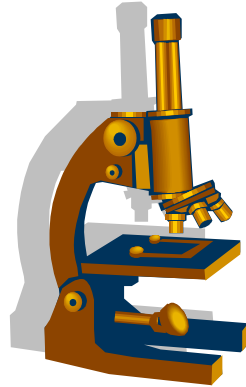




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



PFA

Formazione Interdisciplinare su Attività di Sanità Animale presso le Strutture di Biotecnologie e Diagnosi delle Malattie Virali

2° Modulo

Caratteristiche Fondamentali del Laboratorio di Virologia Pratica

29 novembre – 11 dicembre 2018

Piano Nazionale di Controllo per l'AVE degli equini

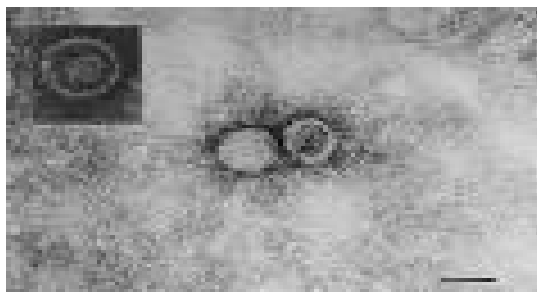
Monitoraggio malattie notificabili dei pesci: virus IHN, VHS E KHV

Giampiero Dante

Lab. Microscopia elettronica e Virologia speciale

Piano Nazionale di Controllo per l'Arterite Virale Equina

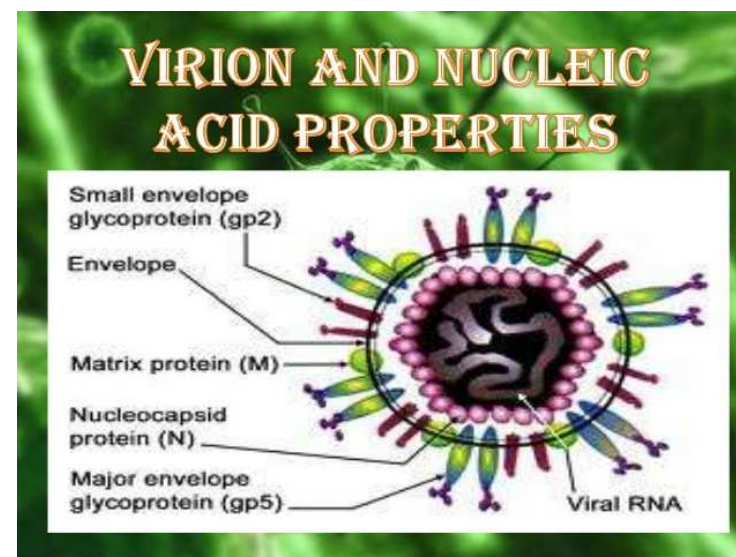
AGENTE EZIOLOGICO



Arterivirus

Classificazione ICTV

ORDINE: Nidovirales
FAMIGLIA: Arteriviridae
GENERE: Arterivirus



Arteriviridae è una famiglia di virus dell'ordine *Nidovirales*, con genoma a ssRNA (+), di forma pleomorfa e 45-60 nm di grandezza, nucleocapside a simmetria icosaedrica avvolto da una membrana lipoproteica con peplomeri

AVE: Malattia

La malattia è caratterizzata da una vasculite generalizzata che interessa soprattutto le piccole arteriole muscolari e delle venule dei diversi organi, in particolare dei polmoni.



- Nel puledro si può avere **morte** da polmonite interstiziale
- La cavalla gravida può **abortire** (50%) tra 2 e 10 mesi di gravidanza, senza presentare sintomi premonitori.

AVE: Esiti



- Nelle cavalle guarite non si osservano problemi di ipofertilità.
- Negli stalloni ci può essere un periodo (3 - 4 mesi) di ipofertilità, dovuta a ridotta produzione di spermatozoi normali a causa dell'ipertermia scrotale.
- Negli stalloni portatori comunque non si osservano effetti sulla qualità del seme a lungo termine.

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

O.M. 13 gennaio 1994 stabilisce i criteri e modalità di svolgimento Piano nazionale di controllo dell'arterite virale equina e successive modifiche

The screenshot shows the official website of the Italian Ministry of Health (Ministero della Salute). The page displays the 'Piano Nazionale di controllo dell'arterite virale equina' (National Plan for the control of equine viral arteritis). The document is dated 13 January 1994 and is part of the 'Ordinanze Ministeriali' (Ministerial Orders) series.

Cap. 10 - Arterite Virale Equina

Ordinanza Ministeriale 13 gennaio 1994

Arterite Virale Equina - Piano Nazionale di Controllo
(Ordinanza Ministeriale 13 gennaio 1994)

Finalità: 44 - Controlli ufficiali previsti da norme nazionali e/o comunitarie, diversi dal Piano specifico comunitario, per organizzazione e programmazione controlli.

Autorità Competenti	Funzioni
<p>IC Centrale: Ministero della Salute OGG - Ufficio II</p>	<p>Proposizione del Piano a livello nazionale, ai sensi dell'Ordinanza Ministeriale 13 gennaio 1994; emanazione di eventuali linee guida e chiarimenti;</p> <p>supervisione per tutto lo sviluppo di attività di controllo di una rete di laboratori di diagnosi per la malattia, con l'obiettivo di monitorare l'andamento della malattia e la diffusione della malattia;</p>
<p>IC Regionali: Istituti Zooprofilattici Regionali della Salute</p>	<p>Coordinamento delle attività previste dall'Ordinanza Ministeriale 13 gennaio 1994;</p> <p>verifica dell'attuazione dei controlli previsti dalla stessa Ordinanza sul proprio territorio;</p> <p>inquadramento di eventuali problemi degli stabilimenti zootecnici, partecipando con gli operatori ed istituzioni di cui, alla trascrizione al ministero della Salute, agli Istituti zooprofilattici regionali all'agricoltura, all'industria;</p> <p>trasmissione al Ministero della Salute dei dati sui controlli effettuati;</p> <p>notifica al Ministero della Salute (art. 2 D.L. 121/94) dei risultati di indagine e controllo sul</p>

Indicazioni

Cap. 1 - Obiettivi strategici

Cap. 2 - Attività di sorveglianza e controllo nazionale di riferimento

Cap. 3 - Obiettivi nazionali e controllo del rischio di diffusione

Cap. 4 - Piani di intervento e di controllo

Cap. 5 - Ruolo della Rete Nazionale di riferimento

Cap. 6 - Obiettivi operativi e procedure

Cap. 7 - Sistema di riferimento del PNI

Allegato - Schema regionale

Indice del documento

Piano nazionale di controllo per l'AVE degli equini.
Monitoraggio malattie notificabili dei pesci: virus IHN e VHS

Roma, 11 Dicembre 2018

OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2013, cap 2.5.10

Decisione UE 2018/1143

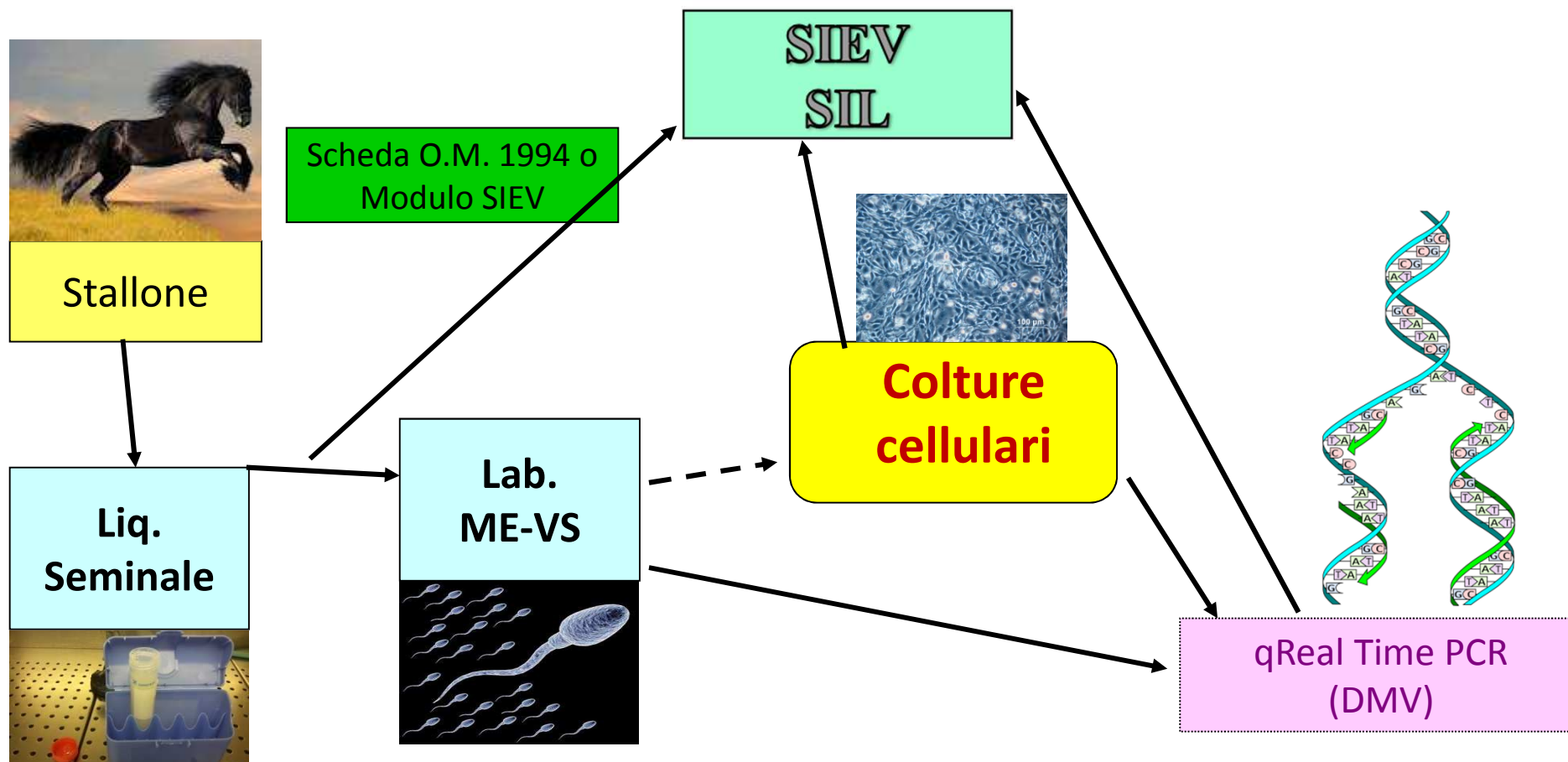
recepita dal MS con Nota del MS **27414 del 02.11.18**, a sua volta recepita dalla regione Lazio con **Notifica 8674/2018**



In relazione all'oggetto, con nota allegata il Ministero della Salute, comunica che, ai sensi della Decisione di esecuzione (UE) 2018/1143, ai fini del riconoscimento dello stato di eliminatore di virus dell'arterite virale negli stalloni è considerata come prova ufficiale anche la PCR su sperma intero.



Flusso Liq. Seminale x isolamento EAV



Virologia speciale

PRELIEVO



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

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
- ✓ real time PCR (Colture cellulari)
- ✓ soggetto eliminatore: esclusione monta

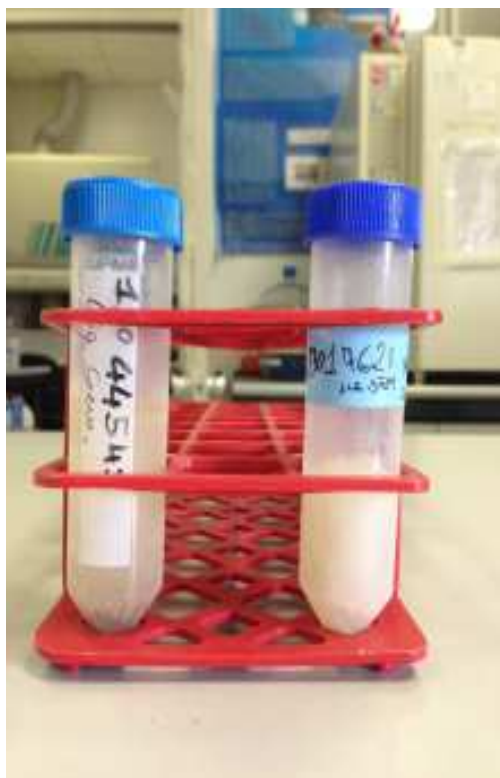
Stalloni riproduttori

Virologia speciale

Invio Campioni

Modulo OM 1994

Liquido seminale



Piano Nazionale di Controllo dell'arterite virale equina (D.M. 15 gennaio 1994) Scheda di accompagnamento dei campioni												Il Registro Generale ES completa Data Registrazione		
A.S.L. _____		Denominazione Azienda _____												
Detentore _____		Codice Azienda _____		Orientamento Produttivo ⁽¹⁾ E F G H C D I										
Comune _____				Provincia _____		Paese _____								
Indirizzo _____				Latitudine Nord (Sistema WGS84) _____				Longitudine EST _____						

SOGGETTI SOTTOPOSTI A CONTROLLO PER ARTERITE VIRALE EQUINA													
N. Prog.	Proprietario	Identificativo Soggetto (2)	Anno di nascita	Specie (3)	Razza (4)	Sesso (5)	Maltizio (6)	Malloso Pastoreo SANGUE (7)	Malloso Pastoreo SPERMA (8)	Crine Pastoreo SPERMA (9)	Precedente Genotipaggio (10)	Precedente Isolamento virale (11)	
1							<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
2							<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
3							<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
4							<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
5							<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

ALTRE ANALISI RICHIESTE (12)					
N. Prog.	Anemia Istolitica	Morax	Morbo Collare Malgrado	C.E.M. (Temporari)	Altro
1					
2					
3					
4					
5					

Data prelievo ____/____/____

VETERINARIO PRELEVATORE

Modulo SIEV x prelievo

REGIONE LAZIO
SISTEMA INFORMATICO REGIONALE - Pagina 1 di 1

REGIONE LAZIO
AGENZIA
76 Via 61 - 00144 Roma

ROMA 4
00164 - 00168 - 4 CAVALLO - VIA PRATICA DI MARE

24/4

NOME COGNOME		CATEGORIA		ESCLUSIVITA'	
MAGLIA COLORE		ESCLUSIVITA' SPECIALE			

Soci senza associazione in corso			Associazione		
Partenza	Nome Campione	Esito			
24-03-2019	VA-10-102				

VETTERINARIO OPERATIVO **ATA** **274**

RIFLEGGIO						
PRODOTTO	ESCLUSIVITA'	ESCLUSIVITA' SPECIALE	ESCLUSIVITA' SPECIALE	ESCLUSIVITA' SPECIALE	ESCLUSIVITA' SPECIALE	ESCLUSIVITA' SPECIALE
Pena: 5 euro - 5 anni						
Articolo 1016 Codice Civile	1° Premio contratto		18088350	LIVIGNO SEMINALE	1	1
Articolo 1016 Codice Civile	Non richiesta		18088350	TRAMPONE GENERALE	1	1

ANAGRAFICA						CONTROLLI		
N° Partenza	Messaggio	Sex	Razza	Sessione Anno	Proprietario	Int.	Refertato	
11	AN	M	CAVALLO	TRATTATORE I	M	2017	2017	1
21	AN	M	CAVALLO	TRATTATORE I	M	2017	2017	1

FIRMA ALLEVATORE
M. K.

FIRMA VETTERINARIO
Atte

FRATTAS. DEL 10° CONTROLLO DI LIQUIDO SEMINALE
 DEL 2° ANNO IL SUO CUI EBULLO SIEROPPOSITO
 PER ARTERIE VENE ENVIATA IL CUI LIQUIDO SEMINALE
 E' GIA STATO CONTROLLATO NEL 2017.

Atte

S.I.S. Sistema Informativo per l'Epizootologia Veterinaria

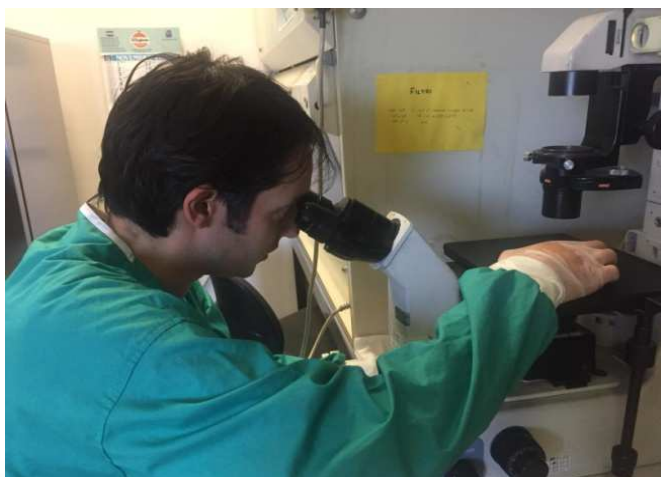
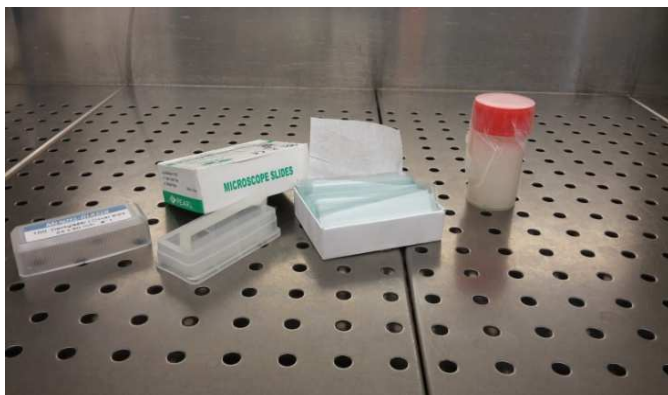
Stampato il 23/02/2019 - 13:07

Piano nazionale di controllo per l'AVE degli equini.
Monitoraggio malattie notificabili dei pesci: virus IHN e VHS

Roma, 11 Dicembre 2018

Valutazione presenza Spermatozoi

Osservazione al Microscopio Ottico (20x):



Video Spermatozoi..



SUBSTRATI, TERRENI, REAGENTI

Terreno di **crescita** E-MEM al 10% di SFB

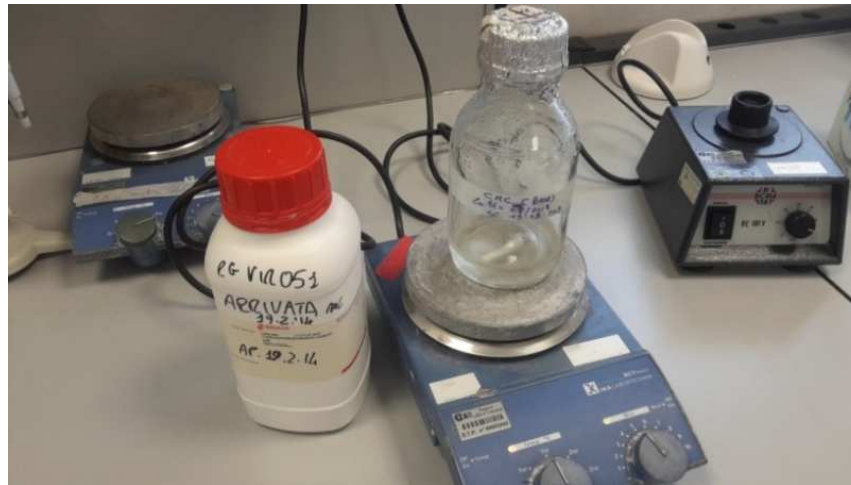
Terreno di **mantenimento** per colture cellulari E-MEM al 2% di SFB e 2% della soluzione di PSF; conservato a $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$

PBS per colture cellulari

Terreno di mantenimento con **CMC** per colture cellulari: E-MEM al 2% di SFB, 0,75% di CMC e 2% della soluzione di PSF; conservato a $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$

REAGENTI, SUBSTRATI, TERRENI

Carbossimetilcellulosa: polimero derivato della cellulosa, avente aspetto di polvere fibrosa o granulare, di colore bianco crema; solubile in acqua.

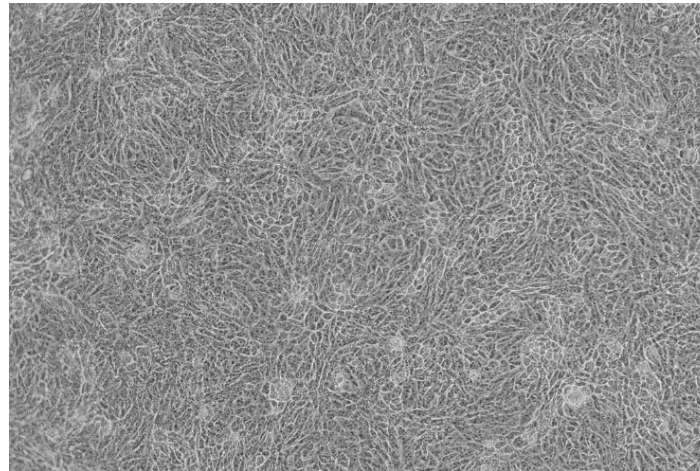


- Contenimento infezione virale (infezione x contiguità = effetto a placche)
- Aumento della sensibilità delle cellule all'adsorbimento virale

SUBSTRATI, TERRENI, REAGENTI

Colture Cellulari: Rabbit Kidney 13: linea cellulare di rene di coniglio.
Linea ATCC CCL 37 meglio se clone Ky, fornito dal Gluck Equine
Research Center, Università del Kentucky (OIE Reference Laboratory)

RK₁₃ 10X



EAV: Sospensione virale preparata con lo stipite di referenza ceppo
Bucyrus del virus AVE

Sonicazione e centrifugazione

Disintegratore ad ultrasuoni per disgregare
gli ammassi di spermatozoi e lisarli



Centrifuga da banco per chiarificazione
del Campione



Foglio di lavoro POS VIR 027 NOR

I.Z.S.L.T. "M.Aleandri"
Ufficio di Staff Biotecnologie

ISOLAMENTO DEL VIRUS DELL'AVE DA LIQUIDO SEMINALE MEDIANTE INOCULAZIONE DI COLTURE CELLULARI Informazioni sull'Inoculo Campione

Numero registrazione campione:

	1° passaggio	2° passaggio
	Data:/...../.....	Data:/...../.....
RK ₁₃	N. pass. del	N. pass. del
Terreno di Mantenimento per Colture Cellulari con CMC	Lotto n.	Lotto n.
Terreno di Mantenimento per Colture Cellulari	Prep. il	Prep. il
Soluzione 0,1% Cristallvioletto in formalina	Lotto n.	Lotto n.

Note:
.....
.....
Ceppo virale di Riferimento mr VIR

STEP principali della Procedura, 1° passaggio

a. Contatto diluizioni campione per 2 ore in frigorifero a (4 ± 2) °C:

Inizio contatto ore:
Fine contatto ore:

b. Contatto campione-coltura cellulare per 60 min. in termostato a (37 ± 1) °C al 5% di CO₂:

Inizio contatto ore:
Controllo monostrato minuti:
Fine contatto ore:

STEP principali della Procedura, 2° passaggio

Inizio contatto ore:
Fine contatto ore:

I.Z.S.L.T. "M.Aleandri"
Ufficio di Staff Biotecnologie

Isolamento del virus dell'AVE – Schema di inoculo Ctrl positivo e negativo in fiasca

Ctrl positivo: EAV (diluizione - ...)

Data	Firma
... °p	
24 h	
2 gg	
3 gg	
4 gg	

Ctrl negativo

Data	Firma
... °p	
24 h	
2 gg	
3 gg	
4 gg	

Verificatore

ISOLAMENTO su CULTURA CELLULARE

Preparazione Campione

- diluizioni in base 10 del campione (-1,-2,-3) in terreno di mantenimento
- contatto per 2 h a +4°C

Semina per Contatto

- Asportazione del terreno di crescita
- lavaggio con PBS il monostrato cellulare
- Inoculo 2 fiasche (25 cm²) per ognuna delle 3 diluizioni campione + 2 fiasche per controlli (+ e -)
- contatto per 1 ora in incubatore a +37°C e 5% CO₂
- controllo ogni 10 minuti al microscopio ottico la comparsa di effetto citotossico
- portare a volume le fiasche con terreno di mantenimento con CMC per colture cellulari
- osservazione al Microscopio ottico per 7 gg di eventuale effetto citopatico.

EFFETTO CITOTOSSICO: Cambiamento della morfologia cellulare non indotto dalla replicazione virale

EFFETTO CITOPATICO: Alterazioni morfologiche del monostrato cellulare osservabili al microscopio ottico rovesciato, conseguenti all'azione del virus sulla struttura e sul metabolismo cellulare.



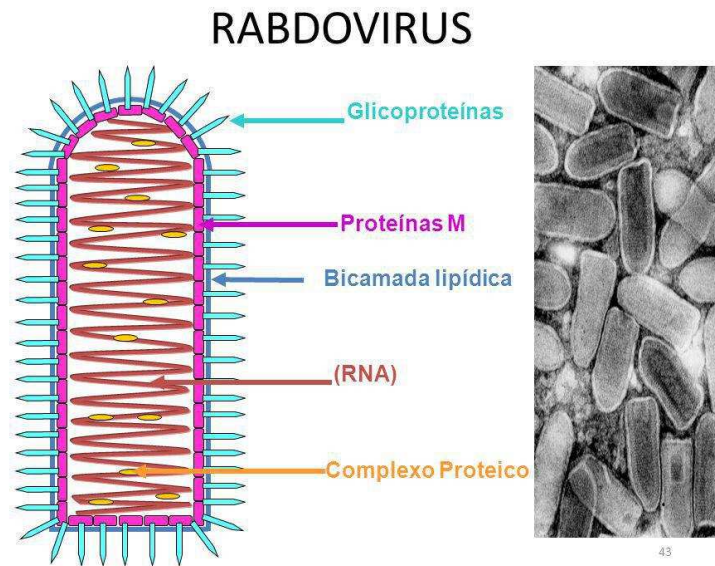
Si osservano foci di cellule modificate per volume e forma (rimpicciolite, raggrinzite e rifrangenti) che si estendono più o meno lentamente a tutto il tappeto provocandone il distacco

Se **ECP** identificazione mediante
PCR real time

Se **NON ECP** 2° passaggio e risultato

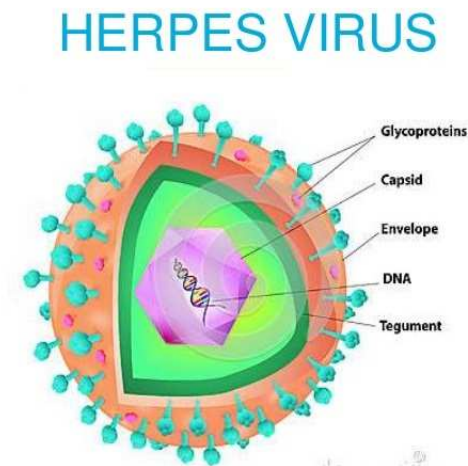


Piani di Controllo e Sorveglianza malattie notificabili dei pesci: virus IHN, VHS e KHV



Classificazione ICTV

ORDINE: Mononegavirales
FAMIGLIA: Rhabdoviridae
GENERE: Novirhabdovirus



Classificazione ICTV

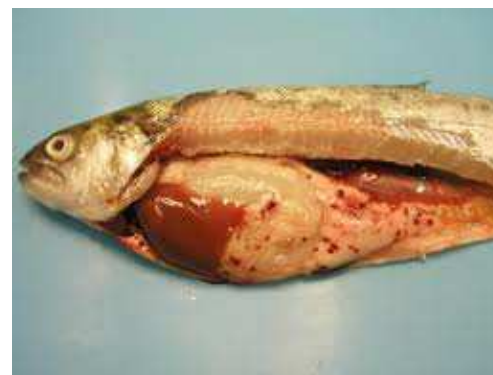
ORDINE: Herpesvirales
FAMIGLIA: Alloherpesviridae
GENERE: Herpesvirus

Malattie oggetto di notifica

«**necrosi ematopoietica infettiva**» («IHN»): malattia causata dal virus della necrosi ematopoietica infettiva (IHNV), appartenente al genere *Novirhabdovirus*, famiglia *Rhabdoviridae*;



«**setticemia emorragica virale**» («VHS»): malattia causata dal virus della setticemia emorragica virale (VHSV), noto anche come virus Egtved, appartenente al genere *Novirhabdovirus*, famiglia *Rhabdoviridae*;



«**herpesvirus della carpa koi**» («KHVD»): malattia causata dall'herpesvirus della carpa koi (KHV), appartenente alla famiglia *Alloherpesviridae*.

Specie: Herpesvirus dei ciprinidi 3 (CyHV-3);



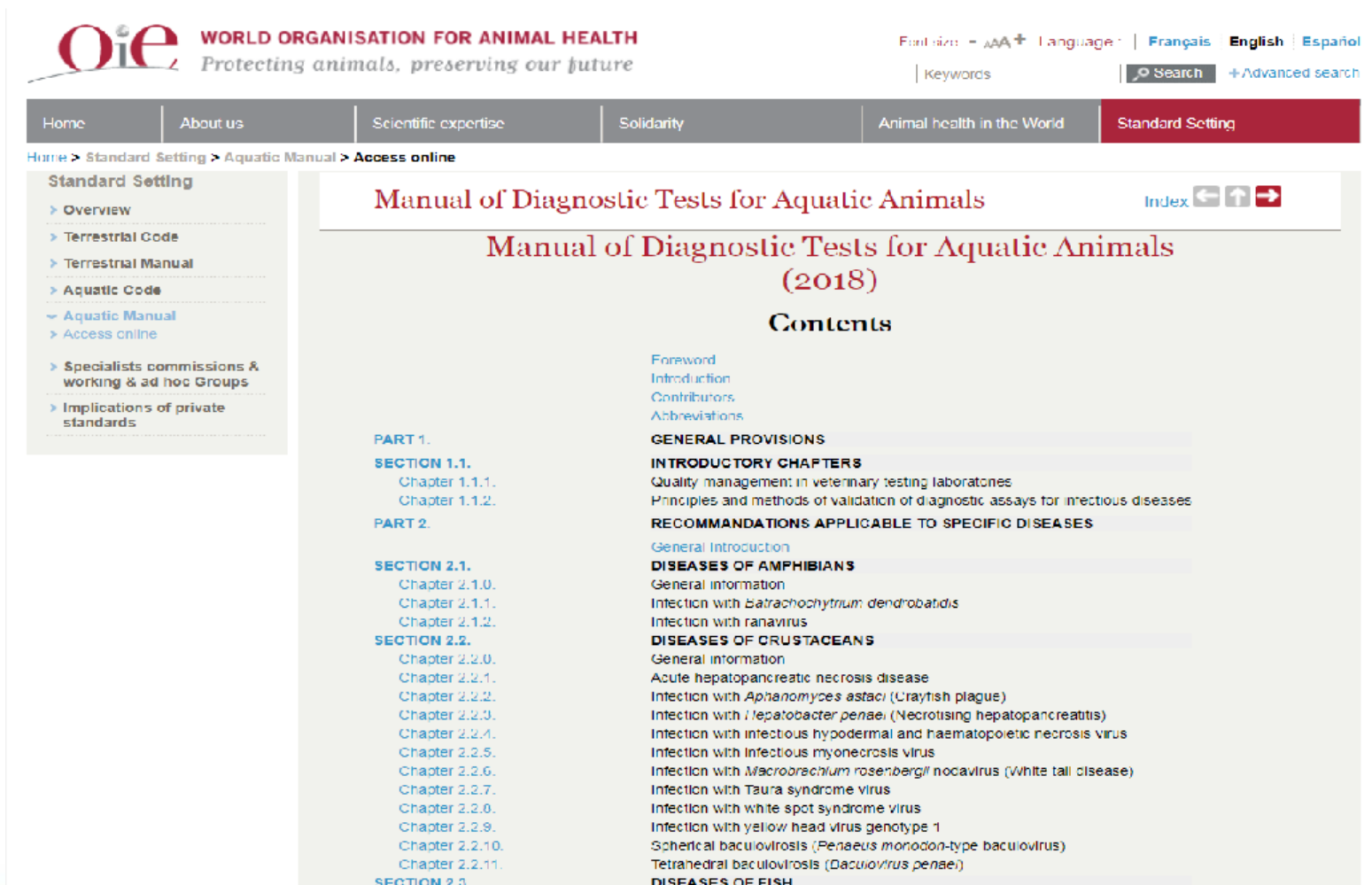
Piani di Controllo e Sorveglianza Nazionale malattie notificabili dei pesci: virus IHN, VHS e KHV

Piano di Monitoraggio virus IHN e VHS nei Salmonidi

- ✓ Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals OIE 2012, 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 2015/1554 UE (piani di campionamento e metodi diagnostici)



IHN e VHS: in applicazione secondo Manuale OIE Aquatic Animals 2012: parte 2, sezione 2.3.4 (IHN), 2.3.7 (KHV) e 2.3.10 (VHS)



Oie WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH
Protecting animals, preserving our future

Font size: - AAA+ Language: | Français English Español
Keywords | Search + Advanced search

Home About us Scientific expertise Solidarity Animal health in the World Standard Setting

Home > Standard Setting > Aquatic Manual > Access online

Standard Setting

- > Overview
- > Terrestrial Code
- > Terrestrial Manual
- > Aquatic Code
- > **Aquatic Manual**
- > Access online
- > Specialists commissions & working & ad hoc Groups
- > Implications of private standards

Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals

Index

Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (2018)

Contents

Foreword
Introduction
Contributors
Abbreviations

PART 1.

SECTION 1.1.

Chapter 1.1.1.
Chapter 1.1.2.

PART 2.

SECTION 2.1.

Chapter 2.1.0.
Chapter 2.1.1.
Chapter 2.1.2.

SECTION 2.2.

Chapter 2.2.0.
Chapter 2.2.1.
Chapter 2.2.2.
Chapter 2.2.3.
Chapter 2.2.4.
Chapter 2.2.5.
Chapter 2.2.6.
Chapter 2.2.7.
Chapter 2.2.8.
Chapter 2.2.9.
Chapter 2.2.10.
Chapter 2.2.11.

SECTION 2.3.

GENERAL PROVISIONS

INTRODUCTORY CHAPTERS

Quality management in veterinary testing laboratories
Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases

RECOMMENDATIONS APPLICABLE TO SPECIFIC DISEASES

General Introduction

DISEASES OF AMPHIBIANS

General information
Infection with *Batrachochytrium dendrobatidis*
Infection with ranavirus

DISEASES OF CRUSTACEANS

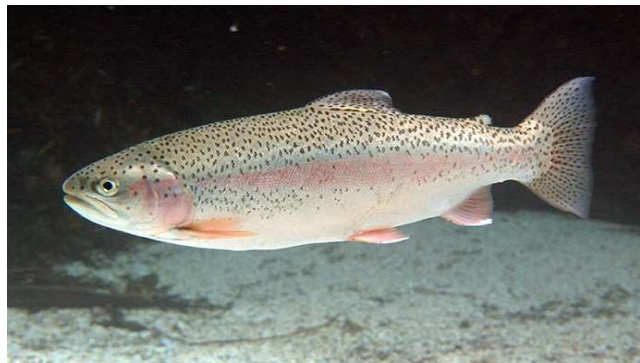
General information
Acute hepatopancreatic necrosis disease
Infection with *Aphanomyces astaci* (Crayfish plague)
Infection with *Hepatobacter penaei* (Necrotising hepatopancreatitis)
Infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus
Infection with infectious myonecrosis virus
Infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (White tail disease)
Infection with Taura syndrome virus
Infection with white spot syndrome virus
Infection with yellow head virus genotype 1
Spherical baculovirus (*Penaeus monodon*-type baculovirus)
Tetrahedral baculovirus (*Dacrydium penaei*)

DISEASES OF FISH

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

Salmonidi

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



Piano nazionale di controllo per l'AVE degli equini.
Monitoraggio malattie notificabili dei pesci: virus IHN e VHS

Roma, 11 Dicembre 2018

DECISIONE DI ESECUZIONE (UE) 2015/1554 DELLA COMMISSIONE dell'11 settembre 2015 recante modalità di applicazione della **direttiva 2006/88/CE** per quanto riguarda le prescrizioni in materia di sorveglianza e di metodi diagnostici

Inoltre Stabilisce norme riguardanti:

- la sorveglianza, le zone cuscinetto, i **metodi di campionamento e diagnostici** che devono essere usati dagli Stati membri
- le **misure minime di lotta** da applicare in caso di presenza sospetta o confermata di malattia

PCR real time IHNv e VHSV -> metodo ufficiale

Tecniche di laboratorio in applicazione del D.Lgs. 148/2008 secondo Dec UE 1554/2015

POS VIR 013 NOR

	ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DEL LAZIO E DELLA TOSCANA M. ALEANDRI UFFICIO DI STAFF BIOTECNOLOGIE
POS VIR 013 NOR rev. 9 del 13/04/2017 VIRUS NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA (IHN), VIRUS SETTICEMIA EMORRAGICA VIRALE (VHS) (COLTURE CELLULARI)	
pag. 1 di 14	

* IN CASO DI POS INT/NOR

VIRUS NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA (IHN),
VIRUS SETTICEMIA EMORRAGICA VIRALE (VHS)
(COLTURE CELLULARI)

Rev.	Data di emissione:	Redazione Incaricato Struttura	Verifica Responsabile della prova/Responsabile strutture/attività	Approvazione Responsabile di Struttura	Approvazione RQ/RB (**)
9	13/04/2017	G. CARDETI	G. CARDETI	R. CAVALLINA	
8	13/01/2015	G. CARDETI	G. CARDETI	R. CAVALLINA	S. GUZZO

** In caso di POS INT/SUP

Descrizione delle modifiche	
	<ul style="list-style-type: none"> L'emissione della Decisione di esecuzione (UE) 2015/1554 della Commissione dell'11 settembre 2015 GU CE L. 247/10 23/09/15 La redazione della POS VIR 001 NOR - Virus necrosi ematopoietica infettiva (IHN) (RT-PCR real time) Virus setticemia emorragica (VHS) (RT-PCR real time) Adeguamento alla PG QUA 005/11 rev. 24

POS VIR 001 NOR

	ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DEL LAZIO E DELLA TOSCANA "M. ALEANDRI" UFFICIO DI STAFF BIOTECNOLOGIE
POS VIR 001 NOR rev. 0 20/04/2017 VIRUS NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA (IHN) (PCR REAL TIME REVERSE TRANSCRIPTION) VIRUS SETTICEMIA EMORRAGICA VIRALE (VHS) (PCR REAL TIME REVERSE TRANSCRIPTION)	
pag. 1 di 21	

VIRUS NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA (IHN)
(PCR REAL TIME REVERSE TRANSCRIPTION)
VIRUS SETTICEMIA EMORRAGICA VIRALE (VHS)
(PCR REAL TIME REVERSE TRANSCRIPTION)

Rev.	Data di emissione:	Redazione Incaricato Struttura	Verifica Responsabile della prova/Responsabile strutture/attività	Approvazione Responsabile di Struttura	Approvazione RQ/RB (**)
0	20/04/2017	Antonella Corsi	Antonella Corsi	Sabrina Cava Itri	

** In caso di POS INT/SUP

Descrizione delle modifiche:	
------------------------------	--

Piano nazionale di controllo per l'AVE degli equini.
Monitoraggio malattie notificabili dei pesci: virus IHN e VHS

Roma, 11 Dicembre 2018

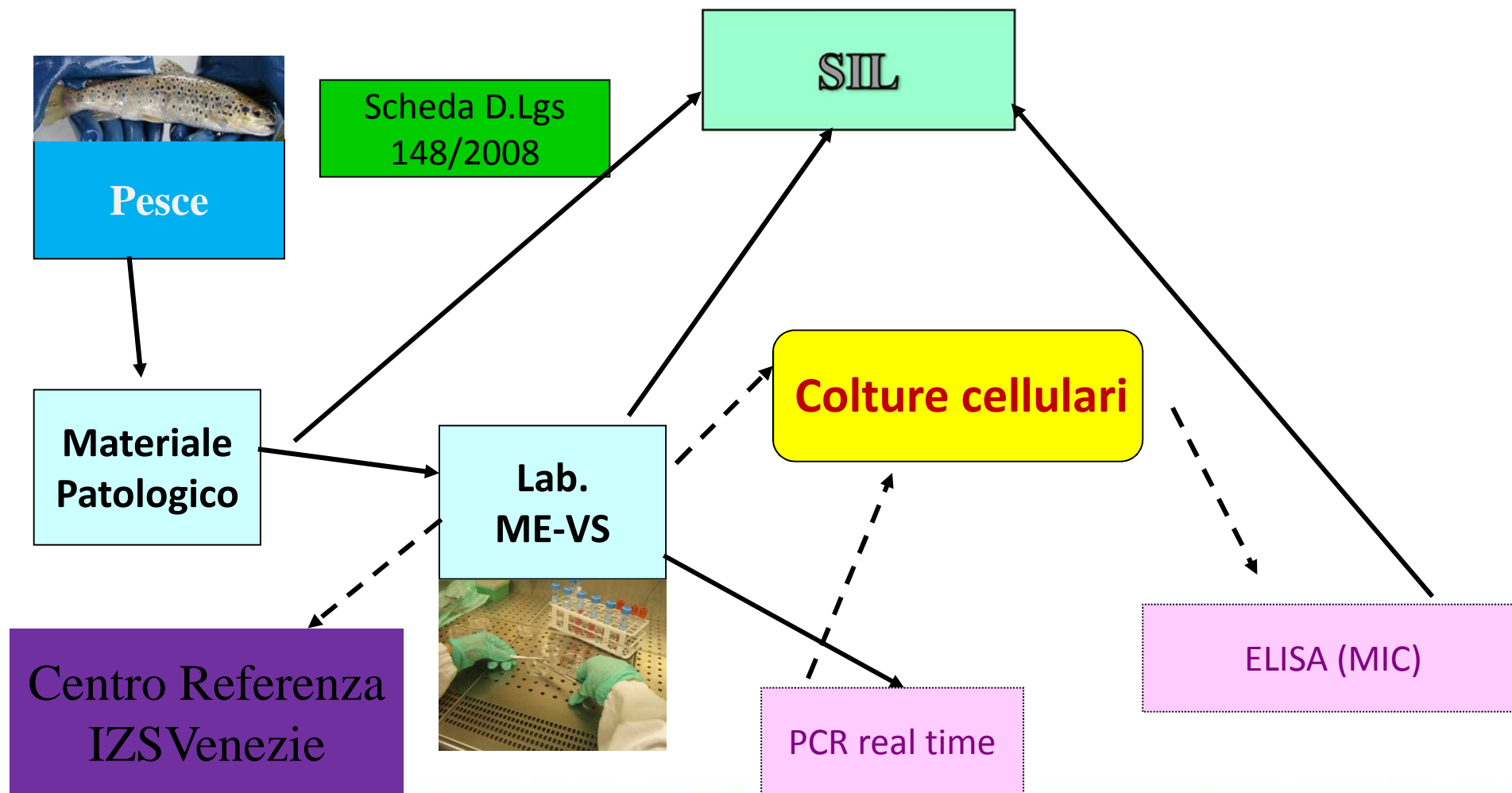
Diagnosi di Laboratorio

La ricerca di VHSV e IHNV deve essere eseguita mediante isolamento ed identificazione dell'agente causale secondo la metodologia descritta nella Dec. 1554/2015 UE

Ottobre – Giugno (temperatura acqua < 14°C)



Flusso Matrici Pesci x Diagnosi IHNV e VHSV



Roma, 11 Dicembre 2018

FLUSSO DI LAVORO PER SALMONIDI **Trota iridea, fario, macrostigma**

MONITORAGGIO SECONDO D. Lgs. 148/2008
(gennaio-giugno; ottobre-dicembre)

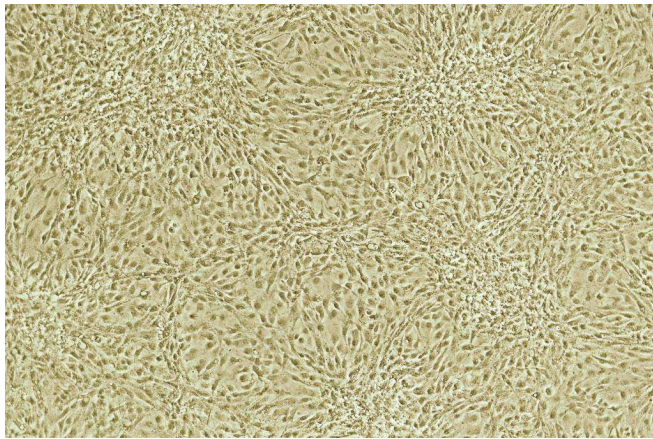
Con la Decisione UE 1554 del 2015 in vigore dal 01/04/2016:

- a) applicazione dei protocolli di RT-Real Time a pool di organi di massimo 5 soggetti a pool
- b) Se PCR positiva, isolamento del virus su due linee cellulari (BF-2, EPC)

Specie	Patologia/PCR	CC (se PCR dubbio o pos)	Note
Trota iridea, fario, macrostigma	IHNv	BF-2 EPC	Malattia notificabile
	VHSv		Malattia notificabile

SUBSTRATI, TERRENI, REAGENTI

- **Colture cellulari:** 2 linee continue di pesce (BF-2 e EPC)



Linea continua BF-2

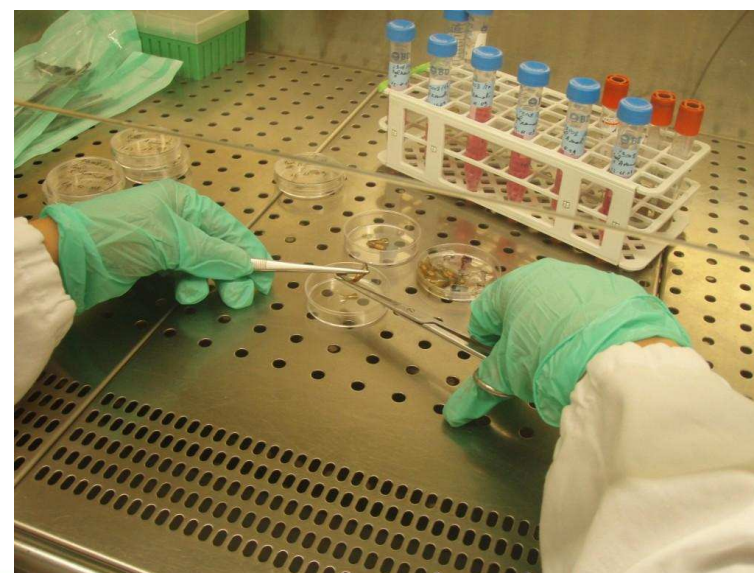
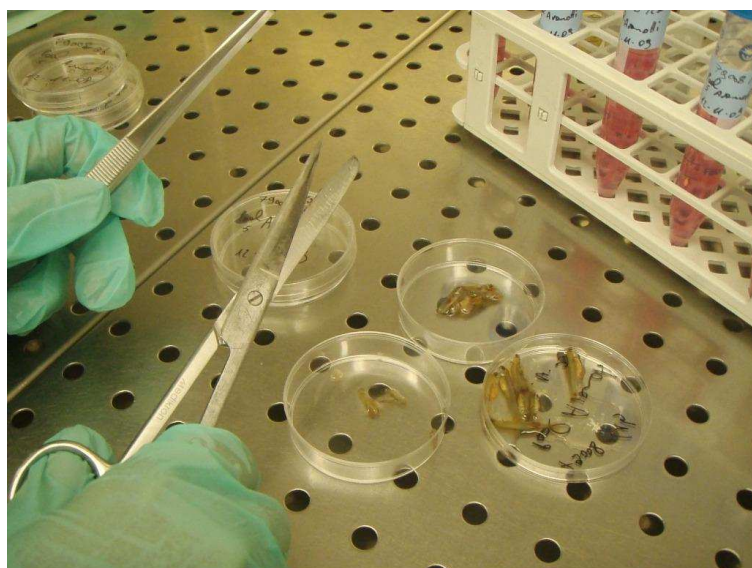


Linea continua EPC

IHN: Sospensione virale preparata con lo stipite di referenza ceppo 217/A

VHS: Sospensione virale preparata con lo stipite di referenza ceppo F1

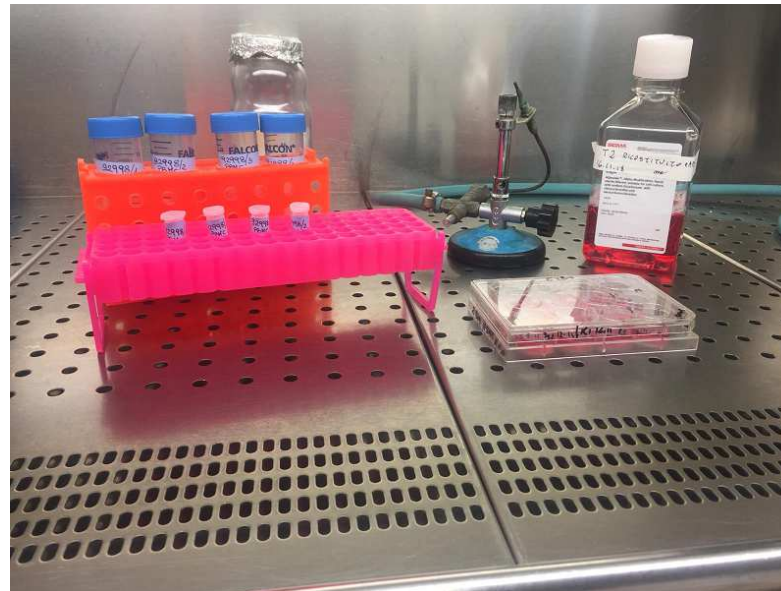
OMOGENIZZAZIONE CAMPIONI



REAGENTI, TERRENI, SUBSTRATI

Terreno di crescita: E-MEM Sigma al 10% di SFB, 1% Glutamina, Tris-HCl 1N

Terreno per omogenati: E-MEM 5% PSF



Modulo x Isolamento Virus POS VIR 013 NOR

POS VIR 013 NOR/1 rev. 9

I.Z.S.L.T. "M.Aleandri"
Ufficio di Staff Biotecnologie

pag /

ISOLAMENTO DI "VIRUS IHN E VHS"
MEDIANTE INOCULAZIONE DI COLTURE CELLULARI
Elenco Campioni

Data..... Operator:

Campioni:

[illegible]

Culture Cellulari: Contenitore

Terreno per Estratti Data prep:

Terreno di Crescita per Culture Cellulari con Tris-HCl Data prep:

Ceppo virale di Riferimento ...IHNv - mr VIR/...VHSv - mr VIR

Note:

Inoculo dopo ore dalla preparazione delle TC

POS VIR 013 NOR/1b rev. 9

I.Z.S.L.T. "M.Aleandri"
Ufficio di Staff Biotecnologie

pag. /

ISOLAMENTO DI "VIRUS IHN E VHS" - Schema di inoculo Campioni e Ctrl

Cultura Cellulare Pass. N. del

....) **N. registrazione:**

Ctrl

<u>Data</u>	<u>Firma</u>
...°p
24 h
2 gg
3 gg
4 gg
5 gg
... gg
Pass/Cong
Risultato

Coltura Cellulare ...BF-2.../...EPC....

Pass. N. / del

....) **N. registrazione:** Virus IHN / Virus VHS

[illegible]

Ctrl (-)

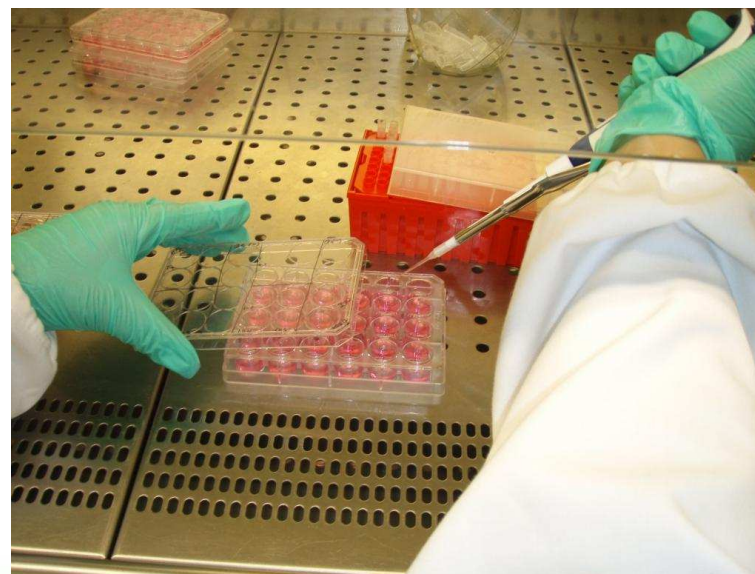
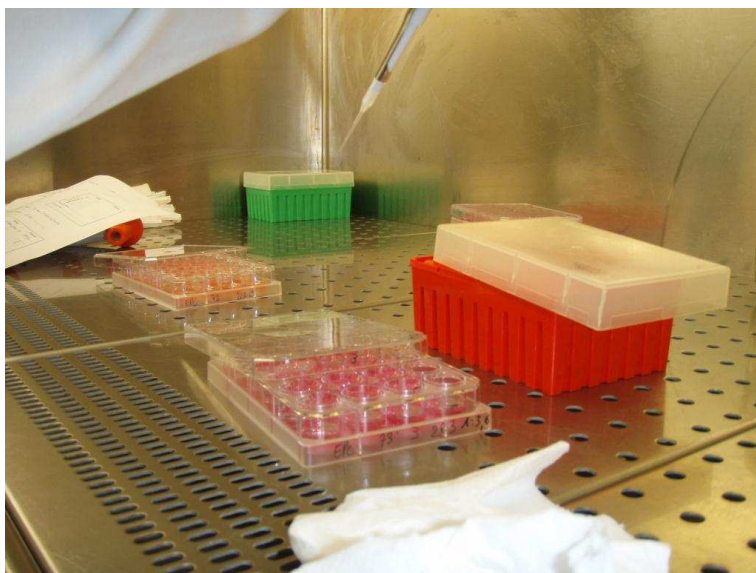
<u>Data</u>	<u>Firma</u>
... °p
24 h
2 gg
3 gg
4 gg
5 gg
... gg
Pass/Cong
Risultato/.....

Firma Verificatore

.....

INOCULO CAMPIONI

Inoculo t.q. e 1:10 in Space 24 pz

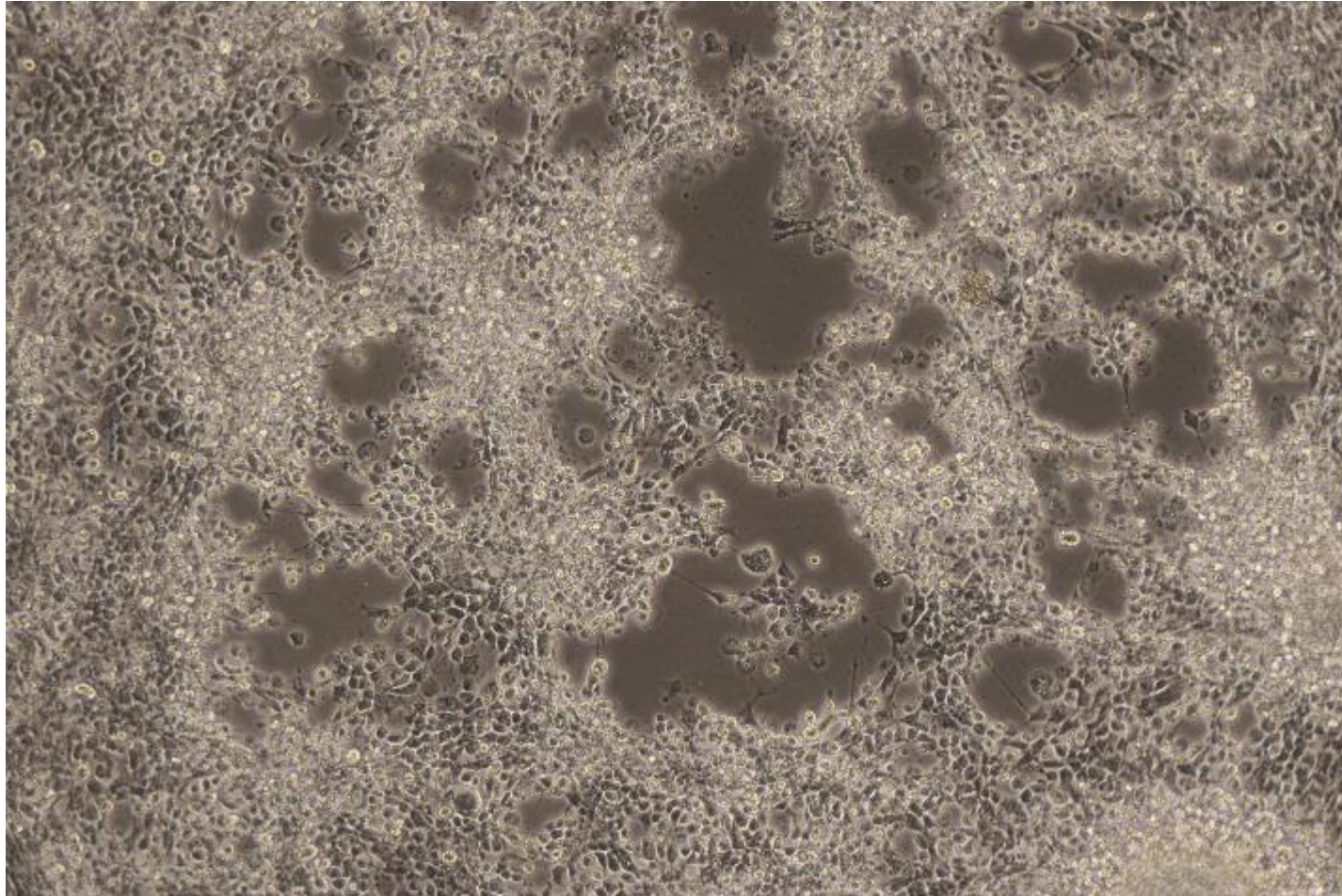


INCUBAZIONE CAMPIONI

Incubazione a 15°C x 7 gg; 2 passaggi



EFFETTO CITOPATICO su EPC



Virus VHS: ECP su
BF2 (20x)

EFFETTO CITOPATICO su BF-2

Virus IHN: ECP su
BF2 (10x)





Se **ECP** -> identificazione mediante PCR real time e invio del ceppo isolato al Centro di Referenza Nazionale per l'Ittiopatologia (IZS Venezie)

Se **NON ECP** -> 2° passaggio e referto

CIRCUITI INTERLABORATORIO

EAV -> CeRME o ANSES (circa ogni due anni)

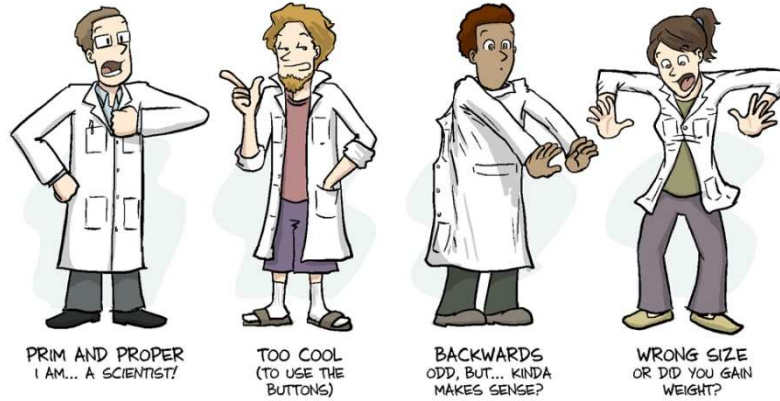
IHN e VHS -> AQUA IV (ogni anno in tardo autunno)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

LAB COAT STYLES



WWW.PHDCOMICS.COM

Grazie per l'attenzione

Giampiero Dante

giampiero.dante@izslt.it

Piano nazionale di controllo per l'AVE degli equini.
Monitoraggio malattie notificabili dei pesci: virus IHN e VHS

Roma, 11 Dicembre 2018