

Centro di referenza nazionale per le brucellosi

Applicazione dei piani di eradicazione alla luce della nuova norma comunitaria (Reg 429/2016 UE e Reg.689/2020), con particolare riferimento all'interpretazione dei test diagnostici.

Manuela Tittarelli
10 novembre 2023



Centro di referenza nazionale e Laboratorio Nazionale di Riferimento per le brucellosi.

Il Ministero della Salute, con Decreto 4 ottobre 1999 (G.U.R.I. n°300 del 23 dicembre 1999), ha attivato il Centro di referenza nazionale per le brucellosi presso la sede centrale dell'IZS dell'Abruzzo e del Molise - Teramo.

TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Attività principali del CRN



TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Abrogazione

REGOLAMENTO (CE) N. 535/2002 DELLA COMMISSIONE del 21 marzo 2002 che modificato legato la direttiva 64/432/CEE la decisione 2000/330/CE

- ALLEGATO
- 4. LABORATO MAZIONALI MIFERIMENTO
- 4.1. Compiti e responsabilità
- 4.2. Elenco dei laboratori nazionali di riferimento



Reg. 625/2017: *Articolo* 37 **Designazione dei laboratori ufficiali**

1.Le autorità competenti designano laboratori ufficiali cui far effettuare analisi, prove e diagnosi di laboratorio a partire dai campioni prelevati durante i controlli ufficiali e le altre attività ufficiali nello Stato membro nel cui territorio operano tali autorità competenti o in un altro Stato membro o in un paese terzo che è parte contraente dell'Accordo sullo Spazio economico europeo.

TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Reg. 625/2017: Articolo 101 Responsabilità e compiti dei laboratori nazionali di riferimento

- 1.I laboratori nazionali di riferimento, nell'area di loro competenza:
 - collaborano con i laboratori di riferimento dell'Unione europea e partecipano a corsi di formazione e a prove comparative interlaboratorio da essi organizzati;
 - coordinano le attività dei laboratori ufficiali designati ai sensi dell'articolo 37, paragrafo 1, al fine di armonizzare e migliorare i metodi di analisi, prova o diagnosi di laboratorio e il loro impiego;
 - se del caso, organizzano prove comparative interlaboratorio o prove valutative tra laboratori ufficiali, assicurano un debito follow-up di tali prove e comunicano alle autorità competenti i relativi risultati e follow-up;
 - assicurano la trasmissione alle autorità competenti e ai laboratori ufficiali delle informazioni fornite dai laboratori di riferimento dell'Unione europea;
 - offrono, nell'ambito della loro missione, assistenza scientifica e tecnica alle autorità competenti per l'attuazione di PCNP di cui all'articolo 109 e di programmi di controllo coordinati adottati a norma dell'articolo 112;
 - se del caso, convalidano i reagenti e i lotti di reagenti, istituiscono e mantengono elenchi aggiornati delle sostanze e dei reagenti di riferimento disponibili e dei fabbricanti e fornitori di tali sostanze e reagenti;
 - se necessario svolgono corsi di formazione per il personale dei laboratori ufficiali designati ai sensi dell'articolo 37, paragrafo 1; e
 - assistono attivamente gli Stati membri che li hanno designati nella diagnosi di focolai di malattie di
 origine alimentare, zoonotica o animale, o nella diagnosi di organismi nocivi per le piante e in caso di non
 conformità di partite, effettuando diagnosi di conferma e studi di caratterizzazione, epizooziologici o
 tassonomici su agenti patogeni isolati o esemplari di organismi nocivi.

TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 9 marzo 2016

Il motto "Prevenire è meglio che curare", come declinato dall'Unione, riunisce in un unico e robusto contesto di legge tutti i provvedimenti relativi alle principali malattie infettive, ponendo l'accento sull'analisi del rischio e sul principio di una salute unica, comune a uomo, animali ed ecosistema.

(il c.d. principio "One Health").



Regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 9 marzo 2016

Relativo alle malattie animali trasmissibili, modifica e abroga taluni atti in materia di sanità animale. Si applica dal 21 aprile 2021.

Il Regolamento implementa strategie in sanità animale con cui l'Unione Europea, tra le tutele garantite ai consumatori, ha inserito, tra le altre cose, l'applicazione del principio di precauzione nella gestione dei rischi.



Regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 9 marzo 2016

Nel Regolamento la brucellosi è categorizzata alla lettera B, vale a dire fra le malattie di cui gli stati membri devono garantire <u>l'eradicazione</u>, laddove, con detto termine deve intendersi la totale assenza di malattia nel territorio di riferimento, raggiungendosi, per tale via, lo status di indenne dalla stessa, da applicare ai seguenti animali: bisonti (Bison spp.), bovini (Bos spp.), bufali (Bubalus spp.), pecore (Ovis spp.), e capre (Capra spp.).



Articolo 17 Laboratori di sanità animale Reg. EU 429/2016

I laboratori ufficiali per la sanità animale, costituiti dai laboratori di riferimento dell'Unione, dai laboratori nazionali di riferimento e dai laboratori ufficiali per la sanità animale, nell'esercizio dei loro compiti e responsabilità, cooperano nell'ambito di una rete dell'Unione di laboratori per la sanità animale.



Obiettivo dell'EU e Ministero della Salute

La normativa vigente conferma come prioritario l'obiettivo di eradicare la Brucellosi dal territorio europeo e l'obiettivo è esteso a tutti gli stati membri.

Eradicare la malattia è irrinunciabile per lo Stato e la tutela della salute pubblica e animale è preminente rispetto alla tutela privatistica dell'interesse economico del singolo allevatore.



DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE

"G. CAPORALE"

Regolamento delegato (UE) 2020/689 della commissione del 17 dicembre 2019 che integra il regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo

Il Regolamento Delegato indica <u>le modalità</u> (<u>come</u>) attraverso le quali conseguire la qualifica di territorio "indenne".

Si individuano e specificano le misure cui attenersi per il mantenimento dello stato di indenne dalla malattia (nord Italia) e anche quelle da porre in essere nei territori dove è necessario ottenere la qualifica di indenne (sud Italia).



Allegato IV Reg.Del. UE 689 /2020

concessione dello status di indenne

Lo status di indenne da infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis e B. suis* senza vaccinazione può essere concesso a uno stabilimento che detiene bovini, ovini o caprini solo se:

- a) negli ultimi 12 mesi non sono stati registrati casi confermati di infezione da Brucella abortus, B. melitensis e B. suis nei bovini, negli ovini o nei caprini detenuti nello stabilimento;
- b) negli ultimi tre anni nessuno dei bovini, degli ovini o dei caprini nello stabilimento è stato vaccinato contro l'infezione da Brucella abortus, B. melitensis e B. suis;
- c) i bovini interi di età superiore a 12 mesi e gli ovini o i caprini interi di età superiore a sei mesi presenti nello stabilimento al momento del campionamento sono risultati negativi a prove sierologiche effettuate in due occasioni



Allegato IV Reg.Del. UE 689 /2020

concessione

come segue:

- i) la prima prova deve essere effettuata su campioni prelevati non prima di tre mesi dopo l'allontanamento dell'ultimo caso confermato e dell'ultimo animale risultato positivo a una prova immunologica;
- ii) la seconda prova deve essere effettuata su campioni prelevati non prima di sei mesi ed entro 12 mesi dalla data del campionamento di cui al punto i);
- d) gli animali che presentano segni clinici compatibili con l'infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis e B. suis*, quali aborti, sono stati sottoposti a indagini dall'esito negativo;



Allegato IV Reg.Del. UE 689 /2020

concessione

- e) dall'inizio del campionamento di cui alla lettera c), punto i) (ovvero delle 2 prove a 3 e 6 mesi di distanza, entro 12 mesi), tutti i bovini, gli ovini o i caprini introdotti nello stabilimento provengono da stabilimenti indenni da infezione da Brucella abortus, B. melitensis e B. suis senza vaccinazione, o da stabilimenti indenni con vaccinazione e non sono stati vaccinati contro l'infezione da Brucella abortus, B. melitensis e B. suis negli ultimi tre anni, e:
- i) provengono da uno Stato membro o da una zona indenni da infezione da *Brucella abortus*, *B. melitensis e B. suis* per quanto riguarda la pertinente popolazione animale;



Allegato IV Reg.Del. UE 689 /2020

concessione

- ii) sono bovini interi di età superiore a 12 mesi oppure ovini o caprini interi di età superiore a sei mesi e devono essere risultati negativi a una prova sierologica effettuata su un campione prelevato:
- nei 30 giorni precedenti la loro introduzione nello stabilimento, o
- nei 30 giorni successivi alla loro introduzione, purché siano stati tenuti in isolamento durante tale periodo;
- iii) sono capi femmine nel periodo del post-parto, tenute in isolamento dalla loro introduzione nello stabilimento finché non siano risultate negative a una prova sierologica effettuata su un campione prelevato non prima di 30 giorni dopo il parto; e



Regolamento (UE) 2020/689

concessione

- i controlli sono cadenzati semestralmente e concernono l'intero compendio di capi allevati, bovini, bufalini e ovi caprini.
- Per raggiungere lo status di indenne è necessario che, negli ultimi tre anni, almeno il 99,8% degli stabilimenti ed almeno il 99,9 % della popolazione animale considerata, abbia mantenuto lo status di indenne da infezione da Brucella abortus, B. melitensis e B. suis.



Allegato IV Reg.Del. UE 689 /20 mantenimento status

Può essere mantenuto solo se:

- a) continuano a essere soddisfatte le prescrizioni di cui alla sezione 1, punto 1, lettere a), b), d), e) e f); e
- b) sono effettuate, con esito negativo, prove sierologiche su campioni prelevati:
- i) da tutti i bovini interi di età superiore a 12 mesi e da tutti gli ovini o i caprini interi di età superiore a sei mesi, a intervalli adeguati non superiori a 12 mesi determinati dall'autorità competente tenendo conto del tipo di produzione, della situazione della malattia e dei fattori di rischio individuati; o



Allegato IV Reg.Del. UE 689 /20 mantenimento status

ii) da bovini interi di età superiore a 12 mesi e da ovini o da caprini interi di età superiore a sei mesi detenuti in stabilimenti situati in uno Stato membro o in una zona indenni da infezione da Brucella abortus, B. melitensis e B. suis, conformemente a un regime di prove istituito dall'autorità competente tenendo conto del tipo di produzione e dei fattori di rischio individuati.

IS TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Mantenimento dello status

La responsabilità primaria per il conseguimento e il mantenimento dello status di indenne da malattia dello stabilimento incombe all'operatore in quanto destinatario principale dei benefici connessi allo status di indenne da malattia. L'operatore dovrebbe pertanto osservare determinati obblighi per poter conseguire e mantenere lo status di indenne da malattia.



Regolamento (UE) 2020/689 autocontrollo

Tramite l'attività di autocontrollo, l'operatore verifica, sotto la propria responsabilità:

- a) la salute e il comportamento degli animali;
- b) le eventuali modifiche dei parametri di produzione normali nello stabilimento, negli animali o nel materiale germinale, che possono far sorgere il sospetto di essere causate da una malattia di cui al presente decreto;
- c) i sintomi clinici riferibili a BRC;
- d) l'isolamento dei capi di nuova introduzione fino al termine dei controlli



Regolamento (UE) 2020/689 autocontrollo

 Allevatore può richiedere esami sul latte, aborti e tamponi in autocontrollo in caso di sospetto della malattia, per il tramite del veterinario aziendale, rivolgendosi all'IZS competente per territorio. Le spese degli esami sono a carico dell'operatore.

IS TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Regolamento (UE) 2020/689

- è basato su specifiche prove sierologiche la cui applicazione si articola in funzione dello status sanitario del territorio oggetto di controllo ufficiale.
- Nel caso dei <u>territori non indenni</u> da brucellosi, le attività di controllo sierologico sono da effettuarsi, <u>su tutti</u> i bovini, i bufalini e gli ovi-caprini di età superiore ad un anno, su base semestrale.

IS TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Zone indenni da almeno due anni

A partire dal terzo anno dall'ottenimento dello status di indenne per BRC, su tutti gli stabilimenti che detengono bovini e ovi caprini, la regione o provincia autonoma definisce un programma che preveda:

- una sorveglianza basata sui rischi, che permetta la rilevazione precoce di eventuali stabilimenti infetti da BRC e LEB;
- nelle aziende a rischio individuate, sono sottoposti a controllo sierologico tutti i bovini di età superiore a 24 mesi e gli ovi caprini di età superiore a 12 mesi.

La regione o provincia autonoma inserisce l'elenco delle aziende individuate nella programmazione nel portale VETINFO, entro il primo bimestre dell'anno di riferimento.

Regolamento delegato UE 2020/689 della commissione

3.6.2020

| 11 |

ALLEGATO III

METODI DIAGNOSTICI PER LA CONCESSIONE E IL MANTENIMENTO DELLO STATUS DI INDENNE DA MALATTIA PER DETERMINATE MALATTIE DEGLI ANIMALI TERRESTRI

Sezione 1

Infezione da Brucella abortus, B. melitensis E B. suis

- 1. Prove sierologiche:
 - a) prove per campioni di sangue:
 - i) prove con antigene brucella tamponato;
 - ii) prova di fissazione del complemento (CFT);
 - iii) ELISA indiretto (I-ELISA);
 - iv) metodo di fluorescenza polarizzata (FPA);
 - v) ELISA competitivo (C-ELISA);
 - prove per campioni di latte:
 - i) ring test (MRT);
 - ii) I-ELISA.

IS TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Metodi ufficiali

articolo 6 Reg. 689/2020

- a) Metodi pertinenti sviluppati o raccomandati dai laboratori di riferimento dell'Unione europea e convalidati in base a protocolli scientifici accettati internazionalmente;
- b) in assenza delle norme o dei protocolli opportuni di cui alla lettera a), metodi conformi alle norme pertinenti definite a livello nazionale o, se tali norme non esistono, metodi pertinenti sviluppati o raccomandati dai laboratori di riferimento dell'Unione europea e convalidati in base a protocolli scientifici accettati internazionalmente

IS TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Metodi ufficiali

- c) metodi pertinenti sviluppati e convalidati da studi interlaboratorio o intralaboratorio sulla convalida dei metodi in base a protocolli scientifici accettati internazionalmente.
- d) Qualora vi sia urgenza di eseguire analisi, prove o diagnosi di laboratorio e non esista alcuno dei metodi di cui ai paragrafi a) e b) del presente articolo, il pertinente laboratorio nazionale di riferimento oppure, se non esiste un laboratorio nazionale di riferimento, qualsiasi altro laboratorio designato in conformità dell'articolo 37, paragrafo 1, può utilizzare metodi diversi da quelli di cui ai paragrafi 1 e 2 del presente articolo in attesa della convalida di un metodo appropriato in base a protocolli scientifici accettati internazionalmente

JS TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Validazione di un metodo

"Validation is a process that determines the fitness of an assay, which has been properly developed, optimised and standardised, for an intended purpose."

La validazione è un processo che determina la valenza (bontà) di un metodo che è stato adeguatamente sviluppato, ottimizzato e standardizzato per un obiettivo predeterminato.

JS TERAMO

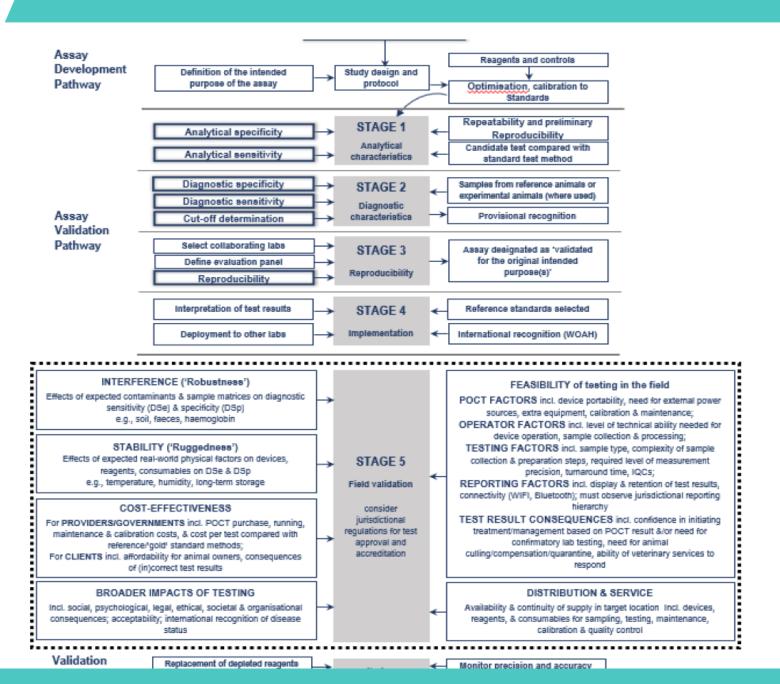
ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Validazione

Un metodo di prova indiretto (metodo sierologico) può essere considerato validato, quando è in grado di fornire risultati che permettono di identificare lo stato sanitario dell'animale, attraverso la presenza di anticorpi, con un predeterminato livello di fiducia (no certezza al 100%, ma misura dell'incertezza).

IS TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"





Caratteristiche delle performance diagnostiche

Nessun metodo sierologico è appropriato da solo in tutte le situazioni epidemiologiche e in tutte le specie. Tutti i metodi hanno dei limiti soprattutto per l'analisi individuale degli animali.

Sono possibili anche reazioni false positive dovute a batteri cross-reattivi che possono compromettere l'accuratezza dei risultati.



Sensibilità diagnostica

Proporzione di campioni positivi al test che sappiamo essere veramente infetti.

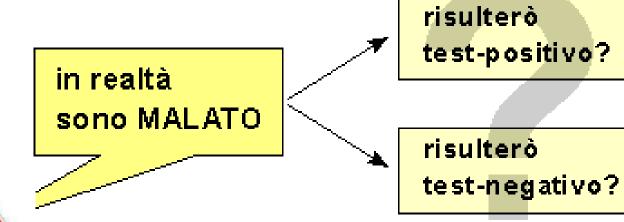
Si ottiene saggiando un pannello di sieri proveniente da animali malati.

Il n° di animali da saggiare dipende dal livello di confidenza che si vuole ottenere.

TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Sensibilità



IS TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Sensibilità

SENSIBILITA'

- probabilità che un malato risulti test-positivo
- proporzione dei malati
 che risultano test-positivi



Specificità diagnostica

Rappresenta la proporzione di campioni negativi al test provenienti da animali sicuramente non infetti.

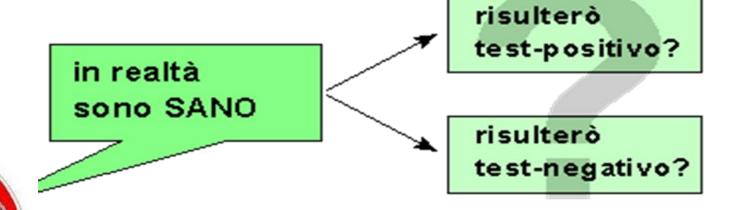
Si ottiene saggiando un pannello di animali sicuramente sani e se possibile cross-reattivi con il patogeno oggetto dello studio.

TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

NO

Specificità



ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Specificità

SPECIFICITA'

- probabilità che un sano risulti test-negativo
- proporzione dei sani
 che risultano test-negativi

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Method	Purpose									
	Population freedom from infection	Individual animal freedom from infection ^a	Contribute to eradication policies ^b	Confirmation of suspect or clinical cases ^e	Herd/flock prevalence of infection – surveillance	Immune status in individual animals or populations post- vaccination				
		Identi	fication of the ag	ent						
Staining methods	-	-	_	+	_	-				
Culture	-	-	_	+++	_	-				
PCR ^d	-	-	_	+/++	-	-				
		Detectio	n of immune res	ponse						
BBAT (RBT or BPAT)	***	**	***	*	***	-				
FPA	++	**	+	**	++	-				
CFT	++	**	+++	**	***	-				
I-ELISA	+++	**	+++	**	+++	-				
C-ELISA	++	+	+	+	++	-				
BST	++	-	+	+++	++	-				
SAT	++	+	+	_	+	-				
NH and cytosol protein-based tests*	_	-	+	++	-	-				
Bulk milk tests' Milk I-ELISA or Milk ring-test	***	-	***	+	***	-				

Key: *** = recommended for this purpose; ** recommended but has limitations;

+ = suitable in very limited circumstances; - = not appropriate for this purpose.

PCR = polymerase chain reaction; BBAT = buffered Brucella antigen tests (i.e. RBT [rose bengal test] and BPAT [buffered plate agglutination test]); FPA = fluorescence polarisation assay; CFT = complement fixation test; I- or C-ELISA = indirect/competitive enzyme-linked immunosorbent assay; BST = brucellin skin test; SAT = serum agglutination test; NH = native hapten

*This applies only to herds/flocks, countries or zones free from infection with Brucella.
*To increase the efficiency of eradication policies in infected herds/flocks, it is recommended to associate tests in parallel so as to increase the sensitivity of the diagnosis, i.e. two serological tests at least, e.g. BBAT or FPA and CFT or I-ELISA. The sensitivity is further increased by parallel testing by both serology and BST.

In low-prevalence or almost-free zones, the predictive value of positive results to serological tests may be very low. In such situations, agent identification is usually needed to confirm clinical cases.

In infected herds/flocks, a positive result to any serological test may be considered as confirmation of a clinical case. Any reactor in any serological test should be considered to be infected even in the absence of clinical signs.

to low prescrience or almost tree zones, singleton serological reactors may be confirmed by culture (or PCP) or BST.

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Key: +++ = recommended for this purpose; ++ recommended but has limitations;

+ = suitable in very limited circumstances; - = not appropriate for this purpose.

PCR = polymerase chain reaction; BBAT = buffered *Brucella* antigen tests (i.e. RBT [rose bengal test] and BPAT [buffered plate agglutination test]); FPA = fluorescence polarisation assay; CFT = complement fixation test; I- or C-ELISA = indirect/competitive enzyme-linked immunosorbent assay; BST = brucellin skin test; SAT = serum agglutination test; NH = native hapten

aThis applies only to herds/flocks, countries or zones free from infection with *Brucella*.

^bTo increase the efficiency of eradication policies in infected herds/flocks, it is recommended to associate tests in parallel so as to increase the sensitivity of the diagnosis, i.e. two serological tests at least, e.g. BBAT or FPA and CFT or I-ELISA. The sensitivity is further increased by parallel testing by both serology and BST.

°In low-prevalence or almost-free zones, the predictive value of positive results to serological tests may be very low. In such situations, agent identification is usually needed to confirm clinical cases.

In infected herds/flocks, a positive result to any serological test may be considered as confirmation of a clinical case. Any reactor in any serological test should be considered to be infected even in the absence of clinical signs.

In low-prevalence or almost-free zones, singleton serological reactors may be confirmed by culture (or PCR) or BST.

In free countries or zones, suspect animals are those positive to both a screening and a confirmatory serological test (tests in series) and may be confirmed by culture (or PCR) and/or BST.

^dFalse-positive results may occur.

eln zones where subcutaneous S19 or Rev.1 vaccination is practised, this test may help in differentiating antibodies due to vaccination from those due to infection.

Dairy cattle only.

All cases of abortion as well as orchitis in cattle, sheep and goats, and pigs, should be considered as suspected brucellosis and should be investigated through the herd/flock history and submission of specimens for laboratory testing. The clinical signs are not pathognomonic and unequivocal diagnosis of *Brucella* infections can be made only by the isolation and identification of *Brucella*, but in situations where bacteriological examination is not practicable, diagnosis must be based on molecular or immunological methods.



Definizione di caso Reg.2020/689 Articolo 9

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE

DELL'ABRUZZ E DEL MOLIS "G. CAPORAL

Articolo 9

Definizioni di caso

- L'autorità competente classifica un animale o un gruppo di animali come un caso sospetto di una malattia elencata o di una malattia emergente quando:
- a) gli esami clinici, post mortem o di laboratorio concludono che i segni clinici, le lesioni post mortem o i risultati istologici sono indicativi della presenza di tale malattia;
- i risultati ottenuti utilizzando un metodo diagnostico indicano la probabile presenza della malattia in un campione prelevato da un animale o da un gruppo di animali; oppure
- è stata stabilita una connessione epidemiologica con un caso confermato.

- L'autorità competente classifica un animale o un gruppo di animali come un caso confermato di una malattia elencata o di una malattia emergente quando:
- a) in un campione prelevato da un animale o da un gruppo di animali è stato isolato l'agente patogeno, ad eccezione dei ceppi vaccinali;
- in un campione prelevato da un animale o da un gruppo di animali che presentano segni clinici compatibili con la malattia o una connessione epidemiologica con un caso sospetto o confermato è stato individuato un antigene o un acido nucleico specifico dell'agente patogeno, non derivante dalla vaccinazione; oppure
- c) in un campione prelevato da un animale o da un gruppo di animali che presentano segni clinici compatibili con la malattia o una connessione epidemiologica con un caso sospetto o confermato è stato ottenuto un risultato positivo, non derivante dalla vaccinazione, utilizzando un metodo diagnostico indiretto.
- Le definizioni specifiche per malattia di caso sospetto e di caso confermato delle malattie elencate sono stabilite nell'allegato I per gli animali terrestri e nell'allegato VI, parte II, capitoli da 1 a 6, sezione 5, punto 3, per gli animali acquatici.



Alcune azioni da intraprendere su sospetto

In caso di focolaio sospetto registrare l'evento in SIMAN e avviare entro 2 giorni dall'inserimento, l'indagine epidemiologica (IE), possibilmente avvalendosi del supporto dell'Osservatorio Epidemiologico Regionale o dell'IZS competente per territorio, utilizzando il modello elaborato dal SIMAN; sia in caso di focolaio sospetto o confermato, impartire prescrizioni e/o predisporre gli atti volti all'estinzione dello stesso, nonché ad impedire la trasmissione degli agenti patogeni ad altri animali e all'uomo; dare indicazioni all'operatore su come gestire il latte degli animali infetti e di quelli negativi.

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Table 1. Determinants of an antibody assay's fitness for its intended purpose

	Determinants of fitness for purpose									
Assay characteristics	1*		2*	3*	4*	5*	6*			
	а	b								
Diagnostic sensitivity (DSe)	+++	+++	+++	++-	+++	+	+			
Diagnostic specificity (DSp)	+	+	+	+	+++	+	+++			
Positive predictive value (PPV)	+	+	+	+	+++	+	+++			
Negative predictive value (NPV)	+++	+++	+++	+++	+++	+	+			
Throughput capacity	+	+++	++	+	-	++	++			
Turn-around time of test	+	+	+	+	+++	-	+			
QA capability	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
Reproducibility	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
Repeatability	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			

Other characteristics such as the technical sophistication of the assay, and the skill required for interpretation will be related to the disease or infection under investigation.

Basic purposes for which an assay may be deemed fit:

- 1. Contribute to the demonstration of freedom from infection in a defined population.
- 2. Certify freedom from infection or presence of the agent in individual animals or products for trade/movement purposes
- 3. Contribute to the eradication of disease or elimination of infection from defined populations
- 4. Confirmatory diagnosis of clinical cases (includes confirmation of positive screening test)
- 5. Estimate prevalence of infection or exposure to facilitate risk analysis
- Determine immune status in individual animals or populations (post-vaccination)

JS TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Valore predittivo positivo

Il valore predittivo positivo VPP di un test è la probabilità che un risultato positivo, in una certa popolazione, corrisponda alla reale presenza della malattia, e quindi a una vera positività.

$$VPP = VP/(VP+FP)$$

corrisponde alla proporzione degli animali positivi che sono effettivamente malati

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"





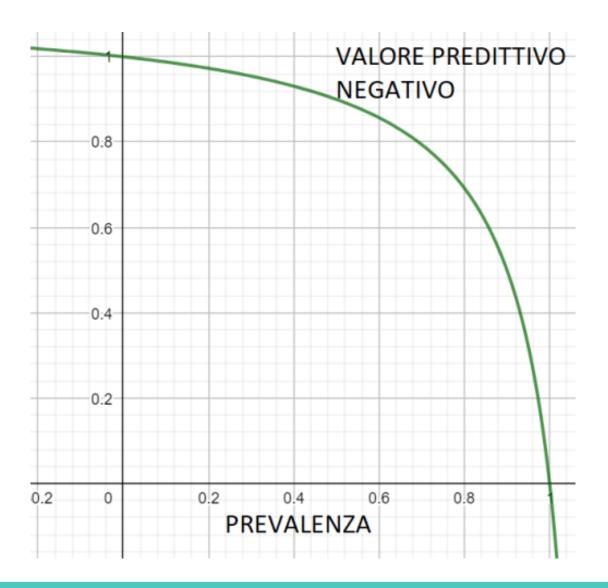
Valore predittivo negativo

Il valore predittivo negativo VPN di un test è la probabilità che un risultato negativo del test in una data popolazione corrisponda a una vera negatività.

$$VPN = VN/(VN+FN)$$

corrisponde alla proporzione degli animali negativi che sono effettivamente sani.

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"



JS TERAMO

Se e Sp SAR

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE

"G. CAPORALE"

Sensibilità (DSe) e Specificità (DSp) diagnostica

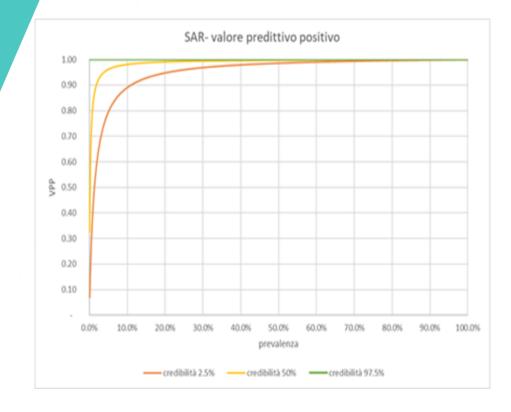
EFSA, 2006. Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) on a request from the Commission concerning Brucellosis Diagnostic Methods for Bovines, Sheep, and Goats. The EFSA Journal (2006) 432, 1-44.

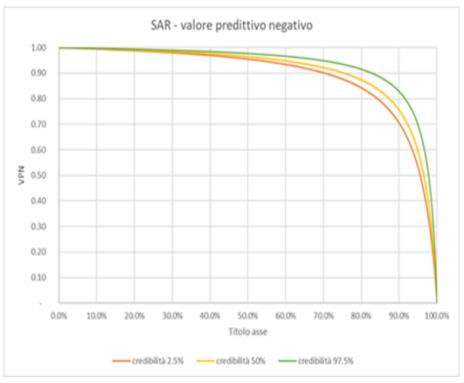
DSe Bovini e bufalini: 98, % (96,8 - 99,1 %) (I.C. 95%); Dsp 99.8% (99.7 - 99.8%) (I.C. 95%)

DSe Ovini e caprini: 92,5 % (91,6 - 93,4 %) (I.C. 95%); Dsp 99.9% (99.8 -100%) (I.C. 95%)

VPP e VPN SAR

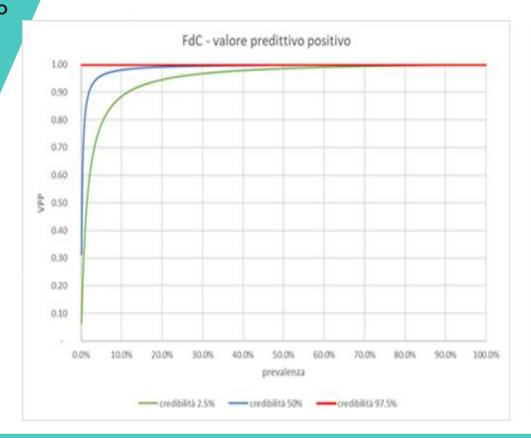
ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

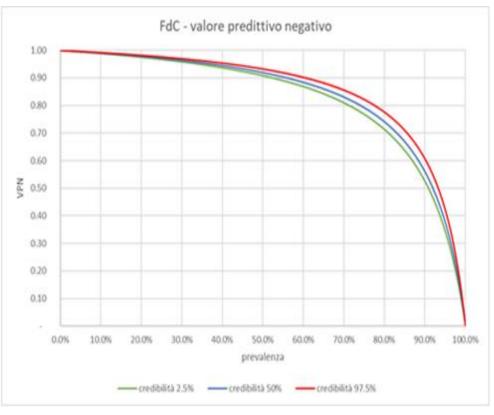




VPP e VPN FDC

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"







Diagnosi della brucellosi

E'una diagnosi epidemiologica che valuta la probabilità che in un allevamento gli animali siano infetti, sani o malati.

Quindi il giudizio diagnostico deve tener conto di tutti gli elementi relativi all'allevamento (Stato sanitario del territorio, epidemiologia dell'infezione) e delle performance delle prove impiegate.

SOP brucellosis EURL



EU Reference Laboratory for Brucellosis



TERA

ISTITUTO
ZOOPROFILATI
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Brucellosis
Complement Fixation Test
(EU RL cold and warm incubation)
Standard Operating Procedure

1 Scope

The present document describes a standard technique aiming at detecting antibodies specific of smooth Brucella species (especially B. abortus, B. melitensis and B. suis) by the complement fixation test in animal sera (ruminants, equidae, suidae, camelidae and carnivores, both wild and domestic, in particular).



EU Reference Laboratory for Brucellosis

2 Normative references

- Brucellosis (Brucella abortus, B. melitensis and B. suis) (infection with B. abortus, B. melitensis and B. suis), In: OIE Terrestrial Manual, 2018, Chapter 3.1.4., Paris. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health standards/tahm/3.01.04 BRUCELLOSIS.pdf
- Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council of 15 March 2017 on
 official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law,
 rules on animal health and welfare, plant health and plant protection products. Official Journal of the
 European Union 17.03.2017, L95/1-142. Text with EEA relevance. ELI:
 http://data.europa.eu/eli/reg/2017/625/oj
- Regulation (EU) 2020/689 of 17 December 2019 supplementing Regulation (EU) 2016/429 of the
 European Parliament and of the Council as regards rules for surveillance, eradication programmes,
 and disease-free status for certain listed and emerging diseases. ELI:
 http://data.europa.eu/eli/req_del/2020/689/oj
- ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- French Standard NF U47-004 Animal health analysis methods Detection of antibodies against Brucellosis by the Complement Fixation Test, April 2009, AFNOR, France.

Brucellosis
Rose Bengal Test
Standard Operating Procedure

Page 1/7

Brucellosis EURL Rose Bengal Test – SOP

Revision 1 July 2021

 Revision 11

 Brucellosis EU-RL CFT SOP
 Page 1/19
 October 2021



"G. CAPORALE"

Riferimento nei rapporti di prova

 ANSES EU RL Brucellosis Rose Bengal Test – SOP Rev 1 2021

ANSES EU RL Brucellosis CFT – SOP Rev 11 2021

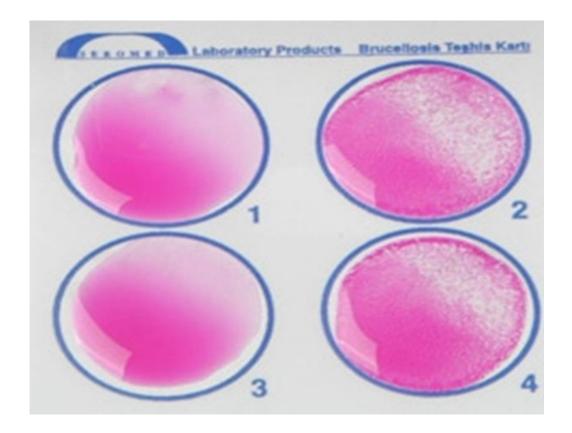
JS TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

SAR

- Test di screening ufficiale
- Semplice, economico e rapido
- Antigene prodotto con ceppo standard di *B. abortus* S99 colorato e sospeso in tampone acido e titolato con il siero internazionale standard.
- Individua IgM e IgG mediante agglutinazione

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"



ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Campo di applicazione SAR

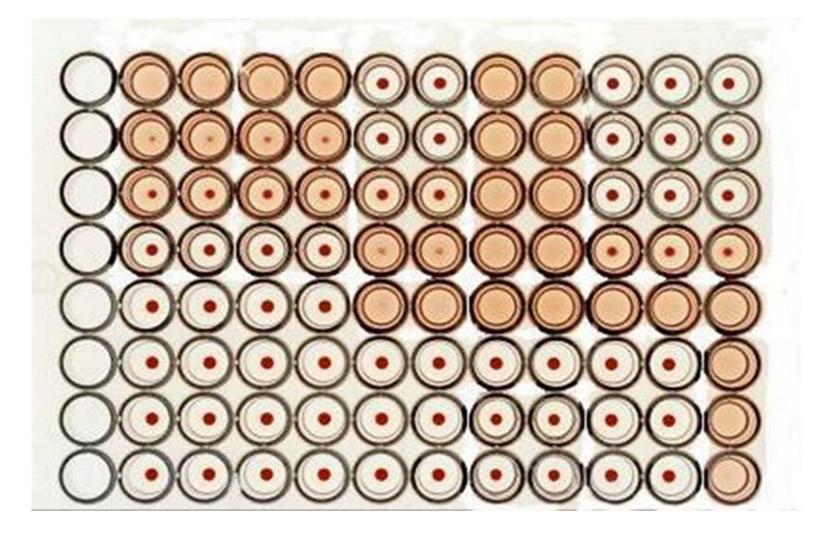
La prova di sieroagglutinazione rapida è da eseguirsi, come metodo di screening, su tutti i campioni ematici prelevati, per la diagnosi sierologica della brucellosi bovina, bufalina ed ovi-caprina. Per la sua elevata sensibilità, può trovare impiego in ogni situazione epidemiologica come test di screening.



Fissazione del complemento

- Prova ufficiale individuale
- Specifica e sensibile
- Individua IgG₁ e IgM
- Antigene prodotto con ceppo standard di *B. abortus* S99 e titolato contro il siero internazionale standard

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"



ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Campo di applicazione FDC

La prova di fissazione del complemento (FDC) è dotata di ottima sensibilità e specificità, e, pertanto, può essere considerata il saggio di base e di riferimento. La prova FDC deve essere eseguita su tutti i campioni positivi alla SAR e su tutti gli animali dell'allevamento nel caso di allevamenti sospetti. La prova FDC è un metodo di tipo quantitativo; il risultato è espresso in UI/ml fissanti il complemento, ottenuti utilizzando la tabella di conversione del titolo in valori numerici descritti allegata alla procedura operativa fornita dal laboratorio nazionale di riferimento. La prova della FdC è considerata positiva ad un titolo uguale o maggiore a 20 UIFC/ml.

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

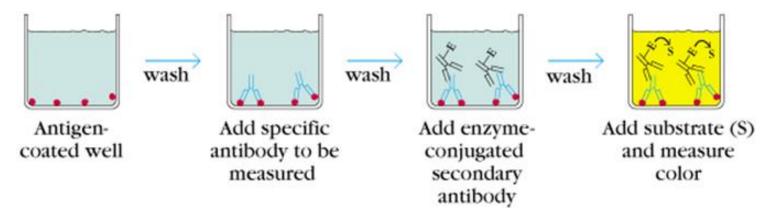
ELISA indiretta (siero e latte)

La metodica ELISA può essere utilizzata mediante l'uso di un kit che contenga i reagenti necessari per la prova e deve essere eseguita in maniera conforme alle indicazioni date dal produttore nel foglietto illustrativo. Le performance del kit utilizzato e, di conseguenza, l'interpretazione dei risultati devono essere state convalidate dal produttore conformemente ai principi stabiliti nel capitolo 1.1.6 del Manuale dei test diagnostici e vaccini per animali terrestri del WOAH (edizione 2016) e devono comprendere studi diagnostici e di laboratorio. Inoltre, ogni lotto del kit in uso deve essere controllato da un laboratorio nazionale di riferimento (LNR), seguendo le procedure del Laboratorio di referenza comunitario (EU-RL).

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

ELISA indiretta (principio)

(a) Indirect ELISA





Campo di applicazione ELISA indiretta (siero e latte)

La metodica ELISA siero può essere utilizzata come test complementare in aggiunta ai test SAR e FDC, o quando richiesto per esportazione/importazione o introduzione di capi.

Il test ELISA latte può essere utilizzato in allevamenti indenni di province indenni esaminando un campione di latte di massa proveniente da aziende in cui almeno il 30 % delle vacche da latte sia in lattazione. Se si utilizza tale metodica, si deve assicurare che i campioni prelevati per l'analisi permettano di risalire univocamente ai singoli animali da cui proviene il latte esaminato. Le prove di conferma, in caso di positività, devono essere effettuate su campioni di siero prelevato dai singoli animali che hanno composto il pool di latte di massa.

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

ELISA





Campo di applicazione ELISA competitiva (cELISA siero)

La metodica cELISA siero può essere utilizzata come test complementare in aggiunta ai test SAR e FDC, quando gli esiti delle altre prove sierologiche sono non conclusive.

Si esegue mediante l'uso di un kit che contenga i reagenti necessari per la prova.

Le performance del kit utilizzato e, di conseguenza, l'interpretazione dei risultati devono essere state convalidate dal produttore conformemente ai principi stabiliti nel capitolo 1.1.6 del Manuale dei test diagnostici e vaccini per animali terrestri del WOAH (edizione 2016) e devono comprendere studi diagnostici e di laboratorio.

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Definizione di caso

Articolo 9 Reg 689/2020

L'autorità competente classifica un animale o un gruppo di animali come un caso <u>sospetto</u> di una malattia elencata o di una malattia emergente quando:

- a) gli esami clinici, post mortem o di laboratorio concludono che i segni clinici, le lesioni post mortem o i risultati istologici sono indicativi della presenza di tale malattia;
- b) i risultati ottenuti utilizzando un metodo diagnostico indicano la probabile presenza della malattia in un campione prelevato da un animale o da un gruppo di animali; oppure
- c) è stata stabilita una connessione epidemiologica con un caso confermato.

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Connessione epidemiologica

- ·la circostanza per la quale, nel corso della sua vita, l'animale sospetto d'infezione abbia convissuto con uno o più capi confermati infetti da brucellosi, in altri stabilimenti o in quello in questione, oppure
- ·l'esistenza di un legame indiretto (uso di mangime, paglia, fieno, attrezzi agricoli, ecc.) tra lo stabilimento in questione e un altro dove siano stati confermati casi d'infezione, oppure
- •il rilievo della presenza o del transito di animali per i quali non sia possibile stabilirne con certezza l'origine e lo stato sanitario, oppure



Connessione epidemiologica

- la presenza negli ultimi dodici mesi nell'arco di 20 chilometri dallo stabilimento di altri casi confermati di infezione, oppure
- il caso in cui l'animale sospetto provenga da una azienda che successivamente alla sua movimentazione è divenuta focolaio con un caso confermato".



Interpretazione delle prove

Stabilimenti indenni da infezione:

a. Nel caso il siero di un animale esaminato fornisca esito positivo alla FDC (maggiore o uguale a 20 UIFC/ml) e negativo o positivo alla SAR l'animale è da considerarsi sospetto d'infezione. Il servizio veterinario può in ogni caso considerare uno o più capi sospetti d'infezione anche sulla base di esami e sintomi clinici, esami post mortem o in caso sia stabilita una connessione epidemiologica con un caso confermato.



Interpretazione delle prove

Stabilimenti non indenni da infezione:

 Nel caso il siero di un animale esaminato fornisca esito positivo alla FDC e/o alla SAR, l'animale è da considerarsi infetto, senza necessità di ulteriori conferme, in quanto presente una connessione epidemiologica con un caso confermato.

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Interpretazione delle prove

Ripristino dello status: tutti gli animali presenti nello stabilimento al momento del campionamento sono risultati negativi a prove sierologiche effettuate in due occasioni come segue:

- i) la prima prova deve essere effettuata su campioni prelevati non prima di tre mesi dopo l'allontanamento dell'ultimo caso confermato e dell'ultimo animale risultato positivo a una prova immunologica;
- ii) la seconda prova deve essere effettuata su campioni prelevati non prima di sei mesi ed entro 12 mesi dalla data del campionamento di cui al punto i).

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Interpretazione delle prove

Caso sospetto

- In tutti i casi (sospetto d'infezione o esito dubbio) la qualifica sanitaria dello stabilimento è sospesa sino alla conferma e risoluzione del sospetto e del dubbio diagnostico.
- Negli stabilimenti con qualifica sanitaria sospesa per la presenza di uno o più sospetti d'infezione, il servizio veterinario avvia l'indagine epidemiologica, e:

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Interpretazione delle prove

- a) vieta i movimenti di animali delle specie recettive alla brucellosi in entrata ed in uscita dallo stabilimento, se non per macellazione immediata in un macello designato;
- b) dispone l'isolamento dei casi sospetti nello stabilimento. Qualora tale misura non sia possibile o non sia possibile garantirla per l'intero periodo necessario alla risoluzione del sospetto, il servizio veterinario può disporre la macellazione dei capi dichiarati sospetti d'infezione al fine di proteggere la salute pubblica.

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Caso confermato

L'autorità competente classifica un animale o un gruppo di animali come un caso confermato di una malattia elencata o di una malattia emergente quando:

- a) in un campione prelevato da un animale o da un gruppo di animali è stato isolato l'agente patogeno, ad eccezione dei ceppi vaccinali;
- b) in un campione prelevato da un animale o da un gruppo di animali che presentano segni clinici compatibili con la malattia o una connessione epidemiologica con un caso sospetto o confermato è stato individuato un antigene o un acido nucleico specifico dell'agente patogeno, non derivante dalla vaccinazione; oppure
- c) in un campione prelevato da un animale o da un gruppo di animali che presentano segni clinici compatibili con la malattia o una connessione epidemiologica con un caso sospetto o confermato è stato ottenuto un risultato positivo, non derivante dalla vaccinazione, utilizzando un metodo diagnostico indiretto.

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Esami diretti

- Ricerca della Brucella spp. da materiale organico (organi, tamponi vaginali, aborti, latte) mediante isolamento e PCR/PCR RT
- Ricerca di Brucella spp. nel latte, mozzarella e formaggio non stagionato mediante PCR
- Tipizzazioni dei ceppi isolati
- WGS

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE "G. CAPORALE"



















