



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

LA NOSTRA
ESPERIENZA,
LA VOSTRA
SICUREZZA.

DIAGNOSI E MONITORAGGIO DELLE MALATTIE: L'IMPORTANZA DEL CAMPIONAMENTO

Andrea Luppi, DVM, PhD, Dipl. ECPHM

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sede di Parma



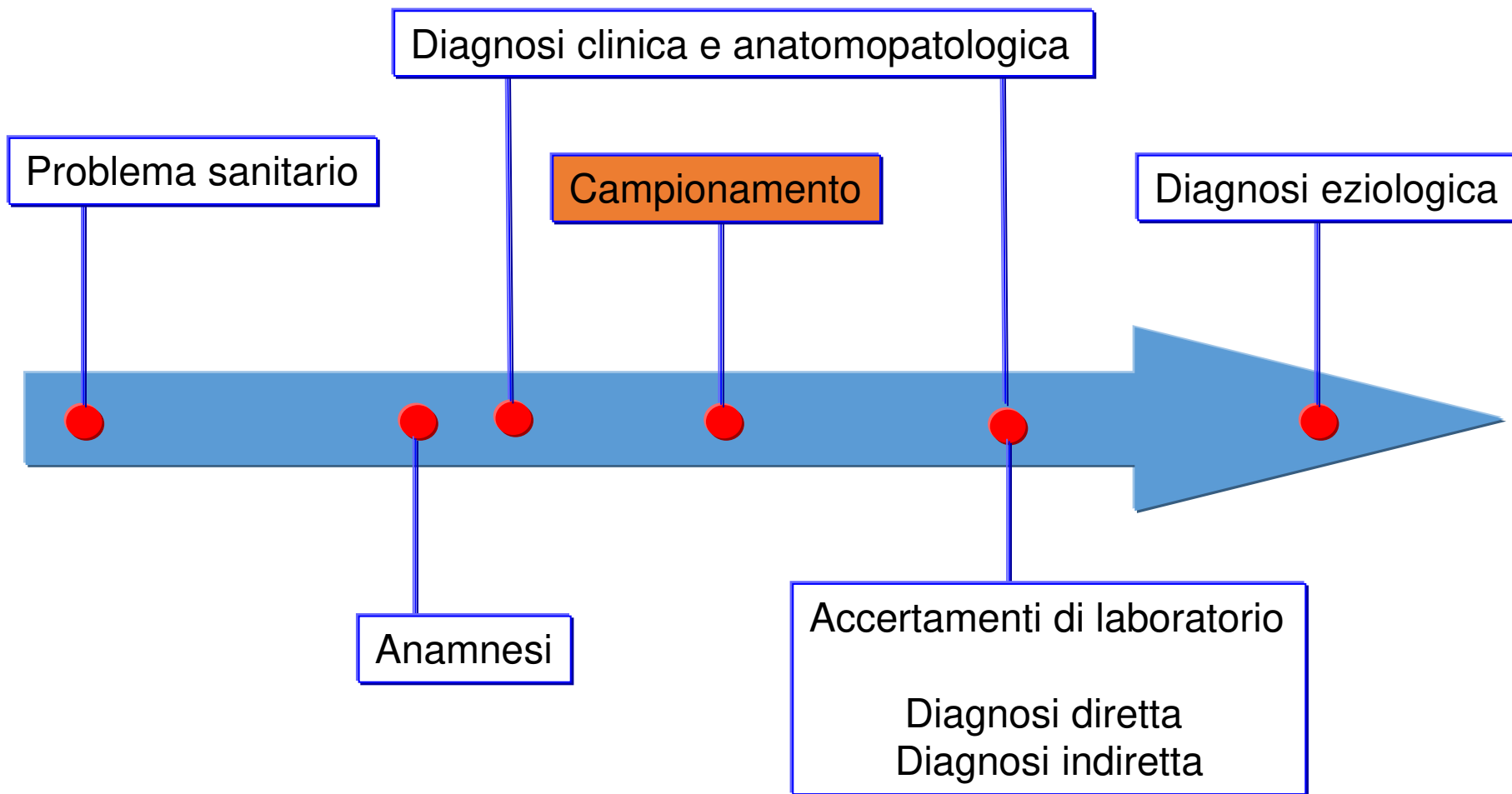
INTRODUZIONE E CONTENUTI



- Monitoraggio/sorveglianza vs Diagnosi: criteri di campionamento
- Il campionamento: aspetti generali
- Campionamento (parte generale): esame batteriologico, parassitologico, istologico, sierologico e virologico
- Fluidi orali e fluidi di processazione
- Campionamento (parte speciale): patologia enterica
- Campionamento (parte speciale): patologia respiratoria e sistemica



ITER DIAGNOSTICO





IL CAMPIONAMENTO



- Diagnosi o Sorveglianza/Monitoraggio?

Diagnosi: processo di verifica della **presenza di un agente patogeno** associato a quadri clinici ed anatomo-isto-patologici, che porta ad una diagnosi eziologica. **Deve sottostare a definiti criteri diagnostici.**

Sorveglianza: Tutte le attività mirate ad **accertare rapidamente l'ingresso** nella popolazione di un agente patogeno.

Monitoraggio: dimostrazione della **presenza** di un agente patogeno in una popolazione (dimostrazione diretta, indiretta o di esiti del suo «passaggio»).



DIAGNOSI

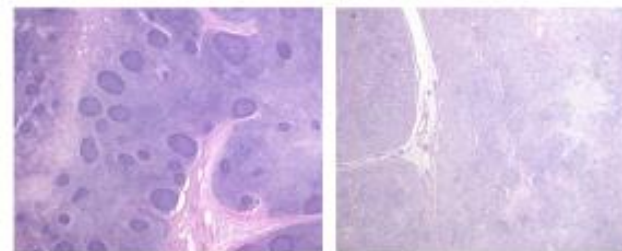


PCVAD

1. CLINICA E LESIONI A.P.

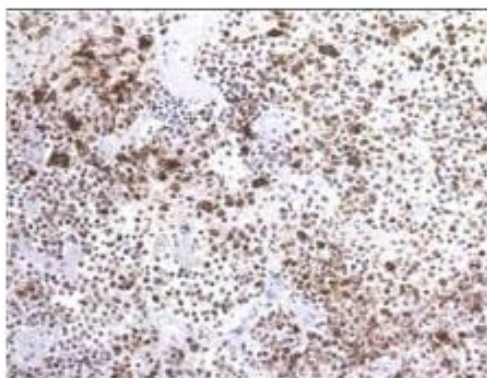


2. LESIONI ISTOLOGICHE TIPICHE



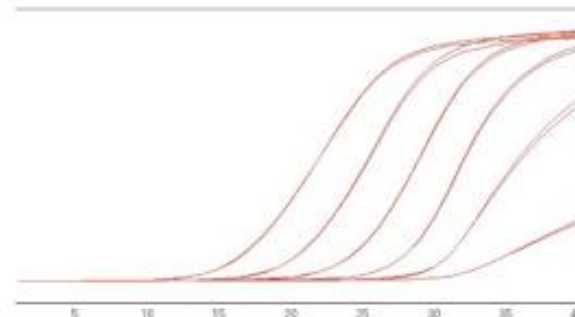
DIAGNOSI

3. PRESENZA DI PCV-2



IHC

qPCR

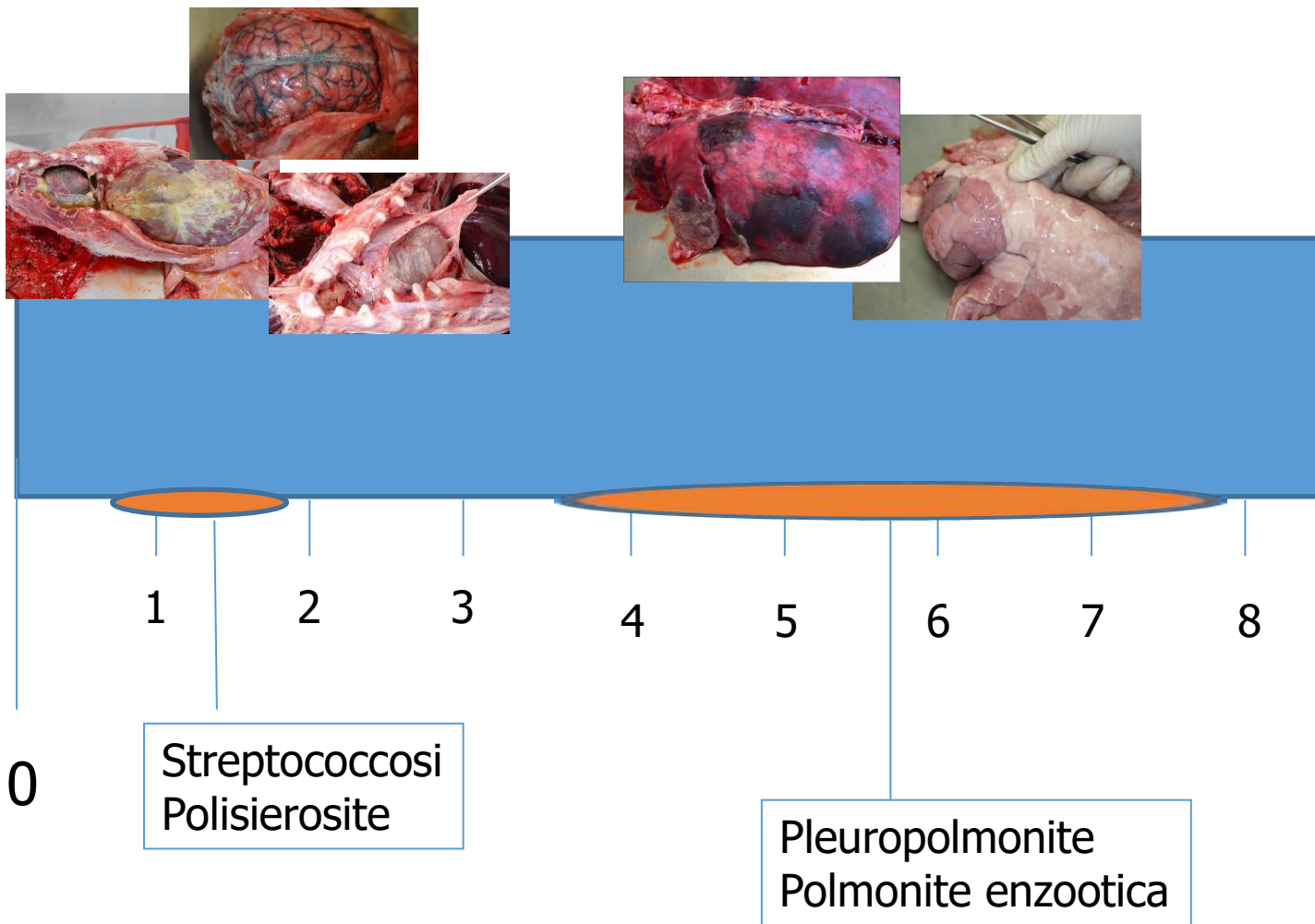




ESEMPIO DI MONITORAGGIO



Monitoraggio delle lesioni al macello



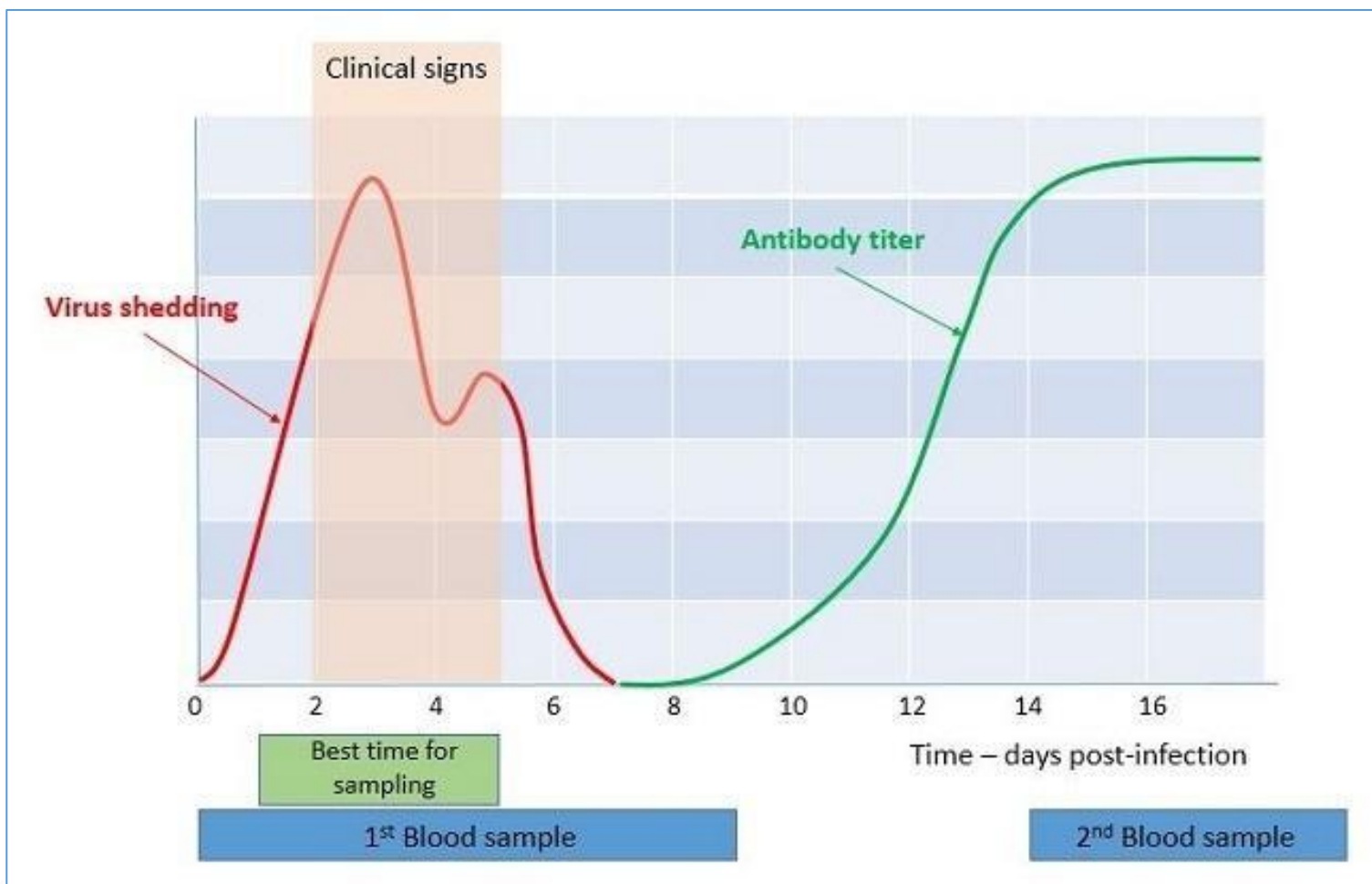
9 mesi



DIAGNOSI VS MONITORAGGIO



Indagine sierologica: es. influenza suina





PARTE GENERALE



- Esame batteriologico
- Esame parassitologico
- Esame istologico
- Esame sierologico/biochimica-clinica
- Esame virologico/biologia molecolare





ESAME BATTERIOLOGICO



- N° ottimale di suini da campionare: almeno 3-5
- Scegliere animali:
 - nella **fase acuta** della malattia (24-48 ore dalla comparsa dei sintomi)
 - **non trattati** con antibiotici
 - sacrificati (da preferire)
 - deceduti (< di 4 ore)
 - Conservare i campioni a temperatura di refrigerazione (+4°C)

Allegare sempre un'accurata anamnesi (**clinica, morbilità, mortalità, trattamenti, età** degli animali, ecc.)



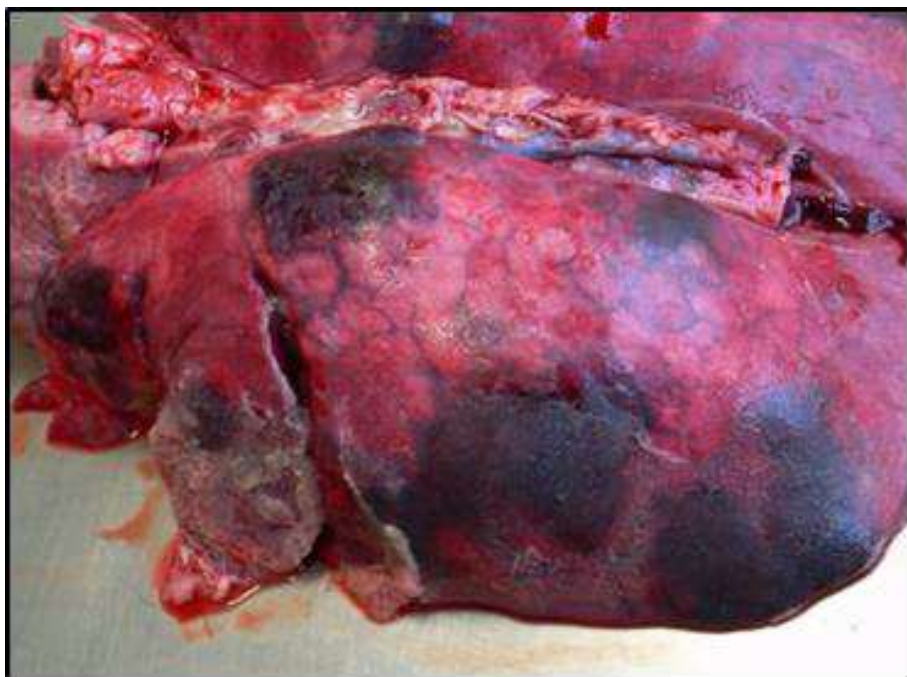
ESAME BATTERIOLOGICO



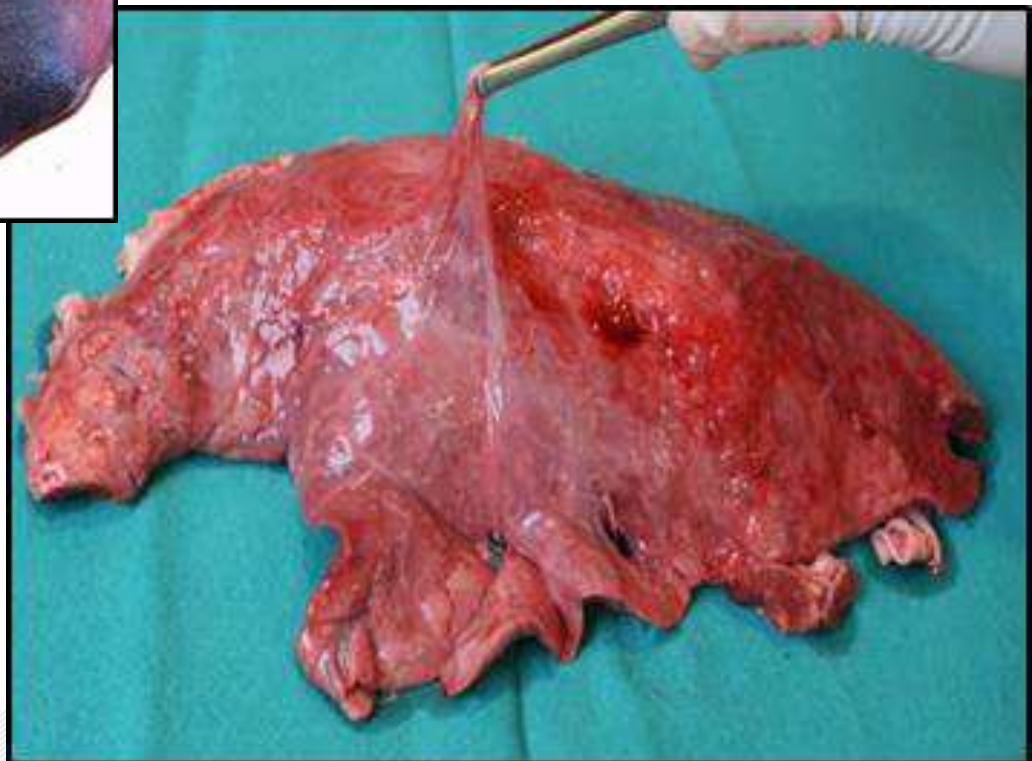
Evitare animali cronici



ESAME BATTERIOLOGICO



Evitare lesioni croniche





ESAME BATTERIOLOGICO



Evitare campioni in cattivo stato di conservazione



4 ore a T° ambiente
(28°C)





ESAME BATTERIOLOGICO



- Evitare porzioni troppo piccole di organi parenchimatosi.
- Adeguate dimensioni favoriscono la sterilità dell'esame batteriologico.
- Evitare il rimescolamento di visceri, in particolare intestino e organi parenchimatosi.





ESAME BATTERIOLOGICO



Esistono diversi tipi di terreni di trasporto ad es.

- Stuart
- Amies
- Cary-Blair

- Composizione: sali + agar

- Permettono la **sopravvivenza** dei microrganismi impedendone la moltiplicazione. **Ne preservano la tipologia e la quantità.**

Tutti i campioni devono essere inviati il più rapidamente possibile al laboratorio:

- da 4 ore a un massimo di 48 ore e comunque mantenuti a 4 °C



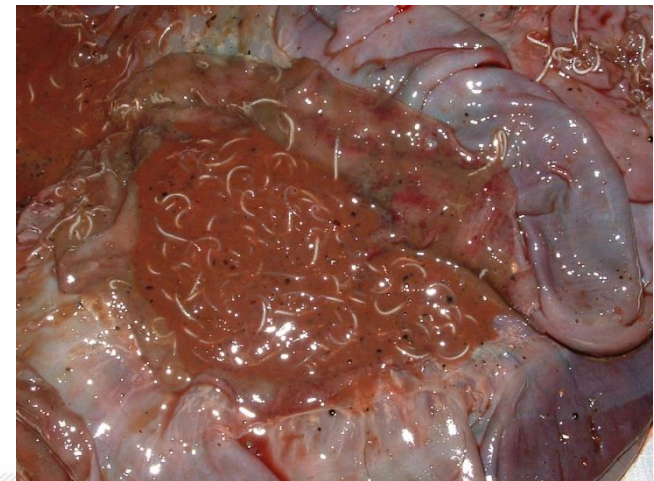
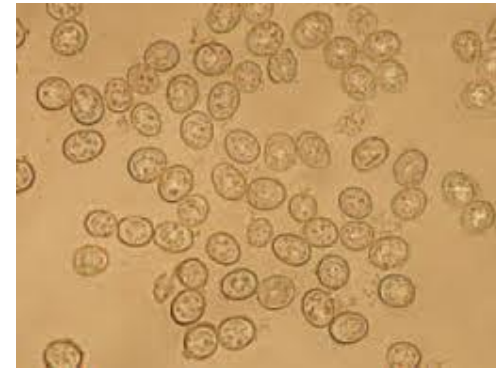


ESAME PARASSITOLOGICO



- Prelievo di feci fresche (ampolla rettale)
- Da pavimento (feci appena emesse – solo porzione superficiale)
- **Conservare a +4°C**
- **Non congelare**

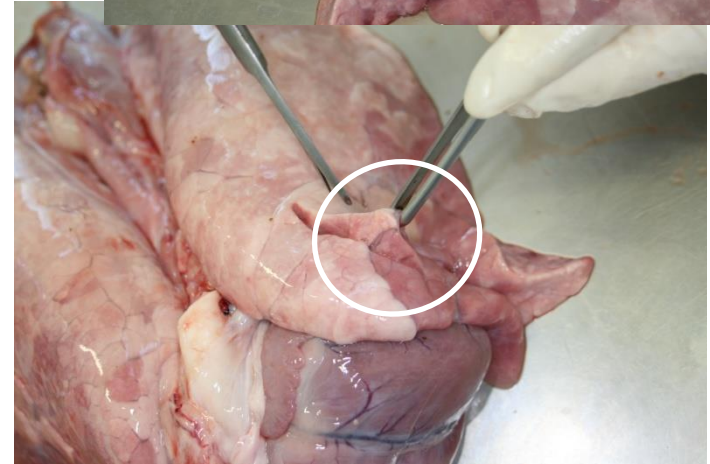
- **Quantità minima 3-5 gr. di feci**
- Per aumentare la sensibilità diagnostica effettuare prelievi ripetuti a distanza di alcuni giorni





ESAME ISTOLOGICO

- Materiale ben conservato
- Evitare il congelamento
- Rapporto tessuto/formalina: 1:10
(penetrazione nel tessuto 0,8 mm/h)
- Frammenti con spessore non superiore a 0,5 cm.
- Fissazione in formalina tamponata al 10%



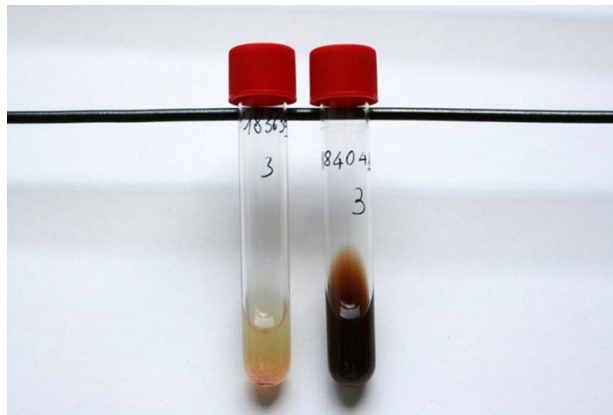


SIEROLOGIA e BIOCHIMICA-CLINICA



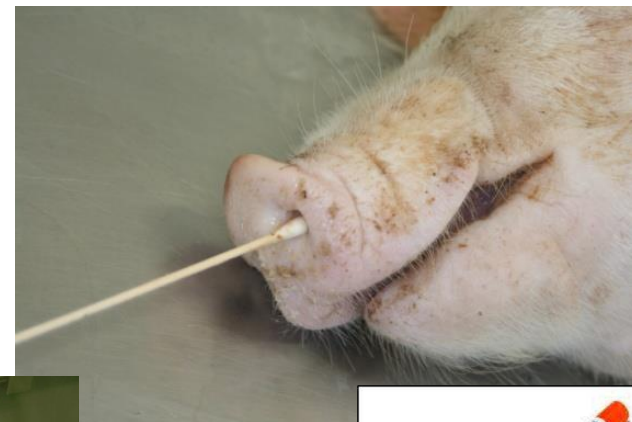
QUALITA' DEL CAMPIONE DI SIERO

- Lasciare riposare a **temperatura ambiente** il campione di sangue prelevato ($<27^{\circ}\text{C}$)
- Formazione del coagulo e separazione del siero
- Subito dopo tale fase conservare il campione a $+4^{\circ}\text{C}$
- Trasferire il siero ottenuto in una seconda provetta (refrigerare o congelare)





INDAGINI VIROLOGICHE

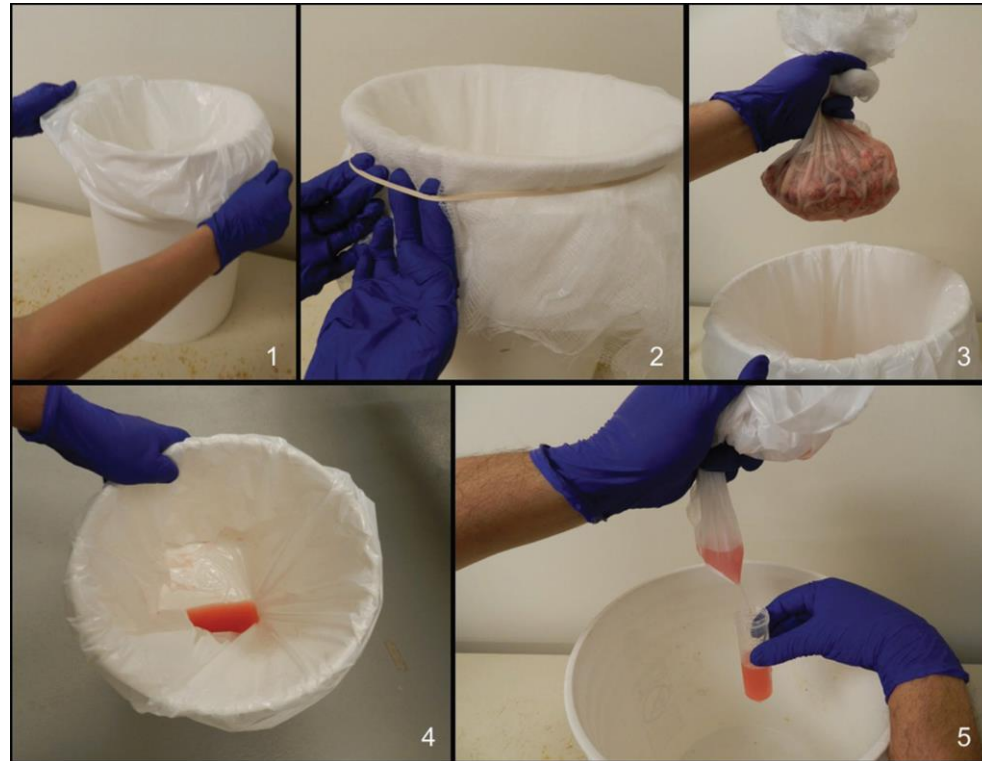


MODALITA'

- Tessuti o fluidi biologici per indagini virologiche possono pervenire **freschi, refrigerati o congelati**
- I tamponi vanno posti in **2 ml di soluzione fisiologica** (“secchi” accettabili entro 30' dal prelievo)



FLUIDI DI PROCESSAZIONE



Fluidi di processazione: impiego dei testicoli e di altri fluidi per ottenere liquidi tissutali.

Con i fluidi provenienti **solo dal taglio della coda**, la sensibilità è molto inferiore e non è sufficiente per determinare in modo affidabile lo stato dell'allevamento (Vilalta et al, 2018).



FLUIDI DI PROCESSAZIONE



Table 2: Qualitative result of PRRSV rRT-PCR tests in processing fluids and matching serum samples and timeline of PRRS outbreak and whole-herd exposure

Sampling set	Time between PRRS outbreak and sampling (weeks)	Time from whole-herd exposure to MLV or FVE (weeks)	Result of PRRSV rRT-PCR				
			Processing fluids		Serum samples		
			Ct value*	Test result	Ct value*	Test result	
1	6.0	21 - 262	FVE: 1.0	31.7	Positive	23.0	Positive
2	5.4	21 - 250	MLV: 5.4	28.4	Positive	20.1	Positive
3	7.9	18 - 174	MLV: 6.9	30.1	Positive	27.0†	Positive
4	9.6	20 - 226	MLV: 9.6	25.6	Positive	23.7	Positive
5	11.9	25 - 265	MLV: 10.9	22.7	Positive	27.6	Positive
6	8.0	37 - 466	MLV: 2.0	29.2	Positive	25.0†	Positive
7	20.0	35 - 438	MLV: 9.0	34.1	Positive	40.0	Negative
8	21.1	50 - 650	MLV: 10.1	35.2	Positive	40.0	Negative
9	22.0	37 - 481	MLV: 11.0	26.4	Positive	27.9	Positive
10	11.4	17 - 221	MLV: 5.4	30.2	Positive	31.1†	Positive
11	16	17 - 177	MLV: 15	40.0	Negative	40.0	Negative
12	27.1	21 - 233	MLV: 26.1	40.0	Negative	40.0	Negative


Lopez et al., 2018

N. Nidiate – N. suinetti



Effect of litter aggregation and pooling on detection of porcine reproductive and respiratory virus in piglet processing fluids

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation
2019, Vol. 31(4) 625–628
© 2019 The Author(s)
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/1040638719852999
jvdi.sagepub.com

Carles Vilalta^{1*} , Jake Baker^{*}, Juan Sanhueza, Deb Murray, Amanda Sponheim, Julio Alvarez, Fred Sylvia, Dale Polson, Montse Torremorell, Cesar Corzo, Robert B. Morrison[†]

- 50 nidiare (circa 600 suinetti): possibile quando nel campione era presente un suino con un valore Ct di ~ 22
- Tuttavia, nelle nidiare con valori Ct iniziali di ≥ 30 , la numerosità del pool dovrebbe essere ridotta.

(Vilalta et al., 2019)



FLUIDI DI PROCESSAZIONE



STUDIO SULL'USO DEGLI EMOSIERI TESTICOLARI PER LA DIAGNOSI DI PRRS IN CONDIZIONI DI CAMPO

STUDY ON USE OF PROCESSING FLUIDS FOR PRRS DIAGNOSIS IN FIELD CONDITIONS

USTULIN M.¹, TONON F.², LOMBARDO F.², GIORGIUTTI M.³, TARGHETTA C.¹, TOFFOLETTO M.¹, VIO D.¹

Azienda	n°	Risultato sieri	Risultato emosieri	Risultato pool
B	1	Neg	Neg	Neg
B	2	Neg	Neg	
B	3	Pos (Ct=36,05)	Pos (Ct=35,93)	
B	4	Neg	Neg	
B	5	Neg	Neg	
B	6	Neg	Neg	
B	7	Neg	Neg	
B	8	Neg	Pos (Ct=37,92)	
B	9	Neg	Neg	
B	10	Neg	Neg	

10 nidiatae
5 suinetti per nidiata

Con Ct >35 osservati per le singole nidiatae, il pool delle stesse rischia di determinare risultati falsamente negativi.



Impiego di corde di cotone:

- lasciare a disposizione dei suini per 20'-30'
- Per 25-30 animali 1 corda (dopo 30' 75% dei suini è venuto in contatto con la corda). La percentuale aumenta (90%) con 2 corde per box.
- Ogni 2-4 settimane per il monitoraggio di PRRS e PCV2

Trattamento e conservazione:

- Centrifugare la saliva raccolta: (1000-2000 rpm/30 min.) e separare sovranatante.
- Se analizzati entro 24 ore (+4°C)
- Se >24 ore (-20°C)





Sampling guidelines for oral fluid-based surveys of group-housed animals

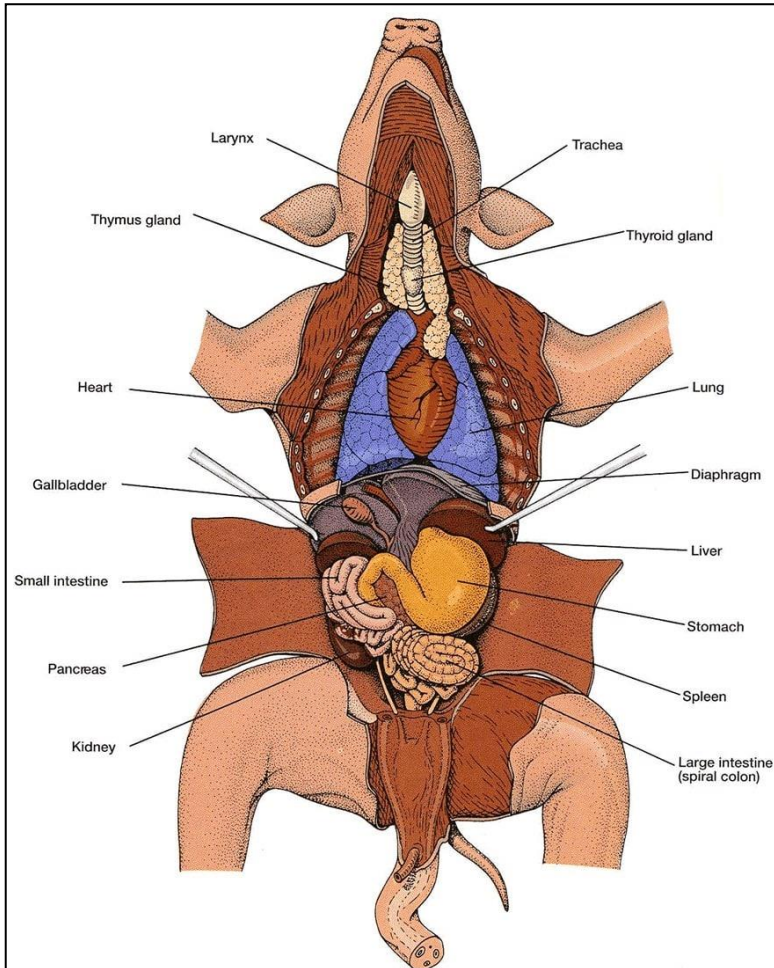


Marisa L. Rotolo^{a,*}, Yaxuan Sun^b, Chong Wang^{a,b}, Luis Giménez-Lirola^a, David H. Baum^a, Phillip C. Gauger^a, Karen M. Harmon^a, Marlin Hoogland^c, Rodger Main^a, Jeffrey J. Zimmerman^a

Test	No. of samples	Number of positive pens among a total of 36 pens in the barn									
		1	2	3	4	5	6	9	18	27	36
Diagnostic sensitivity 95%	1	3	5	8	10	13	16	25	53	81	95
	2	5	11	16	20	25	30	43	79	96	100
	3	8	16	23	30	36	42	58	90	99	100
	4	11	21	30	39	46	53	71	96	100	100
	5	12	25	36	46	55	63	80	99	100	100
	6	15	30	42	52	62	69	85	99	100	100
	9	23	43	58	68	77	84	95	100	100	100
	18	47	73	87	94	97	99	100	100	100	100
	27	73	93	98	100	100	100	100	100	100	100
	36	94	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Sensibilità del test: 95%
 Box positivi: 9
 N. Di box campionati: 2

Probabilità di rilevare il virus della PRRS: 43%
 Se i capannoni campionati con la stessa modalità passano a 3 la probabilità arriva all'81%



In molti casi il prelievo di materiale patologico avviene **contestualmente all'esame necroscopico**

A seconda del sospetto clinico e del quadro anatomopatologico occorre considerare:

- Protocollo diagnostico
- Indagini di prima e seconda scelta
- Distretto da campionare
- Tipologia di campione



AGENTI UBIQUITARI



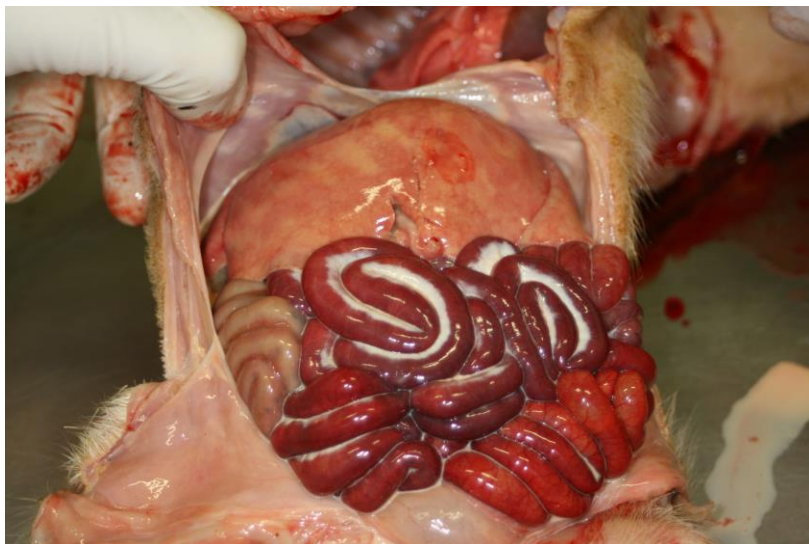
La maggior parte degli agenti eziologici che causano malattie nei suini **sono ubiquitari** e considerati parte del normale microbiota.

Pertanto, **la sola presenza di un agente eziologico** potenzialmente patogeno non necessariamente coincide con la diagnosi eziologica.

In particolare, l'isolamento di determinati agenti eziologici da certi distretti corporei, non è significativo.



PATOLOGIA ENTERICA



1



2

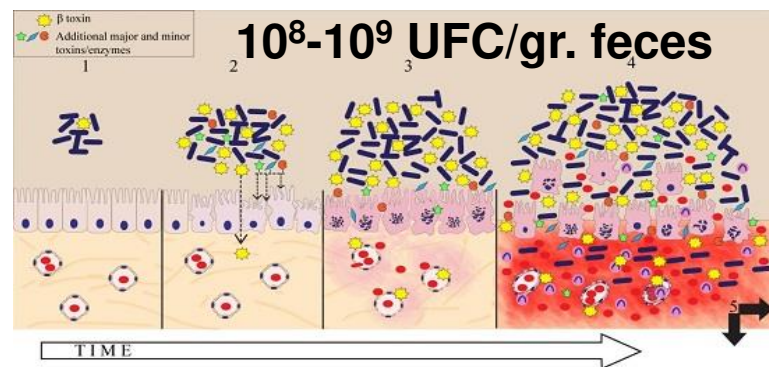
J. G. Songer, F. A. Uzal. J Vet Diagn Invest 17:528-536 (2005)

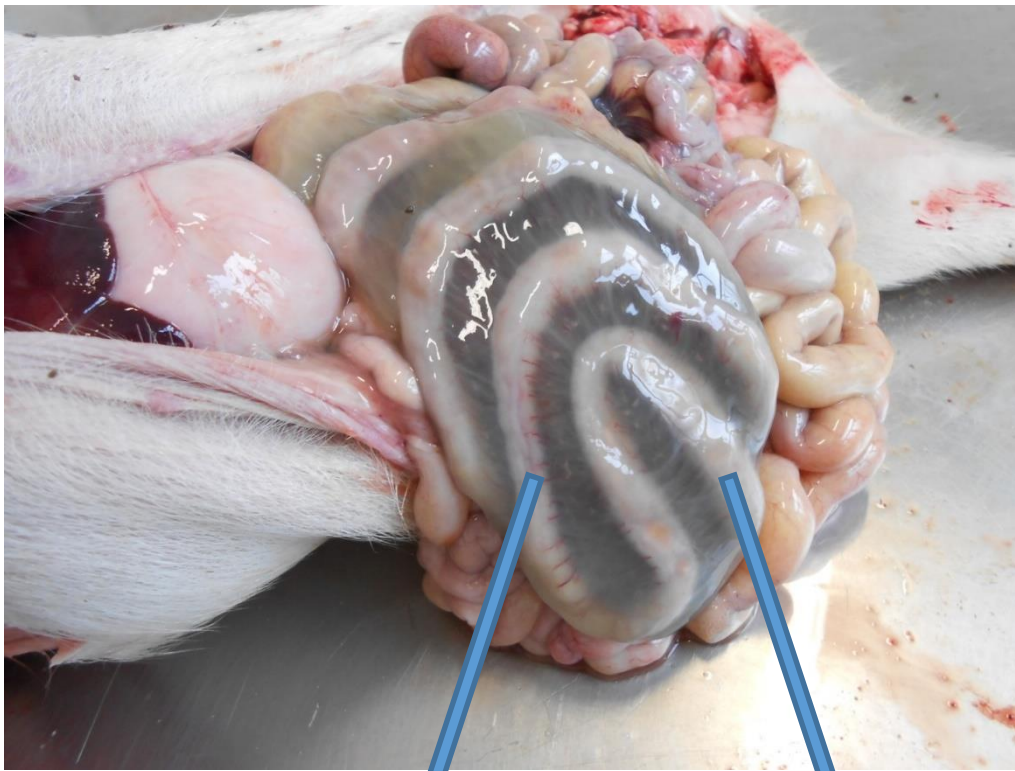
Agente eziologico: *C.perfringens* tipo A (1) e tipo C (2)

Campionamento:

- piccolo intestino
- contenuto intestinale/feci

Approccio diagnostico: batteriologia quantitativa e genotipizzazione (tossinotipo e geni tossine CPA, CPB, CPB2 ecc.), istopatologia





Agente eziologico: *C.difficile*

Campionamento: Colon

Approccio diagnostico:
batteriologia, ricerca diretta
delle tossine, genotipizzazione
degli isolati e istopatologia.

-20°C per ricerca
tossine TcdA e/o TcdB
(termolabili)

+ 4°C per esame
batteriologicalo

Importante associare i risultati di laboratorio con i rilievi clinici ed anatomopatologici data la frequente presenza di *C.difficile* in feci di animali clinicamente sani.

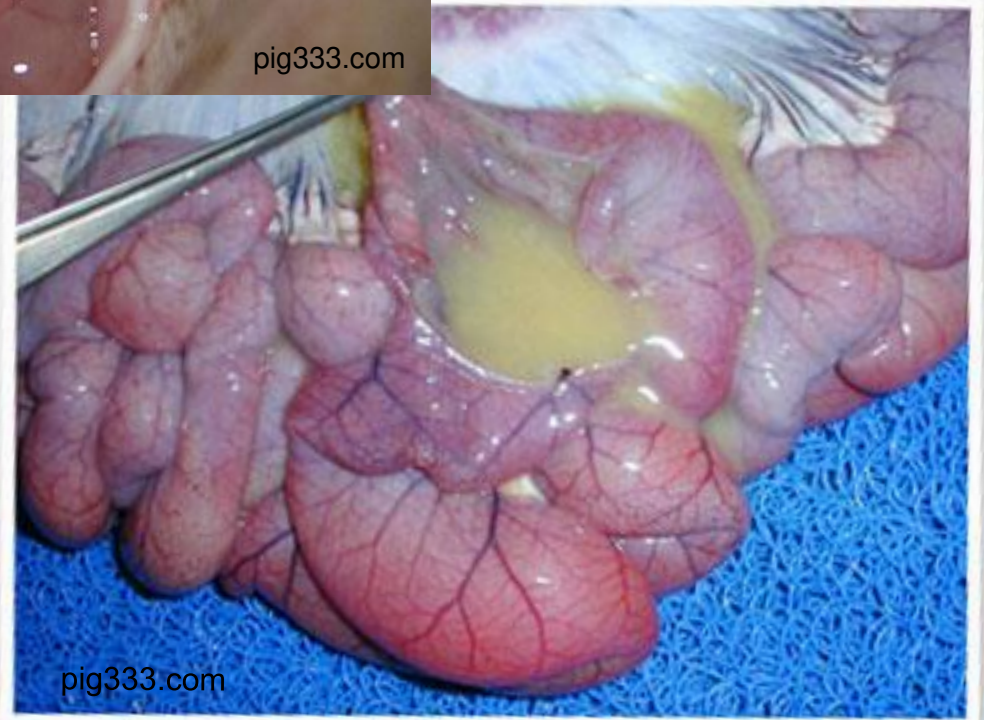


Agenti eziologici: PEDV e
Rotavirus

Campionamento:

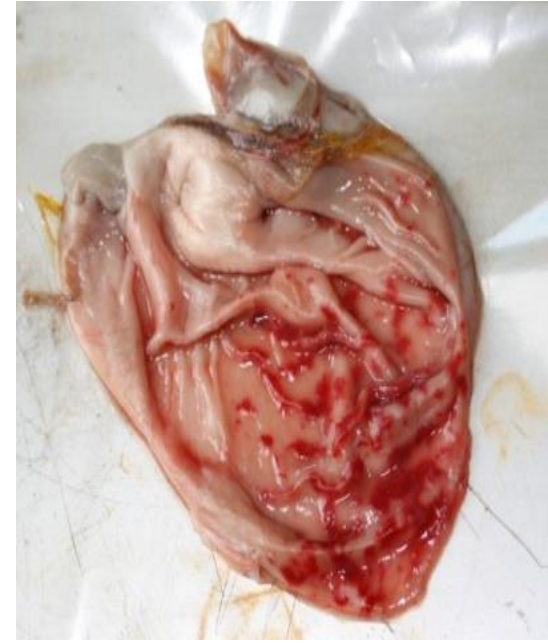
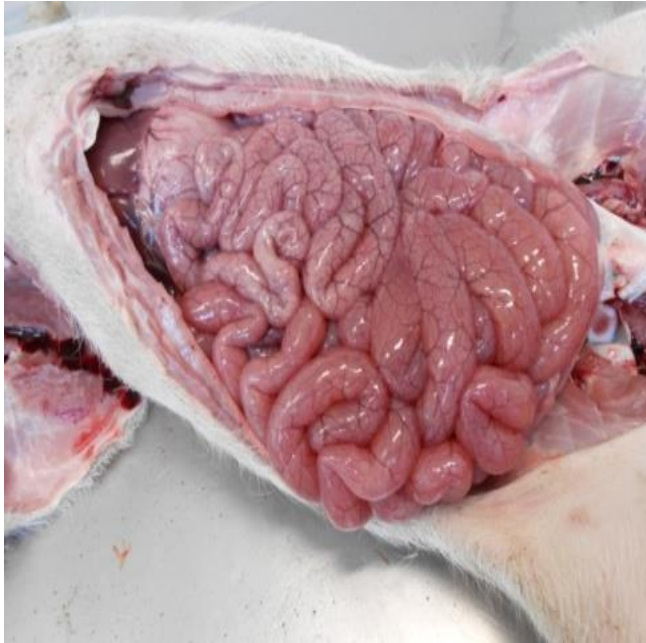
- piccolo intestino
 - feci
- (refrigerare o congelare)

Approccio diagnostico:
PCR + istopatologia



Country	Year	Diagnostic test	Age (days)	Symptoms	n=	% RVA positive	Reference
USA, Canada, Mexico	2009-2011	RT-qPCR	1-3	D	954	30%	[62]
			4-21	D	2144	46%	
			22-55	D	2538	84%	
			>55	D	1207	61%	
Argentina	1999	PAGE + antigen EIA	<45	ND	901	3.3%	[63]
Canada	2005-2007	RT-PCR	Slaughter	ND	96	8.3%	[64]
			>24	ND	50*	16.0%	
Denmark	2006-2007	EIA	1-28	D	308	10%	[65]
Germany	nd	EM	1-21	D	102	2.0%	[66]
Italy	2004-2006	RT-PCR	28-84	D	102	71.5	[67]
Ireland	2005-2007	RT-PCR	28-63	ND	292	6.5%	[68]
Slovenia	2004-2005	RT-PCR	1-21	D	6	50%	[69]
				ND	121	11.6%	
			22-70	D	14	35.7%	
			ND	133	25.6%		
			>70	D	13	46.2%	
Japan	2000-2002	PAGE	suckling weaning	ND	119	16.0%	[70]
				D	36	18 outbreaks	
South Korea	2006-2007	nested RT-PCR	3-70	D	475	38.3%	[71]
Thailand	2000-2001	antigen EIA	7-49	D	175	22.3%	[72]
Vietnam	2012	RT-qPCR	all ages	D	76	19.7%	[73]
				ND	654	24.9%	

Legend: D diarrheic; ND non-diarrheic; EIA enzyme immunoassay; EM electron microscopy; PAGE polyacrylamide gel electrophoresis; * mixed samples from multiple animals



Agente eziologico: *E.coli* enterotossigeni (ETEC)

Campionamento:

- piccolo intestino
- tamponi rettali



Approccio diagnostico: batteriologia quantitativa e determinazione del virotipo (istopatologia)



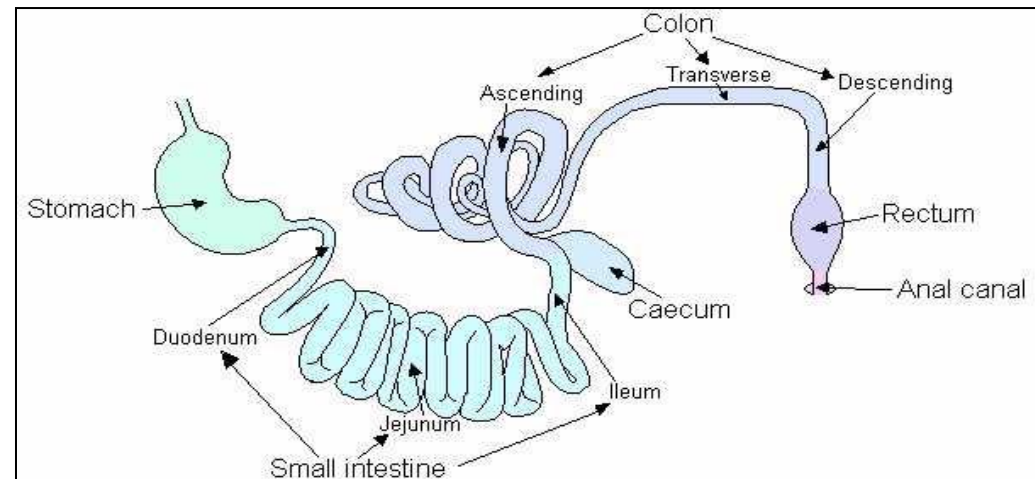


Il solo isolamento di *S. Typhimurium* non è sufficiente per una diagnosi di salmonellosi enterica ma dev'essere associato a lesioni compatibili

Agente eziologico: *Salmonella Typhimurium*

Campionamento: colon

Approccio diagnostico:
batteriologia e sierotipizzazione





The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine feces

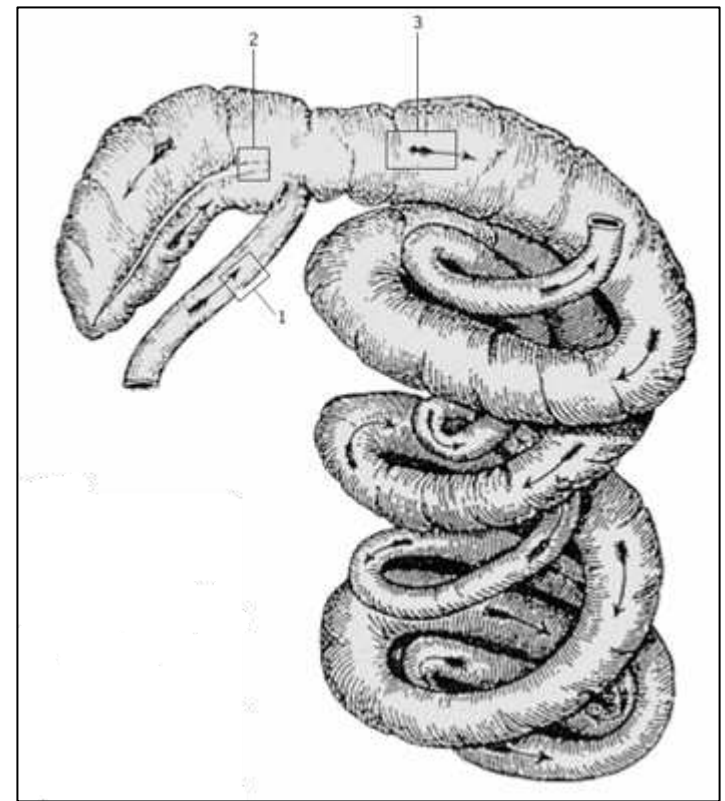
Julie A. Funk, Peter R. Davies, Monica A. Nichols

Campionando 126 animali, ottenendo campioni quantitativamente differenti varia la % di animali positivi.

- tamponi rettali: 1,6%
- 1 g: 4%
- 10 g: 9,5%
- 25 g: 14,3%



WWW.STUDYBLUE.COM



Agente eziologico: *Lawsonia intracellularis*

Campionamento: valvola ileo-ciecale, feci?

Approccio diagnostico: istopatologia e dimostrazione della presenza di *L.intracellularis* (PCR, **IHC** ecc.)



Gold standard



Animali nella **fase acuta** della malattia eliminano **10^8 - 10^9 microrg/gr di feci**

Suini **asintomatici** solo sporadicamente possono eliminare **$> 10^3$ microrg/gr di feci**

Agente eziologico: *Brachyspira hyodysenteriae*

Campionamento: Colon e cieco, feci

Approccio diagnostico: batteriologia e genotipizzazione (istopatologia)

Le feci **dopo 48 ore a temperatura di refrigerazione** mostrano una **riduzione** del numero di microorganismi da **100 a 1000 volte**.

Brachyspira hyodysenteriae detection in the large intestine of slaughtered pigs

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation
2018, Vol. 30(1) 56–63
© 2017 The Author(s)
Reprints and permissions:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1040638717722816
jvdi.sagepub.com

Friederike Zeeh,¹ Silvio De Luca, Pamela Nicholson, Niels Grützner, Christina Nathues, Vincent Perreten, Heiko Nathues

Table 2. Results of *Brachyspira* examination in 400 ingesta or mucosa samples and 200 fecal samples obtained from 200 slaughtered pigs.

Site	<i>Brachyspira</i> spp.						Total*
	BH	BP	BIM	BIN	BM	B. sp. (n.i.)	
Colon	11	2	1	19	7	2	42 (43.8)
Cecum	5	6	0	11	4	1	27 (28.1)
Rectum	7	1	2	14	2	1	27 (28.1)
Total†	23 (3.8)	9 (1.5)	3 (0.5)	44 (7.3)	13 (2.2)	4 (0.7)	96 (16.0)

BH = *Brachyspira hyodysenteriae*; BP = *B. pilosicoli*; BIM = *B. intermedia*; BIN = *B. innocens*; BM = *B. murdochii*; B. sp. (n.i.) = non-identifiable *Brachyspira* spp. Samples were submitted to selective culture followed by identification with PCR and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Ingesta or mucosa samples were obtained from the colon and cecum. Fecal samples were collected from the rectum.

* Numbers in parentheses are row percentages.

† Numbers in parentheses are column percentages.

16 suini, 7 allevamenti
Positività intra-allevamento:
• Campioni 3,3-26,7%
• Suini 10-50%



PATOLOGIA RESPIRATORIA E SISTEMICA



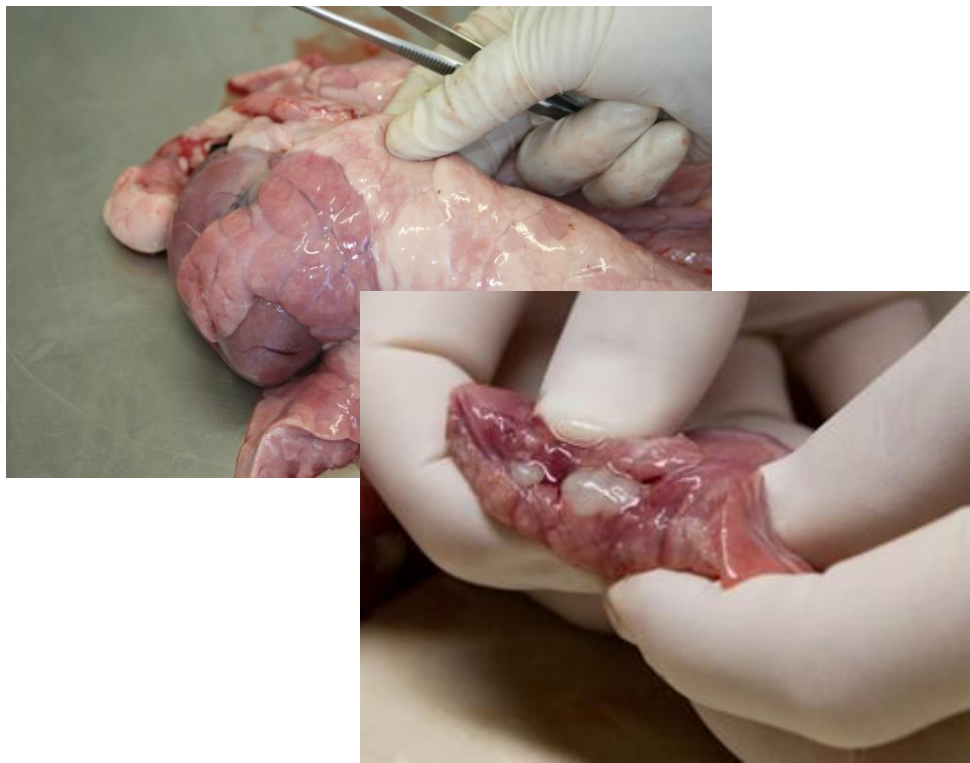
Agente eziologico: *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Campionamento:

- polmone
- tamponi da lesioni fibrino-necrotiche-emorragiche

Approccio diagnostico: esame colturale e siero/genotipizzazione degli isolati





Agente eziologico: *Mycoplasma hyopneumoniae*

Campionamento:

- polmone
- tampone tracheo-bronchiale
- tampone laringeo

Approccio diagnostico: PCR e istopatologia

- > **sensibilità:** polmone con lesioni (includere bronchi)
- Campioni prelevati a livello bronchiale e bronchiolare profondo
- **Sensibilità:** fluidi orali < tampone nasale < lavaggio tracheo-bronchiale < tampone laringeo (Pieters et al., 2017)
- **Maggiore sensibilità:** tampone tracheo-bronchiale e laringeo (Maes et al., 2018)



Molto importante la conservazione:

Tamponi in soluzione salina + glicerolo

Consegna entro 48 ore dal prelievo (+4°C)

Se consegna o esecuzione delle prove previste in tempi superiori conservare a -70°C (a -20°C non è stabile).

Agente eziologico: virus influenzali

Campionamento:

- polmone
- tampone nasale

Approccio diagnostico: PCR, isolamento e istopatologia

Fluidi orali:

- meno adatti per l'isolamento virale
- Virus rilevabile per piu' tempo rispetto ai tamponi nasali (Turlewicz-Podbielska et al., 2020)



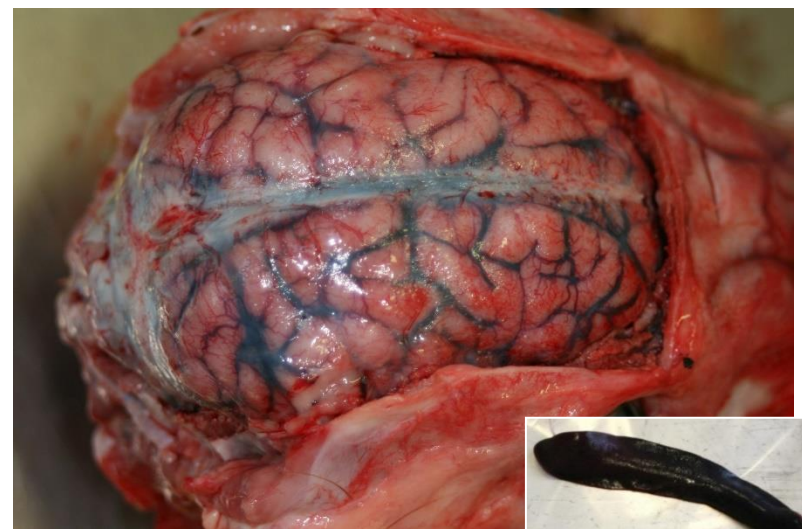
Agente eziologico: *H.parasuis*

Campionamento:

- suini eutanizzati
- tampone pericardico
- liquido articolare
- versamento addominale
- cervello/tampone cerebrale



Approccio diagnostico: isolamento (PCR) + sierotipizzazione
Evitare il congelamento



Agente eziologico: *Streptococcus suis*

Campionamento:

- carcassa
- tampone cerebrale
- rene
- milza
- ago-aspirati articolari

- conferimenti e isolamenti multipli
- campioni da considerare a scopo diagnostico e per isolamento propedeutico alla produzione di vaccini stabulogeni

Approccio diagnostico: Esame colturale e genotipizzazione degli isolati



Grazie per l'attenzione

andrea.luppi@izsler.it