Anna Jubert (ALLIC) Herramientas de Diagnóstico en Granja

Cultivo bacteriológico en granja como herramienta de apoyo en la toma de decisiones del tratamiento de las mastitis clínicas bovinas



Veterinario: medidas para reducir el uso de antibióticos en animales de producción. **Situación** actual



Desinfección de los pezones después del ordeño



Mantenimiento periódico del equipo de ordeño



Tratamiento precoz de TODOS los casos de mastitis clínica



Eliminación de vacas crónicas



Tratamiento de TODOS los cuarterones de las vacas en el momento del secado



Veterinario: medidas para reducir el uso de antibióticos en animales de producción **Nuevos** enfoques



Tratamiento selectivo de los casos de mastitis clínica



Tratamiento selectivo en el secado



Medidas de higiene exhaustiva y estrategias de buenas prácticas : Reducción de la incidencia de infección



Promover la utilización de pruebas diagósticas rápidas para identificación de patógenos y reducir uso de antimicrobianos



Evitar la alimentación de los terneros con leche de deshecho de vacas tratadas con antimicrobianos

Veterinario: medidas para reducir el uso de antibióticos en animales de producción. Tratamiento selectivo mastitis clínica

Mastitis Clínica: Es necesario un tratamiento RÁPIDO y ORIENTA QUE

Diagnóstico laboratorial = 72 horas (envío y siembra),

No permiten esperar el resultado para iniciar una terapia antibiótica orientada

Implantación de terapia antibiótica de amplio espectro

A menudo resulta un tratamiento inadecuado, casi el 50% de los casos de MC se tratan de manera inapropiada o innecesaria.

Gasto inútil de medicamentos

Aparición de resistencias
tiempos de espera en leche largos





Veterinario: medidas para reducir el uso de antibióticos en animales de producción. Tratamiento selectivo de los casos de mastitis clínica



Se ha demostrado que en el caso de mamitis clínica leve o moderada causada por bacterias gram - como E.coli, no mejoran significativamente las tasas de curación. (Barlow,2011;Suojala et al.,2013;Persson et al.,2015)



Además las IMI causadas por levaduras, Prototheca spp., Mycoplama spp o casos sin crecimiento bacteriano en la investigación microbiológica convencional no justifica ningún tratamiento terapéutico (Roberson et al.,2004; Hoe y Ruegg,2005; Lago et al.,2011; Roberson,2012)



Sin embargo, el tratamiento antimicrobiano de las inflamaciones de la ubre causadas por bacterias gram+, especialmente Streptococcus o Stahylococcus puede mejorar significativamente las tasas de curación bacteriológica (Roberson, 2012)



Veterinario: medidas para reducir el uso de antibióticos en animales de producción. Tratamiento selectivo de los casos de mastitis clínica

Tenemos herramientas para rápida diferenciación del grupo de patógenos en 12 a 24 h.

Permite tomar decisiones

CULTIVO EN GRANJA

¿Qué buscamos? ¿Principal causante de Mastitis?





PREDOMINANTE





Veterinario: medidas para reducir el uso de antibióticos en animales de producción: Cultivo en granja: ¿Qué nos aporta?

Terapia racional responsable

Exigencia en un futuro próximo

Nos va ayudar a DECIDIR cual será el TRATAMIENTO de elección

> "CULTIVO para TRATAR"

Ni mucho menos se va a llegar a un DIAGNÓSTICO **ESPECÍFICO**

> (identificación precisa)

No remplaza al Laboratorio de diagnóstico habitual:

"CULTIVO para **DIAGNOSTICAR**"

Nos permitirá un **TRATAMIENTO** TEMPRANO de la infección sin arriesgar la salud y el bienestar de los animales.

ELECCIÓN **RESPONSABLE DEL** ANTIBIÓTICO,

Terapia dirigida, consistente y con criterio





Veterinario: medidas para reducir el uso de antibióticos en animales de tratamiento mastitis decisiones Toma

Determinar la GRAVEDAD de la mastitis clínica:
 GRADO 1 (leve), GRADO 2 (moderada), GRADO 3 (Grave)



Did you know that not all clinical mastitis cases has to be treated with antibiotics. In up to 60% of mastitis cases, cows are classified as either Grade 1 or Grade 2 and as such other form of treatment is suitable.



• En los resultados del CULTIVO, que pueden ser obtenidos dentro de las 24 horas: las decisiones de tratamiento se basan en gran medida en la distinción entre crecimiento gram+, crecimiento gram- y ausencia de crecimiento (Lago et al., 2011; Cameron et al., 2014).



Permite realización de tratamiento justificado



Reducción del uso no adecuado de antibióticos





Puede llegar a reducir el uso de antimicrobianos en un 50%.

(2011, J.Dairy Sci.94:4457-4467, Lago et al)

Menos leche descartada

Tratamiento RACIONAL, en línea con las directrices gubernamentales

Veterinario: medidas para antibióticos en animales de producción. reducir el uso de

Relación entre GANADERO y VETERINARIO: FORMACIÓN:

Toma de muestra de leche del cuarterón

Consejos errores más comunes

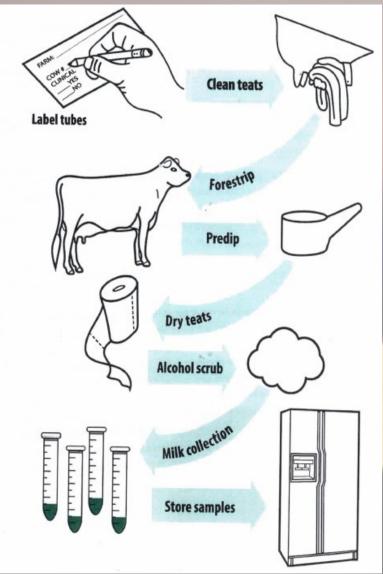
Zona de laboratorio

Material y equipamiento

Siembra e incubación. Eliminación de residuos

Lectura e interpretación





Cultivo en Granja: Procedimiento

Objetivo: obtener muestras asépticas





Toma de muestras del cuarterón



Lavarse las manos y utilizar guantes desechables antes de cada muestra



Desechar 3-4 chorros para eliminación de bacterias del canal y observación características de la leche



Rotular el tubo de muestras (Fecha/Granja/#vaca/cuarterón)



Sumergir cuarterones en desinfectante pre-ordeño durante 30 segundos



DD = delantero derecho DI = delantero izquierdo TD = trasero derecho TI = trasero izquierdo





Cepillar la suciedad, pelo de la ubre y restos de cama o materia orgánica. Lavar, aclarar y secar la ubre



Secar pezón con papel de un solo uso





Toma de muestras del cuarterón



Limpiar punta pezón con algodón/gasa alcohol 70% (uno por cuarteró los pezones más alejados a los más cercanos







Abrir tubo antes de la toma de muestra, mantener en horizontal, sostener tapón con una mano. No tocar interior del tubo. Dirigir 1-2 chorro pezón, inclinando 45ºel tubo hasta llenarlo a la mitad. Volver a tapar el tubo



Poner tubo de muestra en hielo o nevera hasta siembra. Sino, hacer siembra antes de 24 h





Desinfectar o cambiar guantes para tomar siguiente muestra





Errores comunes en el muestreo

Tomar la muestra antes del tratamiento con antibiótico

No mezclar muestra de varios cuarterones afectados (recoger leche de cuarterones individuales)

Evitar contaminación ambiente

- Pezón no suficientemente limpio
- Manos sucias
- Tubo toma de muestra abierto antes de tiempo





Errores comunes en el muestreo

Evitar contaminación de la muestra con desinfectante

- No habría crecimiento
- Sucede cuando no se seca bien el pezón o si desinfectante queda en los guantes

Si <5% muestras individuales contaminadas = Buena técnica de muestreo. Sino revisar:

- Técnica de muestreo
- Manipulación de muestras
- Técnicas de cultivo



Formar al personal de la sala de ordeño



Consejos

En la toma de muestras

Tomar la muestra con la ubre llena

Será más fácil y menos probable que se contamine

Tomar la muestra en sitio lo más limpio possible

Lugar más óptimo es en la sala de ordeño

Poner muestra en frío lo antes possible

Menos de una hora

Cambiarse de ropa si hay estiércol (ojo con las mangas)

Ojo con las mangas

Usar guantes y desinfectar de muestra a muestra

Muestras enviadas a laboratorio de referencia para prueba confirmatoria





Cultivo en granja

EL LABORATORIO. requisitos

Dedicar zona de la explotación a tareas de laboratorio

- Superficie de fácil limpieza y desinfección
- Sin corrientes de aire
- Sin oscilaciones de temperatura

Material

- Incubadora a 37º con termómetro de fácil lectura para monitorear
- Guantes y escobillones o micropipetas estériles
- Bolsa sellada para residuos
- Alcohol 70º, lejía diluida







37ºC +/- 2ºC



Cultivo en granja: siembra e incubación

Desinfectar zona de trabajo

Usar guantes. Desinfectar entre muestra y muestra

Si la muestra está congelada, dejar que se descongele completamente en la nevera

Usar hisopo o micropipeta nuevo para cada muestra

Los residuos generados (placas/tubos/pipetas) se consideran de riesgo biológico potencial

Agitar suave: invertir el tubo 15 veces

Rotular placa/tubos del kit

Si se siembra con hisopo: saturarlo de leche (8-10 seg)

No tomar leche grumosa ni con coágulos

Sembrar en cada medio. Antes de sembrar en cada sección de la placa o tubo, volver a sumergirlo en leche.

Plada en incubadora, pre-ajustada a 37ºC, boca abajo

Congelar las muestras

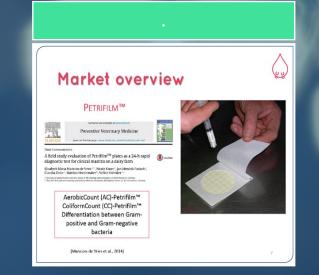
Desinfectar zona de trabajo

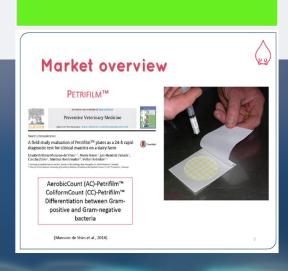


Cultivo en granja: diferentes tests

Biplaca o triplaca











Cultivo en granja: diferentes tests

Tubo





Cultivo en granja:

Diferentes tests

Evaluar en función de

- Rapidez (12/24h)
- Simple
- Fácil interpretación
- Fecha caducidad larga
- Identificación principales patógenos
- Precio





Cultivo en granja:

Diferentes tests

Parámetros a evaluar en la validación

- Sensibilidad: Capacidad del método de detectar la presencia del microrganismo objetivo. Si el objetivo del test es la detección de GRAM +, el test tendrá una alta sensibilidad si es capaz de detectar correctamente los gram positivos
- Especificidad: Capacidad del método de detectar la no presencia del microrganismo objetivo. Si el objetivo del test es la detección de GRAM +, el test tendrá una alta especificidad si es capaz de dar como negativo la no presencia (ausencia) de gram positivos
- Capacidad discriminar contaminación
- Capacidad discriminar crecimiento mixto

		CULTIVO EN GRANJA	
		RESULTADOS POSITIVO	RESULTADOS NEGATIVOS
MUESTRA POSITIVA (TOTAL 100) MÉTODO DE REFERENCIA		90 SENSIBILIDAD	10 FALSOS NEGATIVOS ANIMALES SUBTRATADOS
(TOTAL 200)	MUESTRA NEGATIVA (TOTAL 100)	20 FALSOS POSITIVOS ANIMALES SOBRETRATADOS	80 ESPECIFICIDAD



Cultivo en granja: diferentes tests

El veterinario junto con el ganadero evaluaran el test y en función de los resultados aplicarán el protocolo de actuación

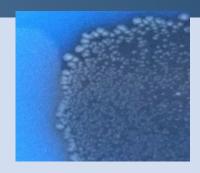
CULTIVO CLÁSICO: Medio de cultivo: Agar Esculina, Incubación: 37ºC en condiciones de aerobiosis, Lectura: 24 y 48 horas, Interpretación de resultados:

CULTIVO PURO:

si solo 1 morfotipo está presente en la placa de agar sangre

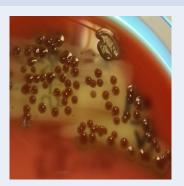


Cultivo puro con colonias aisladas



Cultivo puro con colonias poco aisladas

MUESTRA CONTAMINADA: si dos o más tipos de hacterias están presentes CONTAMINADAS < 5%



Cultivo puro mayoritario con subcultivo



verdaderos negativos

verdaderos negativos

falso negativo

falsos negativos

Muestra contaminada

CRECIMIENTO:		
SIN CRECIMIENTO		
(25-40%)		

MUFSTRA SIN



puede indicar que el c	iarto no fue i	ntectado
------------------------	----------------	----------

especies de Mycoplasma o otros microorganismos anaerobios)

el cuarto estaba infectado pero el sistema inmune de la vaca ya ha respondido a la infección y elimina las bacterias antes de tomar la muestra: esto es común en infecciones Gram - errores en la toma de muestra: desinfectante, almacenamiento incorrecto, vaca tratada AB algún tipo de bacterias no crece en las condiciones estándar de incubación (por ejemplo,

CULTIVO	LASICO CONVENCIONAL		TEST EN CRANIA		
CULTIVO CLASICO CONVENCIONAL		TEST EN GRANJA			
CULTIVO para DIAGNOSTICAR		CULTIVO para TRATAR			
CLASIFICACION	RESULTADO	RESULTADO	LIMITACIONES		
cocos	Staphylococcus aureus	Gram positivos (GP)			
GRAMPOSITIVOS	Staphylococcus coagulasa negativos (SNC)				
	Streptococcus uberis				
	Enterococcus spp.		La mayoría de kits son útiles para la diferenciación de categ	gorías amplias (GP y GN),	
	Streptococcus dysgalactiae		pero son menos fiables cuando se aplica un diagnóstico a nivel de género y esp		
	Streptococcus agalactiae				
	Otros Streptococus				
BACTERIAS	Escherichia coli	Gram negativos (GN)			
COLIFORMES	Otras Bacterias coliformes				
PATÓGENOS DE	Pseudomonas spp.	No crecimiento	Hay microorganismos tardíos (necesitan más tiempo para		
CRECIMIENTO	Corynebacterium spp.		su crecimiento): Pseudomonas, Corynebacterium,	NO AFECTA AL OBJETIVO	
LENTO	Trueperella pyogenes		Streptococcus de crecimiento tardío, etc.	(TRATAMIENTO MC)	
			' '		
Otros PATÓGENOS	Bacillus spp.	No crecimiento	Al utilizar medios selectivos para la diferenciación de	NO AFECTA AL OBJETIVO	
	Prototheca spp		Gram positivos o Gram negativos hay microorganismos	(TRATAMIENTO MC)	
	Levaduras		que no crecerán, como Prototheca, Levaduras, Nocardia,	(THE CONTROLLED	
	Nocardia		Bacillus		
INFECCIONES MIXTAS	Infecciones mixtas por cocos gram	Gram positivos			
	positivos	Gram negativos	Hay kits que no pueden reconocer infecciones mixtas no uniformes (patógenos		
	Infecciones mixtas por bacterias	depende del kit	positivos y Gramnegativos simultáneamente)	mornies (parogenos Grain	
	coliformes		positives, evaluated simulations of		
	Infecciones mixtas no uniformes				
CONTAMINADO	Contaminado	depende del kit	Hay kits que no pueden discriminar muestras de leche cont	caminadas. Alguno de ellos.	
			en este caso obtendremos como resultados GP o GN.		
NO CRECIMIENTO	No hay la bacteria/desinfectante/	No crecimiento			
	bacterias anaerobias (Mycoplasma)				



Lectura e interpretación

http://dairyknow.umn.ectu/topics/milk-quality/minnesota-easy-culture-system-user-s-guid

• Minnesota (Ref. 2014 J.Dairy Sci.97:3648-3659)

Biplaca

- Crecimiento /no crecimiento
- Gram + / Gram -
- Presencia S. aureus

Triplaca

- Crecimiento /no crecimiento
- Gram + / Gram -
- Clasificación estafilococo y estreptococo
- Presencia S. aureus

Pros

- Visión de colonias y su morfología,
- Discriminación de muestras contaminadas
- Discriminación de crecimiento mixto

Contras

- Caducidad corta: las placas se pueden secar
- Al utilizar medios selectivos para la diferenciación de Gram positivos o Gram negativos hay microorganismos que no crecerán, como Prototheca, Levaduras, Nocardia, Bacillus. NO AFECTA AL OBJETIVO (TRATAMIENTO MC)

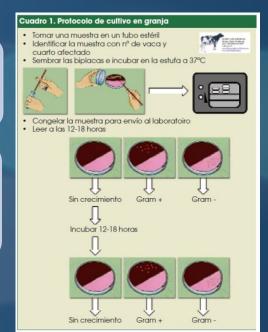


Estos sistemas son <u>menos fiables</u> para llegar a los niveles más detallados de diagnóstico distintas de S.aureus, por ejemplo otras especies de *Staphylococcus*, Strep. uberis, Strep. dysgalactiae, E.coli, Klebsiella ... Minnesota (Ref. 2014 J.Dairy Sci.97:3648-3659)



Minnesota Easy® Culture System User's Guide







Triplaca VetoRapid®

- Selectivo Gr (E.Coli, coliforms) lectura 8-16h
- Selectivo Estafilococo (S.aureus vs. SCN).
 Lectura 24h
- Selectivo Estreptococo (S.esculina vs. S esculina neg.) lectura 24-36-48h

Pros

- Visión de colonias y su morfología,
- Discriminación de muestras contaminadas
- Discriminación de crecimiento mixto



EVALUACIÓN DE DOS TESTES DE CULTIVO BACTERIOLÓGICO PARA APOYAR LAS DECISIONES DE TRATAMIENTO EN MASTITIS CLÍNICAS BOVINAS – PÓSTER, C. 2019.

Por ANEMBE (Secretaría) I Calidad de Leche

Malcata F, Viora L, Zadocks RN The present study aimed to evaluate the performance of two culture test kits intended to b used on-farm as a diagnostic and treatment decision...

Evaluation of a culture-based pathogen identification kit for bacterial causes of bovine mastitis

L. Viora, MVB, MRCVS¹, E. M. Graham, MVB, MVM, PhD, MRCVS², D. J. Mellor, BVMS, PhD, DipECVPH, MRCVS¹, K. Reynolds, MIBMS P. B. A. Simoes¹ and T. E. Geraghty¹



- Caducidad corta: las placas se pueden secar
- Al utilizar medios selectivos para la diferenciación de Gram positivos o Gram negativos hay microorganismos que no crecerán, como Prototheca, Levaduras, Nocardia, Bacillus. NO AFECTA AL OBJETIVO (TRATAMIENTO MC)

Triplaca VetoRapid®

Varios estudios han validado el sistema:

Es una herramienta de diagnóstico que permite la fácil identificación de los patógenos mamarios más comunes causantes de mamitis clínica: E.coli, estafilococos y estreptococos. Ref. 2007, Bradley et al. Veterinary Record 160, 253-258

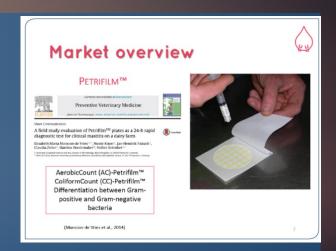
Es una herramienta que permite una primera y rápida identificación de las cinco causas más comunes de mastitis bovina en condiciones de trabajo en campo: E.coli, S.aureus, S.coagulasa negativos, S.uberis y Enterococcus spp. Ref. 2014, Viora et al., Veterinary Record 175, 89. http://dx.doi.org/10.1136/vr.102499

Es una herramienta útil para la diferenciación de categorías amplias (GP y GN), pero es menos fiable cuando se aplica un diagnóstico a nivel de género y especie. REF. Evaluación de dos testes de cultivo bacteriológico para apoyar las decisiones de tratamiento en mastitis clínicas bovinas – póster, c. 2019.

Lectura e interpretación

Sistema PETRIFILM 3M[®]: 2 placas (films)

- Contaje rápido aerobios (AC)
- Contaje rápido coliformes (CC)



Pros

- Las muestras sin crecimiento son claras ya que el medio AC es un medio no selectivo
- Fácil almacenamiento

Contras

- Su incapacidad para discriminar muestras de leche contaminadas de no contaminadas (no puedes distinguir las colonias por su morfología)
- No puede discriminar el crecimiento mixto no uniforme que contiene grampositivos y gramnegativos del crecimiento gramnegativo (ref. 2014, Mansion-de Vries et al.): casos de MC grampositivos no tratados

Milk production

Comparison of an evidence-based and a conventional mastitis therapy concept with regard to cure rates and antibiotic usage

E.M. Mansion-de Vries^{1,2}, J. Lücking^{1,2}, N. Wente¹, C. Zinke¹, M.Hoedemaker², V. Krömker¹

¹ University of Applied Sciences and Arts, Faculty II, Microbiology, Heisterbergallee 12, D-30453 Hannover, Germany

² Clinic for Cattle, Hanover University of Veterinary Medicine, Foundation, Bischofsholer Damm 15, D-30173 Hannover, Germany

Date submitted:24/02/2016

Date accepted: 06/06/2016

Volume/Page(s): 69/27-32



Accuracy of 12h-Petrifilm[™]-plates as a rapid on-farm test for evidence-based mastitis therapy on a dairy farm in Germany

2018, Krömker et al.; 2016, Mansion-de Vries et al.; 2014 Mansion-de Vries et al. 2013, Gitau et al. 2012 Roberson et al.; McCarron et al.;

Lectura e interpretación

Sistema ACCUMAST®

- Medios selectivos cromogénicos para identificación de patógenos
- Sofisticado permite mayor clasificación de género

Pros

- Visión de clara de las colonias: identificación de las bacterias basado en el color
- Discriminación de muestras contaminadas

• Caducidad corta: las placas se pueden secar

Discriminación de crecimiento mixto

Contras

 Al utilizar medios selectivos para la diferenciación de Gram positivos o Gram negativos hay microorganismos que no crecerán, como Prototheca, Levaduras, Nocardia, Bacillus. No afecta al objetivo (tratamiento mc)



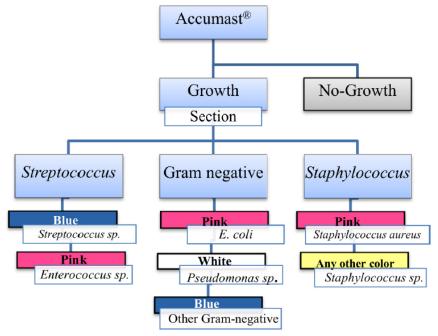


Fig 2. Flow-chart for on-farm diagnosis of mastitis pathogens based on Accumast.

doi:10.1371/journal.pone.0155314.g002

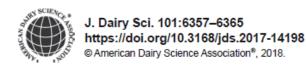


MASTDECIDE®

- Cocos grampositivos
- Bacterias coliformes
- No crecimiento
- Sistema cerrado
- 100µl de siembra
- No identifica la bacteria



MEDIO 1 (tapón blanco) CRECIMIENTO BACTERIANO	MEDIO 2 (tapón amarillo) GRAM POSITIVO	RESULTADO	MÉTODO DE REFERENCIA
BLANCO (+)	ROSA (-)	GRAM - /Coliformes	E.coli, Klebsiella spp, otros coliform (Citrobacter, Enterobacter)
(.,	()	/ Comornies	Infección mixta de Gram -
BLANCO (+)	BLANCO (+)	GRAM +	S.aureus, CNS, S.uberis, S.agalactiae, S.dysgalactiae, Enterococci, Lactococcus), Infección mixta de Gram +
ROSA (-)	ROSA (-)	SIN CRECIMIENTO	Patogenos de crecimiento tardio: Prototheca, Corynebacterium, Pseudomonas, Levaduras, Mycoplama No hay bacteria
BLANCO /ROSA (+)/(-)	BLANCO /ROSA (+)/(-)	TODOS LOS RESULTADOS SON POSIBLES	Muestra contaminada



Laboratory evaluation of a novel rapid tube test system for differentiation of mastitis-causing pathogen groups

S. Leimbach¹ and V. Krömker

University of Applied Sciences and Art, Faculty II, Microbiology, Heisterbergallee 10A, 30453, Hanover, Germany

Pros

- Es una de las pruebas más rápidas para el diagnóstico de grupos de patógenos. Resultados: 12-14h
- Las muestras sin crecimiento son claras
- Fácil de usar y interpretar
- Fácil almacenamiento y larga caducidad (8 meses en refrigeración

Contras

- Posible interferencia con muestras contaminadas.
- No pueden rl de siemeconocer infecciones mixtas no uniformes (patógenos Gram positivos y Gramnegativos simultáneamente)



Conclusiones

El veterinario junto al ganadero evaluarán test de diagnóstico y protocolo de actuación

Calidad de la muestra de leche: garantía éxito para el diagnóstico

- •Si más del 40% no hay crecimiento: revisar protocolo toma muestras y kit
- •Si hay < 5% muestras/cuarterón contaminadas = Buena técnica
- •Enviar muestras a lab de referencia para confirmación del test

Cultivo en granja es una herramienta indispensable para toma de decisiones

- •Buena herramienta para la diferenciación de mastitis GP de mastitis no GP pero no reemplaza al laboratorio de diagnóstico habitual
- •Ideal como primera actuación pero en caso de repetición de las mastitis, es necesario enviar muestra al laboratorio para realizar una identificación y antibiograma
- •No implementar tratamiento en rebaños con Mycoplasma spp, Prototeca spp o Trueperella pyogenes.





ASSOCIACIÓ INTERPROFESSIONAL LLETERA DE CATALUNYA LABORATORI INTERPROFESSIONAL LLETER DE CATALUNYA

Ctra. Vilassar de Mar a Cabrils, s/n – 08348 Cabrils (Barcelona)
T 93 750 88 56 F 93 750 89 53 - www.allic.org