RICERCA NEL LATTE DI AGENTI RESPONSABILI DI MASTITI MEDIANTE METODO COLTURALE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

1.1. Descrive il metodo di routine per la ricerca, nel latte ovino e caprino, di microrganismi responsabili di mastite, mediante esame colturale

1.2. Il metodo non riguarda la ricerca mirata di:

- *Brucella spp*
- *Listeria monocytogenes*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- Batteri anaerobi e microaerofili per i quali si rimanda ai metodi specifici

2. DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

2.1 Bibliografia

2.1.1. Quinn P. J., Carter M. E., Markey B. and Carter G. R,: Clinical veterinary microbiology, 1994

2.1.2. Holt, J.C., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. William & Wilkins, Baltimore

2.1.3. Bolzoni G., Benicchio S., Posante M., Boldini M., Peli G., Varisco G. Esame batteriologico del latte. Alcune considerazioni su esecuzione ed interpretazione dei risultati e frequenza degli isolamenti. Large Animal Review, 5, 2006

2.1.4. Clinical and Laboratory Standards Institute document M35-A2. Abbreviated identification of Bacteria and Yeast

2.1.5. Mastitis in dairy production. Current knowledge and future solutions. Edited by F. Hogeveen Wageningen. Academic Publishers

2.1.6. Norma ISO 7932:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal methods for the enumeration of presuntive *Bacillus cereus* – Colony count technique at 30 °C

2.1.7. Pyorala, S., Taponen, S. Coagulase-negative staphylococci-Emerging mastitis pathogens. Vet Microbiol, 2009, 134, 3-8

2.1.8. Schalm O.W./Carrol E.J./Jain U.C. Le Mastiti della Bovina, Casa editrice Edagricole (Bologna)

3. DEFINIZIONI

N.a.

4. PRINCIPIO

Il metodo è basato sull'applicazione di tecniche colturali classiche che prevedono l'inoculo dei campioni in terreni di coltura e la successiva identificazione biochimico-colturale degli isolati.

5. REAZIONI

N.a.

6. INTERFERENZE

La presenza di microrganismi contaminanti può inficiare il corretto isolamento degli agenti eziologici.

7. REAGENTI E MATERIALI

- Portaprovette
- Ansa per batteriologia da 10 µl
- Piastre di agar al 5% di sangue di montone
- Piastre di Mannitol Salt Agar (MSA)
- Piastre di agar MacConkey
- Piastre di Baird Parker RPF (Rabbit Plasma Fibrinogen)
- Piastre di agar Cetrimide
- Piastre di DNAse agar
- Piastre di agar Sabouraud
- Piastre di agar MYP (Mannitol Egg Yolk Polymixin agar)
- Brodo nutritivo
- Piastre di Agar sangue-bile
- Piastre di agar sangue-esculina
- Kit per la colorazione di Gram
- Soluzione di H_2O_2 al 3 %
- Plasma di coniglio con EDTA per test coagulasi libera (es. Coagulase Plasma, BBL)
- Kit per la ricerca del clumping factor negli stafilococchi (es. Staphylase test, Oxoid)
- Kit per il test dell'ossidasi (es. Bactident Oxidase, Merck)

- Test biochimici multipli per l'identificazione microbica (es. API 20E, API 20NE, API Staph, Api Strep, API Aux, API Coryne, API Listeria, bioMerieux)
- Antisieri per gruppo sierologico di Lancefield (es. Streptococcal Grouping Kit, Oxoid)

8. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Na

9. APPARECCHIATURE

- Becco di Bunsen
- Microscopio ottico
- Agitatore Vortex
- Termostato a 37 ± 2 °C
- Frigorifero a +2 ÷ 8 °C
- Congelatore
- Cappa a flusso laminare di classe II

10. CAMPIONAMENTO E CAMPIONI PER LE PROVE

- I campioni devono pervenire in provette sterili prelevati secondo le norme di asepsi; in attesa della semina, possono essere mantenuti in frigorifero per non più di 48 ore; per periodi più lunghi devono essere congelati a temperatura inferiore a -18 °C.
- Dopo la semina conservare il campione in congelatore.

11. PROCEDIMENTO

- Portare il campione a temperatura ambiente.
- Agitare il campione al vortex.
- Prelevare sterilmente un'ansata (10 µl) di materiale e seminarla per isolamento su agar sangue e, se necessario, su altri terreni, quali il MSA o MacConkey, utilizzando tutta la superficie disponibile (utilizzare una piastra suddivisa per max 4 campioni).
- Incubare le piastre in aerobiosi a 37 °C per 24-48h.
- Esaminare la crescita batterica.
- Considerare positivi i campioni che presentano anche una sola colonia di sospetto patogeno primario, seppure in presenza di altro tipo di

colonie (es. S. aureo); in presenza di stafilococchi coagulasi negativi, considerare negativi i campioni con un numero di colonie < 5 (500 CFU/ml). Campioni con 2 o più tipi di colonie, non attribuibili a patogeni primari, non vanno considerati come positivi.

- Procedere,se necessario, all'isolamento in coltura pura.
- Incubare le piastre nelle stesse condizioni della coltura di origine.
- Allestire, per l'osservazione microscopica, un preparato di Gram da una colonia rappresentativa.
- Osservare il vetrino al microscopio ottico ad immersione con obiettivo 100× e procedere all'identificazione nel modo descritto nel seguito.
- Microrganismi morfologicamente uguali possono essere ritenuti appartenenti allo stesso isolato.

<u>Stafilococchi</u>

- Se si osservano cocchi Gram positivi, effettuare il test della catalasi (Istruzione I 09 004).
  Cocchi Gram positivi, di forma sferica, in aggregati irregolari, con colonie opache, di color bianco, crema, giallo o giallo-arancio, positivi al test della catalasi, capaci di crescere in Mannitol Salt agar, sono considerati appartenenti al genere *Staphylococcus.*
- Inoculare su terreno Baird Parker RPF per evidenziare la produzione di coagulasi libera (per testare contemporaneamente più isolati la piastra può essere suddivisa in settori, max 6).
- Incubare a 37 °C per 18-24 ore.
- La produzione di coagulasi è indicata dalla coagulazione/opacità del terreno attorno al microrganismo.
- Ceppi coagulasi positivi devono essere sottoposti al test del clumping factor (coagulasi legata).
  - Isolati positivi al test della coagulasi libera e legata sono ritenuti *Staphylococcus aureus* e sono in genere capaci di dare reazione gialla su terreno MSA.
  - Isolati positivi al test della coagulasi libera e negativi al test della coagulasi legata sono identificati come *Stafilococchi coagulasi positivi.*
  - Isolati negativi al test della coagulasi libera sono identificati come *Stafilococchi coagulasi negativi.*

- Identificazione più accurata della specie può essere ottenuta, se necessario, con l'ausilio di test biochimici aggiuntivi (es. gallerie API).

Streptococchi

- Se in presenza di cocchi Gram positivi, di forma sferica, ovoidale o anche lanceolata, disposti a coppie o catenelle, con reazione negativa al test della catalasi, procedere all'identificazione di specie mediante semina su Agar sangue per Camp-test, Agar Sangue-bile e Agar Sangue-esculina.

	CAMP	ESCULINA	BILE	Gruppo di *Lancefield*
Streptococcus agalactiae	+	-	±	B
Streptococcus uberis	±	+	-	//
Streptococcus disgalactiae	-	-	-	C
Enterococcus spp.	-	+	+	D

- Identificazione più accurata della specie può essere ottenuta, se necessario, con l'ausilio di test biochimici aggiuntivi (es. con la galleria API Strep e con la ricerca del gruppo di Lancefield).

Enterococchi

- Se in presenza di batteri Gram positivi, di forma sferica, ovoidale o anche lanceolata, disposti a coppie o catenelle, con reazione debole al test della catalasi, procedere all'identificazione con la galleria API Strep ed alla ricerca del gruppo di Lancefield.

Batteri coryneformi

- Se si osservano batteri Gram positivi a disposizione corineforme, ovvero bacilli allungati, sottili, diritti o leggermente ricurvi, con estremità affusolate o clavate, disposti singoli, in coppia, in formazioni a V o affiancati "a palizzata", eseguire il test della catalasi ed identificare con striscia biochimica multipla per Corynebatteri.

- Batteri come sopra, a crescita lenta, con emolisi completa su agar sangue, catalasi negativi, possono essere identificati come *Arcanobacterium pyogenes*.

RICERCA NEL LATTE DI AGENTI RESPONSABILI DI MASTITI MEDIANTE METODO COLTURALE

Listeria spp.

- Batteri Gram positivi, con morfologia attribuibile al genere Listeria (corti bacilli di forma regolare con estremità arrotondate, disposti singolarmente o in corte catenelle, o meno spesso in lunghi filamenti, catalasi positivi) devono essere identificati con le gallerie biochimiche specifiche (es. API Listeria).

Bacillus spp.

- Bacilli allungati (0.5-2.5 × 1.2-10 µm), Gram positivi, disposti in coppie o catenelle, provvisti di endospore, catalasi positivi, mobili, anaerobi facoltativi, sono assegnati al genere *Bacillus.*
- Identificazione della specie *Bacillus cereus*:
    - Subcolturare una colonia in agar sangue e MYP
    - Incubare le piastre a 30 °C in aerobiosi per 24 ore
    - La presenza di colonie rosa in MYP (assenza di fermentazione del mannitolo), circondate da un alone di precipitato, emolitiche in agar sangue, conferma il *Bacillus cereus*

Batteri Gram negativi

- Se si individuano bacilli o coccobacilli Gram negativi, procedere al test dell'ossidasi (Istruzione I 09 005) e, se necessario, della catalasi (Istruzione I 09 004):

Per testare sviluppo e fermentazione del lattosio in agar MacConkey, inoculare una piastra con una colonia in esame ed incubare a 37 °C per 18-24 h. Colonie circondate da un alone rossastro sono lattosio-fermentanti.

- Colonie emolitiche Gram negative/capaci di crescere in MacConkey/fermentanti il lattosio, possono essere attribuite alla specie *Escherichia coli*
- Colonie sciamanti in agar sangue, Gram negative/capaci di crescere in MacConkey/non fermentanti il lattosio, possono essere attribuite al genere *Proteus spp.*

Pasteurella/Mannheimia

- Colonie grigiastre, non emolitiche, con odore "dolciastro", di piccoli coccobacilli (0.3-1.0 × 1.0-2.0), incapaci di crescere in MacConkey, indolo positivi, sono attribuite a *Pasteurella multocida.*

- Colonie grigiastre, emolitiche, inodori, di bacilli pleomorfi, indolo negativi, capaci di crescere in MacConkey n. 1 (senza cristalvioletto) con colonie piccole, puntiformi, rossastre, sono attribuite a *Mannheimia haemolytica.*

Pseudomonas aeruginosa

- Bacilli Gram negativi, ossidasi positivi con colonie emolitiche o non, di aspetto "metallico" o "perlaceo", rugose, pigmentate, mucoidi, con odore caratteristico ("concord grapes"), capaci di crescere in agar Cetrimide a 42 ± 1 °C, appartengono alla specie *Pseudomonas aeruginosa*.

In tutti gli altri casi, e se necessaria conferma, procedere secondo lo schema seguente:

- Isolati con ossidasi negativa: identificazione con galleria API 20 E
- Isolati con ossidasi positiva: identificazione con galleria API 20 NE

Miceti/Lieviti

- Microrganismi con caratteristiche morfologiche attribuibili ai miceti lievitiformi devono essere identificati con una striscia biochimica (es. API 20C Aux) dopo averne confermato lo sviluppo in agar Sabouraud.

Mycoplasma spp.

- Il metodo è in grado di rilevare anche Mycoplasmi eventualmente presenti nel campione, pur non essendo mirato alla loro ricerca. Identificare secondo il metodo specifico.

12. CASI PARTICOLARI

I campioni provenienti da animali con mastite clinica o sub-clinica, risultati negativi all'esame batteriologico, possono essere sottoposti ad uno dei seguenti trattamenti alternativi:

- Semina del campione in brodo nutritivo ed incubazione per 18/24 ore o a 37 °C prima della coltura sui terreni solidi.
- Semina di maggiore volume di campione (es. 100 µl).
- Ciclo di congelamento-scongelamento del campione prima della semina
- Incubazione del campione a 37 °C per 18-24 h prima della semina
- Ricerca di microrganismi non previsti dal presente metodo (vedi 1.1)

13. PERFORMANCE DEL METODO

- N. a.

14. CALCOLO ED ESPRESSIONE DEL RISULTATO:

Il risultato della prova è espresso in maniera qualitativa come campione negativo o positivo per i batteri identificati.

15. REGISTRAZIONE DEI DATI

- Riportare i dati della prova nei documenti di registrazione adottati in laboratorio.

16. CALCOLO DELL'INCERTEZZA DI MISURA

- N.a.

17. RAPPORTO DI PROVA

- Viene prodotto come previsto dalla sezione 13 del Manuale della Qualità.

18. ALLEGATI

- N.a.

19. DOCUMENTI CORRELATI

- N.a.

ELENCO REVISIONI				
REV.	DATA	PAGINA	PARAGRAFO	MODIFICHE
00	19.10.09	-	-	-