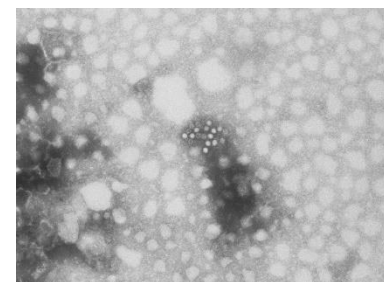


Microscopia Elettronica e Diagnosi Virologica Veterinaria: Principi, Strumentazione e Metodiche



Giusy Cardeti

Lab. Microscopia elettronica e Virologia speciale



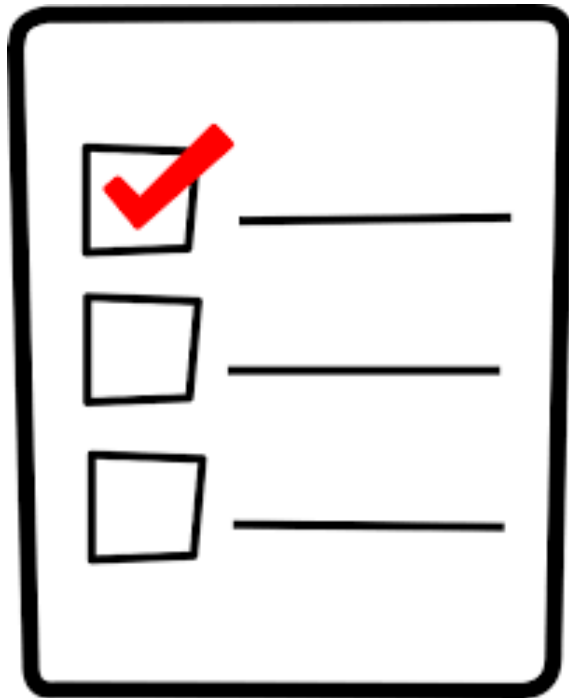
Finalità

Fornire una rassegna sull'uso
della microscopia elettronica in
colorazione negativa per
l'evidenziazione e
l'identificazione di particelle
virali in campioni animali

Descrizione
procedure eseguite
presso il laboratorio
di ME-VS dell'IZSLT



Indice degli argomenti trattati



- × **Microscopio Elettronico**
- × **Metodi di preparazione**
- × **IEM**
- × **Conclusioni**



Premessa

Il microscopio elettronico viene da tempo
utilizzato per più scopi:

in campo biomedico, negli studi ed
applicazioni industriali e commerciali di
metallurgia ed elettronica, in biologia
vegetale



M. OTTICO



M. ELETTRONICO

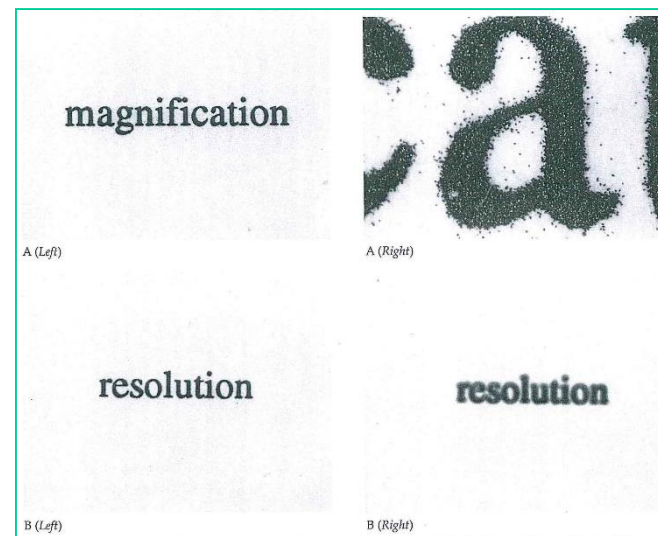
200 nm

0,1 nm

- ✗ Il M.E. presenta molte caratteristiche comuni al M.O., ma ha un **potere di risoluzione** maggiore
- ✗ Potere risolutivo del microscopio: la più piccola distanza alla quale due punti possono essere visti come distinti

TABLE 6.1 Electromagnetic Radiations

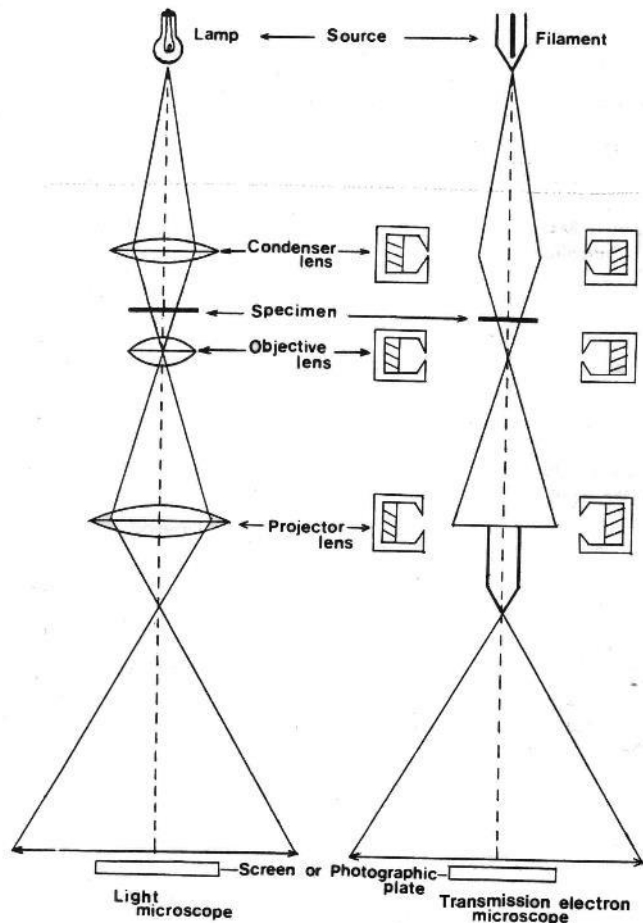
Radiation Type	Wavelength Ranges (meters)	Usual Source	Usual Detector
Radio		Transmitter	Receiver
AM	545–188		
FM	3.40–2.79		
Television	5.55–0.34		
Microwaves	3×10^{-1} – 3×10^{-3}		
Infrared (heat)	3×10^{-3} – 8×10^{-7}	Hot Objects	Thermometers, Thermocouples, Nerve Cells
Visible Light	8×10^{-7} – 4×10^{-7}	Electric Filament, Hot Objects	Photocell, Photographic Film, Eye
Ultraviolet	4×10^{-7} – 1×10^{-9}	Electric Filament	Photocell, Photographic Film
X Rays	1×10^{-9} – 1×10^{-11}	Impact of electrons on metal target	Photographic Film, Ionization Chamber, Geiger Counter
Gamma Rays	$< 1 \times 10^{-11}$	Radioactive Nuclei	Ionization Chamber, Geiger Counter
Accelerated, 60 kV electrons in microscope	5×10^{-12}	Electric Filament	Viewing Screen, Photographic Film



- ✗ La risoluzione è inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda del fascio luminoso



Confronto M.O. vs M.E.



M.O.		M.E.
lampadina o luce solare	sorgente	filamento a V di tungsteno o esaboruro di lantanio
vetro prismatiche	lenti	Elettromagnetiche /statiche
aria, vetro, olio	mezzo	alto vuoto (10^{-6} torr)
movimento della lente dell'obiettivo	fuoco	modificazione dell'intensità del campo magnetico dell'obiettivo
vetro (1-2 mm)	supporto	film di supporto (formvar, carbone) di 50-200 Å disteso su dischetti metallici (griglie) di 2-3 mm di Ø
occhio + fotografia	osservazione	idem ma tramite schermo fluorescente

Parti costitutive TEM

SISTEMA DI ILLUMINAZIONE

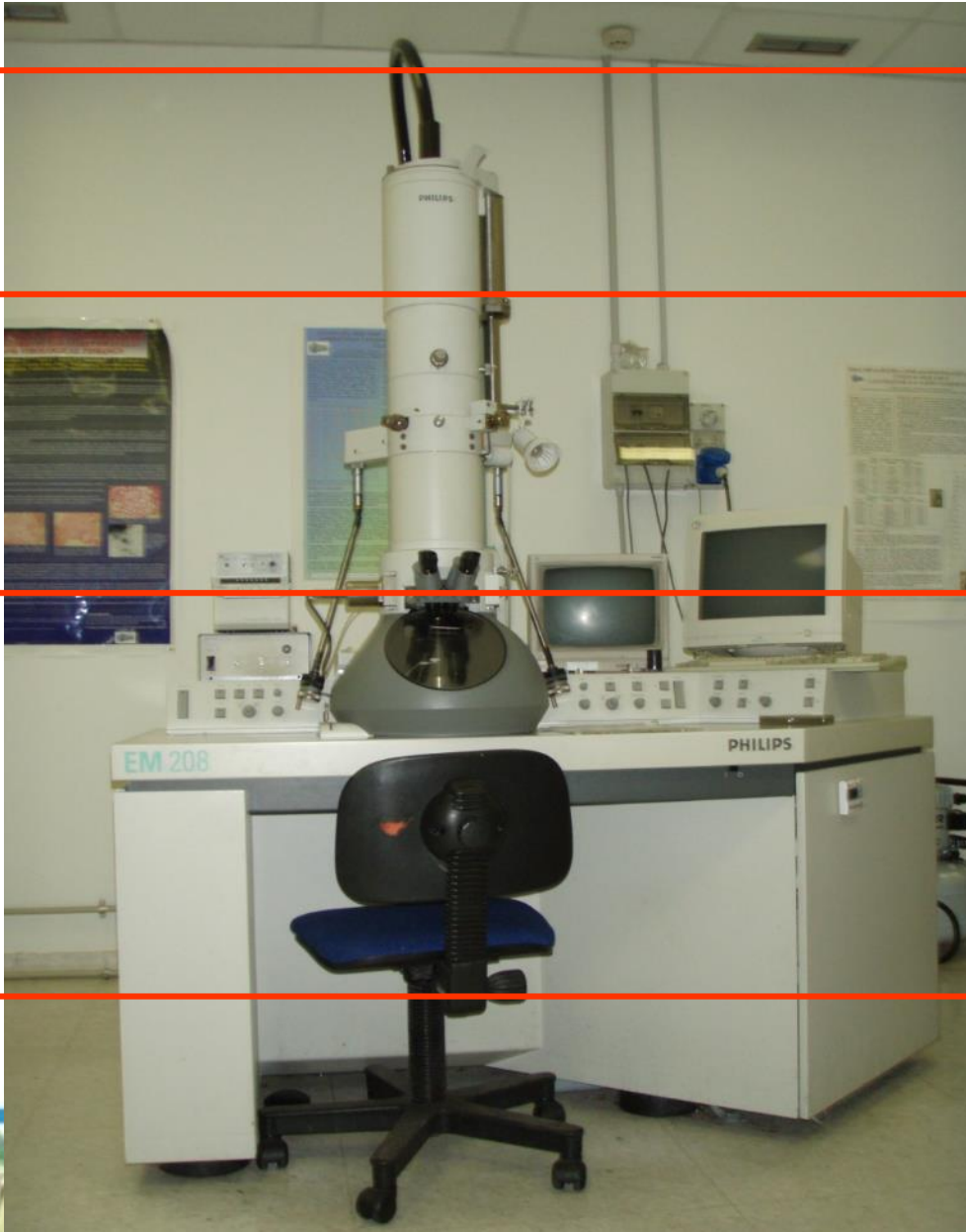
“electron gun”
condensatore

SISTEMA FORMANTE L' IMMAGINE

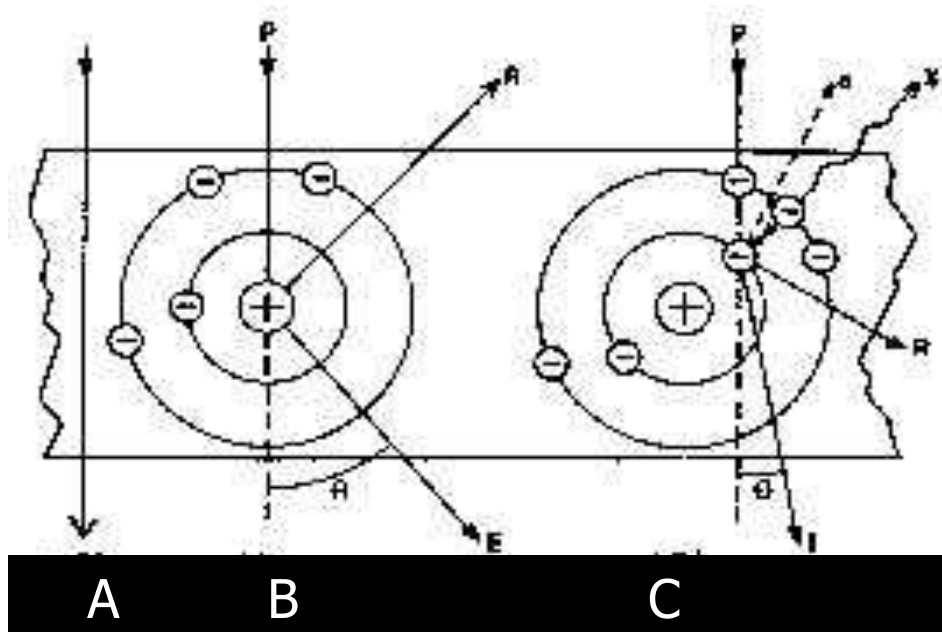
obiettivo
lenti intermedie
lente del proiettore

SISTEMA DI TRASLAZIONE DELL' IMMAGINE

schermo fluorescente
lastre fotografiche
telecamera + monitor (opt)



Sistema formante l'immagine

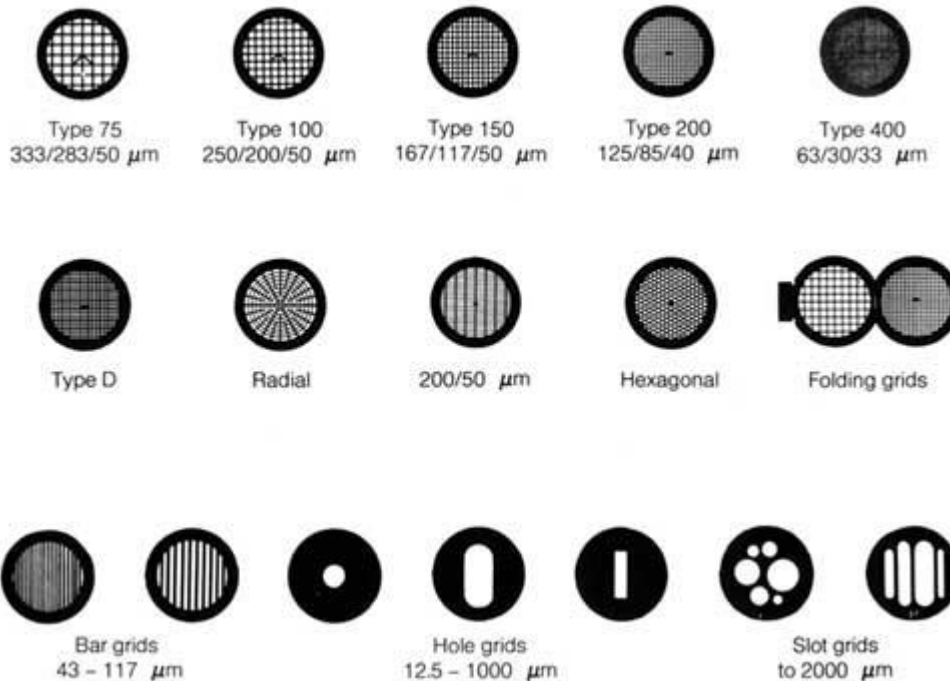


I differenti ingrandimenti si ottengono con le differenti associazioni di lenti e delle loro lunghezze focali

Quando gli elettroni attraversano un campione, quelli che non incontrano alcun ostacolo (es. atomi di metalli pesanti usati nelle colorazioni) non deviano dalla loro direzione (**A**), mentre quelli che sono intercettati (**B** e **C**), danno origine ad una **immagine** che è **raccolta e messa a fuoco dall'obiettivo** e quindi ingrandita dalla combinazione delle lenti (diffrazione, intermedia e del proiettore) che costituiscono il **SISTEMA FORMANTE L'IMMAGINE**

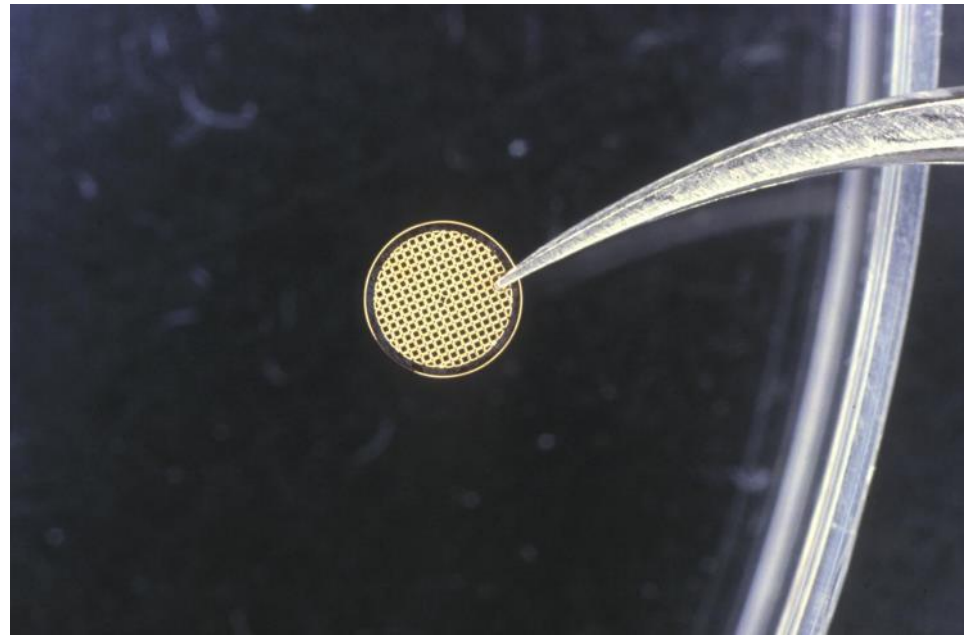
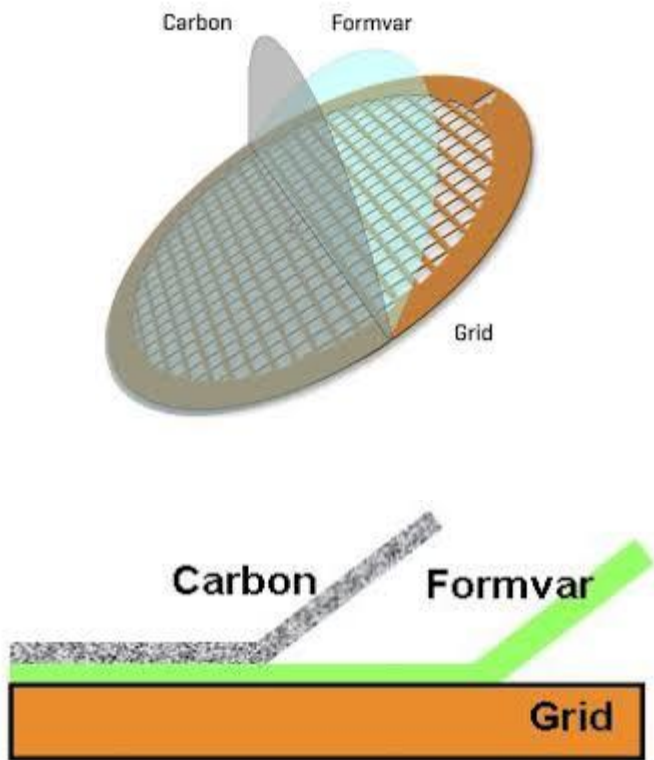


Campione e supporto

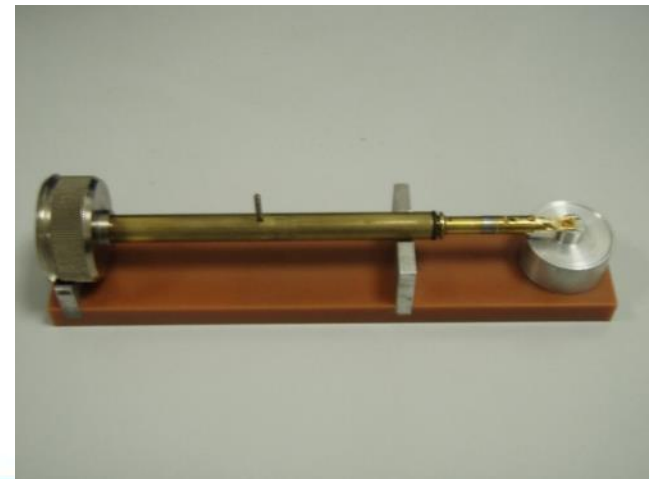


- ✘ Essendo il vetro non permeabile agli elettroni il campione deve essere posto su una **griglia** rivestita di un materiale simile alla cellulosa (Formvar) sottilissimo e trasparente agli elettroni
- ✘ Le griglie possono avere disegno a rete o a buchi (**mesh**)

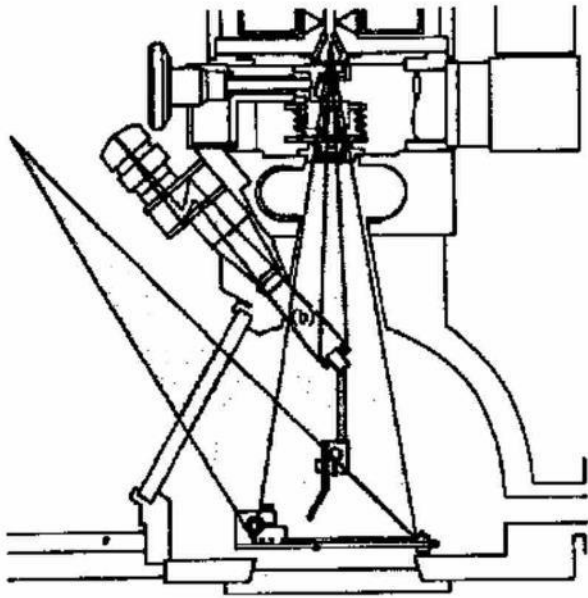




- ✗ Vengono poste su un portacampioni (anche multiplo) che poggia su un piatto manovrabile dall'esterno nei due sensi con manopole traslatrici.



Sistema di traslazione dell'immagine



- ✗ Immagine prodottasi dall'interazione fascio/campione -> visualizzata solo tramite schermo fluorescente (emissione di luce visibile quando bombardato dagli elettroni)
- ✗ Piccoli dettagli -> osservabili con binoculare (10-20x) direttamente su un piccolo schermo realizzato con grana molto fine

- ✗ Scarsa risoluzione, bassa intensità luminosa e limitato spettro cromatico nonché -> necessita di immagini perduranti nel tempo e ad elevato ingrandimento -> trasferimento delle immagini in **fotografia**
- ✗ Oggi su **fotocamera digitale** che trasferisce le immagini (ingrandite) su monitor TV + software x analisi di immagine



Microscopia Elettronica

METODI

❖ METODI ULTRAISTRUTTURALI

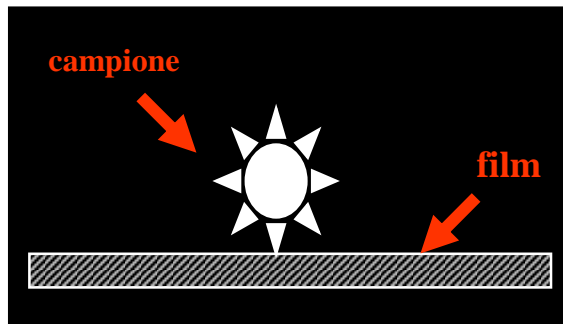
- ❖ Su tessuti fissati e inclusi
- ❖ Scarsamente utile per routine diagnostica (lungo e dispendioso)

❖ COLORAZIONI POSITIVA E NEGATIVA

- Per la diagnosi di microrganismi presenti in sospensioni acquose (almeno $10^3/\text{ml}$)
- Diagnostica virologica di routine (rapida e semplice)

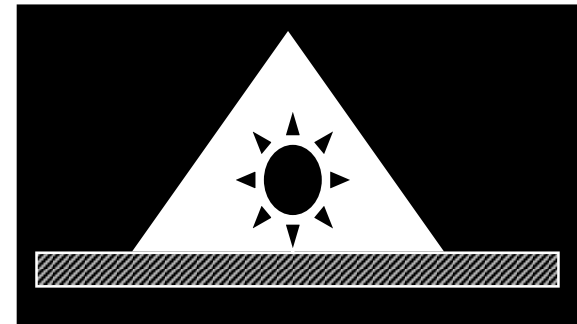


Colorazione positiva e negativa



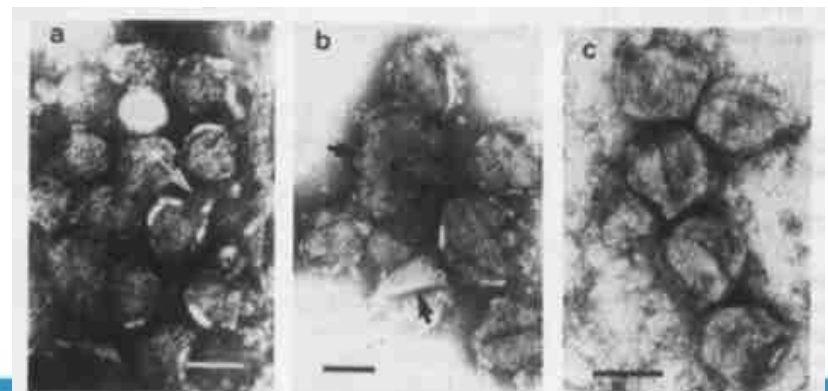
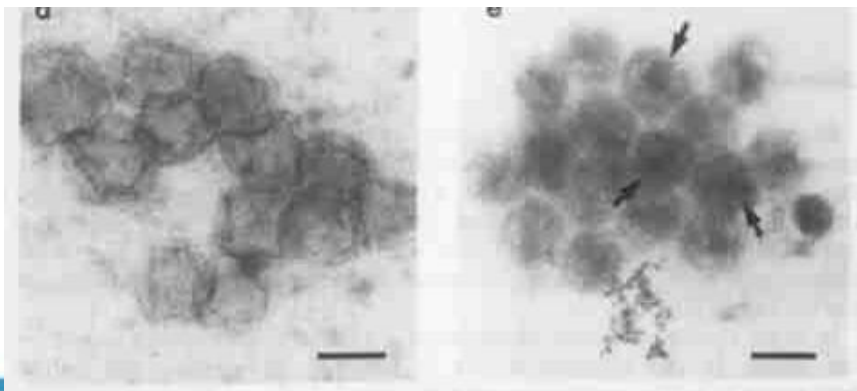
POSITIVA

- acetato d'uranile
- citrato di piombo
- NaPT pH acido (4,5)



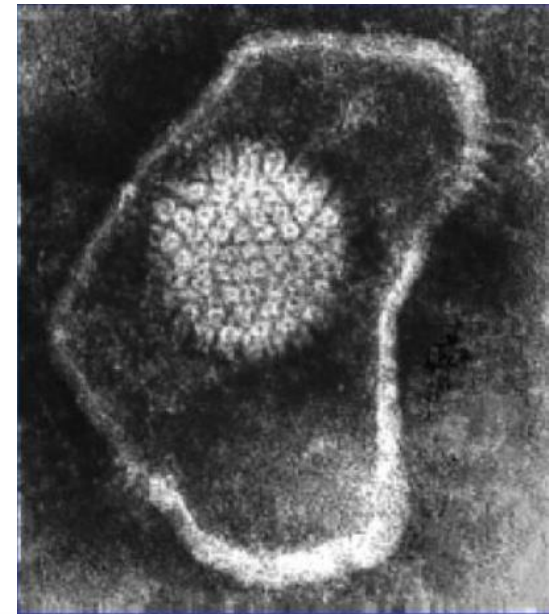
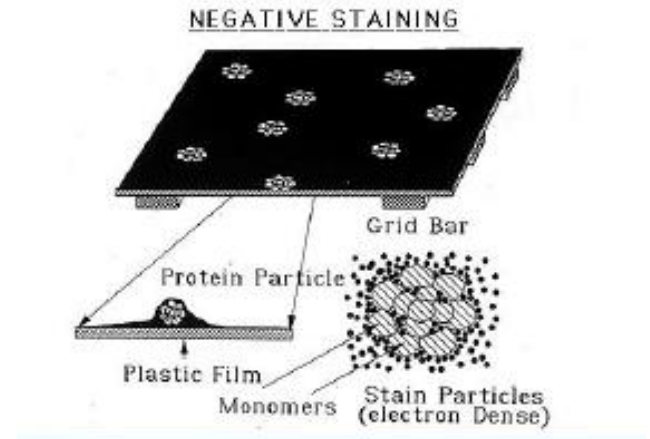
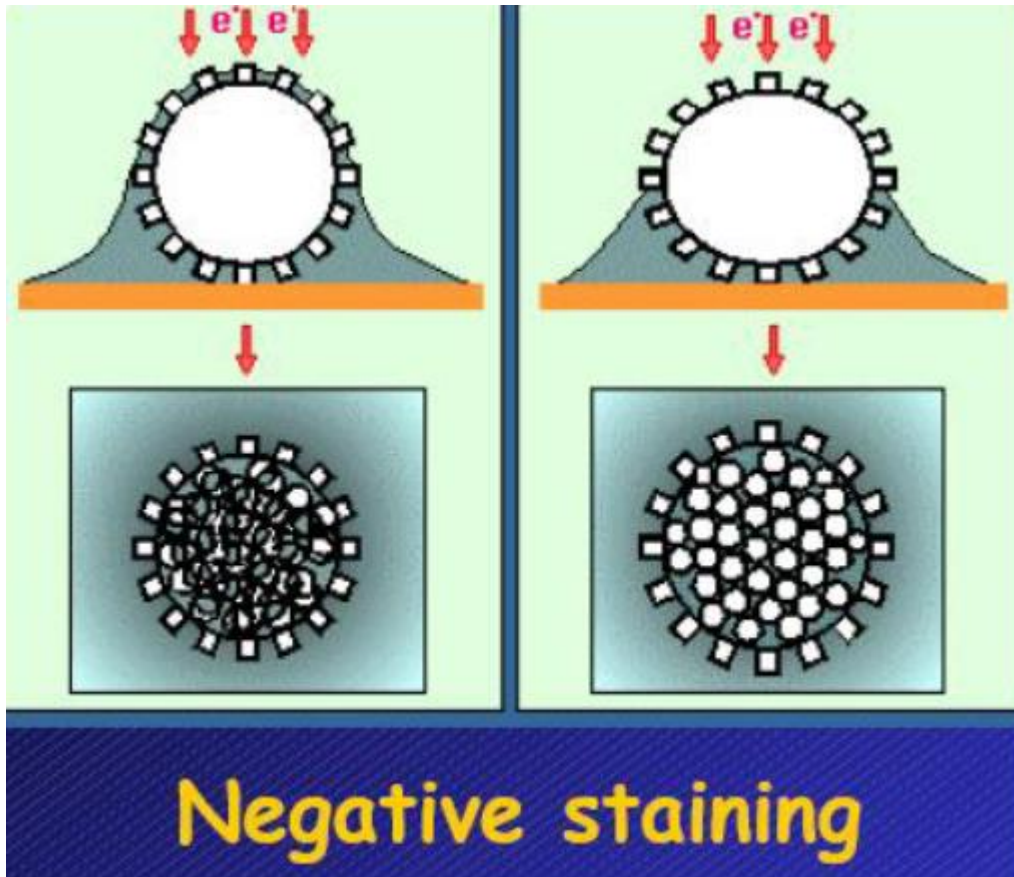
NEGATIVA

- NaPT pH neutro (7,2)
- Molibdato d'ammonio



Colorazione negativa

NaPT pH 7,2



Metodi di colorazione negativa

Vantaggi:

- semplicità e rapidità di esecuzione
- buona conservazione, contrasto e risoluzione
- necessità di scarse quantità di campione e colorante

Svantaggi:

- ✓ limitata allo studio di particelle isolate in sospensione
- ✓ necessità di elevata concentrazione di particelle ricercate (almeno 10^3)



**PARTICOLARMENTE UTILI
IN DIAGNOSTICA VIROLOGICA**



Schema di lavoro nella diagnostica virologica

Materiale ed anamnesi
(dati epidemiologici, clinici, patologici)

Dimostrazione diretta del virus

Dimostrazione indiretta del virus

Senza coltura del Virus

Con coltura del Virus
- Colture cellulari - Animali
- Uova embrionate

Microscopia Elettronica
Visualizzazione
morfologica

Istologia
Presenza corpi inclusi
Immunofluorescenza
Metodi immunoistochimici

Sierologia
(antigene sconosciuto
anticorpo conosciuto)

Biologia Molecolare
PCR
Western Blotting
Ibridazione in situ

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

Metodi sierologici
(antigene conosciuto
anticorpo sconosciuto)



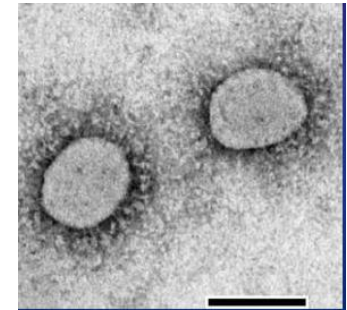
Test
Neutralizzazione
Emoagglutinazione
Fissazione del complemento
Precipitazione
Immunofluorescenza
Radioimmunoassay
ELISA

Prerogative dell'indagine in ME

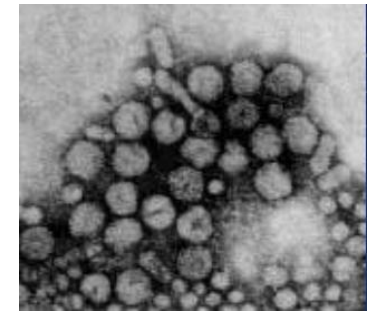
Vantaggi

- Rapidità
- Evidenzia virus che non possono essere isolati o identificati tramite metodi sierologici e biomolecolari
- Evidenzia infezioni miste
- Evidenzia particelle che non crescono in CC (virus Epatite B)
- Specificità

Virus SARS



HBV



Svantaggi

- Limitato a pochi laboratori (costi per lo strumento e personale specializzato)
- Sensibilità variabile in rapporto al metodo di preparazione utilizzato
- Non idoneo per virus che non presentano caratteristiche morfologiche peculiari
- Morfologia identica nell'ambito di uno stesso genere (ovviabile con IEM)



Riconoscimento morfologico virus

INDISPENSABILE:

mantenere le caratteristiche strutturali costitutive
dell'elemento in esame

BASATO SU:

- forma, dimensioni, simmetria
- numero e grandezza dei capsomeri,
- presenza, forma, dimensioni proiezioni periferiche
- organizzazione dell'acido nucleico

valore identificativo



**FAMIGLIA e GENERE DI APPARTENENZA
+ IEM**



SPECIE, TIPO



Scelta e prelievo dei campioni

Il prelievo deve essere:

- corredato da **notizie anamnestiche**
- accurato e finalizzato al sospetto diagnostico nei soggetti che mostrano **sintomi iniziali**
- protetto da **danni fisico-chimici** (eccesso di T°C, pH estremi, disinfettanti, luce, irradiazione ed essiccamento)
- conservato a **T°C di congelamento**
- conferito al laboratorio nel più **breve tempo**



Materiale patologico - 1

(attendibilità della risposta)

App. gastroenterico	fece	+++++
	contenuto intestinale	+++++
	tamponi fecali	++++
	porzioni di tessuto	++++
	linfonodi regionali	+

App. respiratorio	tamponi nasali	++
	raschiati tracheali	+++
	frammenti polmonari	++
	essudato seni nasali	++

App. urogenitale	tamponi vaginali	++
	feti e annessi fetali	++
	sperma	+
	urine	+



Materiale patologico - 2

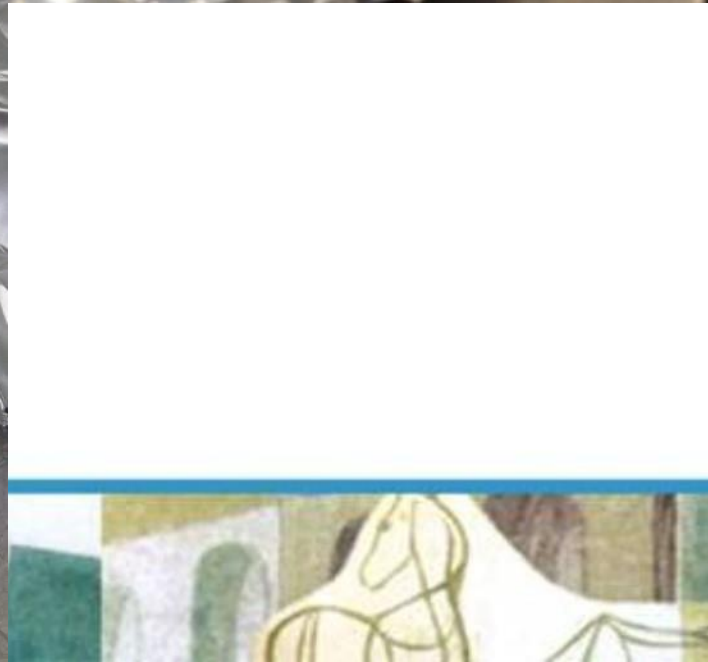
(attendibilità della risposta)

App. cutaneo	croste, papule, vescicole	+++++
	papillomi	+++++
	peli, piume	++

App. nervoso	porzioni di encefalo	++
	gangli nervosi	+

Altro:	frammenti d'organo (milza, rene, fegato, pancreas, amigdale, cuore etc.)	++++
	uova e liquidi embrionari	+++
	sangue	+

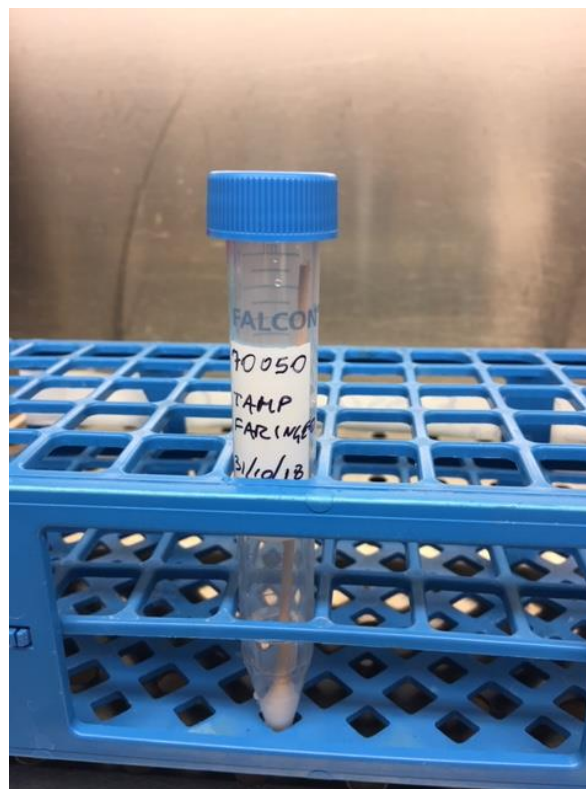
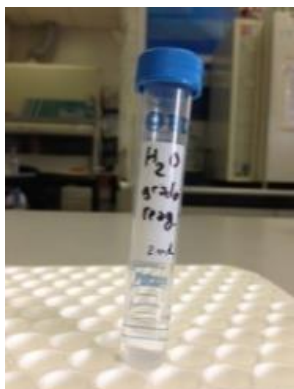
Mat.patologico - Lesione cute di Stenella





Mat.patologico – Rima palpebrale di coniglio





ME

✓ in Acqua grado reagente o
soluzione fisiologica

✓ a +4°C o a -20°C

Mat. Patologico - Tamponi; raschiato cutaneo



Mat.patologico - Intestino

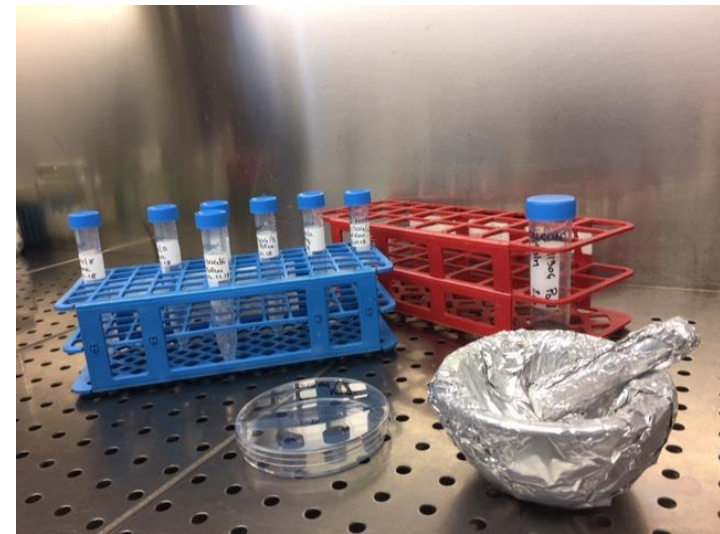




Materiale patologico: organi



Materiali e utensili specifici

[illegible]

Colorazione negativa per diagnosi virale

- Su sospensioni virali
- Facile e veloce da eseguire
- Utile per identificare virus non coltivabili
- e associazioni virali
- Livello di sensibilità buono
(*dipende dal metodo utilizzato*)

Metodo	Soglia di detectabilità	Tempo
Metodo della goccia	10^6 - 10^8 particelle/ml	Pochi minuti
Metodo Airfuge	10^4 - 10^6 particelle/ml	~3 ore
IEM-Airfuge	10^3 - 10^4 particelle/ml	~ 4 ore
IEM-Gold	10^3 - 10^4 particelle/ml	~ 5 ore

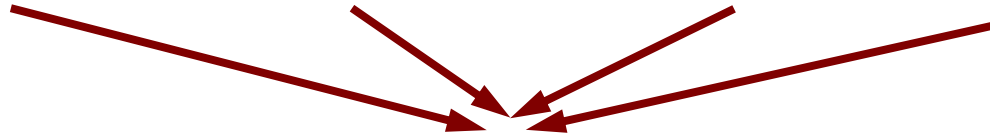
Metodo della goccia

Tessuto colture
(surnatante)

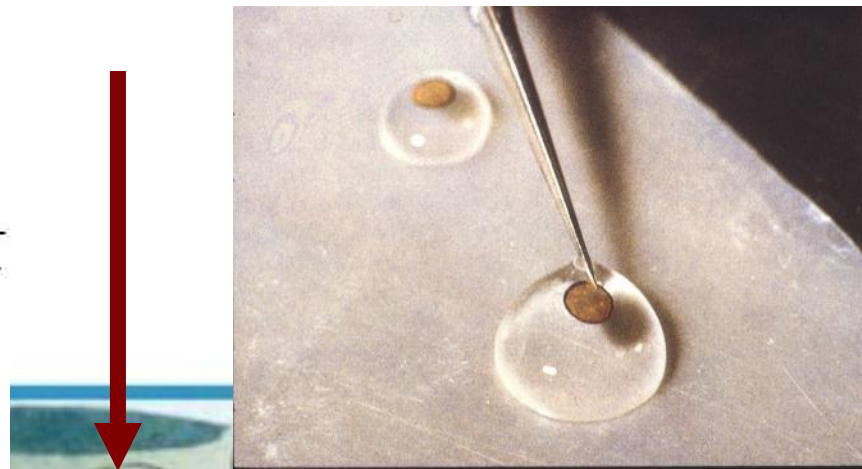
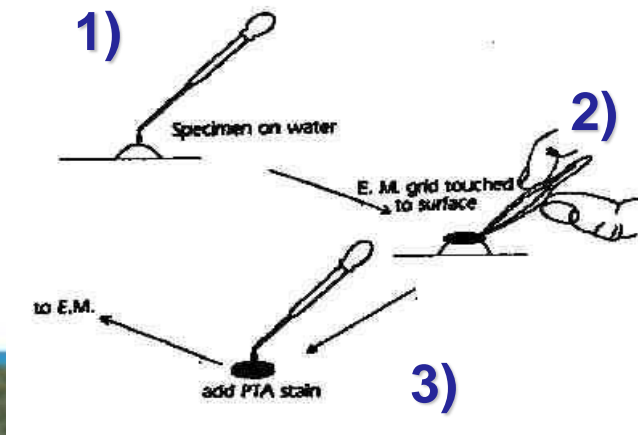
Sospensioni
(virus purificato)

Liquidi
embrionari

Croste, pustole,
vescicole, papillomi



- 1) Su parafilm, 10-50 μ L di sospensione acquosa di virus (dopo eventuale sonicatura o fissazione in glutaraldeide 0,2%)
- 2) Porre una griglia a flottare con la faccia rivestita di formvar sulla goccia x 15-20 min
- 3) Lavare in gocce di acqua grado reagente e mettere a contatto con 50 μ L di NaPT 2% x max 3'

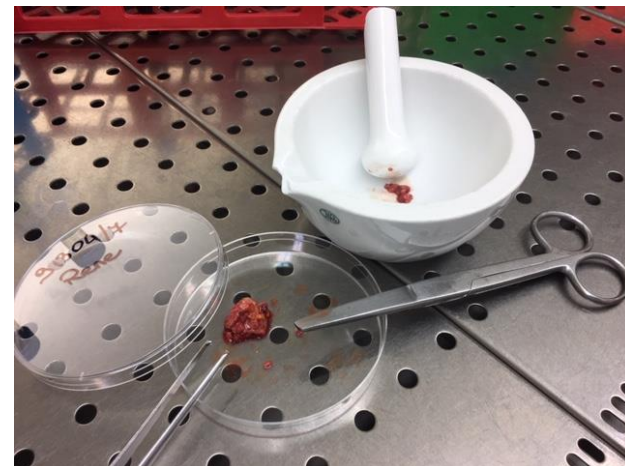


Osservazione 80kV – 22.000- 28.000x

Metodo "Airfuge" - parte 1

1) Omogenizzazione del campione

- **1:5 o 1:10 w/v in acqua grado reagente**



2) CENTRIFUGAZIONI a bassa velocità **3.000 e 9.000 g x 30 min.**

3) IEM STEP

Incubazione con siero a 37 °C x 1 hr

4) ULTRACENTRIFUGAZIONE Airfuge Beckman *21 psi per 20 min*

5) COLORAZIONE NEGATIVA *2% NaPt pH 6.8-7,2 per 2 min*

6) OSSERVAZIONE *TEM - 80 kV a 28.000x*

Apparecchiature

- *Centrifuga*



- *Microcentrifuga*



Metodo "Airfuge" - parte 2

1) Omogenizzazione del campione

- 1:5 o 1:10 w/v in acqua grado reagente

2) CENTRIFUGAZIONI a bassa velocità 3.000 e 9.000 g x 30 min.

3) IEM STEP Incubazione con siero a 37°C x 1 hr

4) ULTRACENTRIFUGAZIONE Airfuge Beckman 21 psi per 20 min

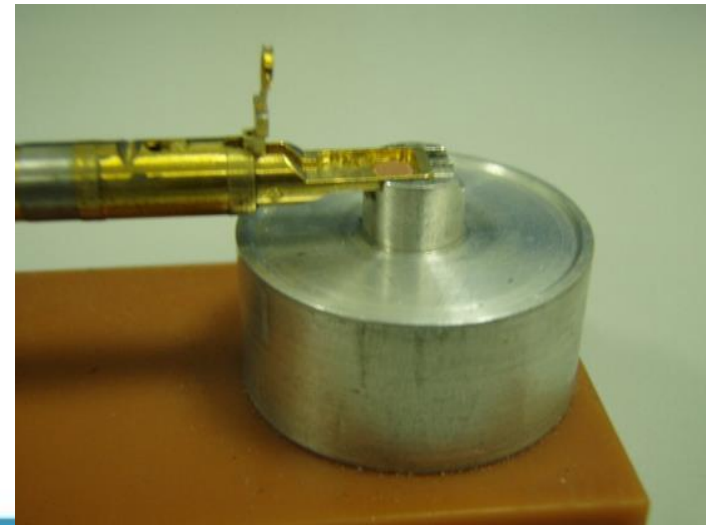
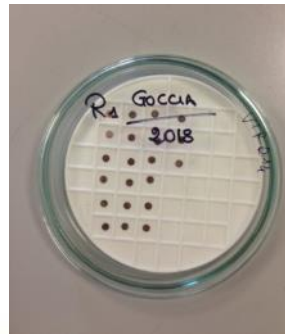
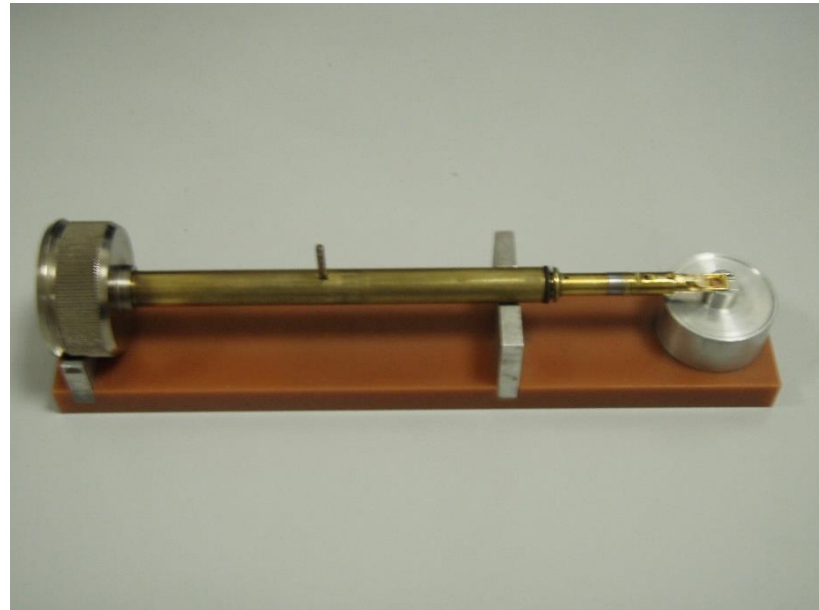
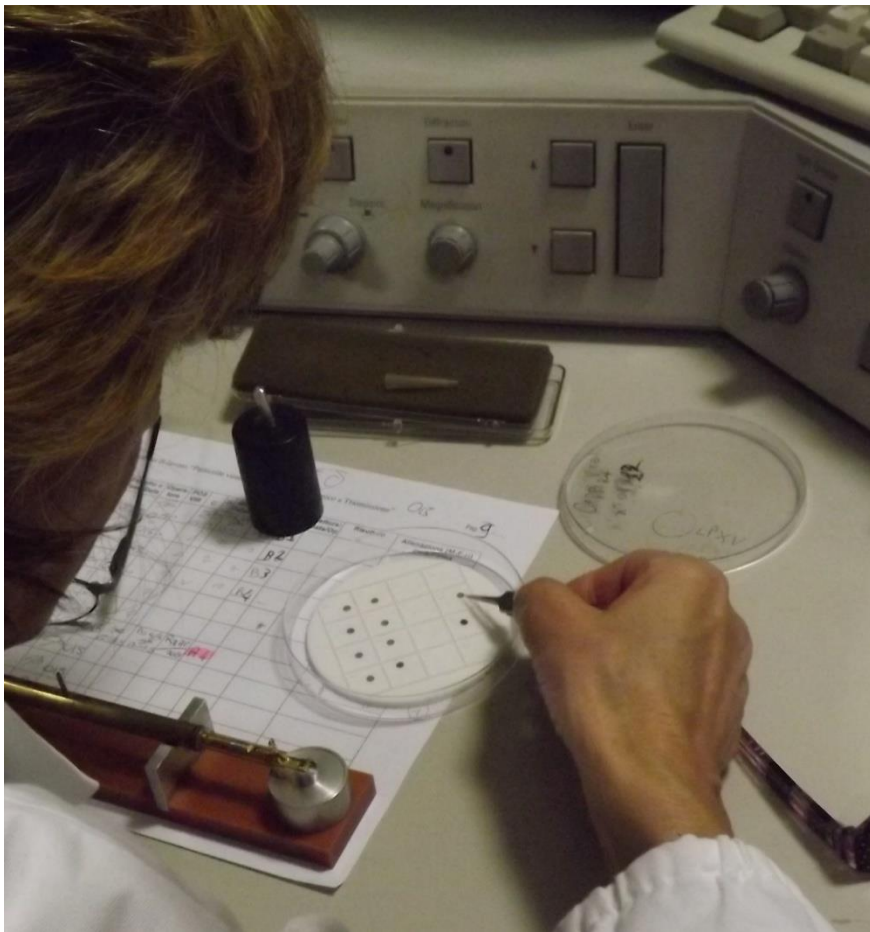
5) COLORAZIONE NEGATIVA 2% NaPt pH 6.8-7,2 per 2 min

6) OSSERVAZIONE TEM - 80 kV a 28.000x





Preparativi per Osservazione del campione al TEM



ImmunoElettronMicroscopia (IEM)



Più specifica: identificazione morfologica x maggiore specificità antigenica

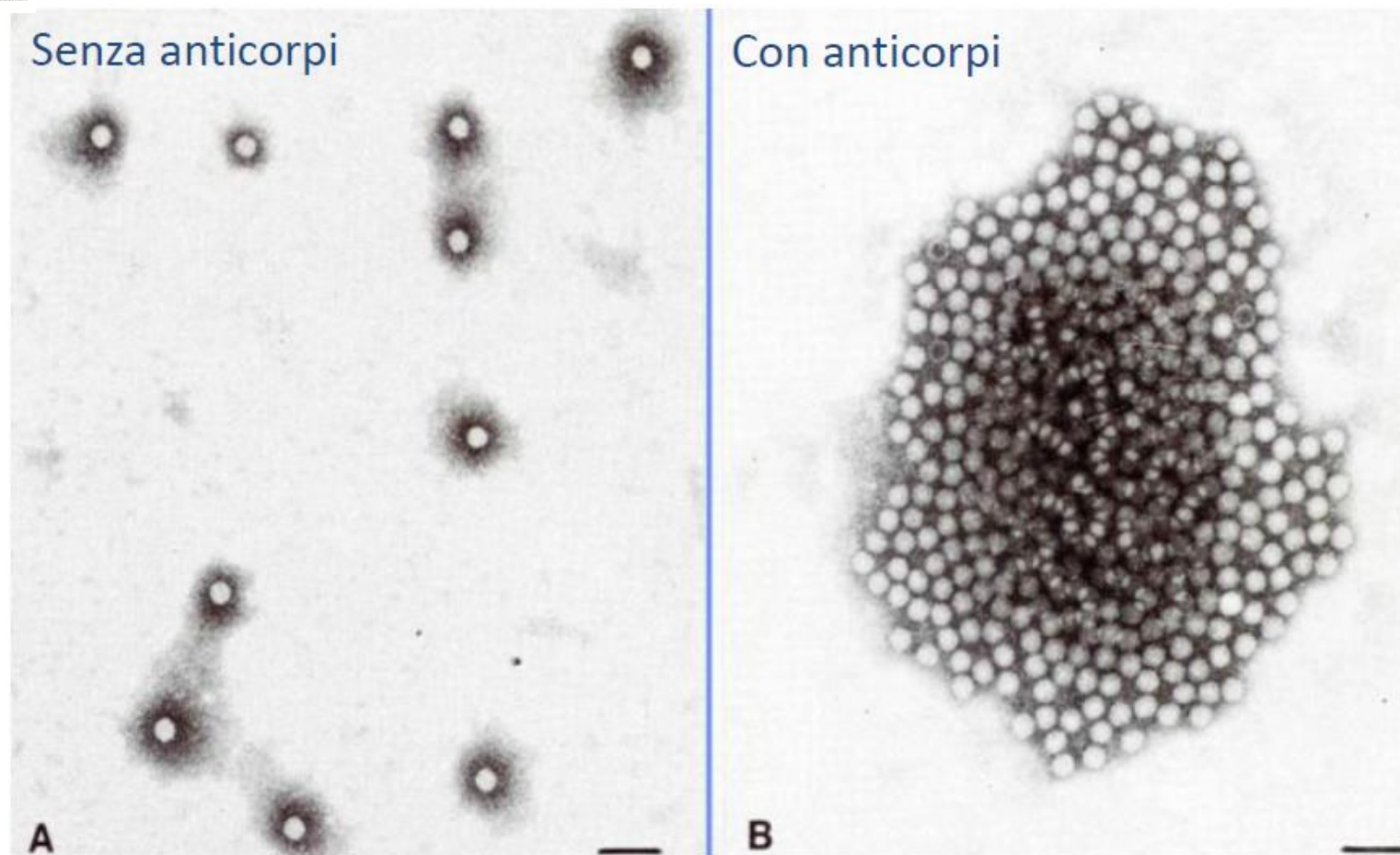
Più sensibile: identificazione di virus noti e sconosciuti

- *senza morfologia peculiare (pleomorfi, virus elusivi)*
- *in bassa concentrazione (10^2 - 10^3 arricchimento)*
- *in campioni "sporchi" (dimensione dei gruppi)*

ImmunoElettronMicroscopia (IEM)

- Aumenta sensibilità e specificità della microscopia elettronica utilizzando anticorpi **specifici** (identificazione conclusiva)
- Due varianti:
 - Classica (**IEM**)
 - Il campione è trattato con un antisiero prima di allestire il preparato per l'osservazione. Le particelle virali sono agglutinate dagli anticorpi e la loro aggregazione è più facilmente visibile.
 - Su fase solida (**SPIEM**)
 - Le maglie del 'retino' sono rivestite di anticorpi che adsorbono le particelle virali.





Poliovirus

Doane and Anderson "Electron Microscopy in Diagnostic Virology", 1987



Metodo "IEM Airfuge"

1) Omogenizzazione del campione

- 1:5 – 1:10 w/v in acqua grado reagente

2) CENTRIFUGAZIONI a bassa velocità 3.000 e 9.000 rpm x 30 min.

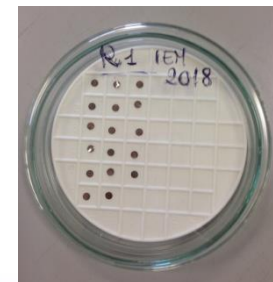
3) IEM STEP

Incubazione con siero a 37°C x 1 hr

4) ULTRACENTRIFUGAZIONE Airfuge Beckman 21 psi per 20 min

5) COLORAZIONE NEGATIVA 2% NaPt pH 6,8-7,2 per 2 min

6) OSSERVAZIONE TEM - 80 kV a 28.000x



Tipi di sieri utilizzati per IEM

- **Sieri Iperimmuni**
 - della stessa specie
 - di specie eterologhe
- **Anticorpi monoclonali**
- **Siero convalescente**

Perchè?

Virus emergenti o ri-emergenti come agenti eziologici di casi di malattia non diagnosticati

Possibile fallimento di metodi diagnostici alternativi a causa di

- 1. Mancanza di reagenti immunologici*
- 2. Indisponibilità di primers*
- 3. Sospetto clinico non indicativo*



Preparazione del siero convalescente

- ✗ Fare un pool di 2-10 sieri prelevati da animali convalescenti a distanza di 15-20 gg dopo la comparsa dei sintomi clinici
- ✗ Centrifugare a 10.000 rpm per 30 min
- ✗ Inattivare in bagnomaria a 56°C per 30 min
- ✗ Filtrare con filtri da 22 µm
- ✗ Esame al TEM: privo di particelle virali, altre particelle, lipidi e detriti proteici
- ✗ Saggiare il campione con diluzioni seriali
 - Inizialmente 1:2, 1:20, 1:200 e 1:1000.....
 -e, in funzione dei risultati, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 etc.



Esempi di utilizzo di sieri convalescenti per identificare virus “nuovi” ed emergenti mediante IEM

- ✕ Rotavirus Suino (PRoV)
- ✕ Virus Diarrea Epidemica Suino (PEDV)
- ✕ Circovirus Suino (PCV2)
- ✕ Torovirus Suino (PToV)
- ✕ Rota- e Astrovirus Tacchino
- ✕ Parvovirus-like Fagiano
- ✕ Lagovirus (RHDV e EBHSV)

Viruses **2015**, *7*, 2683–2703; doi:10.3390/v7052683

OPEN ACCESS

viruses

ISSN 1999-4915

www.mdpi.com/journal/viruses

Article

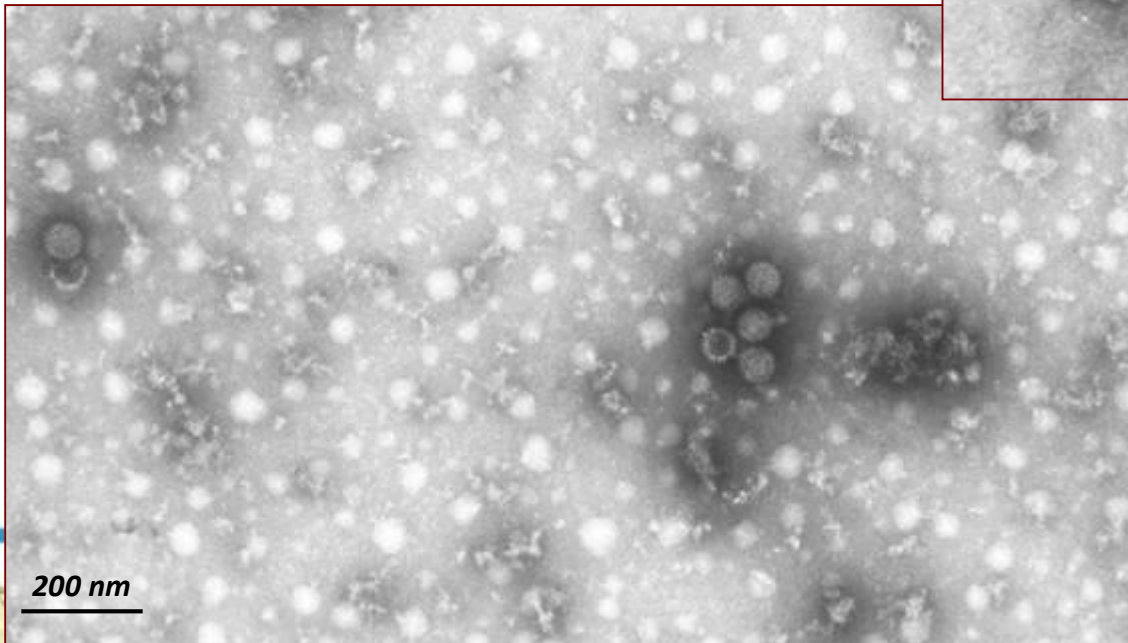
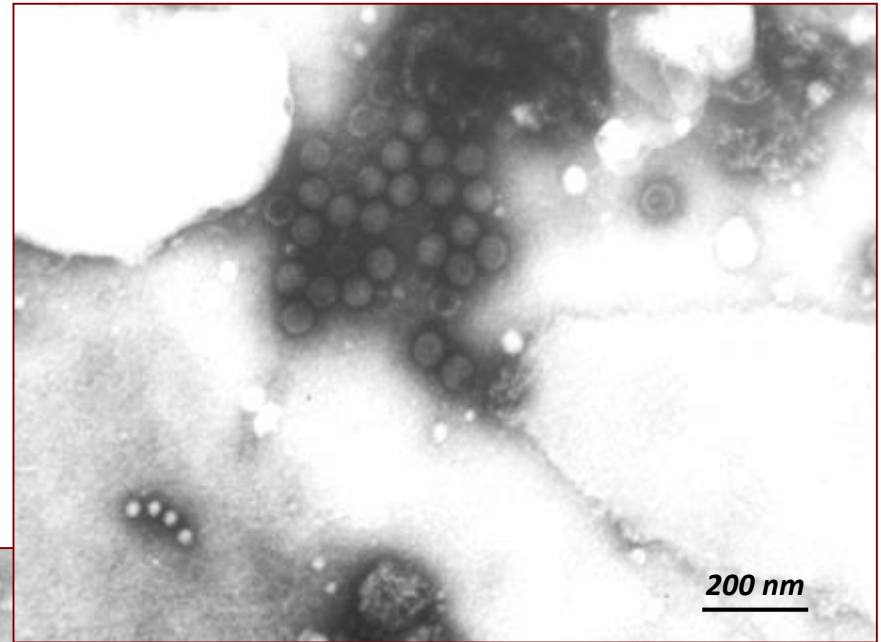
The Use of Convalescent Sera in Immune-Electron Microscopy to Detect Non-Suspected/New Viral Agents

Antonio Lavazza ^{1,*}, Cristiana Tittarelli ² and Monica Cerioli ³



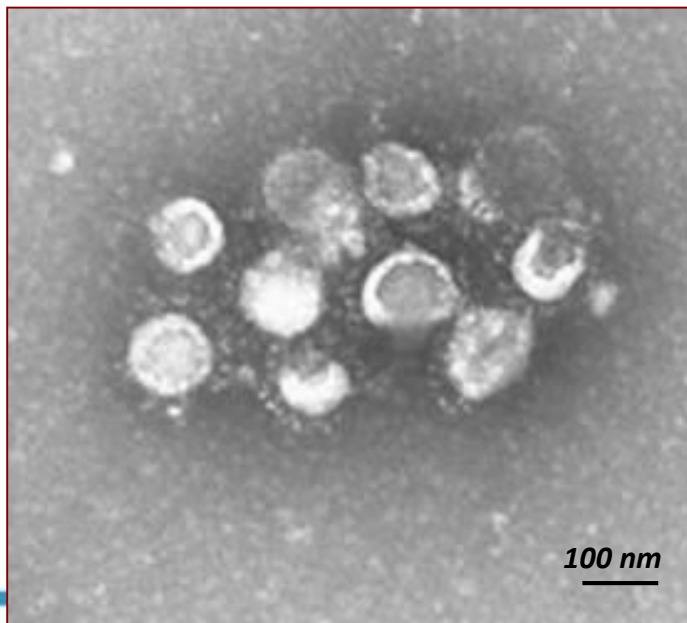
Rotavirus Suino

- ✕ Agenti primari di enterite
- ✕ Incidenza costante
- ✕ Spesso associati ad altri virus
- ✕ Siero convalescente: molti ceppi appartengono a **gruppi non-A**



Coronavirus della Diarrea Epidemica (PEDV)

- ✕ Uno dei quattro coronavirus del suino conosciuti (gruppo 1)
- ✕ Segni clinici non patognomonicici: diarrea, vomito
- ✕ Alta morbilità, bassa mortalità
- ✕ Identificato costantemente ed endemico in Italia
- ✕ Numerosi focolai riportati nel 2005-2006



100 nm

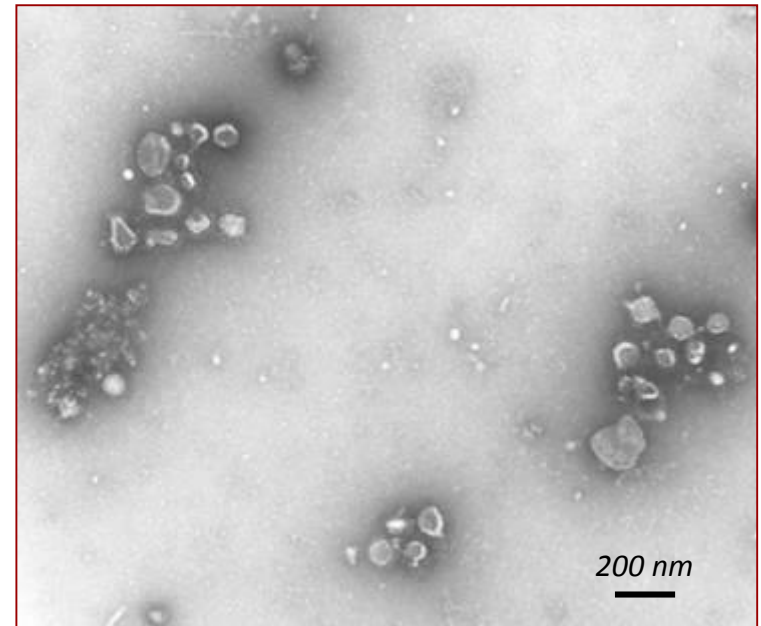
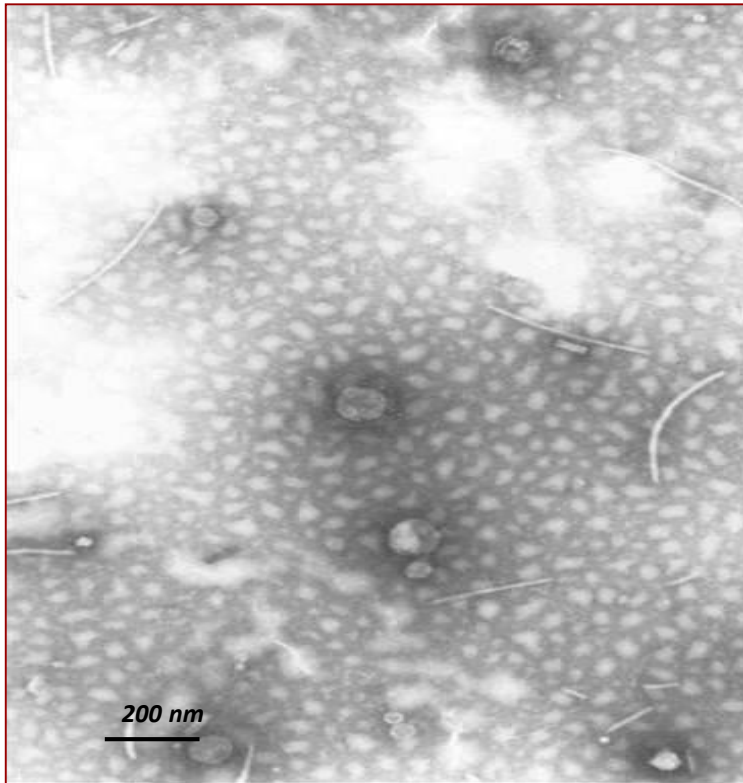
Veterinary Record (2008)
162, 307-310

Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy

P. MARTELLI, A. LAVAZZA, A. D. NIGRELLI, G. MERIALDI, L. G. ALBORALI, M. B. PENZAERT

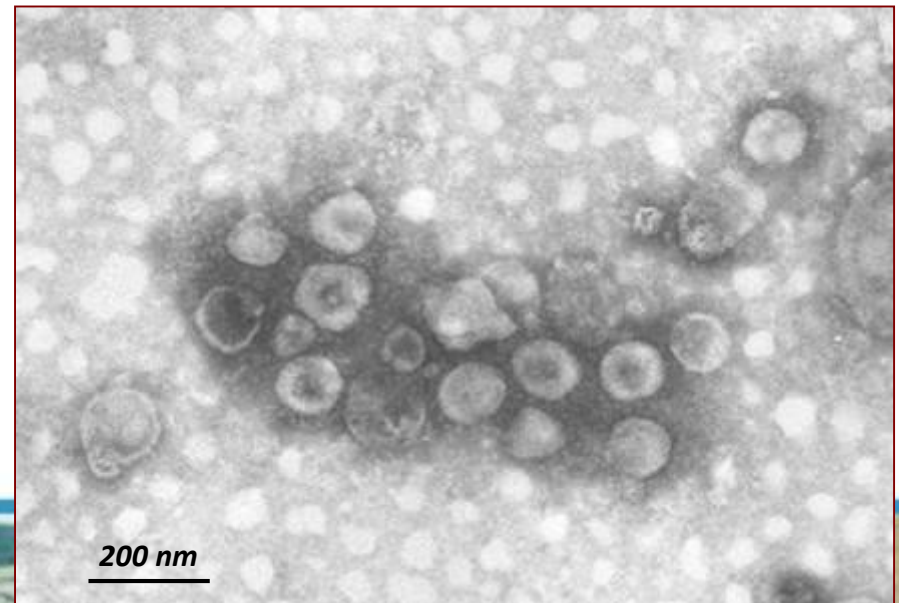
Virus PED mediante EM e IEM

Particelle singole



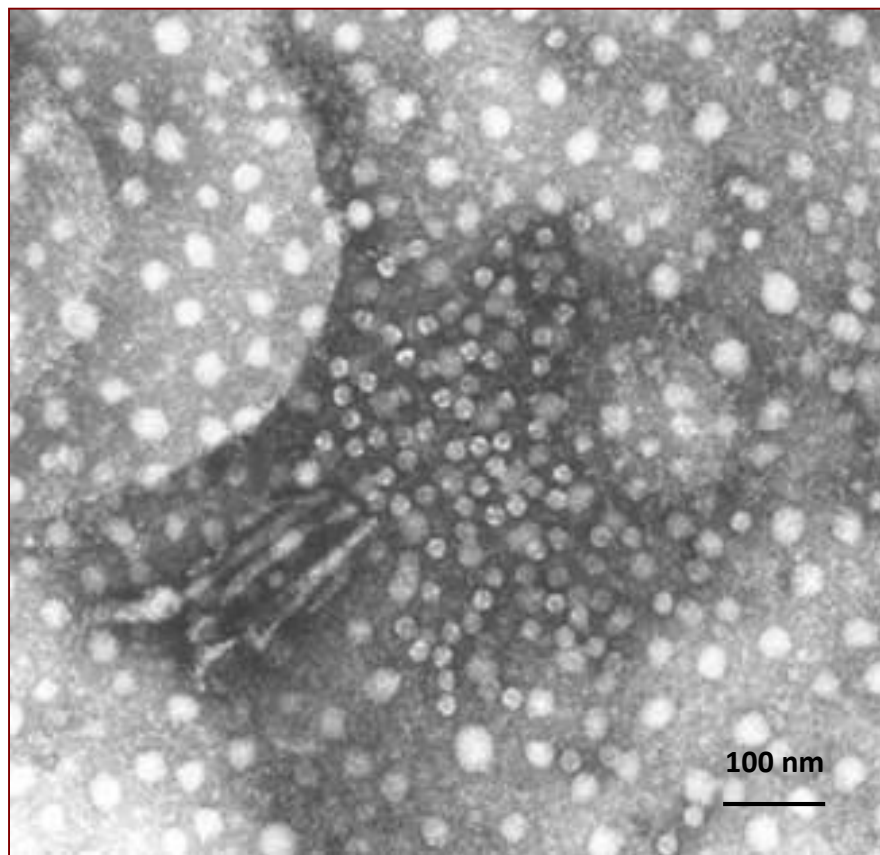
Siero Convalescente:

PEDV è difficile da diagnosticare: non isolabile *in vitro*, pochi reagenti e metodi standardizzati



Circovirus Suino (PCV-2)

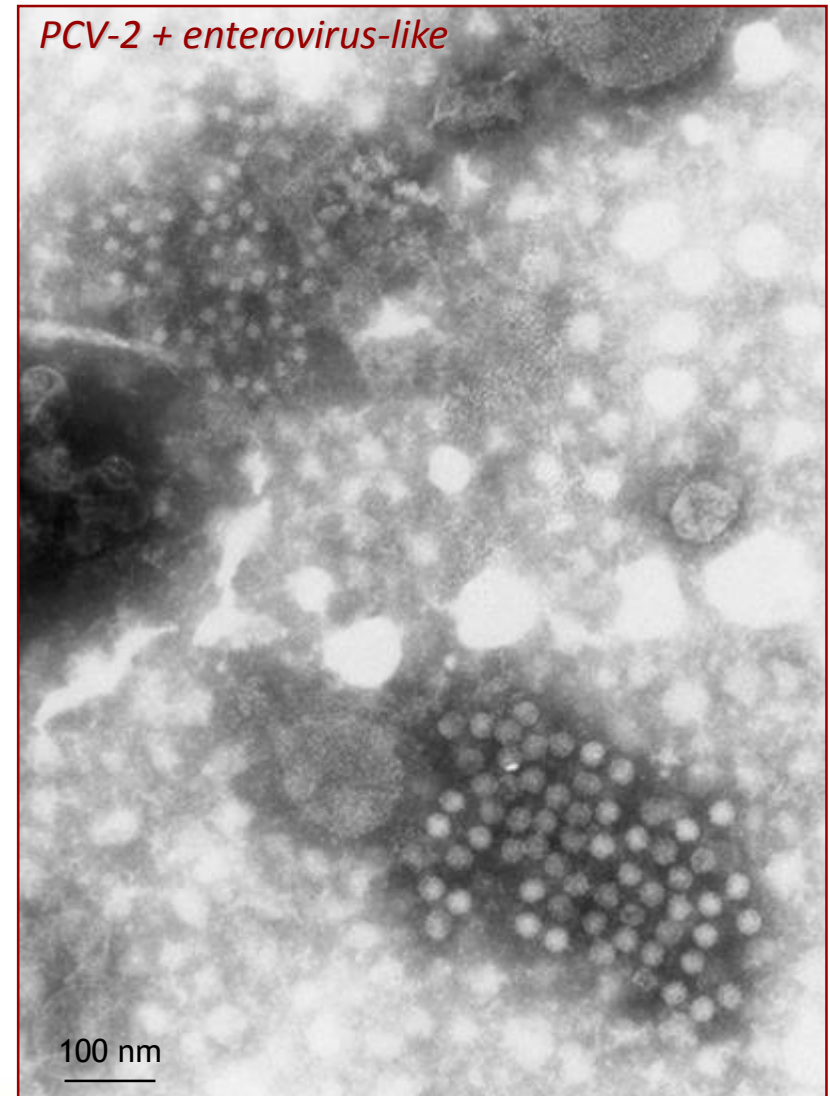
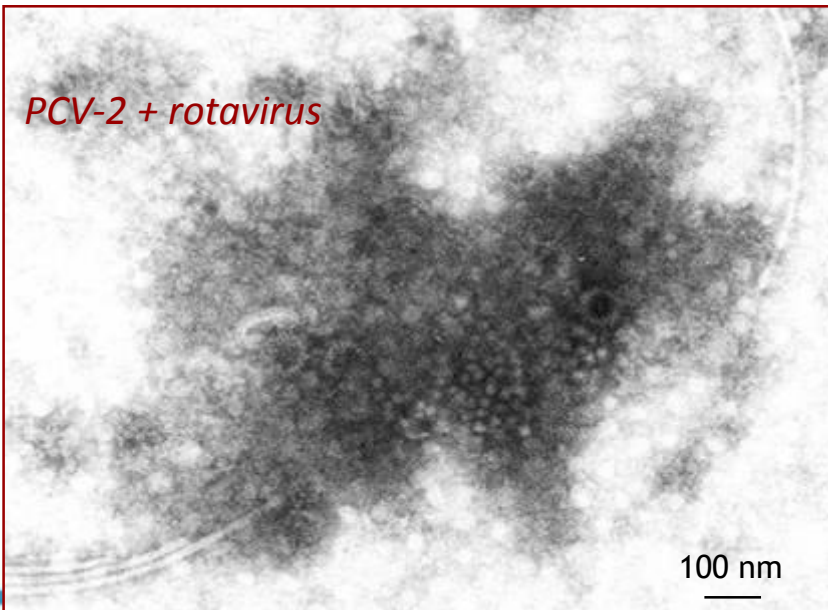
- ✕ Famiglia Circoviridae
- ✕ Virus ssDNA
- ✕ Privo di envelope
- ✕ Diametro **17 nm**
- ✕ PCV-1, non patogeno, isolato nel 1974 come contaminante delle PK15
- ✕ PCV-2 isolato nel 1991 e oggi associato con la Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS)



100 nm

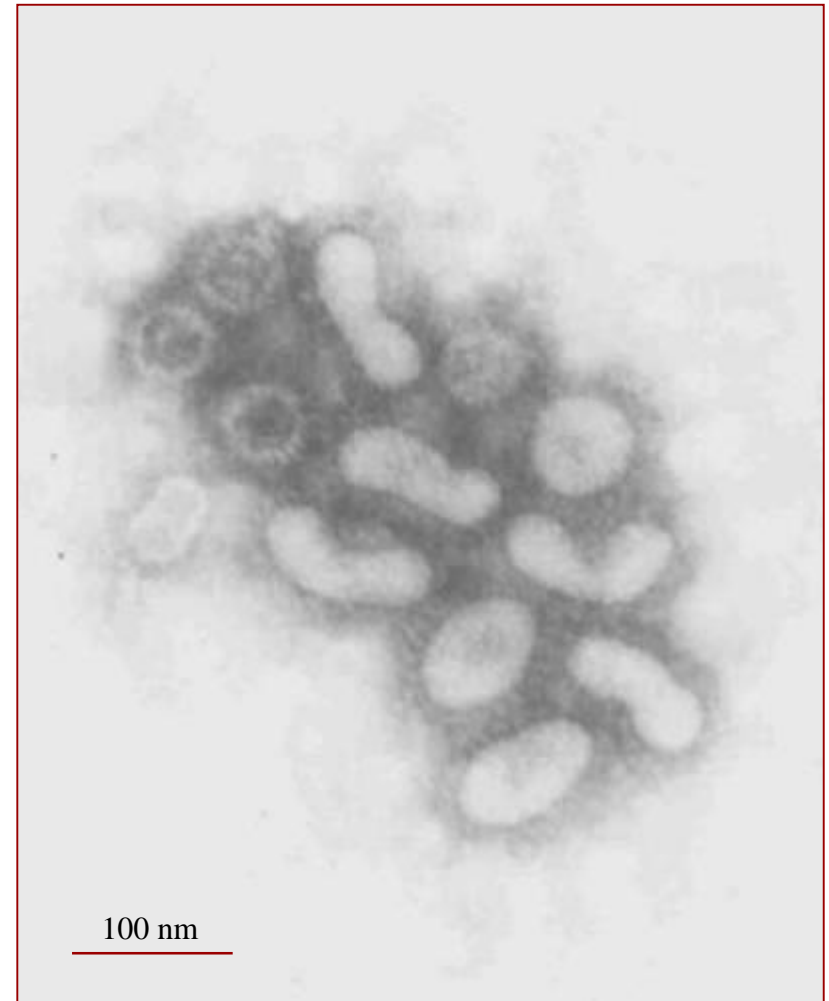
IEM PCV-2 con siero convalescente

- ✕ Siero convalescente : PCV-2 è frequentemente isolato da suinetti con quadri clinici di PMWS
- ✕ PCV-2 è spesso associato con altri agenti (effetto immunosoppressivo)



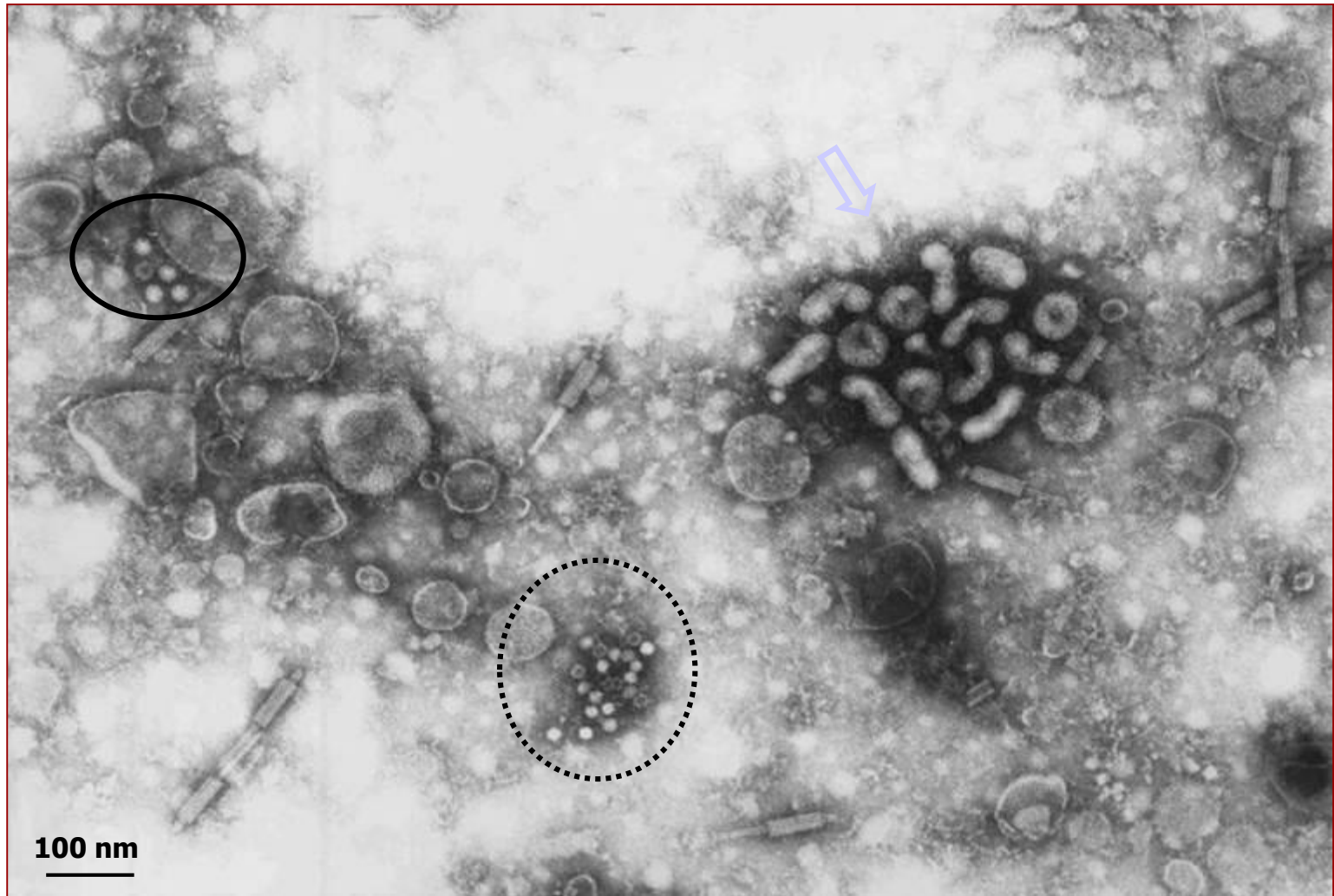
Torovirus Suino (PToV)

- ✕ Ordine *Nidovirales*
- ✕ Virus RNA pos-stranded
- ✕ Discoidale, forma reniforme o a bastoncino; nucleocapside tubulare; envelope con spikes 7-9nm
- ✕ Infezione enterica asintomatica nel **suino**
- ✕ Malattia diarroica grave e talvolta letale nel **bovino** (Bredavirus-BRV)
- ✕ Gastroenterite nell'**uomo**



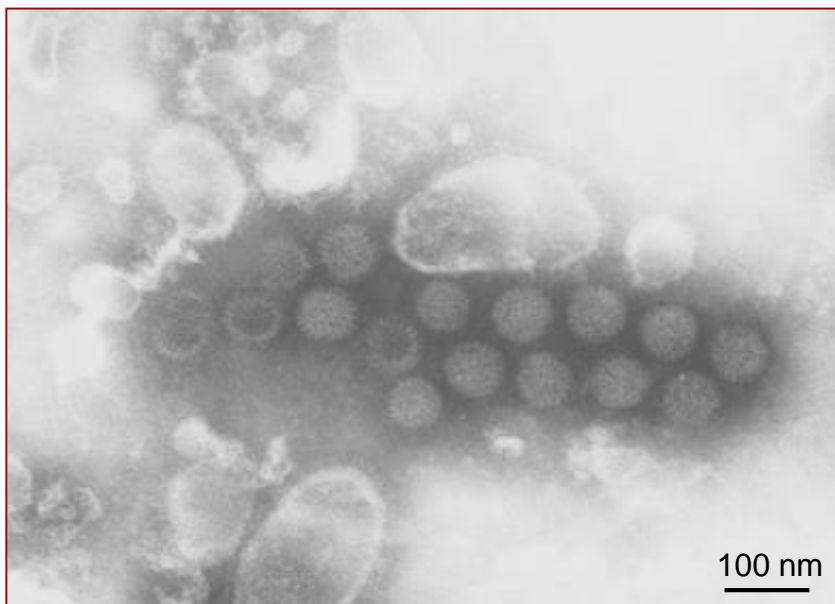
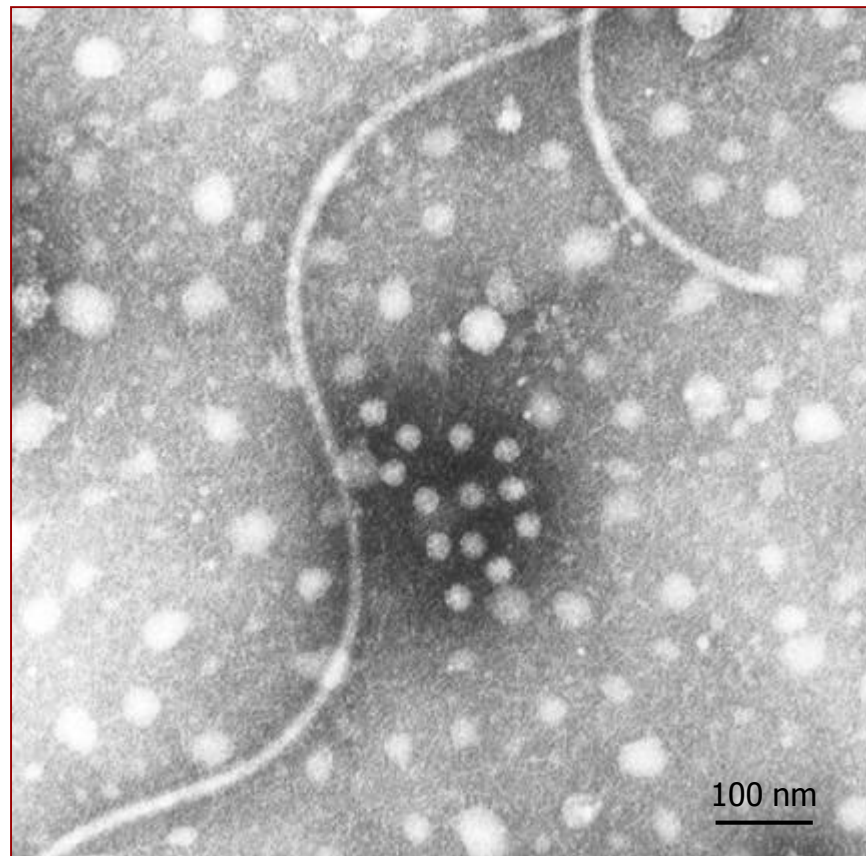
IEM: torovirus (\Rightarrow) + enterovirus-like (—) + PCV2-like (\cdots)

Siero
convalescente:
dopo il primo
caso nel 1990,
identificati altri
quattro casi tra
il 1999 e 2002



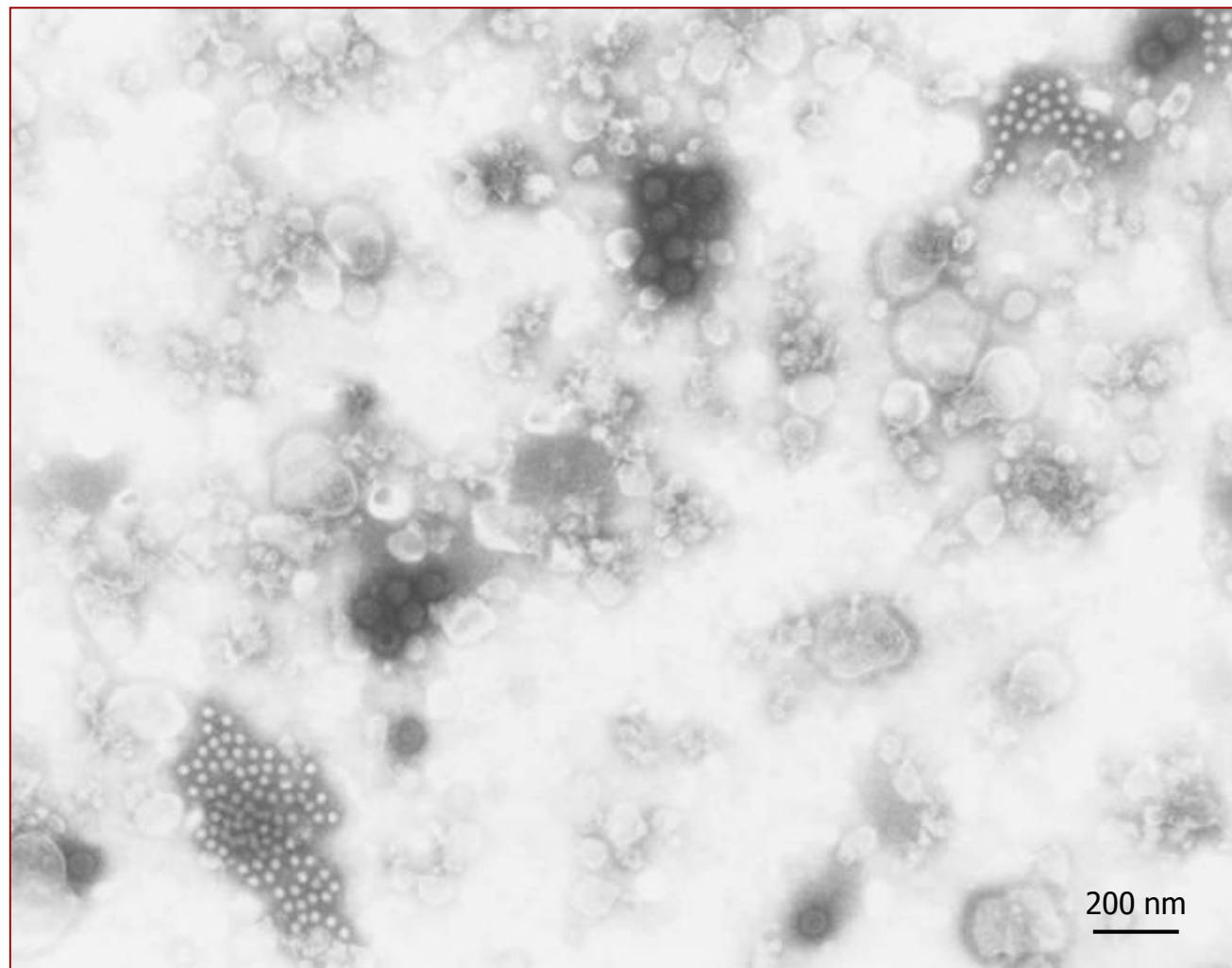
Rotavirus e Astrovirus del Tacchino

- ✕ Agenti primari di enterite nei tacchinotti (7-21gg età)
- ✕ Spesso identificati in associazione (effetto sinergico)



IEM: Rotavirus + Astrovirus del tacchino

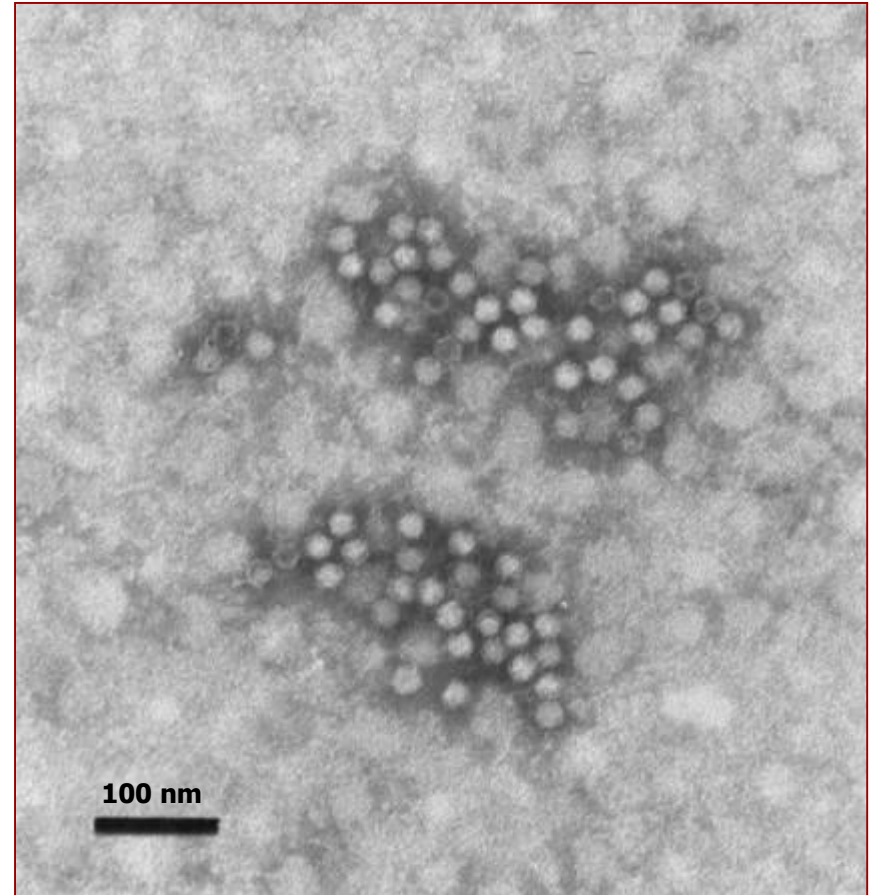
Siero
convalescente:
identificazione
contemporanea
di virus non
coltivabili in
associazione



200 nm

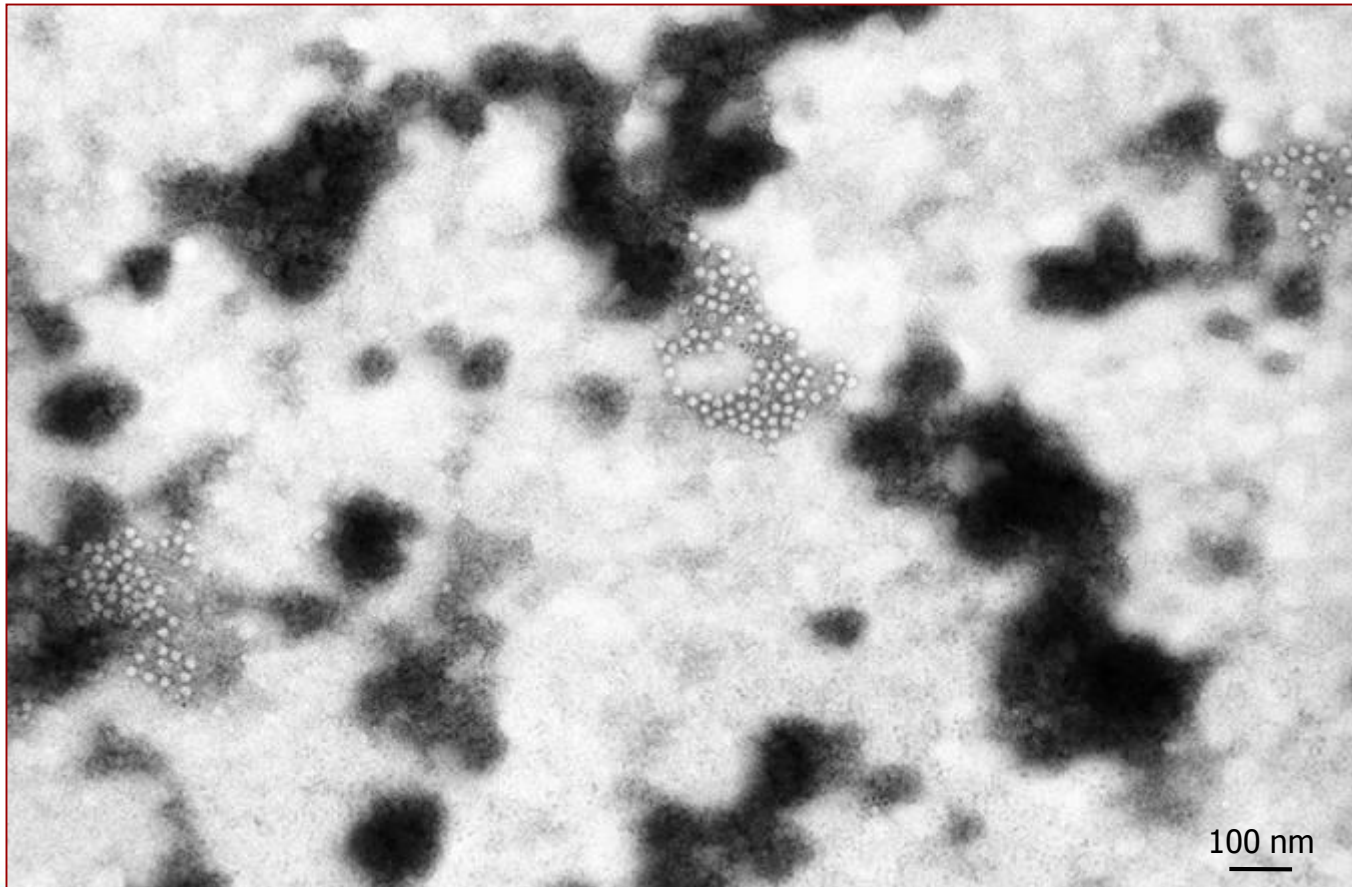
Epatite del Fagiano

- ✗ Osservata per la prima volta in Italia nel 1996 [Gelmetti et al., 1996]
- ✗ Nuova malattia dei fagianotti (15-25gg)
- ✗ Anoressia, apatia, diarrea, perdita di peso
- ✗ Emorragie diffuse, epatomegalia
- ✗ Enterite catarrale
- ✗ 15-60% mortalità

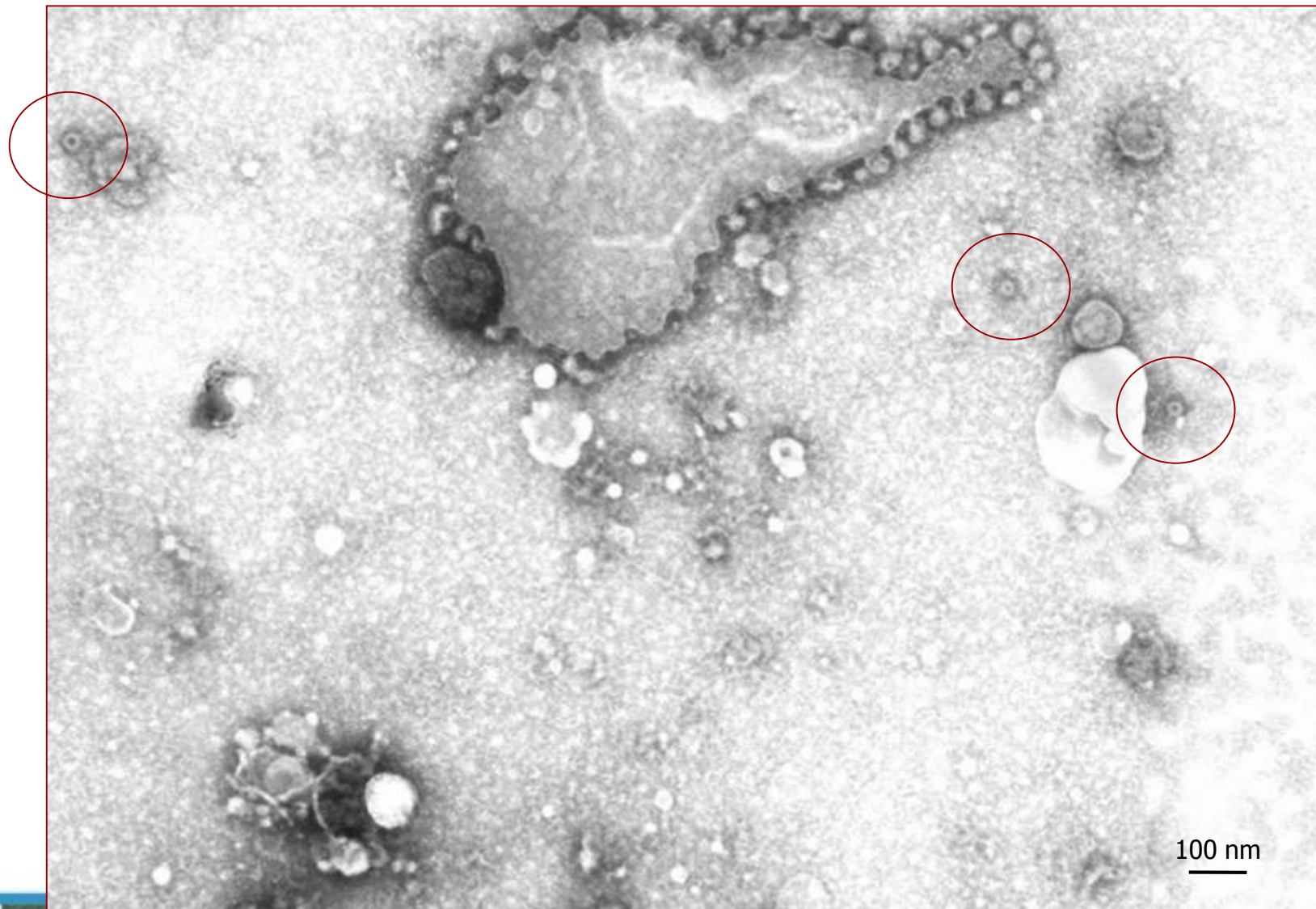


IEM: parvovirus-like dell'Epatite del Fagiano

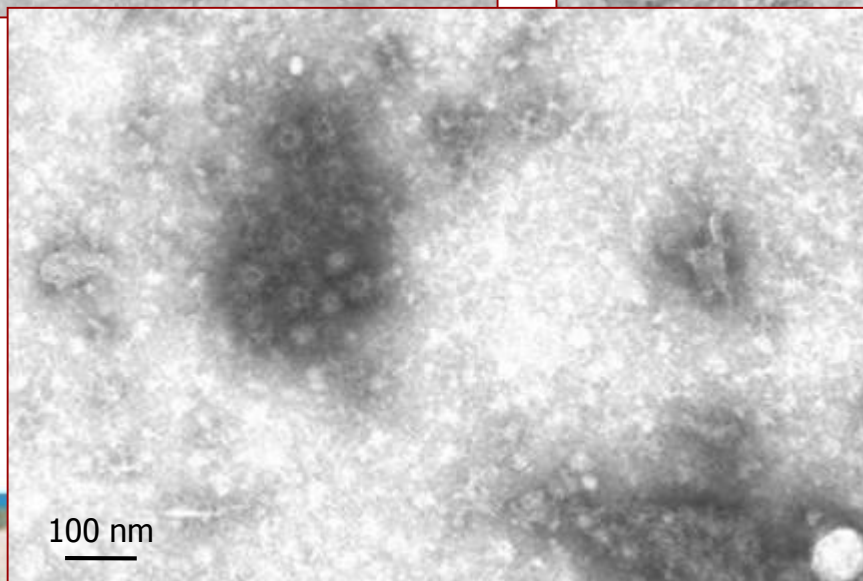
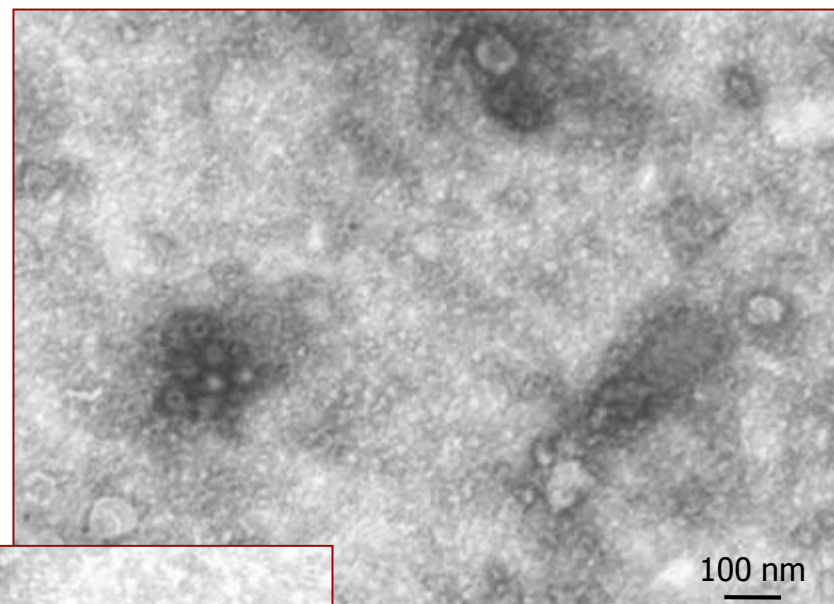
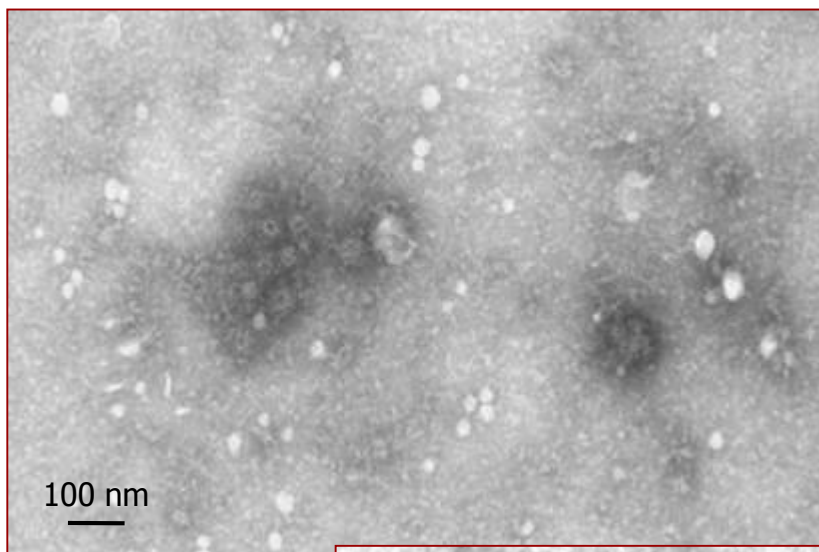
Siero convalescente: prima identificazione di virioni parvovirus-like di 18-21 nm nel fegato di fagianotti



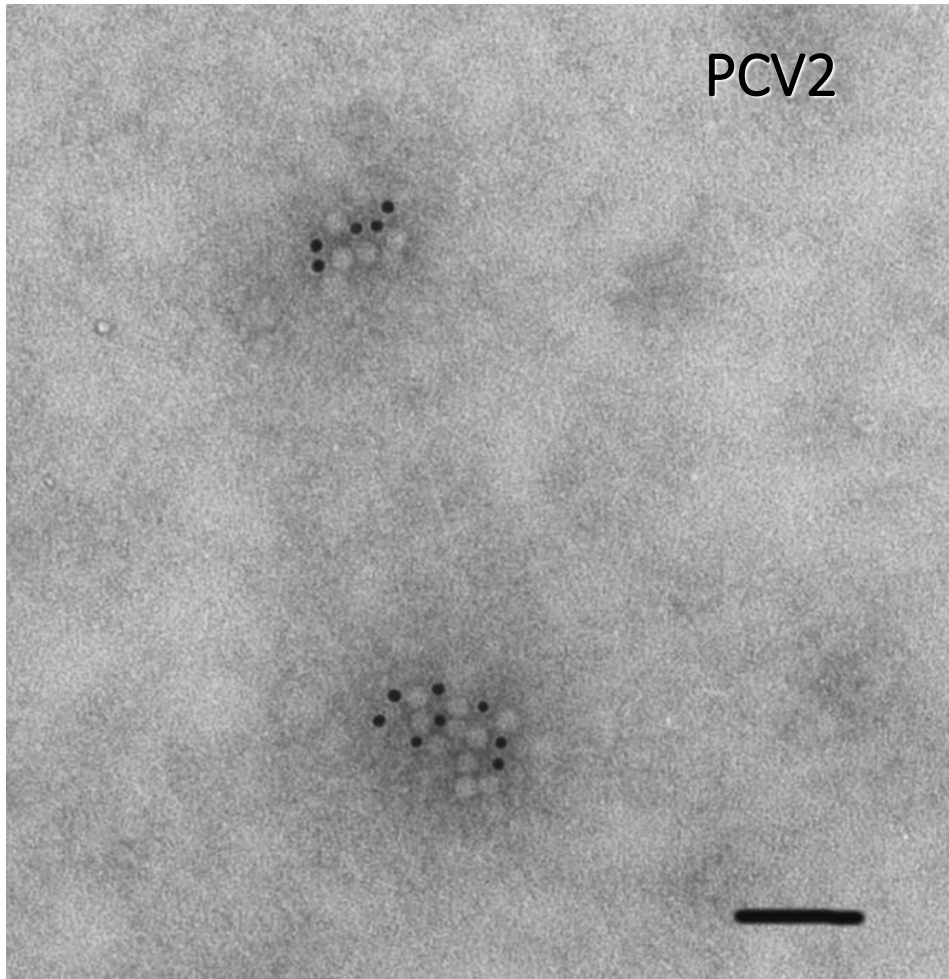
nsEM: 1st “detected” RHDV pos. (30-06-88) da fegato



IEM: 1st “detected” RHDV pos. (30-06-88) da fegato utilizzando un siero convalescente



Immunogold-EM: IEM con oro colloidale

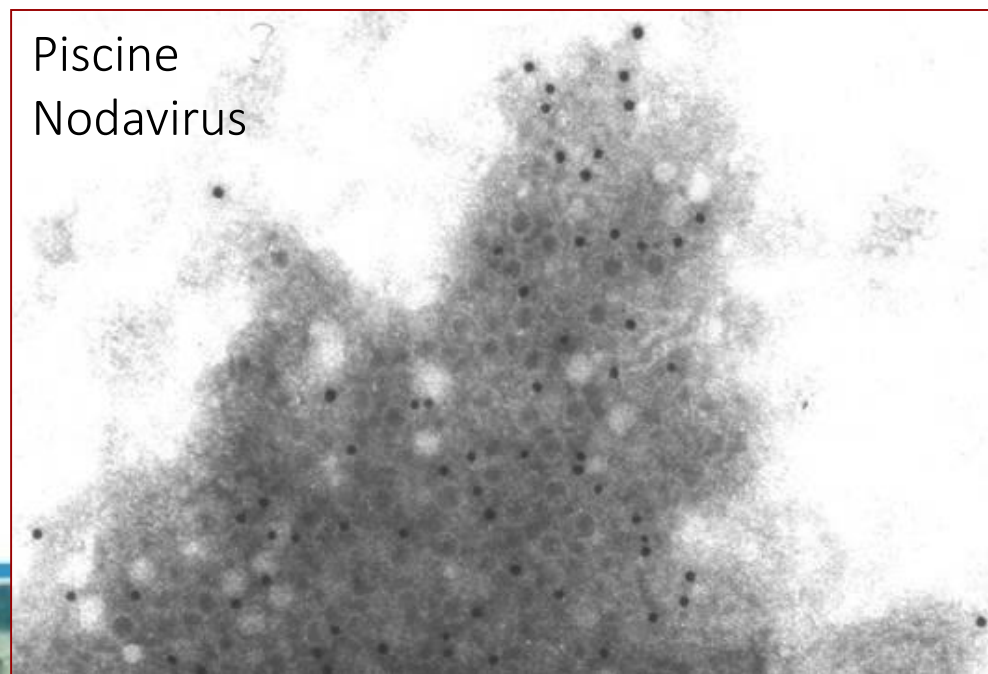
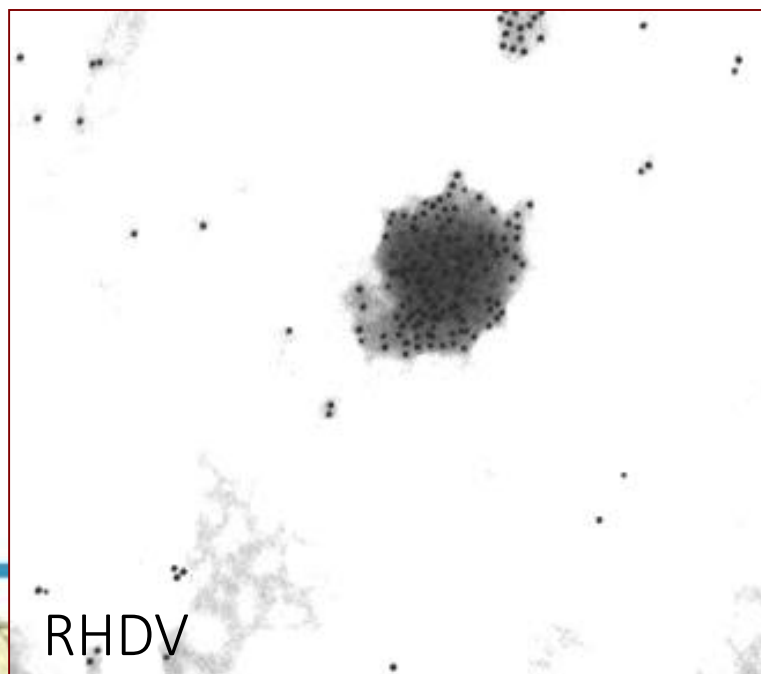
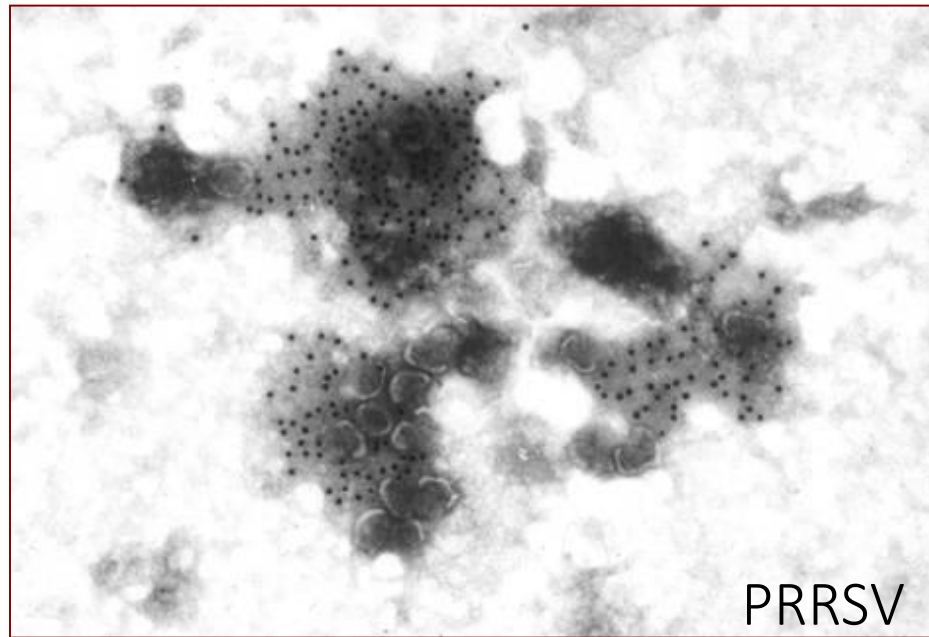
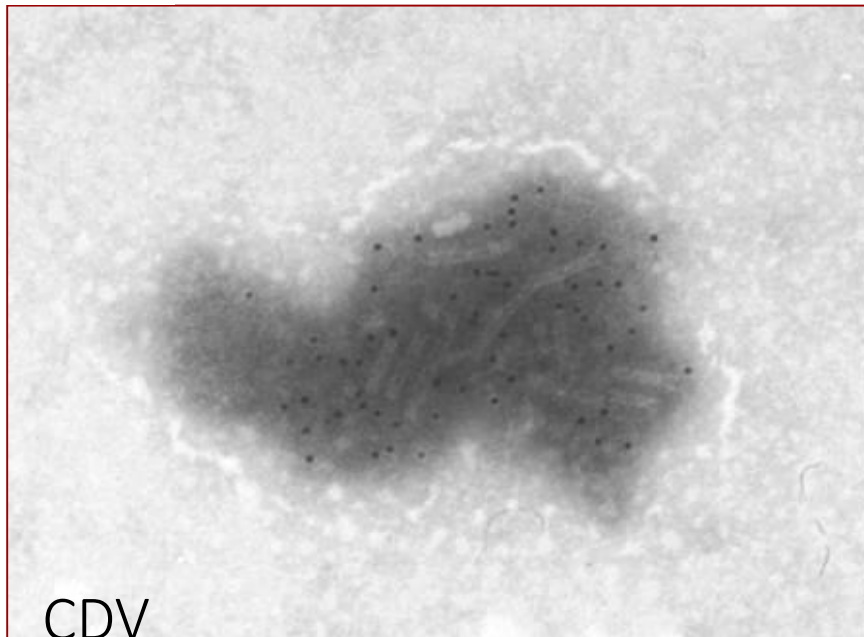


Utilizzano un marcatore elettrondenso, **particelle di oro colloidale di 5-30nm** in sospensione legate elettrostaticamente agli anticorpi, quale tracciatore

Per identificare particelle

- con morfologia variabile
- presenti in piccolissima concentrazione
- mascherate dalla presenza di sostanze interferenti

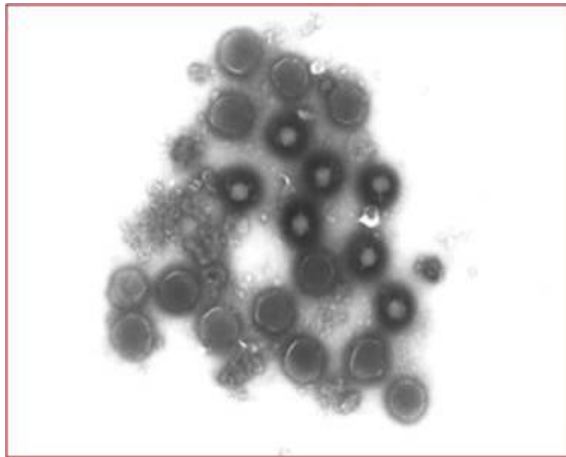
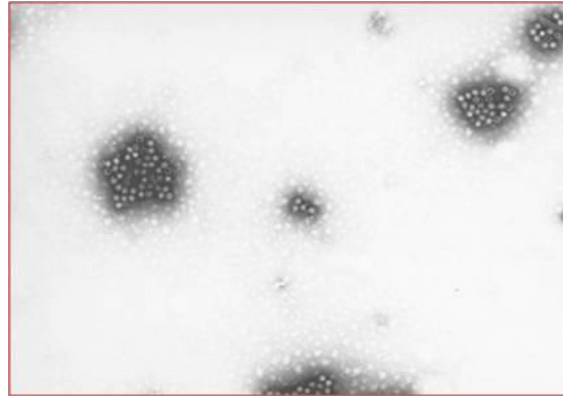




Microscopia Elettronica in Ittiovirologia

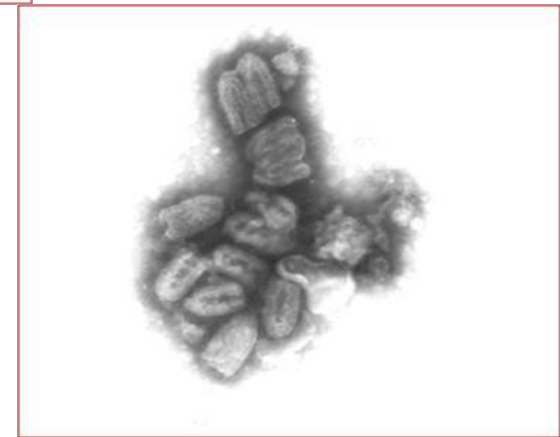
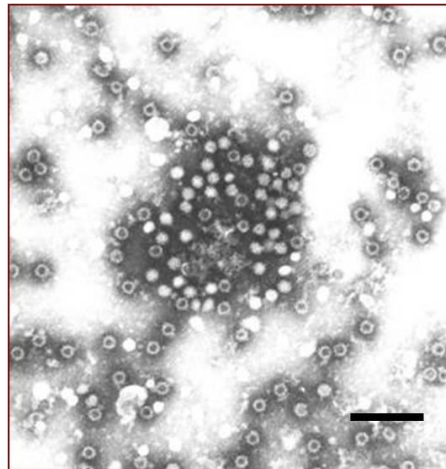
Campioni -> Lesioni cutanee e
Branchiali; surnatante cellulare

Birnavirus Trota



Iridovirus Spigola

Betanodavirus Spigola



Rhabdovirus Carpa



Risultati falsi negativi

Alterazioni morfologiche virali per:

- ✗ errori di prelevamento
- ✗ errori di conservazione dei campioni
- ✗ animali in fase cronica
- ✗ presenza di anticorpi con distruzione delle particelle
- ✗ soggettività della osservazione
- ✗ abilità ed esperienza dell'operatore

Assenza di dati anamnestici con:

- ✗ limitazione dell'applicazione di tecniche di IEM

negative
positive





Conclusioni (1)

I metodi **nsEM** e in particolare l'**IEM** possono essere efficacemente utilizzati per la diagnosi di virus negli animali

1. Permettono di identificare virus non coltivabili e infezioni virali multiple in tempi ridotti
2. Grazie alla “**open view**” ed alla proprietà “**catch all**” dei TEM convenzionali, possono essere identificati virus nuovi, emergenti o elusivi



Conclusioni (2)

I risultati ottenuti usando i metodi diagnostici di nsEM possono essere la base di partenza per ulteriori studi di:

- caratterizzazione genetica e molecolare dei virus
- patogenesi delle infezioni
- epidemiologia delle malattie



Approccio Combinato degli strumenti diagnostici

Contenuto intestinale

Kit ELISA specifico x Corona-Rotavirus-K99

PCR Parvovirus cane e gatto;
Rotavirus ruminanti e suini

+

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

Virosi Api

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

+

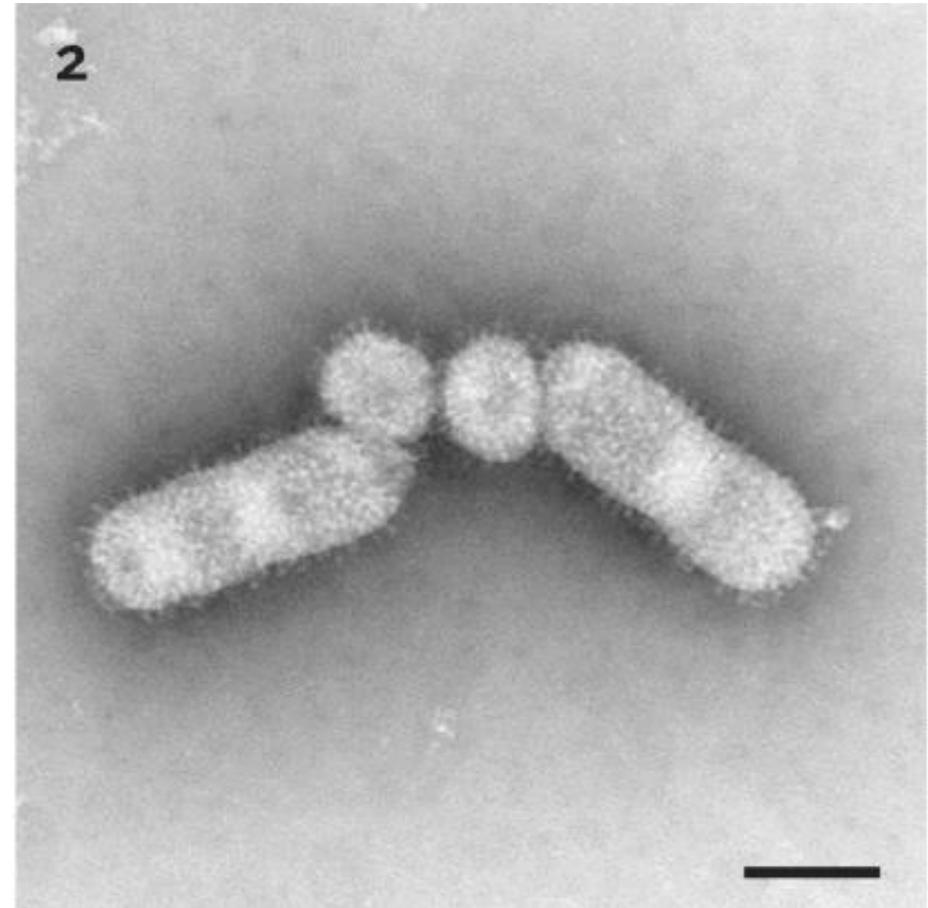
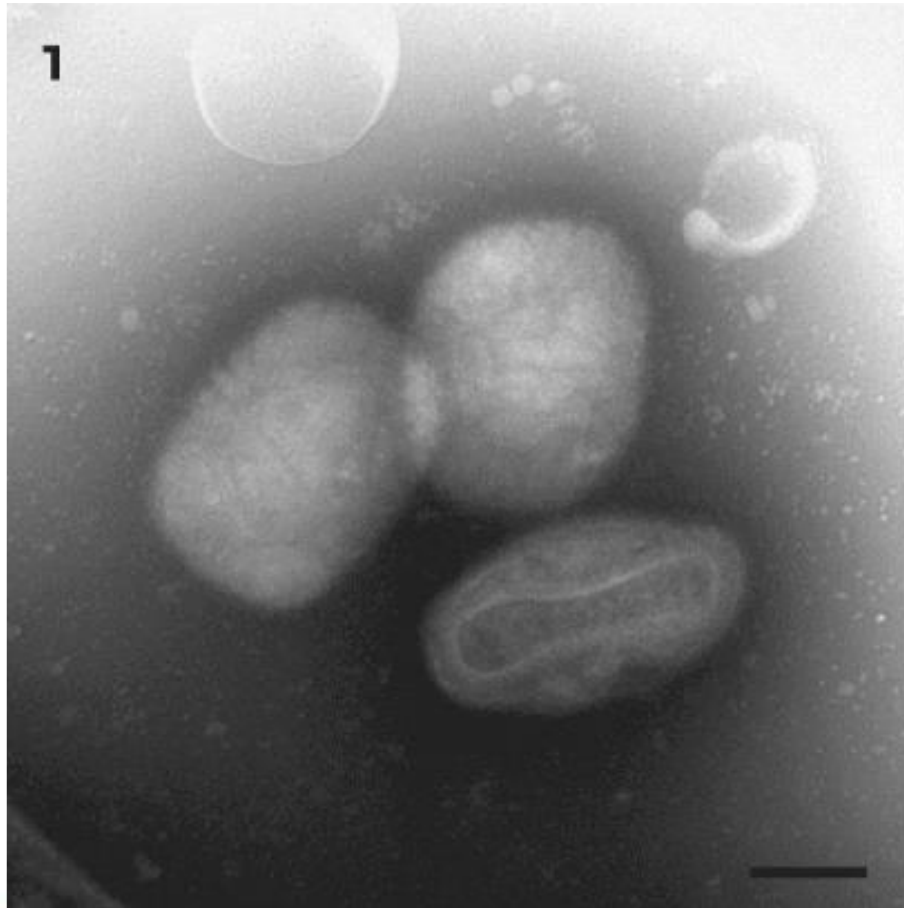
ME ultracentrifuga:
metodo “catch all” –
“open view” (Virus
Filamentoso, Iridovirus,
CWV)



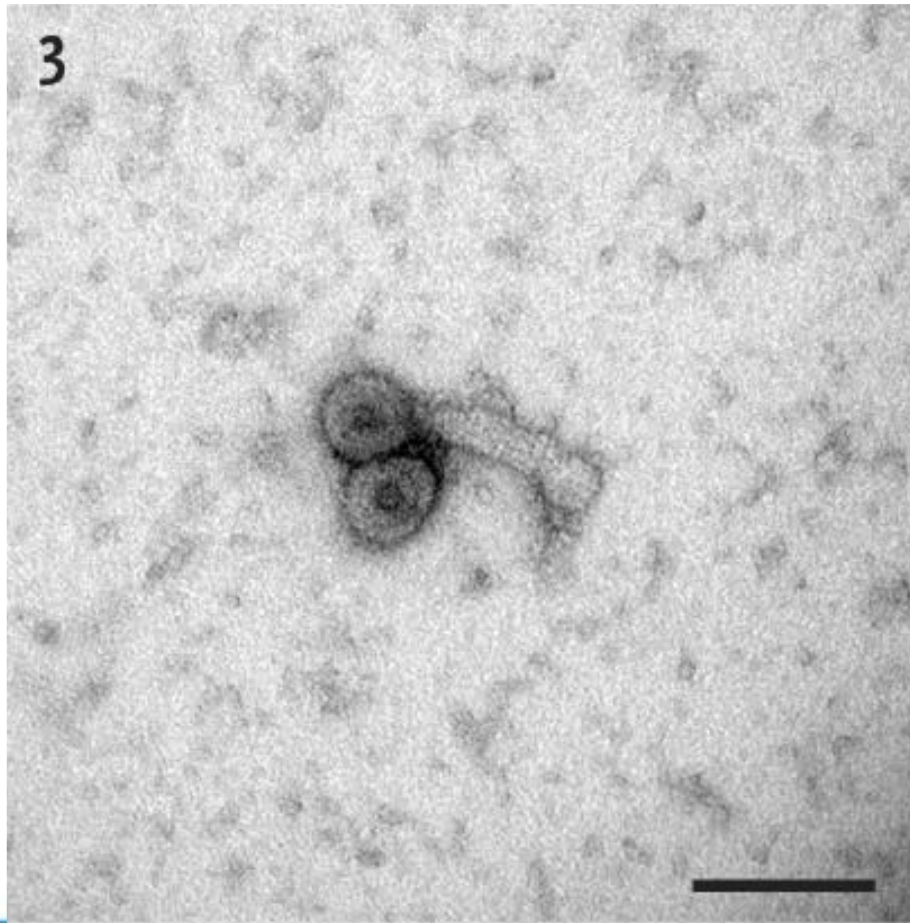
External Quality Assurance Scheme in EM Virus Diagnostics (EQA-EMV): Discussion of Results from EQA-EMV No. 30 (EQA-30)

Camp.1: *Vaccinia virus* (particelle M e C)

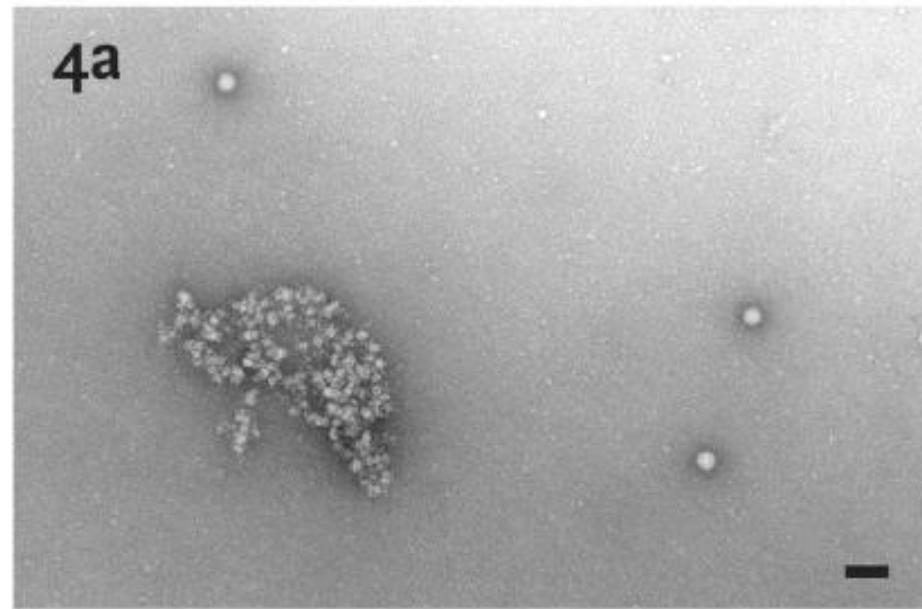
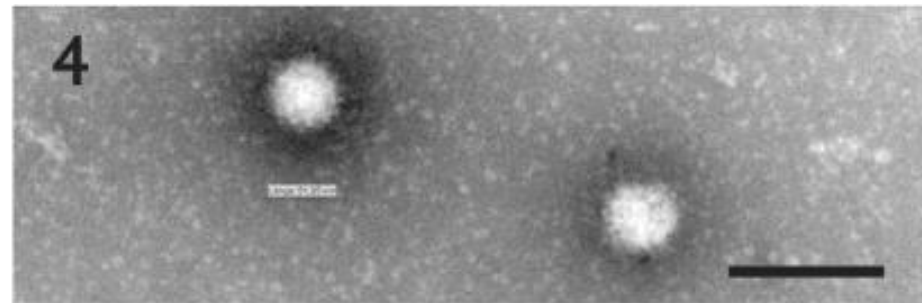
Camp.2: *Virus Influenza A (H3N2)*



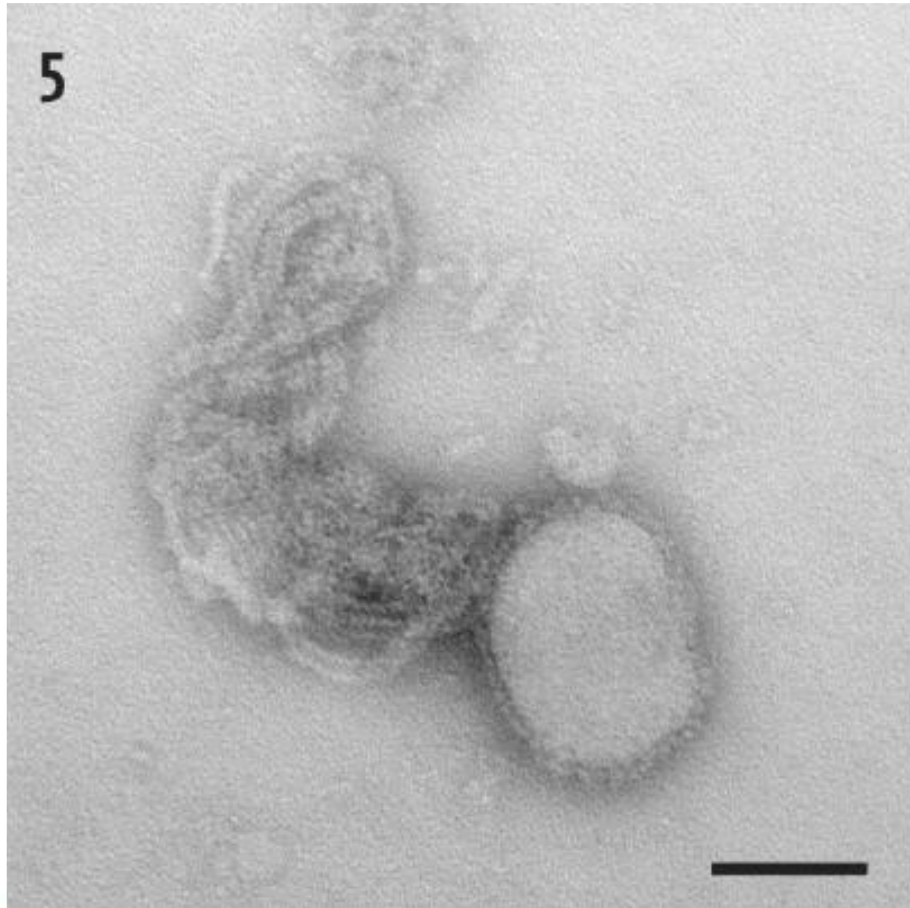
Camp.3: *Hepatitis B virus* (2
particelle di Dane e Antigene b



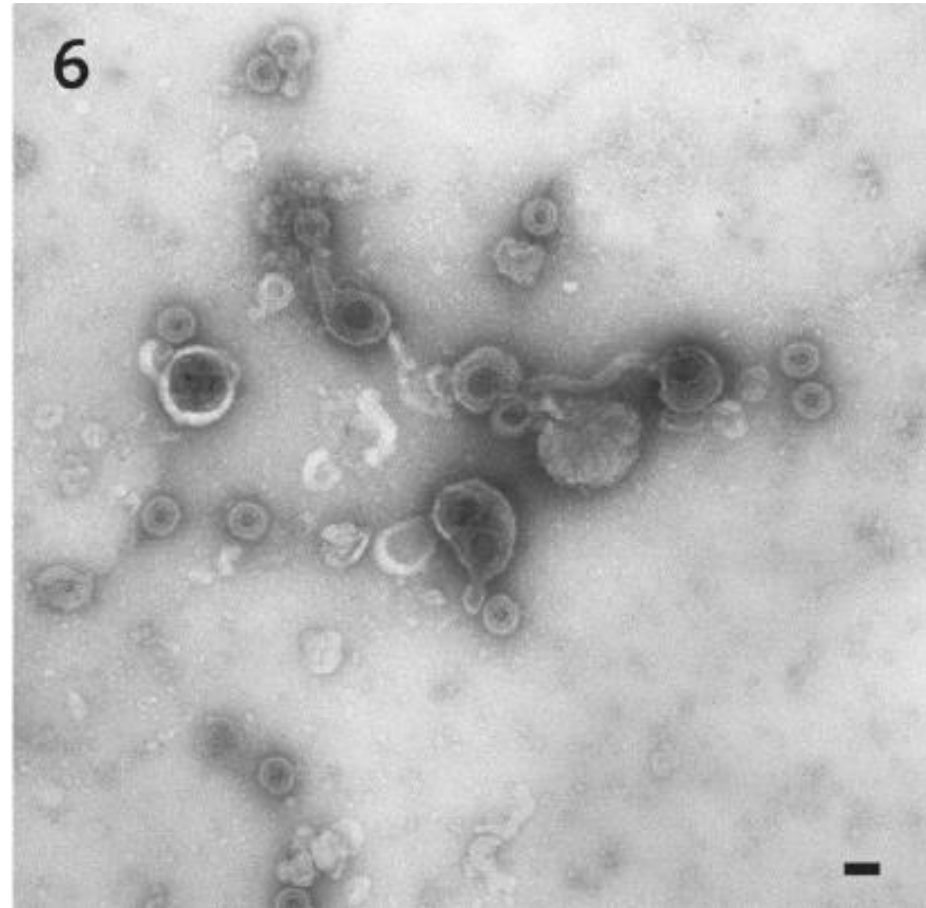
Camp.4: *Flavivirus* di *Culex theileri*

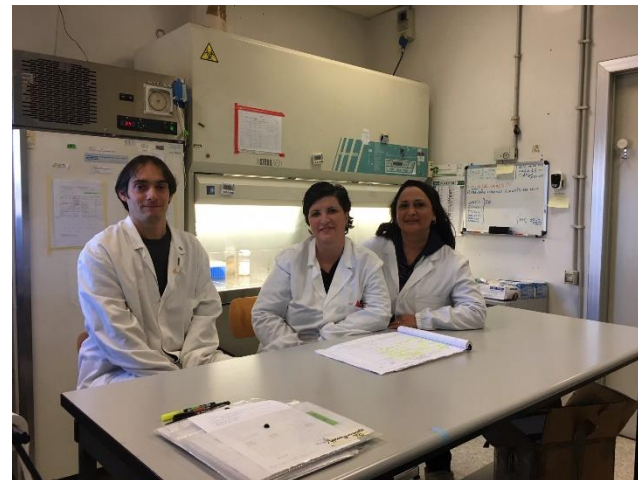


Camp.5: *Rubulavirus* della Parotite



Camp.6: *Murid betaherpesvirus 8*





Grazie per l'attenzione

