

Diagnostica in sanità animale e produzioni animali

**FOCUS SULLE MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO, DI ACCETTAZIONE,
ESECUZIONE E REFERTAZIONE DI PROVE
DIRETTE RELATIVE A PIANI NAZIONALI DI CONTROLLO (SALMONELLOSI)
E PIANI NAZIONALI DI ERADICAZIONE (BRUCELLOSI
E TUBERCOLOSI)**

IZSLT– Sede di Roma, Via Appia Nuova 1411, 26 novembre 2020

Andrea Caprioli

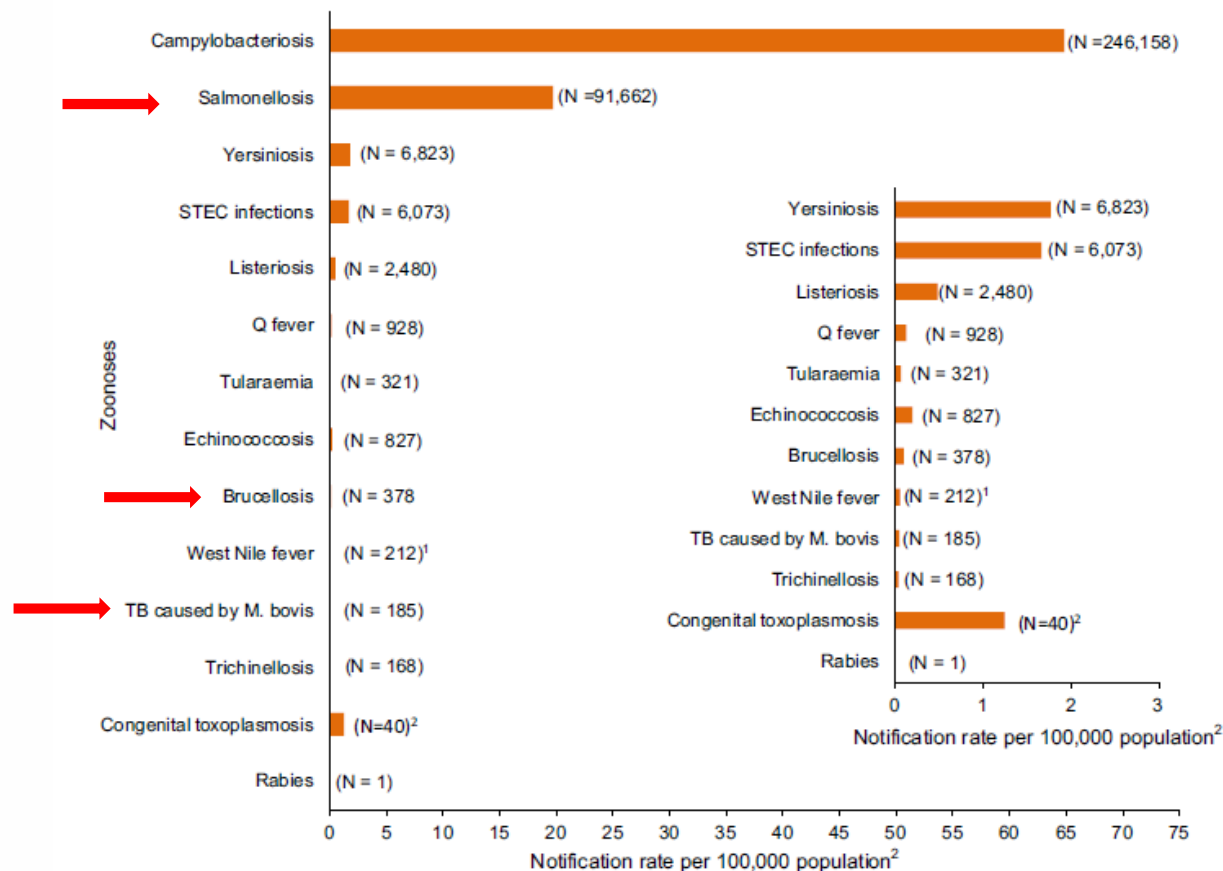
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DEL LAZIO E DELLA TOSCANA “M. ALEANDRI”

Unità Operativa Complessa Diagnostica Generale (U.O.C. D.O. DIG)



The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC)



Results of **zoonoses** monitoring activities carried out in 2017 in 37 European countries (28 Member States (MS) and nine non-MS).

Note: Total number of confirmed cases is indicated in parenthesis at the end of each bar.

¹Exception: West Nile fever where total number of cases were used.

²Exception: congenital toxoplasmosis notification rate per 100,000 live births.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

REQUISITI DI IDONEITA' DI UN CAMPIONE BIOLOGICO



PORRE PARTICOLARE ATTENZIONE A:

- Ø **Malattie denunciabili** e comunque a patologie con risvolti di sanità pubblica.
- Ø **Malattie diffuse** “sensibili” che coinvolgano in particolare animali di allevamento.
- Ø **Malattie che prevedono abbattimento** del capo e/o dell'intero effettivo presente in allevamento.
- Ø **Malattie con POTENZIALE ZOONOSICO!**

TBC, Brucellosi, Salmonellosi





Ministero della Salute

DI REZIONE GENERALE DELLA SANITÀ ANIMALE
E DEI FARMACI VETERINARI

Piano nazionale di controllo delle salmonellosi negli avicoli

2019/2021



INDICE DEGLI ARGOMENTI

- 1. ACRONIMI E DEFINIZIONI UTILIZZATI NEL PIANO**
- 2. OBIETTIVO E AMBITO DI APPLICAZIONE**
- 3. AUTORITA' COMPETENTI**
- 4. ANALISI DI LABORATORIO**
 - 4.1. Laboratori di riferimento
 - 4.2. Metodi di analisi in ambito PNCS
 - 4.2.1. Metodi di analisi per l'isolamento
 - 4.2.2. Metodi di analisi per la sierotipizzazione
 - 4.3. Trasmissione isolati a CRNS e a CRN-AR e Conservazione degli isolati
 - 4.3.1. Trasmissione isolati a CRNS
 - 4.3.2. Trasmissione isolati a CRN-AR e Analisi del profilo di antibioticoresistenza
 - 4.3.3. Conservazione degli isolati
- 5. ANTIMICROBICI**
- 6. CONTROLLI DEL PIANO**
 - 6.1. Piano di autocontrollo
 - 6.2. Controllo veterinario sistematico
 - 6.3. Programmazione campionamenti - frequenza, periodo e luogo del campionamento
 - 6.3.1. Programmazione campionamenti in autocontrollo
 - 6.3.2. Programmazione campionamenti ufficiali
 - 6.4. Verifiche sull'uso di antimicrobici in azienda
- 7. PROTOCOLLO - METODO E TECNICHE DEL CAMPIONAMENTO**
 - 7.1. Campionamenti di routine
 - 7.1.1. Riproduttori *Gallus gallus* e tacchini
 - 7.1.2. Ovaiole
 - 7.1.3. Polli da carne e tacchini da ingrasso
 - 7.2. Dettagli per tipologia di campione
 - 7.2.1. Campioni di sovrascarpe
 - 7.2.2. Campione di polvere
 - 7.2.3. Campione per la ricerca di inibenti
 - 7.2.4. Campionamento di mangime
 - 7.3. Conferma ufficiale in casi eccezionali di sospetto di risultati errati





- 7.5. Conferenza ufficiale in casi eccezionali di sospetto di risultati errati
8. **GESTIONE DEI CAMPIONI, SIA UFFICIALI CHE DI AUTOCONTROLLO**
 - 8.1. Schede di accompagnamento campioni
 - 8.2. Trasporto
 - 8.3. Gestione dei campioni presso il laboratorio
 - 8.4. Risposte analitiche
 9. **FLUSSO INFORMATIVO DEGLI ESITI DEI CAMPIONAMENTI**
 10. **MISURE IN CASO DI RISULTATI POSITIVI**
 - 10.1. Riscontro di sierotipi non rilevanti a seguito di campioni ufficiali in allevamento
 - 10.2. Riscontro di sierotipi non rilevanti a seguito di campioni di autocontrollo in allevamento
 - 10.3. Riscontro di *Salmonella Enteritidis* e/o *Typhimurium*, compresa la variante monofasica in allevamento
 - 10.4. Ulteriori misure in caso di riscontro di *S. Enteritidis* e/o *Typhimurium* in gruppi di riproduttori (*Gallus gallus* e tacchini)
 - 10.5. Riscontro di *Salmonella Infantis* in gruppi di riproduttori *Gallus gallus*
 - 10.6. Misure sulle uova da consumo
 - 10.7. Riscontro di *S. Hadar* e *Virchow* in allevamento di riproduttori *Gallus gallus*
 11. **PULIZIA E DISINFEZIONE DEGLI AMBIENTI**
 12. **VACCINAZIONI**
 13. **INDAGINE EPIDEMIOLOGICA**

PNC Salmonellosi 2019/2021

14. **REPORTISTICA**
15. **AZIONI IN CASO DI NON CONFORMITA'**
16. **QUALIFICHE SANITARIE DEGLI ALLEVAMENTI**
17. **INDENNIZZI**
18. **RENDICONTAZIONE TECNICA E FINANZIARIA**

2. **OBIETTIVO** E AMBITO DI APPLICAZIONE

Lo scopo del presente piano è quello di garantire che siano adottate misure adeguate ed efficaci di individuazione e di **controllo delle salmonelle potenzialmente responsabili di zoonosi a livello di produzione primaria**, ai fini della riduzione della prevalenza e del pericolo per la sanità pubblica.



Il PNCS è obbligatorio, su tutto il territorio nazionale, per i gruppi degli allevamenti avicoli a carattere commerciale delle seguenti specie e orientamenti produttivi:

- **Riproduttori *Gallus gallus*;**
- **Ovaiole *Gallus gallus*;**
- **Polli da carne *Gallus gallus*;**
- **Tacchini da riproduzione *Meleagris gallopavo*;**
- **Tacchini da ingrasso *Meleagris gallopavo*.**

Le attività di controllo del PNCS sono finalizzate al raggiungimento dell'**obiettivo comunitario di riduzione della prevalenza dei sierotipi** di Salmonella **rilevanti** per la salute pubblica che è pari:

- All'1% o meno per i gruppi di riproduttori e di polli da carne *Gallus gallus* e per i tacchini da riproduzione e da ingrasso;
- Al 2 % o meno per i gruppi di ovaiole in deposizione.

2. AMBITO DI APPLICAZIONE

PdAA= Piano di Autocontrollo Aziendale



Gli allevamenti con capacità strutturale uguale o superiore ai 250 capi devono applicare il piano integralmente.

Sono esentati dall'obbligo di applicazione del PNCS solo gli allevamenti familiari, come definiti dal DM 13.11.2013 ovvero quelli che non movimentano animali verso altri allevamenti, in cui gli animali sono allevati esclusivamente per autoconsumo o utilizzo personale senza attività commerciale e con capacità strutturale non superiore a 250 capi.

Gli allevamenti con capacità strutturale inferiore a 250 capi che movimentano gli avicoli ed effettuano attività commerciale, ad esclusione di quelle consentite dai regolamenti locali ai sensi del Reg. 852/2004, **possono applicare un PdAA semplificato ovvero adeguato alla realtà aziendale.**

Relativamente agli allevamenti familiari i SV hanno la facoltà, se lo ritengano opportuno, di prescrivere l'applicazione di un PdAA semplificato.

I SV hanno altresì la facoltà di prescrivere l'applicazione di un PdAA semplificato nei casi in cui lo ritengano necessario.

L' applicazione di tale PdAA semplificato deve essere registrata in BDN dai SV competenti.

Indipendentemente che si tratti di PdAA integrale o semplificato questo deve essere approvato dai SV.

2. AMBITO DI APPLICAZIONE



Il PdAA è firmato dal detentore degli animali ed è presentato al SV, che lo approva previa eventuale richiesta di modifiche o integrazioni. Copia del PdAA approvato deve essere conservata, oltre che dal responsabile dell'azienda, anche dall'AC.



7. PROTOCOLLO - METODO E TECNICHE DEL CAMPIONAMENTO

Il materiale per effettuare e conservare i campioni deve essere adatto allo scopo e deve essere nuovo e non riutilizzabile.

7.1 Campionamenti di routine

Ø Riproduttori polli e tacchini

Ø Ovaiole

Ø Polli da carne e tacchini da ingrasso

7. PROTOCOLLO -METODO E TECNICHE DEL CAMPIONAMENTO



7.1.2 Ovaiole

Il campione in autocontrollo è composto per ciascun gruppo almeno da:

- a) *nei gruppi in gabbia* - **due pool di feci fresche di 150 grammi l'uno**, prelevati dopo aver fatto azionare il sistema di rimozione della pollina per qualche minuto; nel caso in cui non siano presenti sistemi di rimozione della pollina devono essere prelevati almeno due campioni di feci fresche, ognuno di 150 grammi, presi da 60 posti diversi nelle fosse di deiezione al di sotto delle gabbie.
- b) *Nei gruppi allevati a terra* - **almeno due paia di soprascarpe** per gruppo.

Il campione ufficiale, è composto per ciascun gruppo almeno da:

- a) *nei gruppi in gabbia* - **tre pool di feci fresche di 150 grammi l'uno**, prelevati dopo aver fatto azionare il sistema di rimozione della pollina per qualche minuto; nel caso in cui non siano presenti sistemi di rimozione della pollina devono essere prelevati almeno tre campioni di feci fresche, ognuno di 150 grammi, presi da 60 posti diversi nelle fosse di deiezione al di sotto delle gabbie.
- b) *Nei gruppi allevati a terra* - **almeno tre paia di soprascarpe** per gruppo.

Il SV può sostituire un pool di feci o un paio di soprascarpe con un campione di polvere (100 grammi o tampone di tessuto pari 900 cm²).




ALLEGATO 1 -scheda di consultazione -

Materiali e Tecniche di prelievo campionamenti PNCS – CAMPIONE UFFICIALE

Ovaiole in gabbia				
Tipo campione	n. minimo campioni singoli per gruppo	Quantità per singolo campione	Materiale	Metodo di prelievo
Feci fresche	3	150 gr	Non applicabile	Con una spatola monouso prelevare le feci fresche dal nastro della pollina dopo averlo azionato per pochi minuti. Effettuare un campione rappresentativo ovvero avendo cura di prelevare materiale da punti diversi. In mancanza di nastro, prelevare le feci delle fosse deiezioni sotto le gabbie in 60 punti diversi. In ogni punto di prelievo operare un breve mescolamento con la spatola monouso.
Oppure				
Feci fresche	2	150 gr	Non applicabile	Con una spatola monouso prelevare le feci fresche dal nastro della pollina dopo averlo azionato per pochi minuti. Effettuare un campione rappresentativo ovvero avendo cura di prelevare materiale da punti diversi. In mancanza di nastro, prelevare le feci delle fosse deiezioni sotto le gabbie in 60 punti diversi. In ogni punto di prelievo operare un breve mescolamento con la spatola monouso.
+				
Polvere	1	100 gr	Non applicabile	Prelevare, eventualmente raschiando con una spatola monouso, la polvere da più punti delle batterie in modo tale da garantire un campione rappresentativo.
		Oppure		
		1 tampone	Tampone di tessuto 900 cm ² (quadrato di 30 cm per lato)	Passare sulle superfici impolverate il tampone di tessuto opportunamente idratato con soluzione fisiologica. Il tessuto deve risultare ben coperto di polvere da ambo i lati.



Ovaiole a terra				
Tipo campione	n. minimo campioni per gruppo	Quantità per singolo campione	Materiale	Metodo di prelievo
Sovrascarpe	3	Un paio di sovrascarpe (due "piedi")	 Tessuto assorbente	Umidificare le sovrascarpe con soluzione fisiologica. Indossare i calzari mono uso e <u>sopra questi</u> calzare le sovrascarpe in tessuto assorbente. Calpestare per ciascun paio di sovrascarpe circa il 33% della superficie calpestabile in modo tale da effettuare un campionamento rappresentativo.
Oppure				

25

PNC Salmonellosi 2019/2021

Sovrascarpe	2	Un paio di sovrascarpe (due "piedi")	Tessuto assorbente	Umidificare le sovrascarpe con soluzione fisiologica. Indossare i calzari mono uso e <u>sopra questi</u> calzare le sovrascarpe in tessuto assorbente. Calpestare per ciascun paio di sovrascarpe circa il 50% della superficie calpestabile in modo tale da effettuare un campionamento rappresentativo.
+				
Polvere	1	100 gr	Non applicabile	Prelevare, eventualmente raschiando con una spatola monouso, la polvere da più punti delle batterie in modo tale da garantire un campione rappresentativo.
		1 tampone	Tampone di tessuto 900 cm ² (quadrato di 30 cm per lato)	Oppure Passare sulle superfici impolverate il tampone di tessuto opportunamente idratato con soluzione fisiologica. Il tessuto deve risultare ben coperto di polvere da ambo i lati.



INDICAZIONI DI CARATTERE GENERALE

BIOSICUREZZA!!

- Confezionamento

Inserire il materiale prelevato (feci, sovrascarpe, polvere) in un idoneo contenitore monouso ed assicurarsi che esso sia etichettato ed ermeticamente chiuso.

Nell'inserire le sovrascarpe nel contenitore prestare attenzione ad evitare di rimuovere il materiale adesivo. Nel caso dei riproduttori le 5 paia di sovrascarpe possono essere inserite in 5 contenitori diversi o raggruppate a formare due pool. Nel caso delle altre categorie produttive le sovrascarpe possono essere inserite in contenitori diversi o raggruppate a formare un unico pool.

Tutti i contenitori del materiale campionato devono essere inseriti in un altro contenitore in modo tale che la documentazione d'accompagnamento non venga a contatto con essi e tale da proteggerli dalla luce solare.

- Trasporto

I campioni sono inviati ai laboratori di analisi preferibilmente entro 24 ore dal prelievo. Il trasporto può avvenire a temperatura ambiente, ma al riparo dal calore eccessivo e dalla luce solare diretta.

Se non è possibile inviare i campioni entro 24 ore, gli stessi devono essere refrigerati subito dopo il campionamento e devono essere conservati e trasportati a temperatura di refrigerazione, tenendo presente che l'analisi di laboratorio deve essere iniziata in ogni caso entro 4 giorni dal prelievo. A tal fine è necessario prendere preventivamente accordi con il laboratorio di riferimento.

8. GESTIONE DEI CAMPIONI, SIA UFFICIALI CHE DI AUTOCONTROLLO



Il laboratorio esegue le analisi sulla base delle informazioni ricevute insieme ai campioni, ovvero se il laboratorio riceve campioni per isolamento di *Salmonella* spp. effettuati nell'ambito del presente piano di controllo in assenza di opportuna scheda accompagnatoria è esonerato da responsabilità conseguenti alla mancata consapevolezza del contesto in cui sono stati prelevati i campioni.

8.1 Schede di accompagnamento campioni

Per ogni gruppo campionato è compilata, in ogni sua parte, una scheda di accompagnamento.

Le schede sono disponibili, con i dati anagrafici prestampati, accedendo alla BDN, sul portale internet www.vetinfo.it. In BDN, nell'ambito dell'allevamento di origine, deve essere selezionato il gruppo, registrato ai sensi del DM 13.11.2013, per cui si effettua il campionamento.

Ogni scheda prodotta dall'applicativo BDN sarà identificata con un codice univoco di prelievo riportato sulla scheda in chiaro e con codice a barre. L'uso della scheda prodotta da BDN è obbligatorio nel caso di campioni ufficiali.

8.2 Trasporto

I campioni sono inviati ai laboratori di analisi preferibilmente entro 24 ore dal prelievo. Il trasporto può avvenire a temperatura ambiente, ma al riparo dal calore eccessivo (25°C) e dalla luce solare diretta.

8. GESTIONE DEI CAMPIONI, SIA UFFICIALI CHE DI AUTOCONTROLLO



8.3 Gestione dei campioni presso il laboratorio

Il laboratorio verifica la conformità del campione e la completezza della scheda di accompagnamento.

In caso di identificazione di criticità che impattano sulla corretta gestione dei campioni (incluse condizioni per cui i campioni risultano non conformi rispetto a quanto previsto dal piano) il laboratorio contatta il verbalizzante al numero telefonico indicato sulla scheda. Nel caso non sia possibile contattare il verbalizzante (numero di telefono assente/illegibile/errato; verbalizzante non reperibile) il laboratorio decide come gestire i campioni. Il laboratorio inoltre **deve dare evidenza nell'esito che il campione ricevuto non risultava conforme rispetto a quanto previsto dal piano.**

Presso il laboratorio, i campioni devono essere conservati a temperatura di refrigerazione fino all'analisi, in ogni caso eseguita entro 4 giorni dal prelievo.

**SCHEDA DI PRELIEVO
SCARICATA DA VETINFO GIA' IN
PARTE PRECOMPILATA**

R. Campioni:

5

Richieste Prove Aggiuntive Aperte:

0

Numero Ente di origine:

PNCS_7752

Token:

BUS7H43J2TV7

CODICE PRELIEVO: PNCS_16819



Piano nazionale di controllo delle salmonellosi negli avicoli
Anno 2019

CONTROLLO UFFICIALE: OVAIOLE
SCHEDE DI ACCOMPAGNAMENTO CAMPIONI IN ALLEVAMENTO

1. DATI DELL'ALLEVAMENTO (residenti in gruppo e dati precompilati da BDN)			
Azienda ASL:	O205	Codice aziendale:	Codice fiscale proprietario:
ROMA 5			PNZTLL61A15F692I
			Codice fiscale detentore:
			PNZTLL61A15F692I
Via, numero:			
Località:			
Comune:			
Cap:			
Sigla Provincia:			
RM			
Modalità allevamento:		Numero di capi presenti nell'allevamento a piena capacità:	
In Gabbia		11136	
Tipologia produttiva:		Fase produttiva:	
		Fase Deposizione	
N. Capannoni popolati in BDN:		N. Gruppi previsti nell'anno:	
1		0	
Numero di gruppi presenti nell'allevamento al momento del campionamento:		Numero di capi presenti nell'allevamento al momento del campionamento:	
1		10.892	
2. DATI GRUPPO CAMPIONATO (Completare una scheda per ogni gruppo campionato)			
Identificativo del capannone o recinto campionato*:		Data accasamento:	N. di ovaiole del gruppo al momento del campionamento:
01		20/08/2019	10.892
Fase del ciclo produttivo al momento del campionamento:		Gli animali del gruppo sono stati vaccinati per S. Enteritidis e/o Typhimurium:	
<input checked="" type="checkbox"/> fase deposizione		<input type="checkbox"/> NO	
<input type="checkbox"/> Altra fase non prevista nel piano:		<input checked="" type="checkbox"/> SI, indicare il nome vaccino:	
Specificare:		AVIPLO SALMONELLA DUO	

* I dati necessari per identificare i gruppi campionati devono essere presenti in BDN. In caso di campionamento su più gruppi, si invoca: per tale motivo il Sistema Informativo Salmonellosi (SiSalm) seleziona i gruppi registrati in BDN.

1 Tutti i dati richiesti devono essere presenti;

2 L'unità di riferimento per i piani salmonellosi è il gruppo: insieme di avicoli, di uguale stato sanitario, allevati contemporaneamente (nello stesso ciclo produttivo) nel medesimo capannone, per i quali è possibile dimostrare la completa separazione fisica e gestionale. Il gruppo è definito da tre elementi:

Piano nazionale di controllo delle salmonellosi negli avicoli

Anno 2019

CONTROLLO UFFICIALE: OVAIOLE

Piano nazionale di controllo delle salmonellosi negli avicoli

2018/2021



C. MOTIVO DEL CAMPIONAMENTO

- ☐ Routinario
- ☐ Controllo nei gruppi di 24 +/- 2 settimane di età ospitati in capannoni in cui era stata isolata precedentemente S. Enteritidis Typhimurium
- ☐ Controllo in ogni caso di sospetta infezione da Salmonella sulla base dell'indagine epidemiologica dei focolai di tossinfezi alimentare di cui all'articolo 8 della Direttiva 2003/99/CE o nei casi in cui l'AC lo ritenga appropriato, utilizzando il proto di campionamento definito nell'allegato II, parte D, punto 4, lett. b), del regolamento (CE) n. 2160/2003
- ☐ Controllo su tutti gli altri gruppi presenti in allevamento nel caso siano state individuate salmonelle rilevanti in un gruppo
- ☐ Controllo nei casi ritenuti opportuni dall'Autorità Competente
- ☐ Controllo ambientale dell'avvenuta pulizia e disinfezione dei locali a seguito di positività per Salmonelle rilevanti
- ☐ Controllo di conferma, in casi eccezionali per sospetto di risultati errati (**)
- ☐ Controllo per ricerca inibenti

(**) Confermare che è stata concessa l'autorizzazione ministeriale

D. DATI CAMPIONE

Tipo di campione:

- ☐ Soprascarpe N° _____
- ☐ Polvere con tampone di tessuto N° _____
- ☐ Polvere N° _____
- ☐ Animali N° _____
- ☐ Tamponi ambientali (spugnette) N° _____
- ☒ Feci N° 2

Ufficiale dovevano essere
3! Non idoneo!

DATA 29-10-19 11h
° RILEVATA °C _____
1° NON RILEVABILE 20
FIRMA PER ACCETTAZIONE _____
FIRMA OPERATORE 1251 12

E. ANALISI RICHIESTE

- ☒ Ricerca Salmonella
- ☐ Ricerca Inibenti

Data del prelievo 29.10.2019

Nome e Cognome (stampatello) del Veterinario Ufficiale che ha effettuato il campionamento

Timbro e Firma

Dott. T...

Recapito telefonico [redacted]

N° Verbale ASL: _____

Dott. T...

3 Secondo quanto previsto dal Piano.

Data di elaborazione

28/10/2019

Pagina 2 di 4

8. GESTIONE DEI CAMPIONI, SIA UFFICIALI CHE DI AUTOCONTROLLO



Galline ovaiole

Le sovrascarpe possono essere riunite in un unico pool per l'analisi, nel caso ciò non sia possibile il laboratorio raggruppa i campioni in più pool (sub campioni).

A ciascun pool/sub campione vanno aggiunti 225 ml di acqua peptonata tamponata (APT), a temperatura ambiente.

I campioni di feci vanno riuniti per l'analisi e dal pool accuratamente omogenato, è prelevato un sotto campione di 25 grammi. Tale sotto campione deve essere addizionato con 225 ml di APT a temperatura ambiente.

Nel caso di un campione di polvere con tampone di tessuto, aggiungere a ciascun campione 225 ml di acqua peptonata tamponata (APT), a temperatura ambiente.

Nel caso di un campione corrispondente a 100 grammi di polvere, prelevare un sub campione di 25 grammi e aggiungere 225 ml di APT a temperatura ambiente.

Polvere e materiale fecale vanno tenuti separati per l'analisi in caso di campioni ufficiali, in caso di campioni in autocontrollo è possibile non separare le matrici.

SIL accettazione 1 campione solo! VEDI IL DIG 018!!!!

4. ANALISI DI LABORATORIO



4.2.1 Metodi di analisi per l'isolamento

Le analisi previste per l'isolamento, di seguito descritte, si intendono da applicare ai campioni della produzione primaria ovvero a tutte le matrici previste nell'ambito del presente piano.

- *isolamento di salmonelle da campioni prelevati nell'ambito dei controlli ufficiali*: metodica di analisi per la rilevazione di *Salmonella* spp. di cui alla EN/ISO 6579-1:2017 accreditata dall'organismo nazionale di accreditamento
- *isolamento di salmonelle da campioni prelevati nell'ambito di autocontrollo*: metodica di analisi per la rilevazione di *Salmonella* spp. di cui alla EN/ISO 6579-1:2017 accreditata dall'organismo nazionale di accreditamento o metodo alternativo purché validato in accordo alla norma EN/ISO 16140 e accreditato dall'organismo nazionale di accreditamento.

LAB. ANALISI CHIMICHE E MICROBIOLOGICHE I.C.Q. SRL
UNISORE - 2017 - 371466

INTERNATIONAL
STANDARD

ISO
6579-1

First edition
2017-02

Microbiology of the food chain —
Horizontal method for the detection,
enumeration and serotyping of
Salmonella —

Part 1:
Detection of *Salmonella* spp.

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale
pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des
Salmonella —

Partie 1: Recherche des *Salmonella* spp.

4. ANALISI DI LABORATORIO

POS DIG 001 NOR Rev 3 *Salmonella* spp. esame colturale ricerca-Metodo ISO



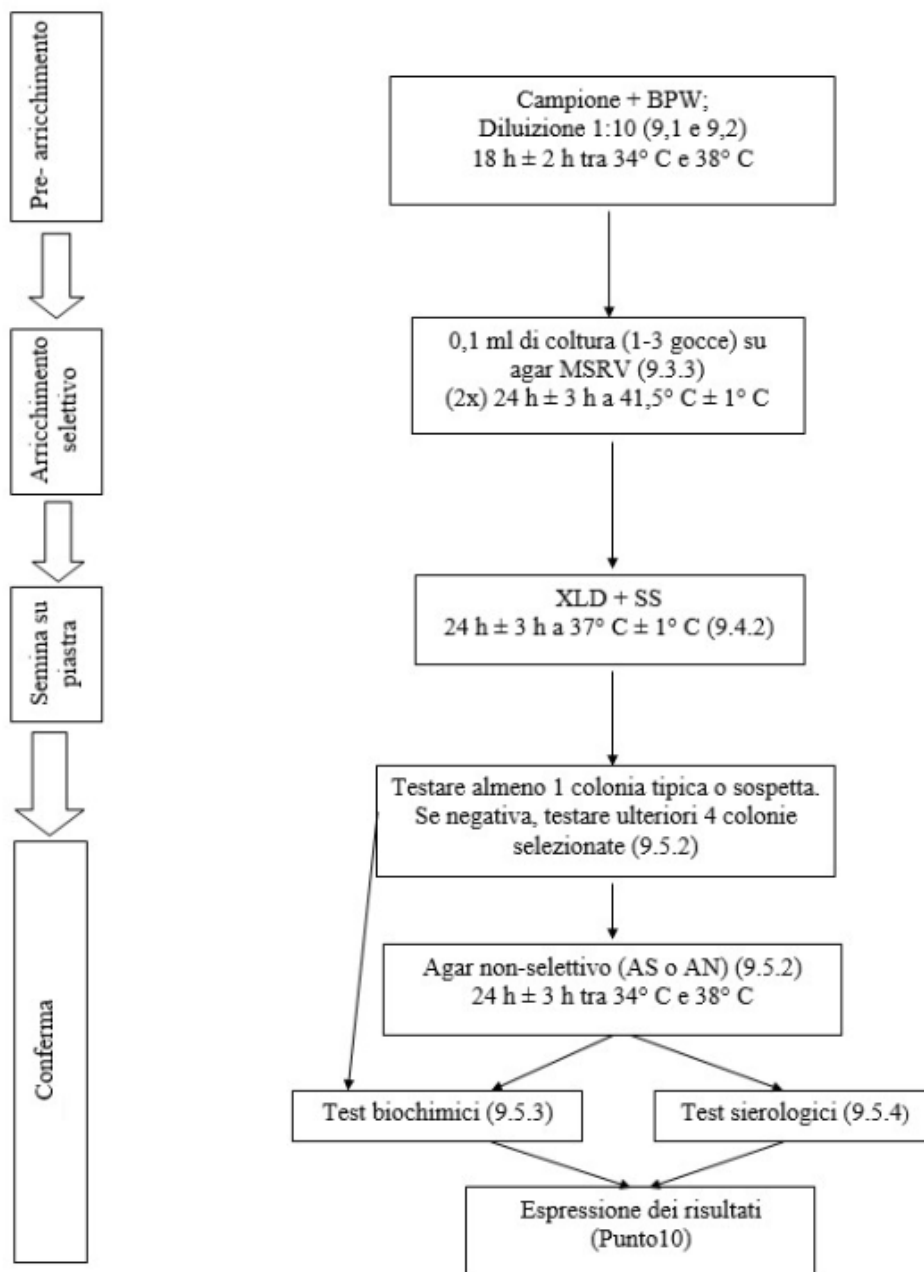
 Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri	
UNITA' OPERATIVA COMPLESSA DIAGNOSTICA GENERALE	
POS DIG 001 NOR rev. 3	
SALMONELLA SPP. (ESAME CULTURALE-RICERCA-METODO ISO)	pag. 1 di 16

SALMONELLA SPP. (ESAME CULTURALE-RICERCA-METODO ISO)

Rev.	Data di emissione:	Redazione Incaricato Struttura	Verifica Responsabile della prova/Responsabile taratura/attività	Convalida Qualità	Approvazione Responsabile di Struttura
3	28/08/2020	Andrea Caprioli	Antonio Battisti	Stefania Bugattella	Antonio Battisti
2	09/05/2018	Andrea Caprioli Carmela Buccella Serena Lorenzetti	Antonio Battisti	Stefania Bugattella	Antonio Battisti

Descrizione delle modifiche/motivo della redazione	
Modifica della denominazione della tecnica	Modificata denominazione della tecnica in: esame colturale-ricerca-Metodo OIE
Modifica dell'espressione del risultato	Adeguamento delle modalità di espressione del risultato in funzione del parere del Centro di Riferenza per le Salmonellosi del 01/08/2019, Prot. 0009329/2019. L'espressione del risultato passa da Presente/Assente a Rilevato/Non Rilevato.
Revisione della normativa di riferimento	Amendment della ISO 6579-1: 2017/DAM 1 (ampliamento range di temperatura per l'incubazione di alcuni terreni).
Aggiornamento dei riferimenti di supporto	Inserimento delle PG QUA 015 e PG SPP 003.
Adeguamento alla modulistica	Aggiornamento in base al modulo per la stesura delle POS MOD 016 rev 1.

Diagramma della procedura



4.2.2 Metodi di analisi per la sierotipizzazione

**INVIO DI TUTTI GLI ISOLATI (1 isolato per
unità epidemiologica) DI SALMONELLA AL
C.R.E.P. U.O.C. ALIMENTI**

**La sierotipizzazione deve essere basata
sullo schema di Kauffmann-White-Le Minor.**

8.4 Risposte Analitiche

Poiché agli esiti analitici è legata l'applicazione di misure sanitarie, **le analisi sui campioni di cui al Piano hanno carattere di priorità**. Pertanto i laboratori garantiscono risposte analitiche nel tempo più breve possibile, compatibilmente con i tempi necessari all'esecuzione delle analisi che dipendono necessariamente dalle metodiche utilizzate (vedi anche capitolo "Analisi di Laboratorio").

La risposta analitica (rapporto di prova/esito) deve riportare indicazione dell'assenza o presenza di *Salmonella* spp.

In caso di presenza di *Salmonella* spp. l'esito deve riportare: indicazione del/i sierotipo/i isolato/i o indicazione di esclusione di sierotipi rilevanti (come previsto in caso di campioni prelevati nell'ambito dell'autocontrollo per le categorie galline ovaiole, polli da carne e tacchini da ingrasso) ed esito dell'identificazione di ceppi vaccinali se del caso.

Nei casi in cui è necessario effettuare una sierotipizzazione completa (campioni ufficiali e campioni prelevati nell'ambito dell'autocontrollo per le categorie riproduttori *Gallus gallus* e tacchini) se il laboratorio è in grado di escludere rapidamente la presenza di sierotipi rilevanti, ovvero *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, inclusa la sua variante monofasica e *S. Infantis* nel caso specifico dei riproduttori *Gallus gallus*, può scegliere di emettere un rapporto di

Sierotipi rilevanti



Sierotipi di salmonelle rilevanti per la salute pubblica	<i>Per i gruppi di riproduttori Gallus gallus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Salmonella Enteritidis, • Salmonella Typhimurium, compresa la variante monofasica con formula antigenica 1,4[5],12:i:- • Salmonella Infantis • Salmonella Virchow, Salmonella Hadar
	<i>Per i gruppi di ovaiole, polli da carne, tacchini da riproduzione e ingrasso</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Salmonella Enteritidis • Salmonella Typhimurium, compresa la variante monofasica con formula antigenica 1,4[5],12:i:-

RILEVANTI - Vincolo sanitario, animali abbattuti-destinati al macello, uova distrutte o pastorizzate, uova non destinate alla cova....

NON RILEVANTI - Il SV, in collaborazione con il veterinario aziendale, deve **condurre una IE** al fine di verificare l'efficacia delle misure finalizzate a impedire l'ingresso e la diffusione di salmonelle all'interno dell'allevamento. 'AC può aggiornare la IE già effettuata e **richiedere modifiche/integrazioni delle misure di biosicurezza**. Inoltre può intensificare la frequenza dei controlli ufficiali.

AMR



4.3 TRASMISSIONE ISOLATI A CRNS E A CRN-AR E CONSERVAZIONE DEGLI ISOLATI

4.3.1 Trasmissione isolati a CRNS

Per ogni **campione ufficiale** positivo ai sierotipi Enteritidis, Typhimurium, compresa la variante monofasica e *S. Infantis* (quest'ultima esclusivamente da campioni prelevati in riproduttori *Gallus gallus*) almeno una colonia deve essere inviata dagli IIZZSS competenti per territorio al CRNS per ulteriori indagini.

4.3.2 Trasmissione isolati a CRN-AR e Analisi del profilo di antibioticoresistenza

Per ogni gruppo riscontrato positivo a qualsiasi salmonella, sia da campionamento ufficiale e sia da autocontrollo, i laboratori che hanno effettuato la sierotipizzazione devono inviare al CRN per l'Antibioticoresistenza (CRN-AR) almeno un isolato per ciascun sierotipo di salmonella riscontrato.

Ci pensa il CREP per noi

4.3.2 Trasmissione isolati a CRN-AR e Analisi del profilo di antibioticoresistenza



I suddetti isolati saranno sottoposti a test di sensibilità agli antibiotici e riportati all'EU secondo normativa vigente (Dec. 2013/652/EU). Ogni isolato inviato al CRN-AR dovrà esser corredato dei necessari metadati (es. dati anagrafici, dati relativi al campione, dati relativi all'isolato), la cui tracciabilità e integrità deve essere garantita per adempiere alla vigente normativa sulla reportistica del Piano di Monitoraggio armonizzato dell'antibioticoresistenza (Dec. 2013/652/EU).

Pertanto gli isolati saranno **corredati dal codice univoco di prelievo** riportato sulla scheda di accompagnamento campioni e dalle informazioni relative al numero progressivo (se da uno stesso gruppo o da uno o più campioni sono stati isolati diversi sierotipi) e qualora necessario dalla matrice di origine. **I dati anagrafici a corredo degli isolati inviati al CRN-AR verranno forniti direttamente dal SISalm utilizzando il codice univoco di prelievo.**

La cadenza temporale per l' invio degli isolati è stabilita come trimestrale , attenendosi alle seguenti date:

SIL numero verbale

N. Campioni:	5
Richieste Prove Aggiuntive Aperte:	0
Numero Ente di origine:	PNCS_7762
Token:	BU67H4XU2TV7

DA OEVR: Gentili colleghi,
nell'ambito della attuale analisi sulle criticità sul raggiungimento dei **LEA** della Regione Lazio, abbiamo rilevato una problematica organizzativa del nostro Ente sull'implementazione del **sistema informativo salmonellosi**.
Come sapete il personale dell'Osservatorio alimenta il sistema a partire dalle schede di prelievo che voi inviate periodicamente.
Il LEA specifico su questo punto, prevede che i positivi vengano inseriti a sistema in un tempo massimo di una **settimana**. Ovviamente si intende (anche se non specificato) che è necessario introdurre l'esito positivo riferito all'identificazione anagrafica del gruppo di animali soggetti a prelievo, ANCORA PRIMA dell'identificazione del sierotipo.

Per riuscire in questo compito, è necessario che NON APPENA VENGA ISOLATO un ceppo di Salmonella spp., la corrispondente scheda di prelievo venga inviata, in cartaceo o scannerizzata, all'indirizzo dell'osservatorio oevrf@izslt; simone.corzani@izslt.it

Se vi fossero delle difficoltà a comportarsi come descritto o per qualsiasi altro dubbio, potete far riferimento alla sottoscritta o al Dr. Andrea Carvelli.



PNC Salmonellosi 2019/2021



IL DIG 018

Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

UNITÀ OPERATIVA COMPLESSA DIAGNOSTICA GENERALE

IL DIG 018 Rev 0

Istruzione di lavoro per la gestione della prova *Salmonella* spp. esame coltura-ricerca-Metodo ISO per campioni del Piano nazionale di controllo delle salmonellosi negli avicoli (ISO 6579-POS DIG 001 NOR) pag. 1 di 8

**ISTRUZIONE DI LAVORO PER LA GESTIONE DELLA PROVA *SALMONELLA* SPP.
ESAME COLTURA-RICERCA-METODO ISO PER CAMPIONI DEL PIANO NAZIONALE
DI CONTROLLO DELLE SALMONELLOSI NEGLI AVICOLI (ISO 6579-POS DIG 001
NOR)**

Rev.	Data di emissione:	Redazione Incaricato Struttura ¹	Verifica Dirigente o Collaboratore sanitario professionale esperto	Approvazione Responsabile di Struttura
0	03/09/2020	Gruppo H&S Sanità Animale – Diagnostica: Andrea Caprioli Maira Guidoni Giorgio Saralli Marcello Sala Giuliana Terracciano Martina Benedetti Antonino Barone	Andrea Caprioli	Antonio Battisti

Descrizione delle modifiche/motivo della redazione	Armonizzazione delle prove nell'ambito delle attività Hub e Spoke Sanità Animale-Diagnostica
--	--

2. Linea guida per la prova *Salmonella* spp. esame coltura-ricerca-Metodo ISO per campioni del Piano nazionale di controllo delle salmonellosi negli avicoli (ISO 6579-POS DIG 001 NOR)

ACCETTAZIONE

FASE	PUNTO DA VALUTARE	INDICAZIONI E LINEE GUIDA
RICEZIONE ED ACCETTAZIONE DEL CAMPIONE	CONTROLLO MODULISTICA	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Accettare sotto la branca “Piano Nazionale Salmonella” solo i campioni con modulistica del Piano Nazionale vigente (es. Piano nazionale di controllo delle salmonellosi negli avicoli 2019-21). Altri campioni, anche se da avicoli, saranno accettati sotto la branca appropriata (es. Diagnostica). ➤ In Accettazione valutare l'utilizzo della modulistica del Piano scaricata da sito Ministero Vetinfo (https://www.vetinfo.it/) con numero Piano (PNCS_); tale utilizzo è obbligatorio per campioni ufficiali. Se la modulistica non è presente accettare con riserva e contattare il prelevatore per sanare il problema. N.B. I campioni devono essere conservati a temperatura di refrigerazione fino all'analisi, che in ogni caso deve essere eseguita/seguita entro 4 giorni dal prelievo.

UNITÀ OPERATIVA COMPLESSA DIAGNOSTICA GENERALE

IL DIG 018 Rev 0

Istruzione di lavoro per la gestione della prova *Salmonella* spp. esame coltura-ricerca-Metodo ISO per campioni del Piano nazionale di controllo delle salmonellosi negli avicoli (ISO 6579-POS DIG 001 NOR) pag. 3 di 8

➤ Per gli Autocontrolli, qualora non venisse utilizzata la modulistica del Piano scaricata da Vetinfo con presenza del numero Piano (PNCS_) è

LABORATORIO

FASE	PUNTO DA VALUTARE	Indicazioni e linee guida
ESECUZIONE DELLA PROVA	POS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ La prova deve essere accreditata. Rispettare quanto previsto nella POS DIG 001 NOR, preferibilmente utilizzare il foglio di lavoro PG DIG 001/11 rev. corrente. ➤ Per l'identificazione biochimica di <i>Salmonella</i> spp. l'utilizzo dell'API 20 E è consigliabile quando i risultati degli altri test biochimici/sierologici di conferma (TSI, Urea agar, LDM, agglutinazione antigeni O e Vi) non diano una chiara identificazione. ➤ Inviare al C.R.E.P. un solo isolato identificato biochimicamente e sierologicamente come <i>Salmonella</i> spp. Se l'aspetto delle colonie sui terreni (TSI, XLD, SS) fosse leggermente diverso, o l'isolato inviato non risultasse appartenere al genere <i>Salmonella</i>, inviare fino a 5 isolati sospetti differenti.
REFERTAZIONE E COMUNICAZIONE ESITO	INSERIMENTO E COMUNICAZIONE ESITI	<ul style="list-style-type: none"> ➤ La POS DIG 001 NOR prevede la dicitura dell'esito come Rilevato/Non rilevato. ➤ Attenzione alle matrici pesabili (es. feci, polvere, gusci d'uovo) deve essere aggiunta la dicitura in 25 gr. Le sovrascarpe non sono considerate pesabili. ➤ In caso di riproduttori il C.R.E.P. dovrebbe escludere nel più breve tempo possibile non solo la presenza di <i>Salmonella</i> enteritidis e Typhimurium, ma anche di <i>S. infantis</i> (sierovarianti rilevanti). ➤ L'esito di rilevata presenza (rilevato=positività per <i>Salmonella</i> spp.), sia per campioni ufficiali che autocontrolli, va sempre notificato ad ASL, regione di competenza ed eventuale sezione di invio dei campioni, preferibilmente mediante PEC, in alternativa utilizzano

Ø **Brucellosi**

Ø **Tuberculosi (TBC)**

Rilevanti per:

ü Sanità Pubblica (zoonosi)

ü Sanità animale

ü Scambi e commercio nazionale ed internazionale

ü Causano rilevanti danni economici

Ø In Italia soggette ad **eradicazione**!!! Denunciabili!

Ø Brucellosi: Decreto Ministeriale 15 Dicembre 1994, n. 651; Decreto Ministeriale 15 Dicembre 1992, n. 453

Ø Tubercolosi: Decreto Ministeriale 15 dicembre 1995, n. 592

Brucellosi

- Nell'uomo anche conosciuta come febbre ondulante, febbre maltese o febbre del Mediterraneo.
- Colpisce diverse specie animali fra cui:
bovini, ovi-caprini, suini, cani, cavalli
animali selvatici e animali marini.

Brucellosi

Ø Distribuzione

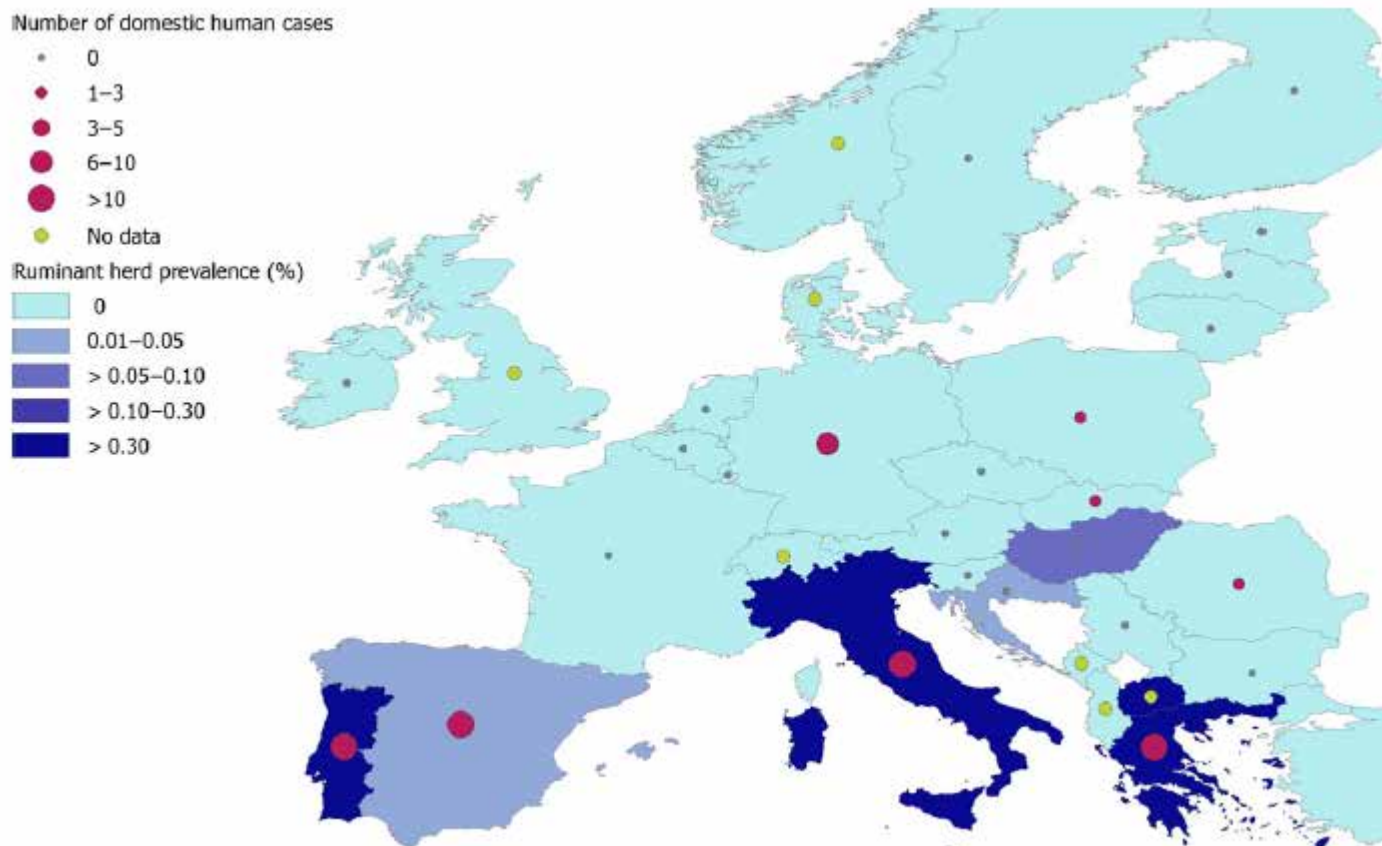
Ø Mondiale

soprattutto è diffusa nei paesi del Mediterraneo, in India, nei paesi mediorientali, nell'Asia centrale e in America Latina.

Ø Eradicata in alcuni paesi

Brucellosi

Ø Greece (0.87 cases per 100,000 population), **Italy (0.16)**, Portugal (0.16) and Spain (0.14) together accounting for 72% of all confirmed cases reported in 2017.



The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC)

Brucellosi

Allevamenti bovini positivi



AL: Albania; BA: Bosnia and Herzegovina; FYRM: Former Yugoslav Republic of Macedonia; ME: Montenegro; SR, Serbia.

Figure 44: Proportion of cattle herds infected with or positive for *Brucella*, according regional boundaries of official status (OBF or non-OBF), EU/EEA, 2017

The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC)

Brucellosi

Allevamenti ovi-caprini positivi

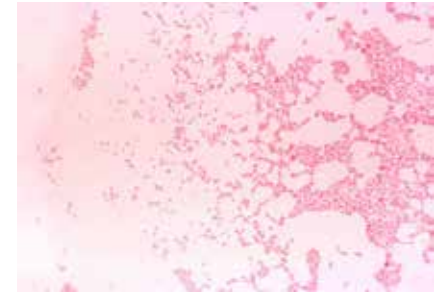


AL: Albania; BA: Bosnia and Herzegovina; FYRM: Former Yugoslav Republic of Macedonia; ME: Montenegro; SR, Serbia.

Figure 47: Proportion of sheep and goat herds infected with or positive for brucellosis, according regional boundaries of official status (ObmF or non-ObmF), EU/EEA, 2017



Eziologia

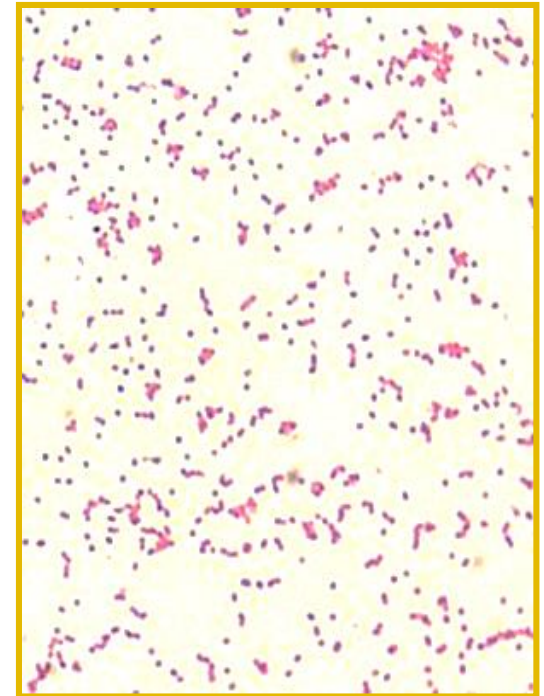


Ø *Brucella spp.*

Ø Gram negativo, coccobacillo molto piccolo (0,6-2,0 x 0,3-0,5 µm).

Ø Patogeno intracellulare facoltativo.

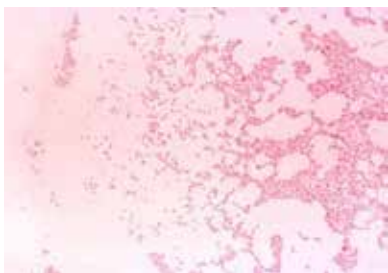
Ø Può persistere nell'ambiente anche a lungo.





Eziologia

- Responsabili dell'infezione sono otto specie appartenenti al genere Brucella:
 - *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti* e *B. pinnipedialis*.... *B. microti*..altre *Brucella* spp.
 - Le prime tre divise in biovars sulla base delle caratteristiche colturali e sierologiche.
- B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* gruppo di pericolo 3!



Sorveglianza delle Zoonosi:

Brucellosi

Cenni di epidemiologia

•Le brucelle hanno ciascuna un ospite d'elezione, che ne rappresenta il serbatoio di provenienza:

B. abortus →



B. melitensis →



B. suis →



B. canis →



B. ceti/pinnipedialis →





L'INFEZIONE

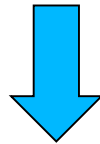
Ø Infezione persistente (life long)

Ø **Escrezione del microrganismo attraverso prodotti dell'aborto** (aborted fetus, afterbirth, vaginal discharge) **e secrezioni mammarie** (latte).

Brucellosi

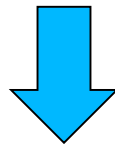
Modalità di trasmissione e patogenesi: Bovini e ovicaprimi

Secrezioni, deiezioni, prodotti abortivi e placenta animali infetti.



Via digerente, genitale, oculo-
congiuntivale

Linfonodi regionali



milza, fegato, midollo osseo e linfonodi

Stato di quiescenza

Micro-
mastite

Problemi genitali maschio

Aborto 3-
4° mese



Aborto 6-7° mese
gravidanza



La malattia (ruminanti)

Ø **Femmine**

Ø **Aborti**, natimortalità, animali nati deboli

Ø Ritenzione placentare, metrite

Ø Diminuzione produzione latte-**Micromastite subclinica**

Ø **Maschi**

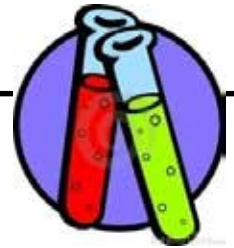
Ø Epididimite, orchite

Ø **Infertilità, artrite**

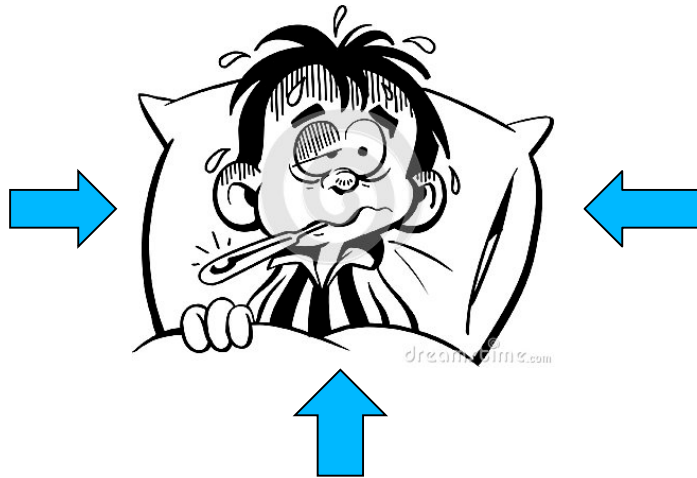


Brucellosi

Modalità di trasmissione : Uomo



Via transcutanea:
contatto diretto con
materiale biologico di
animali infetti
brucellosi occupazionale



Via aerogena e Via
congiuntivale: aerosol,
mani contaminate
**brucellosi in personale
di laboratorio**
Agente classe III!



Via alimentare: Consumo di
latte infetto non sottoposto ad
adeguato trattamento termico
o prodotti derivati freschi
Paesi industrializzati-Italia



ACCETTAZIONE CAMPIONI SOSPETTI BRUCELLOSI

Focolaio 2015... All'uopo si raccomanda di **CONFEZIONARE i campioni dopo il prelievo in IDONEI contenitori a tenuta, nel rispetto delle norme di biosicurezza**, avendo cura di identificare correttamente ogni singolo campione ed inviarli nel piu' breve tempo possibile al nostro Istituto, trasportandoli a temperatura di refrigerazione.



DOCUMENTO DI ACCOMPAGNAMENTO



Verbale di prelievo:

- Documenti allegati a: **Gazzetta ufficiale, Normativa, Piani Nazionali e Regionali** (no modulistica contraffatta, riprodotta o personalizzata).
- TBC e BRUCELLA:

VERBALE OSSERVATORIO EPIDEMIOLOGICO
VETERINARIO REGIONALE. REGIONE LAZIO

BRUCELLOSI MODULISTICA

OSSERVATORIO EPIDEMIOLOGICO VETERINARIO REGIONALE

REGIONE LAZIO

BRUCELLOSI DEGLI OVINI E DEI CAPRINI
SCHEDA DI RILEVAMENTO DATI
IN UN FOCOLAIO

Dr. Recapito telefonico.....

A.S.L. n° Data/...../.....

TIPOLOGIA INSEDIAMENTO — Allevamento ☐
— Stalla di sosta ☐

Codice identificazione azienda (DPR 317/96) □ □ □ □ □ □ □ □

Denominazione azienda

Proprietario

Via/località N. Comune Prov.

Data denuncia di malattia infettiva:/...../..... → **allegare mod. 1**
→ **allegare mod. 2/33**

Positività sierologica riscontrata nel corso di: - controllo per attività pianificata ☐
- compravendita ☐

STATO SANITARIO DELL'ALLEVAMENTO PRIMA DEL RILIEVO DEL FOCOLAIO

1) UFFICIALMENTE INDENNE:

SI ☐ Data conferimento qualifica/...../.....
Data ultima prova sierologica negativa/...../.....

NO ☐ Precedente positività sierologica: data/...../.....
n. capi controllati n. capi positivi

INDENNE (art. 1, comma 2, DM 292/95):

SI ☐ Data ultima prova sierologica negativa/...../.....

NO ☐ Precedente positività sierologica: data/...../.....
n. capi controllati n. capi positivi

2) PRECEDENTI POSITIVITÀ SIEROLOGICHE IN ALLEVAMENTO (Ultimi 10 anni)

NO ☐

SI ☐ → anno
n. capi controllati n. capi positivi

TUBERCOLOSI MODULISTICA



BRUCELLOSI E TUBERCOLOSI: ACCETTAZIONE

Ø Deve essere presente la **Modulistica specifica** con le informazioni previste.

Ø Attenzione ai dati anagrafici:

Detentore = Allevamento di origine, NO macello!

Per identificare allevamento infetto serve **Cod. aziendale**

allevamento di origine, matricola animale!

BRUCELLOSI E TUBERCOLOSI: ACCETTAZIONE

Ø Verificare **corrispondenza/congruità organi**!

Ø Invio campioni  Inviare **direttamente**
in sede centrale organi refrigerati!

**Per qualunque dubbio contattare
l'accettazione centrale e/o il
laboratorio!!!**

Se le cose non tornano contattare il prelevatore!

Brucellosi Diagnosi

Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Chapter 3.1.4.

Brucellosis (Brucella abortus, B. melitensis and B. suis) (infection with B. abortus, B. melitensis and B. suis) (NB: Version adopted in May 2016)
<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>

There is **no single phenotypic test** by which a bacterium can be identified unequivocally as *Brucella*. Accordingly, for a **definitive identification, a combination of growth characteristics, serological, bacteriological methods is required** (Alton et al., 1988; Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, 1986).

Brucellosi diagnosi diretta

- IZSLT ha una **Procedura Operativa Standard** per **l'esame colturale** di *Brucella* spp. accreditata secondo ISO/IEC 17025 Standard.
- **POS DIG 009 NOR.**
- Manuale OIE cap 3.1.4, maggio 2016

Diagnosi diretta: Scopi

- Ø Rilevare e determinare le **species/biovars coinvolte**
- Ø Affrontare il problema (anche dopo l'eradicazione) di risultati **falsi positivi sierologici**... (e. g. singoli o pochi reactors)
- **I test indiretti (serology) sono imperfetti per definizione...**
- **Rose Bengal Test ha «solo» 99.0% DSp!!! (DSp= Diagnostic Specificity)!**



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Immunology and Immunopathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetimm



**RBT = DSp (99.0%;
95% CPI: 98.0;
99.6%)**

Research paper

Evaluation of sensitivity and specificity of RBT, c-ELISA and fluorescence polarisation assay for diagnosis of brucellosis in cattle using latent class analysis

G. Matope^{a,*}, J.B. Muma^b, N. Toft^f, E. Gori^c, A. Lund^d, K. Nielsen^e, E. Skjerve^g

^a Department of Paraclinical Veterinary Studies, University of Zimbabwe, P.O. Box MP 167, Mount Pleasant, Harare, Zimbabwe

^b Department of Disease Control, University of Zambia, School of Veterinary Medicine, P.O. Box 32397, Lusaka, Zambia

^c Department of Preclinical Veterinary Studies, University of Zimbabwe, P.O. Box MP 167, Mount Pleasant, Harare, Zimbabwe

^d Department of Animal Health, National Veterinary Institute, P.O. Box 8156 Dep., N-0033 Oslo, Norway

^e Ontario Laboratories (Fallowfield), Canadian Food Inspection Agency, 3851 Fallowfield Road, Nepean, Ontario, Canada K2H 8P9

^f Department of Large Animal Sciences, Faculty of Life Sciences, Copenhagen University, Grønnegaardsvej 8, DK 1870 Frederiksberg C, Denmark

^g Department of Food Safety and Infection Biology, Norwegian School of Veterinary Science, P.O. Box 8146 Dep., 0033 Oslo, Norway

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2010

Received in revised form 28 January 2011

Accepted 9 February 2011

Keywords:

RBT
c-ELISA
FPA
Brucellosis
Latent class analysis

ABSTRACT

The sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the Rose Bengal test (RBT), competitive ELISA (c-ELISA), serum (sFPA) and blood (bFPA) fluorescence polarisation assay for brucellosis were evaluated using latent class analysis using sera and whole blood collected from infected cattle reared in smallholder dairy farms of Zimbabwe. The latent class model allowed estimation of Se and Sp in the absence of a gold standard test. The c-ELISA had the highest Se (99.0%; 95% credible posterior interval (CPI): 94.8; 100%), while the RBT and sFPA had the highest Sp (99.0%; 95% CPI: 98.0; 99.6%). The bFPA had the lowest Se (71.3%; 95% CPI: 56.2, 83.5%), while its Sp (96.3%; CPI: 93.9; 98.0%) was marginally higher than that of the c-ELISA (95.4% CPI: 93.7; 96.8%). Therefore based on these data, test regimen using the RBT and c-ELISA could be suitable for diagnosis of brucellosis in smallholder dairies in Zimbabwe. Based on cost and ease of performance, the sFPA may be adopted as a confirmatory test, but its performance may be optimised by altering cut-off points to suit the Zimbabwean conditions. Thus, latent class models provide an alternative method for evaluating Se and Sp of diagnostic tests, which could be used to optimise test performance in different cattle populations.

Indirect tests may detect **cross-reacting antibodies** resulting from exposure to other micro-organisms such as *Salmonella urbana* O:30, *Escherichia coli* O:116, O:157, *Yersinia enterocolitica* O: 9, etc.

AGENTI INTERFERENTI!



Brucellosi cross-reacting antibodies

Ricerca Agenti interferenti cross-reagenti nelle feci

- Nelle feci la Brucella non viene escreta!
(non caricare prova Brucella)
- Presenza di un agente interferente cross reagente non significa assenza di Brucella!
- Può essere di aiuto per aiutare a chiarire singoli casi di false positività!
- Prove da caricare SIL: Salmonella, Yersinia, Entero, Non entero, O157

Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies
to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT,
CFT, and iELISA

J.A. McGiven*, J.D. Tucker, L.L. Perrett, J.A. Stack, S.D. Brew, A.P. MacMillan

Department of Bacterial Diseases, FROTHO Collaborating Centre for Reference and Research on Brucellosis,

Veterinary Laboratories Agency, Woodham Lane, New Han, Weybridge, Surrey, KT15 1NR, UK

Received 21 August 2002; received in revised form 27 January 2003; accepted 8 April 2003

Table 1
Diagnostic specificity and sensitivity values for each method

Parameter	CFT	SAT	iELISA	cELISA	FPA
Test cutoff	20 IUs	30 IUs	10%	70%	15.5mP
DSp (%)	99.9 (± 0.20)	98.9 (± 0.65)	97.8 (± 0.34)	99.7 (± 0.28)	99.1 (± 0.44)
Total no. of samples	995 ^a	995 ^a	6957	1440	1947
DSn (%)	91.8 (± 4.46)	81.5 (± 6.30)	97.2 (± 2.65)	95.2 (± 3.47)	96.6 (± 2.95)
Total no. of samples	146	146	146	146	146
DSp + DSn	191.7 (± 4.45)	180.4 (± 6.33)	195.0 (± 2.70)	194.9 (± 3.48)	195.7 (± 2.79)

Values in parentheses indicate 95% confidence interval.

^a Data from Emmerzaal et al. (2002).

B. DIAGNOSTIC TECHNIQUES

Table 1. Test methods available for the diagnosis of infection with *Brucella abortus*, *melitensis* or *suis*

Purpose

Complement fixation test (CFT)

is the Gold Standard for International Trade

BDAT (RBT or BPAT)	+++	++	+++	+	+++	n/a
FPA	++	++	+	++	++	n/a
CFT	++	++	+++	++	+++	n/a
I-ELISA	+++	++	+++	++	+++	n/a
C-ELISA	++	+	+	+	++	n/a
BST	++	—	+	+++	++	n/a
SAT	++	+	+	—	+	n/a
NH and cytosol protein-based tests ^e	—	—	+	++	—	n/a
Bulk milk tests ^f Milk I-ELISA or Milk ring-test	+++	—	+++	+	+++	n/a

Key: +++ = recommended method; ++ = suitable method; + = may be used in some situations, but cost, reliability, or other factors severely limits its application; – = not appropriate for this purpose; n/a = not applicable.

Diagnosi diretta

L'isolamento è lento, costoso e difficile, ma **dovrebbe essere eseguito quando possibile per confermare la malattia e determinare le species/biovars coinvolte.**

Necessita di:

- Campioni adeguati (tipo, numero, ben conservati);
- Terreni specifici di coltura e di incubazione;
- Tempi lunghi (fino a 6 settimane);
- Biosafety/Biosecurity.

Biosafety / Biosecurity:

At least a Class II Safety Cabinet

Better in a BSL 3 laboratory!



Brucellosis is also one of the most easily acquired laboratory infections, and all laboratory manipulations with live cultures or potentially infected/contaminated material must be performed at an appropriate biosafety and containment level determined by biorisk analysis (see Chapter 1.1.4 Biosafety and biosecurity: Standard for managing biological risk in the veterinary laboratory and animal facilities).

Campioni di elezione per l'esame colturale

Ø Tessuti (**linfonodi, milza**, organi riproduttivi femminili e maschili).

Ø **Feti abortiti** (contenuto dello stomaco, milza e polmone).

Ø **Secrezioni vaginali**

Ø **Latte** e prodotti lattiero caseari

Ø **Fluidi da igromi**

Brucellosi-Diagnosi diretta: Gestione campioni

•POS DIG 009 NOR

Ø Tutti i campioni dovrebbero essere refrigerati (4-10°C) immediatamente dopo il campionamento e trasportati al laboratorio nel più breve tempo possibile.

Qalora i campioni non possano essere sottoposti a prova colturale entro 48-72 h dal prelievo è opportuno che vengano congelati a $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Brucellosi-Diagnosi diretta - **Esame colturale**

• **POS DIG 009 NOR**

Ø **9.2 Isolamento**

Ø L'isolamento si ottiene generalmente mediante l'effettuazione di **colture in parallelo** su terreni solidi e terreni liquidi di arricchimento selettivo.

Ø Farrell's Medium (**FM**)

Ø CITA Medium (**CITA**)

Ø **TSB1 o TSB2** (terreni liquidi)

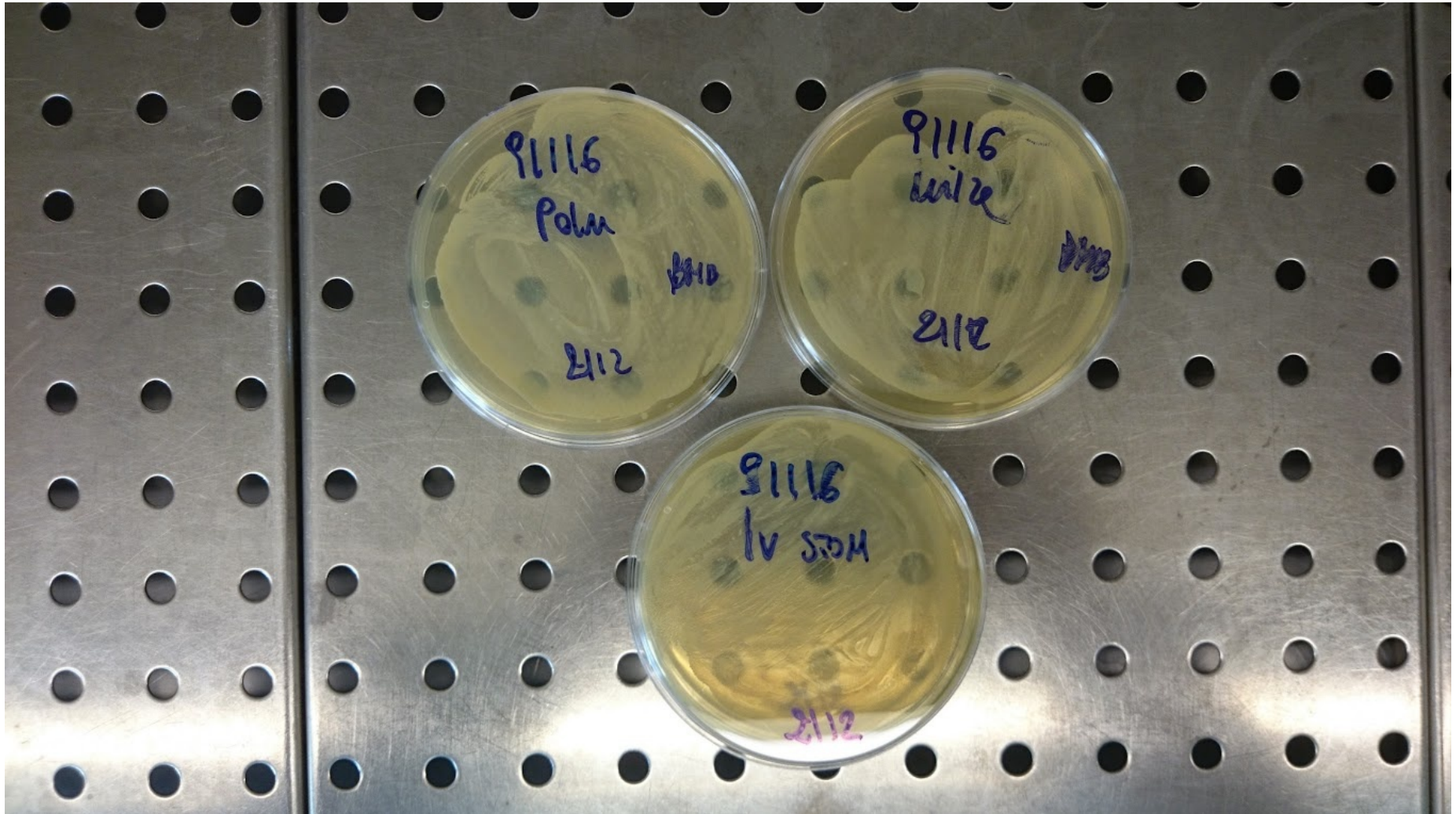
9.3 Identificazione

Tutte le colonie che mostrano le caratteristiche fenotipiche riferibili a *Brucella* spp. dovrebbero essere identificate utilizzando una combinazione dei seguenti test:

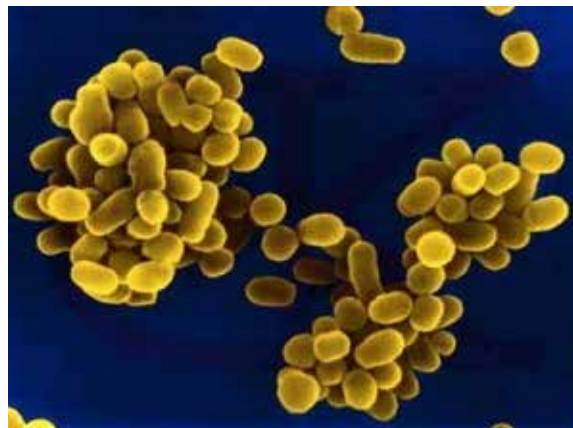
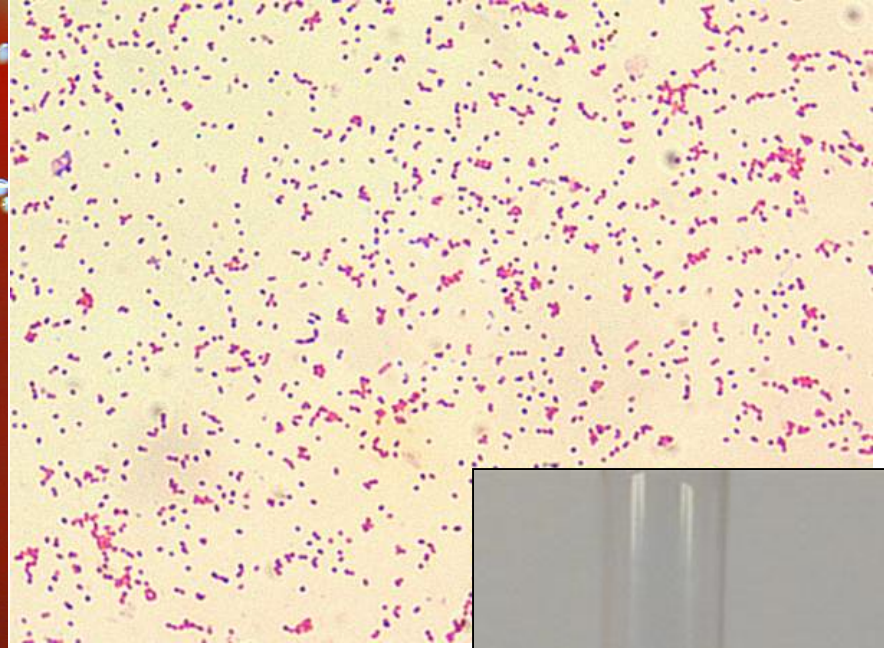
- Esame morfologico del microorganismo mediante colorazione di Gram;**
- Test dell'ossidasi;**
- Test dell'ureasi;**
- Test di agglutinazione con siero policlonale anti-Brucella.**
- Altri test biochimici (API 20 NE)**

Primary culture (at 7 days)

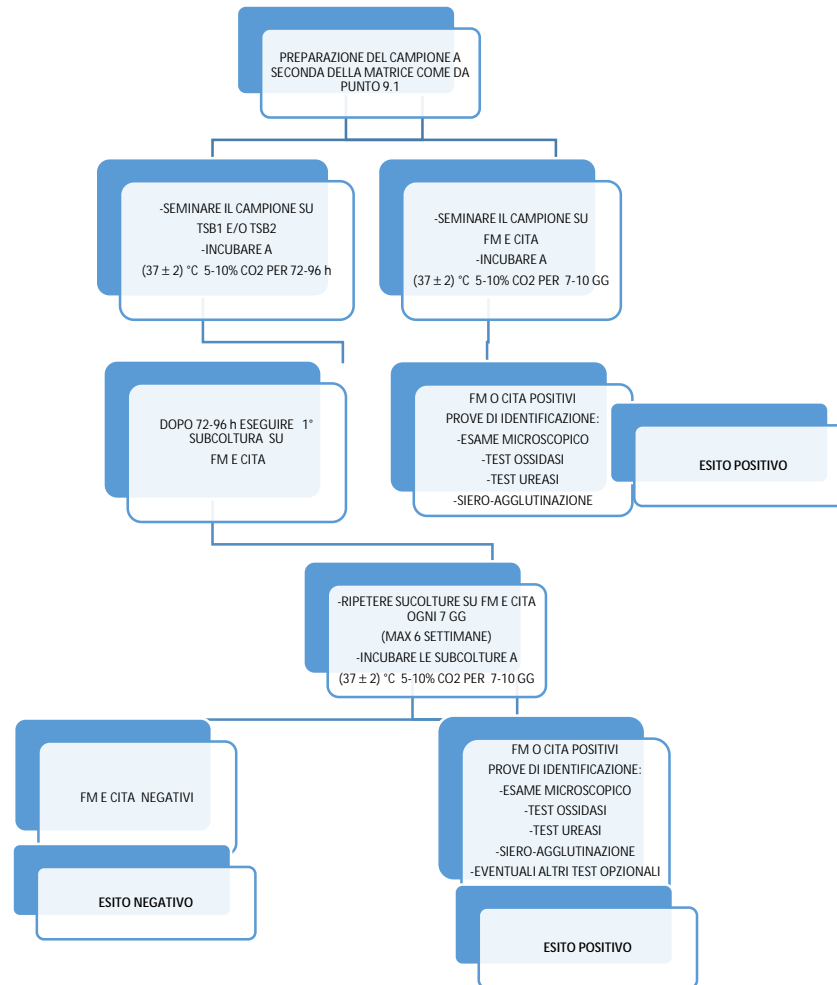
Ovine abortion on Farrell's medium (*B. melitensis* 3)



Phenotypic characteristics of *Brucella* spp.



Brucella spp.
Esame colturale-
Allegato n° 2:
diagramma di
flusso per la
ricerca di *Brucella*
spp.



Diagnosi diretta - PCR

Ø Polymerase chain reaction (PCR) methods are additional tools to detect the presence of *Brucella*.

- **1. d) Nucleic acid recognition methods**

“The **PCR**, including the **real-time** format, provides an additional means of detection and identification of *Brucella* sp. (Bricker, 2002; Bricker et al., 2003; Bricker & Halling, 1994; 1995; Garcia-Yoldi et al., 2006; Hinićet al., 2008; Ocampo-Sosa et al., 2005). (....)”

Brucellosi-Diagnosi diretta - PCR

PCR testing (*Brucella spp.*):

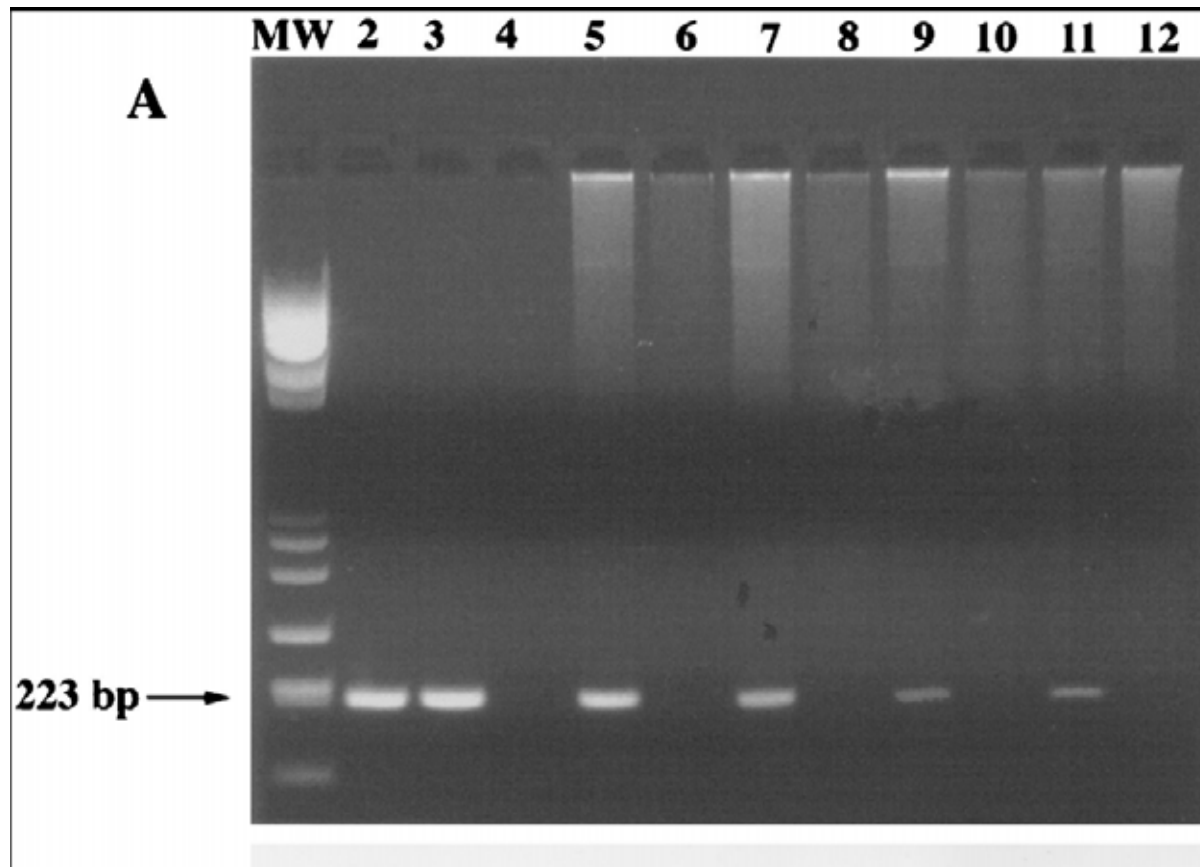
Ø **End-point PCR**: specific primers for the amplification of a sequence of 223 bp

(**BCPS31**, *Baily et al., 1992*; primers: *Elfaki et al., 2005*)

Ø **Real-Time PCR** (*Bounaadja et al., 2009*)

End-point PCR

BCPS31 PCR (223 bp amplicon)



Detection & Identification by **Real-Time PCR**

Real-Time PCR based on IS 711 locus

Veterinary Microbiology 137 (2009) 156–164



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic



Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of IS711, *bcs*p31 and *per* target genes

Lotfi Bounaadja^{a,b}, David Albert^c, Benoît Chénais^a, Sylvie Hénault^c, Michel S. Zygmunt^d, Sylvie Poliak^b, Bruno Garin-Bastuji^{c,*}

^a Université du Maine, Laboratoire de Biologie et Génétique Evolutive, EA2160 Mer Molecules Santé, 72085 Le Mans, France

^b Laboratoire Départemental de la Sarthe, 72000 Le Mans, France

^c OIE/FAO and EU Community Reference Laboratory for Brucellosis, French Food Safety Agency (AFSSA), 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex, France

^d UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique (IASP), Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), 37380 Nouzilly, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2008

Received in revised form 22 December 2008

Accepted 29 December 2008

Keywords:

Brucella

Real-time PCR

*bcs*p31

per

IS711

Genus-specific identification

ABSTRACT

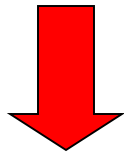
Culture is considered as the reference standard assay for diagnosis of *Brucella* spp. in humans and animals but it is time-consuming and hazardous. In this study, we evaluated the performances of newly designed real-time PCR assays using TaqMan[®] probes and targeting the 3 following specific genes: (i) the insertion sequence IS711, (ii) *bcs*p31 and (iii) *per* genes for the detection of *Brucella* at genus level. The real-time PCR assays were compared to previously described conventional PCR assays targeting the same genes. The genus-specificity was evaluated on 26 *Brucella* strains, including all species and biovars. The analytical specificity was evaluated on a collection of 68 clinically relevant, phylogenetically related or serologically cross-reacting micro-organisms. The analytical sensitivity was assessed using decreasing DNA quantities of *Brucella ovis*, *B. melitensis* bv. 1, *B. abortus* bv. 1 and *B. canis* reference strains. Finally, intra-assay repeatability and inter-assay reproducibility were assessed. All *Brucella* species DNA were amplified in the three tests. However, the earliest signal was observed with the IS711 real-time PCR, where it varied according to the IS711 copy number. No cross-reactivity was observed in all three tests. Real-time PCR was always more sensitive than conventional PCR assays. The real-time PCR assay targeting IS711 presented an identical or a greater sensitivity than the two other tests. In all cases, the variability was very low. In conclusion, real-time PCR assays are easy-to-use, produce results faster than conventional PCR systems while reducing DNA contamination risks. The IS711-based real-time PCR assay is specific and highly sensitive and appears as an efficient and reproducible method for the rapid and safe detection of the genus *Brucella*.

Gli isolati di *Brucella* spp. saranno inviati per una ulteriore **caratterizzazione e per una definitiva identificazione di specie e di biotipo** presso un Laboratorio di Riferimento Nazionale, Comunitario o OIE (**IZS Abruzzo e Molise**).

Brucellosi-Diagnosi diretta : Caratterizzazione molecolare

Scopi:

Ø Rilevare e determinare le **species/biovars coinvolte** sul territorio (con cosa abbiamo a che fare?).



- Epidemiologia molecolare....
- Correlazione tra casi umani e casi negli animali

Strain characterization is important !!

Brucellosi-Diagnosi diretta: Caratterizzazione molecolare

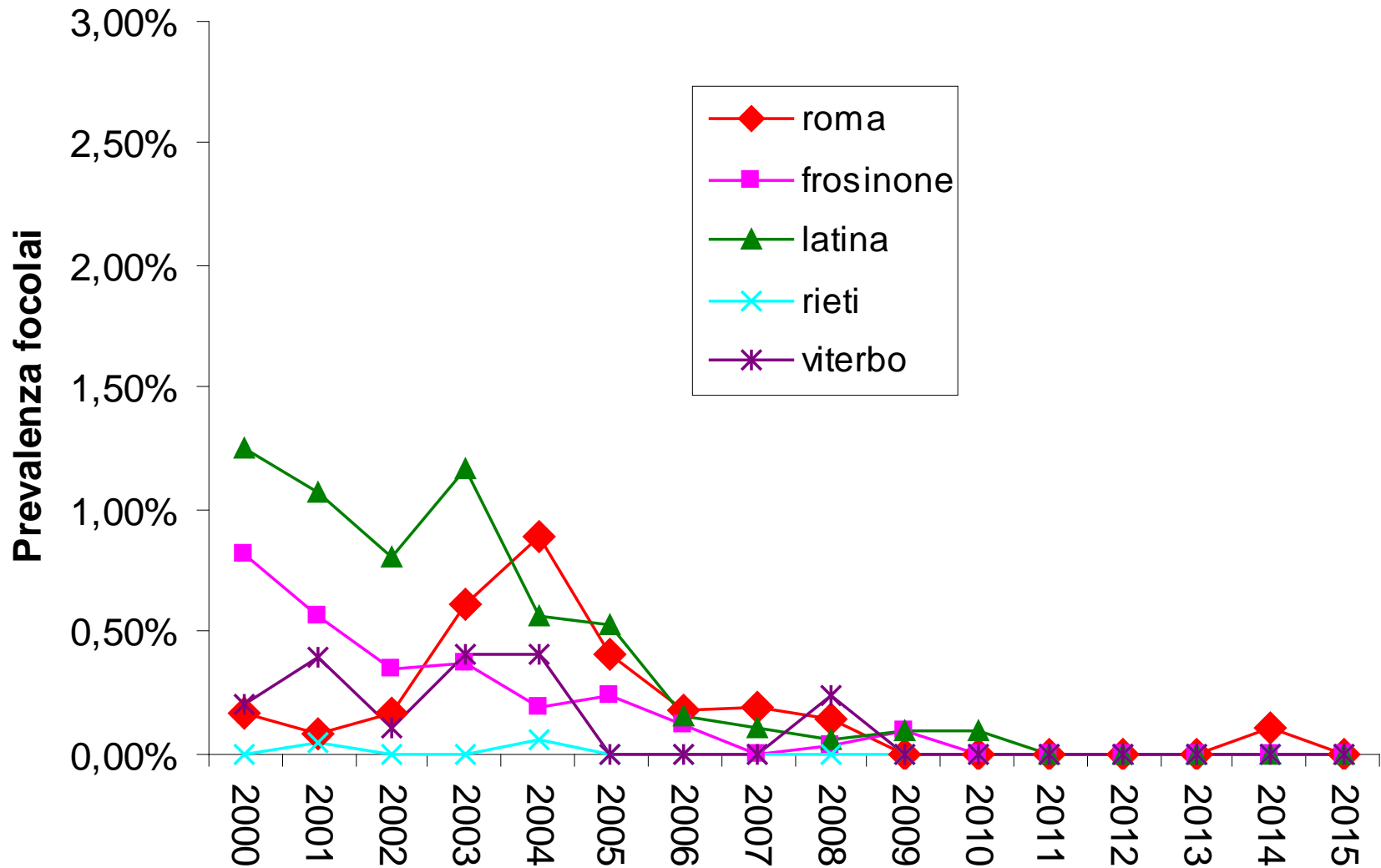
Metodi molecolari utili per ottenere informazioni epidemiologiche= **Epidmiologia molecolare:**

Ø **Multilocus Sequencing Typing (MLST)**

Ø **Multiple locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA)**

Ø **Ora NGS-WGS**

Lazio: trend Brucellosi bovina- bufalina 2000-2015



Lazio: trend BRC ovina-caprina

2000-2015

Brucella melitensis biovar 3

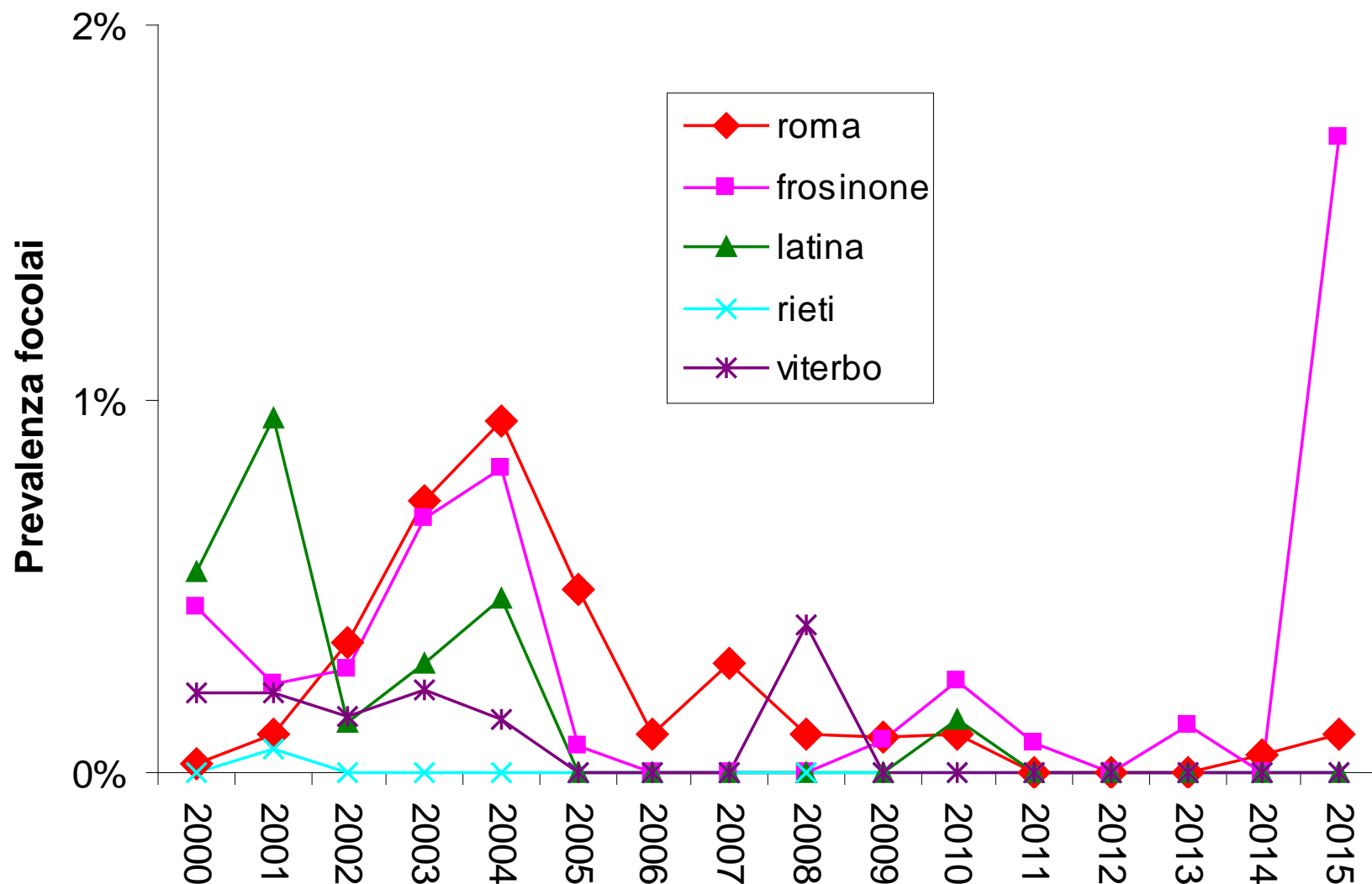


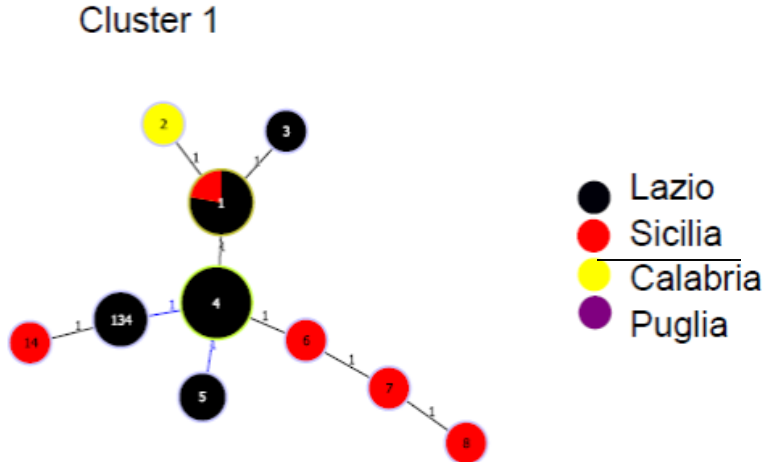
Figura 1. Albero filogenetico tipo UPGMA che rappresenta le connessioni tra i vari profili analizzati. In rosso si evidenziano i due cluster individuati.

Isolati B.
melitensis 3 da
epidemia di
Brucellosi in
provincia di
Frosinone,
2014-2016



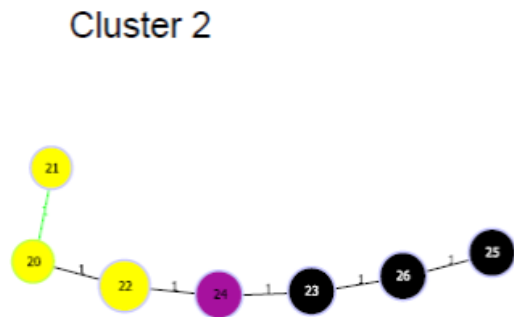
Figura 2. Minimum Spanning tree ottenuto con metodo goe-Burst rappresentante le connessioni a singolo locus tra i genotipi del focolaio e quelli presenti nel database LRN per le Brucellosi

Cluster 1

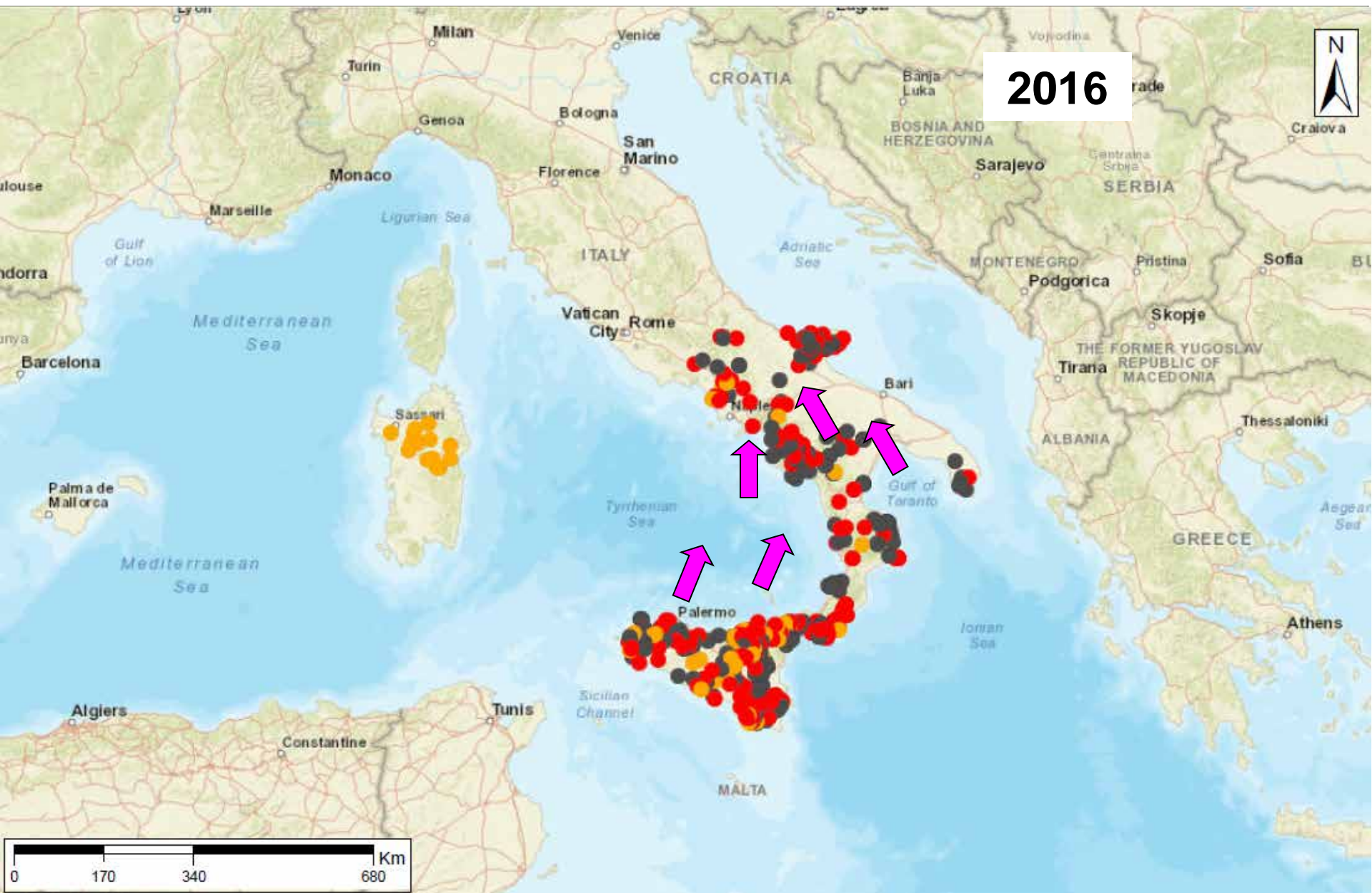


2 Clusters: Frosinone e Roma

Cluster 2



BRUCELLOSI ITALIA 2012-2016





Conclusioni

Ø Aree endemiche italiane rappresentano il principale fattore di rischio (tuttora presente) per la reintroduzione della BRC nel Lazio e nella Toscana

Ø Il principale fattore di rischio per la eventuale diffusione della BRC risiede nella efficacia e tempestività delle azioni a livello locale (Asl-distretto)

Brucella suis biovar 2-Toscana 2019-2020

Brucella suis

- 5 biovars, of which the first three only considered capable of infecting swine
- Widespread in Europe (Western & Eastern), including Italy, France, Portugal, Germany
- **Many wild boar (meta)populations do maintain *B. suis* 2 in Europe**



Rischio per suini allevati allo stato brado o semi-brado- Toscana cinta senese e non solo!

Biosicurezza!



Toscana 2019-2020 *Brucella suis* biovar 2

Circolazione dell'infezione da *Brucella suis* biovar 2 nel circuito degli allevamenti di Cinta Senese della Toscana

Piano regionale ad hoc

Ufficio di staff Osservatorio Epidemiologico
Tel. 06 79099462 - 461 - 460 - 473 - 476 - Fax 06 79099462 – oevr@izslt.it

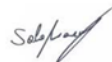
Alla [c.a. Dott. Alessandro Millo](#)
Direzione Diritti di Cittadinanza e Coesione Sociale
Settore Prevenzione e sicurezza in ambienti di vita, alimenti e veterinaria
P.O. Sanità animale, igiene degli allevamenti e igiene urbana veterinaria
Regione Toscana

Oggetto: proposta per un Piano di sorveglianza e prevenzione della brucellosi suina in Regione Toscana

Come concordato a termine della riunione del 03/12/2019 presso il Ministero della Salute, con la partecipazione del CRN per le brucellosi dell'IZSAM, Regione Toscana ed IZSLT, si trasmette [la proposta tecnico-scientifica](#) per un Piano di sorveglianza e prevenzione della brucellosi suina in Regione Toscana, da sottoporre ad approvazione Ministeriale. La proposta si intende a supporto della programmazione regionale di un sistema di controlli minimi per la verifica di circolazione dell'infezione negli allevamenti suini all'aperto e per la gestione del rischio.

Nel rimanere a disposizione per eventuali chiarimenti porgiamo cordiali saluti.

Osservatorio Epidemiologico
Marcello Sala
Email: marcello.sala@izslt.it
tel + 39 06 79099473



Brucella canis 2020

Brucella canis

- Diffusione da allevamento illegale cani in provincia di Ancona





TBC

la tubercolosi (TBC) è una malattia infettiva dell'uomo e degli animali con decorso cronico, caratterizzata dalla formazione di noduli (tubercoli) e processi essudativi.

• Nell'uomo è causata principalmente da *Mycobacterium tuberculosis* mentre la TBC bovina/bufalina è sostenuta da *M. bovis*. Anche *M. bovis* può essere causa di tubercolosi nell'uomo (zoonosi)

• Malattia antichissima: Lesioni ossee rinvenute in scheletri umani dell'età della pietra e in mummie egiziane e peruviane. Legata nel passato soprattutto al consumo di latte crudo (*M. bovis*)

TBC bovina

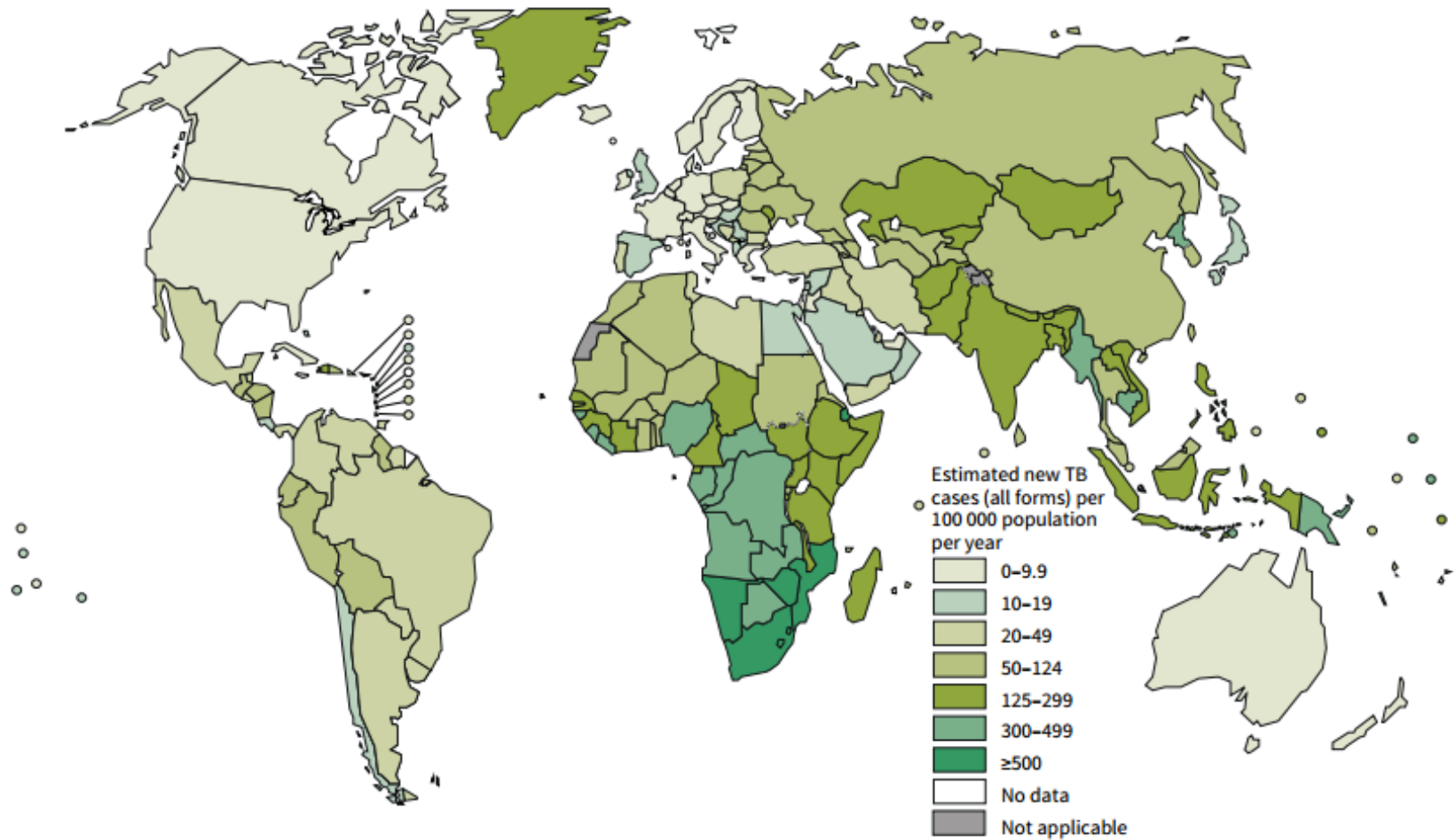
Ø Patologia con effetti socio-economici e di salute pubblica di notevole rilevanza

Ø Impatto significativo nei confronti del commercio internazionale di animali e prodotti animali.

Ø La sua diffusione è mondiale

TBC Uomo

Estimated TB incidence rates, 2013



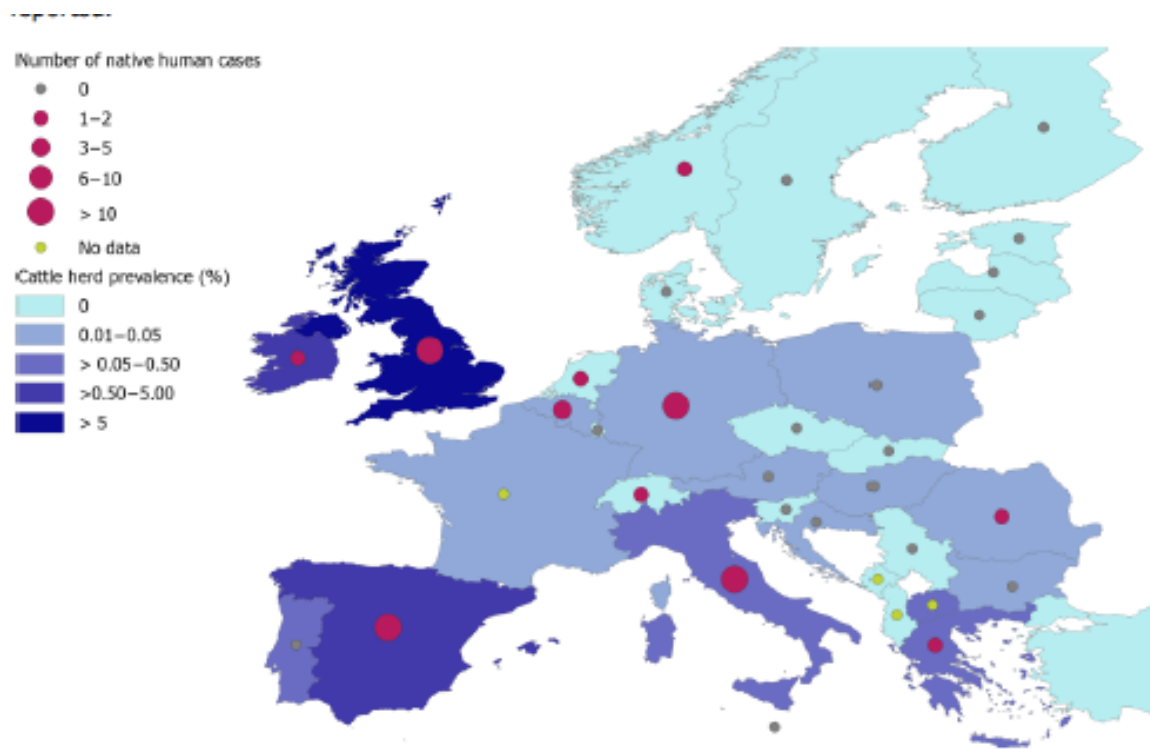
The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC)

TBC

Casi umani dovuti a *M. bovis*

***M. bovis* cases represented 0.4% of all confirmed tuberculosis cases**



No human data were obtained from France, Albania, Bosnia and Herzegovina, Former Yugoslav Republic of Macedonia, Montenegro and Serbia.

Figure 37: Number of confirmed tuberculosis cases due to *M. bovis* in individuals of EU origin and country-level aggregated herd prevalence of bovine tuberculosis in cattle, EU, 2016

The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC)

TBC

Allevamenti bovini positivi

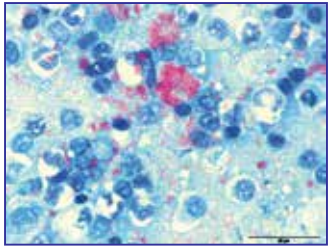
Author: EFSA, ECDC, EFSA, ECDC



AL: Albania; BA: Bosnia and Herzegovina; FYRM: Former Yugoslav Republic of Macedonia; ME: Montenegro; SR, Serbia.

Figure 38: Proportion of cattle herds infected with or positive for bovine tuberculosis, according regional boundaries of official status (OTF or non-OTF), EU/EEA, 2017

Eziologia TBC bovina e bufalina

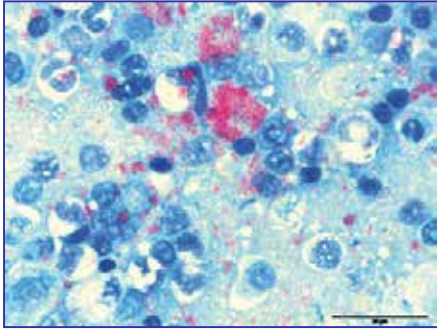


M. bovis



Forma bastoncellare, asporigeno, immobile, strettamente aerobio, se sottoposto a colorazione di Ziehl-Neelsen essendo acido-resistente, assume regolarmente un caratteristico colore rosso

Il serbatoio principale è il bovino ma possono essere colpite molte altre specie domestiche (capre, pecore, pets, cavalli...) e selvatiche (tassi, cinghiali, bisonti, antilopi, volpi, ratti...)



Eziologia



M. tuberculosis complex

- *M. tuberculosis*
- *M. africanum* (subtype I e II)
- *M. bovis*
- *M. bovis* BCG
- *M. microti*
- *M. caprae*
- *M. canettii*
- *M. pinnipedii*

Persiste nell'ambiente!

L'infezione

Ø **Via erogena tramite aerosol** è la più frequente via di infezione, seguita dall'**ingestione** di materiale contaminato.

Ø **Trattamento**: unico metodo è la rimozione (macellazione) di tutti gli animali infetti ed esposti.

Sintomi TBC bovina

Spesso subclinici !!

**..... Quando presenti, spesso non
caratteristici/distintivi!**

Sintomi TBC bovina

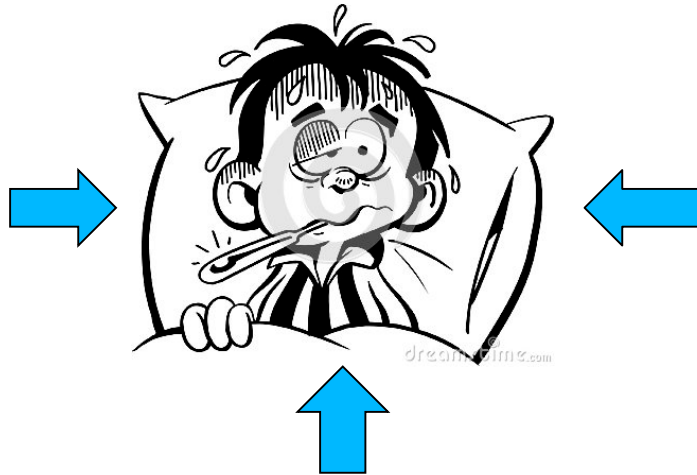
- Ø Perdita di peso graduale, nonostante adeguata alimentazione
- Ø Febbre in genere non elevata – l'animale tende ad abbeverarsi maggiormente
- Ø Ingrossamento dei linfonodi (es. del collo)
- Ø Difficoltà nella respirazione
- Ø Tosse– peggiore al mattino, con il freddo e dopo esercizio fisico



Tubercolosi da M. bovis

Modalità di trasmissione : Uomo

Contatto diretto con
materiale biologico di
animali infetti



Materiale infetto in
laboratorio: agente
Classe III!



Via alimentare: Consumo di
latte infetto non sottoposto ad
adeguato trattamento termico
o prodotti derivati freschi



TBC-Lesioni Post-mortem

Granulomi (tubercoli)

Ø Aspetto

Ø Gialli

Ø Caseosi

Ø Calcificati

Ø Possono assomigliare ad ascessi

Ø Nei linfonodi e altri organi



TBC-Lesioni Post-mortem



TBC-Lesioni Post-mortem





Diagnosi di laboratorio-Diagnosi in animali in vita

Test della tubercolina (skin test)

Ø Reazione di ipersensibilità ritardata

Ø Test prescritto per gli scambi internazionali!

Ø Test ancillari

Ø Gamma-interferon test

Ø ELISA

Ø Lymphocyte proliferation test

Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Chapter 3.4.6. (NB: Version adopted in May 2009)



Tubercolosi da *M. bovis* skin test

D.M. 15 dicembre 1995, n. 592

•La prova ufficiale per la diagnosi di TBC bovina in vita, è il **test di intradermoreazione alla tubercolina PPD (Purified Protein Derivative) bovina**. E' test di allergia all'inoculazione (reazione di ipersensibilità ritardata), che negli animali infetti provoca ispessimento cutaneo dopo **72 ore**, accompagnato a volte da fenomeni infiammatori locali o generali. l'intradermoreazione tubercolinica deve essere eseguita nella regione del collo fra il terzo anteriore e il terzo mediano.

Prova IDT comparativa

- La prova IDT comparativa (ppd bovina e ppd aviare inoculate nello stesso animale)
- Dati recenti UK:
- Standard interpretation (in Italia= DM 592/95)
- DSE=81% (85% severe interpretation, fino a 93,5%)
- DSP>99% (99,9%? DEFRA, UK*)
- *Questo è il motivo per cui, ancora oggi, la IDT (nella sua forma singola o comparativa) è il test di elezione per i Piani di eradicazione*
- “Genera” meno falsi positivi di G-IFN e quindi meno “falsi focolai”!

Campioni per la diagnosi diretta di TB

Organi con lesioni rilevate al macello

Tessuti = linfonodi da:

Ø Reactors (positive/dubbi) al test della Tuberolina

Ø Reactors da allevamenti sospetti in seguito ad indagini epidemiologiche





Diagnosi di laboratorio

Diagnosi diretta: generalmente post-mortem

Ø Istopatologia

Ø Esame colturale

Ø Ancillary:

Ø PCR dai tessuti (rapida ma con bassa sensibilità in “no lesion reactors”)

Ø Immune-Histo-Chemistry (IHC)

Diagnosi di laboratorio

Istopatologia

- Ø Diagnosi rapida
- Ø Buona correlazione con l'esame colturale
- Ø Ma conclusiva solo quando le tipiche lesioni da TBC sono riscontrate
- Ø E non identifica l'agente causale

Diagnosi di laboratorio

Esame colturale

Ø Elevata sensibilità e specificità

Ø Lenta = incubazione fino a 12
settimane

a) Microscopic examination

Mycobacterium bovis can be demonstrated microscopically on direct smears from clinical samples and on prepared tissue materials. The acid fastness of *M. bovis* is normally demonstrated with the classic Ziehl–Neelsen stain, but a fluorescent acid-fast stain may also be used. Immunoperoxidase techniques may also give satisfactory results. The presumptive diagnosis of mycobacteriosis can be made if the tissue has characteristic histological lesions (caseous necrosis, mineralisation, epithelioid cells, multinucleated giant cells and macrophages). As lesions are often paucibacillary, the presence of acid-fast organisms in histological sections may not be detected, although *M. bovis* can be isolated in culture. However, large numbers of acid-fast organisms are seen in lesions in primates, felids, mustelids (badgers) and marsupials (brush-tailed possums).

***M. tuberculosis complex* are slow growing bacteria!**

b) Culture

To process specimens for culture, the tissue is first homogenised using a mortar and pestle, stomacher or blender, followed by decontamination with either detergent (such as 0.375–0.75% hexadecylpyridinium-chloride [HPC]), an alkali (2–4% sodium hydroxide) or an acid (5% oxalic acid). The alkali or acid mixture is shaken for 10–15 minutes at room temperature and then neutralised. Neutralisation is not required when using HPC. The suspension is centrifuged, the supernatant is discarded, and the sediment is used for culture and microscopic examination. It is recommended that, as a minimum, pooled lymph node samples from the head and thorax be cultured when no visible lesions are detected in tuberculin or interferon test positive animals at post-mortem examination.

For primary isolation, the sediment is usually inoculated on to a set of solid egg-based media, such as Lowenstein–Jensen, Coletsos base or Stonebrinks; these media should contain either pyruvate or pyruvate and glycerol. An agar-based medium such as Middlebrook 7H10 or 7H11 or blood based agar medium (16) may also be used.

Cultures are incubated for a minimum of 8 weeks (and preferably for 10–12 weeks) at 37°C with or without CO₂. The media should be in tightly closed tubes to avoid desiccation. Slopes are examined for macroscopic growth at intervals during the incubation period. When growth is visible, smears are prepared and stained by

Solid media



A. Battisti 2002

Identificazione dell'agente

Ø Dimostrazione **all'esame microscopico** di acid-fast bacilli

Ø Diagnosi presuntiva

Ø Nessuna informazione sulla specie di *Mycobacterium*

Ø **Esame colturale seguito da DNA-based techniques, come la PCR**

Ø Conferma dell'infezione

Ø Identificazione specie di *Mycobacterium*

**L'identificazione della specie è rilevante ai fini epidemiologici
control/eradication purposes!**

TB diagnosis Recap

**Tissue samples with visible lesions or from
Tuberculin test positive animals (no visible
lesion reactors)**



Macroscopic examination



Tissue samples for:

- Histopathology
- Culture (SOP following OIE Manual)

Microscopic examination, cultures, DNA techniques, such as PCR on isolates referable to *Mycobacterium spp.*

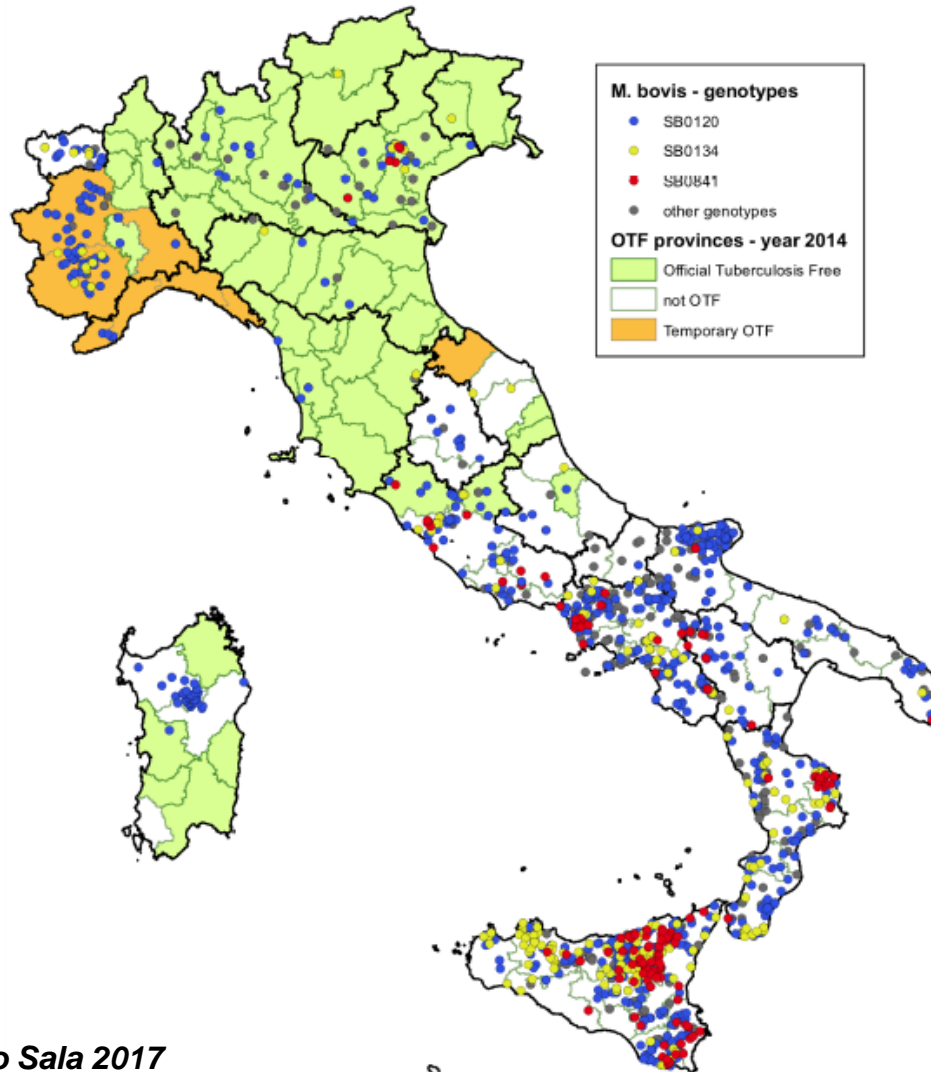
Direct PCR provides variable results depending on stage of lesions etc. (Diagnostic Sensitivity is not optimum)

*Distribuzione geografica degli spoligotipi
maggiormente diffusi in Italia dal 2008-2015.*

TBC:
Italia
M. bovis

BOVINE TUBERCULOSIS IN ITALY - YEAR 2008/2014

update 31/12/2014



SB120
SB134
SB841 } 70%

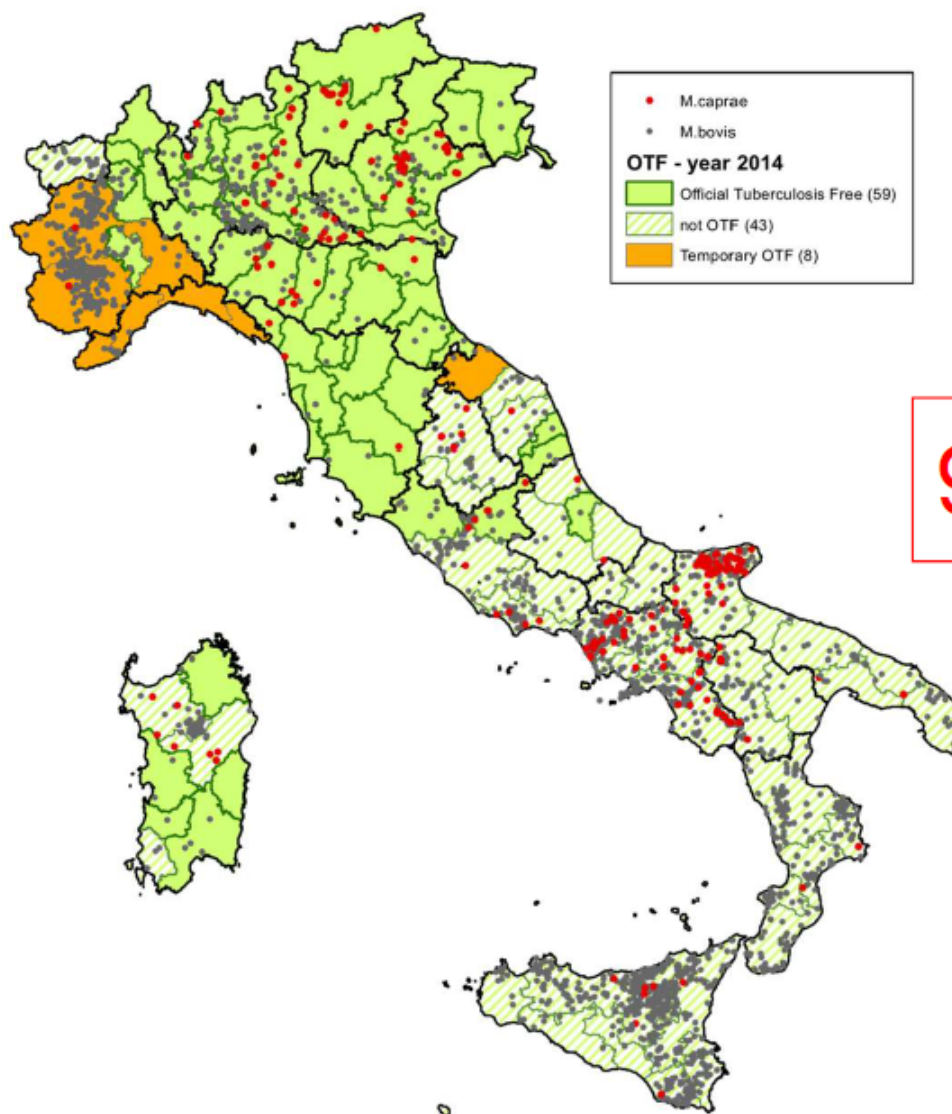
N° tot spoligotipi =
160

Distribuzione geografica *M. caprae* 2000-2015

BOVINE TUBERCULOSIS IN ITALY - YEAR 2000/2014

update 31/12/2014

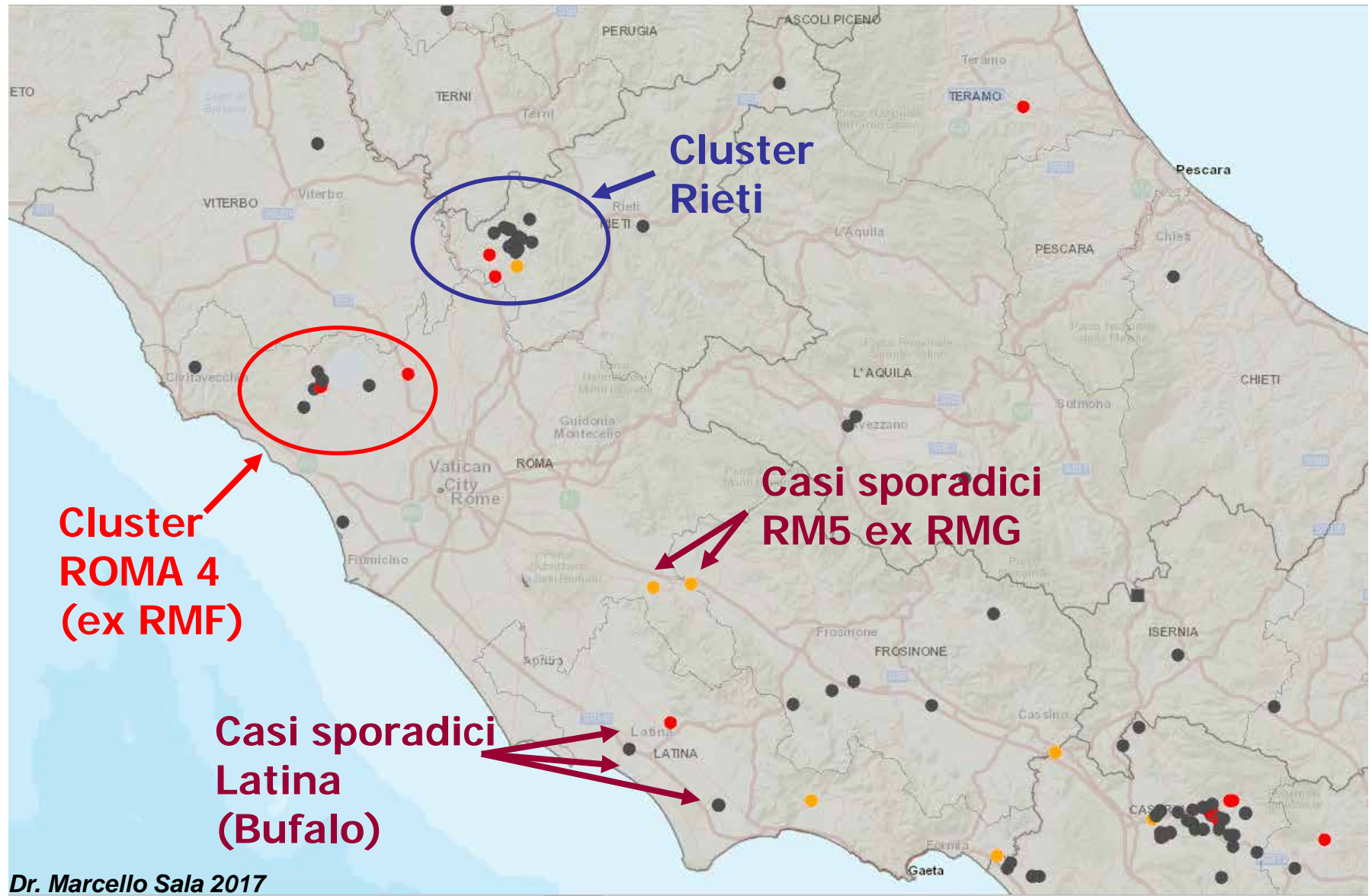
TBC:
Italia



9,2%

M. caprae

LAZIO 2014-2017: focolai di TBC



LAZIO: Elementi di rischio TBC

Ø Allevamenti allo stato brado



Capi non identificati

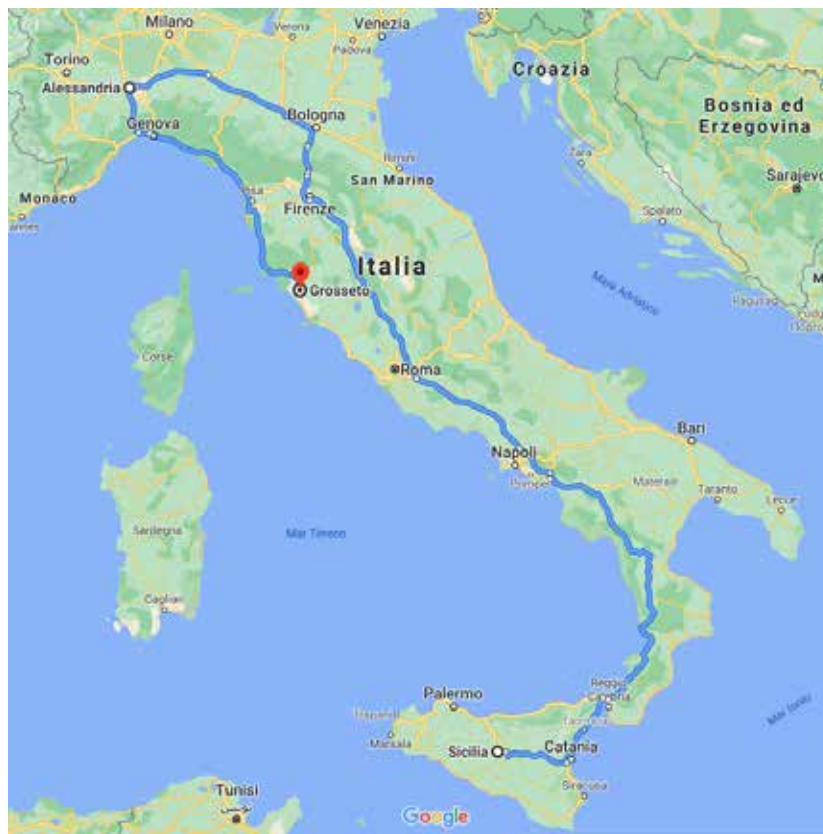
Capi «vaganti»
sfuggono al controllo
annuale

serbatoio

Toscana: Elementi di rischio TBC

Movimentazione di capi non controllati o illegale

Ø Caso recente: capo nato in Sicilia, ingrassato in Piemonte, Macellato nel Grossetano.....





Grazie per l'attenzione D.O.DIG!

Domande?



**KEEP
CALM
BECAUSE**

THIS IS NOT THE END OF THE WORLD

BUT THE END OF THIS PRESENTATION