



Dr. Raffaele Frontoso

Firenze, 11 giugno 2014





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

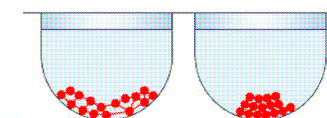
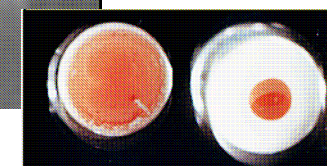
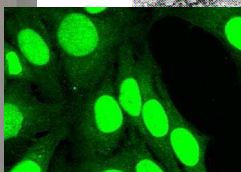
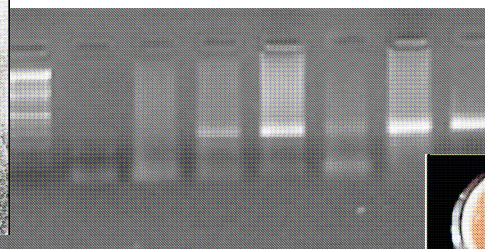
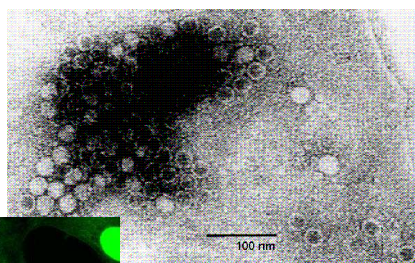
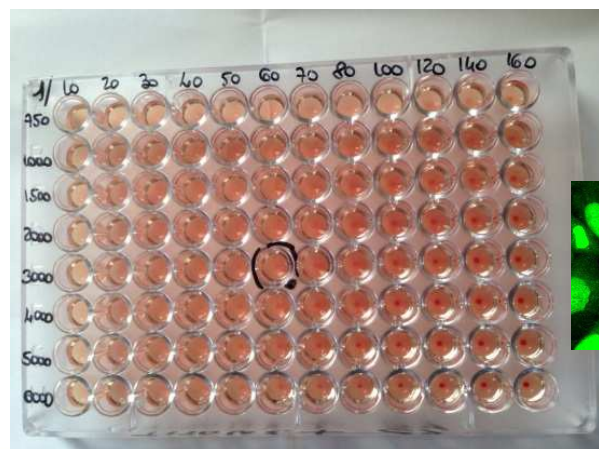


Definizione: utilizzo di più tecniche diagnostiche oppure utilizzo di più prove nel caso di sindromi

Obiettivo:

- ✓ aumentare la probabilità di fare diagnosi
- ✓ essere sicuri che il campione in esame sia effettivamente negativo

es rabbia, anemia, tori per centri genetici → negatività al test ELISA ed SN





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana



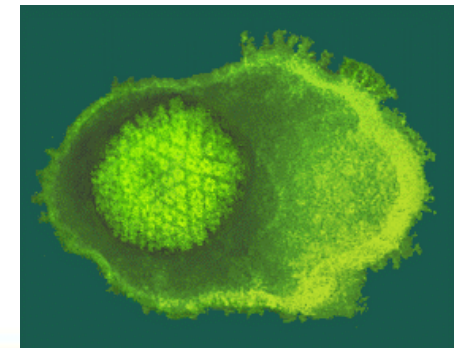
Approccio combinato

✓ **test in serie**

Es. Piano di sorveglianza Anemia, Blue Tongue, NDV (PCR e sequenziamento) ecc...

✓ **test in parallelo** → effetto combinato della loro sensibilità e specificità o per ridurre i tempi di diagnosi - il primo test conferma il caso; o test la cui specificità permette di escludere che il campione sia positivo

- es. toro per ingresso centro genetico dove è richiesta la negatività per Rinotracheite Infettiva Bovina sia al test ELISA che al Test di Sieroneutralizzazione





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana



Sospetto/orientamento
diagnostico

Modalità di invio

Diagnosi

Scelta matrici..

In caso
di sindromi

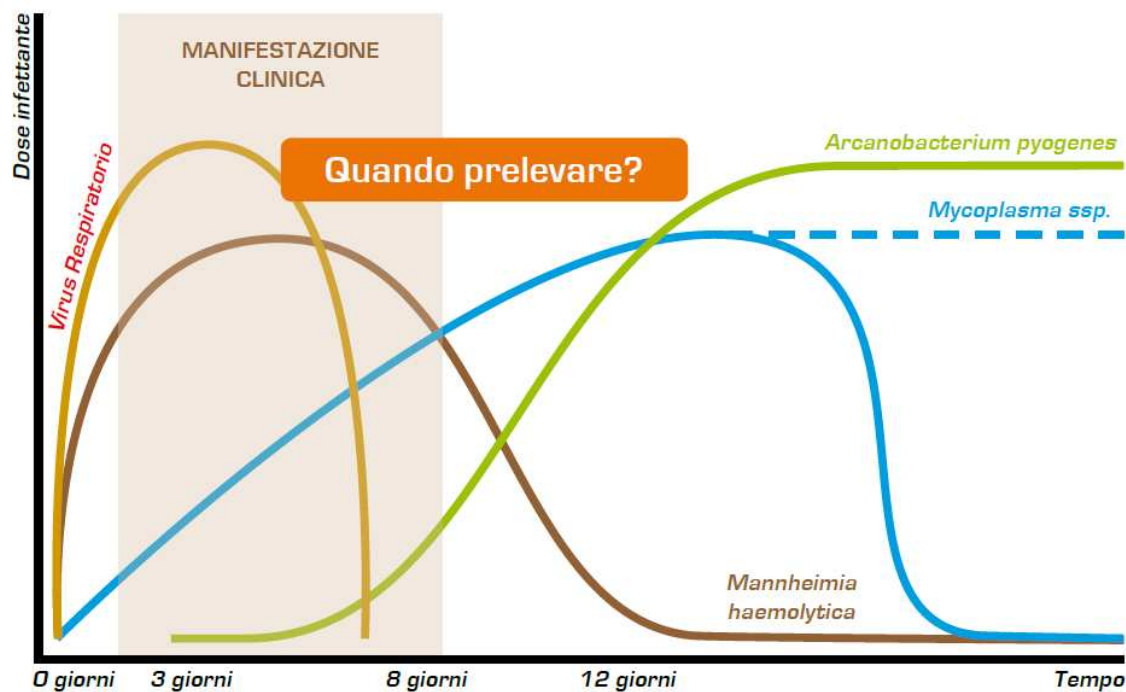
Appropriatezza
delle prove da caricare



Scelta diagnostica

in funzione di:

- ✓ Malattia
- ✓ Stadío – Fase acuta, o cronica
- ✓ matrice



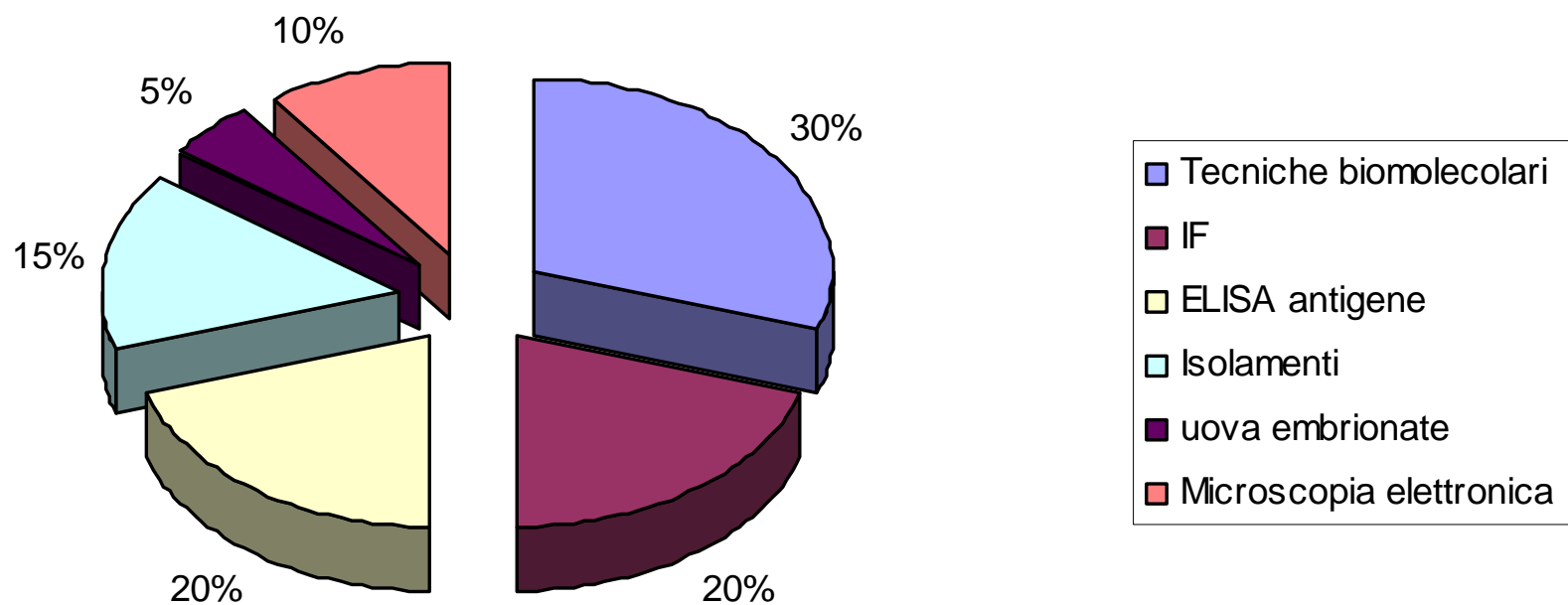


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Metodiche per la ricerca degli agenti virali

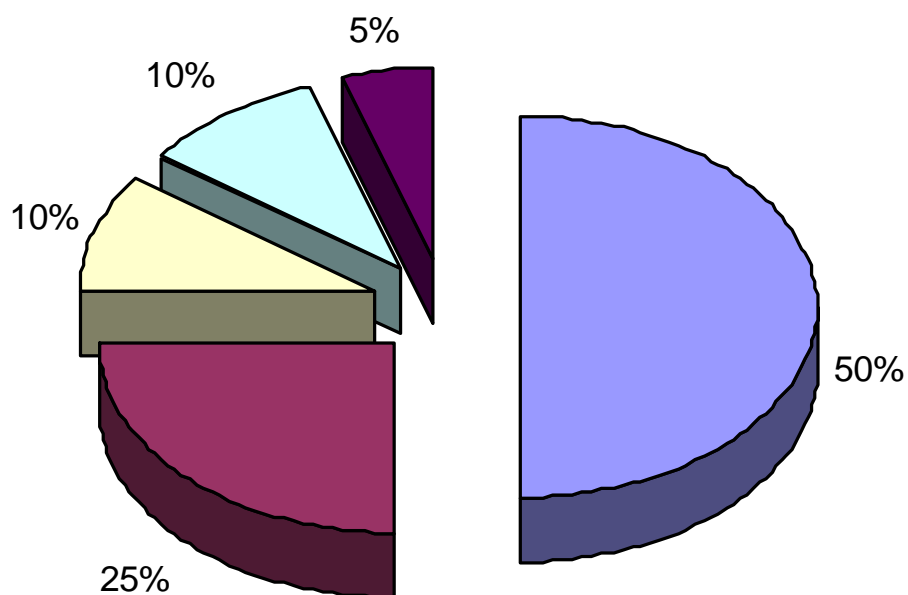


DIAGNOSI DIRETTA





DIAGNOSI INDIRETTA



- ELISA varie
- sieroneutralizzazione
- fissazione del complemento
- immunofluorescenza indiretta
- immunoblotting





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana



La diagnosi di infezione virale:

- ✓ Tecniche di amplificazione dell'acido nucleico virale
- ✓ Ricerca di anticorpi o degli antigeni virali
- ✓ Ricerca del virus





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Approccio Combinato



Piano Nazionale di controllo per Arterite Virale Equina

- ✓ controllo sierologico
- ✓ controllo virologico su seme



Test ufficiale isolamento del virus da Liquido Seminale

Animale non escretore in assenza di isolamento virale in tre prelievi successivi

- ✓ Tessuto coltura → virus infettante
- ✓ PCR real time → genoma virale

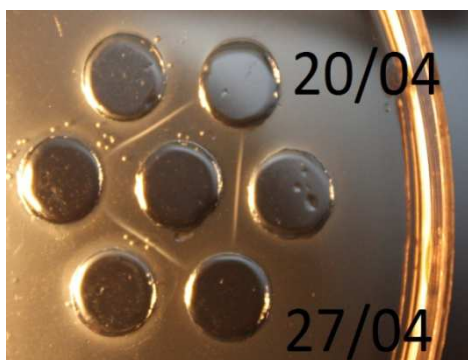




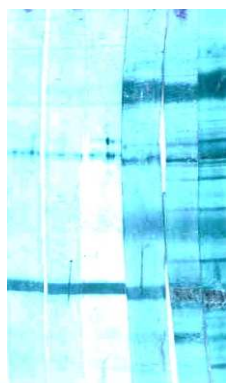
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

ANEMIA INFETTIVA EQUINA

ELISA



AGID



gp90

gp45

p26

Immunoblotting

positività per p26

+ una delle due proteine dell'envolepe

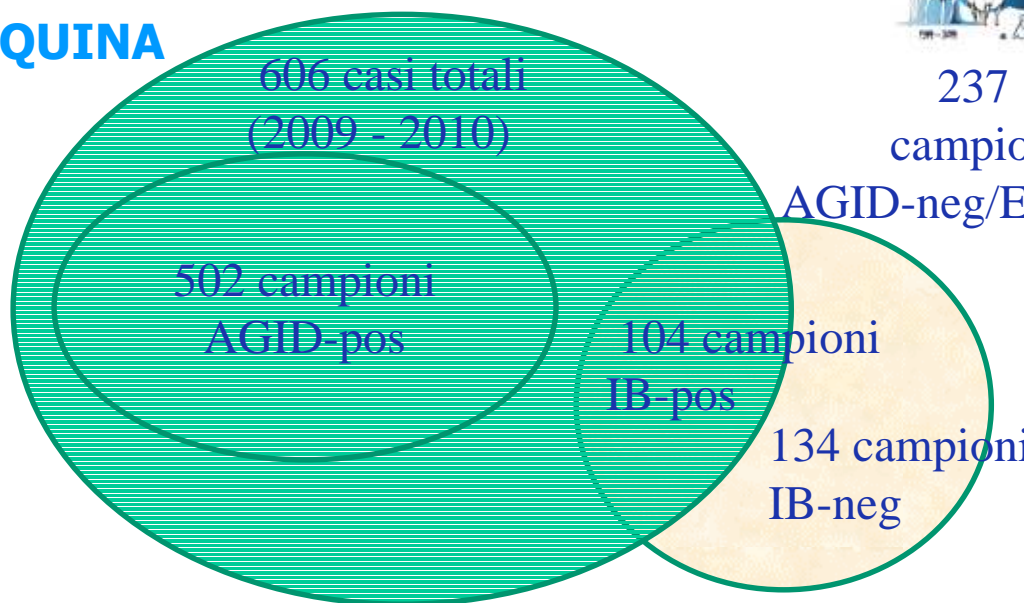
Approccio Combinato



237

campioni

AGID-neg/Elisa-pos



N. casi confermati	Confermati in AGID	Elisa Pos/AGID neg	Confermati in Immunoblotting	casi persi senza ELISA
606	502	237	104 (44%)	104/606 (17%)

Aumento della sensibilità del Sistema





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Approccio Combinato: test in parallelo



RABBIA

- ✓ IF rabbia: test di screening rapido
- ✓ Ricerca diretta del genoma virale tramite PCR classica o Real Time
- ✓ Isolamento su colture cellulari N2A





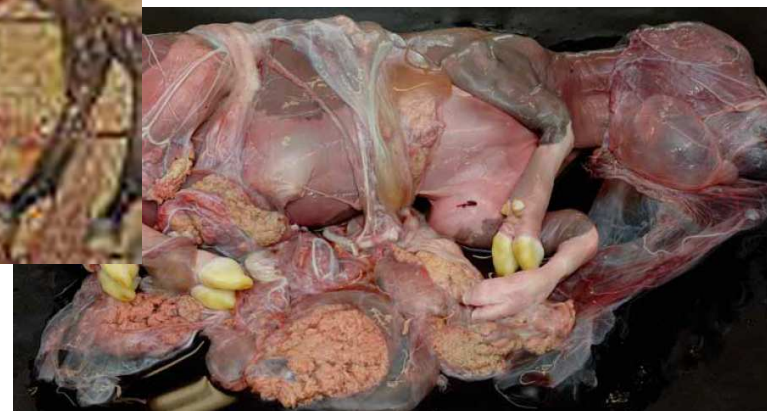
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Approccio Combinato



Leptospirosi

- ✓ Prova sierologica: MAT
- ✓ Prova PCR
- ✓ Prova di isolamento



- ✓ Siero fetale
- ✓ organi





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana



Approccio Combinato

Cimurro

- ✓ Immunofluorescenza morbillivirus
- ✓ PCR genere *morbillivirus* + sequenziamento





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Approccio Combinato



Babesia caballi e Theileria equi

- ✓ ELISA anticorpi
- ✓ PCR
- ✓ IFI

soggetti

ELISA positivi vs PCR
negativo





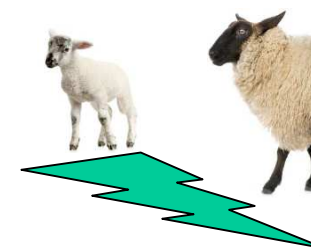
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Approccio Combinato



Contenuto intestinale

- Kit ELISA Ag specifico x Corona-Rotavirus-E.coli K99
 - PCR Parvovirus cane e gatto
- +
- ME ultracentrifuga: metodo "catch all" – "open view"





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Approccio Combinato



Cetacei

sospetto diagnostico non esiste: trovati spiaggiati e in cattivo stato di conservazione

- Consensus PCR per la famiglia *herpesviridae* mammiferi e rettili; Morbillivirus (2 protocolli)
- TC – non esiste una linea cellulare specie specifica

Rettili

(bioparchi , pets- tartarughe e serpenti)

- Consensus PCR per la famiglia *herpesviridae*
- TC – ME (tamponi, contenuto intestinale)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Approccio Combinato

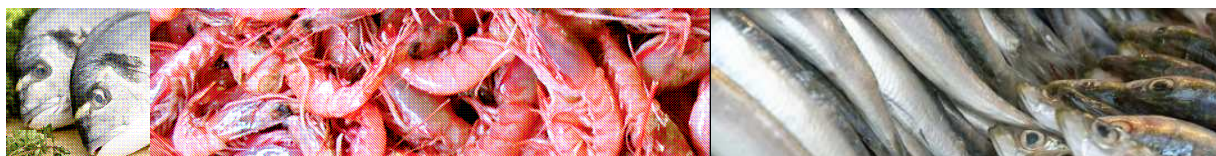


- ✓ Virosi Api
- ✓ PCR 7 virus principali (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV, SBV)
- +
- ✓ ME ultracentrifuga:
metodo "catch all" "open view"
(Virus Filamentoso, Iridovirus, CWV)



Pesci o sospetto diagnostico o piano nazionale

- TC (metodo ufficiale per il piano nazionale IHN, VHS con due line cellulari e due passaggi)
- PCR real time

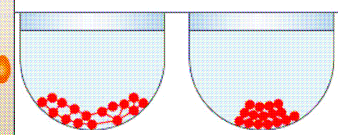
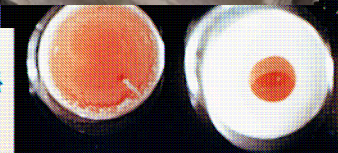
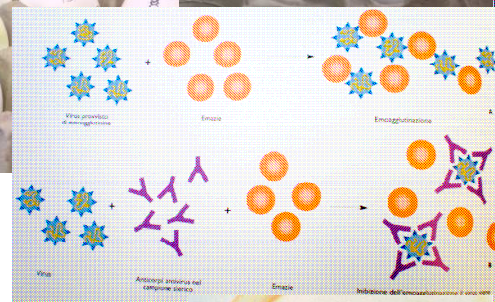
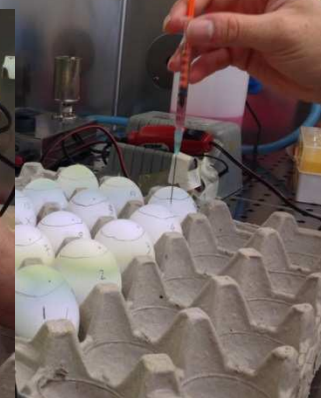
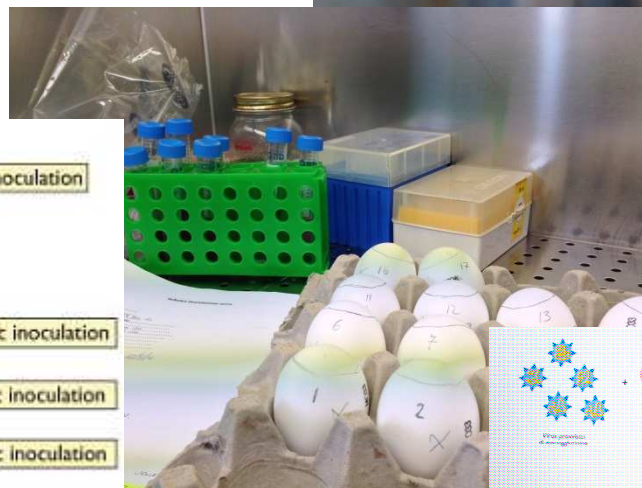
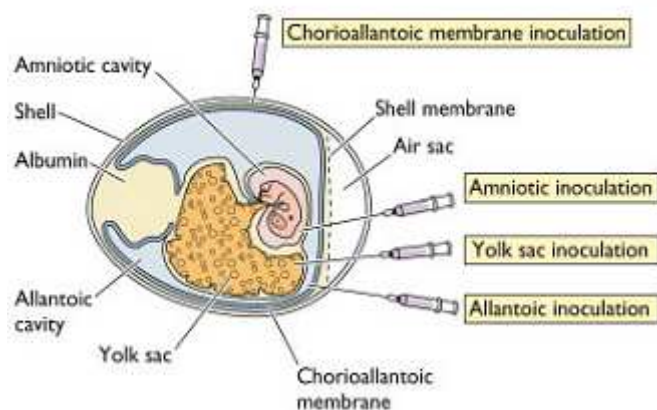


Approccio Combinato



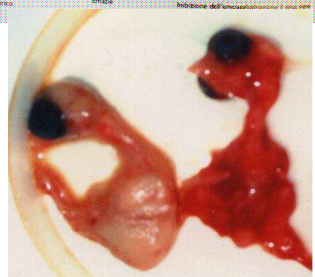
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Uova embrionate....



- ✓ Importante partire da un sospetto diagnostico
- ✓ Differenti vie di inoculo per differenti famiglie virali

In assenza di HA o lesioni specifiche apprezzabili nell'embrione – risulta importante associare altri metodi diretti es. la ME



BT virus
cherry red embryo

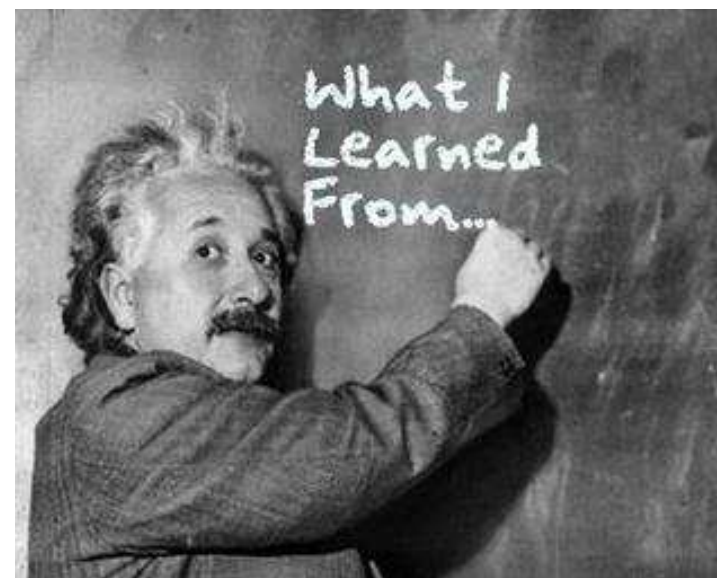


Lesioni da Pox Virus
della CAM



Obiettivo: arrivare ad una diagnosi

- ✓ orientamento diagnostico
- ✓ matrici idonee
- ✓ appropriatezza delle prove
- ✓ combinazione di prove e tecniche
- ✓ attenzione al SIL
- ✓ interpretazione dei risultati





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana



Thank You!

