



**DIAGNOSTICA DI LABORATORIO PER TRICHINELLA**  
**IZS Lazio e Toscana – Sede di Roma**  
**18 marzo 2014**

# **Ricerca di *Trichinella* nelle carni: metodi diagnostici e punti critici**

**Gianluca Marucci**  
**Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Trichinella***  
**Istituto Superiore di Sanità**  
**Viale Regina Elena 299, 00161 Roma**

# Normativa vigente

- Regolamento CE 2075/2005: descrive in dettaglio i metodi di prova ufficiali per la ricerca di larve di *Trichinella* spp. nelle carni (All.1, cap. I e II);
- Regolamento 1245/2007: inserisce la possibilità di utilizzare la pepsina in formulazione liquida;
- Regolamento 1109/2011: inserisce il test di agglutinazione al lattice tra i metodi di prova ufficiali;
- Regolamento 216/2014 (dal 1° giugno 2014): descrive il protocollo del test di agglutinazione al lattice ed inserisce un paragrafo su pulizia e decontaminazione dell'attrezzatura;
- Linee di indirizzo per la corretta applicazione del regolamento CE 2075/2005 (Conferenza permanente per i rapporti tra stato, regioni e province autonome di Trento e Bolzano, del 10 maggio 2007).



# Siti di prelievo e quantità di tessuto da campionare

Categoria produttiva	Sito di prelievo	esame 1° istanza	esame 2° istanza	Conferma positività
Suino da ingrasso	pilastrì diaframma	1 gr	20 gr	20 gr
	massetere, lingua, muscoli addominali, diaframma prossimo alle costole o sterno	2 gr	20 gr	20 gr
Scrofe e verri	pilastrì diaframma	2 gr	20 gr	20 gr
	massetere, lingua, muscoli addominali, diaframma prossimo alle costole o sterno	4 gr	20 gr	20 gr
Cinghiali	lingua, diaframma, tibiale	10 gr	-	50 gr
Equini	lingua, massetere	10 gr	-	50 gr
Altri animali	siti di elezione	10 gr	-	-

Prelevare un campione di peso tale da garantire la corretta esecuzione di tutte le prove diagnostiche (50 gr suini, 150 gr equini e cinghiali).

# Conformità del campione

Requisiti di conformità richiesti dalla normativa:

1. Il campione deve essere di peso idoneo
2. Il campione deve essere privo di grasso e tessuto connettivo
3. Se si utilizza la lingua, occorre asportare lo strato superficiale che non è digeribile ed impedisce una corretta lettura del sedimento

Ove sia necessario il laboratorio dovrà procedere con le operazioni di pesatura e toelettatura al fine di ottenere un campione valido per l'analisi



# Metodi diagnostici ufficiali



- Agitatore magnetico (**metodo di riferimento**);



- Stomacher, con sedimentazione o filtrazione;



- Trichomatic 35™;



- Test di agglutinazione al lattice (**solo per suini domestici**).

# Agitatore magnetico

## Materiali, reagenti ed apparecchiature necessarie

- Coltello o forbici per prelievo/toilettatura campione;
- Vassoi suddivisi in riquadri o strumenti equivalenti che permettano di tracciare i campioni;
- Miscelatore con lame affilate (tritacarne o frullatore);
- Agitatore magnetico con piastra riscaldante dotato di termostato;
- Ancorette magnetiche di **5 cm** rivestite in teflon;
- Becher **in vetro** da **3 litri**;
- Imbuto **in vetro**;
- Imbuto separatore **in vetro** da **2 litri**;
- Setaccio con maglie metalliche da **180  $\mu\text{m}$** ;
- Cilindri **graduati in vetro da 50-100 ml** o provette da centrifuga;
- Termometro di precisione da **0,5° C**;
- Bilancia di precisione da **0,1 g**;
- Pipette graduate;
- Stereomicroscopio con ingrandimenti di almeno **15-20X (60-100X)**;

# Agitatore magnetico

## Materiali, reagenti ed apparecchiature necessarie

- Piastre Petri monouso 9 cm Ø (**quadrettatura del fondo**);
- Acido cloridrico 25% (**importante la concentrazione finale**);
- Pepsina in polvere (**1:10 000 NF**) o liquida (**660 EP unità/ml**);
- Acqua di rubinetto alla temperatura di **46-48° C**;
- Contenitori per la raccolta del succo digestivo rimanente;
- Dispositivi di protezione individuali (camice, guanti, mascherina) ed ambientali (cappa chimica o sistema di aspirazione dell'aria).

# Agitatore magnetico

## Punti critici di reagenti ed apparecchiature

- L'uso di materiale in plastica può pregiudicare la prova per via dell'adesività delle larve;
- Disponibilità di vetreria di riserva;
- Stato di usura delle lame del tritacarne;
- Integrità delle maglie del setaccio e loro pulizia;
- Quadrettatura delle piastre da lettura;
- Taratura di termometro e bilancia per il corretto range di utilizzo;
- La pepsina è un reagente critico che deve essere conservato in un contenitore ermeticamente chiuso in ambiente fresco (4 – 15 ° C) ed asciutto. L'attività enzimatica si riduce con il tempo (scadenza 2 anni).



# Agitatore magnetico

## Procedura

- Preparare la soluzione digestiva aggiungendo in un becher da 3 litri in successione 2 litri di acqua a  $46-48^{\circ}\text{C}$ ,  $16 \pm 0,5$  ml di HCl al 25%,  $10 \pm 0,2$  g di pepsina in polvere (o 30 ml di pepsina liquida);
- Sminuzzare i campioni e trasferirli nel becher;
- Sciacquare il contenitore e le lame del tritacarne;
- Incubare in agitazione alla temperatura di  $44-46^{\circ}\text{C}$  fino alla scomparsa delle particelle di carne, circa 30' (**massimo 60'**);
- Versare la soluzione attraverso il setaccio nell'imbuto separatore e lasciare sedimentare per 30';
- Valutare il peso del residuo indigerito (**max 5% campione**);
- Prelevare 40 ml di soluzione nel cilindro graduato o nella provetta e lasciare sedimentare per 10';
- Aspirare 30 ml di sopranatante e versare i rimanenti 10 ml nella piastra da lettura insieme ad ulteriori 10 ml con cui verrà lavato il cilindro;
- Procedere con la lettura del sedimento.

# Agitatore magnetico

## Raccomandazioni della 2075/2005

- La pepsina va sempre aggiunta alla soluzione di acqua ed acido cloridrico, mai direttamente all'acido cloridrico altrimenti verrà degradata;
- Il liquido digestivo rimasto nell'imbuto separatore deve essere conservato fino al completamento della lettura dei risultati;
- La lettura del sedimento deve essere effettuata immediatamente, nel caso il sedimento non venga esaminato entro 30' occorre procedere con la chiarificazione (lavaggio con 30 ml di acqua di rubinetto);
- Un massimo di 15 g possono essere aggiunti al pool di campioni da 100 g, più di 15 g vanno analizzati come campione separato;
- Campioni fino a 50 g possono essere analizzati dimezzando la quantità dei reagenti;
- In caso di positività, le larve devono essere prelevate con una pipetta e conservate in una **provetta da 1,5-2 ml con alcool etilico al 90%** per l'identificazione della specie;
- i liquidi digestivi devono essere decontaminati riscaldandoli ad una temperatura minima di 60° C.

# Agitatore magnetico

## Punti critici della procedura

- La temperatura iniziale dell'acqua e della soluzione digestiva vanno costantemente monitorate, sotto i 37 ° C l'attività della pepsina si riduce mentre sopra i 48 ° C la pepsina viene disattivata (digestione incompleta);
- Un tempo di digestione eccessivo (>60') può danneggiare le larve con conseguente diminuzione del peso specifico (diverso tempo di sedimentazione) ed aumento dell'adesività ai contenitori;
- Un eccesso di sedimento nel setaccio può trattenere le larve;
- Le larve possono rimanere adese alle pareti del bicchiere del tritacarne, o del becher che vanno quindi sciacquati con cura;
- La torbidità del sedimento può impedire una corretta lettura;
- L'utilizzo di campioni positivi a scopo didattico (PT, addestramento, visita ispettiva) può essere fonte di falsi positivi se l'attrezzatura utilizzata non viene correttamente decontaminata.

# Stomacher

- Sistema di omogeneizzazione meccanica del campione
- Temperatura interna regolabile
- Permette di analizzare un campione di 100 g



# Stomacher

## Materiali ed apparecchiature peculiari

- Sacchetti in plastica per stomacher;
- Apparato vibrante (es. rasoio elettrico);
- Relè elettrico;

**Nel caso di isolamento delle larve mediante filtraggio:**

- Imbuto Gelman da 1 litro con supporto per filtro;
- Dischi filtranti in acciaio da 35  $\mu\text{m}$ ;
- Beuta da aspirazione;
- Pompa aspirante;
- Sacchetti in plastica sigillabili;
- Rennilasi.

# Stomacher

## Procedura

Triturando i campioni si migliora la qualità della digestione

- Dotare lo stomacher di un doppio sacchetto e regolare la T a 40-41° C;
- Versare nel sacchetto interno 1,5 l di acqua preriscaldata a 40-41° C, 25 ml di acido cloridrico al 17,5 %, il pool di campioni da 100 g, e 6 g di pepsina;
- Mescolare il contenuto del sacchetto per 25 minuti;
- Filtrare il succo di digestione attraverso il setaccio in un becher da 3 litri;
- Aggiungere ghiaccio fino ad ottenere un volume di 2 litri;
- Trasferire il liquido digestivo in un imbuto separatore da 2 litri;
- Lasciare sedimentare per 30';
- Durante la sedimentazione il recipiente viene fatto vibrare ad intervalli di 1';
- Prelevare 60 ml di liquido e lasciare sedimentare per 10' in un cilindro graduato;
- Aspirare il surnatante fino a 15 ml, trasferire il rimanente in una Petri per la ricerca delle larve.

# Stomacher

## Isolamento mediante filtraggio

- Dopo l'aggiunta del ghiaccio il succo digestivo viene trasferito nell'imbuto Gelman e filtrato;
- Il filtro viene messo in un sacchetto con la soluzione di rennilasi ed incubato nello stomacher per 3';
- La soluzione viene versata nella piastra per controllare la presenza di larve di *Trichinella*.

# Stomacher

## Punti critici della procedura

Gli stessi del metodo dell'agitatore magnetico inoltre:

- Temperatura mantenuta dallo stomacher durante l'analisi

Se si utilizza la procedura di filtraggio anche:

- Possibilità che le larve restino adese alle pareti del sacchetto dello stomacher o nell'imbuto Gelman;
- Corretta attività della soluzione di rennilasi.



# Trichomatic 35

- Apparecchio di digestione completamente automatico
- Permette un'analisi veloce del campione (circa 20')
- Massima quantità di campione analizzabile 35 g



# Trichomatic 35

## Procedura

- Aggiungere il campione (max 35 g) nella camera di digestione;
- Versare l'acqua nella camera dei liquidi fino al segno (400ml circa);
- Versare circa 30 ml di acido cloridrico all'8,5 % nell'apposita cameretta;
- Collocare il filtro a membrana (14 um) sotto al filtro a grana grossa nell'apposito supporto;
- Aggiungere 7 g di pepsina nella camera di digestione;
- Selezionare il periodo di digestione (5' per suini da ingrasso, 8' per altri campioni);
- Rimuovere il filtro a membrana e trasferirlo sulla piastra Petri per la lettura allo stereomicroscopio.

# Trichomatic 35

## Raccomandazioni della 2075/2005

- Il filtro a membrana può essere riutilizzato fino ad un massimo di cinque volte. Il filtro deve essere rigirato dopo ciascuna utilizzazione e controllato prima dell'uso per individuare eventuali danni che lo renderebbero inutilizzabile;
- Nel caso di risultati positivi, riempire la camera di reazione del miscelatore con acqua bollente fino a 2/3. Versare acqua di rubinetto nel recipiente collegato al contenitore di liquidi fino raggiungere il livello del sensore inferiore e procede con la pulizia automatica. Decontaminare il supporto del filtro e qualsiasi altra attrezzatura, usando, ad es. formalina;
- In caso di digestione incompleta si pone un nuovo filtro sul supporto, si riempie con acqua il recipiente del miscelatore e si procede al programma di pulizia automatica. Alla fine entrambi i filtri devono essere esaminati allo stereomicroscopio.

# Trichomatic 35

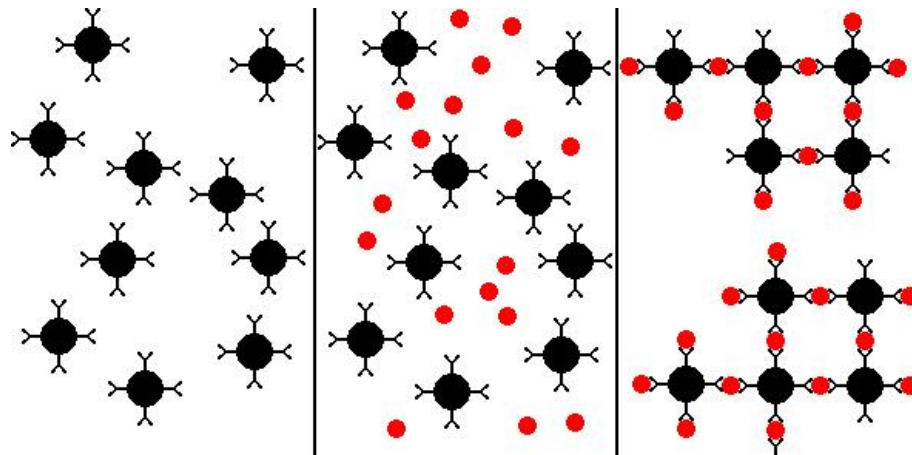
## Punti critici

- Essendo un sistema totalmente automatizzato è fondamentale una corretta manutenzione dello strumento (es. mantenimento della corretta temperatura, tenuta delle guarnizioni, etc.);
- Controllare lo stato di usura della membrana filtrante.



# Test di agglutinazione al lattice

- Permette di rilevare la presenza di larve di *Trichinella* spp. nel campione di tessuto mediante una reazione specifica antigene-anticorpo;
- Basato sulla reazione di agglutinazione del lattice;
- Validato solo per l'utilizzo su suini domestici.



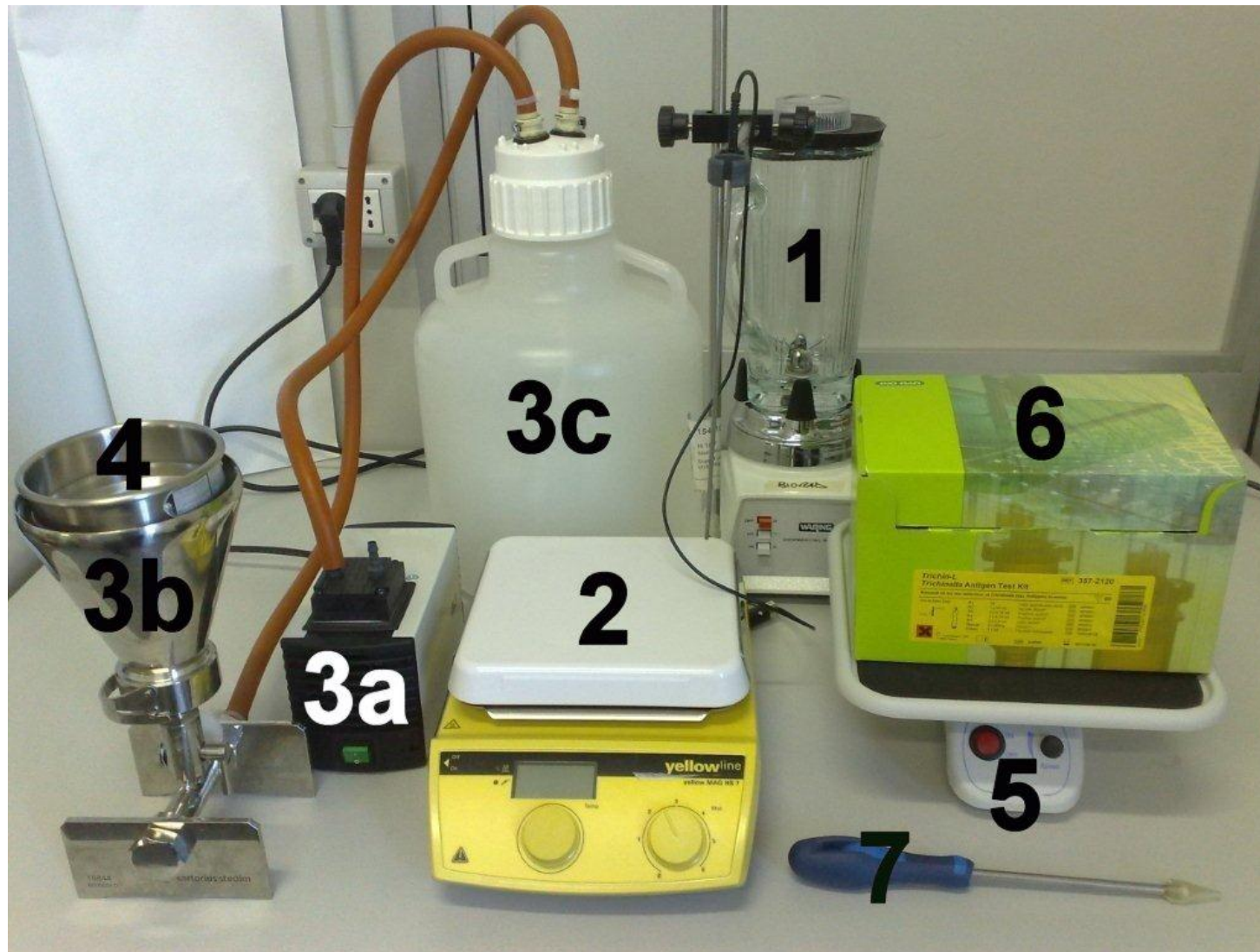
# Agglutinazione al lattice

## Materiali, reagenti ed apparecchiature necessarie

- Coltello o forbici per prelievo/toilettatura campione;
- Vassoi suddivisi in riquadri o strumenti equivalenti che permettano di tracciare i campioni;
- Miscelatore con lame affilate (tritacarne o frullatore);
- Agitatore magnetico con piastra riscaldante dotato di termostato;
- Ancorette magnetiche di 5 cm rivestite in teflon;
- Becker in vetro da 3 litri;
- Setaccio con maglie metalliche da 180  $\mu\text{m}$ ;
- **Dispositivo di filtrazione in acciaio per filtri da 20  $\mu\text{m}$  con imbuto in acciaio;**
- **Pompa per vuoto;**
- **Contenitori con capacità 10-15 litri per raccolta succo digestivo;**
- Termometro di precisione da 0,5° C;
- Bilancia di precisione da 0,1 g;
- Pipette graduate;



# Test di agglutinazione al lattice



1= frullatore  
2= agitatore magnetico con sonda termometrica  
3= pompa da vuoto + imbuto in acciaio + tanica di raccolta

4= setaccio in acciaio da 180  $\mu$ m  
5= agitatore orbitale  
6= Trichin-L kit  
7= pestello

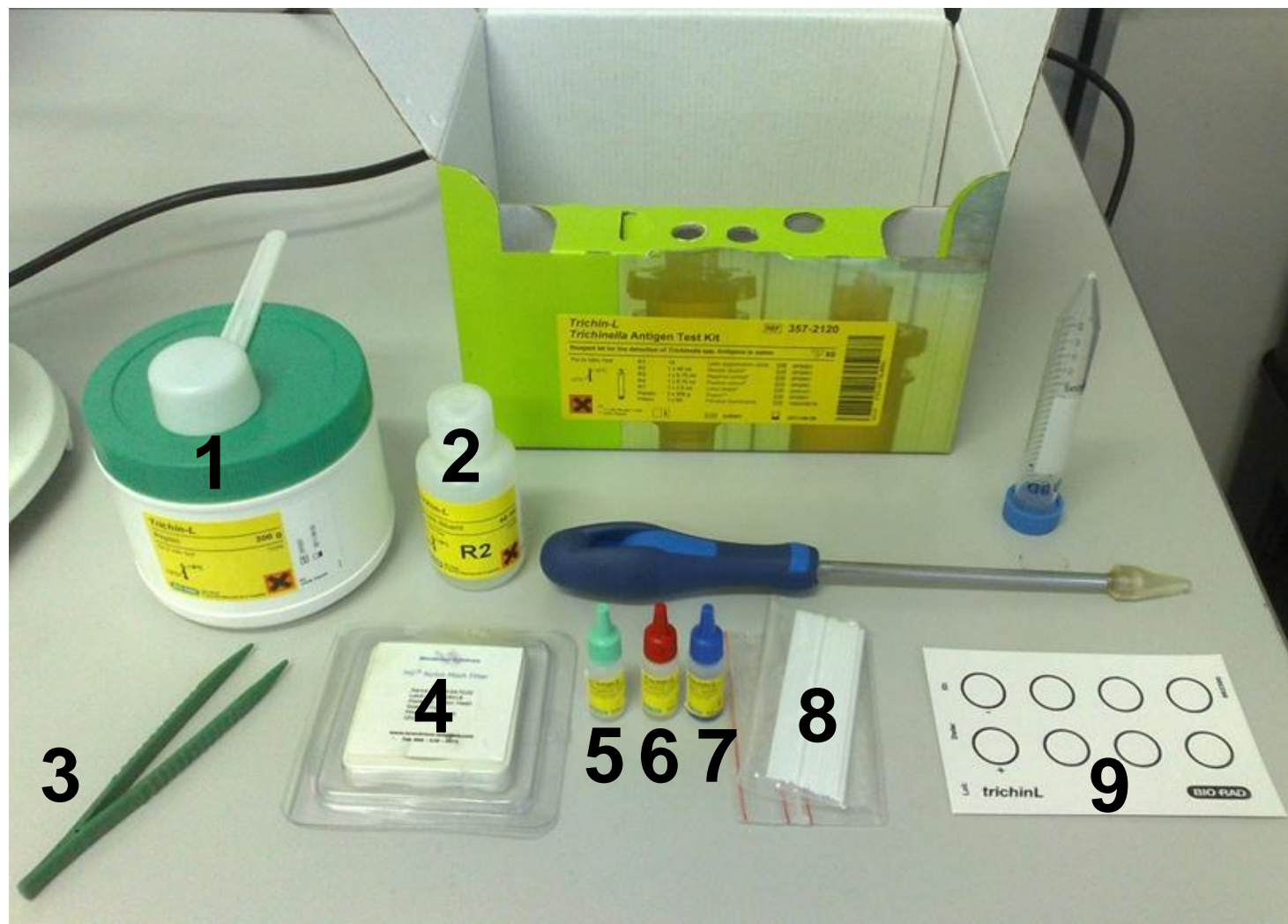
# Agglutinazione al lattice

Materiali, reagenti ed apparecchiature necessarie

- Filtri in nylon con maglia da 20  $\mu\text{m}$ ;
- Pinzette;
- Provette coniche da 15 ml (tipo Falcon);
- Pestello in teflon a punta conica adatta alle provette;
- Acido cloridrico al 25%;
- Acqua di rubinetto alla temperatura di 46-48° C;
- Kit Trichin-L (Biorad);
- Dispositivi di protezione individuali (camice, guanti, mascherina) ed ambientali (cappa chimica o sistema di aspirazione dell'aria).



# Contenuto del kit Trichin-L



1= pepsina (300 g) + dosatore  
2= diluente per il campione  
3= pinzette  
4= filtri in nylon da 20  $\mu$ m

5= controllo negativo  
6= controllo positivo  
7= biglie di lattice  
8= bacchettine monouso

9= carte di agglutinazione

# Agglutinazione al lattice

## Procedura

- Preparare la soluzione digestiva aggiungendo in un becher da 3 litri in successione 2 litri di acqua a 46-48° C,  $16 \pm 0,5$  ml di HCl a 25%,  $10 \pm 0,2$  g di pepsina in polvere (o 30 ml di liquida);
- Sminuzzare i campioni nel mixer con 150ml di soluzione digestiva;
- Sciacquare il contenitore e le lame del mixer;
- Incubare in agitazione alla temperatura di 44-46° C fino alla scomparsa delle particelle di carne, circa 30' (o al massimo 60');
- Valutare il peso del residuo indigerito (max 5% campione);
- Posizionare il filtro di nylon sul supporto di filtrazione e fissarvi sopra l'imbuto ed il setaccio;
- Collegare la pompa da vuoto e procedere con la filtrazione della soluzione digestiva;
- Lavare il becher con 250ml di acqua di rubinetto calda e versare il liquido di risciacquo nel filtro;

# Agglutinazione al lattice

## Apparato filtrante



# Agglutinazione al lattice

## Solubilizzazione dell'antigene

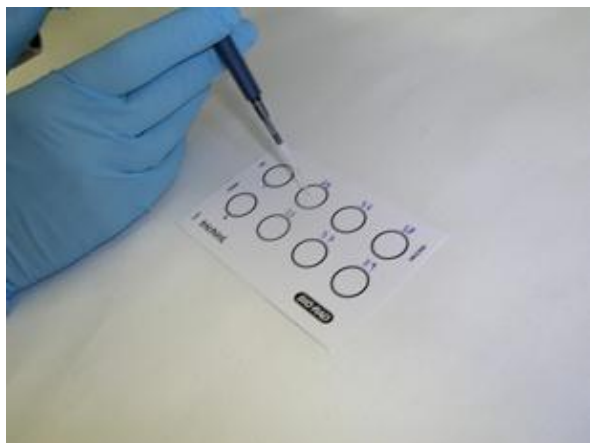
- Prelevare il filtro in nylon, ripiegarlo in 4 e posizionarlo all'interno della provetta da 15 ml;
- Pressare con forza il filtro mediante 20 movimenti avanti-indietro del pestello;
- Aggiungere nella provetta 0,5 ml  $\pm$  0,01 ml di diluente e miscelare per 30 secondi mediante brevi movimenti del pestello facendo attenzione a non far fuoriuscire il liquido;



Tra un'analisi e la successiva il pestello deve essere decontaminato in acqua ad almeno 65° C e risciacquato accuratamente per eliminare ogni residuo di antigene.

# Agglutinazione al lattice

## Rilevazione dell'antigene



50  $\mu$ l di campione e 2 gocce di ciascun controllo vengono poste sulla carta di agglutinazione



Le biglie di lattice vengono aggiunte al campione e la soluzione viene mescolata con la bacchettina

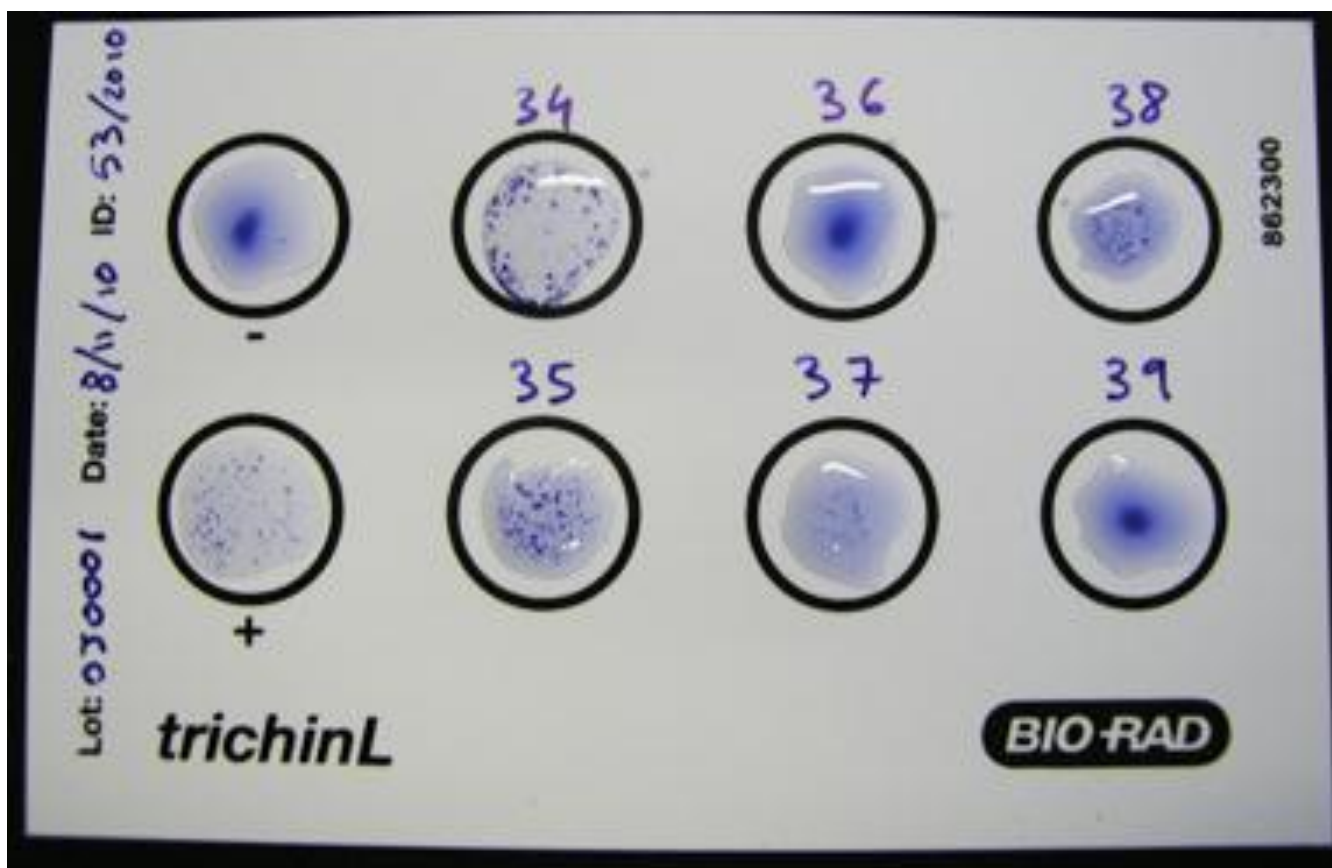


La carta di agglutinazione viene incubata a temperatura ambiente per 10 minuti sull'agitatore



# Agglutinazione al lattice

## Interpretazione dei risultati



La REAZIONE POSITIVA, evidenziata dalla presenza di aggregati di biglie di colore blu acceso, indica che nel campione sono presenti antigeni di *Trichinella*.

# Agglutinazione al lattice

## In caso di esito positivo o dubbio

Gli esami di seconda istanza (pool di 5 animali) **e di terza istanza (singolo animale)** possono venire effettuati con la stessa metodica utilizzando il quantitativo di tessuto specificato nella 2075/2005.

In caso di positività nell'esame di terza istanza, 20 grammi di tessuto vengono inviati al laboratorio di riferimento nazionale per le analisi di conferma mediante uno dei metodi descritti al Cap.1, Allegato 1 della 2075/2005.

# Agglutinazione al lattice

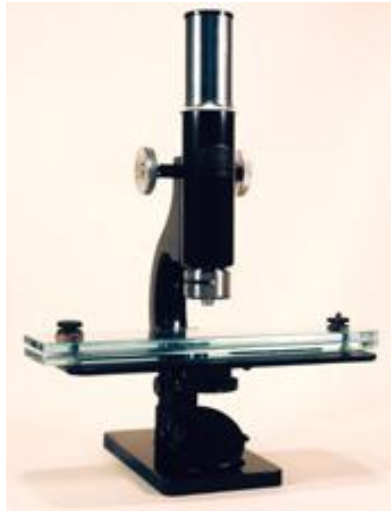
## Pulizia e decontaminazione

In caso di esito positivo od incerto, tutto il materiale a contatto con le carni (vaschetta di miscelazione, becher, barretta per rimescolare, sensore di temperatura, imbuto di filtraggio conico, setaccio e pinza) deve essere accuratamente decontaminato mediante immersione per alcuni secondi in acqua calda (65 ° C - 90 ° C). I residui di carne o le larve inattivate che dovessero restare sulla loro superficie possono essere rimossi con una spugna pulita e acqua corrente. Se necessario, è possibile aggiungere alcune gocce di detergente per sgrassare l'attrezzatura. Si raccomanda poi di risciacquare accuratamente ogni elemento per rimuoverne ogni traccia.

**Secondo le stesse modalità deve essere decontaminato il pestello utilizzato per solubilizzare l'antigene.**



# Trichinoscopio



- Non più utilizzabile da gennaio 2010
- Non permette di analizzare un elevato numero di animali
- Difficoltà nel rilevare le specie di *Trichinella* non incapsulate
- Falsi negativi causati da errata dimensione del campione (elevato spessore del tessuto da esaminare)

# Falsi positivi

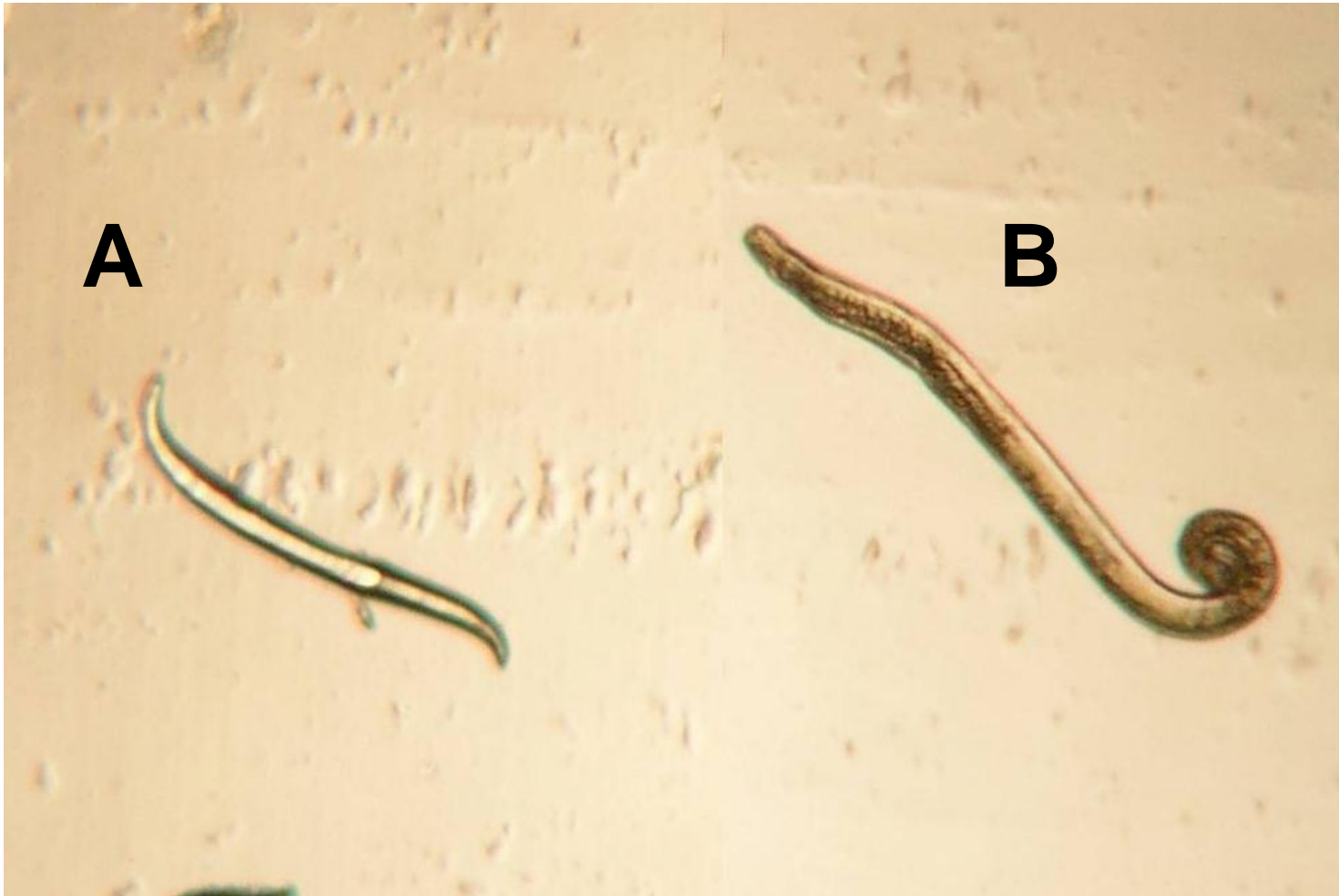
- La digestione artificiale è riconosciuta come il metodo più efficace per evidenziare la presenza di larve di *Trichinella* sp. nei tessuti muscolari.
- L'osservazione della larva al di fuori della sua nicchia naturale (la cellula muscolare) può a volte portare all'identificazione di falsi positivi costituiti da larve di nematodi appartenenti a differenti generi o famiglie.
- Non è insolito che larve di nematodi che vivono o migrano nel corpo di vertebrati ma in nicchie differenti (lume intestinale, fegato, polmoni, vasi sanguigni o linfatici) possano per errore essere identificate come appartenenti al genere *Trichinella*.

# Falsi positivi-1



A, larva di nematode di genere *Strongylus* isolata da cavallo;  
B, *Trichinella spiralis*.

# Falsi positivi-2



A, setola di verme oligochete;  
B, *Trichinella spiralis*.

# Falsi positivi-3



A, larva di nematode appartenente al genere *Metastrongylus* isolata da cinghiale;  
B, *Trichinella spiralis*.



# Falsi positivi-4

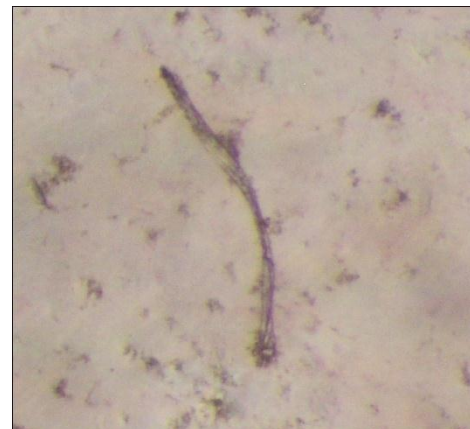


Larva di *Toxocara cati* isolata da suino



# Le fibre muscolari

Possono trarre in inganno l'occhio inesperto a basso ingrandimento, ma aumentando la risoluzione si nota l'aspetto irregolare e l'assenza di strutture interne.



Grazie per la vostra attenzione

