



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana



SANITA' ANIMALE: FLUSSI DELL'ACCETTAZIONE
Criticità e proposte a confronto

***Accettazione, Gestione e Invio del Campione
destinato al Laboratorio di
Microscopia Elettronica e Virologia Speciale***



Giusy Cardeti





Indice degli argomenti trattati

- ✓ Laboratorio di Microscopia elettronica - Virologia speciale (presentazione)
- ✓ Singole attività - materiale patologico - normativa
- ✓ Matrici e diagnostica virologica: regole e criticità
- ✓ Matrici utilizzate per metodi biomolecolari (test screening, in parallelo, di conferma a TC e ME)
- ✓ Campioni per ricerca CPXV





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

✓ Laboratorio Microscopia elettronica e Virologia speciale



Biotechnologie

Demetrio Amaddeo

Lavanderia,
Sterilizzazione

Accettazione, Refertazione e
Sportello dell'Utente

F. Scholl

Substrati
cellulari e
Produzione

Katia Barbaro (Resp.)

Microscopia
elettronica e
Virologia
speciale

Giusy Cardeti (Resp.)

Marina Cittadini

Giampiero Dante

Stefania Sittinieri

Analisi
biomolecolare e
Genetica

Raniero Lorenzetti (Resp.)

Ingegneria genetica
e
Immunobiochimica

Ugo Marchesi (Resp.)

Centro di Riferenza
Nazionale per la
ricerca di OGM

Ilaria Ciabatti (Resp.)

Diagnosi Malattie Virali

G.L. Autorino

Ittiopatologia

T.Bossù/F.Susini

Sierologia

G. Macri

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

Roma, 17 giugno 2014

Schema di lavoro nella diagnostica virologica



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana



Materiale ed anamnesi
(dati epidemiologici, clinici, patologici)

**Dimostrazione diretta
dell'agente patogeno**

Senza coltura del virus

Microscopia Elettronica
Visualizzazione
morfologica

Istologia
Presenza corpi inclusi
Immunofluorescenza
Metodi immunoistochimici

Sierologia
(antigene sconosciuto
anticorpo conosciuto)

Biologia Molecolare
PCR
Western Blotting
Ibridazione in situ

Con coltura del virus
Colture cellulari
Uova embrionate

**Dimostrazione indiretta
dell'agente patogeno**

Metodi chimico-fisici
prova al cloroformio,
acidi, pH, T°C

Proprietà biologiche
spettro ospite sensibile

Metodi sierologici
(antigene conosciuto
anticorpo sconosciuto)

Test
Neutralizzazione
Emoagglutinazione
Fissazione del complemento
Precipitazione
Immunofluorescenza
Radioimmunoassay
ELISA



Indice degli argomenti trattati

- ✓ Laboratorio di Microscopia elettronica - Virologia speciale (presentazione)
- ✓ **Singole attività - materiale patologico - normativa**
- ✓ Matrici e diagnostica virologica: regole e criticità
- ✓ Matrici utilizzate per metodi biomolecolari (test screening, in parallelo, di conferma a TC e ME)
- ✓ Campioni per ricerca CPXV



✓ Attività principali



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana



Virologia speciale

- **Isolamento Virus animali**
(Mammiferi, Rettili, Pesci,
Insetti)

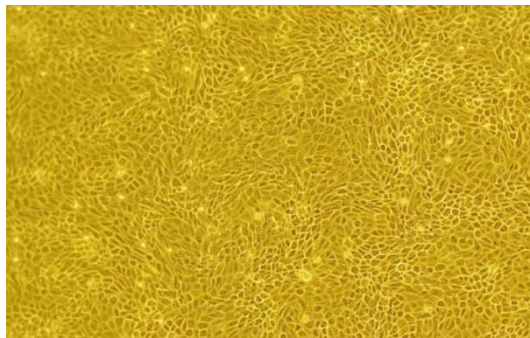
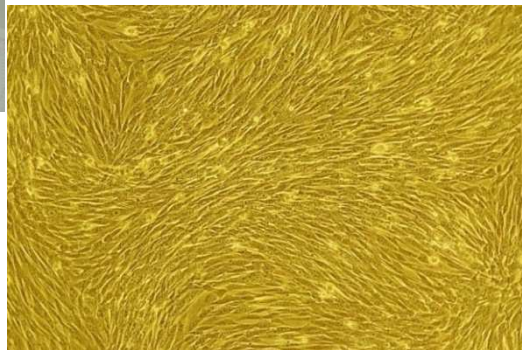
su

Colture Cellulari

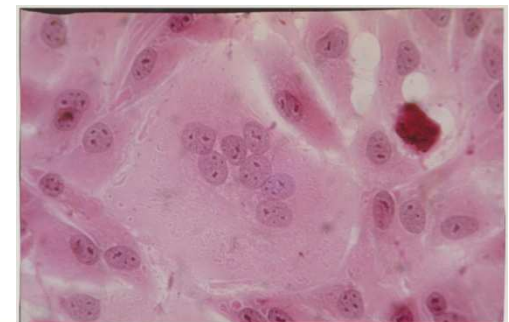
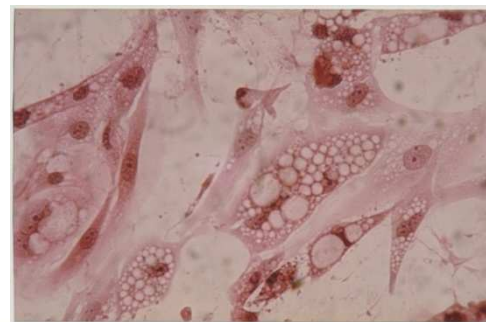
(staminali, primarie e
continue)



Fibroblastica
- BHK₂₁



Epitelioide -
MDBK





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana



Materiale patologico:

Tamponi diagnostici: in 2 mL di EMEM
+ 2%SFB + 5% antibiotici-antimicotici)

Organi: t.q. o in EMEM+2%SFB+5%PSF

Secreti ed escreti: t.q.



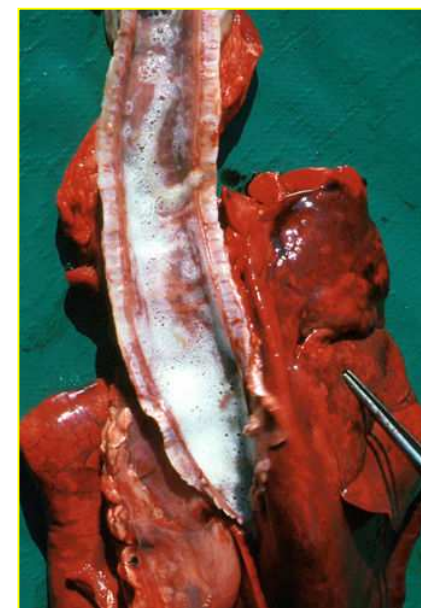
Temperatura di conservazione:

- entro le 24 ore: +4°C
- oltre le 24 ore, a $\leq -20^{\circ}\text{C}$

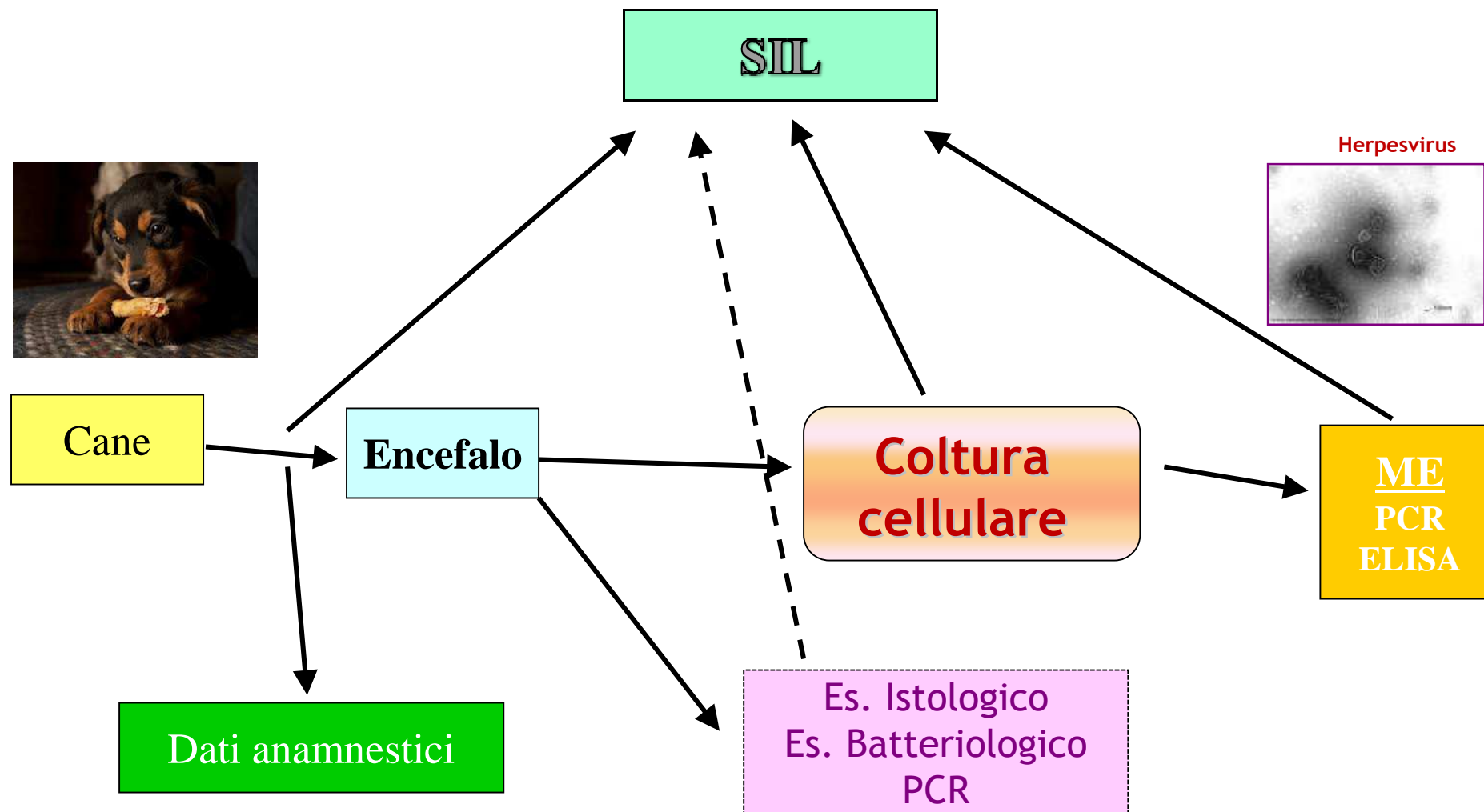


Contenitori per l'invio:

- a chiusura ermetica
- tipo provette Falcon
- in quantità sufficiente (≥ 1 cm³; 3 mL; 15 mL)



Flusso Campione x TC



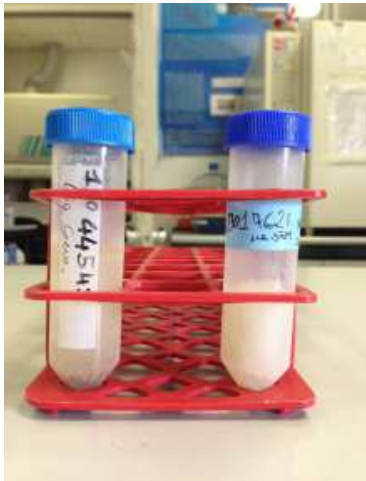


Virologia speciale



- **Isolamento EAV** in Liquidi Seminali equidi sieropositivi (Piano Nazionale di Controllo; CeRME)

Liq. seminale



Cavalli Sieropositivi

- ✓ Liquido Seminale con fase spermatica (almeno 15 mL)
- ✓ Consegna +4°C entro le 24 h, altrimenti congelato a -20°C
- ✓ 3 prelievi ogni 15 giorni
- ✓ Colture cellulari e real time PCR
- ✓ soggetto eliminatore: esclusione monta



Piano Nazionale di Controllo Arterite Virale Equina CeRME

✓ OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2013, cap 2.5.10 (sito web <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>)

✓ O.M. 13 gennaio 1994 Piano nazionale di controllo dell'arterite virale equina e successive modifiche

✓ PG ACC 003 - modulo 2

✓ PG VIR 002

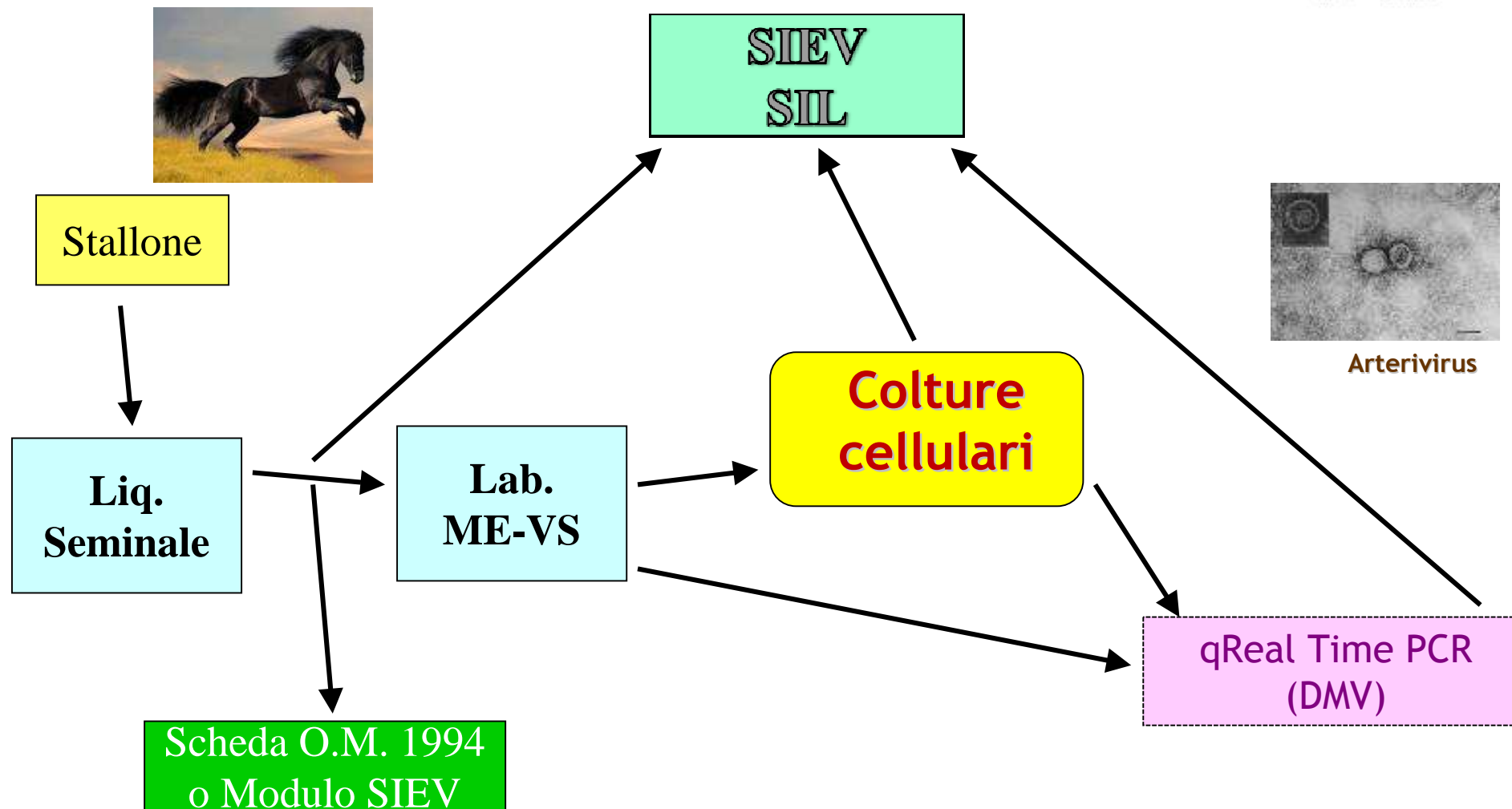
✓ POS VIR 027 NOR





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Flusso Liq. Seminale x isolamento EAV

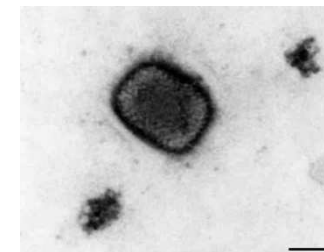




Philips EM 208



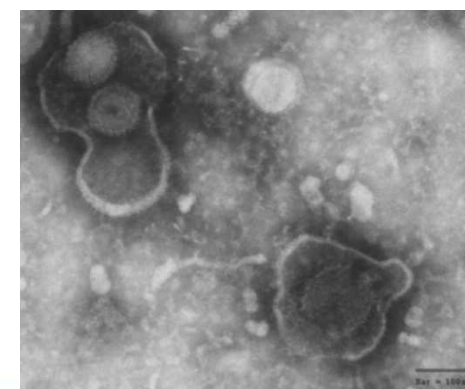
Microscopia elettronica



Cowpoxvirus

Visualizzazione diretta ed identificazione, su base morfologica o mediante IEM, di **virus presenti**:

- in **campioni clinici** (lesioni cutanee e mucose, tamponi, feci, essudati, api in toto)
- in **sospensioni virali** (ceppo virale isolato in coltura cellulare, uovo embrionato)



Herpesvirus



Materiale patologico

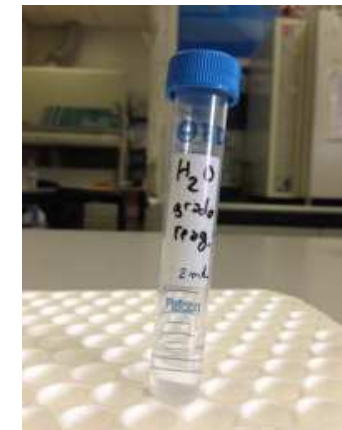


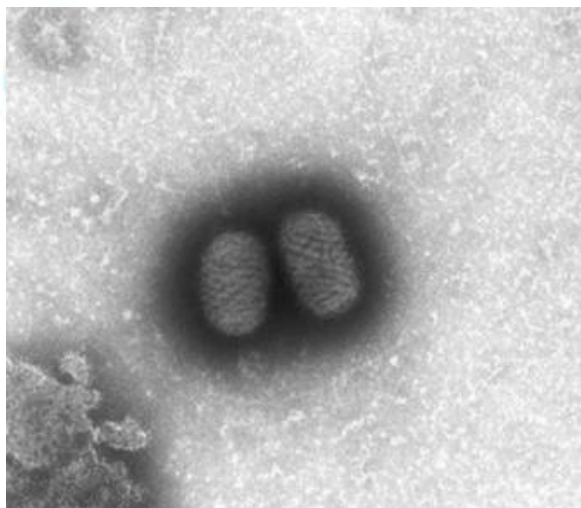
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

- **Lesioni cutanee e mucose**
- **Tamponi diagnostici:**
congiuntivale, nasale, oro-faringeo,
ecc.
- **Contenuto intestinale o feci**
- **Essudato (pleurico, peritoneale)**
- **Api**



✓ in 2 mL Acqua grado
reagente o laboratorio
✓ a +4°C o a -20°C



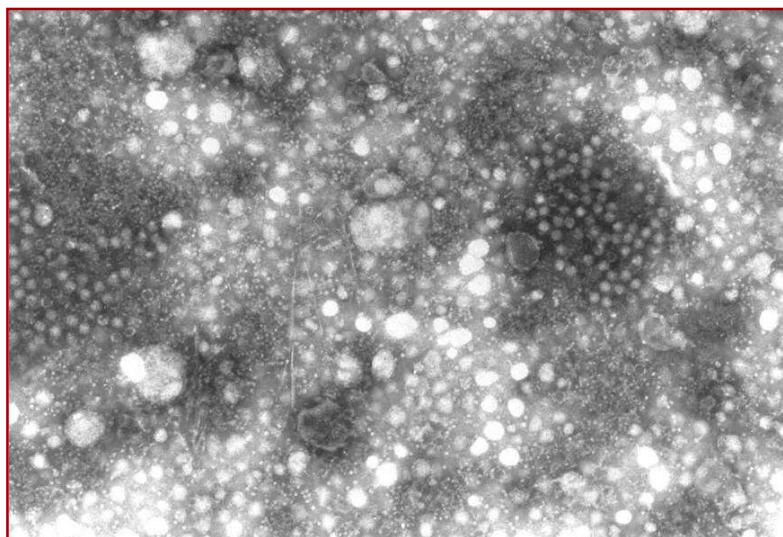


Parapoxvirus

Microscopia elettronica: metodo “catch all - open view”



- ✓ Diagnosi rapida di **virus nuovi o emergenti**
- ✓ **Diagnosi differenziale** delle malattie vescicolari dei ruminanti (poxvirus, FMD, Bluetongue, Mammillite erpetica)
- ✓ Diagnosi rapida in caso di infezioni da **virus difficilmente o affatto coltivabili** (api, pesci)



DWV



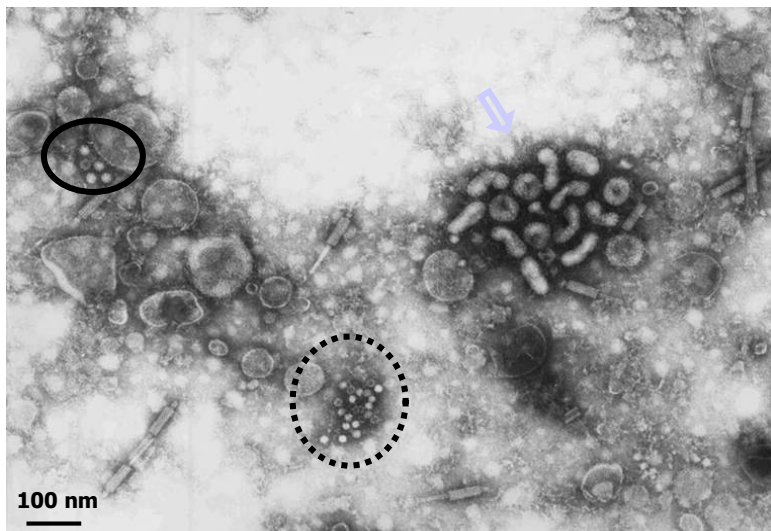
Rabdovirus





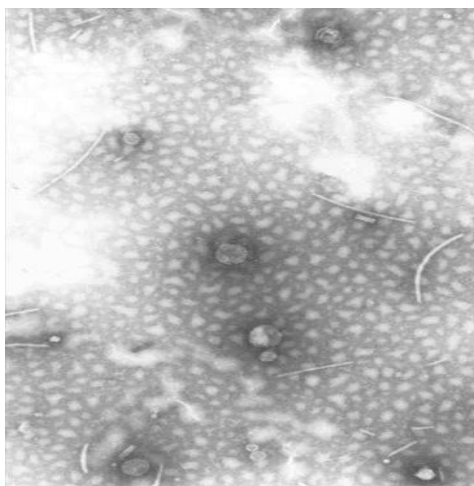
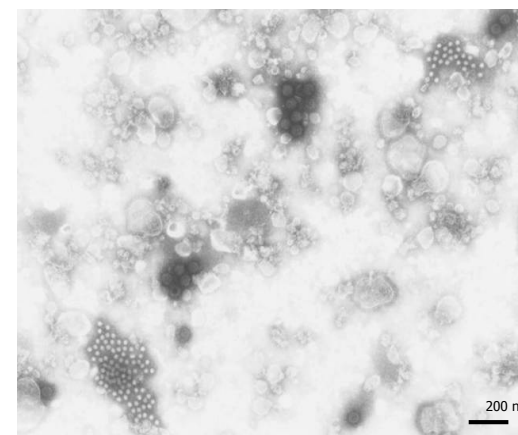
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Microscopia elettronica: metodo “catch all - open view”



Entero+Circo+
Torovirus

Rota + Astrovirus



Coronavirus

- ✓ Possibilità di evidenziare **più virus diversi** in infezioni associate (virus enterici)
- ✓ Evidenziazione di virus in campioni relativamente “sporchi” e/o **poco concentrati**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Flusso Campione x ME



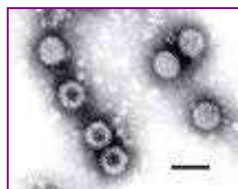
Vitello

Intestino

Dati anamnestici

SIL

Rotavirus



ME

TC
PCR
IEM

Es. Istologico
Es. Batteriologico
ELISA



Diagnosi Malattie Virali dei pesci



○ Inoculo di linee cellulari di pesce a differenti temperature di incubazione:

- Virus Salmonidi: 15°C
- Virus Ciprinidi, Anguille, Cefalopodi e pesci di mare: 22°-25°C
- Omogenato di Encefalo, Milza, Rene, Fegato o Cuore

○ Osservazione al TEM

- omogenato di branchie, lesioni cutanee, contenuto intestinale



Piano di Monitoraggio Nazionale IHN e VHS



Organi

- ✓ in EMEM + 2%SFB + 5%PSF o PBS antibiotato
- ✓ a +4°C o a $\leq 20^{\circ}\text{C}$

✓ Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals OIE 2013, parte 2, sezione 2.3.4 (IHN) e 2.3.9 (VHS), <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/>

✓ D.Lgs. 148/2008 (polizia sanitaria acquacoltura, prevenzione malattie e misure di lotta)

✓ Decisione 2001/183/CE (piani di campionamento e metodi diagnostici)

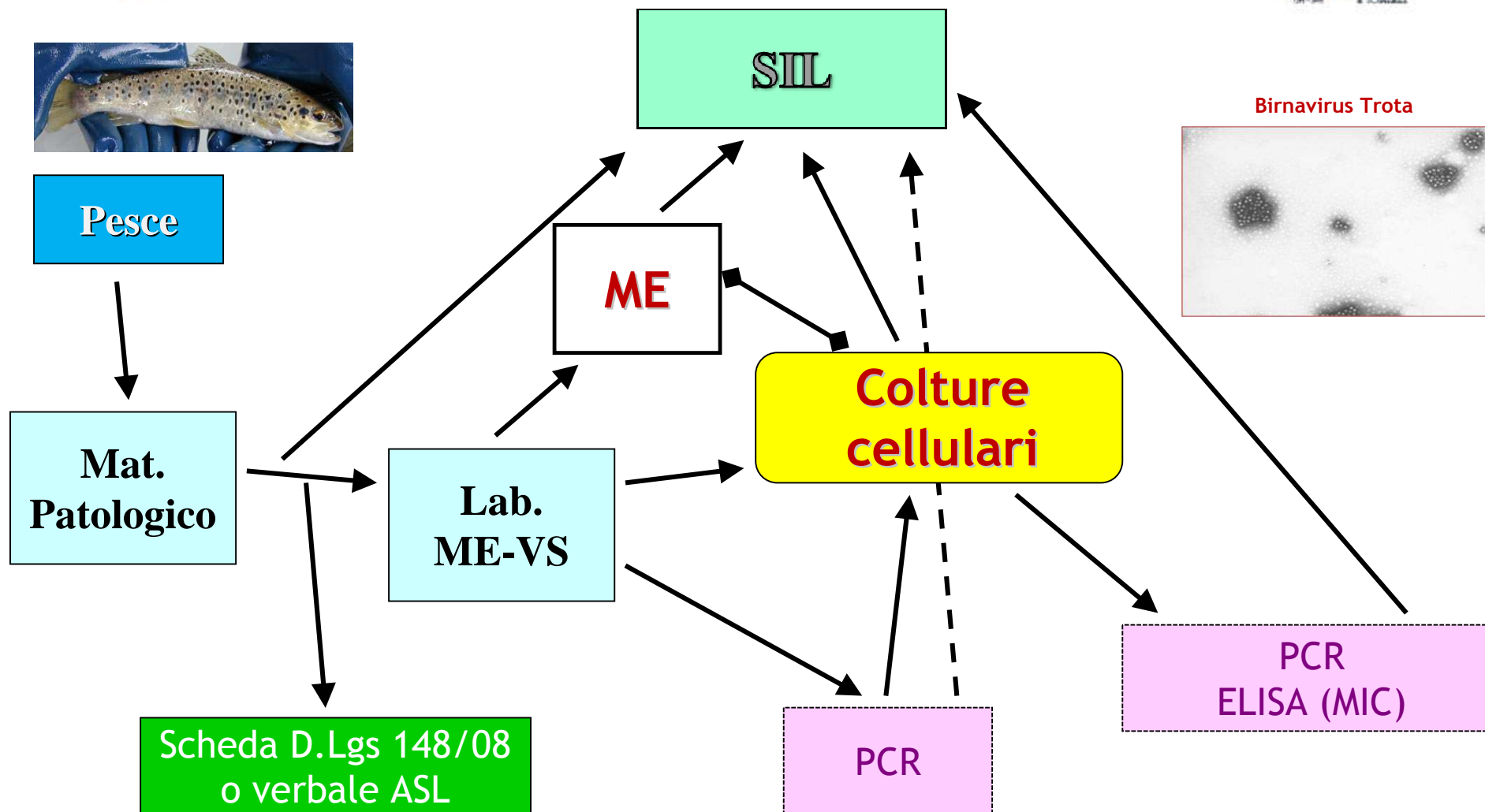
✓ PG VIR 002

✓ POS VIR 013 NOR

Salmonidi

- ✓ anagrafe acquaculture
- ✓ autorizzazione e analisi del livello di rischio aziendale (ASL)
- ✓ prelievo pesci in regime di autocontrollo
- ✓ prelievo ufficiale ASL
- ✓ riconoscimento o mantenimento Azienda indenne







Indice degli argomenti trattati

- ✓ Laboratorio di Microscopia elettronica - Virologia speciale (presentazione)
- ✓ Singole attività - materiale patologico - normativa
- ✓ **Matrici e diagnostica virologica: regole e criticità**
- ✓ Matrici utilizzate per metodi biomolecolari (test screening, in parallelo, di conferma a TC e ME)
- ✓ Campioni per ricerca CPXV





✓ **MATRICE e DIAGNOSTICA VIROLOGICA**



Efficacia diagnostica

- la qualità di una diagnosi dipende anche dalla corretta selezione del materiale biologico

- Appropriatezza della matrice



Encefalo e Intestino x Cimurro
Encefalo e Fegato x Rabbia
Polmone e **Fegato** x MEV

- Idoneità del campione



**X es. sangue con EDTA
e non intero; T°C cons.**



Informazioni necessarie ai fini di una corretta diagnosi



Informazioni specifiche
sul soggetto
specie, razza, età,
sesso



Informazioni specifiche
sul caso
segni clinici e quadri lesivi
osservati sugli animali

[...]

7.2 Verifica del campione e del documento di accompagnamento

Al momento dell'arrivo del campione deve essere fatta la verifica dello stesso e del relativo documento di accompagnamento.

Sulla base delle indicazioni riportate sul documento di accompagnamento, delle indicazioni del responsabile dell'Accettazione/Sezione e di quanto riportato nell'Allegato 1 della presente procedura, il personale addetto all'accettazione individua quali fra le prove richieste debbano essere effettuate a pagamento. Qualora il personale addetto all'accettazione non sia in grado di stabilire quanto detto, consulta il dirigente per la relativa decisione.

7.2.1. Verifica del documento di accompagnamento

Il documento di accompagnamento deve riportare:

- nome ed indirizzo del richiedente e/o Ente di appartenenza;
- nome ed indirizzo del proprietario;
- ubicazione dell'allevamento (se diversa dall'abitazione del proprietario);
- descrizione del materiale inviato;
- numero dei campioni;
- codice anagrafico o dati segnalatici dei capi inviati o sottoposti a prelievo;
- **- anamnesi e trattamenti effettuati;**
- data del prelievo;
- prove richieste.

I campioni che pervengono per prelievi effettuati in ottemperanza a piani di eradicazione, sorveglianza, risanamento o monitoraggio, debbono essere inviati da Veterinari Ufficiali e consegnati dal personale del Servizio Sanitario Nazionale o in alternativa in confezioni sigillate a cura dello stesso; il relativo documento di accompagnamento deve essere quello previsto dalla normativa vigente ed essere conformemente compilato. Nell'ambito delle malattie sottoposte a piani ufficiali sono accettati campioni eseguiti da Veterinari liberi professionisti esclusivamente se effettuati a seguito di sospetto clinico.

[...]

Nel caso in cui il campione pervenga **senza documento di accompagnamento**, o con documento incompleto, il personale in firma il dirigente che deciderà se respingere il campione o accettarlo con riserva o procedere comunque alle prove in assenza del documento. Nel caso di carcase provenienti da allevamenti di animali di bassa corte a carattere familiare, il campione può essere accettato anche senza documento di accompagnamento dopo aver raccolto i dati anamnestici. In questo caso il Dirigente di turno del laboratorio Anatomopatologia presso l'Accettazione della Sezione, o altro personale individuato, raccoglie direttamente dal cliente/tutela tutte le informazioni rilevanti a proposito del documento di accompagnamento e qualsiasi altra informazione ritenuta utile a fini diagnostici. Le informazioni vengono riportate su un foglio che, dopo essere stato datato e firmato, sostituisce il documento di accompagnamento in tutto l'iter del campione.



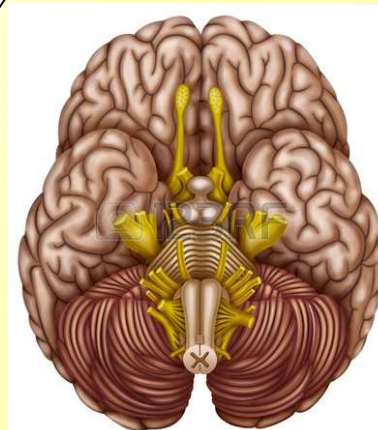
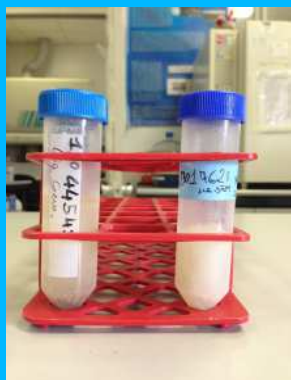
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Criticità

Informazioni Anamnestiche

PG ACC 003

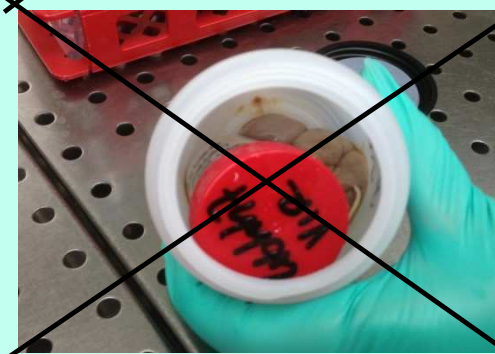
Contenitore



Organo target

X

Morbo di Aujeszky



Modalità di invio



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Criticità (2)



PG ACC 003/2 rev. 9

pag. 1 di 1

INDICAZIONI PER IL PRELIEVO ED IL CONFERIMENTO DEI CAMPIONI

SANITÀ ANIMALE

I campioni biologici per l'esecuzione di esami per la sanità animale devono essere consegnati presso i locali dell'acettazione.

CAMPIONI DI SANGUE

[.....]

Per esami virologici: sangue addizionato con anticoagulante (EDTA), consegna entro 24 ore refrigerato.

CAMPIONI DI ORGANO

[.....]

Per esami virologici: in contenitori sterili a tenuta ermetica - consegna entro 24 ore refrigerati, altrimenti congelati.

[.....]

FECI ED URINE

[.....]

Per esami virologici: in contenitori sterili a tenuta ermetica 10 - 50 g di materiale, consegna entro 24 ore refrigerati, altrimenti congelati.

[.....]

TAMPONI E LAVAGGI PREPUZIALI

Per esami virologici: in terreno di trasporto per colture cellulari MEM (Minimal Essential Medium) o in soluzione fisiologica antipiolata (2 ml) o in soluzione tampone PBS (Phosphate Buffer Saline) (2 ml), in contenitori sterili a tenuta ermetica - consegna entro 24 ore refrigerati, altrimenti congelare.

[.....]

LIQUIDI BIOLOGICI

[.....]

Per esami virologici: in contenitori sterili a tenuta ermetica consegna entro 24 ore refrigerati, altrimenti congelati.

LIQUIDO SEMINALE EQUINO

Per esami virologici: in contenitori sterili a tenuta ermetica in quantità minima di 20 ml consegna entro 24 ore refrigerato, altrimenti congelato.

[.....]

API

[.....]

Numero di api necessarie per le suddette analisi:

- [.....]
- Virus PCR: almeno 10 api prelevate dall'interno dell'alveare, dai telami di covata,
- [.....]

T°C di Conservazione:

- ✓ **a +4°C x >24h**
- ✓ **congelare trote** (Piano Monitoraggio)

Terreno di Trasporto:

- **PBS x ME**
- **EMEM + DMSO x TC**

Registrazione nel SIL:

- **Polmone + Trachea;**
- **ME goccia x Tampone; TC x Intestino**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Prove gestite (SIL)



Microscopia Elettronica

- goccia
- ultracentrifugazione

PROVA	VIRUS-Mat.Patologico
PARTICELLE VIRALI (goccia)	Poxvirus da Lesioni Cutanee
PARTICELLE VIRALI (ultracentrifugazione)	Virus da Tamponi, Contenuto intestinale, essudato

Immunolettromicroscopia

PROVA
ADENOVIRUS
CORONAVIRUS
ENCEFALOMIOCARDITE (EMCV)
MORBILLIVIRUS
PARVOVIRUS
ROTAVIRUS

Colture Cellulari

PROVA
ADENOVIRUS (Cane, bovino, cavallo)
HERPESVIRUS (cane, gatto, bufalo, ovino)
ARTERITE VIRALE EQUINA
EQUINE HERPES VIRUS 4 (EHV-4)
RINOPNEUMONITE
ANEMIA INFETTIVA EQUINA
RINOTRACHEITE INFETTIVA DEL BOVINO (IBR)
PARAINFLUENZA 3 (PI3)
VIRUS RESP.SINCIZIALE BOVINO
BVD
BORDER DISEASE
MORBO D'AUJESZKY (Spp)
ENCEFALOMIOCARDITE (EMCV)
PESTE SUINA CLASSICA
CALICIVIRUS
CORONAVIRUS
CIMURRO
MORBILLIVIRUS Cetacei
VIRUS NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA (IHN)
VIRUS SETTICEMIA EMORRAGICA VIRALE (VHS)
NECROSI PANCREATICA INFETTIVA (IPN)
VIREMIA PRIMAVERILE CARPA (SVC)
HERPESVIRUS DELLA CARPA KOI (KHV)
INFEZIONE DA IRIDOVIRUS
BETANODAVIRUS
AGENTI VIRALI (x es. SBV, Virus Anguille)





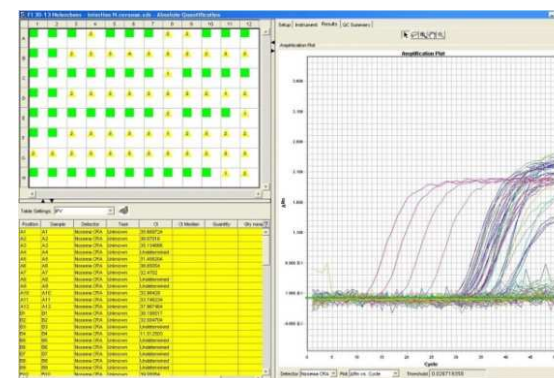
Indice degli argomenti trattati

- ✓ Laboratorio di Microscopia elettronica - Virologia speciale (presentazione)
- ✓ Singole attività - materiale patologico - normativa
- ✓ Matrici e diagnostica virologica: regole e criticità
- ✓ **Matrici utilizzate per metodi biomolecolari (test screening, in parallelo, di conferma a TC e ME)**
- ✓ Campioni per ricerca CPXV



Analisi e diagnosi biomolecolare

- ✓ PCR 7 virus delle api
- ✓ PCR Betanodavirus
- ✓ PCR Virus Salmonidi (VHSV, IHNV)
- ✓ PCR Virus Ciprinidi (KHV, CyHV, SVCV)
- ✓ PCR Virus delle Anguille (EVEV e AngHV-1)
- ✓ PCR Morbillivirus Cetacei
- ✓ Consensus PCR Herpesvirus Mammiferi e Rettili
+ Sequenziamento
- ✓ PCR Parvovirus + Pirosequenziamento

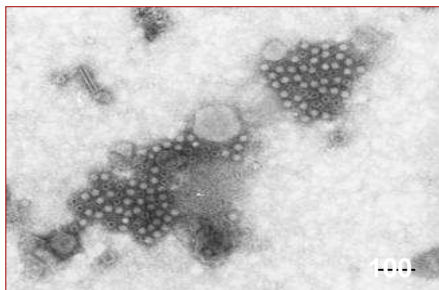


Approccio Combinato degli strumenti diagnostici

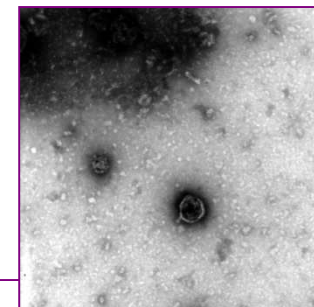
Contenuto intestinale

- Kit ELISA specifico x Corona-Rotavirus-K99
- PCR Parvovirus cane e gatto

+



- ME ultracentrifuga: metodo “catch all” - “open view”



Cetacei (Encefalo, polmone, milza)

- PCR herpesvirus;
Morbillivirus (2 protocolli)
- TC

Rettili (Encefalo, polmone, fegato milza, rene)

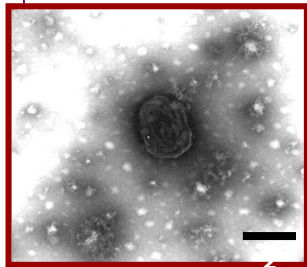
- PCR herpesvirus
- TC - ME (tamponi, contenuto intestinale)

Approccio Combinato degli strumenti diagnostici (2)



Virosi Api

- PCR 7 virus principali (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV, SBV)



+



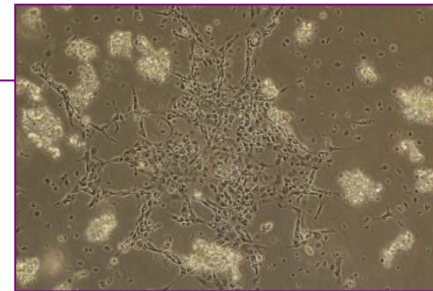
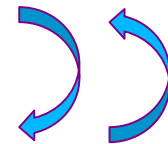
- ME ultracentrifuga: metodo “catch all - open view” (Virus Filamentoso, Iridovirus, CWV)

EAV - Liquido Seminale

- TC (metodo ufficiale)
- PCR real time

Pesci

- TC
- PCR real time



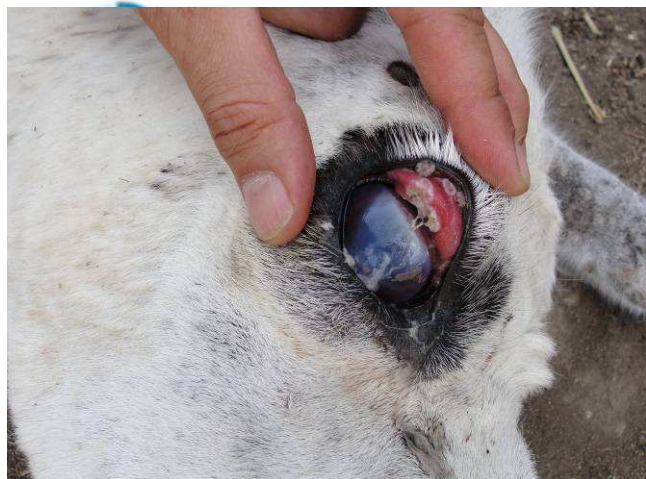


Indice degli argomenti trattati

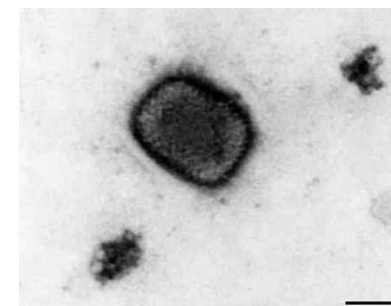
- ✓ Laboratorio di Microscopia elettronica - Virologia speciale (presentazione)
- ✓ Singole attività - materiale patologico - normativa
- ✓ Matrici e diagnostica virologica: regole e criticità
- ✓ Matrici utilizzate per metodi biomolecolari (test screening, in parallelo, di conferma a TC e ME)
- ✓ **Campioni per ricerca CPXV**



✓Progetto di Ricerca Corrente MS 2013



“Infezione da Cowpoxvirus negli animali: studi sulla presenza e diffusione del virus in Italia Centrale”



- **Cowpoxvirus**: Orthopoxvirus patogeno per bovino, gatto, uomo, primati, felidi selvatici, elefante, lama, roditori
- **Animali campionati** nel progetto: **gatti di colonia e padronali; animali esotici** (Bioparco, Centri di Ricovero e Recupero), **animali selvatici, sinantropi e alloctoni** con lesioni sospette; **Uomo**.
- **Tipologia campioni**: lesioni cutanee e mucose, tamponi; siero; organi interni
- **Esami di laboratorio**: ME, Colture cellulari; esame istologico; SN; PCR Real Time e Sequenziamento
- Distribuzione di **Questionario e Brochure**
- Organizzazione di un **Workshop** divulgativo ad ottobre 2014



**Lesioni Lama
(Italia, 2009)**

© D'Alterio, Viterbo

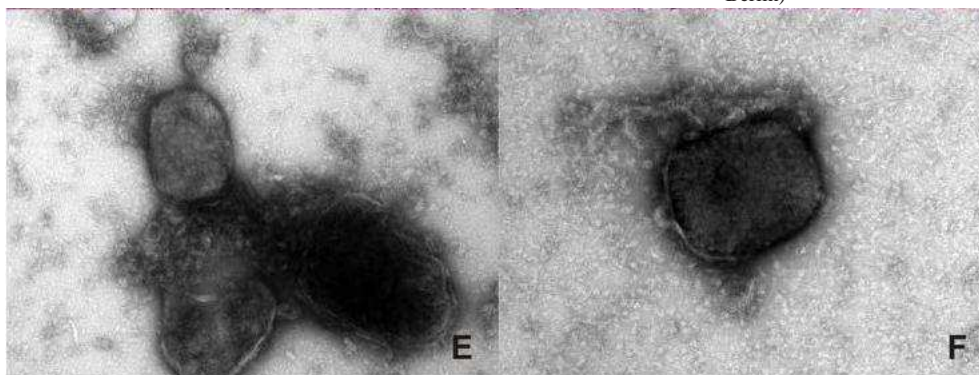




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Cowpoxvirus

© Andreas Nitsche (Robert Koch-Institut, Berlin)

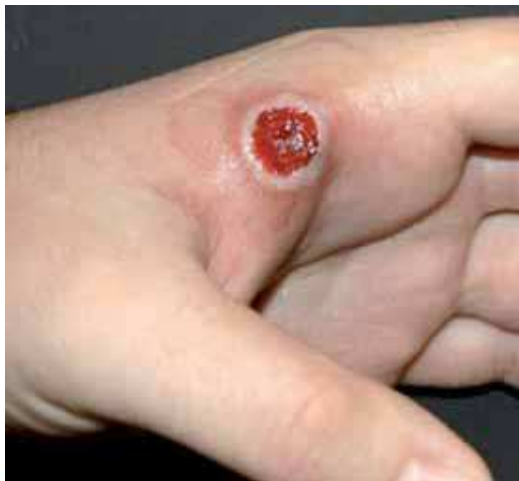


Lesioni cutanee nel ratto

© Andreas Nitsche (Robert Koch-Institut, Berlin)

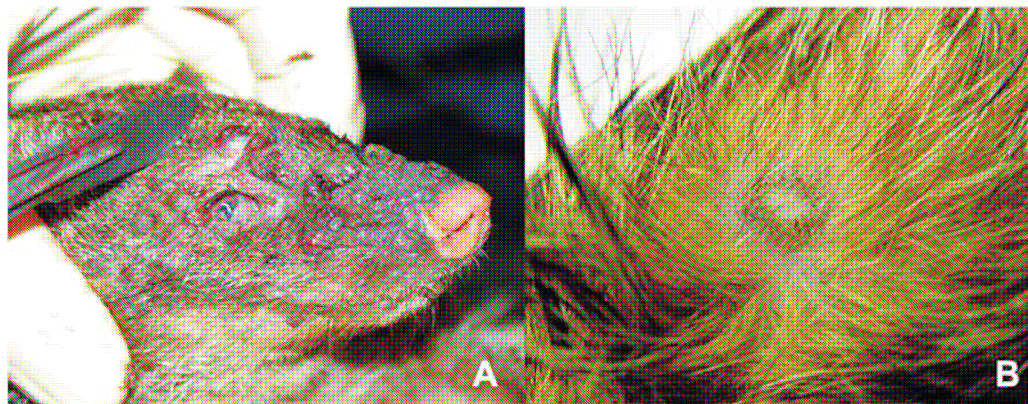
Lesione mano uomo

© Andreas Nitsche (Robert Koch-Institut, Berlin)



Lesioni Mangusta (Germania, 2009)

© Andreas Nitsche (Robert Koch-Institut, Berlin)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana



Grazie per l'attenzione!

...e se avete dubbi o quesiti:

giusy.cardeti@izslt.it

marina.cittadini@izslt.it

giampiero.dante@izslt.it

stefania.sittinieri@izslt.it



Laboratorio
Microscopia elettronica
e Virologia speciale

