



**Associazione Regionale Allevatori della Lombardia**

**Via Kennedy, 30 – Crema CR**

**[www.aral.lom.it](http://www.aral.lom.it) [info@aral.lom.it](mailto:info@aral.lom.it)**

**Tel. 0373-897011**

**Dipartimento di Medicina Veterinaria**

**Via Celoria, 10 – Milano Mi**

**[www.veterinaria.unimi.it](http://www.veterinaria.unimi.it) [francesca.dellorco@unimi.it](mailto:francesca.dellorco@unimi.it)**

**Innovazione in laboratorio: impiego della qPCR  
per il monitoraggio dei mastitogeni contagiosi**

*Nicoletta Rizzi - ARAL, Francesca Dell'Orco - UniMI*



## **Valorizzazione dei campioni dei controlli funzionali**

**Controllo e prevenzione della mastite: utilizzo della tecnica PCR**

# PERCHE' LA qPCR?

LATTE DI  
MASSA

CON  
CONSERVANTE

4 PATOGENI  
IN UN'UNICA  
ANALISI



# MASTITIS qPCR

**STAPHYLOCOCCUS  
AUREUS**

**STREPTOCOCCUS  
AGALACTIE**

**PROTOTHECA**

**MYCOPLASMA BOVIS**



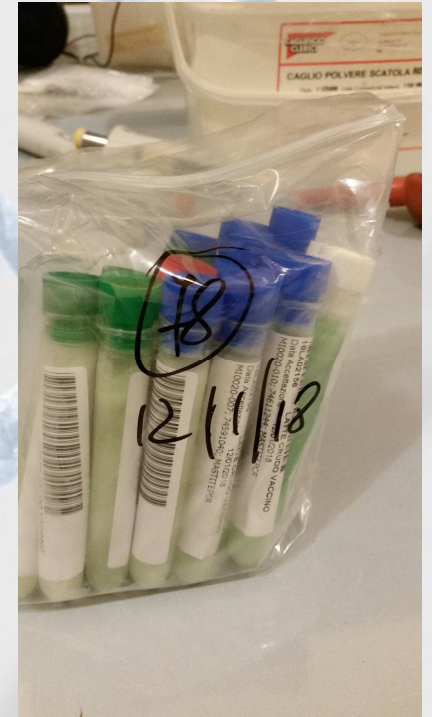
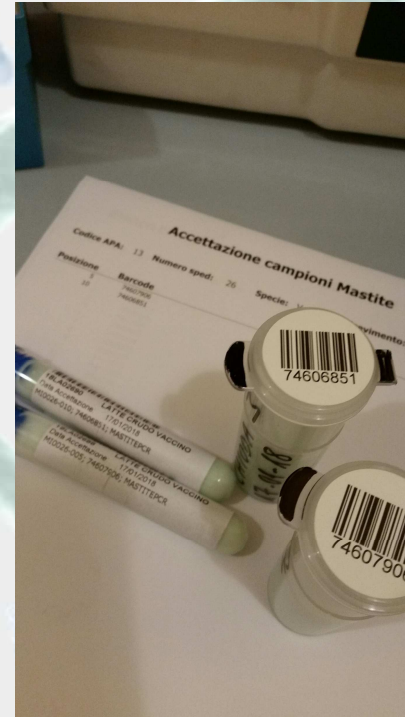
**ALLEVAMENTI  
DELLE  
PROVINCIE DI  
MILANO,  
VARESE,  
COMO, PAVIA**

**631 ALLEVAMENTI**

**CIRCA 5 MESI**

**3 RIPETIZIONI**

**1841 ANALISI**





# ALTRI VANTAGGI DELLA qPCR

**TEMPI**

**COSTI**



**BATTERIOLOGICO**

**3 GIORNI**

**MYCOPLASMA**



**TEMPI**

**MICROBIOLOGIA SU  
TERRENO SPECIFICO**

**AUREUS - AGALACTIE 3 gg.**

**PROTOTECA 2 gg.**

**MYCOPLASMA 10 gg.**





**COSTO  
A  
CAMPIONE**

**BATTERIOLOGICO**

**7,40 EURO**

**MICROBIOLOGIA SU  
TERRENO SPECIFICO**

**11,60**

# qPCR → LATTE DI MASSA

**TEMPI**

**POCHE ORE**

**COSTO**

**BASSO**



**Mastit?**  
**PREVENT with**  
**LOW cost**  
**in**  
**LOW time**





**A.R.A.**  
LOMBARDIA



**Associazione Regionale Allevatori della Lombardia**

**Via Kennedy, 30 – Crema CR**

**[www.aral.lom.it](http://www.aral.lom.it) [info@aral.lom.it](mailto:info@aral.lom.it)**

**Tel. 0373-897011**

**Dipartimento di Medicina Veterinaria**

**Via Celoria, 10 – Milano Mi**

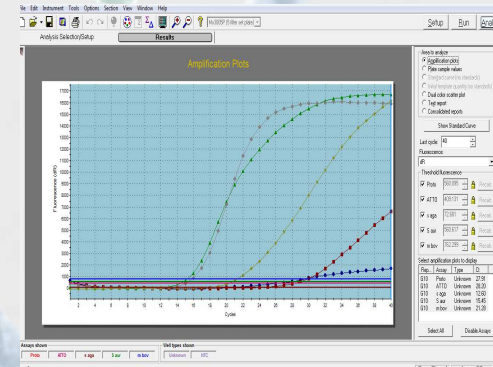
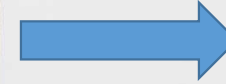
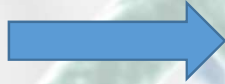
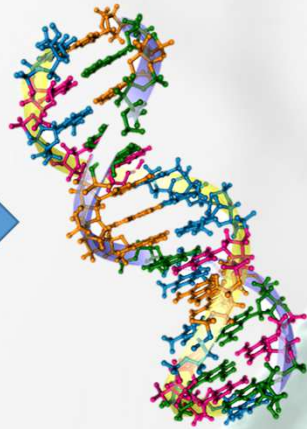
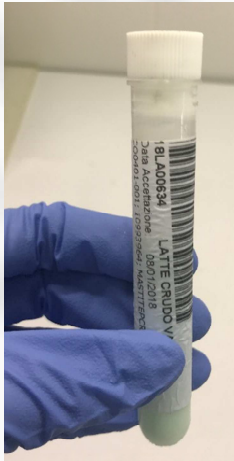
**[www.veterinaria.unimi.it](http://www.veterinaria.unimi.it) [francesca.dellorco@unimi.it](mailto:francesca.dellorco@unimi.it)**

**Innovazione in laboratorio: impiego della qPCR  
per il monitoraggio dei mastitogeni contagiosi**

*Nicoletta Rizzi - ARAL, Francesca Dell'Orco - UniMI*



# Workflow



Estrazione del DNA

qPCR

Analisi dei risultati

## Mastite qPCR



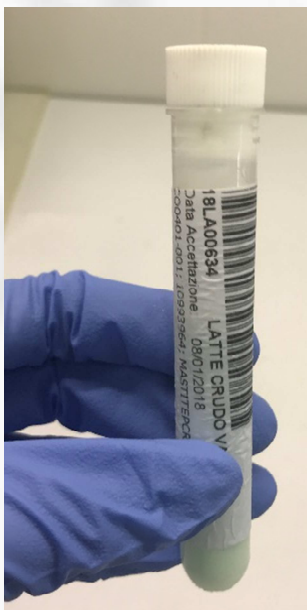
# Estrazione del DNA

500  $\mu$ l di latte di massa

Kit di Estrazione  
Mastite qPCR

DNA

1 h  
45 min





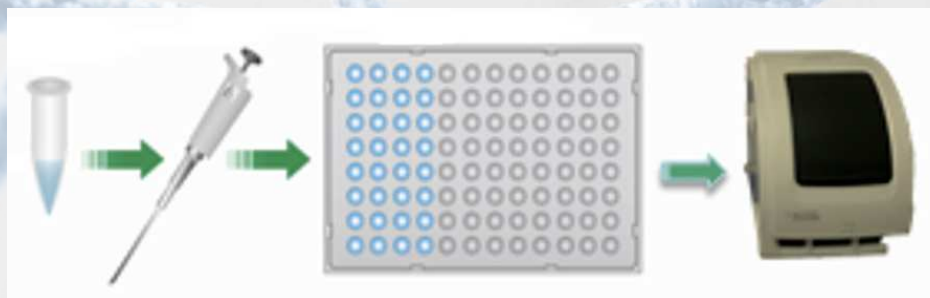
# qPCR

**52 min**

DNA

Kit  
Mastite qPCR

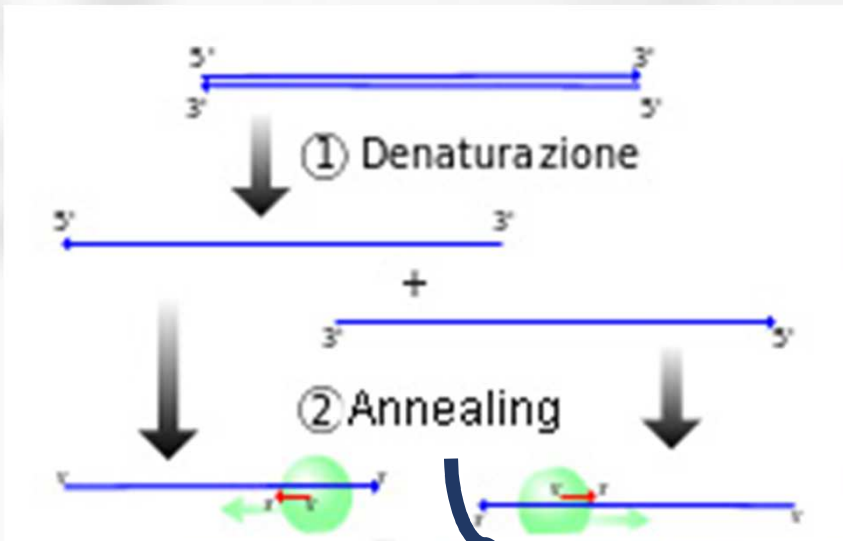
- *Streptococcus agalactiae*
- *Staphylococcus aureus*
- *Prototheca*
- *Mycoplasma bovis*





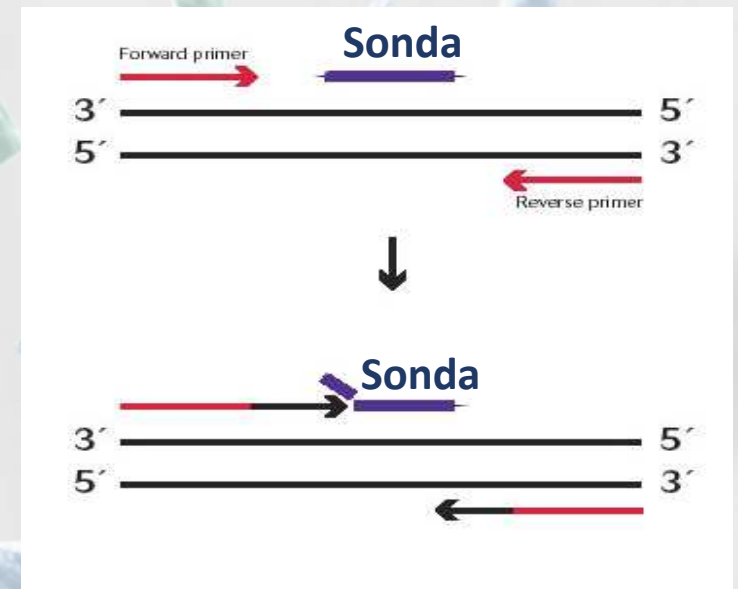
# qPCR: Principio

qPCR si divide in due passaggi:



Ripetuto per 40 cicli

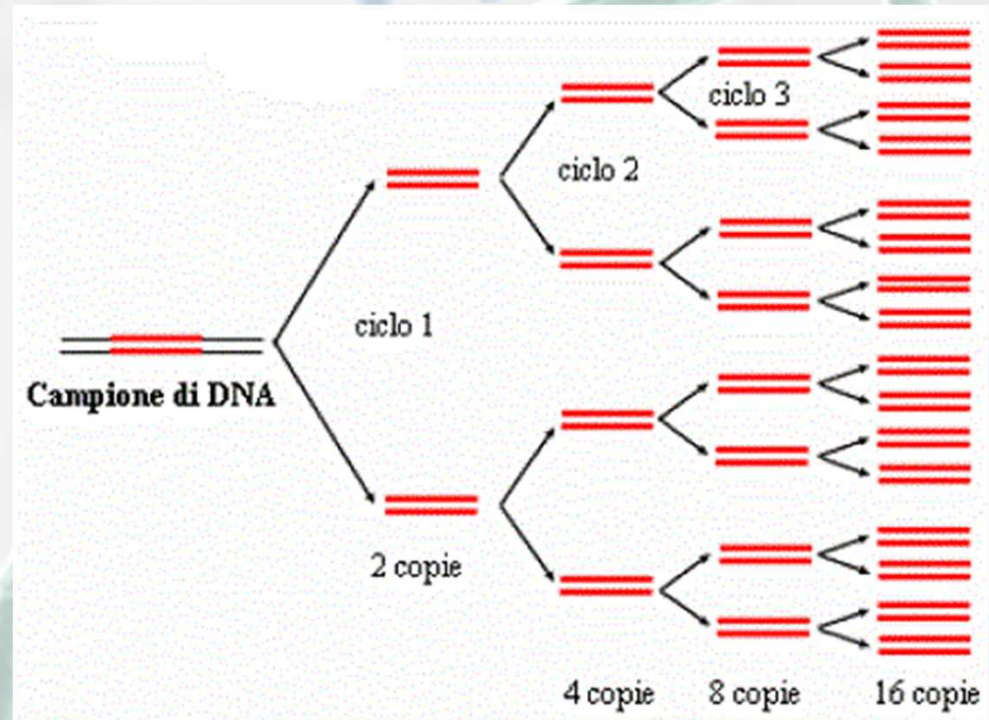
**Sonda fluorescente:**  
specifica per ogni patogeno







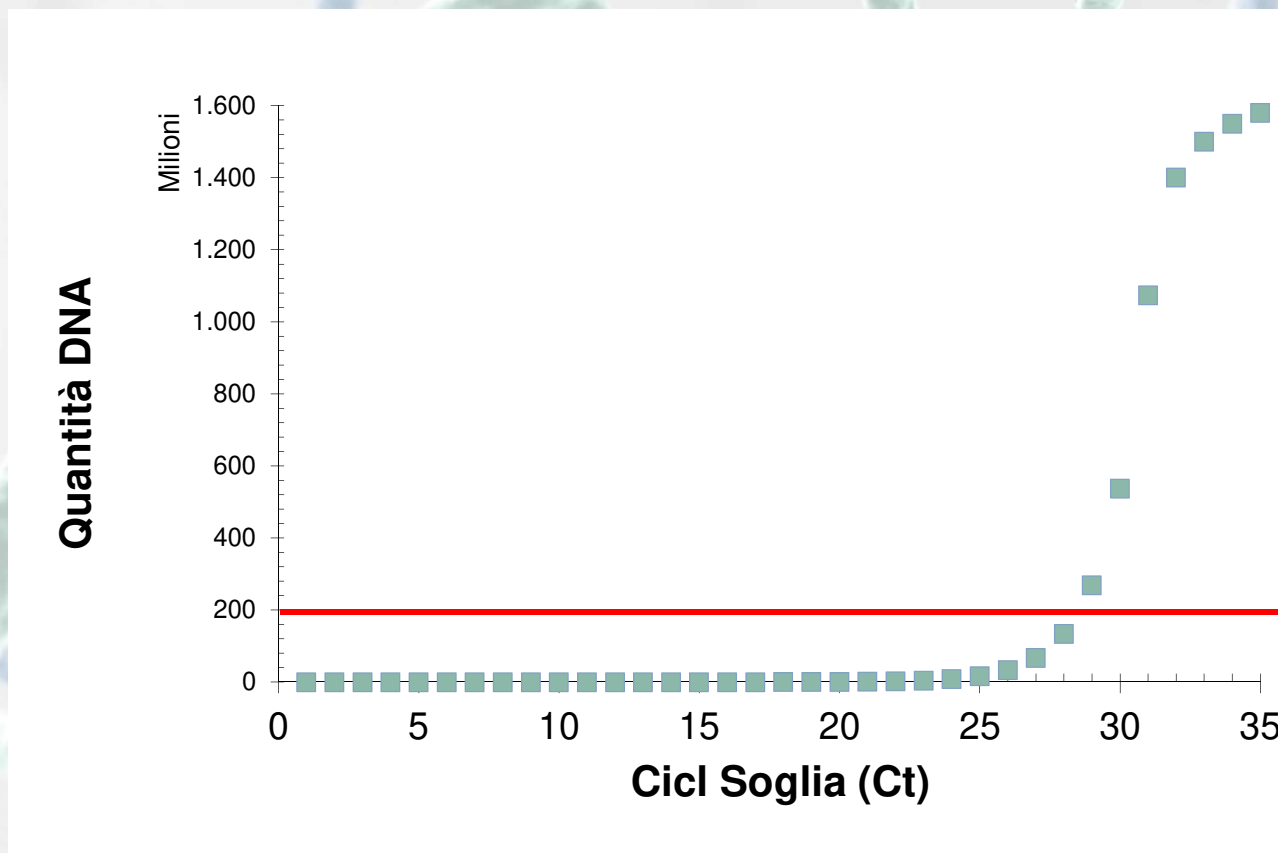
# qPCR: Principio





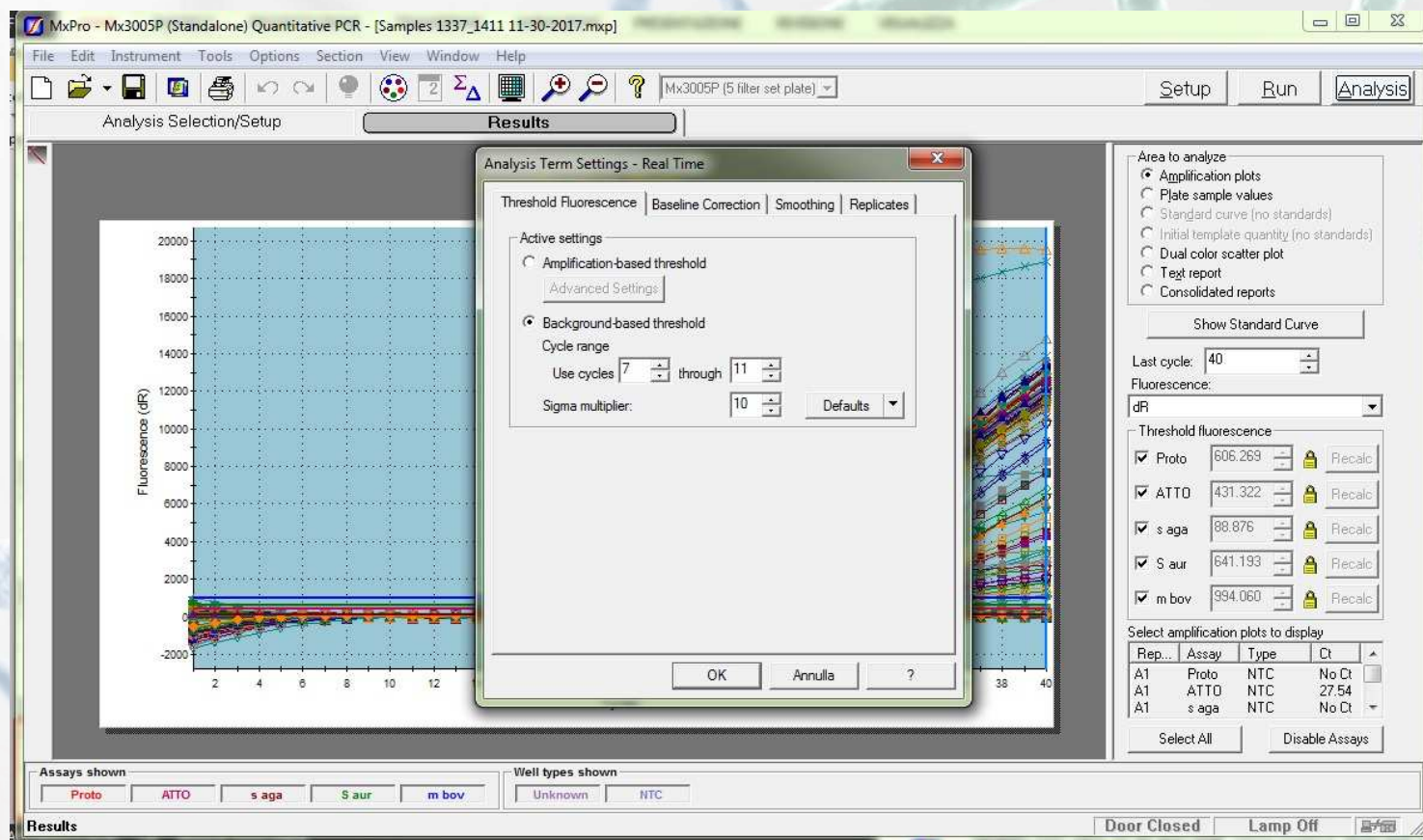
# qPCR: Cicli Soglia

Cicli Soglia	Quantità di DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1.024
11	2.048
12	4.096
13	8.192
14	16.384
15	32.768
16	65.536
17	131.072
18	262.144
19	524.288
20	1.048.576
21	2.097.152
22	4.194.304
23	8.388.608
24	16.777.216
25	33.554.432
26	67.108.864
27	134.217.728
28	268.435.456
29	536.870.912
30	1.073.741.824
31	1.400.000.000
32	1.500.000.000
33	1.550.000.000
34	1.580.000.000



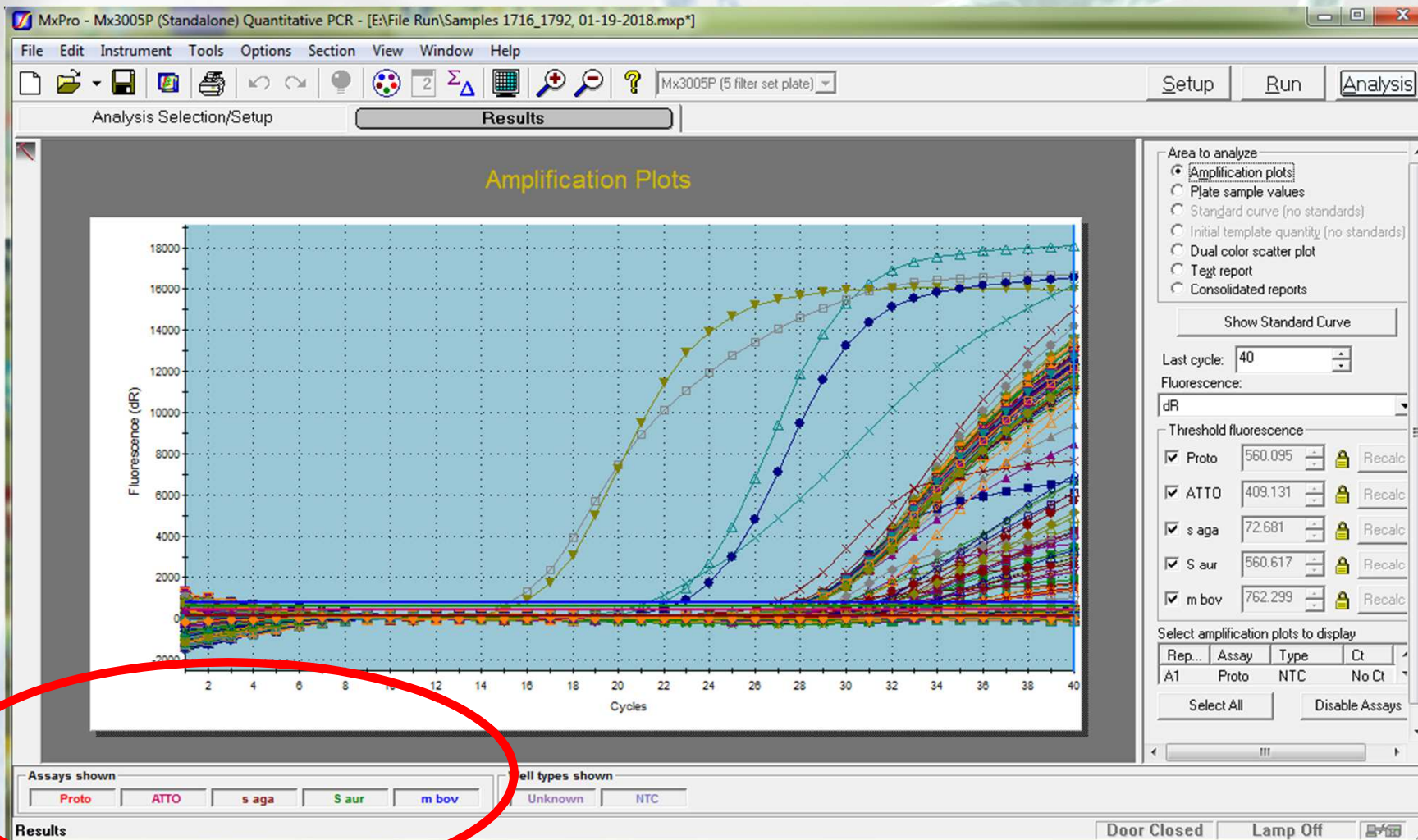


# Analisi dei risultati



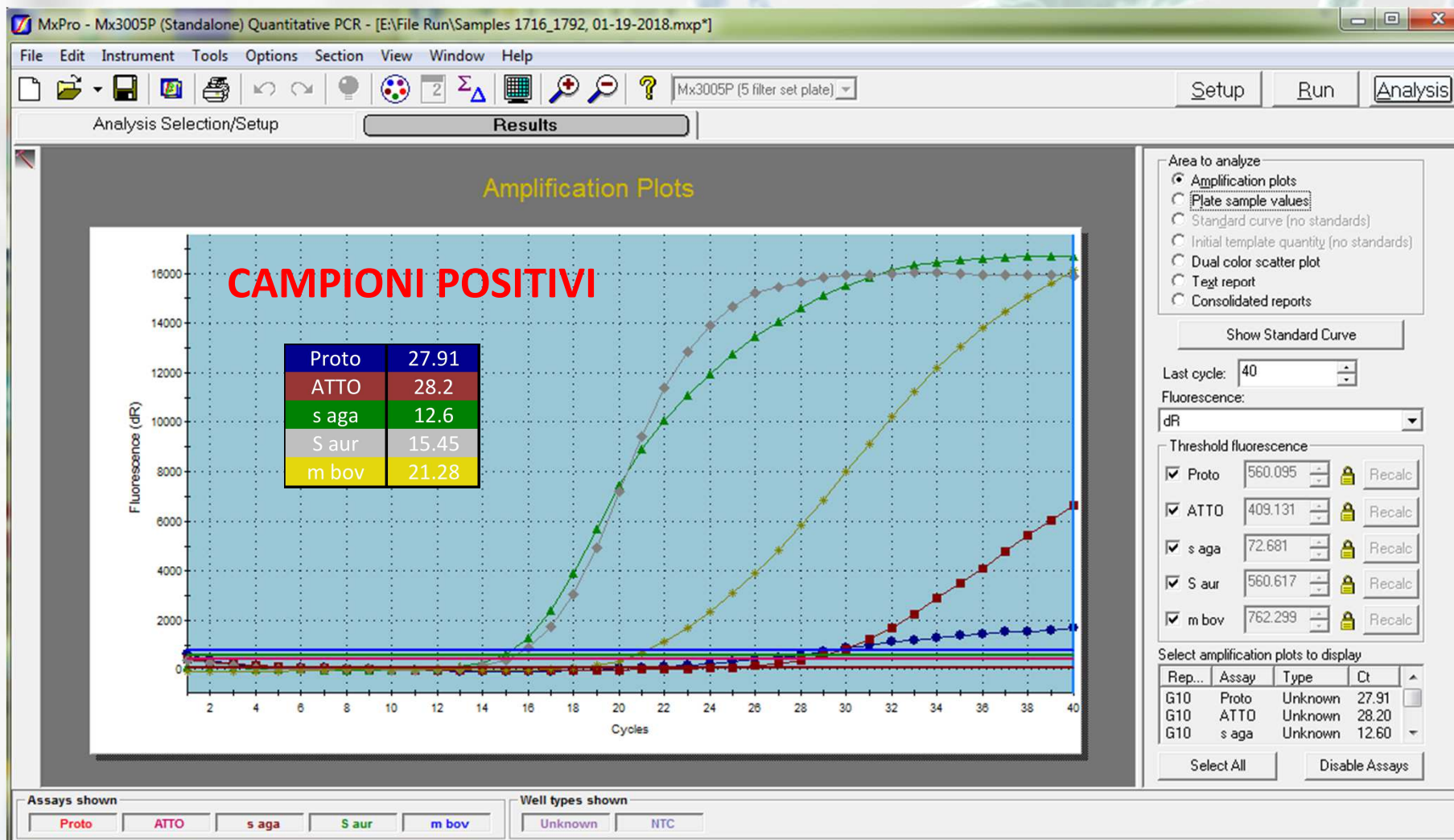


# Analisi dei risultati





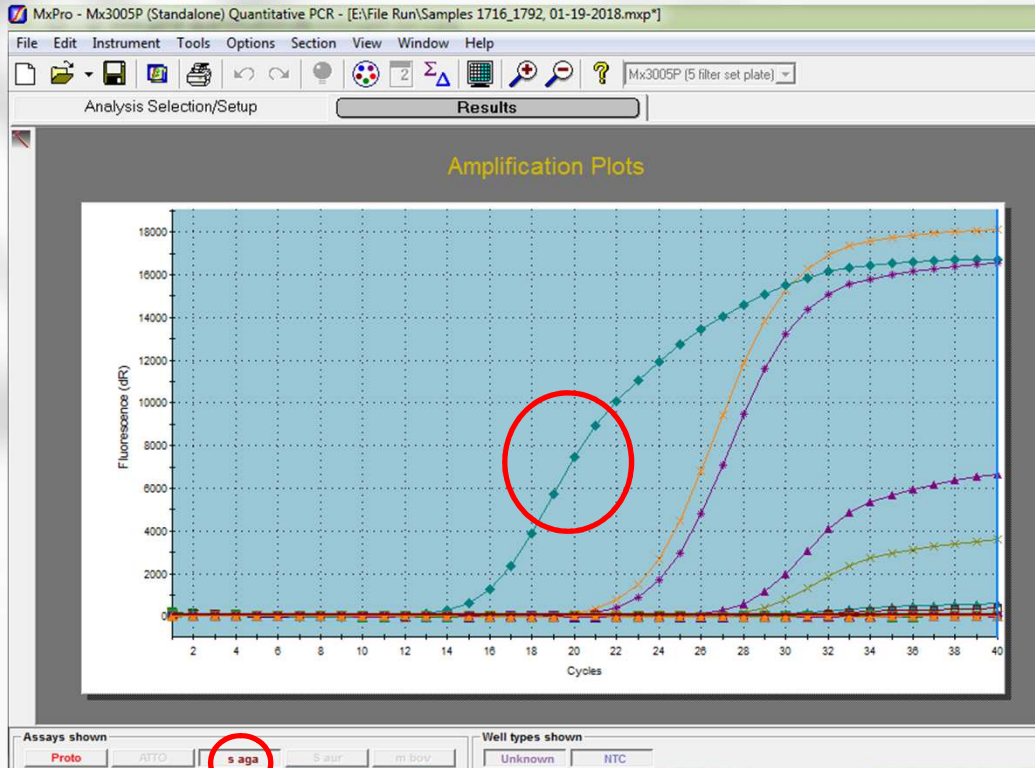
# Analisi dei risultati



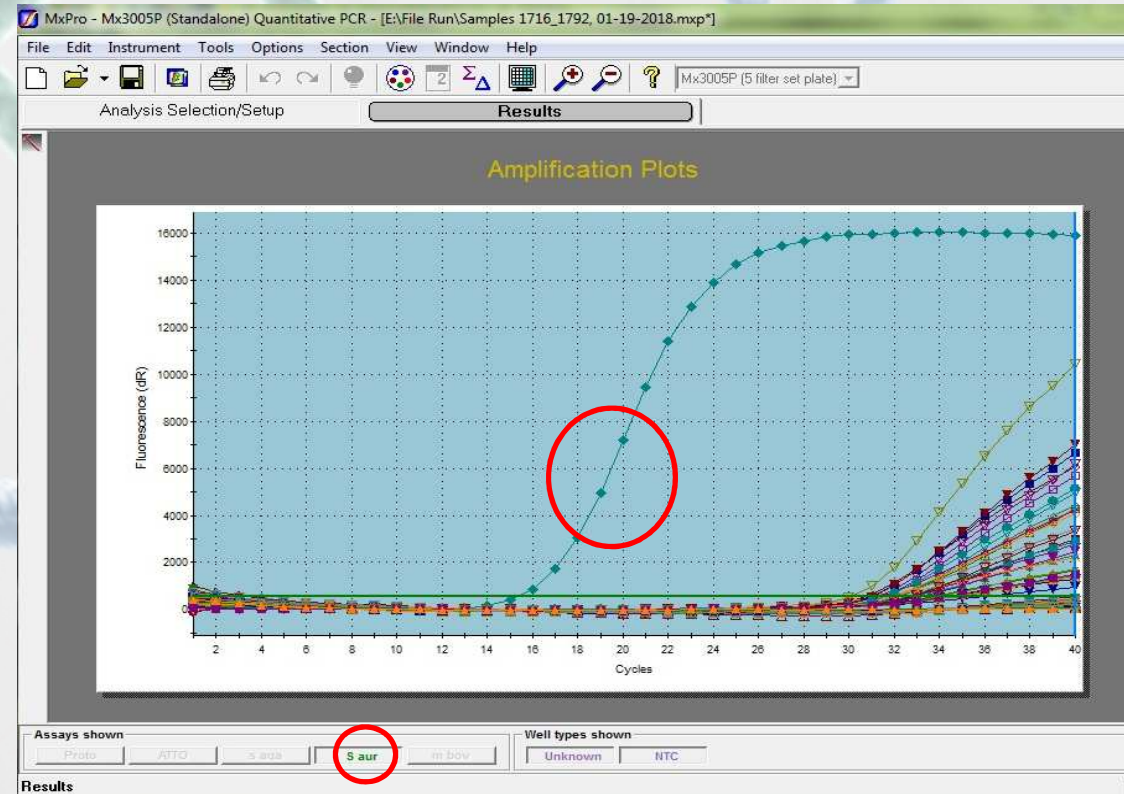


# Analisi dei risultati

*Staphylococcus aureus*

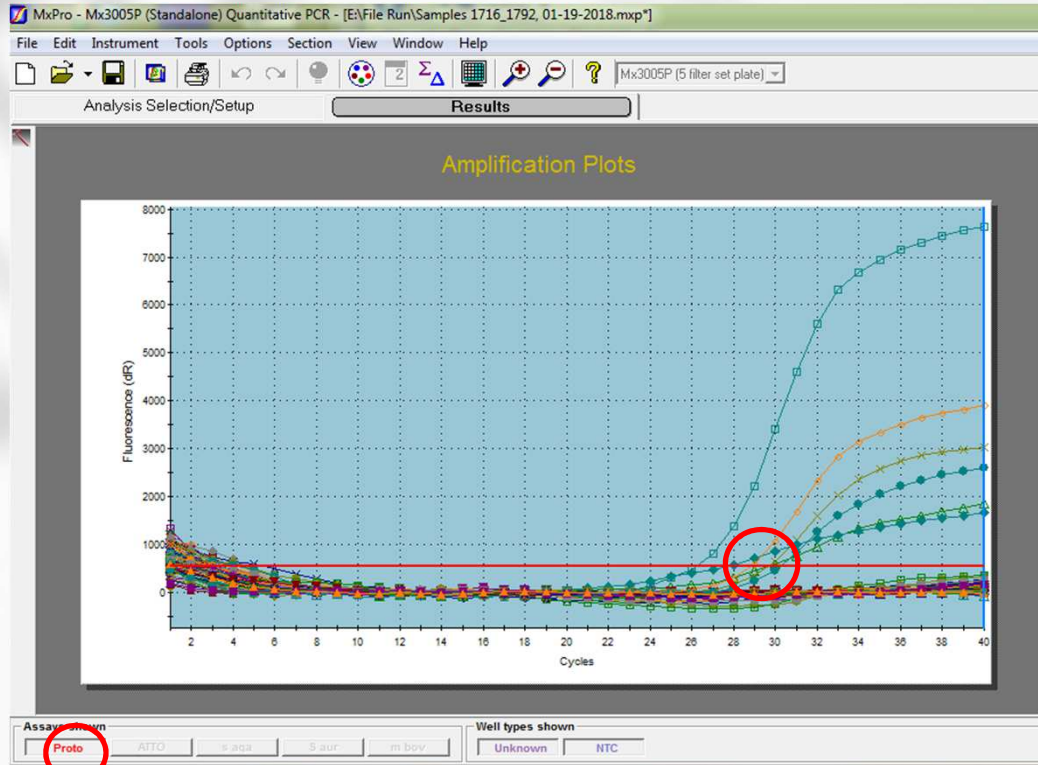


*Streptococcus agalactiae*



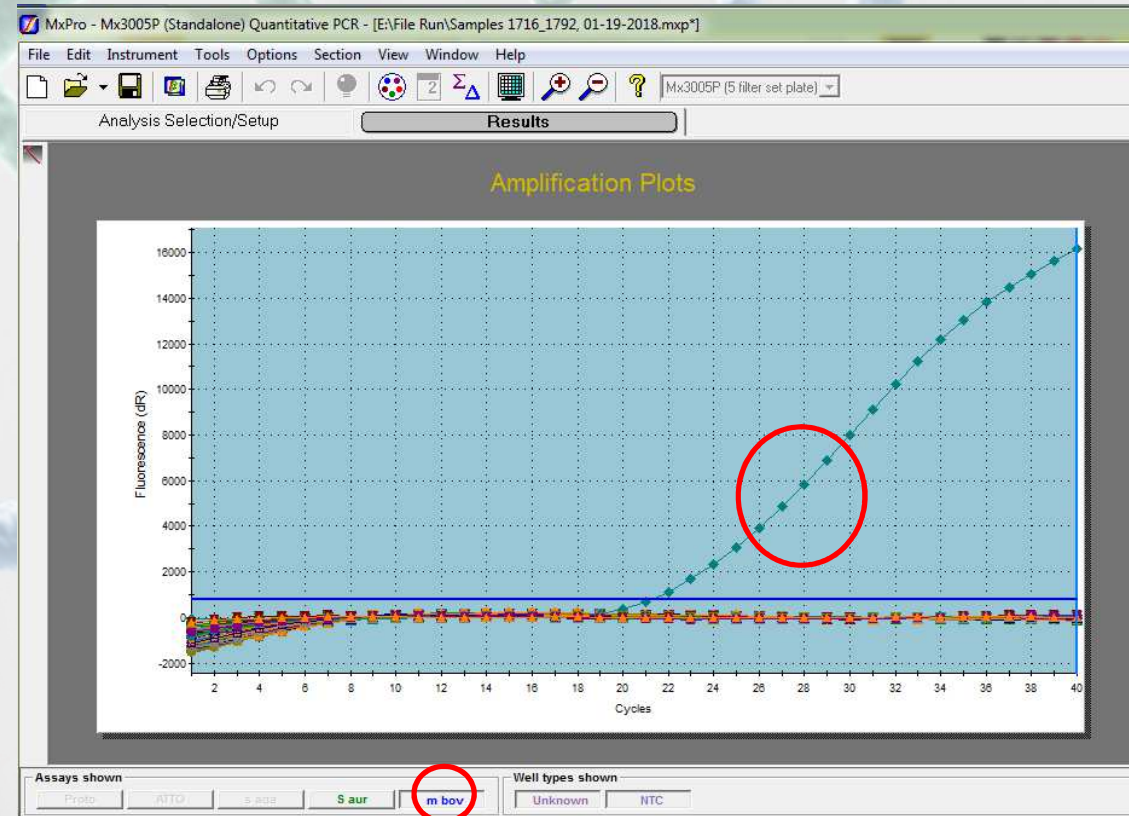


# Analisi dei risultati



*Prototheca*

*Mycoplasma bovis*





# Analisi dei risultati

MxPro - Mx3005P (Standalone) Quantitative PCR - [E:\File Run\Samples 1716\_1792, 01-19-2018.mxp]

File Edit Instrument Tools Options Section View Window Help

Analysis Selection/Setup Results

Well	Well Name	Assay	Ct (dR)
H5	18LA00641	Proto	No Ct
H5	18LA00641	ATTO	27.32
H5	18LA00641	s aga	No Ct
H5	18LA00641	S aur	No Ct
H5	18LA00641	m bov	No Ct
H6	18LA00882	Proto	No Ct
H6	18LA00882	ATTO	27.20
H6	18LA00882	s aga	No Ct
H6	18LA00882	S aur	No Ct
H6	18LA00882	m bov	No Ct
H7	18LA01041	Proto	No Ct
H7	18LA01041	ATTO	27.28
H7	18LA01041	s aga	No Ct
H7	18LA01041	S aur	30.20
H7	18LA01041	m bov	No Ct
H8	18LA01049	Proto	30.32
H8	18LA01049	ATTO	27.70
H8	18LA01049	s aga	No Ct
H8	18LA01049	S aur	31.63
H8	18LA01049	m bov	No Ct
H9	18LA01059	Proto	No Ct
H9	18LA01059	ATTO	27.46
H9	18LA01059	s aga	No Ct
H9	18LA01059	S aur	34.42
H9	18LA01059	m bov	No Ct
H10	NEG	Proto	No Ct
H10	NEG	ATTO	27.87
H10	NEG	s aga	No Ct
H10	NEG	S aur	No Ct
H10	NEG	m bov	No Ct

Assays shown: Proto ATTO s aga S aur m bov

Well types shown: Unknown NTC

Area to analyze:
 

- Amplification plots
- Plate sample values
- Standard curve (no standards)
- Initial template quantity (no standards)
- Dual color scatter plot
- Text report
- Consolidated reports

Last cycle: 40

Ct and final call based on: dR

Column:
 

- Replicate
- Well
- Well Comment
- Dye
- Assay
- Well Type
- R Last
- dR Last
- Rn Last

Il patogeno non è presente, ma l'estrazione è avvenuta correttamente

Prototheca ed S. aureus sono presenti nel campione, l'estrazione è avvenuta correttamente

Target	Value range >1000000 CFU	Value range 100000-10000 CFU	Value range 10000 - 100 CFU	Value range <100 CFU
	++++	+++	++	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 24	24 - 28	28 - 34	34 - 37
<i>Streptococcus agalactiae</i>	< 19	19 - 21	21 - 28	28 - 37
<i>Prototheca</i>	< 17	17 - 20	20 - 34	34 - 37
<i>Mycoplasma bovis</i>	< 24	24 - 27	27 - 29	29 - 37





## Vantaggi Mastit 4E

- ✓ Sistema affidabile e sensibile (da 500  $\mu$ l di latte di massa);
  - ✓ Sistema efficiente;
- ✓ Veloce e preciso;
  - ✓ Quantificazione del patogeno target;
- ✓ La possibilità di poter analizzare i campioni diluite con conservanti e congelati.



## Vantaggi Mastit 4E

- *S. aureus* è la principale causa di mastite bovina contagiosa;
- *S. agalactiae* è la causa secondaria di mastite bovina contagiosa;
- *M. bovis* è la causa principale di malattie respiratorie nel bovino; secondariamente causa mastite nelle vacche.
- *Prototheca* è un'alga che si trova principalmente nelle feci e nell'ambiente, dannosa a livello di mammella;

**Perché ricercare questi 4 patogeni?**



**Mastit?**  
**PREVENT with**  
**LOW cost**  
**in**  
**LOW time**

