

MANUALE PER LA GESTIONE DELLA DIAGNOSTICA RAPIDA DI MASTITE IN ALLEVAMENTO

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna - Sezione di
Piacenza ([Responsabile: Dott. Norma Arrigoni](#))

Strada Faggiola 1 - 29027 Gariga di Podenzano (PC)

Tel +39 0523 524253

Fax +39 0523 523491

Email: piacenza@izsler.it - norma.arrigoni@izsler.it

Collaboratori:

Dott. Marcello Cannistrà cell [3403422362](tel:3403422362) e-mail marcello.cannistra@izsler.it

Dott. Giulio Capelli cell [3404156843](tel:3404156843) e-mail giulio.capelli@izsler.it



Sommario

Introduzione	3
ALLESTIMENTO DEL LABORATORIO AZIENDALE	4
Locale	4
Incubatore	4
Piastre	4
Registrazione dei risultati	5
Materiale da laboratorio	5
Gestione dei rifiuti	6
Formazione degli operatori	6
Raccolta e manipolazione dei campioni	7
Comuni errori di campionamento	9
Etichettatura dei campioni	10
Conservazione dei campioni	10
Procedure di coltura	11
Preparazione dei campioni	11
Procedura per la coltura	11
Ordine di semina	13
Conservazione dei campioni dopo la semina	13
Interpretazione	14
1 Crescita su terreno MSA	14
2 Crescita su terreno Gassner	14
3 Crescita su terreno TKT	15
4 Crescita su tutti i terreni	15
Schema riassuntivo	16
Approfondimenti	17
Allegato 1	18

Introduzione

La comunicazione della commissione europea 2015/C 299/04 inerente le “Linee guida sull’uso prudente degli antimicrobici in medicina veterinaria”, promuove l’utilizzo mirato degli antimicrobici ed auspica, a tale scopo, l’adozione di sistemi diagnostici rapidi.

Il presente manuale è stato sviluppato con l’obiettivo di dare indicazioni pratiche per realizzare l’analisi microbiologica sui campioni di latte direttamente in azienda (diagnosi On-Farm), permettendo così una diagnosi rapida di mastite.

Sulla base della diagnosi eziologica sarà possibile decidere se intraprendere o meno il trattamento terapeutico con antibiotico.

L’analisi microbiologica dei campioni di latte è una metodica che permette l’identificazione dei batteri responsabili di mastite ed è considerata il “gold standard” per individuare la causa delle mastiti cliniche e subcliniche.

Attraverso la realizzazione di colture batteriche e altre tecniche di approfondimento, il laboratorio di diagnostica IZS identifica i batteri presenti nei campioni; alcune di queste tecniche sono economiche e semplici a tal punto da poter anche essere effettuate anche presso le aziende zootecniche.

L’obbiettivo del progetto è quello di velocizzare il processo diagnostico sulle mastiti cliniche, mediante l’allestimento di un laboratorio aziendale che permetta di ottenere risultati utili entro 18 ore dalla raccolta dei campioni.

Questo dovrà prevedere, inizialmente in modo sistematico e poi periodicamente, l’analisi dei campioni presso il laboratorio IZSLER di Piacenza, in modo da validare i risultati ottenuti in allevamento.

Riassumendo, questo sistema permette in modo facile, veloce ed economico, di identificare giornalmente i batteri che sono causa di mastite nei capi in lattazione. L’identificazione dei microorganismi è utile per facilitare e guidare le decisioni sul tipo di trattamento da intraprendere.

Il nostro protocollo di Diagnosi On-Farm prevede l’utilizzo di piastre a tre settori, in cui si trovano tre diversi terreni di coltura:

1. M.S.A. (Mannitol Salt Agar) : terreno selettivo e differenziale per stafilococchi
2. Gassner: terreno selettivo e differenziale per enterobatteri
3. T.K.T. (Tallium Kristalviolette Tossin): terreno selettivo e differenziale per streptococchi.

Di seguito verranno fornite istruzioni per:

- allestire e gestire il laboratorio aziendale ed i vari materiali necessari;
- eseguire prelievo e semina dei campioni;
- identificare i batteri cresciuti in coltura.

Per ottenere risultati attendibili è necessario applicare in modo puntuale e preciso le tecniche e procedure che verranno illustrate di seguito.

Inoltre, il vostro veterinario aziendale deve essere coinvolto nella realizzazione del progetto; oltre a collaborare nell’allestimento e nelle procedure di campionamento e analisi, può aiutarvi nella interpretazione dei risultati, che dovrà poi utilizzare per definire i protocolli terapeutici.

ALLESTIMENTO DEL LABORATORIO AZIENDALE

Locale

Prima di iniziare il progetto è necessario identificare un locale, anche di piccole dimensioni, da adibire a laboratorio aziendale.

Il laboratorio aziendale non deve essere sottoposto a importanti sbalzi termici o correnti d'aria.

Il locale deve sempre essere mantenuto pulito per evitare il rischio di contaminazione accidentale delle piastre, che potrebbe dare risultati falsamente positivi o non interpretabili.

In questo locale è necessario avere a disposizione un piano di lavoro, dedicato alla semina delle piastre, da mantenere sempre in ordine e facilmente disinfettabile.

Gli operatori, durante il prelievo e la semina dei campioni e durante la semina e la lettura delle piastre devono sempre indossare abiti puliti, guanti monouso; devono inoltre lavarsi accuratamente le mani una volta terminato il lavoro in laboratorio.

Non entrare mai in laboratorio con cibo o bevande.

Incubatore

La funzione dell'incubatore è creare le condizioni ambientali di temperatura e umidità favorevoli alla crescita batterica.

La maggior parte dei batteri responsabili di mastite crescono bene a 37°C e con il 75% di umidità, parametro quest'ultimo ottenibile mediante l'inserimento di un piccolo recipiente pieno d'acqua.

È opportuno che sia presente un termometro che permetta di monitorare giornalmente la temperatura dell'incubatore.

Senza le adeguate condizioni ambientali i batteri potrebbero non crescere nelle piastre, dando dei risultati falsamente negativi.

Il posizionamento dell'incubatore è importante ai fini del mantenimento della temperatura al suo interno: non deve essere collocato vicino a porte esterne o in ambienti in cui ci sono elevati sbalzi termici.

Si consiglia di tenere sempre acceso l'incubatore anche se non si usa giornalmente, così facendo si mantiene meglio la temperatura adeguata.

Sono presenti differenti tipologie di incubatori in base alle loro dimensioni e caratteristiche. Gli incubatori impiegati nei laboratori possono essere molto costosi, perciò, come soluzione economica, si può utilizzare un incubatore per uova, che mantiene la temperatura costante e ha le dimensioni sufficienti per incubare un numero ragionevole di piastre.



Piastre

Le piastre, in attesa di essere utilizzate, devono essere conservate a temperatura di refrigerazione e non mantenute a temperatura ambiente.

Vanno utilizzate entro la data di scadenza, riportata sulla piastra stessa.

È importante controllare la scadenza delle piastre e non adoperare piastre scadute, che potrebbero fornire risultati falsamente negativi.

Le piastre inoltre vanno controllate prima di essere utilizzate. Se presentano già crescita batterica o muffe, risultano inquinate e vanno eliminate.

Registrazione dei risultati

La registrazione dettagliata dei risultati è importante per il migliore utilizzo del dato ottenuto.

Per ogni caso di mastite registrare le informazioni minime (numero bovina, data, operatore che ha eseguito la semina e la lettura) oltre ai controlli sulla temperatura dell'incubatore.

Per un monitoraggio completo degli agenti batterici prevalenti e dell'efficacia dei protocolli terapeutici, oltre ai dati sopra citati (data di rilevazione, numero bovina) registrare:

- quarto colpito
- livello di gravità (**0**: esclusivamente aumento conta cellulare > 200.000; **1**: lieve → sola alterazione del latte; **2**: moderata → alterazioni del latte e della mammella; **3**: grave → ai precedenti si associano sintomi generali)
- esito della coltura
- protocollo terapeutico adottato
- esito della terapia (guarita/recidiva)

Queste informazioni verranno periodicamente verificate dal veterinario aziendale, che valuterà la necessità di piani di controllo mirati ai patogeni prevalenti, oltre alla eventuale necessità di modificare i protocolli terapeutici.

A tale scopo si riporta una pagina di esempio (vedi allegato 1), che andrà a costituire il registro aziendale da conservare nel locale laboratorio.

Materiale da laboratorio

- Guanti monouso
- Provette sterili
- Porta provette
- Cotone o garze
- Alcool 70%
- Disinfettante per capezzoli
- Rotoli di carta
- Pennarelli indelebili
- Tamponi di cotone sterili
- Piastre
- Disinfettante
- Contenitore rifiuti

I guanti monouso devono essere sempre indossati sia per il prelievo dei campioni di latte, che per la semina, la lettura o comunque la manipolazione delle piastre.

Le provette per i campioni di latte sono sterili e devono quindi rimanere chiuse fino al momento del campionamento, in modo tale da evitare possibili contaminazioni.

Il cotone e le garze possono essere conservate in un contenitore (es. tipo Tupperware) ben chiuso.

I tamponi di cotone vanno riposti in un luogo pulito e asciutto; per garantirne la sterilità, la confezione del tampone deve essere aperta immediatamente prima del suo utilizzo, dal lato del bastoncino.

Durante l'estrazione del tampone dalla sua confezione bisogna fare attenzione a non contaminare l'estremità sulla quale si trova il cotone. I tamponi inutilizzati devono essere conservati nella loro confezione originale, all'interno di un sacchetto o di un contenitore con chiusura ermetica. Le piastre inutilizzate devono essere conservate, con il tappo rivolto verso il basso, in frigorifero. non in congelatore. Non devono essere utilizzate oltre la data di scadenza.

Gestione dei rifiuti

Tutto il materiale adoperato per la semina dei campioni e le piastre, dopo esser state incubate e interpretate per la ricerca di microorganismi, devono essere riposte in un contenitore con apposito coperchio, adibito esclusivamente allo smaltimento di rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo.



Formazione degli operatori

È necessario che tutti gli operatori coinvolti in questo progetto vengano formati, al fine di garantire l'affidabilità del lavoro svolto.

La formazione deve prevedere la corretta gestione del materiale, la tecnica di raccolta e di semina dei campioni, la registrazione degli esiti, la lettura e l'interpretazione dei risultati.

Sono necessari periodici corsi di aggiornamento del personale.

E' necessario individuare una persona responsabile di queste attività, che si occupi di monitorare l'accuratezza dei risultati e di coordinare il personale addetto alle varie operazioni.

Per qualsiasi chiarimento inerente l'organizzazione del laboratorio e delle relative attività rivolgersi all'IZS di Piacenza.

Raccolta e manipolazione dei campioni

Per ottenere un campione rappresentativo è fondamentale eseguire tutte le operazioni di campionamento in maniera estremamente pulita, in modo da non contaminare i campioni con i microorganismi presenti sulla superficie della mammella o nell'ambiente.

A tale scopo:

1. Lavarsi accuratamente le mani con acqua e sapone ed indossare guanti nuovi monouso. Scrivere, con una penna indelebile, su ogni provetta:
 - la data
 - il numero identificativo del capo
 - il quarto mammario da cui si preleva il latte, utilizzando le sigle di seguito:
 - AD: quarto anteriore destro
 - AS: quarto anteriore sinistro
 - PD: quarto posteriore destro
 - PS: quarto posteriore sinistro



2. Pulire la mammella e i capezzoli da residui di letame e lettiera con carta a perdere. Se i capezzoli e la mammella sono molto sporchi, prima di procedere con la disinfezione lavarli a fondo e asciugare accuratamente con carta a perdere



3. Disinfettare il capezzolo immergendolo in una soluzione germicida per predipping, lasciando agire per 30 secondi.



4. Asciugare con carta assorbente monouso ponendo particolare attenzione al capezzolo. Fare attenzione a che non siano presenti residui di soluzione germicida sui capezzoli, in quanto la loro eventuale presenza potrebbe provocare la morte dei batteri eventualmente presenti nel campione, causando risultati falsamente negativi.



5. Eliminare i primi 3 – 4 getti di latte per eliminare i batteri presenti nel canale mammario.



6. Strofinare vigorosamente per 10-15 secondi l'apice del capezzolo con cotone o garza imbevuti in alcool 70%, fino a quando il cotone o la garza non risultino completamente puliti. Utilizzare nuovo cotone/garza per ogni quarto. Iniziare la disinfezione dai capezzoli più lontani rispetto all'operatore e proseguire con quelli più vicini, in modo da non rischiare la contaminazione dei capezzoli già disinfettati. Al termine della disinfezione l'alcool non deve gocciolare dal capezzolo; eventuali gocce di alcool all'interno della provetta potrebbero provocare la morte dei batteri eventualmente presenti nel campione, causando risultati falsamente negativi.



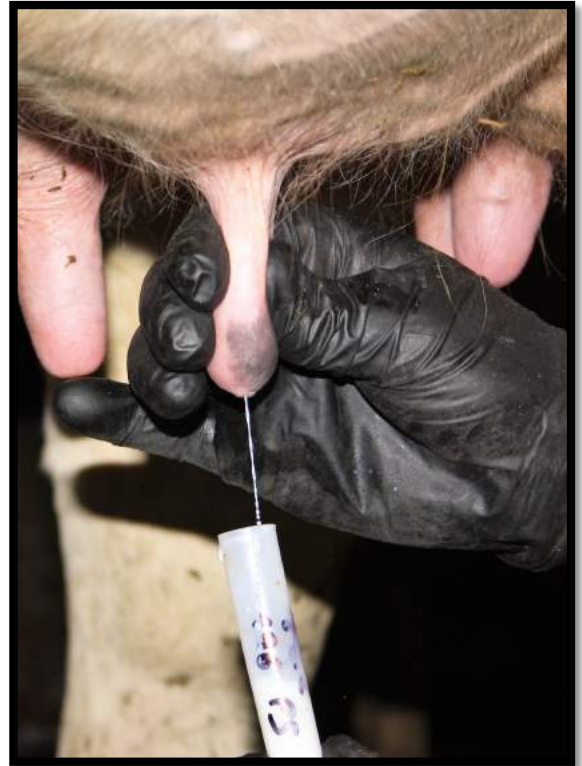
7. Aprire la provetta solo immediatamente prima di raccogliere il campione. Non toccare l'interno della provetta e del tappo con le mani e fare molta attenzione a non toccare con la provetta il capezzolo o la mammella durante la raccolta del campione.

Tenere la provetta inclinata per evitare che residui di letame/lettiere sul mantello o i peli degli animali possano inavvertitamente cadere nella provetta. Raccogliere il campione indirizzando il getto di latte verso la provetta.

Iniziare il campionamento dai quarti più vicini all'operatore e proseguire con quelli più lontani.

Effettuare la raccolta il più velocemente possibile per minimizzare la contaminazione esterna.

Utilizzare una provetta per ogni quarto e riempirla per circa 1/3.



Attenzione: tentare di riempire completamente la provetta risulta inutile e aumenta il rischio di contaminazione del campione; la provetta eccessivamente piena, inoltre, rischia di aprirsi durante il congelamento rendendo il campione inadatto.

Chiudere immediatamente la provetta in modo ermetico non appena il campione è stato raccolto.

8. Refrigerare immediatamente le provette e mantenerle a temperatura di refrigerazione fino a quando il campione non verrà sottoposto in coltura. Congelare le provette se non vengono esaminate entro 24 ore.



Comuni errori di campionamento

Un problema comune è la contaminazione dei campioni di latte con batteri ambientali, che danno risultati falsamente positivi e non interpretabili, generalmente per la presenza di più agenti batterici contemporaneamente.

Le cause più frequenti sono:

- il capezzolo non è stato adeguatamente pulito e disinfettato;
- le mani dell'operatore che effettua il campionamento non sono pulite;
- la provetta è stata aperta con troppo anticipo rispetto alla raccolta del campione.

Anche la pratica di mantenere garze imbevute di alcool già pronte in una vaschetta, può rappresentare una fonte di contaminazione, se la vaschetta non viene mantenuta costantemente

pulita o l'alcool viene lasciato evaporare.

Se la tecnica è corretta, meno del 5% dei campioni dei singoli quarti deve risultare 'contaminato'. Se la contaminazione si verifica con maggiore frequenza, è necessario rivedere tecnica di campionamento, la manipolazione del campione, e la tecnica di coltura degli operatori coinvolti.

Nel caso di mastite clinica, si deve raccogliere il latte dal singolo quarto colpito. Evitare di raccogliere campioni di latte in pool di più quarti perché in questo caso l'interpretazione dei risultati risulta difficile: infatti, se da un campione in pool si ottengono più di due patogeni ambientali in coltura, è impossibile determinare se gli organismi provengano da più quarti infetti o se il campione è stato contaminato dall'ambiente; i risultati risultano quindi di difficile interpretazione.

Il campionamento in pool è invece applicabile in caso di piani di controllo specifici per batteri contagiosi.

Ecco alcuni consigli per aiutarvi a essere sicuri di ottenere un campione idoneo:

- effettuare il campionamento su una mammella piena di solito consente una più facile raccolta del campione e quindi meno a rischio di contaminazione;
- eseguire il campionamento in un luogo pulito riduce la probabilità di contaminazioni ambientali; per questo la sala di mungitura è il luogo ideale per effettuare la raccolta;
- mettere in coltura il campione immediatamente dopo il prelievo ne minimizza la contaminazione;
- lavarsi accuratamente le mani e cambiarsi i vestiti se sporchi di letame diminuisce il rischio di contaminazione dei campioni.

Ecco alcuni esempi di fattori che invece aumentano le probabilità di contaminazione:

- riutilizzo di piastre di coltura, provette o garze per la disinfezione;
- effettuare il campionamento con mammelle molto sporche;
- effettuare il campionamento in un luogo poco pulito, dove il letame può contaminare il campione;
- presenza di letame o sporcizia sulle mani e le maniche del campionatore;
- lasciare le provette aperte dopo la raccolta (prima di metterle in coltura);
- lasciare le piastre di coltura aperte più del necessario.

Etichettatura dei campioni

Etichettare ogni provetta e ogni piastra di coltura con la data, l'ID della vacca e il quarto colpito, usando un pennarello indelebile in modo che la condensa che si può formare nell'incubatore o nel congelatore non comprometta l'identificazione, rendendo le etichette illeggibili.

Conservazione dei campioni

I campioni devono essere messi in coltura il più presto possibile la loro raccolta. Se questo non è possibile il campione deve essere conservati secondo le seguenti indicazioni:

- a temperatura ambiente: fino a 1 ora
- a temperatura di refrigerazione: fino a 2 giorni
- a temperatura di congelamento: fino a 60 giorni

Procedure di coltura

Preparazione dei campioni

Se il campione non può essere seminato in piastra immediatamente (entro 1 ora dalla raccolta) refrigerarlo o congelarlo fino a quando sarà possibile procedere con la coltura. Questo è fondamentale per ottenere risultati di affidabili. Se il campione è congelato, prima di metterlo in coltura è necessario attendere lo scongelamento completo, che dovrà avvenire in frigorifero.

Mescolare la provetta del campione capovolgendola delicatamente circa 15 volte, dopo aver verificato che il tappo della provetta sia sigillato.

Procedura per la coltura

1. Lavarsi accuratamente le mani ed indossare guanti nuovi e monouso.
2. Capovolgere la piastra e identificare ogni campione sul fondo della piastra (parte contenente il terreno di coltura). Scrivere, con pennarello indelebile: data, numero identificativo della vacca e quarto colpito.
3. Utilizzare un nuovo tampone di cotone sterile e una nuova piastra per ogni campione. Non riutilizzare mai una piastra anche se non è stata rilevata nessuna colonia durante precedenti colture.
Non utilizzare mai un tampone di cotone bagnato, sporco, già utilizzato, o non sterile. In caso contrario i risultati ottenuti non saranno affidabili.
4. Non toccare l'interno della piastra o il cotone del tampone sterile con le dita, né con qualsiasi altro oggetto. Il contatto con qualsiasi materiale non sterile ne causa la contaminazione. Aprire le confezioni di tamponi dalla parte del bastoncino, in modo tale che il cotone resti nella parte ancora chiusa della confezione).
5. Immergere l'estremità del tampone con il cotone nel campione di latte e, tenendo l'estremità del bastoncino del tampone tra il dito indice e il pollice, far roteare il tampone per circa 8 a 10 secondi, fino a quando il tampone sarà completamente imbevuto di latte.



6. Evitare di deporre sul terreno fiocchi di fibrina (cosiddetti "stoppini") presenti nel latte. Se sono presenti fiocchi di fibrina sul tampone, far aderire il cotone sulla parete interna della provetta del campione, per eliminarli. Se accidentalmente vengono depositati dei grumi di latte sulla piastra è necessario evidenziarli sul retro della piastra con un pennarello indelebile, in modo da non confonderli con una crescita batterica dopo l'incubazione.

7. Preparare sul bancone un numero di piastre pari ai campioni da esaminare. Le piastre devono essere capovolte (con il coperchio della piastra appoggiato sul bancone e il terreno nella parte superiore). Successivamente prendere la parte della piastra contenente il terreno con la mano non dominante. Con la mano dominante impugnare il tampone imbevuto ed effettuare uno striscio su uno dei terreni di coltura, come mostrato nell'immagine.

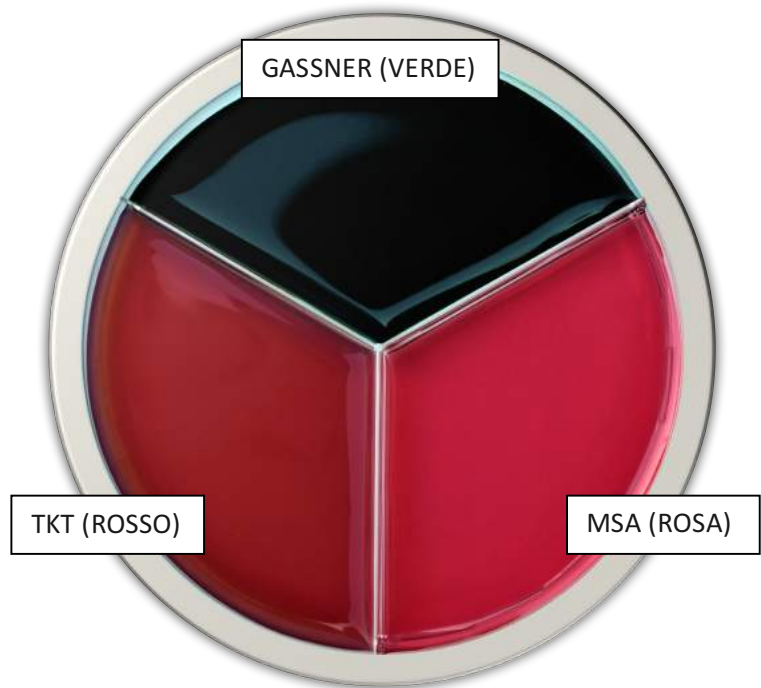


8. Immergere nuovamente il tampone nel campione di latte tra la semina di una sezione della piastra e la successiva (facendo attenzione a non contaminare il tampone).
9. Una volta effettuata la semina, mettere immediatamente il coperchio sulla piastra (senza toccare l'interno) e chiudere la provetta contenente il campione di latte.
10. Posizionare la piastra nell'incubatore capovolta con il coperchio a contatto con il piano dell'incubatore, in questo modo la condensa sul coperchio non gocciolerà sul terreno seminato.
11. Le piastre devono rimanere in incubazione a 37 ° C per 48 ore. Dopo 18 - 24 ore si può eseguire una prima lettura. Fare riferimento alla sezione "Interpretazione" di questo manuale per le informazioni relative alla lettura delle piastre.
12. Anche durante questa procedura è necessario indossare vestiti puliti; fonti di contaminazione possono essere rappresentati da letame o polvere presenti su maniche, vestiti, mani, capelli, o nell'ambiente circostante. Disinfettare la superficie di lavoro prima di iniziare e, nel caso in cui il piano di lavoro dovesse sporcarsi con un campione di latte, ripulire immediatamente.

Ordine di semina

Per avere risultati più attendibili, si consiglia di passare il tampone nella seguente sequenza:

1. MSA (ROSA)
2. TKT (ROSSO)
3. GASSNER (VERDE)



Ricapitolando: raccomandazioni finali

- Assicurarsi che le piastre siano chiaramente identificate.
- Posizionare la piastra nell'incubatore capovolta con il coperchio a contatto con il piano dell'incubatore.
- L'incubatore deve essere impostato a 37 ° C.
- I campioni devono restare in incubazione per almeno 18 ore, ma non più di 48 ore.
- Assicurarsi che nell'incubatore ci sia un contenitore aperto pieno d'acqua o un asciugamano bagnato, perché l'umidità è un elemento fondamentale necessario per la creazione di un ambiente favorevole alla crescita batterica.

Conservazione dei campioni dopo la semina

Dopo la semina, i campioni vanno conservati per le prove di validazione del progetto da parte dell'IZS di Piacenza.

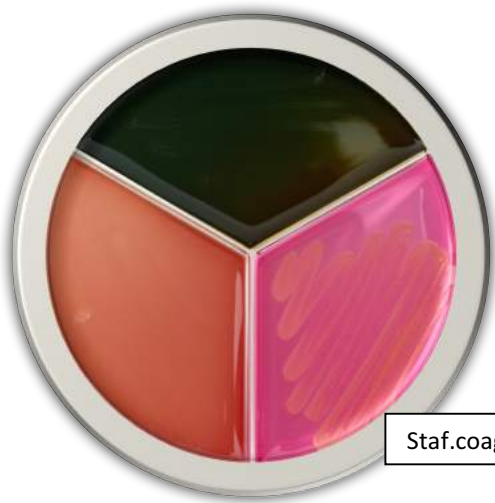
I campioni di latte possono essere conservati in frigorifero fino a 2 giorni, altrimenti vanno congelati (opzione consigliata).

Per ragioni organizzative, si consiglia di raggruppare i campioni (opportunamente identificati) in congelatore in base alla settimana di raccolta

In generale, i campioni di latte possono essere conservati congelati per un massimo di 8 settimane.

Interpretazione

1 Crescita su terreno MSA

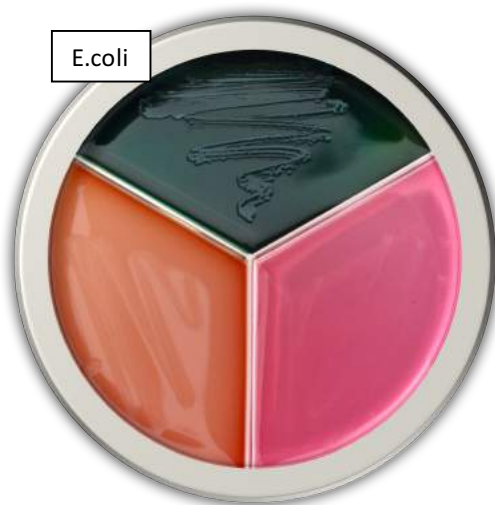


Staf.coagulasi negativi

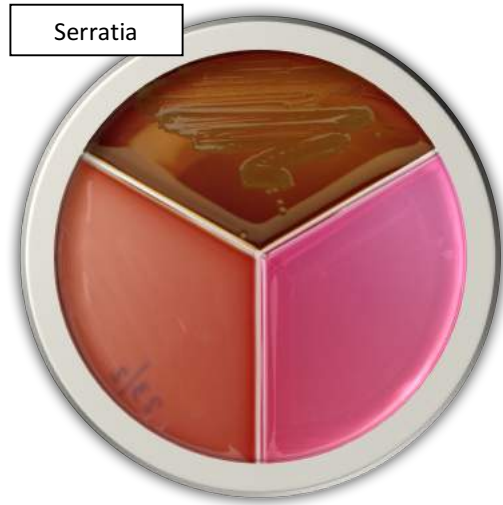


Staf. aureus

2 Crescita su terreno Gassner



E.coli



Serratia

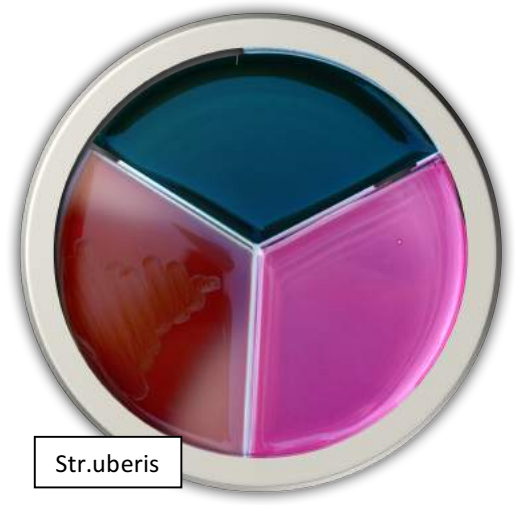


Klebsiella

3 Crescita su terreno TKT



Str.agalactiae



Str.uberis



Str.dysgalactiae

4 Crescita su tutti i terreni

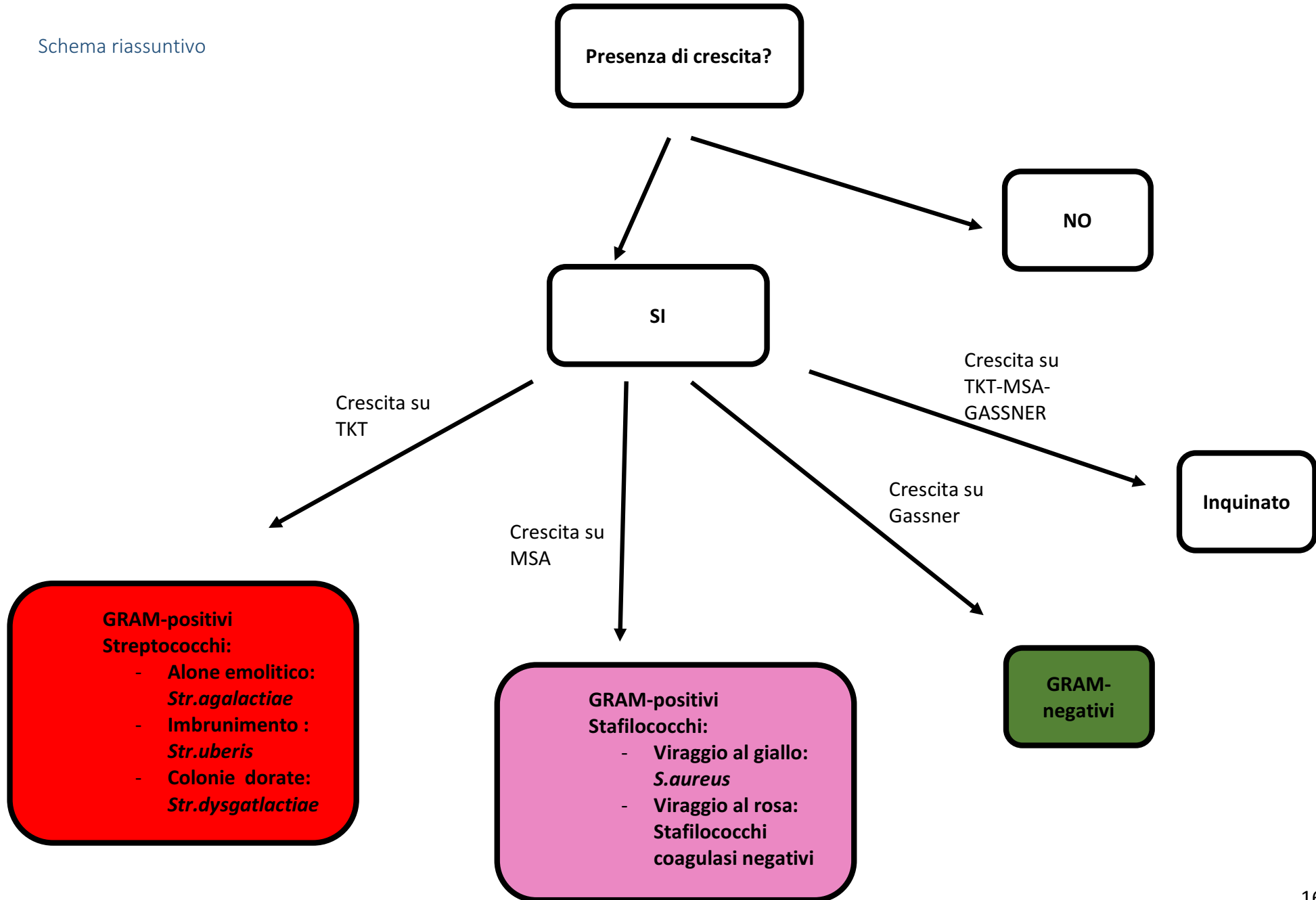


INQUINATO



INQUINATO

Schema riassuntivo



Approfondimenti

- University of Minnesota Dairy Extension – Milk Quality and Mastitis Website
<http://www1.extension.umn.edu/dairy/milk-quality-and-mastitis/>
- University of Wisconsin – Milk Quality Website
<http://milkquality.wisc.edu/>
- National Mastitis Council Website
<https://www.nmconline.org>

