

II Giornata:

Workshop dei laboratori nazionali per lo studio della patologia
degli organismi acquatici

Un caso di CyHV₂ in

Carassius carassius nel Lazio

Gruppo di lavoro
dott.ssa A. Cersini
Lab. Analisi Biomolecolare

Giampiero Dante
S. Sittinieri, M. Cittadini
G. Cardetti

Lab. Microscopia Elettronica e Virologia Speciale
S.C. Biotecnologie
IZS LT, Roma

Gruppo di lavoro
dott.ssa T. Bossù
Lab. Ittiopatologia

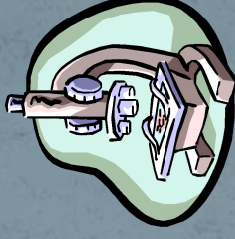
Workshop dei laboratori nazionali per lo studio della patologia degli organismi acquatici
Roma, 16-17 Ottobre 2014

Indice Argomenti

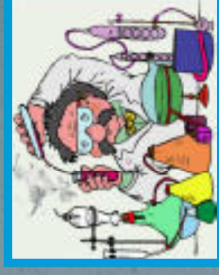
I. Storia del focolaio



II. Materiali e Metodi



III. Risultati e Discussione



IV. Misure Sanitarie



Workshop dei laboratori nazionali per lo studio della patologia degli organismi acquatici
Roma, 16-17 Ottobre 2014

ANAMNESI

- Maggio 2014
- Laghetto privato, Valmontone (Roma)
- *Carassius carassius* (unica specie)
- 16 soggetti (malati e morti in 6 gg circa)
- "Gulping" - sintomi respiratori



II *Materiali e Metodi*

16 soggetti per Esame Anatomopatologico,
Batteriologicalo, Parassitologico, Tossicologico

Indagini Virologiche

- 6 pool lesioni cutanee
- 6 pool lesioni su Branchie



-
- a) Osservazione al Microscopio Elettronico
 - b) Analisi biomolecolare
 - c) Isolamento in coltura cellulare

Esame Anatomopatologico

Esame esterno: nessuna lesione

Esame interno: tutti gli organi nella norma

Diagnosi Batteriologica e Parassitologica

Negativo

Esami Tossicologici

Pesticidi CARBAMMATI (GC-MS)

Pesticidi ORGANOCLORURATI (GC-MS)

Pesticidi ORGANOFOSFORATI (GC-MS)

In corso.....

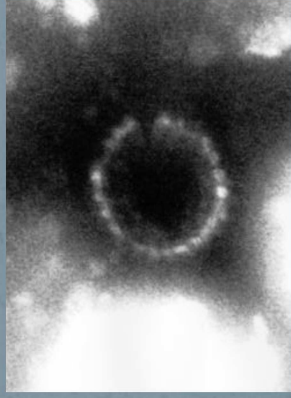
Indagini Virologiche

Microscopia Elettronica

- Trattamento campioni (Lesioni su Cute e Branchie): omogenizzazione (1:5 w/v in H₂O G.R.), F. n' T., centrifugazioni (3.000 g/30'; 9.000 g/30'; 96.000 g/20') e colorazione negativa (NaPT 2%)
- Osservazione al TEM a 28.000 X

Particelle Hv-like riscontrate in:

- Branchie sogg. 1-2-3
- Branchie sogg. 10-11-12

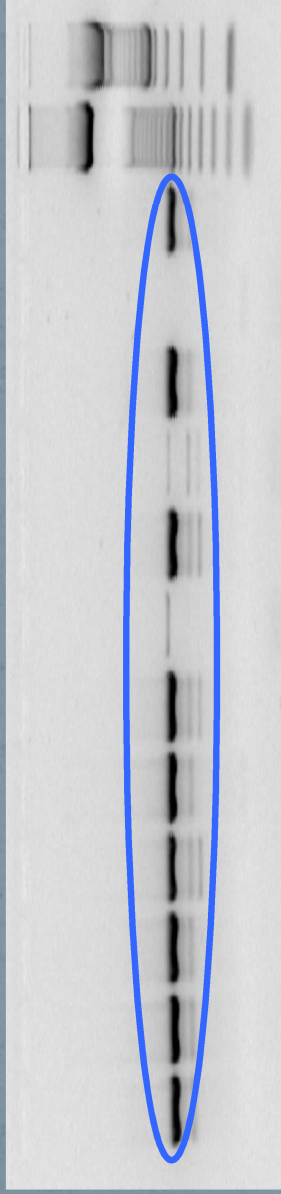


TEM Philips EM 208

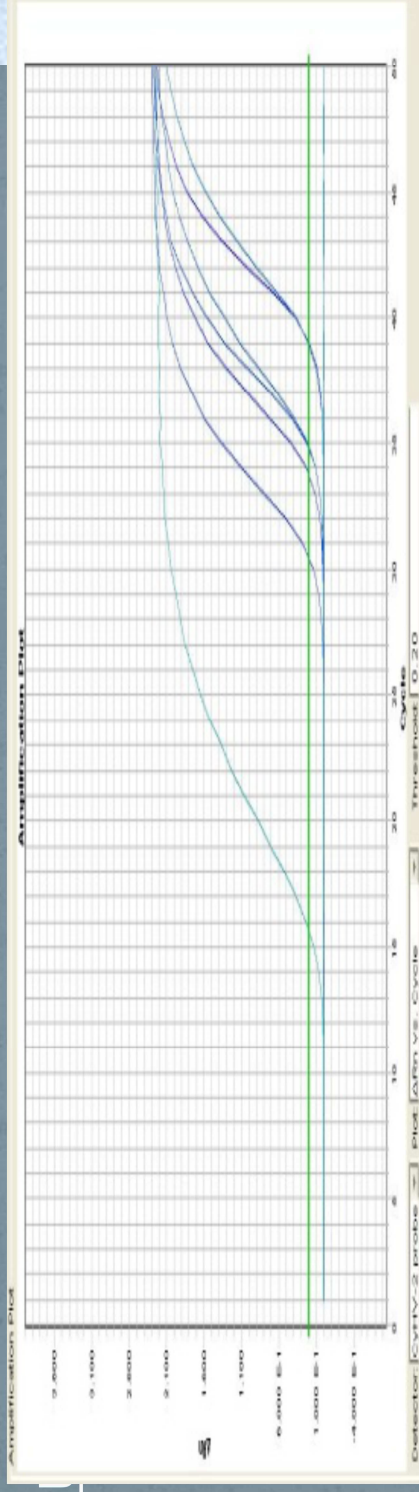
Workshop dei laboratori nazionali per lo studio della patologia degli organismi acquatici
Roma, 16-17 Ottobre 2014

FLUSSO DI LAVORO:

- Trattamento campioni: omogenizzazione meccanica in PBS, estrazione acido nucleico (DNA) tramite apposito Kit
- amplificazione secondo protocollo Real Time PCR x CyHV-2
- per caratterizzazione, nested PCR (CyHV) e Sequenziamento del prodotto di amplificazione.



Analisi Biomolecolari

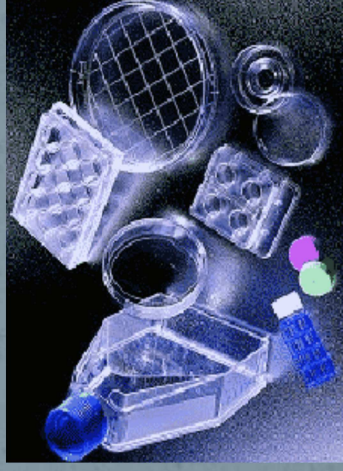


Protocollo	Campione	Risultato
Real Time PCR KHV	Estratti Branchie, Cute	Negativo
Real Time PCR CyHV ₂	Estratti Branchie, Cute	Presenza DNA virale su tutti i sogg. tranne pool Branchie sogg. 15_16
Nested PCR	Estratti Branchie, Cute	Presenza DNA virale sogg. 10-16

Workshop dei laboratori nazionali per lo studio della patologia degli organismi acquatici
Roma, 16,17 Ottobre 2014

Isolamento su Coltura cellulare

- Omogenato 1:10 (w/v) in EMEM antibiotato (PSF 5 %)
- Colture cellulari: linea continua di pesce (CCB)
- inoculo t.q. in fiasche 25 cm²
- incubazione a 22°C x 7 gg; 3 passaggi
- identificazione mediante protocolli di Real Time PCR su criolisato (no ECP): Branchie 1 e 4 [CT 36.8]



Workshop dei laboratori nazionali per lo studio della patologia degli organismi acquatici
Roma, 16-17 Ottobre 2014

III Risultati e Discussione

Al contrario di quanto avvenuto nei casi riscontrati in Toscana, NON sono state evidenziate:

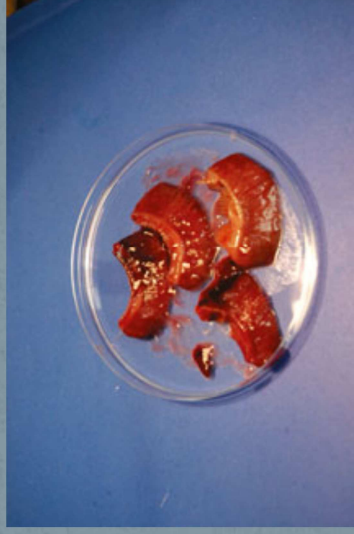
- Emorragie sparse nel corpo, pinne, branchie, occhi ed organi interni
- Lesioni microscopiche nelle branchie afferibili a necrosi, congestione e fusione lamellare multifocale

L'esame Batteriologico non ha rilevato presenza di *Aeromonas sobria*

External examination of crucian carp
Haemorrhages of body and fins
[G. Fichi et al.]



Internal examination of crucian carp.
Haemorrhages in gills
[G. Fichi et al.]



Internal examination of crucian carp.
Haemorrhages in kidney
[G. Fichi et al.]



L'esame virologico in M.E. ha rilevato nei tre focolai particelle HV-like, identificate in PCR come CyHV₂

III Risultati e Discussione

CyHV₂ responsabile della moria?

- Si attendono gli esiti degli esami tossicologici (la moria si sarebbe però dovuta verificare in più breve tempo), l'acqua dell'acquedotto dovrebbe essere sana..
- Grazie alla M.E. è stato comunque possibile rilevare la presenza di particelle HV-like (come nei 2 casi precedenti in Toscana) identificati poi come CyHV₂ (dai protocolli di PCR), rimarcando l'importanza di questa tecnica.

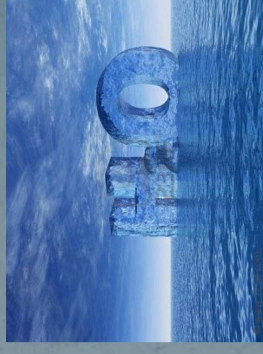
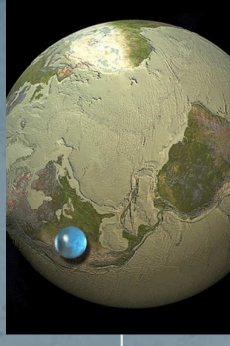
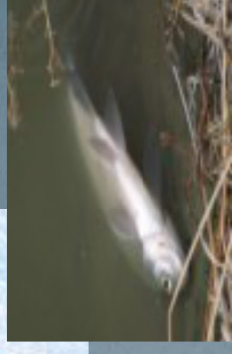
Non si può comunque attribuire un ruolo patogenico certo al CyHV₂
(alla luce anche delle discordanti evidenze riportate in letteratura)



Workshop dei laboratori nazionali per lo studio della patologia degli organismi acquatici
Roma, 16-17 Ottobre 2014

IV Misure Sanitarie

- Mortalità del 100%
- Svuotamento e disinfezione del bacino
(con detergenti sanificanti)
- Riempimento bacino con acqua acquedotto



Workshop dei laboratori nazionali per lo studio della patologia degli organismi acquatici
Roma, 16,17 Ottobre 2014



Grazie per l'Attenzione!!!

Workshop dei laboratori nazionali per lo studio della patologia degli organismi acquatici
Roma, 16-17 Ottobre 2014