



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

## **Progetti di ricerca corrente: utilizzo delle colture cellulari per l'isolamento di virus oggetto di ricerca**

Stefania Sittinieri

Lab. Microscopia elettronica e Virologia speciale



# Indice

*IZSLT 03/13 RC* – “Infezione da Cowpoxvirus negli animali: studi sulla presenza e diffusione del virus in Italia Centrale”

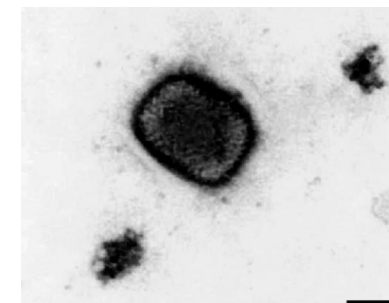
*IZSLT 01/14 RC* – “Sorveglianza sanitaria in pesci autoctoni ed ornamentali: valutazione epidemiologica del rischio nel Lazio”

*IZSLT 03/15 RC* – “Il Papillomavirus felino e le neoplasie cutanee dei felidi: nuovi approcci diagnostici per un virus oncogenico emergente”

*IZSLT 13/15 RC* – “Messa a punto di saggi per la diagnosi in vita di Cimurro (CDV) e caratterizzazione dei ceppi circolanti in Italia centrale”

*IZSLT 09/17 RC* – “Studio del ruolo della immunità innata del cavallo nel controllo dell’infezione dell’Anemia Infettiva Equina”

Brochure



## Infezioni da Poxvirus zoonosici in Europa ed il Progetto di Ricerca Corrente 2013 “Infezione da Cowpoxvirus negli animali: studi sulla presenza e diffusione del virus in Italia Centrale”

Progetto di Ricerca Corrente

Ministero della Salute

Art. 12 D.Lgs 502/92

IZSLT 03/13 RC

Responsabile scientifico: Giusy Cardeti



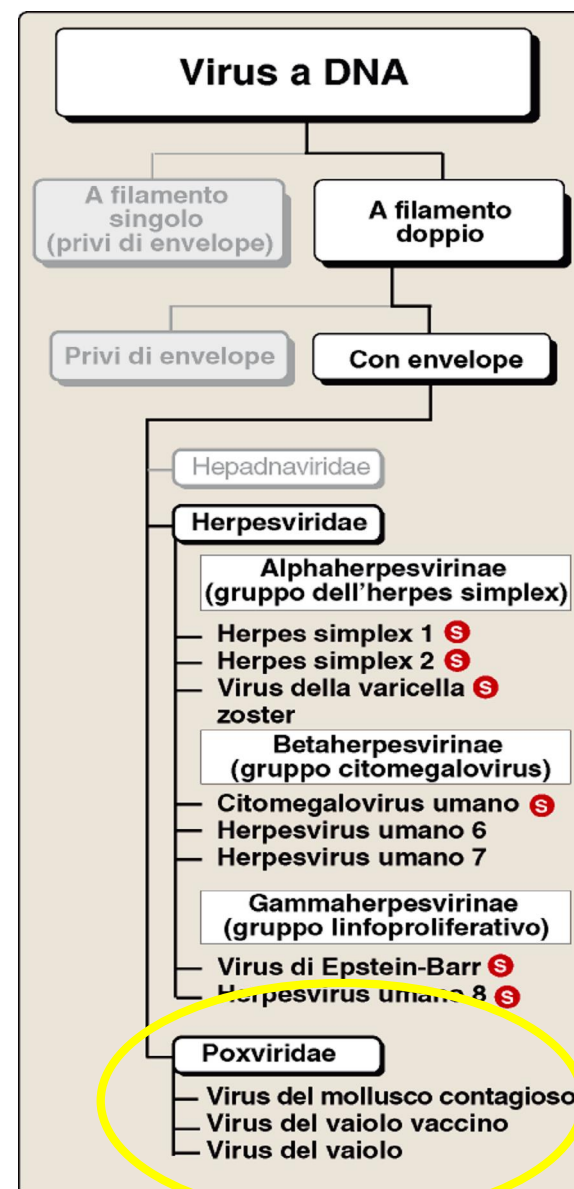
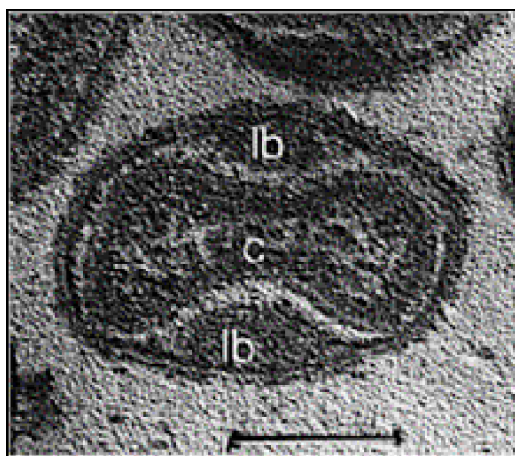
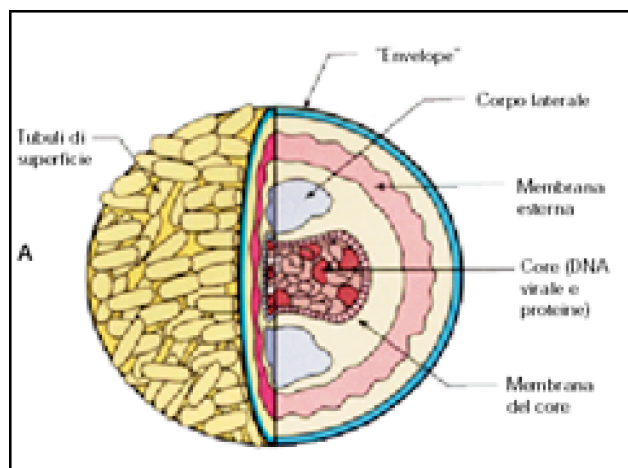
Progetti di ricerca corrente: utilizzo di colture cellulari per l'isolamento di virus oggetto di ricerca

Roma, 11 Dicembre 2018

## COWPOXVIRUS

VIRUS a dsDNA lineare con ENVELOPE

Il virus appartiene alla famiglia **Poxviridae**, sottofamiglia *Chordopoxvirinae*, genere **Orthopoxvirus**, comprendente 10 specie di virus (tra cui il Vaccinia, il Monkeypox e il Variola, patogeni per l'uomo).





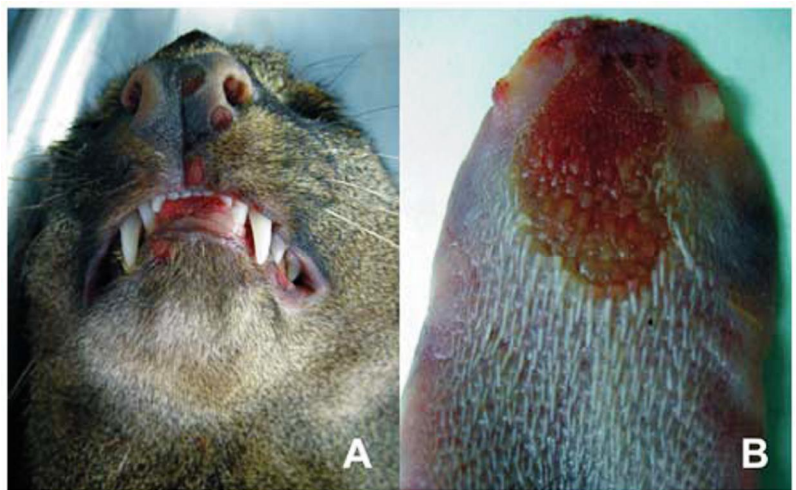
- Oltre a presentare **lesioni cutanee tipiche vaiolose**, gli animali possono indebolirsi per poi morire
- Il **gatto e il ratto domestico** sono i principali responsabili della trasmissione all'uomo
- Nell'**uomo** l'infezione deriva dal contatto diretto con animale infetto; non è mai stata dimostrata trasmissione da uomo a uomo. La malattia può essere grave in soggetti immunocompromessi
- Il virus **penetra attraverso ferite** cutanee.

# METODOLOGIA

- “ Prelievo lesioni cutanee da animali vivi.
- “ Prelievo lesioni cutanee e organi (polmone, fegato, milza, rene) da animali morti.



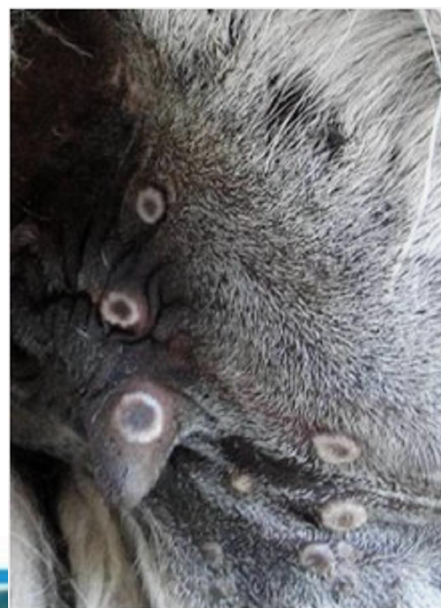
(Lanave et al. EID Sept 2018)



**Lesioni su muso e lingua di Jaguarundi**  
(Kurth et al, Germania 2009)

**Lesioni crateriformi (Lama)**

© D'Alterio G, Viterbo, 2009

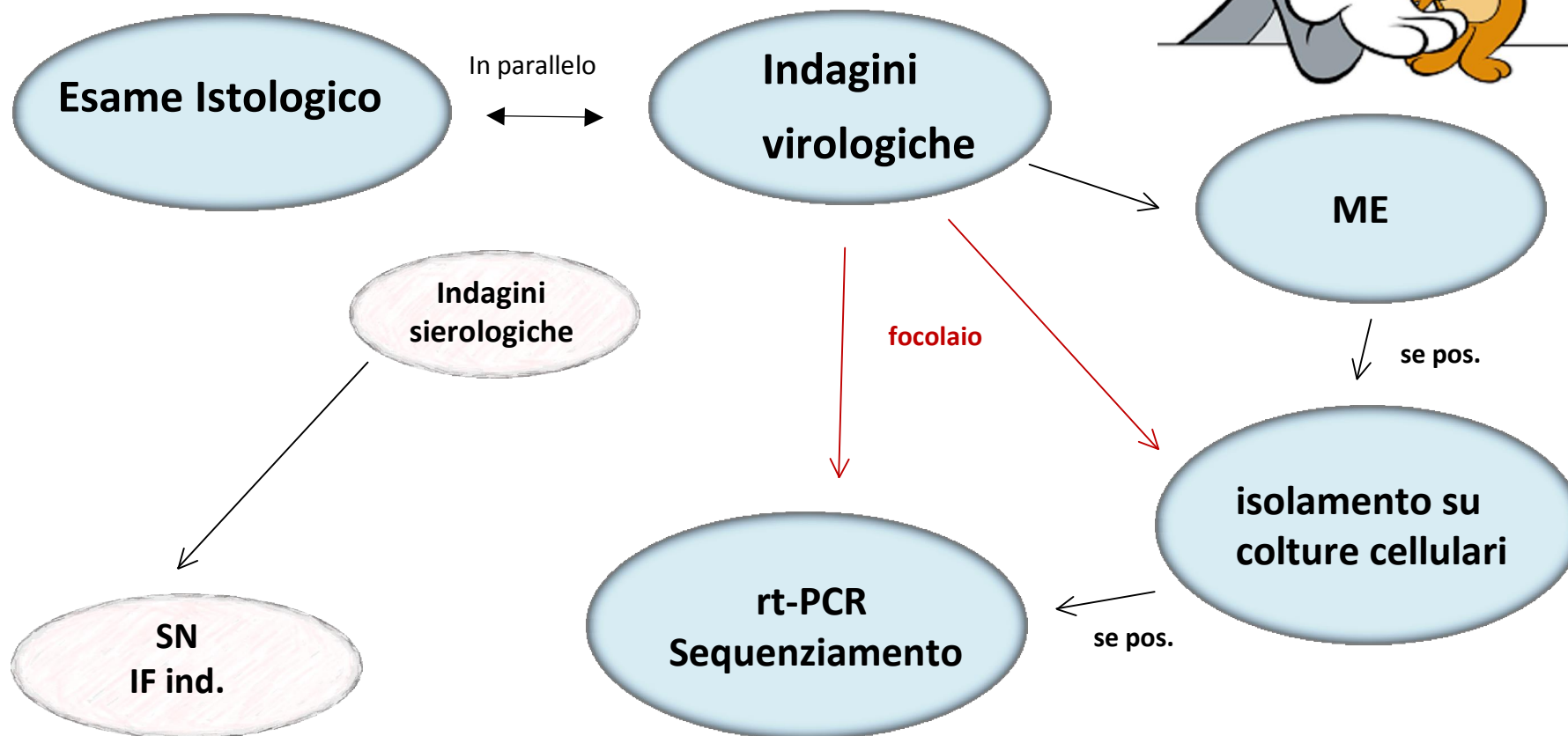


**Ratto domestico: lesioni cutanee sulle zampe**  
(Vogel S et al, Germania 2012)

Progetti di ricerca corrente: utilizzo di colture cellulari per l'isolamento di virus oggetto di ricerca

Roma, 11 Dicembre 2018

# Esami di laboratorio





## Isolamento su colture cellulari (POS VIR 012 INT)

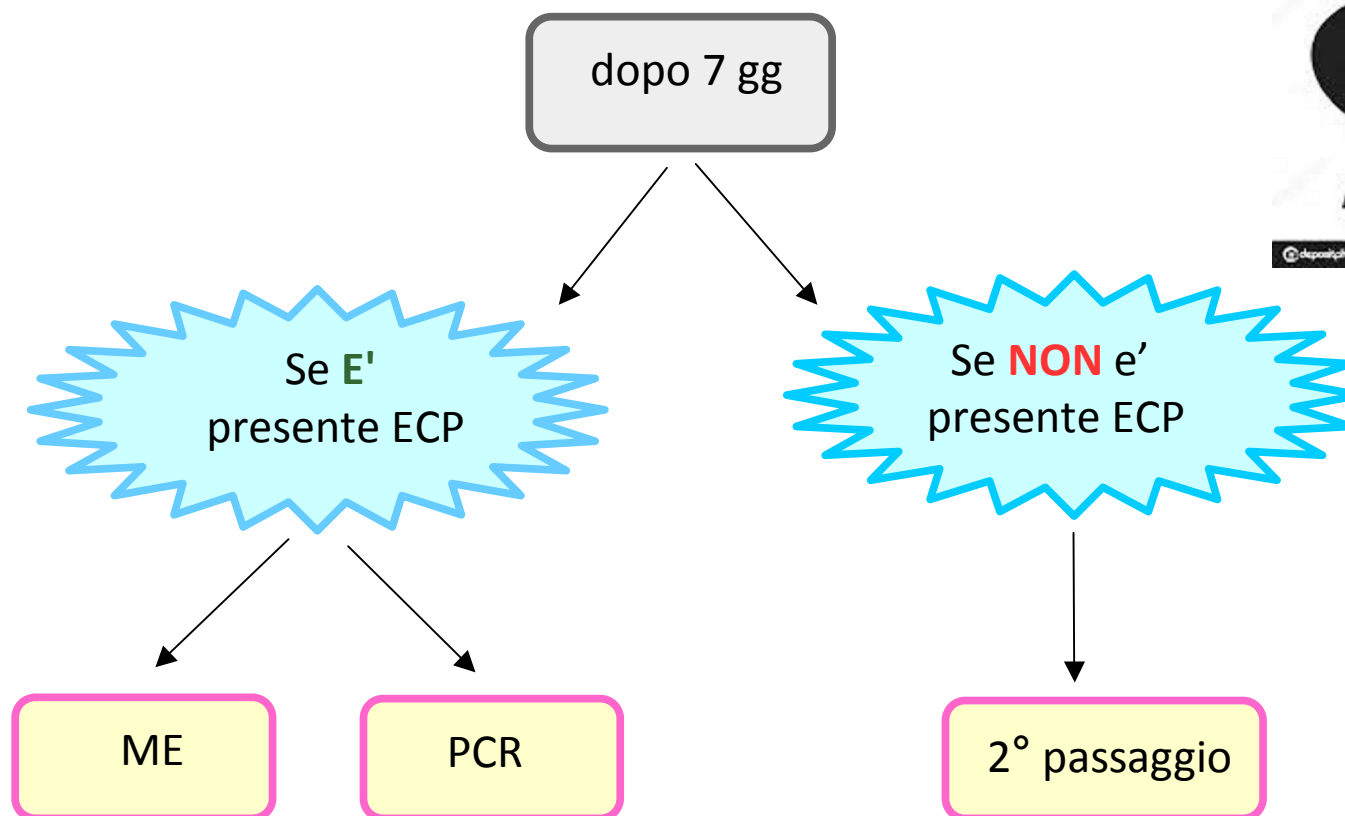


- ✓ Prelevare 1 g di tessuto da analizzare
  - ✓ Trasferirlo in un mortaio sterile e sminuzzare con le forbici sterili
  - ✓ Versare la polvere di quarzo ed omogeneizzare con il pestello e circa 2-3 ml di terreno per estratti (= EMEM+5% PSF)
  - ✓ Aggiungere 6-7 ml di terreno per estratti, mescolare e versare la sospensione in una provetta sterile
  - ✓ Centrifugare a 3000 g /30' circa a +4°C
  - ✓ Trasferire il surnatante in una nuova provetta sterile
  - ✓ Inoculare su colture cellulari
- BHK21  
VERO

Incubare a 37°C ± 1°C al 5% di CO<sub>2</sub>

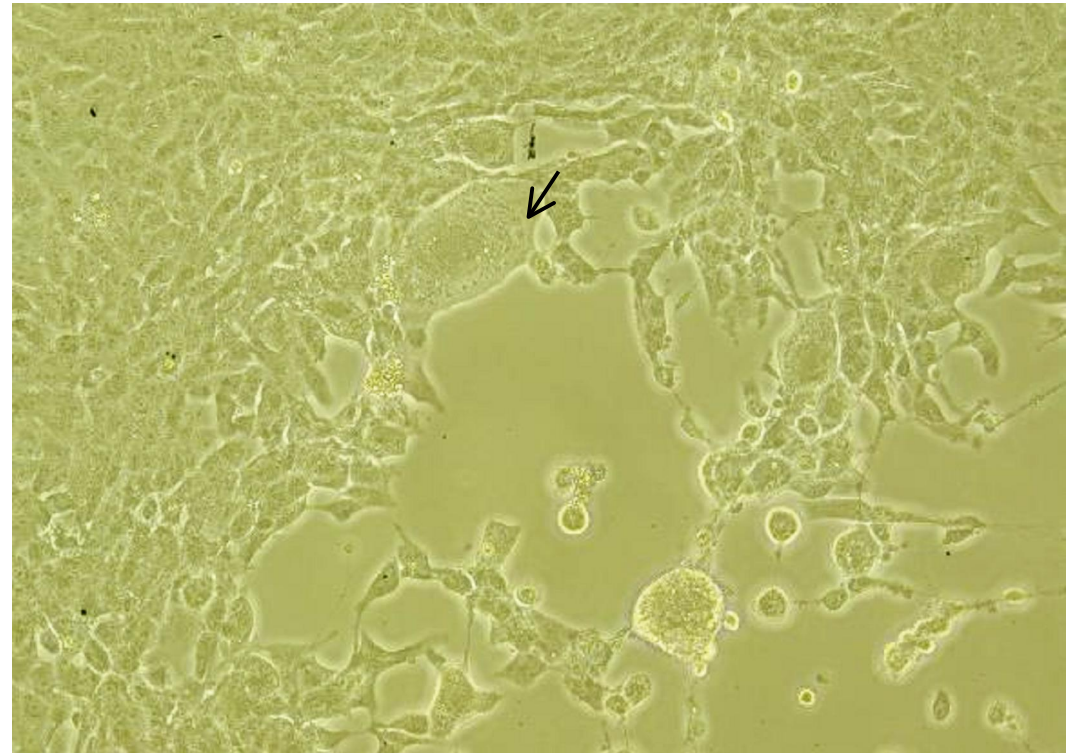


- Le cellule si osservano giornalmente al **Microscopio Ottico**





Vero non infette  
10x



**OrthopoxVirus:** Corpi inclusi  
intracitoplasmatici (Vero al  
MO, 20x)



## Focolaio nel 2015:

- Prelievo agli animali con sintomi e lesioni
- prelievo di organi da animali deceduti e di sangue da altre specie e dagli operatori, eventualmente venuti a contatto con gli animali infetti

### Ricerca di virus e anticorpi specifici

EE, ME, **CC**, PCR

Esami sierologici (SN, IF)

Isolato ceppo di Orthopoxvirus -> tipizzato mediante PCR e NGS -> ceppo nuovo depositato in GenBank come OPV Abatino

## Sorveglianza sanitaria in pesci autoctoni ed ornamentali: valutazione epidemiologica del rischio nel Lazio

IZSLT 01/14 RC

Responsabile scientifico: Teresa Bossù

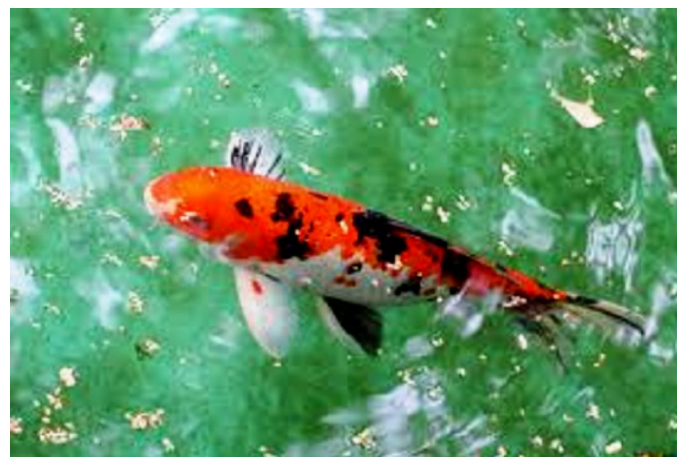
**TC pesci**

per ricerca di

**IHN-VHS-IPN-SVC-  
KHV-BetaNNV**

**Identificazione**

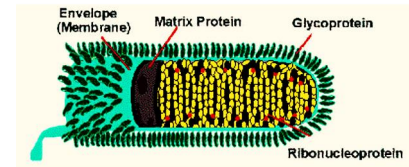
**PCR e ELISA**



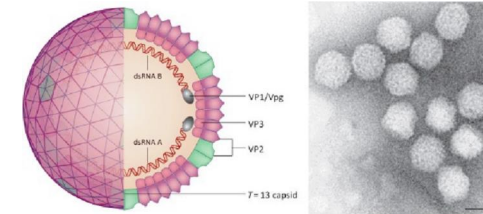


# Virus

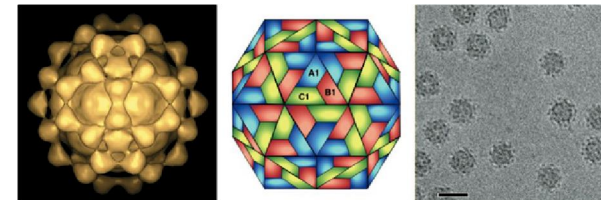
**IHN, VHS, SVC** -> Rhabdovirus -> **EPC e BF-2**



**IPN** -> Birnavirus -> **EPC e BF-2**

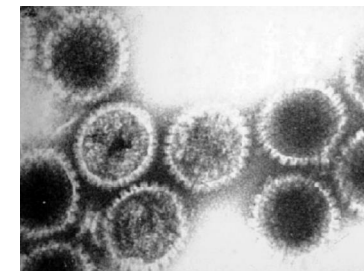


**Betanodavirus** -> Nodavirus -> **SSN-1**



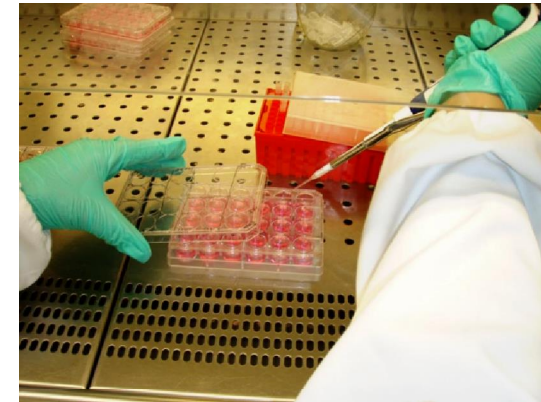
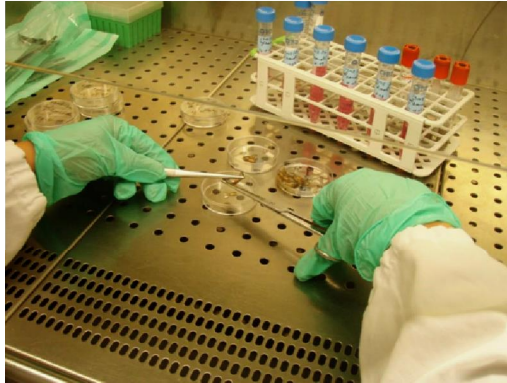
**KHV** -> Herpesvirus -> **CCB**

**CyHV-1 e 2** -> Herpesvirus dei ciprinidi -> **CCB**



## Malattie virali dei pesci ornamentali

Virus	Specie	Tecnica
IPN	Pesci ornamentali di acqua dolce	<u>PCR</u> -> <b>CC (BF-2 e EPC; 22°C)</b> -> ELISA, IF, PCR
IHN-VHS	Pesci ornamentali di acqua dolce	<u>rtPCR</u> -> <b>CC (BF-2 e EPC; 15°C)</b> -> ELISA, IF, rt-PCR
SVC	Ciprinidi	<u>rtPCR</u> -> <b>CC (BF-2 e EPC; 15°C)</b> -> ELISA, IF, rt-PCR
CyHV 1-2-3	Ciprinidi	<u>Real Time PCR</u> -> <b>CC (CCB; 22°C)</b> -> ME, Real Time PCR
Iridovirus	Pesce gatto, pesci marini	<u>PCR</u> -> <b>CC (BF-2 e EPC; 25°C)</b> -> ME, PCR
Betanodavirus	Pesci marini	<u>Real Time PCR</u> -> <b>CC (SSN-1; 25°C)</b>



- Preparazione dell'omogenato da organi
- inoculo in space da 24 pozzetti contenenti i terreni specifici

## RISULTATO RICERCA

***Herpesvirus spp*** evidenziato su  
Branchie di ***Scleropages formosus*** ->  
al ME ma non isolato su CC





## Il Papillomavirus felino e le neoplasie cutanee dei felidi: nuovi approcci diagnostici per un virus oncogenico emergente

RC IZSLT 03/15

Responsabile scientifico: Giusy Cardeti

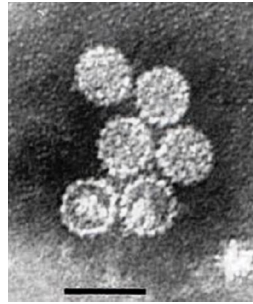


Il progetto ha lo scopo principale di:

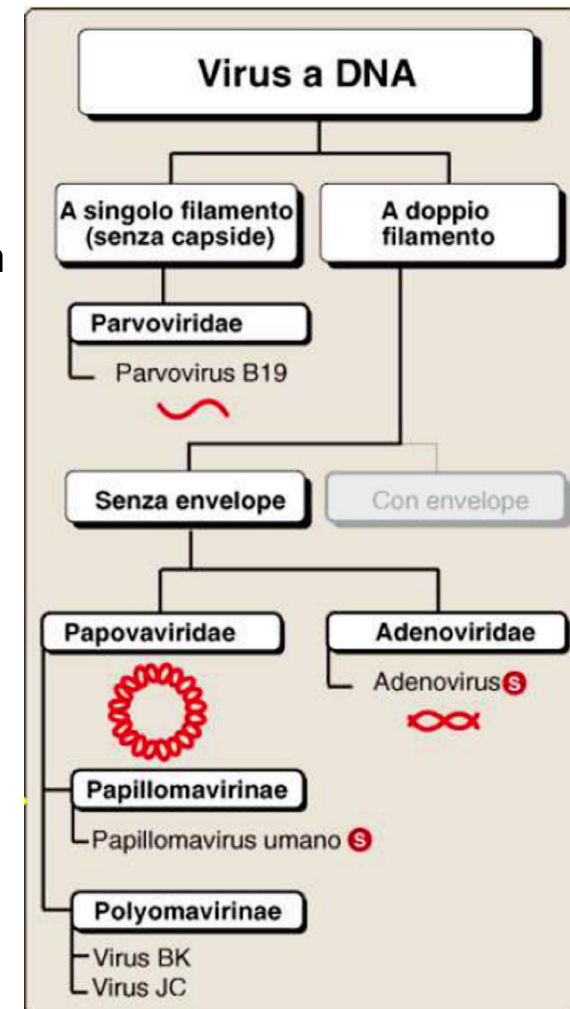
- Chiarire il ruolo del **Papillomavirus felino nelle neoplasie cutanee e mucosali nel gatto**
- Dimostrare la **potenziale eziologia virale del cancro cutaneo e mucosale nei felidi selvatici ed esotici**
- Sviluppare il metodo della **RCA PCR**



# PAPILLOMAVIRUS



- Virus a dsDNA circolare senza envelope, struttura icosaedrica
- replica esclusivamente nello strato basale dei tessuti di rivestimento (**cute e mucose**)
- se ne conoscono diverse centinaia di specie, che infettano mammiferi, ma anche uccelli e rettili.
- l'infezione può causare dei piccoli **tumori benigni** chiamati papillomi o verruche; in alcune specie tra cui il gatto, responsabile del carcinoma a cellule squamose
- **Non è coltivabile** su linee cellulari



Matrici da campionare nell'animale in vita:

- ✓ Lesioni papillomatose\*
- ✓ Lesioni iperproliferative cutanee\*

\* In formalina x ESAME ISTOLOGICO (a t° ambiente)

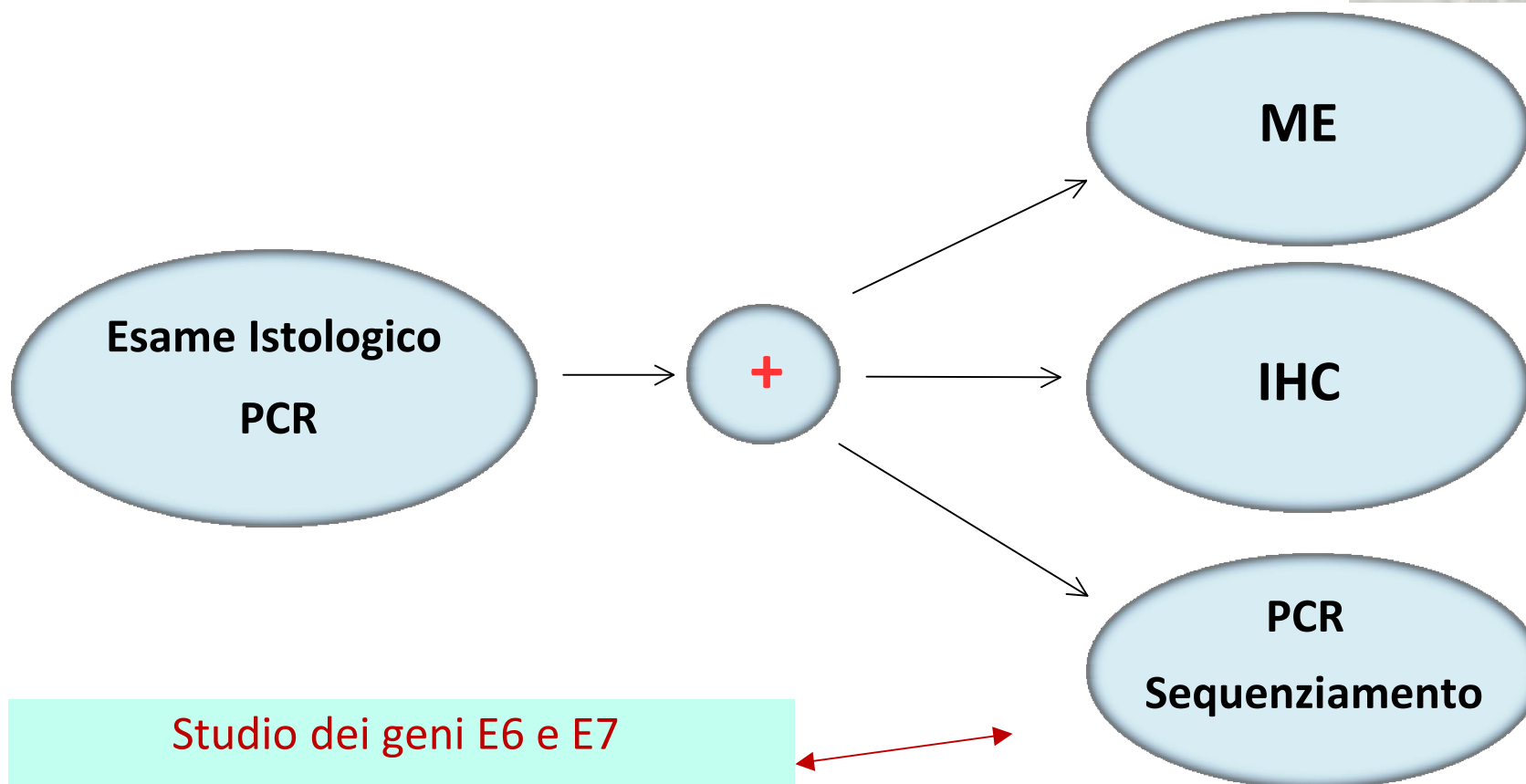
\* In acqua grado reagente o soluzione fisiologica sterile x ESAMI  
VIROLOGICI (a +4°C)

In caso di morte inviare al lab. la carcassa oppure le lesioni.





# Esami di laboratorio



Studio dei geni E6 e E7  
ritenuti responsabili dell'oncogenesi

## **Messa a punto di saggi per la diagnosi in vita di Cimurro (CDV) e caratterizzazione dei ceppi circolanti in Italia centrale**

IZSLT 13/15 RC

Responsabile scientifico: Maria Teresa Scicluna

Brochure



Il progetto ha lo scopo principale di:

“SVILUPPARE UN METODO BIOMOLECOLARE-PCR

“INDIVIDUARE LE MATRICI PIÙ IDONEE

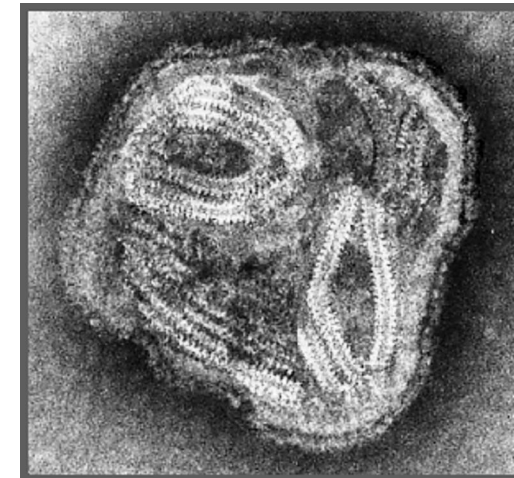
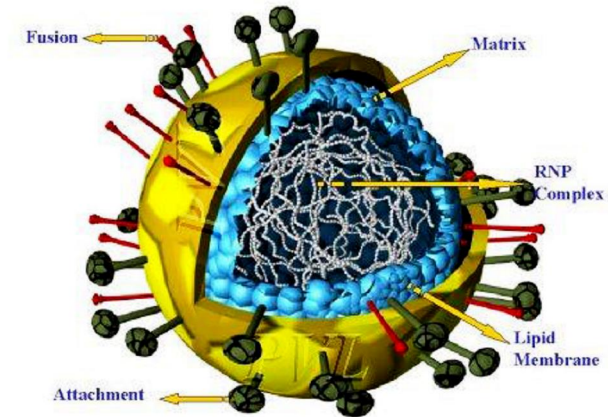


per integrare il sistema diagnostico di CDV anche negli animali in vita



# DEFINIZIONE

- Il cimurro è una malattia infettiva e contagiosa del cane e di altri carnivori, caratterizzata da sintomi respiratori e/o gastro-intestinali e/o nervosi e da elevata morbilità e mortalità
- E' sostenuta da un virus appartenente alla fam. *PARAMYXOVIRIDAE*, gen. *Morbillivirus*
- Sinonimi: Canine distemper - Maladie de Carré



Al Microscopio Elettronico

## Matrici da campionare nell'animale in vita:

- ✓ Tampone congiuntivale\*
- ✓ Tampone nasale\*
- ✓ Tampone rettale\*
- ✓ Tampone vescicale\*
- ✓ Urina

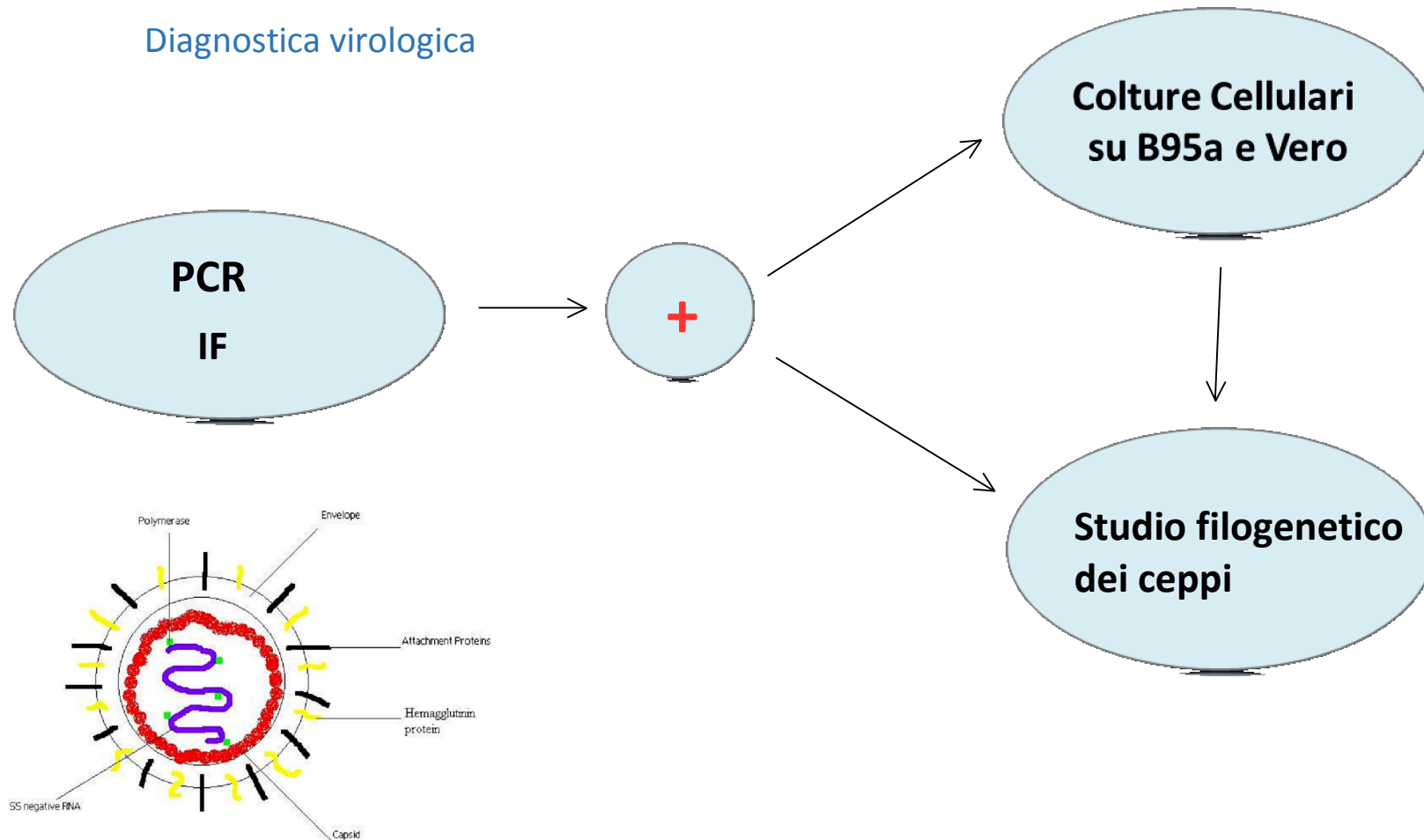


**\* In acqua grado reagente o soluzione fisiologica sterile  
x ESAMI VIROLOGICI (a +4°C)**

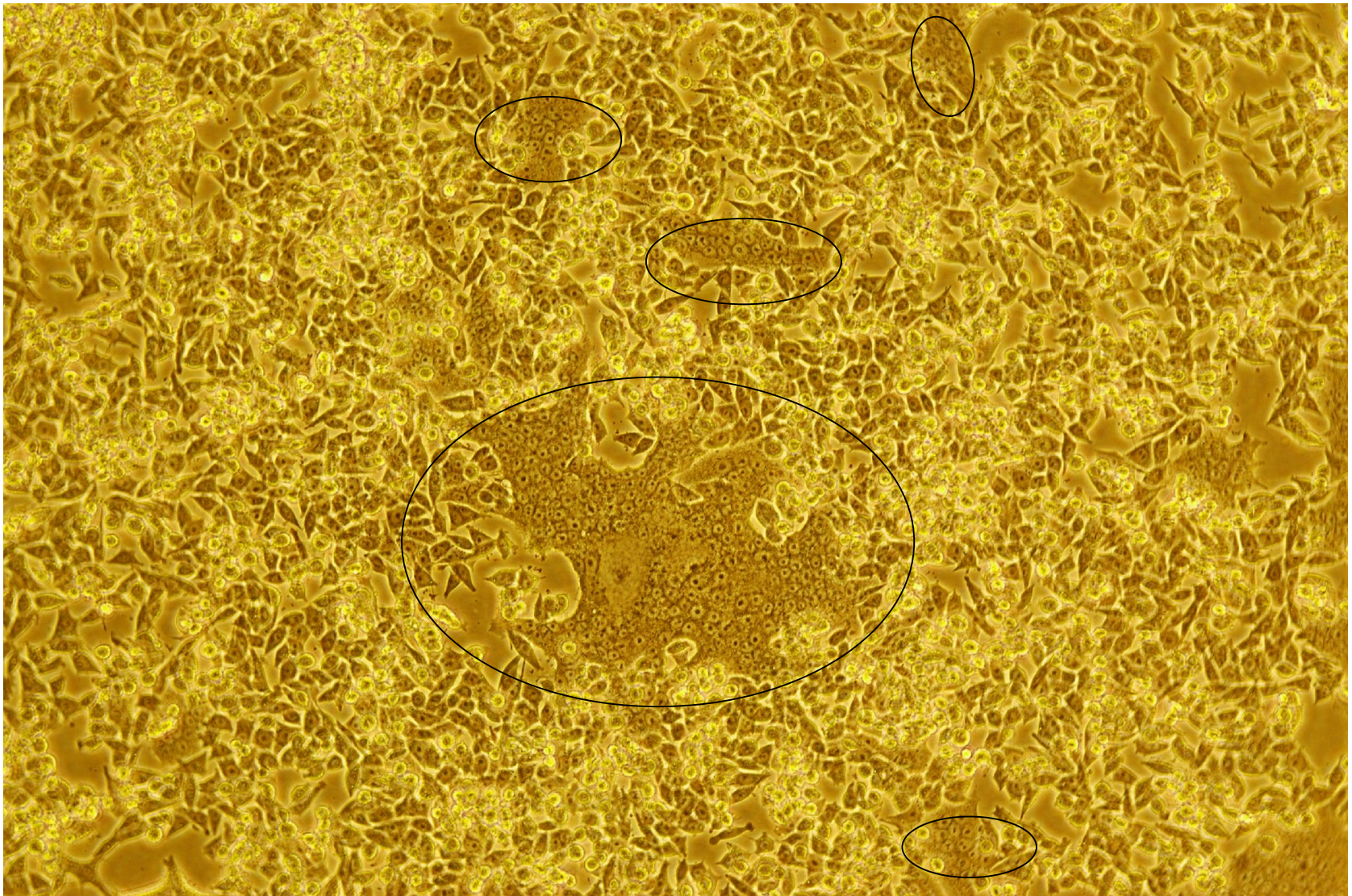
In caso di morte inviare al lab. la carcassa oppure encefalo, polmone e coag. intracardiaco.

# Esami di laboratorio

Diagnostica virologica







**Virus Cimurro:** Sincizi su cellule Vero (MO, 20x)



## **Studio del ruolo della immunita' innata del cavallo nel controllo dell'infezione dell'Anemia Infettiva**

### **Equina**

IZSLT 09/17 RC

Responsabile scientifico: Maria Teresa Scicluna

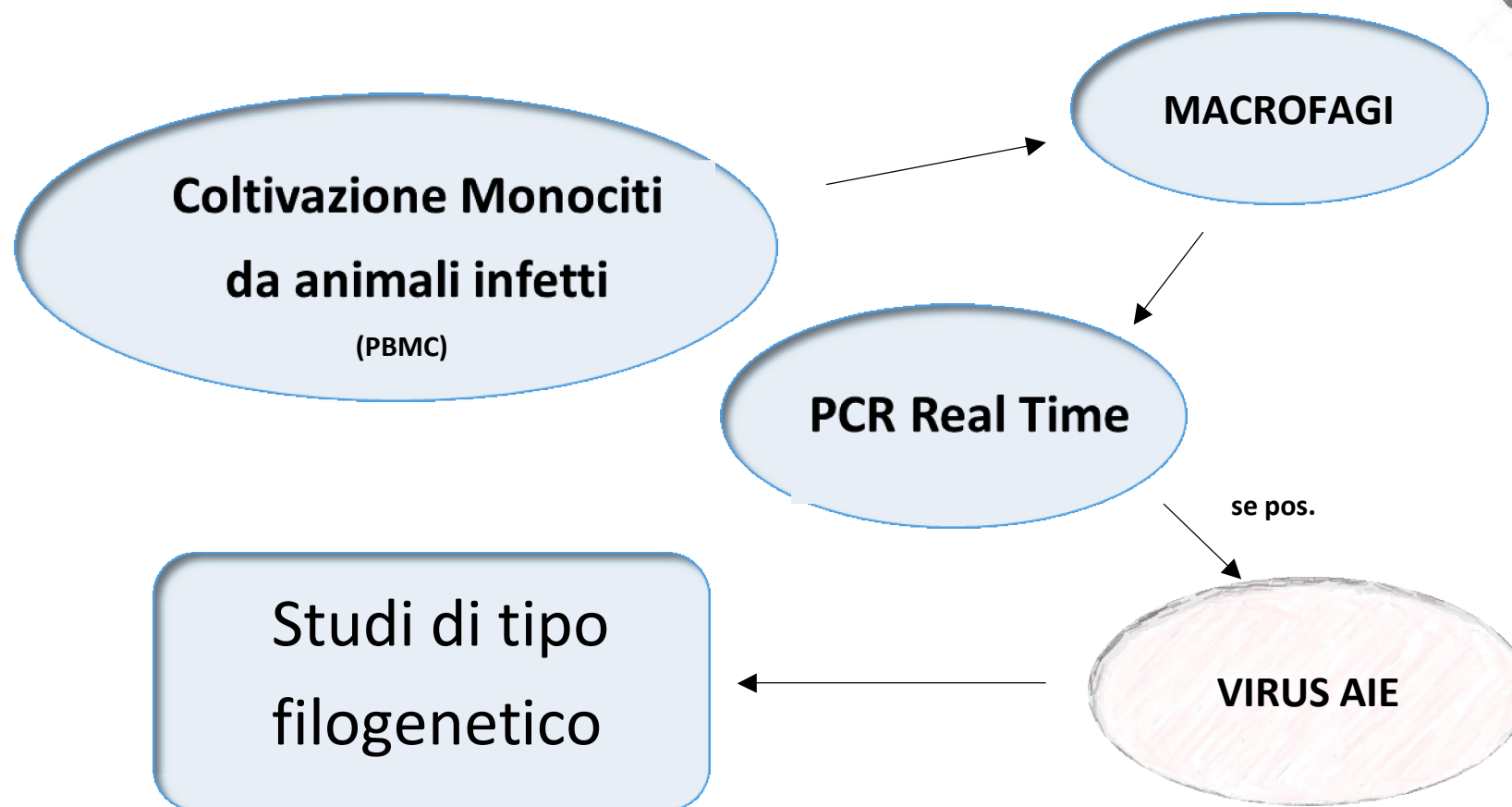


Il progetto ha lo scopo principale di:



- **MESSA A PUNTO DI TECNICHE DI ISOLAMENTO DEI MACROFAGI DEL CAVALLO**
- **IDENTIFICAZIONE E STUDIO FILOGENETICO CEPPI CIRCOLANTI IN ITALIA**
- **STUDIO DELL'IMMUNITA' INNATA CONTRO L'AIE DEL CAVALLO**

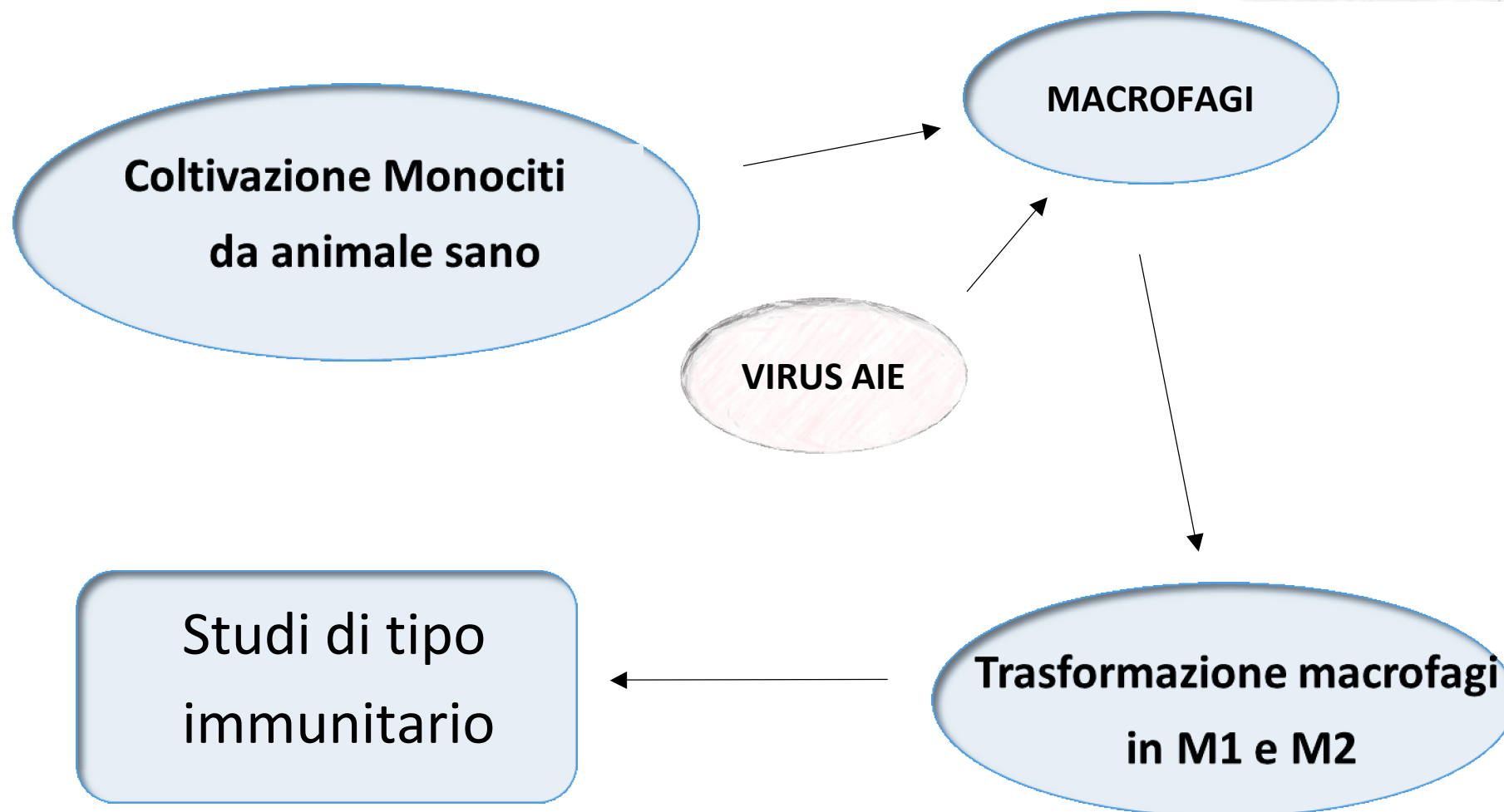
# Esami di laboratorio







# Esami di laboratorio (U.O. Spagna)

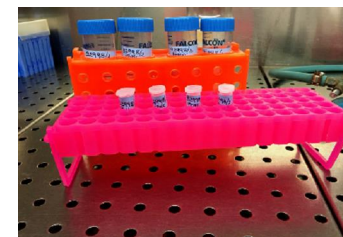


# PROCEDIMENTO

- Prelievo di frammenti di milza
- Campioni di sangue periferico con EDTA

lavorati

Terreno senza siero con aggiunta di antibiotici ed antimicotici



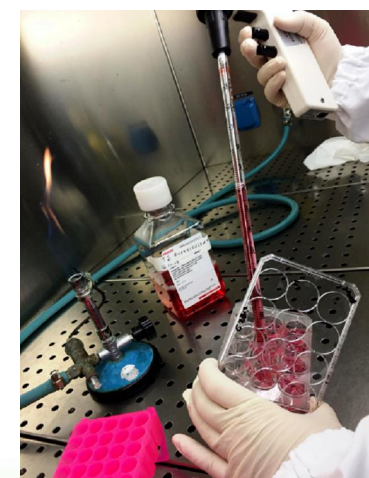
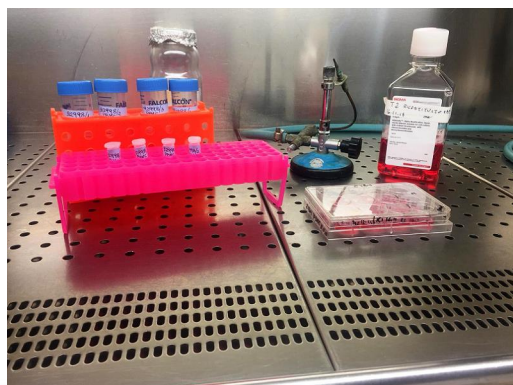
T1

“Giornalmente si controllera’ la comparsa e presenza di macrofagi  
“Sostituzione parziale del terreno di coltura ogni 7 gg x 1 ms

Trasferiti in piastre multi-well contenenti fattori di crescita

- “ Incubazione x 18 h a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>
- “ Lavaggio 2X con PBS + T2
- “ Dopo 3 gg di incubazione, sostituzione del terreno di coltura

T2



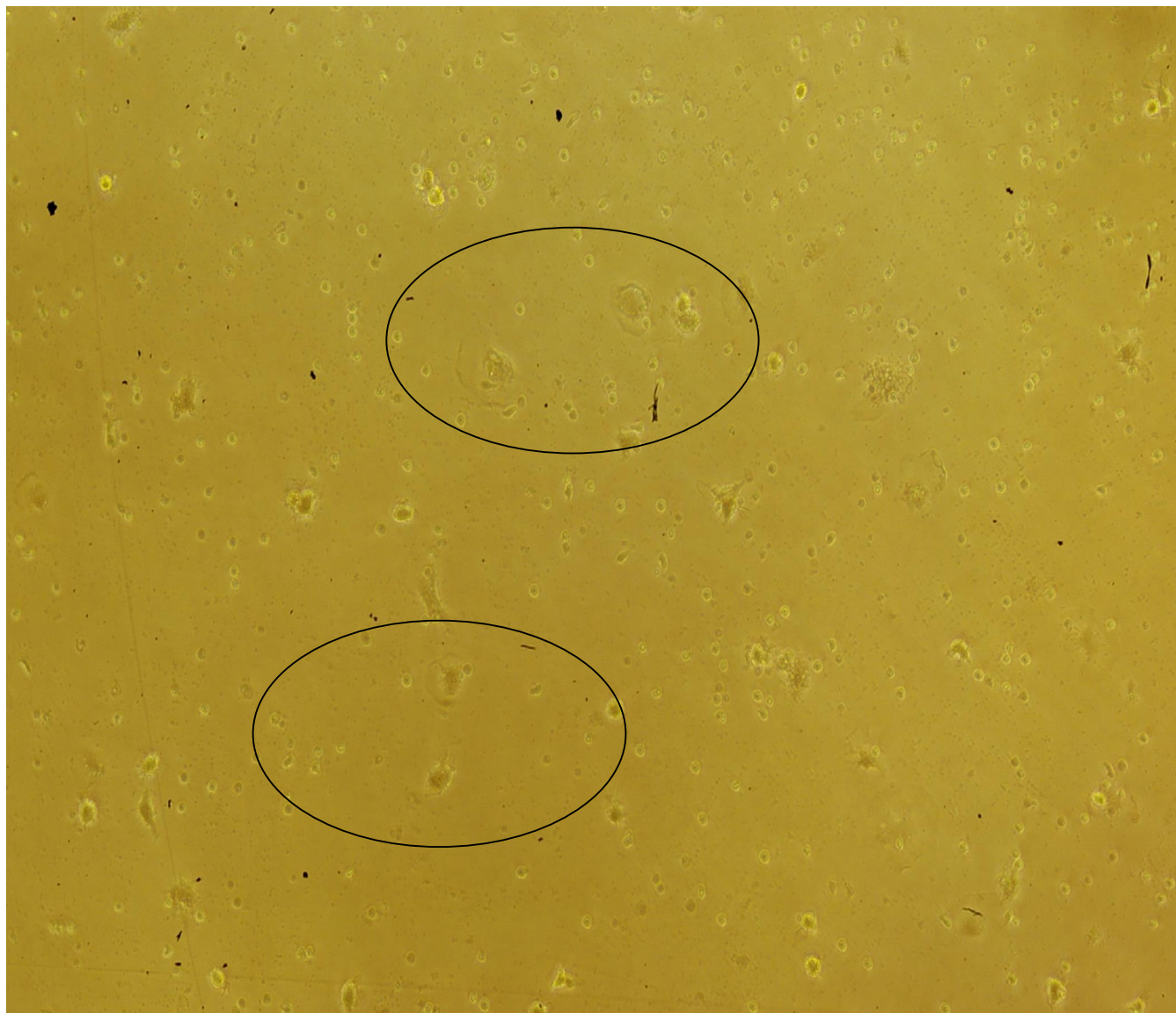
## TERRENI UTILIZZATI

Fattori di crescita	RPMI	-MEM
Antibiotico/Antimicotico		
Gentamicina		
Sodio piruvato		
2-mercaptoetanololo		
Alanyne-Glutamine-Dipeptide	/	
Siero equino al 10%		

T  
1

T  
2



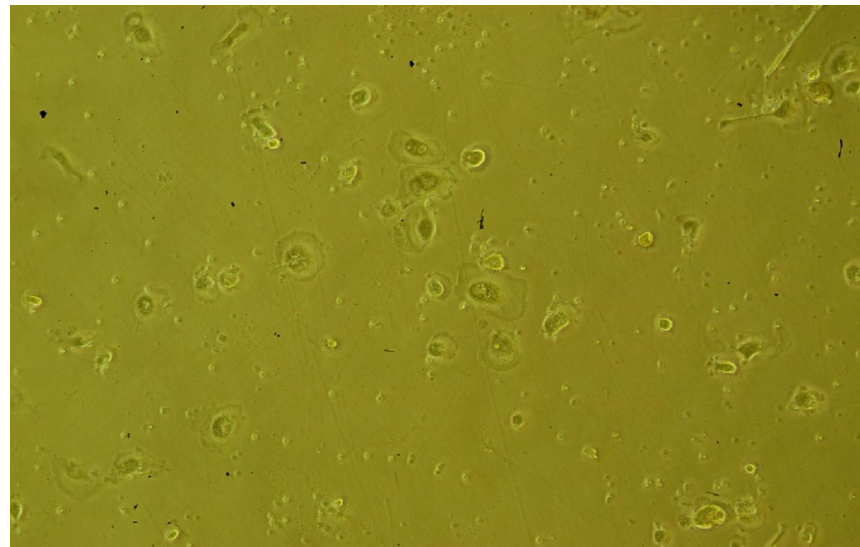
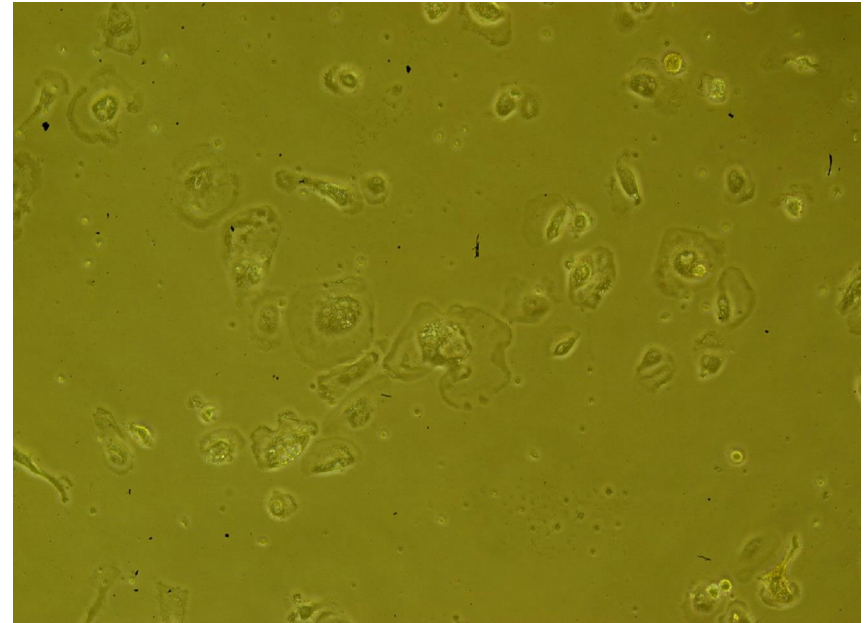
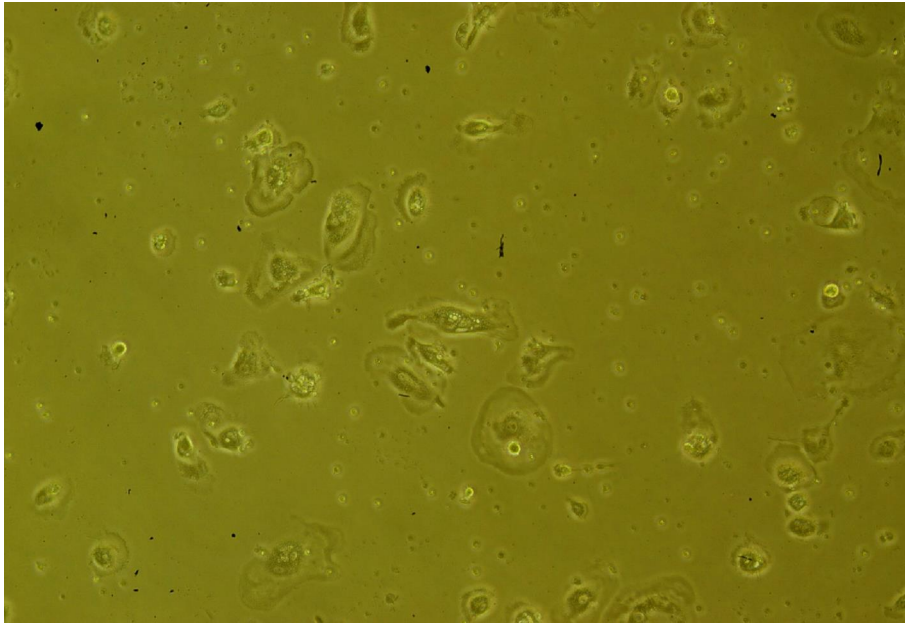


**FOTO MACROFAGI**

Cav.Pos a 9 PID\_20X

Progetti di ricerca corrente: utilizzo di colture cellulari  
per l'isolamento di virus oggetto di ricerca

Roma, 11 Dicembre 2018

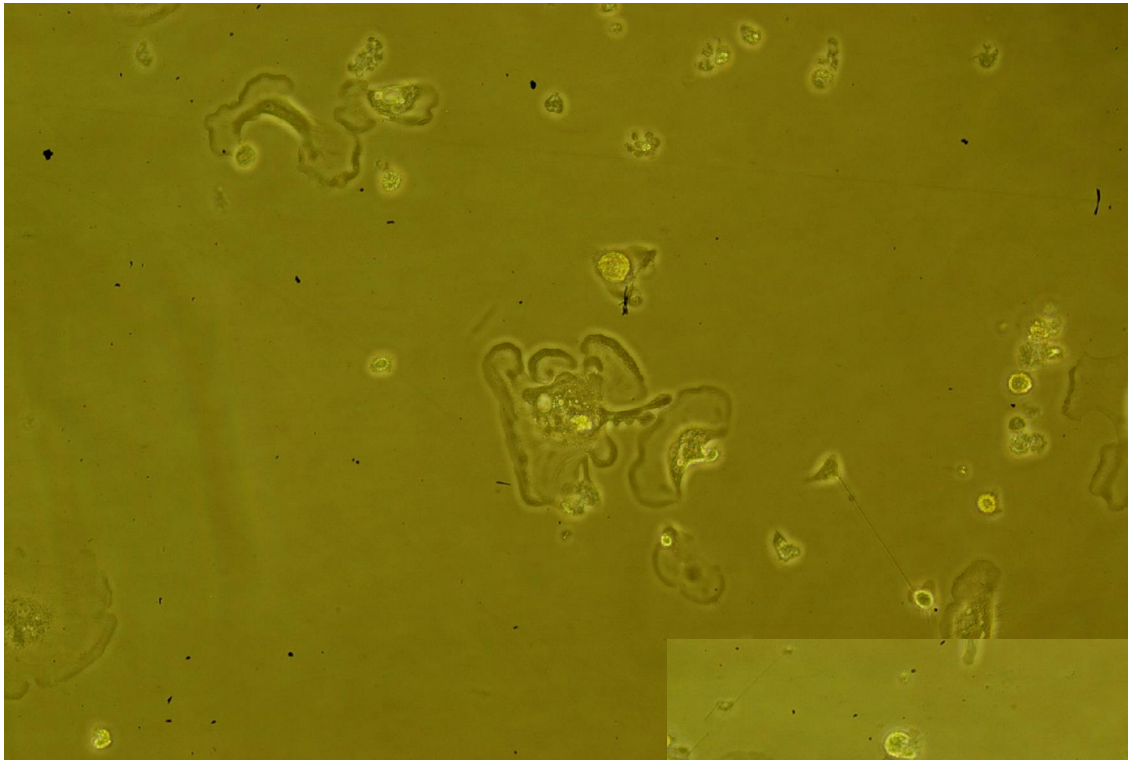


Cav.7 a 30 PID\_20X

Progetti di ricerca corrente: utilizzo di colture cellulari  
per l'isolamento di virus oggetto di ricerca

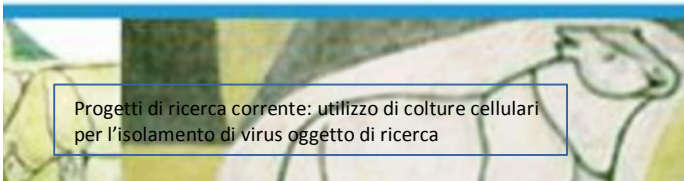
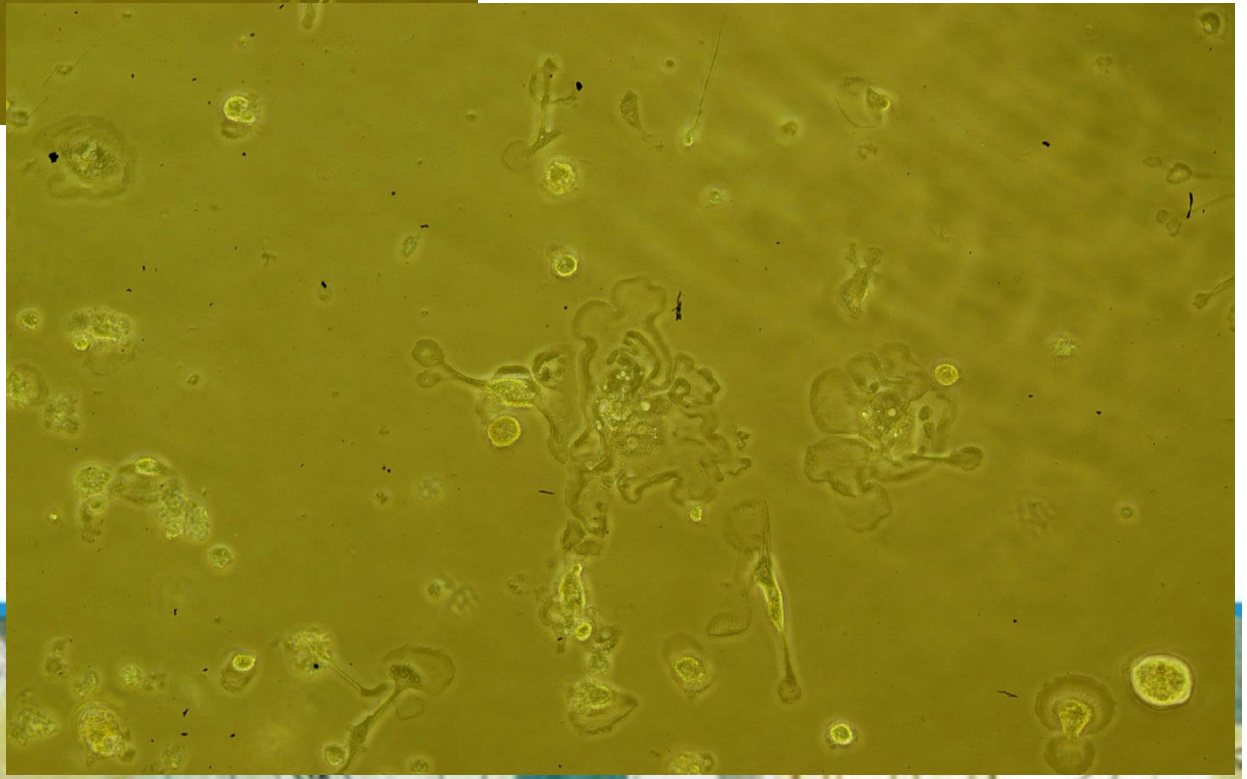
Roma, 11 Dicembre 2018





FILMATO CULTURA DI MACROFAGI – Università di  
Torino

Nerone a 30 PID\_20X

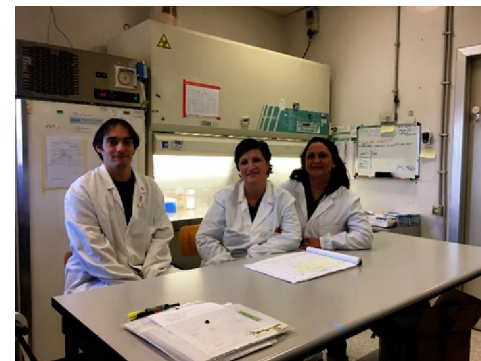


Progetti di ricerca corrente: utilizzo di colture cellulari  
per l'isolamento di virus oggetto di ricerca





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



Progetti di ricerca corrente: utilizzo di colture cellulari  
per l'isolamento di virus oggetto di ricerca

Roma, 11 Dicembre 2018