

**SANITA' ANIMALE: FLUSSI DELL'ACCETTAZIONE,
criticità e proposte a confronto"**

Accettazione, gestione e invio del campione destinato al laboratorio di diagnostica

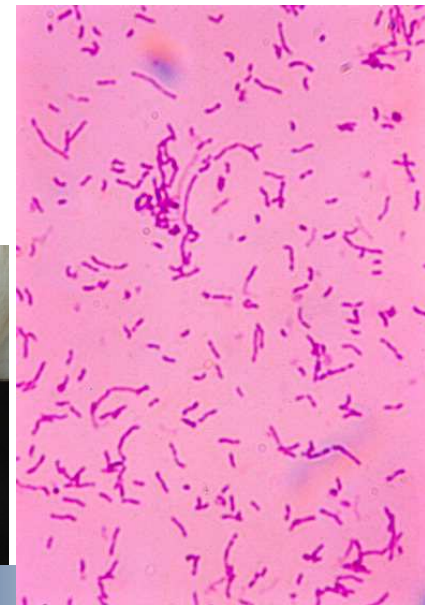
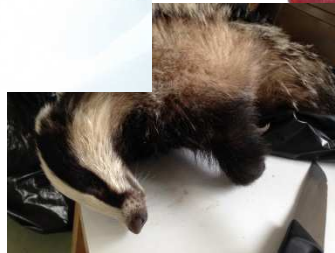
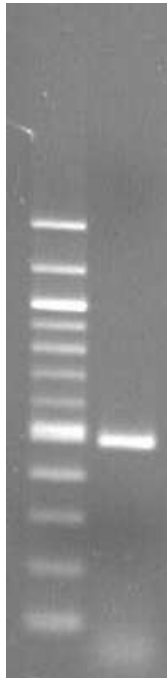
Andrea Caprioli, DVM, PhD

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA

Direzione Operativa Direzione operativa Diagnostica Generale



Attività: **Diagnostica generale, Diagnostica agenti zoonosici speciali , CRAB, Specifici Piani di Monitoraggio-Sorveglianza...**



Attività tecnico scientifica di supporto e ricerca

- ✓ Consulenze e pareri tecnici a diversi enti.
- ✓ Consulenza specialistica attraverso sopralluoghi sul campo.
- ✓ Partecipazione a ricerche con partner scientifici italiani ed internazionali.
- ✓ Attività di formazione.
- ✓ Altro.....



Attività diagnostica:

- ✓ Molteplice e differenziata
- ✓ Circa 90 Prove di laboratorio
- ✓ Gestite secondo il Sistema Qualità
- ✓ Automazione



primo livello: esami effettuati in prima istanza, in genere esaustivi rispetto al quesito diagnostico spesso corrispondono ad esami di non elevata complessità

secondo livello: esami che vengono eseguiti per confermare i precedenti o a seguito della necessità di approfondimenti diagnostici

CAMPIONAMENTO

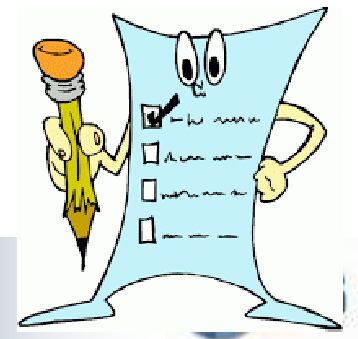
Il campionamento può essere effettuato **da:**

- **singoli animali**
- **popolazioni animali**
- **ambiente**

Importante la raccolta dell'ANAMNESI COMPLETA
PRESSO ACCETTAZIONE SEDE E SEZIONI!

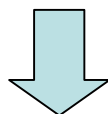


Anamnesi: individuale, collettiva, recente, remota, gestione, alimentazione etc., inclusi trattamenti farmacologici, es. ANTIBIOTICI...



REQUISITI DI IDONEITA' DI UN CAMPIONE BIOLOGICO

- ✓ Prelevato e conservato adeguatamente.
- ✓ Recapitato in tempi brevi e in quantità sufficiente a garantire l'esecuzione delle prove richieste.
- ✓ Ben identificato e accompagnato da un puntuale verbale di prelievo.
- ✓ Opportunamente confezionato e trasportato.



Idonee condizioni di biosicurezza



REQUISITI DI IDONEITA' DI UN CAMPIONE BIOLOGICO

PORRE PARTICOLARE ATTENZIONE A:

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



TBC, Brucellosi, Carbonchio...

Biosicurezza



Se si sospetta/vuole escludere agente zoonosico di Classe di Biosicurezza 3, enunciare chiaramente il sospetto a tutti (per non iniziare altre prove prima di negatività dell'agente da escludere...)



DOCUMENTO DI ACCOMPAGNAMENTO



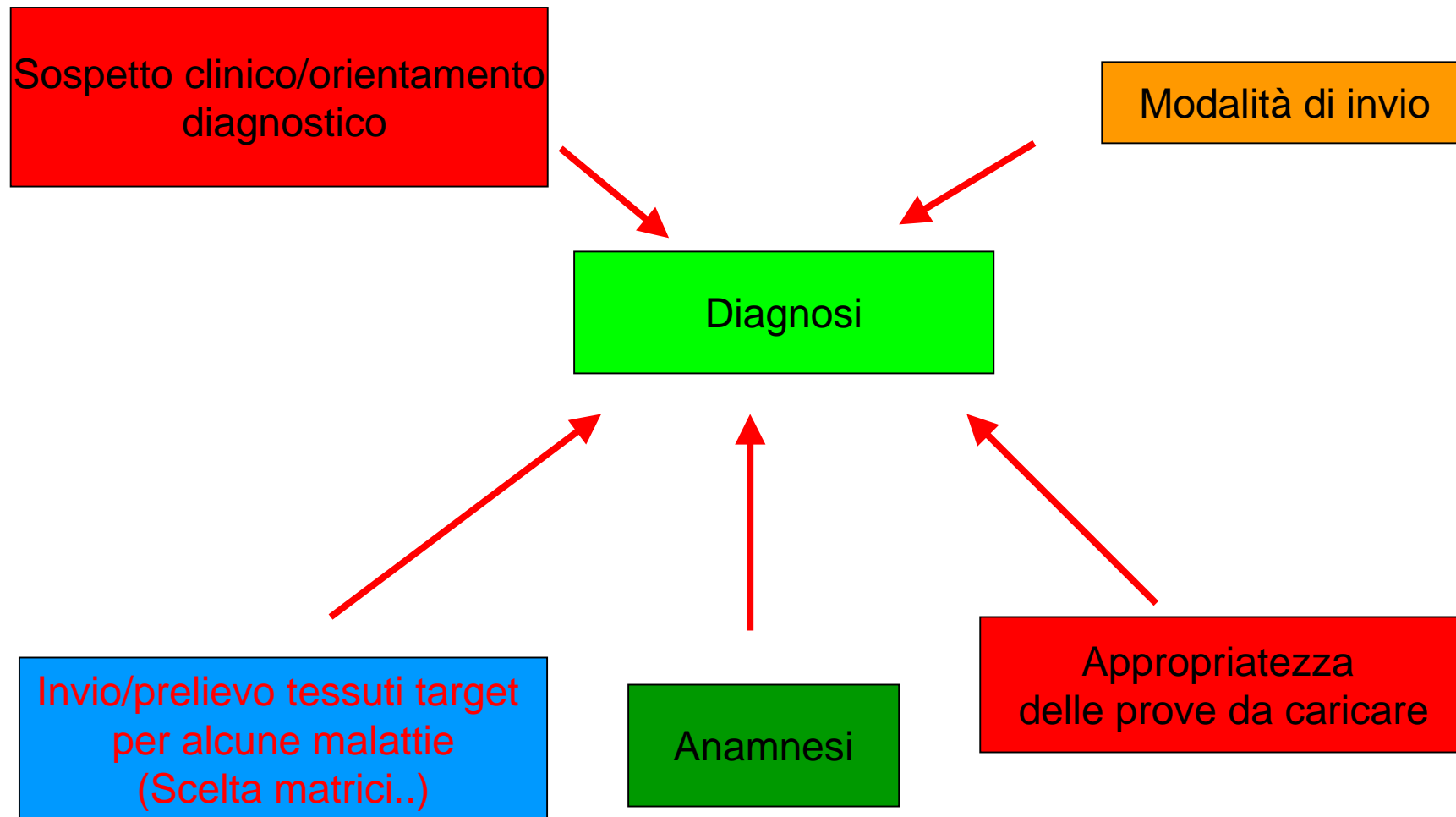
- **Verbale di prelievo**
- Documenti allegati a: **Gazzetta ufficiale, Normativa, Piani Nazionali e Regionali** (no modulistica contraffatta, riprodotta o personalizzata).
- **Modulo d'accompagnamento campioni dell'IZSLT** (del sistema qualità)- PG ACC 003
- Modello SIEV
- Altro documento, purché siano riportate chiaramente tutte le informazioni necessarie.

L'importanza delle informazioni "a corredo dei campioni inviati"



- **La richiesta** del Veterinario aziendale/ASL e l'integrazione anamnestica raccolta in **Accettazione debbono seguire i campioni inviati ad altre Strutture** (es. campioni inviati alla Sede Centrale), per favorire un servizio "complessivo" dell'Ente che sia più "mirato" ed "efficiente" (costi/benefici...) possibile.
- Ne beneficeranno la "Qualità complessiva erogata" e la "Qualità complessiva percepita" dall'utenza.

...COSA PERMETTE UNA CORRETTA DIAGNOSI



Test per la diagnosi di infezione:

- ✓ Tecniche di amplificazione dell'acido nucleico
- ✓ Ricerca di anticorpi o degli antigeni
- ✓ Ricerca colturale dell'agente



CMQ differenze da prova a prova!



.....da considerare tuttavia sempre:

La **sensibilità** di un test è la capacità del test di identificare i soggetti che presentano la malattia/infezione e corrisponde alla proporzione di soggetti realmente ammalati/infetti identificati come tali dal test (**Veri Positivi**).

$$\text{sensibilità} = \frac{VP}{VP + FN} * 100$$

La **specificità** di un test è la capacità del test di identificare i soggetti che non presentano la malattia/infezione e corrisponde alla proporzione di soggetti realmente sani/non infetti identificati come tali dal test (**Veri Negativi**).

$$\text{specificità} = \frac{VN}{VN + FP} * 100$$

Test sensibile = pochi falsi negativi!

Test specifico = pochi falsi positivi!

Approccio combinato

Possibile l'utilizzo di più test per aumentare la specificità, in particolare in caso di bassa prevalenza e/o la sensibilità!

✓ **test in serie**

Primo test in genere molto sensibile, economico, di facile esecuzione, seguito da un test più specifico.

✓ **test in parallelo**

Effetto combinato della loro sensibilità e specificità, in alcuni casi per ridurre i tempi di diagnosi.



Approccio combinato

✓ test in serie

Es: Bucecciosi bovina, con l'impiego di due test sierologici: il test al rosa-bengala (SAR) in prima istanza e quindi, sui positivi, la fissazione del complemento (FDC).

Es: Sensibilità agli antibiotici: fenotipica e genotipica

✓ test in parallelo

Es: SAR e FdC in allevamenti infetti

Es: PCR e esame colturale da vari tessuti (aumenta Probabilità di trovare i veri positivi)



Scelta diagnostica

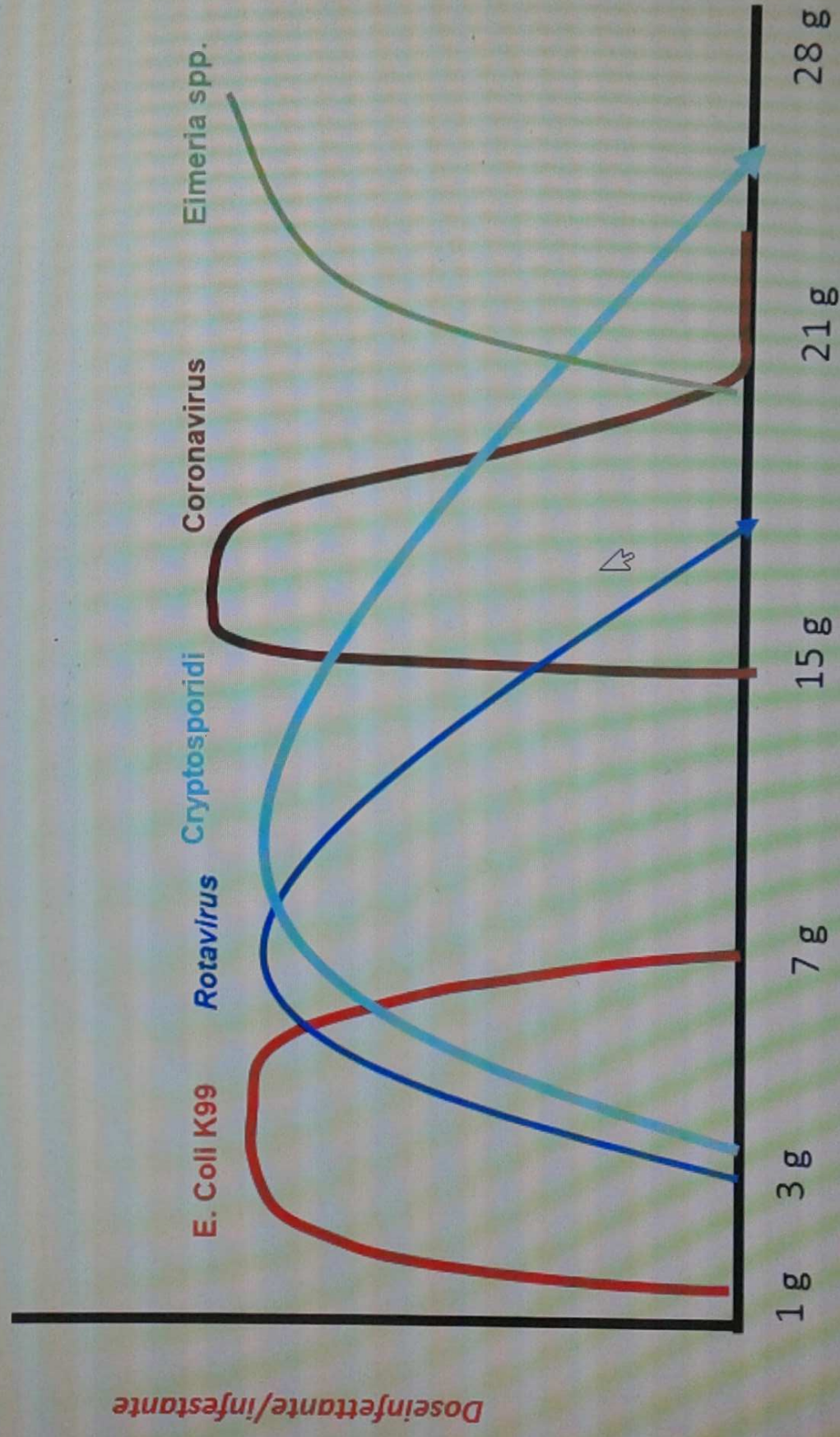


in funzione di:

- ✓ Malattia
- ✓ Stadio – Fase acuta, o cronica
- ✓ Matrice

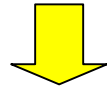


Momento del campionamento (enteriti del vitello)



Ricapitolando....DIAGNOSI DI LABORATORIO DIRETTA

Dimostrazione della presenza nel materiale patologico dell'agente eziologico (e sua identificazione) o di suoi componenti



Presuppone che nel materiale patologico sia ancora presente il microrganismo, o almeno parti di esso!



Importanza della scelta del materiale patologico corretto, nel momento opportuno!!

**IN GENERE SPECIFICA, MA SENSIBILITA' MOLTO
VARIABILE IN FUNZIONE DI UN**

CORRETTO CAMPIONAMENTO!!!!!!!

CORRETTA PROCESSAZIONE E CONSERVAZIONE

DURANTE PRELIEVO, TRASPORTO, ESECUZIONE ANALISI!!

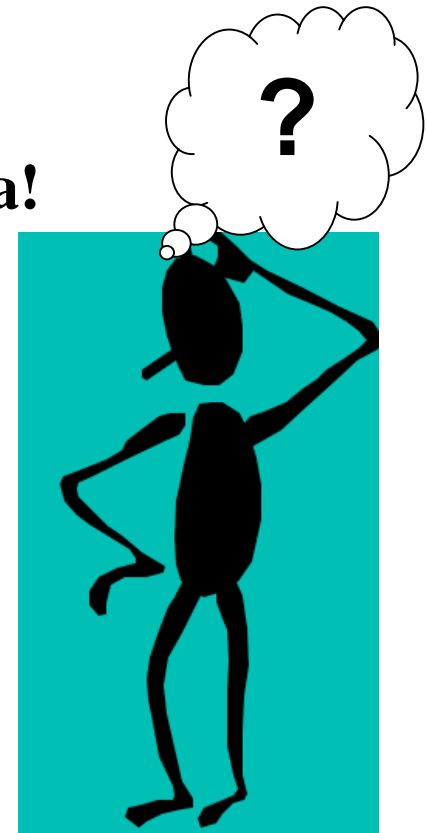


Alcune Problematiche:

- **Prelievo matrice non idonea**
- **Conservazione non idonea, rispettare biosicurezza!**
- **Richieste incomplete, POCO chiare**
- **Incorretta assegnazione prove**
- **Mancata corrispondenza campione-SIL**
- **Campioni destinati a diversi laboratori**



Difficoltà di registrazione, esecuzione aliquote, modalità di conservazione...



➤????????????????????????????????



Alcuni esempi: TUBERCOLOSI

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

- Deve essere presente la **Modulistica specifica** con le informazioni previste.
- Attenzione ai dati anagrafici **Detentore-Macello!** Codice Aziendale!
- Verificare corrispondenza/congruità organi!
- Invio campioni ➡ Inviare **direttamente in sede centrale linfonodi e/o organi con lesioni refrigerati!**
- Se da macello arrivano organi interi, prelevare porzioni con lesioni e inviare in sede centrale refrigerati.
- SIL: caricare esame antomo-istopatologico
- SIL: se si eseguono le aliquote per istologia ed esame colturale in sezione caricare le aliquote e le prove **congruamente!!**

Se le cose non tornano contattare il prelevatore!

TUBERCOLOSI MODULISTICA

ALLEGATO 1
OSSERVATORIO EPIDEMIOLOGICO VETERINARIO REGIONALE
REGIONE LAZIO

TUBERCOLOSI BOVINA
SCHEDA DI RILEVAMENTO DATI
AL MACELLO

La scheda debitamente compilata deve essere consegnata
all'Osservatorio Epidemiologico Veterinario
della Regione Lazio

LABORATORIO EPIDEMIOLOGICO Sperimentale DEL LAZIO E DELLA TOSCANA

DEL Recupero telefonico
A.S.L. n° Data
MACELLO N° TEL
VIA COMUNE PROV.

ANIMALI PROVENIENTI DA ALLEVAMENTO INFETTO
(marcati con 'T')

NO ☐ (Allegare mod. 10/33 - O.M. 2/1/93) SI ☐

Allevamento: Codice identificazione azienda (DPR 317/96) ☐☐☐☐
☐☐☐

Denominazione azienda
Proprietario
Via N°
Comune Prov.
A.S.L.

NUMERO E TIPO DI ANIMALI ESAMINATI

| | | | |
|----------------------|----------|----------------------|----------|
| VITELLI | N° | VITELLI BUFALINI(1) | N° |
| VITELLONI | N° | ANNUTOLI(2) | N° |
| TORI | N° | TORI BUFALINI | N° |
| MANZE | N° | ANNUTOLE(3) | N° |
| VACCHE IN PRODUZIONE | N° | BUFALE IN PRODUZIONE | N° |
| VACCHE DA RIFORMA | N° | BUFALE DA RIFORMA | N° |
| | N° | | N° |

Alcuni esempi: BRUCELLOSI

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

- Deve essere presente la **Modulistica specifica** con le informazioni previste!
- Attenzione ai dati anagrafici! Allevamento Infetto?? Cod. aziendale!
- Verificare corrispondenza/congruità organi!
- Verifica presenza Organi target...come da modulistica!
- Verificare se si tratta di ricerca *Brucella* spp., oppure agenti interferenti (FECI)!

Se le cose non tornano contattare il prelevatore!



BRUCELLOSI MODULISTICA

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| OSSERVATORIO EPIDEMIOLOGICO VETERINARIO REGIONALE REGIONE LAZIO | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DR..... Recapito telefonico..... | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A.S.L. n°..... Data/../.. | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MACELLO..... N° TEL..... | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| VIA..... COMUNE..... PROV..... | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ANIMALI PROVENIENTI DA ALLEVAMENTO INFETTO <input type="checkbox"/> (marcati con 'T') | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Allevamento: Codice identificazione azienda (DPR 317/96) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Denominazione azienda | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Proprietario | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Via..... N°..... | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Comune..... Prov..... | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A.S.L. | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TITO ENRICO 2017 | | | | | | | | | | | | | | | | | |

BRUCELLOSI DEGLI OVINI E DEI CAPRINI
SCHEDA DI RILEVAMENTO DATI
AL MACELLO

Alcuni esempi: Escherichia coli patogeni



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

- **Utilizzare la Modulistica IZSLT specifica** con le informazioni previste!
- **E. coli da intestino/feci:** ricerca geni per **ETEC, EPEC, EHEC**

N.B. Sono presenti IN FUNZIONE DELL'ETA' dell'animale!!

N.B.: Inviare l'intestino o la coltura primaria!!

- **E. coli emolitico da organi:** ricerca geni cytolethal distending toxin (**CDT**) e cytotoxic necrotizing factor (**CNF**).

Se le cose non tornano contattare il prelevatore!



E. COLI MODULISTICA

- **Esistono Linee guida emanate dalla Direzione Operativa Diagnostica Generale per valutare il significato diagnostico di isolati di Escherichia coli da forme enteriche degli animali!**
- **Usare SEMPRE l'apposita scheda di rilevamento dati.**
- **Inviare possibilmente le colture primarie in piastra (in idonei contenitori a tenuta) o attraverso tamponi con terreno di trasporto al carbone attivo (prelevando la patina batterica dello scarico), non le singole colonie isolate.**
- **E' possibile inviare contenuto intestinale o feci diarroiche, in idonei contenitori a tenuta, in condizioni di refrigerazione, in modo che possano pervenire presso il Reparto Diagnostica Generale entro le 72 h dal prelievo al massimo.**



E. coli: scheda di rilevamento dati

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA

(D.L.vo 30.06.1993 n. 270)

SEDE – 00178 Roma/Capannelle – Via Appia Nuova, 1411

Tel. 06 790991 (centralino) – Fax 06 79340724

<http://www.izslt.it> - e-mail: info@izslt.it



Direzione Operativa Diagnostica Generale

Scheda di rilevamento dati per richiesta prove fattori di patogenicità

su campioni, colture primarie (o isolati) di *Escherichia coli* da intestino/feci

SEZ/R IZSLT NUMERO REG. IZSLT

DETENTORE

MATRICE*

Data ricevimento campione Data invio a D. O. Diagnostica Generale

ANAMNESI

| specie | età | Sesso | Dati allevamento |
|-------------------------------|--|-------|---|
| Bovino | <input type="radio"/> ≤ 5 giorni : Specificare _____ <input type="radio"/> > 5 giorni ≤ 21 giorni: Specificare _____ <input type="radio"/> ≥ 21 giorni-≤ 3 mesi <input type="radio"/> > 3 mesi ≤ 6 mesi <input type="radio"/> manza <input type="radio"/> vacca <input type="radio"/> toro | F | Tipologia allevamento: <input type="checkbox"/> Latte <input type="checkbox"/> Carne Consistenza allevamento Numero malati N. tot. animali della classe di età colpita Mortalità (% su tot. animali della stessa classe di età) |
| Bufalino | | M | |
| Caprino | <input type="radio"/> ≤ 5 giorni <input type="radio"/> > 5 giorni ≥ 21 giorni <input type="radio"/> ≥ 21 giorni-≤ 3 mesi <input type="radio"/> > 3 mesi ≤ 6 mesi <input type="radio"/> adulto | F | Consistenza allevamento Numero malati N. tot. animali della classe di età colpita Mortalità (% su tot. animali della stessa classe di età) |
| Ovino | | M | |
| Suino | <input type="radio"/> < 7 giorni <input type="radio"/> post svezzamento <input type="radio"/> svezzati <input type="radio"/> adulto | F | Consistenza allevamento Numero malati N. tot. animali della classe di età colpita Mortalità (% su tot. animali della stessa classe di età) |
| | | M | |
| Coniglio | <input type="radio"/> ≤ 1 mese <input type="radio"/> ≥ 1 mese-≤ 2 mesi <input type="radio"/> < 2 mesi- 3 mesi <input type="radio"/> coniglio adulto | F | Consistenza allevamento Numero malati N. tot. animali della classe di età colpita Mortalità (% su tot. animali della stessa classe di età) |
| | | M | |
| Cane | <input type="radio"/> ≤ 3 mesi <input type="radio"/> > 3 mesi ≤ 12 mesi <input type="radio"/> > 12 mesi | F | <input type="radio"/> Privato <input type="radio"/> Canile Se canile: consistenza allevamento N. tot. animali della classe di età colpita Mortalità (% su tot. animali della stessa classe di età) |
| | | M | |
| Altro: (indicare) | <input type="radio"/> Età: | F | Se specie da reddito o allevata in gruppo, indicare: Numero malati N. tot. animali della classe di età colpita Mortalità (% su tot. animali della stessa classe di età) |
| | | M | |

SEGNII CLINICI

RILIEVI ANATOMOPATOLOGICI

Precedenti sindromi enteriche in allevamento mese/anno % soggetti colpiti

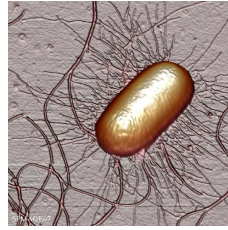
TRATTAMENTI ANTIBIOTICI: molecola utilizzata (specialità)

N° giorni di trattamento Data ultima somministrazione

*Per escludere presenza di *E. coli* patogeni enterici da campioni diagnostici inviare preferibilmente campioni (es. feci, intestino), o colture primarie.

Firma Dirigente IZSLT Data

E. coli



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

➤ **ETEC:** range di età stretto 1-10 giorni. Suino anche 21-40 giorni.

Geni: ST/LT

➤ **EPEC:** generalmente dopo la prima settimana.

Geni: Intimina/Agg

➤ **EHEC:** generalmente dopo la prima settimana.

Geni: Intimina/Agg (se positiva intimina seguiranno altri geni..VT, E-hly...).

E. coli

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

CARICAMENTO SIL

SIL da intestino/feci: caricare Enterobacteriaceae, ETEC, EPEC, EHEC in base all'età + i geni corrispondenti.

**SIL da isolato: caricare Identificazione Ceppo Batterico-
Esame colturale + i geni corrispondenti!**



Alcuni esempi: Abortigeni

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

- Attenzione ai dati anagrafici! **Sempre Codice Aziendale e Proprietario!!!**
- Dati anamnestici (età aborto, numero aborti, specie coinvolte, caratteristiche placenta, etc)!
- Verificare corrispondenza/congruità organi!
- Verifica presenza Organi target!
- Sforzo nel caricare correttamente le prove su SIL!!!

Se le cose non tornano contattare il prelevatore!



Alcuni esempi: Abortigeni tabella riassuntiva

Fare riferimento al file excell
Battisti-Scicluna!

| Agente | Organi di elezione | Materiale da animali in vita | Tecnica |
|--------------------------|---|--|-----------------------|
| Brucella | Milza, polmone, contenuto IV stomaco, placenta. | Latte, sangue, feci per interferenti | Esame colturale e PCR |
| Chlamydiales | Polmone, fegato, placenta, sacchi aerei. | Tamponi faringei, oculari, nasali, cloacali, feci. | PCR |
| Coxiella | Milza, fegato, polmone, placenta. | Tamponi/fluidi genitali, latte | PCR |
| Neospora | Cervello, fegato, cuore, placenta. | | PCR |
| Toxoplasmatidae | Cervello, fegato, cuore, placenta. | | PCR |
| Toxoplasma gondii | Cervello, fegato, placenta. | | PCR |

Alcuni esempi: Antibiogrammi

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

- Tecnica **Disk diffusion**: per gli Isolati di interesse clinico!
- Tecnica minima concentrazione inibente (**MIC**): solo per monitoraggio antibioticoresistenza, isolati per ricerca, Salmonelle e Campylobacter e casi particolari.
- Ricerca geni responsabili della resistenza. Es: gene mecA e gene blaZ per Beta-lattamici.



Alcuni esempi: Varie

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

- **Clostridi**: intestino e liquidi pericardico, peritoneale e pleurico: ELISA ricerca tossine (importante tempestività del prelievo, se >24h congelare!)
- **Clostridi da isolato**: ELISA ricerca tossine. Potenzialità tossinogeniche dell'isolato. Non fornisce informazione sul nesso causale isolato batterico e malattia!
- **Campylobacter spp.** per PCR: microrganismi esigenti di difficile gestione, corretta conservazione ed invio (Tampone con carbone)!!



Alcuni esempi: Varie

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

- **PCR Staphylococcus**: Identificazione di specie e resistenza (MRSA).
- **Taylorella**: utilizzare tamponi non scaduti (**valutare in Accettazione!**), arrivo in laboratorio entro le 48h!
- **Mycoplasmi**: PCR ed esame colturale (tempi lunghi).
- **Sequenziamento**: agenti non identificabili con prove biochimiche (gene 16S rRNA). Valutazione a cura della D. O. Diagnostica Generale...

Conclusioni

I dati raccolti durante l'accettazione sono importanti e funzionali per:

- Effettuare una corretta diagnosi!!
- Effettuare un tempestivo e corretto intervento in caso di apertura focolai.
- Effettuare una valutazione delle misure di gestione e controllo messe in atto.
- Valutare le attività svolte dall'Istituto (NOI!) in termini numerici, di efficacia, di efficienza (rapporto costi/benefici)!
- Effettuare una Gestione dei flussi informativi a vari livelli, locale, nazionale ed internazionale.
- Pianificare gli interventi futuri.
- E molto altro ancora.....

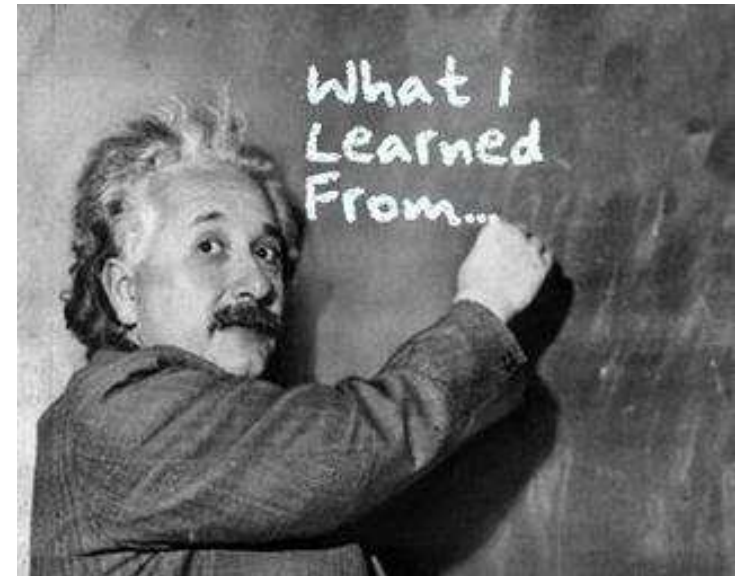


TAKE HOME MESSAGES

Obiettivo: arrivare ad una diagnosi accurata!

Corretta accettazione:

- ✓ Orientamento diagnostico
- ✓ Matrici idonee
- ✓ Appropriatezza delle prove
- ✓ Combinazione di prove e tecniche
- ✓ Attenzione al SIL!
- ✓ Interpretazione dei risultati



Conclusioni

IMPORTANTE LA COMUNICAZIONE E LA COLLABORAZIONE
TRA GLI “UTENTI RICHIEDENTI”, L'ACCETTAZIONE, I
LABORATORI.....



DOMANDE??

