	63931	2019	massa		bovino	P.zopfii		PIA
134	133	Agropoli	70210/9	2019	individuale		bovino	P.wickerhamii	API AUX	PIA
135	134	Agropoli	70211	2019	massa		bovino	P.wickerhamii	API AUX	PIA
136	135	Agropoli	85322	2019	individuale		bovino	P.zopfii	API AUX	PIA
137	136	Agropoli	85323/1	2019	massa		bovino	P.wickerhamii		PIA
138	137	Agropoli	91218/71	2019	individuale		bovino	P.zopfii		PIA
139	138	Agropoli	94335	2019	capezzolo	1\2	bovino	P.zopfii		PIA
140	139	Agropoli	92532	2019	capezzolo	6\1	bovino	Cryptococcus Laurentii	API	SB
141	140	Agropoli	100961/1	2019	individuale		bovino	P.zopfii	SB	PIA
142	141	Agropoli	100962/2	2019	individuale		bovino	P.zopfii	SB	PIA
143	142	Agropoli	9458	2020	capezzolo	2\2	bovino	P.zopfii	SB	PIA
144	143	Agropoli	11553	2020	massa		bovino	P.zopfii	SB	PIA
145	144	Agropoli	11554	2020	massa		bovino	P.zopfii	SB	PIA
146	145	Agropoli	20019750/13	2020	individuale		bovino	P.zopfii		PIA
147	146	Agropoli	20019750/20	2020	individuale		bovino	P.zopfii		PIA



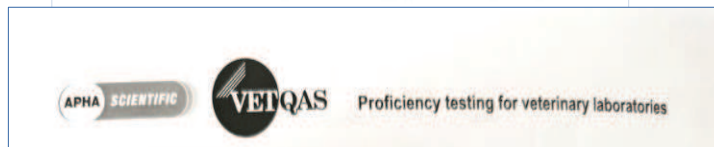
DATA / FIRMA	N°REG	SPECIE	TIPOLOGIA CAMPIONE				N° CAMP	N° SOG	BAT	AUR	AGA	Myc pcr	Myc colt	PROT	*CELL	VUOTI	AZIENDA	NOTE
			MAS	CAPZ	IND	MAST												



Anche il laboratorio mastiti si confronta...



S. agalactiae



Ricerca agenti mastidogeni



Mastopatie ovi-caprine

...con questo ed altro...



RISULTATI ATTESI...

20/01 CAMP LATTE DI MASSA	20/02 CAMP LATTE CAPEZZOLO
<p>Staphylococcus aureus < 10 ufc/ml</p> <p>Streptococcus agalactiae PRESENTE</p>	<p>Klebsiella pneumoniae PRESENTE</p>





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

Domande frequenti:

- **Come eseguire la semina.. quali diluizioni per la massa?**
- **Perché non usare dei kit o terreni cromogeni per la diagnosi?**
- **Negli esiti del campione di massa inserire tutto quello che cresce?**
- **Non riesco a terminare la tipizzazione per mancanza di materiali**

...altre domande?





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

- **ABG:** modalità univoca per tutto il territorio Lazio e Toscana di gestione della tariffazione dell'antibiogramma
- **Progetto mastiti:** possibilità di un modello di adesione per le aziende, da considerare un eventuale impegno da parte dell'allevatore (controllo mastiti cliniche, controllo post-trattamento ecc).
- **Programmare** corso dedicato all'asciutta selettiva
- **Aumentare** la frequenza dei circuiti relativamente al latte di massa
- **Necessità** di valutare una modalità diversa dell'espressione del risultato per il latte di massa: *S. aureus*
- **Referente/i** per la diagnostica delle mastiti
- Liste di lavoro
- Previsione annuale Agar Sangue acquistato
- **ESERCITAZIONE:**
- Simulato di capezzolo OK
- Criticità per il latte di massa



**GRAZIE PER L'ATTENZIONE
E PER LA PARTECIPAZIONE!**

