

## I test batteriologici / micologici per l'ippiatra: come utilizzarli al meglio (parte 1)

I test batteriologici e micologici sono un ausilio molto importante nella clinica equina di campo. Vediamo alcuni suggerimenti che permettono di ottimizzare l'efficienza di questo tipo di diagnostica per i vari distretti.

### Considerazioni preanalitiche

La cosa migliore da fare quando si richiede un esame batteriologico che riguardi un tessuto, un organo o delle secrezioni, sarebbe di inviare al laboratorio il materiale in toto da seminare. Purtroppo questo non sempre è possibile per ovvie problematiche logistiche (corriere, attività itinerante del veterinario che si occupa di equini, materiali deperibili, ...) e quindi una buona opzione è quella di utilizzare un tampone con terreno di trasporto, in modo da "fotografare" la situazione batteriologica/micologica del campione al momento del prelievo.

Laboklin fornisce gratuitamente dei tamponi con medium di Amies con carbone, che permette un buon isolamento di molti funghi e batteri aerobi ed anaerobi, responsabili di patologia in veterinaria e anche particolarmente delicati (es. *Taylorella equigenitalis* per le fattrici). Non si tratta di un terreno nutritivo ma solamente preservante, che inibisce le reazioni cellulari degenerative ed ossidative, fotografando per quanto possibile la popolazione dei microrganismi presente al momento del prelievo per almeno 24/48 ore, sia per batteri che per miceti. A richiesta forniamo anche tamponi con terreno Stuart senza carbone, anch'esso adatto alla maggior parte degli apparati. I tamponi senza terreno di trasporto sono invece utili per l'esecuzione di esami genetici o di PCR per la ricerca di diversi agenti patogeni.

Una volta prelevato il materiale da sottoporre a coltura, si consiglia di spedirlo entro le 24 ore. Non è necessario mantenerlo refrigerato,

quando arriverà in laboratorio verrà infatti immesso in un primo terreno di arricchimento in modo da poter avere una prima crescita nelle successive 24/48 ore ed un secondo isolamento entro i 3 giorni.

Laboklin fornisce a richiesta anche delle apposite bottiglie per emocoltura che non necessitano di trasporto particolare, utilizzabili anche per l'esame batteriologico di alcuni liquidi cavitari particolarmente delicati.

Per la coltura micotica valgono le stesse indicazioni della batteriologia. Inoltre, dato che la crescita fungina è generalmente più lenta, per alcuni microrganismi possiamo effettuare una ricerca tramite metodica PCR che permette di identificare l'agente eziologico in 2/4 giorni anziché aspettare lo sviluppo della colonia. Si possono utilizzare tamponi con medium, sperma per la *Taylorella equigenitalis* o parti di cute, croste e peli per i dermatofiti.

### Antibiogramma

Si tratta di un metodica sviluppata per stabilire se il microrganismo isolato in coltura è sensibile agli antibiotici (o antimicotici) che possono venir utilizzati nel cavallo. Esistono due metodiche utilizzabili a questo scopo, vediamo quali sono.

*Metodo per diffusione (Kirby – Bauer):* si applicano sulla superficie della coltura isolata dei dischetti di carta impregnati con una quantità fissa dei vari antibiotici che intendo testare, i quali diffonderanno concentricamente nell'agar della piastra di coltura, causando un alone di inibizione della crescita. Misurando dopo 24 ore questa zona di inibizione della crescita attorno ad ogni dischetto di antibiotico, sarà possibile catalogare il microrganismo come sensibile (S), resistente (R) o intermedio (I) per ogni antibiotico presente sul disco, in funzione

proprio dell'ampiezza della zona di inibizione (maggiore è l'ampiezza, più è efficace la molecola). I diametri rappresentano l'espressione dell'inibizione della crescita rapportata alla diffusione di una quantità fissa di antibiotico nel gel e non permettono di quantizzare la minima concentrazione efficace (MIC) di antibiotico che potrebbe essere sufficiente ad ottenere l'effetto terapeutico desiderato.

*Microdiluizione in brodo:* si tratta del metodo che utilizziamo di routine e che costituisce il gold standard per la valutazione dell'efficacia di un antibiotico, in quanto fornisce risultati quantitativi. La coltura isolata viene infatti inoculata in pozzetti contenenti diluizioni seriali degli antibiotici da testare (16–8–4 -2–1-0,5–0,25-0,12 mg/L), incubata a 37° per 20 ore, dopodiché viene letta la più bassa concentrazione di antibiotico (MIC) che risulta inibire in modo visivamente chiaro la crescita delle colonie presenti nel brodo e questo costituisce il cosiddetto “*endpoint*”.

I valori soglia per stabilire la sensibilità o resistenza del microrganismo presente in coltura sono di solito quantizzati con un numero variabile, specifico per ogni coppia “microrganismo vs antibiotico testato” e vengono stabiliti da Comitati Internazionali, considerando la possibilità di ottenere facilmente quel livello terapeutico plasmatico di farmaco in vivo, senza incorrere in fenomeni di tossicità; lo stesso valore numerico potrebbe quindi essere abbinato ad una definizione di “resistente” per una molecola poco diffusibile nei tessuti, oppure “sensibile” per un'altra, qualora le corrispondenti concentrazioni plasmatiche fossero ottenibili con facilità nel cavallo.

In pratica vengono stabiliti due valori soglia (i cosiddetti “*breakpoints*” bkp1 e bkp2) all'interno dei quali si è stabilito, attraverso prove cliniche (microbiologiche e farmacologiche), il range ottimale di efficacia di quella molecola per il cavallo, e si confronta il cosiddetto “*endpoint*” della molecola testata in vitro con questi due valori di riferimento: a seconda di dove si

posiziona l'*endpoint* relativo alla MIC del dato antibiotico, il microrganismo viene classificato come:

- sensibile se inferiore a bkp1
- intermedio se all'interno di bkp1 e bkp2
- resistente se superiore a bkp2

Il clinico poi con queste informazioni può valutare quale antibiotico utilizzare e con quale dosaggio per avere la maggior probabilità di successo terapeutico, riducendo l'insorgenza di fenomeni di antibioticoresistenza.

Vediamo ora i principali impieghi della batteriologia / micologia per singolo apparato nel cavallo.

### Apparato urogenitale

*Tamponi uterini:* abbiamo a disposizione dei pacchetti particolarmente convenienti di “Idoneità alla riproduzione” (esame batteriologico, CEM e micologico) appositamente studiati per investigare l'endometrio; possono essere richiesti su tamponi diretti, su tampone da biopsia o da low volume flush. La crescita batterica riscontrata sarà sottoposta ad antibiogramma qualora ritenuta patogena per quel distretto o presente in alta carica. Nel referto verrà specificato se la fattrice può venire coperta o necessita di un trattamento.

Per una maggior accuratezza è sempre consigliabile abbinare alla batteriologia i reperti clinici, l'anamnesi ed un esame citologico (da citobrush o low volume flush) per poter prendere le corrette decisioni terapeutiche.

*Tamponi per CEM (Taylorella equigenitalis):* si tratta di un agente patogeno venereo piuttosto contagioso. Questi tipo di accertamenti vengono solitamente effettuati in sede di compravendita o prima di una monta naturale, sia nella fattrice che nello stallone.

Possiamo allestire sia una coltura contestualmente ad un normale esame batteriologico, sia solo per *Taylorella*, o ancora effettuare una PCR su tampone con medium, quest'ultima metodica con tempistiche particolarmente favore-

voli. A questo proposito ricordo che offriamo un “Profilo CEM - PCR per lo stallone (3 localizzazioni: prepuzio, uretra e fossa del glande) e per la fattrice (2 localizzazioni: fossa e seni clitoridei)” che permettono di avere un esito in 1–3 giorni.

Una crescita batterica in bassa carica senza ulteriori indizi (citologici, clinici od ecografici) di infezione in atto, non permette una diagnosi di endometrite.

Possibili patogeni endometriali includono: *Streptococcus zooepidemicus*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*. La presenza di miceti come *Candida sp.* / *Aspergillus sp.* è sempre un indizio di alterazioni anatomico-funzionali gravi dell'apparato riproduttore.

Per la terapia sono utilizzabili sia antibiotici / antimicotici per infusione uterina che per via sistemica e la scelta si effettua tenendo conto dei risultati dell'antibiogramma, della fase del ciclo estrale e delle tempistiche di inseminazione.

**Urina:** è sempre preferibile recuperare il materiale tramite cateterismo, sia nella fattrice che nello stallone, anche se è descritta la presa delle urine “al volo”, che può essere però difficoltosa in alcuni soggetti. La cistocentesi è metodica attuabile solamente nel puledro neonato o molto piccolo, per ovvi limiti dimensionali.

Le urine possono anche essere sottoposte a coltura direttamente, se prelevate e spedite rapidamente e quindi seminate entro le 24 ore dalla raccolta. In alternativa è preferibile effettuare subito un tampone con medium sul materiale raccolto per poi inviarlo contestualmente al resto del liquido prelevato per ulteriori approfondimenti. Laboklin fornisce gratuitamente i contenitori adatti per la raccolta di urina, con tutte le accortezze e protezioni necessarie per una spedizione in sicurezza.

Specificando sempre un'accurata anamnesi, la sintomatologia clinica e la metodica di raccolta del campione, i nostri batteriologi potranno

valutare se una eventuale crescita batterica – dato che le urine non sono sterili - sia da considerarsi patologica o meno, e quindi allestiranno un antibiogramma se il tipo di microrganismo o la carica riscontrata faranno pensare ad una infezione in corso, in modo da aiutare il clinico nel prendere le decisioni terapeutiche più opportune.

Possibili patogeni isolabili includono:

*Streptococcus zooepidemicus*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium sp.*. Per la terapia (dopo antibiogramma) sono da preferire gli antibiotici che vengono escreti per via urinaria.

## Apparato respiratorio

**Vie respiratorie superiori:** i tamponi da scolo nasale sono generalmente poco specifici per la diagnostica batteriologica delle forme respiratorie di questo distretto. Per le patologie dei seni, delle tasche gutturali e della faringe si consiglia il prelievo tramite endoscopio. È possibile anche effettuare un tampone dell'ostio delle tasche od un tampone faringeo “alla cieca” utilizzando i normali tamponi uterini, ovviamente scamicciati. La metodica non è complicata e non richiede sedazione, permette di ottenere campioni particolarmente diagnostici con meno contaminanti. Ovviamente vanno posti in apposito medium per il trasporto al laboratorio.

**Tracheal wash e BAL:** il fluido raccolto con queste metodiche può essere inviato al laboratorio in provetta da siero per la batteriologia e in provetta EDTA per la citologia, oppure possiamo effettuare un tampone con medium direttamente al momento del prelievo, ricordando di eliminare il fluido che appare molto schiumoso per la presenza di surfattante.

L'esame batteriologico da TW permette di evitare la contaminazione batterica di microrganismi presenti in orofaringe (a meno di ripetuti accessi di tosse), mentre la batteriologia da BAL è generalmente meno attendibile poiché è possibile che si verifichino delle contaminazioni

al momento della introduzione del catetere / endoscopio per via naso-faringea.

Le vie aeree del cavallo non sono sterili ed alcuni batteri potenzialmente patogeni potrebbero essere isolati anche in animali sani. La discriminante terapeutica quindi è sia la quantizzazione delle colonie ma soprattutto la citologia ed i reperti clinici.

Possibili patogeni respiratori includono: *Streptococcus zooepidemicus*, *Actinobacillus*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Rhodococcus* nel puledro.

Per la terapia (dopo opportuno antibiogramma) sono da preferire gli antibiotici che diffondono bene nel parenchima polmonare e negli eventuali ascessi presenti.

*Liquido pleuro-pericardico*: questi fluidi devono essere raccolti con metodica ecoguidata. È possibile poi:

- immerterli in bottiglie da emocoltura, se l'aspetto macroscopico non è troppo alterato
- raccoglierci in provette da siero (per test biochimici e batteriologia)
- effettuare un tampone diretto al momento del prelievo
- utilizzare provette con EDTA per la citologia.

È da segnalare che di solito il liquido pleuro-pericardico con batteriologia positiva appare molto alterato già ad una rapida ispezione visiva. In attesa della coltura è pertanto consigliato ricercare all'esame citologico la presenza di corpi batterici che, dopo le opportune colorazioni (gram positivo vs gram negativo), possono già indirizzare il clinico verso la scelta dell'antibiotico più adatto.

Per la terapia di questo distretto si consigliano lavaggi e drenaggi ripetuti, con soluzione salina addizionata ad antibiotico secondo i test di sensibilità, in quanto la penetrazione degli antimicrobici per via sistemica in questo distretto non è ottimale.

## Apparato gastro-enterico

*Peritonite*: in caso di sospetta peritonite settica è possibile prelevare del liquido peritoneale tramite centesi senza ulteriori rischi, possiamo poi come per gli altri liquidi cavitari effettuare:

- un tampone sul fluido raccolto
- immergere il materiale in una provetta sterile da siero (per gli esami biochimici e la batteriologia)
- utilizzare una provetta con EDTA qualora si voglia effettuare un esame citologico.

La bottiglia da emocoltura è utilizzabile solo se nel fluido non si rileva sangue, fibrina, pus, feci o materiale alimentare.

In caso di peritonite settica acuta possono non esserci i tempi tecnici per aspettare una coltura, vale quindi quanto affermato per il liquido pleuro-pericardico: ricercare i corpi batterici tramite un esame citologico - generalmente dopo citospin - per stabilire a grandi linee che tipo di terapia antibiotica preferire (gram positivi / gram negativi) in attesa dei più precisi risultati colturali.

Se la peritonite settica è risultato di una rottura viscerale od una pregressa chirurgia addominale potremmo avere isolamento di più di una popolazione batterica. L'isolamento di un solo agente patogeno è maggiormente frequente nel puledro (*Rhodococcus equi*, *Streptococcus equi*, ...).

*Enterocoliti*: in questi casi possiamo effettuare un esame batteriologico fecale, offriamo infatti un "Profilo feci / diarrea" per adulto e uno per puledro, con batteriologia e micologia per ricerca di agenti patogeni come Salmonella e Clostridi e per la rilevazione di enterotossine, oltre ad un esame parassitologico e PCR per Giardia, *Rhodococcus*, *Lawsonia* (virus intestinali). Gli esiti sono normalmente disponibili in 1-3 giorni lavorativi.

Laboklin fornisce noi gratuitamente gli appositi contenitori ermetici protetti per un'ideale raccolta ed un trasporto sicuro di materiale fecale.