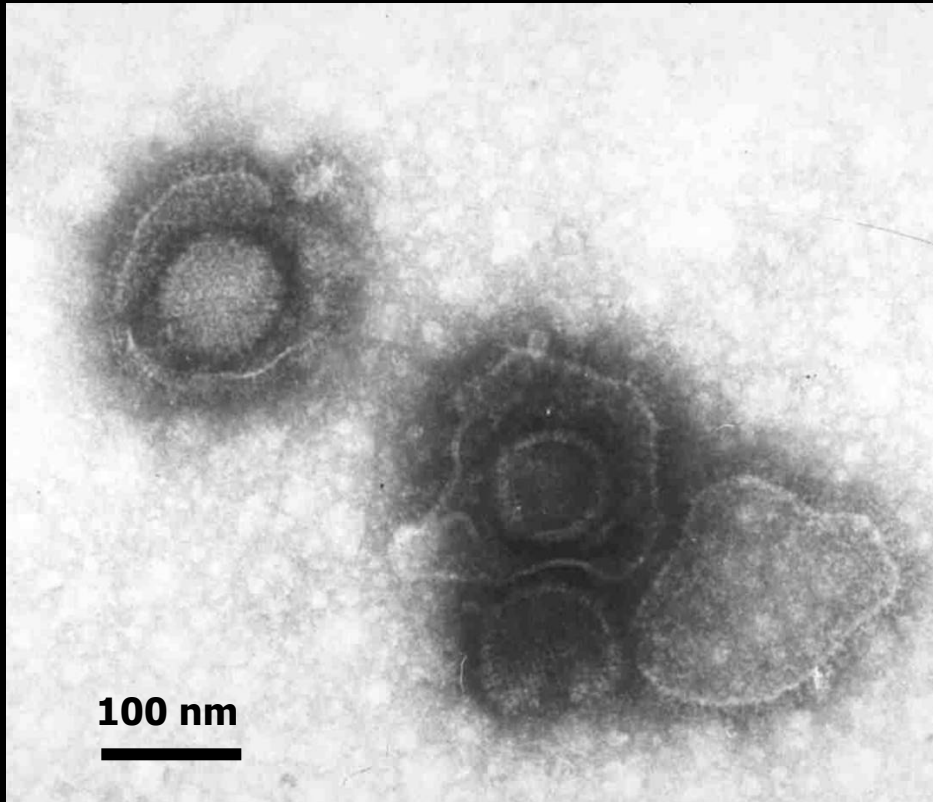


9° Congresso Nazionale SIVAR

“Percorsi diagnostici in patologia suina: campionamenti, esami di laboratorio ed interpretazione dei risultati”

Palazzo Treccchi, Cremona 11 maggio 2007

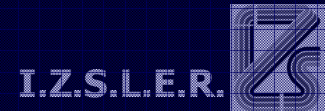


*Interpretazione
dei risultati
sierologici di
laboratorio nelle
malattie virali del
suino*

Paolo CORDIOLI



**Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia Romagna**



STATO MORBOSO

ANAMNESI

(dati epidemiologici, clinici, patologici, esiti altri esami)

Materiale patologico

Prelievo ematico

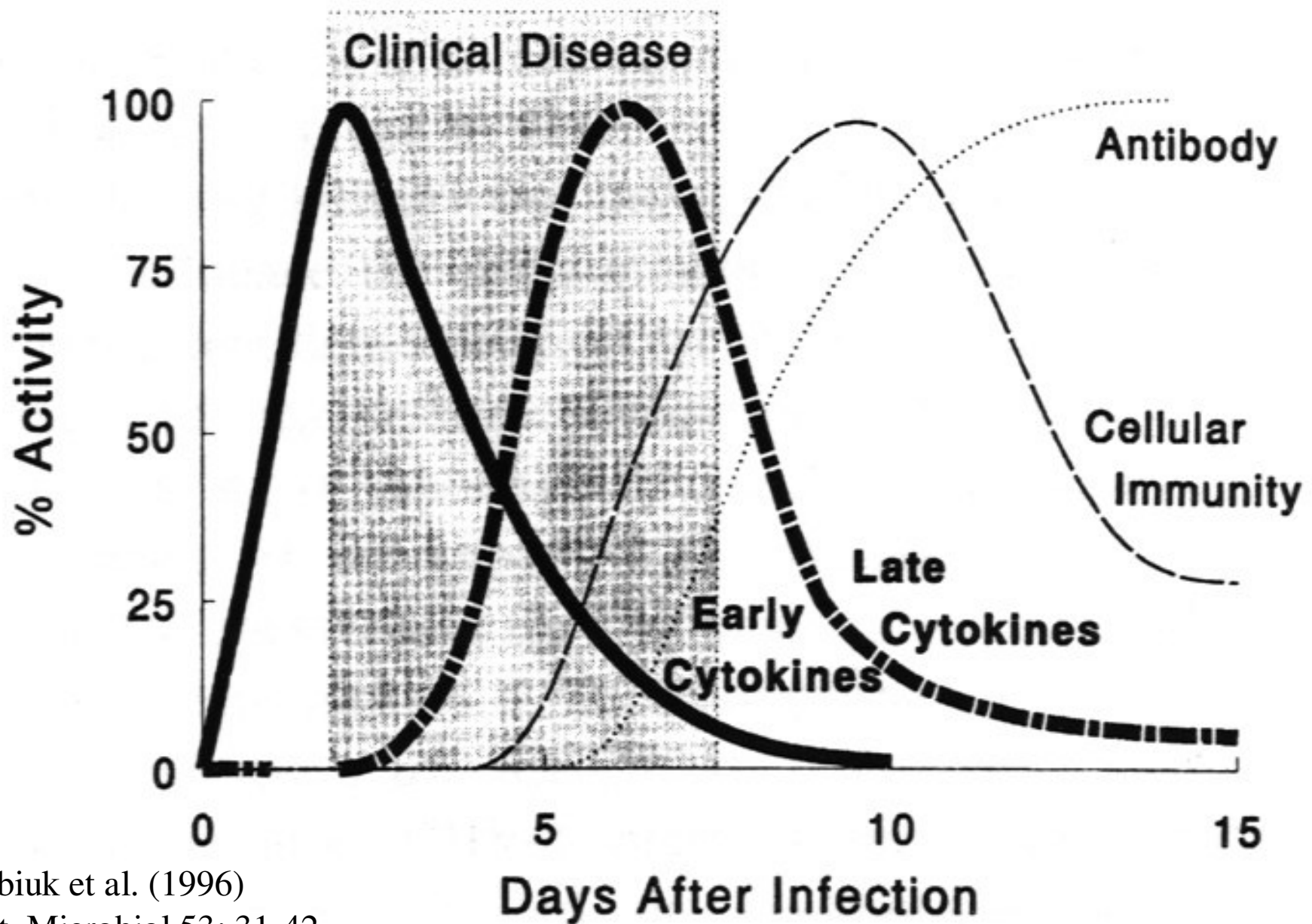
ESAME
VIROLOGICO

ESAME
SIEROLOGICO

DIMOSTRAZIONE DEL VIRUS

DIRETTA


INDIRETTA



Babiuk et al. (1996)
 Vet. Microbiol 53: 31-42

DIMOSTRAZIONE INDIRETTA DEL VIRUS

ESAMI SIEROLOGICI



ELISA
WESTERN BLOTTING
SIERONEUTRALIZZAZIONE
AGAR-GEL IMMUNO-DIFFUSIONE
FISSAZIONE DEL COMPLEMENTO
IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA
INIBIZIONE DELL'EMOAGGLUTINAZIONE

ESAMI SIEROLOGICI

SIGNIFICATO ED INTERPRETAZIONE

CAMPIONE DOPPIO ✓ sieroconversione

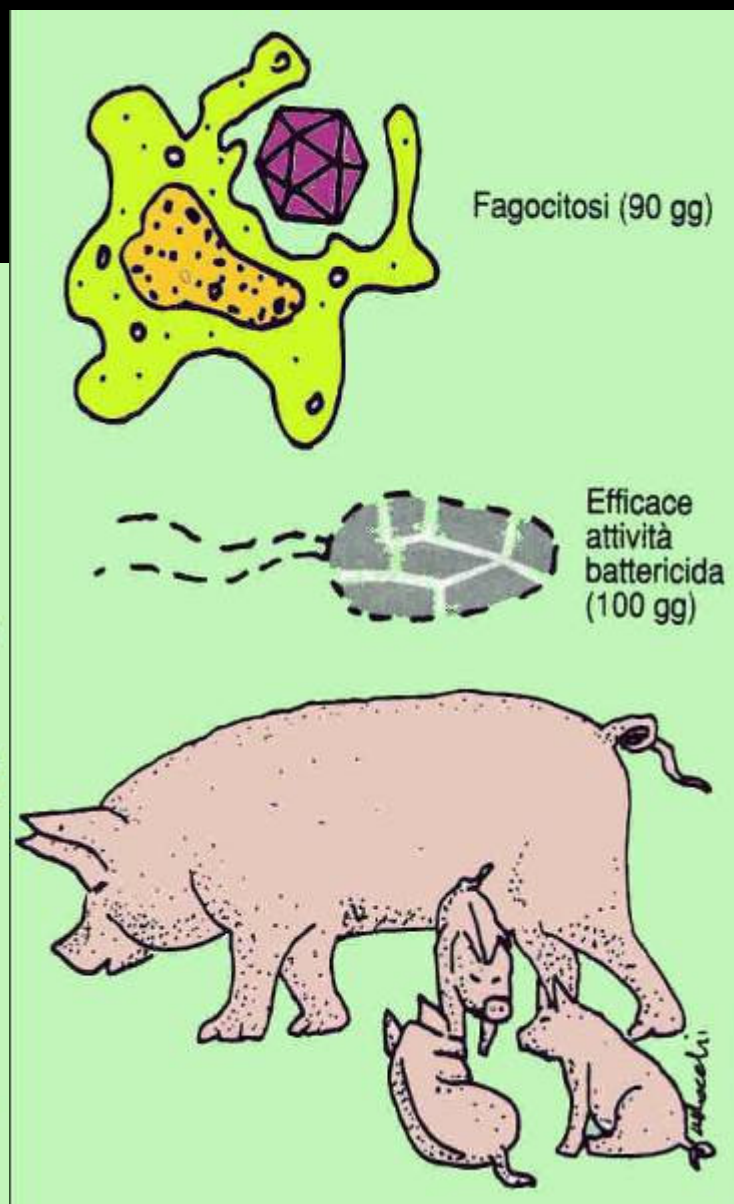
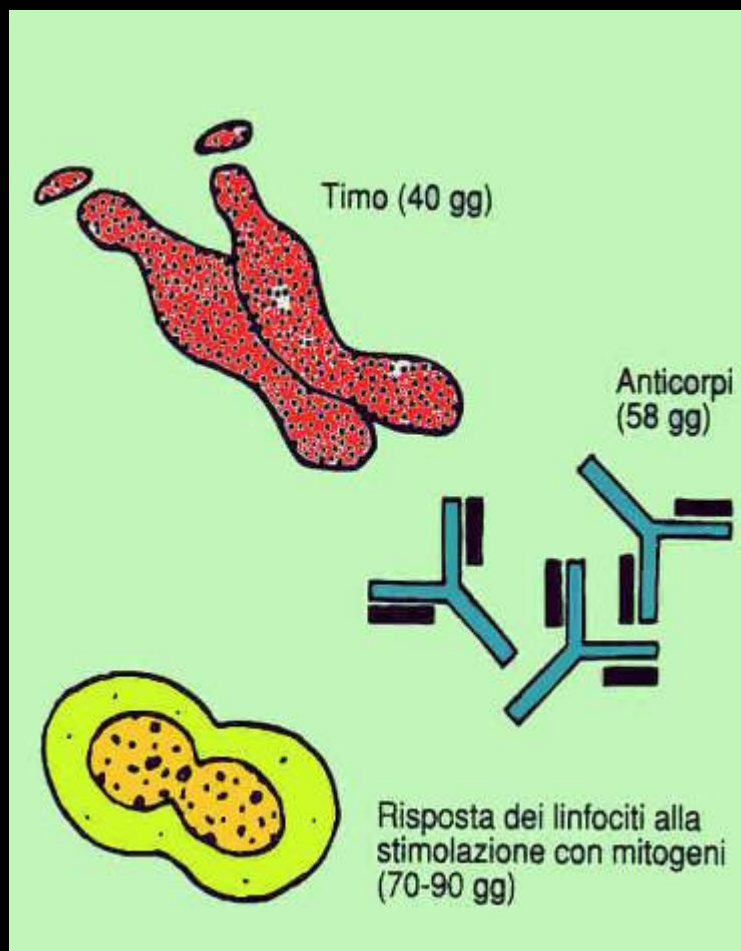
CAMPIONE SINGOLO ✓ animali SPF

- ✓ centri genetici
- ✓ import/export
- ✓ compravendite
- ✓ piani di eradicazione

Utilizzo dei test sierologici

- ✓ per **diagnosticare** un'infezione (doppio campione)
- ✓ per dimostrare l'**assenza** di infezione (campione singolo)
- ✓ per valutare la **prevalenza** dell'infezione in studi epidemiologici o all'interno di un'azienda
- ✓ nei **programmi** di eradicazione e sorveglianza
- ✓ Su sangue anche fetale ed altri liquidi biologici

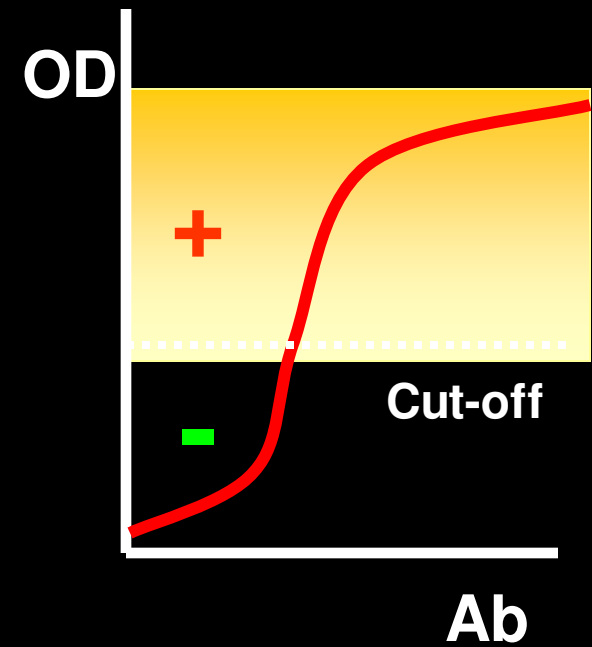
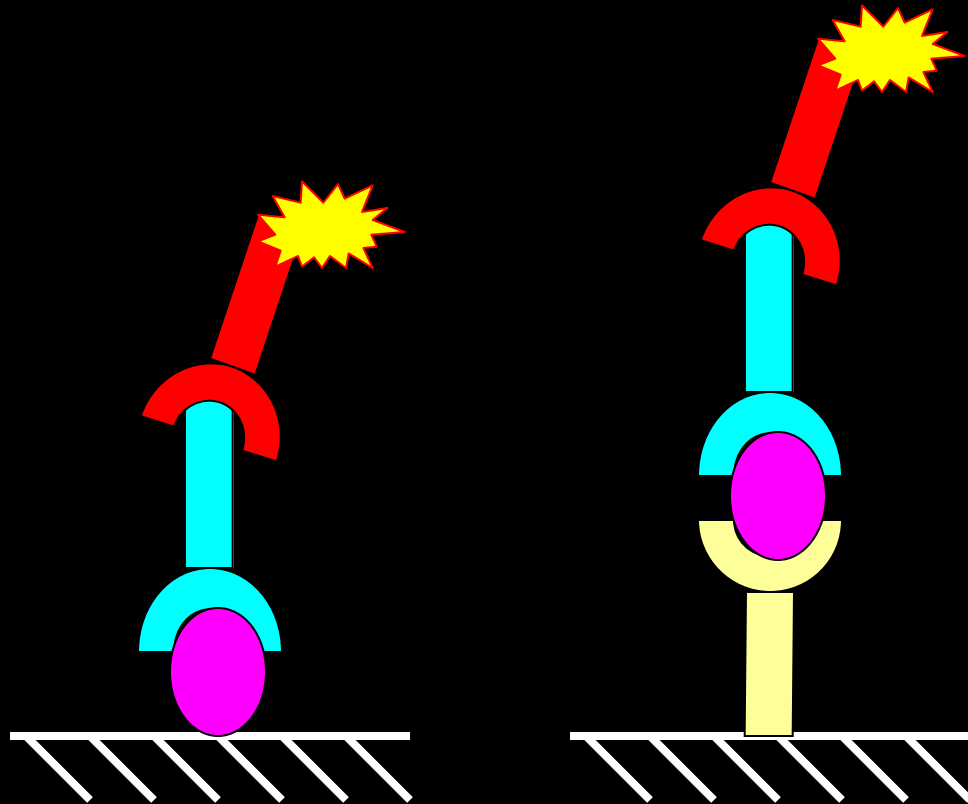
Ontogenesi del sistema immunitario



ELISA

- ✓ Test rapido, automatizzabile,
- ✓ gli anticorpi evidenziati dipendono dal tipo di coniugato utilizzato
- ✓ risposta entro 24-36 ore
- ✓ utilizzabile per latte o altri liquidi biologici
- ✓ presenza di anticorpi “eterofilici” che possono dare falsi risultati

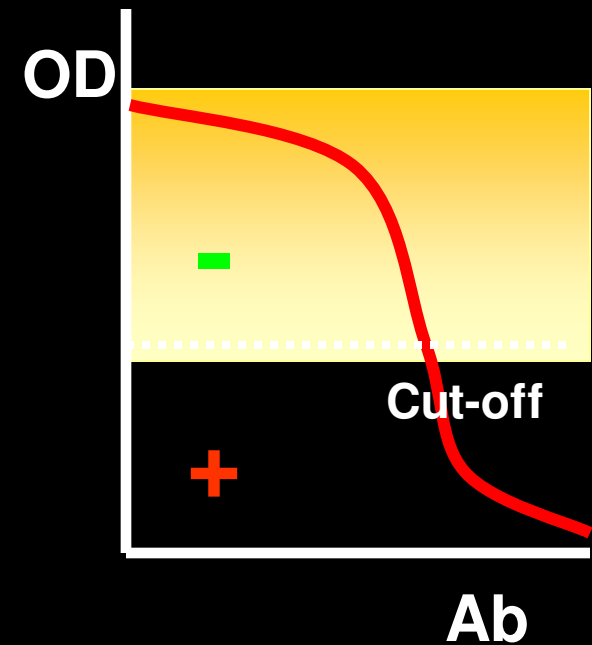
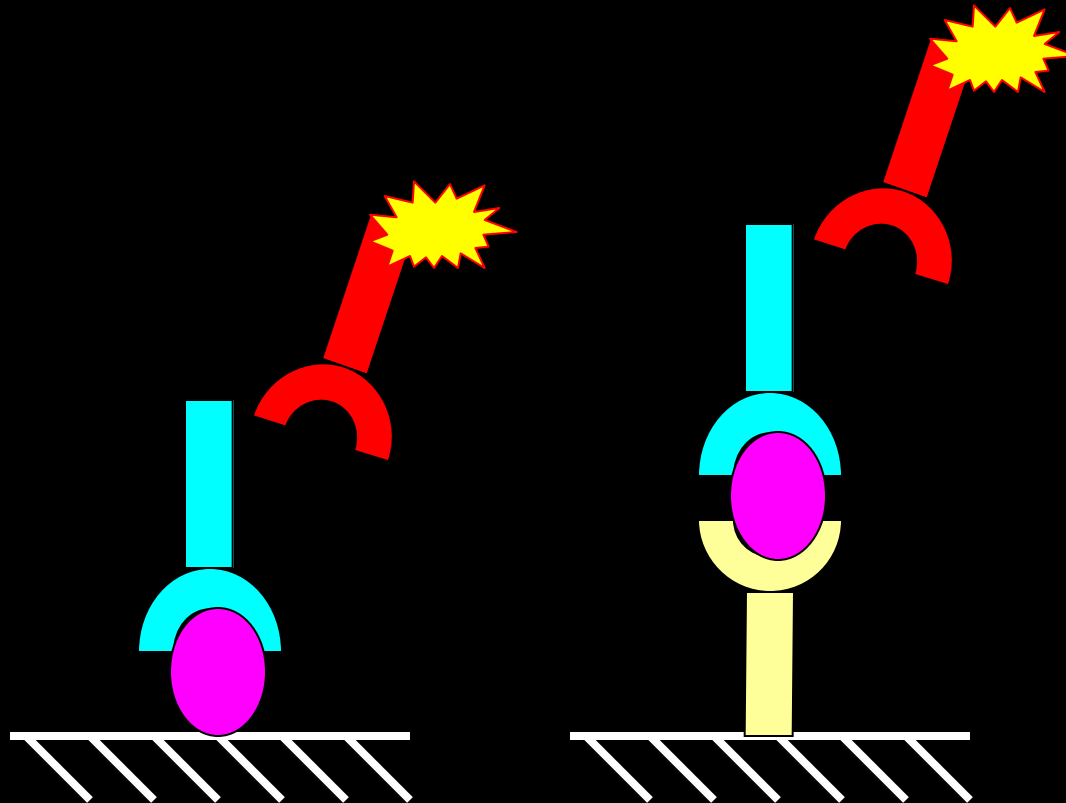
ELISA indiretta



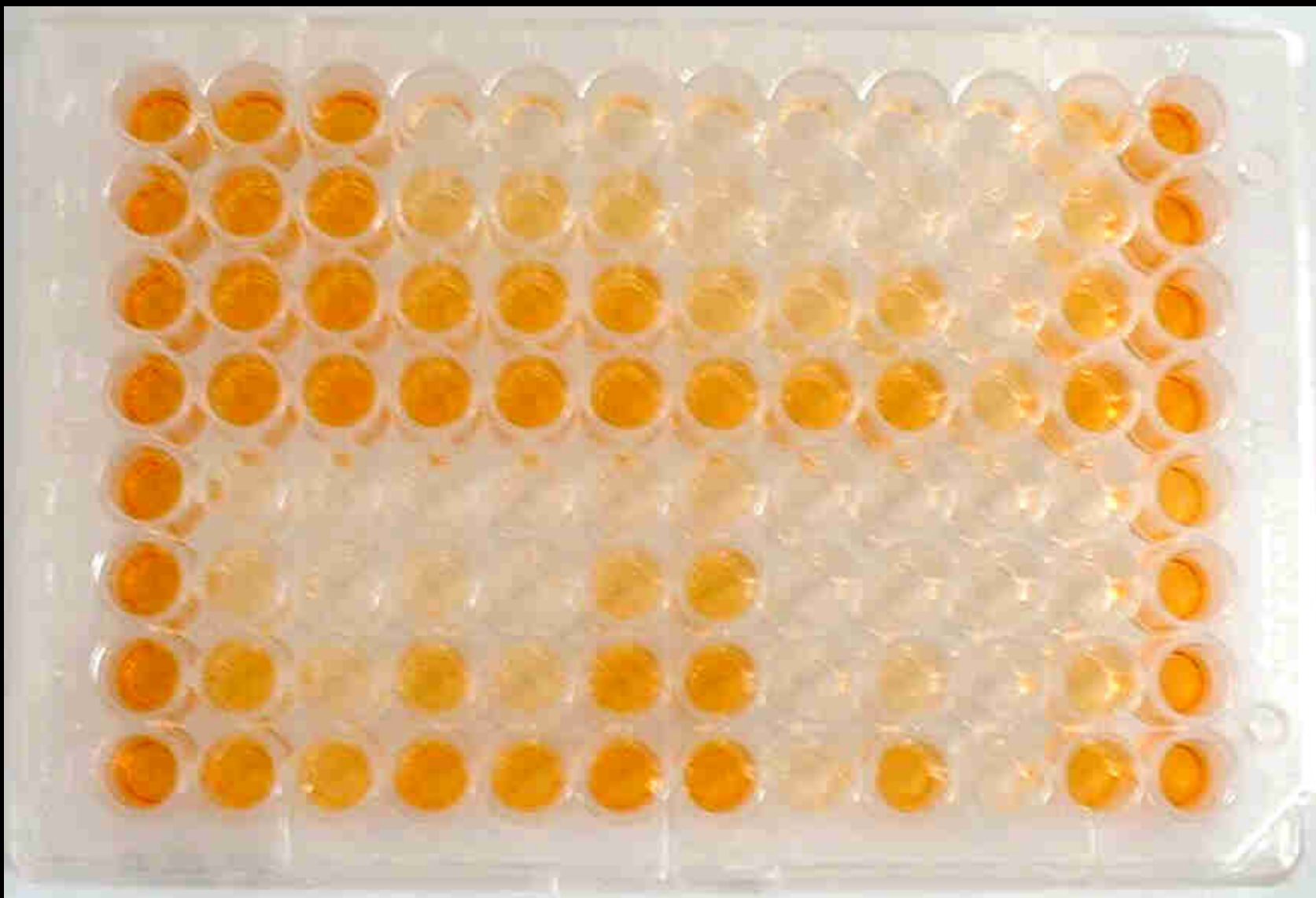
ELISA indiretta



ELISA competitiva



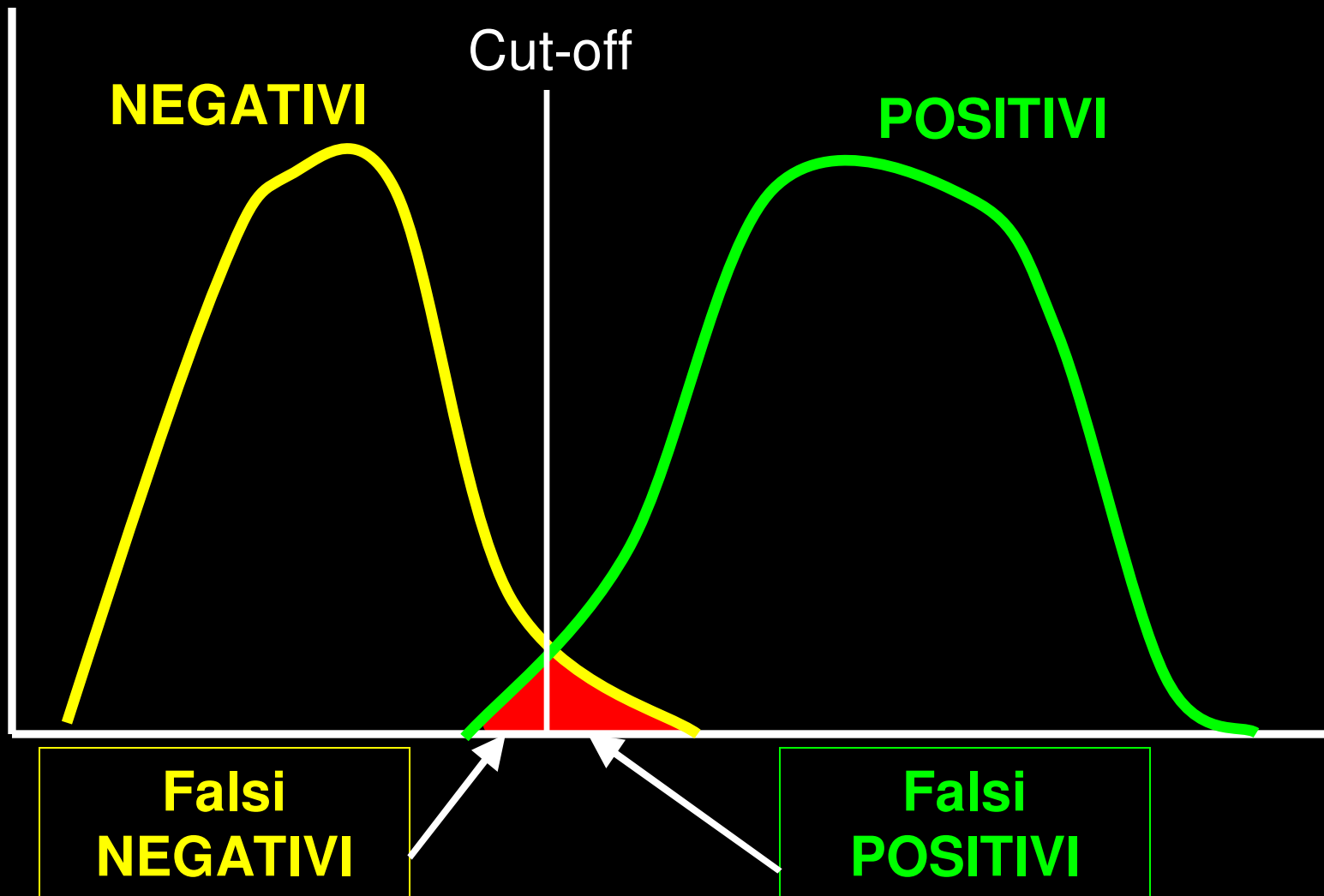
ELISA competizione



TEST IDEALE

- ✓ **SENSIBILITA'** : capacità di identificare correttamente gli animali infetti
- ✓ **SPECIFICITA'** : capacità di identificare correttamente gli animali non infetti
- ✓ per entrambi un valore del 100%

Falsi positivi e falsi negativi



Valutazione della sensibilità e specificità di un test

- ✓ Sieri di animali *sicuramente indenni*, rappresentativi della popolazione

specificità =
$$\frac{\text{numero negativi al test}}{\text{negativi} + \text{falsi positivi}}$$

- ✓ Sieri di animali *sicuramente infetti*

sensibilità =
$$\frac{\text{numero positivi al test}}{\text{positivi} + \text{falsi negativi}}$$

MALATTIE DELLA LISTA ex - A DELL'O.I.E.

DEFINIZIONE

Malattie trasmissibili a diffusione rapida e gravità particolare, con potenzialità di estensione fuori dai confini nazionali, con gravi conseguenze socioeconomiche o di sanità pubblica e che sono di grande importanza nel commercio internazionale degli animali e dei loro prodotti. Le informazioni relative a queste malattie vengono inviate all'O.I.E. con periodicità indicata negli Articoli 1.2.0.2 e 1.2.0.3 del Codice Zoosanitario Internazionale.

MALATTIA VESCICOLARE DEL SUINO

AFTA EPIZOOTICA

STOMATITE VESCICOLARE

PESTE SUINA AFRICANA

PESTE SUINA CLASSICA

MVS – CENNI STORICI ED EPIDEMIOLOGICI

Enterovirus (Picornaviridae)

correlato antigenicamente al patogeno umano Coxsackie B5

1966 → 1° osservazione LOMBARDIA

1972 → 1980 Epidemia in

**Necessità di
DD con Afta**

Lista A OIE

- Europa Occidentale
- Europa Orientale (?)
- Hong Kong

1988 → 1992 Endemica in

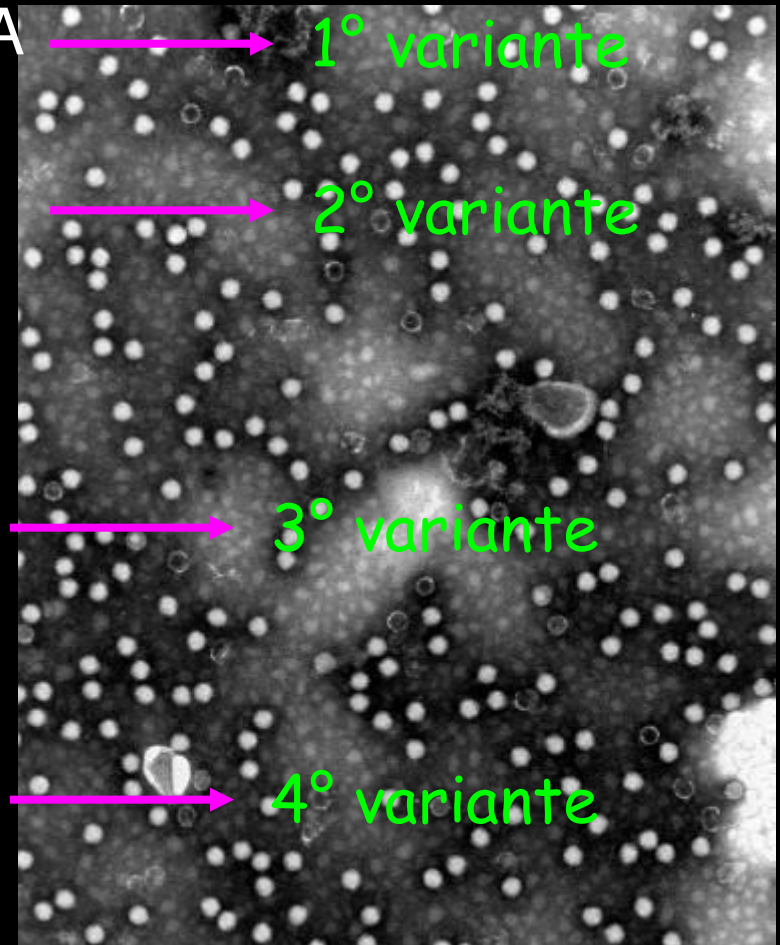
- Italia
- Hong Kong

1992 → 2002 Presente in

- Europa Occidentale
- Taiwan

2006 →

Focolai in Italia del Nord



Sierologia : MVS

SCREENING ELISA
Mab, semplice, larga scala
antigeni inattivati 1 gg

Negativi

Fine dell'esame

Positivi o Dubbi

Riesaminati in:
ELISA per IgM o IgG 1gg
SN (ufficiale, lunga, infettante) 3gg

Negativi

Fine dell'esame

Positivi

Provvedimenti di P.V.

Malattia vescicolare del suino

Singleton reactor

- ✓ Solo IgM a basso titolo (ELISA e SN)
- ✓ Mai osservata conversione a IgG
- ✓ I titoli scompaiono nell'arco di un mese
- ✓ Feci sempre negative
- ✓ Uno (max due) animali sieropositivi per allevamento
- ✓ Mai osservata sieroconversione in altri animali

Singleton reactors nel Piano 2003

Sierosorveglianza in Lombardia e Emilia Romagna
Esami eseguiti a Brescia (Gen – Ott 2003) → **N° 83 599**



singleton reactors in ELISA
N° = 221 → 2.6/1000



confermati positivi in VNT
N° = 83 → 1/1000



Positivi al secondo prelievo (ELISA & VNT)
N° = 52 → 0.6/1000

Singleton reactors nel Piano 2006

Sierosorveglianza in Lombardia e Emilia Romagna
Esami eseguiti a Brescia (Gen – Ott 2006) → **N°40405**



singleton reactors in ELISA
N° = 44 → **1/1000**



confermati positivi in VNT
N° = **10** → **0.2/1000**



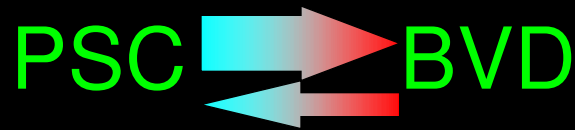
Positivi al secondo prelievo (ELISA & VNT)
N° = **9** → **0.2/1000**

Peste suina classica

- **Lista A O.I.E.**
 - **Direttiva 2001/89/CE**
 - **Metodiche sierologiche ufficiali**
(D.M. 18/10/1991, n°427)
 - riduzione delle placche
 - indice di neutralizzazione
 - sieroneutralizzazione
- ELISA (comune pestivirus e “specifica”)

Peste suina classica

- ✓ Prove comparative per differenziare anticorpi tra BVD e PSC (ceppo Alfort187 per PSC, mancanza di ceppi di referenza per BVD)



- ✓ ELISA *pestivirus* e conferma dei positivi in ELISA specifica e sieroneutralizzazione.
- ✓ Suini positivi *pestivirus* non PSC in allevamenti misti o aggregati a caseifici

PSC suini: Indagini sierologiche IZSLER 2000 - 2006

Anno	Sieri esaminati	Sieri positivi PSC	Sieri positivi pestivirus
2000	28135	0	250
2001	33048	0	675
2002	49370	0	901
2003	62521	0	1039
2004	41944	0	629
2005	41194	0	699
2006	40568	0	579

RISULTATI

Anno	2002	2003	2004	2005	2006
N° campioni positivi	781	913	557	623	518
% campioni positivi su quelli esaminati	1.99%	1.7%	1.6%	1.8%	1.6%

Anno	Az. Testate	Az. Neg.	Az. Pos.	% Az. Pos.
2002	1156	918	238	20.6
2003	1161	888	273	23.5
2004	1072	862	210	19.6
2005	1053	855	198	18.8
2006	1010	866	144	14.3

RISULTATI

	Anno	Tot. Az.	Az. Neg.	Az. Pos.	% Az. Pos.
Az. suine	2002	694	578	116	16.71%
	2003	708	557	151	21.33%
	2004	648	538	110	16.98%
	2005	631	536	95	15.06%
	2006	592	522	70	11.82%
Az. miste	2002	462	340	122	26.41%
	2003	453	331	122	26.93%
	2004	424	324	100	23.58%
	2005	422	319	103	24.41%
	2006	418	344	74	17.7%

PSC Cinghiali : Indagini virologiche e sierologiche IZSLER 2000-2006

Anno	Virologia		Sierologia	
	Esaminati	Positivi	Esaminati	Positivi
2000	318	5	2654	183
2001	203	0	1927	82
2002	23	0	913	24
2003	30	0	726	0
2004	-	-	1515	0
2005	17	0	639	0
2006	181	0	2125	0

Malattia di Aujeszky

diagnosi sierologica

- ✓ **Metodiche previste Manuale OIE:**
 - *Sieroneutralizzazione siero di referenza ADV1*
 - *ELISA sieri di riferimento ADV1 e 16 sieri UE per ELISA gE*
- ✓ **Metodo prevalente di identificazione degli allevamenti infetti**
- ✓ In routine vengono usate metodiche ELISA di tipo competitivo basate sull'uso di anticorpi monoclonali che evidenziano anticorpi anti-gB e anti gE
- ✓ **Necessità di metodica di conferma dei risultati**

Malattia di Aujeszky: confronto tra test sierologici gE

- ✓ 117 sieri sperimentali, prodotti attraverso 6 diverse infezioni in suini negativi o vaccinati, sono stati testati con 6 kit commerciali e non per la ricerca anticorpi anti gE
- ✓ Risultati :
 - *Tutti i presieri e i sieri da animali vaccinati sono risultati negativi con tutti i kit*
 - *Sieri precoci (5-6 g p.i.) hanno dato esito negativo con tutti i test (falsi negativi)*
 - *Sieri prelevati dai 7-15 g p.i : risultati discordanti*
 - *Sieri prelevati oltre i 15 g sono stati rilevati come positivi da tutti i kit*

Malattia di Aujeszky: confronto tra test sierologici

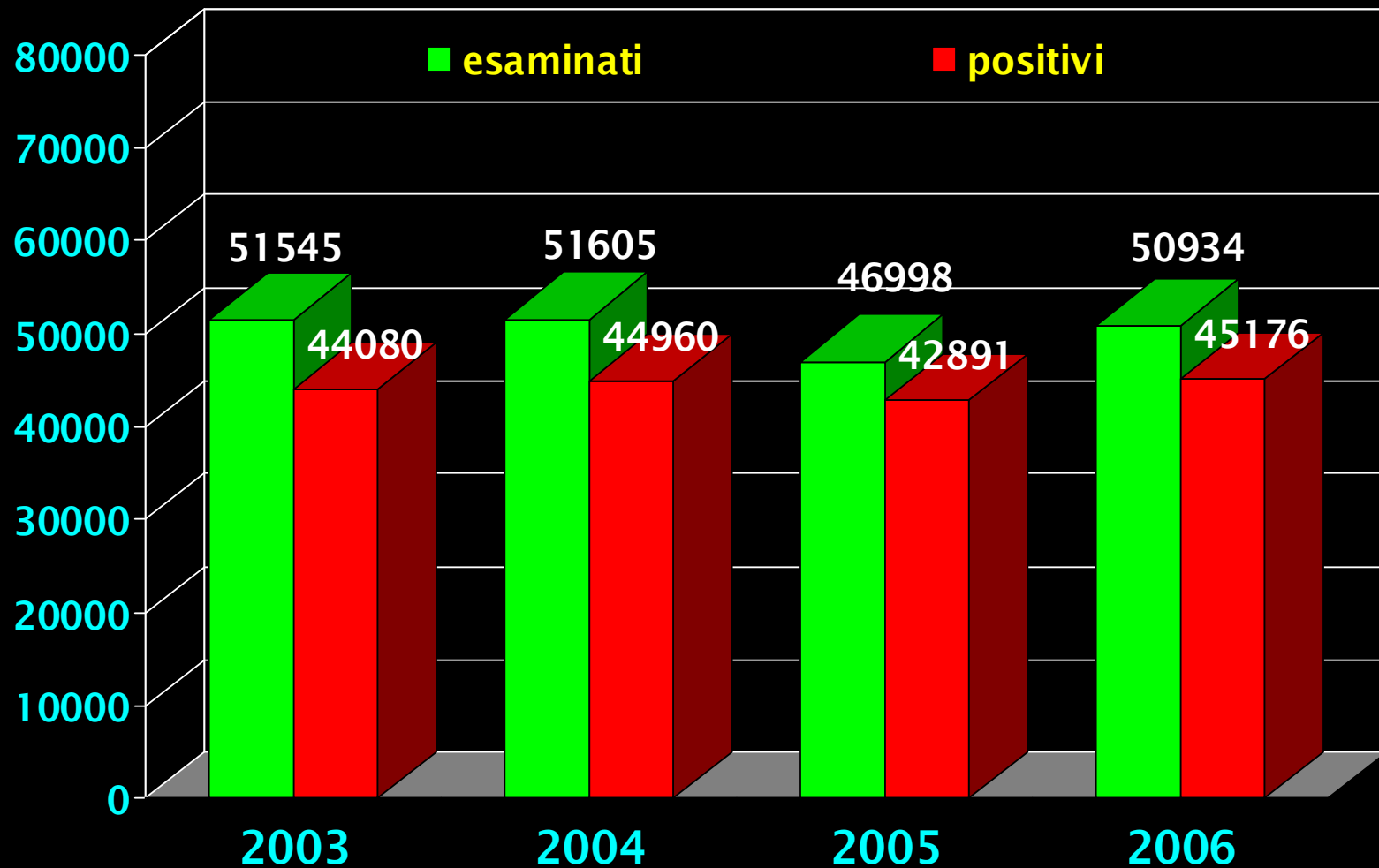
Il calcolo della Se e Sp dei kit è stato valutato considerando i 63 sieri post-infezione come *sieri positivi* e i 56 presieri o post vaccinazione come *sieri negativi* :

Test gE ELISA	Sensibilità (IC95%)	Specificità (IC95%)
1	0,90 (0,82-0,97)	1 (0,91-1)
2	0,68 (0,56-0,79)	1 (0,91-1)
3	0,82 (0,72-0,91)	1 (0,91-1)
4	0,80 (0,70-0,89)	1 (0,91-1)
5	0,85 (0,76-0,93)	1 (0,91-1)
6	0,62 (0,49-0,74)	1 (0,91-1)

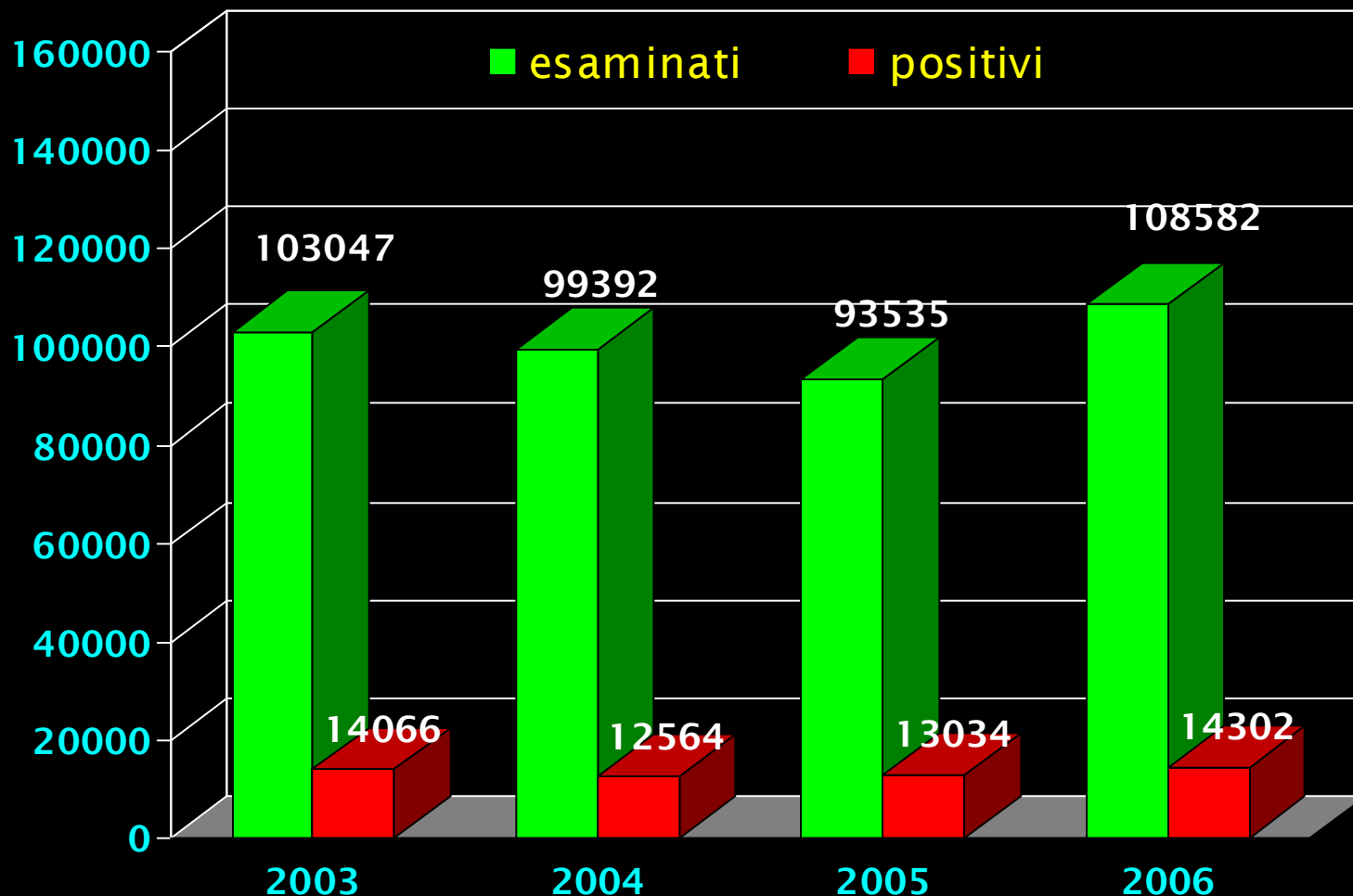
Malattia di Aujeszky: confronto tra test sierologici

Test elisa	MAbs anti gE IZSLER										
	3E3	4F5	3H1	1D9	2E1	2B6	2A8	2F5	3G12	5A6	3D5
Kit 1	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N
Kit 2	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N
Kit 3	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N
Kit 4	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N
Kit 5	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N
Kit 6	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N

IZSLER Esami sierologici per Aujeszky – gB



IZSLER Esami sierologici per Aujeszky - gE



Malattia di Aujeszky

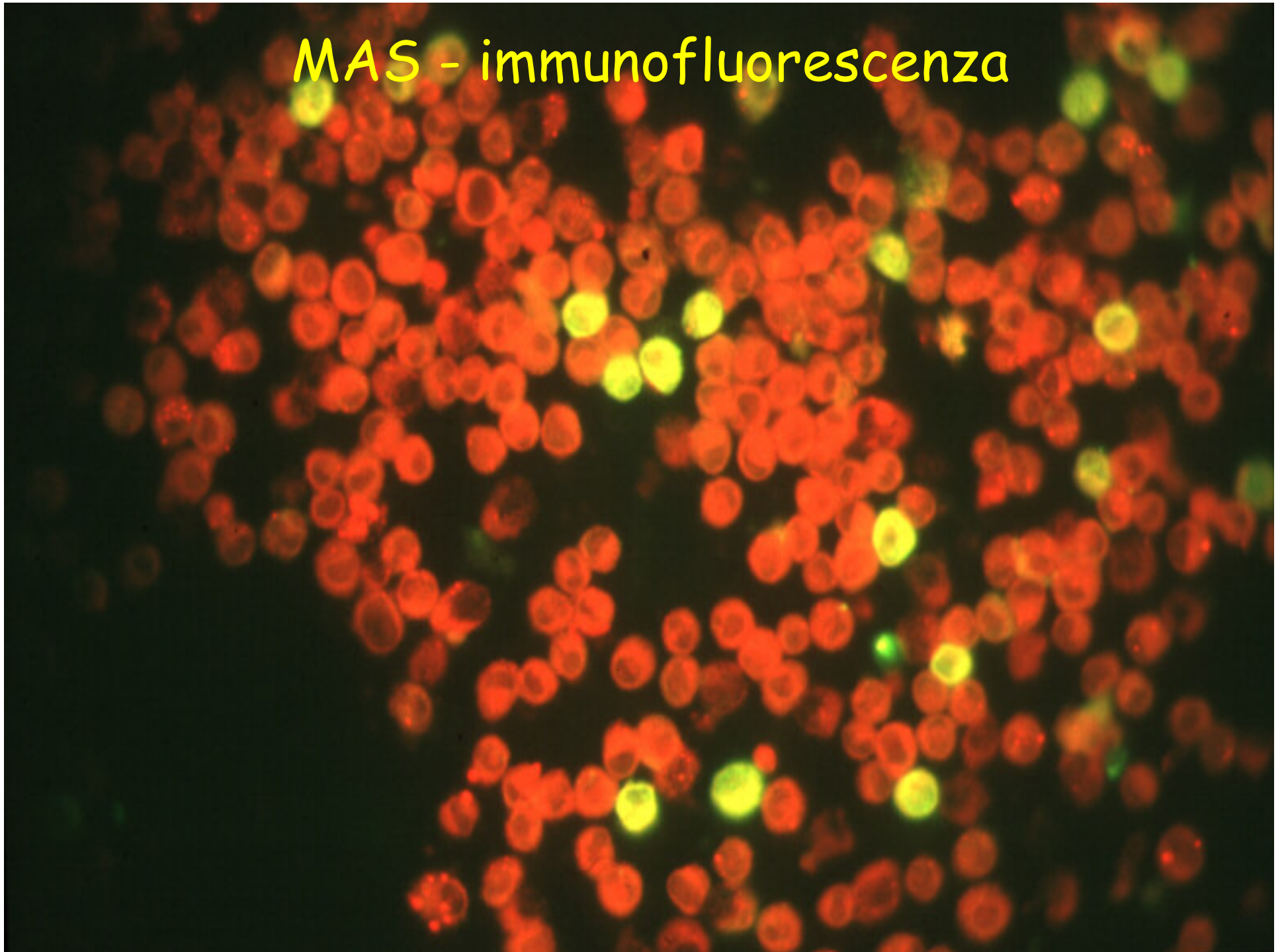
in laboratorio: problematiche attuali

- ✓ Necessità di metodica di conferma dei risultati sierologici gE ed in un futuro, a eradicazione avvenuta, anche gB positivi
- ✓ Non esiste test di conferma al risultato positivo gE se non quello di verificare il risultato con un altro kit ma i test sierologici riconoscono lo stesso epitopo o epitopi molto vicini
- ✓ “Single reactor” (*Bascunana et. al.* 1997)

PRRS

- *Lista O.I.E. Sezione 10*
- **Metodiche sierologiche:**
 - Immunoperossidasi
 - Immunofluorescenza indiretta
 - ELISA *indiretta*
 - Blocking: Sieri esaminati in 4 diluizioni da 1/15 a 1/405*
- ✓ *Variabilità antigenica* tra ceppi europei e Americani e all'interno dei gruppi
- ✓ Immunità materna: 30-40gg

MAS - immunofluorescenza

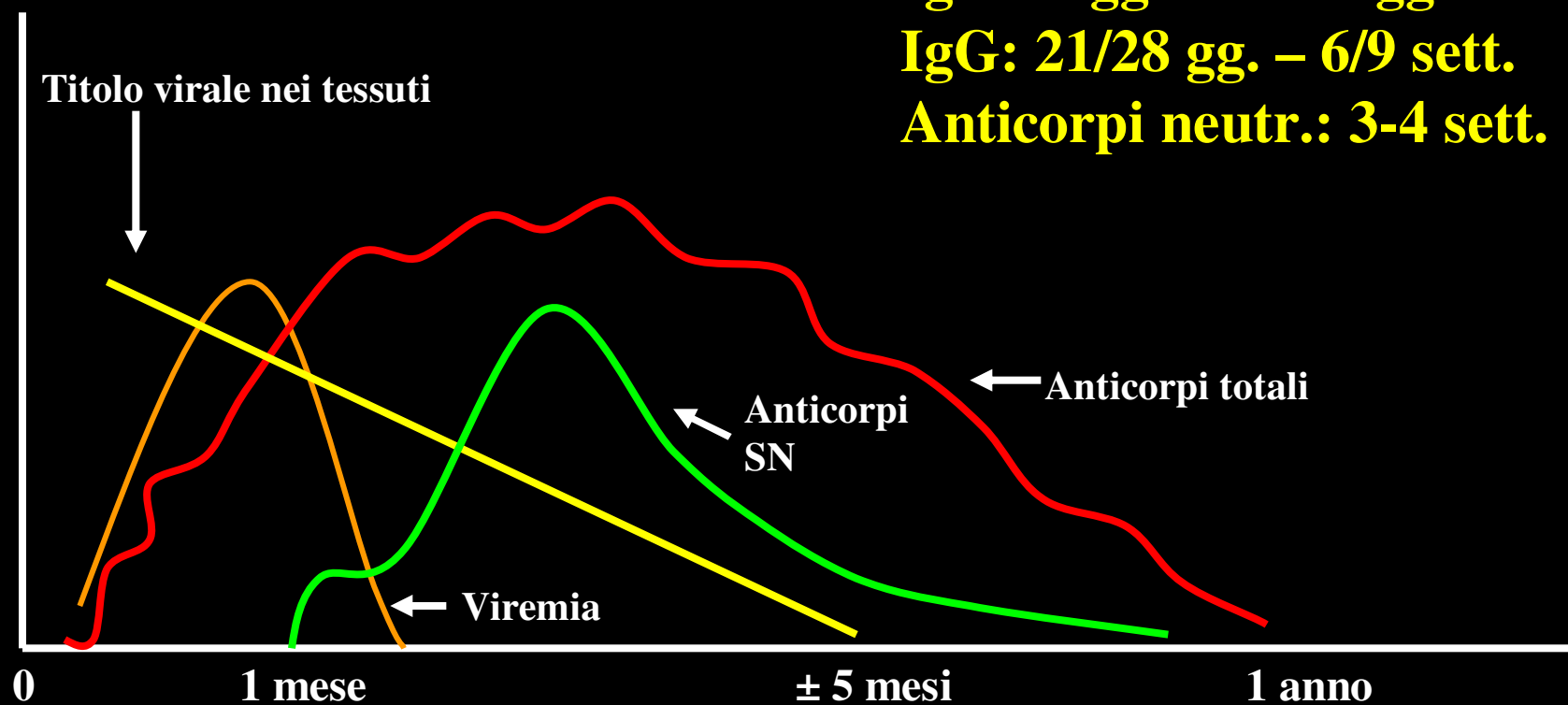


TIPO E DURATA DELLA RISPOSTA ANTICORPALE

- **Anticorpi dimostrabili in Elisa e IF/IP compaiono 7-10 gg post infezione, anticorpi neutralizzanti si evidenziano dopo 1-2 mesi**
- **In assenza di stimolo antigenico gli anticorpi non sono più dimostrabili dopo 4-8 mesi**
- **Durata immunità materna 3-6 settimane**
- **Vaccinazione**

Eventi dopo l'infezione

IgM: 7 gg. – 35/42 gg.
IgG: 21/28 gg. – 6/9 sett.
Anticorpi neutr.: 3-4 sett.



Elisa IDEXX interpretazione

< 0.4 negativo

0.4-0.5 aspecifico
(valutazione delle caratteristiche sierologiche del gruppo)

> 2.5 – 4.5 Sieroconversione da infezione

Vaccinazione con vaccino spento, valori di SP modesti
(a volte negativi)

Scrofe che hanno abortito: SP spesso > 4.5

Sierologia

**Elisa IZS competitiva con
antigene ricombinante orf7
1/15, 1/45, 1/135, 1/405**

- **Sieroconversione** rilevata più precocemente
- Capacità di rilevare sia **IgM** sia **IgG**

**Elisa IDEXX indiretta
SP 0.4 – 4.5**

DO camp. - DO ctrl neg

SP: _____
Ctrl pos – ctrl neg

Studi comparativi:
Concordanza dei risultati
intorno al 93%

PRRS confronto tra test sierologici

- Sono stati esaminati in parallelo 246 sieri da infezione sperimentale ottenuti con prelievi sequenziali di 18 suini vaccinati e infettati dopo 4 settimane e 4 mesi con virus PRRS “diversi”
- **Risultati :**

Test IDEXX (Elisa indiretta)

Test IZSLER

Sieri	-	+	Totale
-	38	0	38
+	5	203	208
Totale	43	203	246

PRRS confronto tra test sierologici

- Sono stati esaminati in parallelo 1031 sieri di campo da allevamenti del Nord Italia
- **Risultati :**

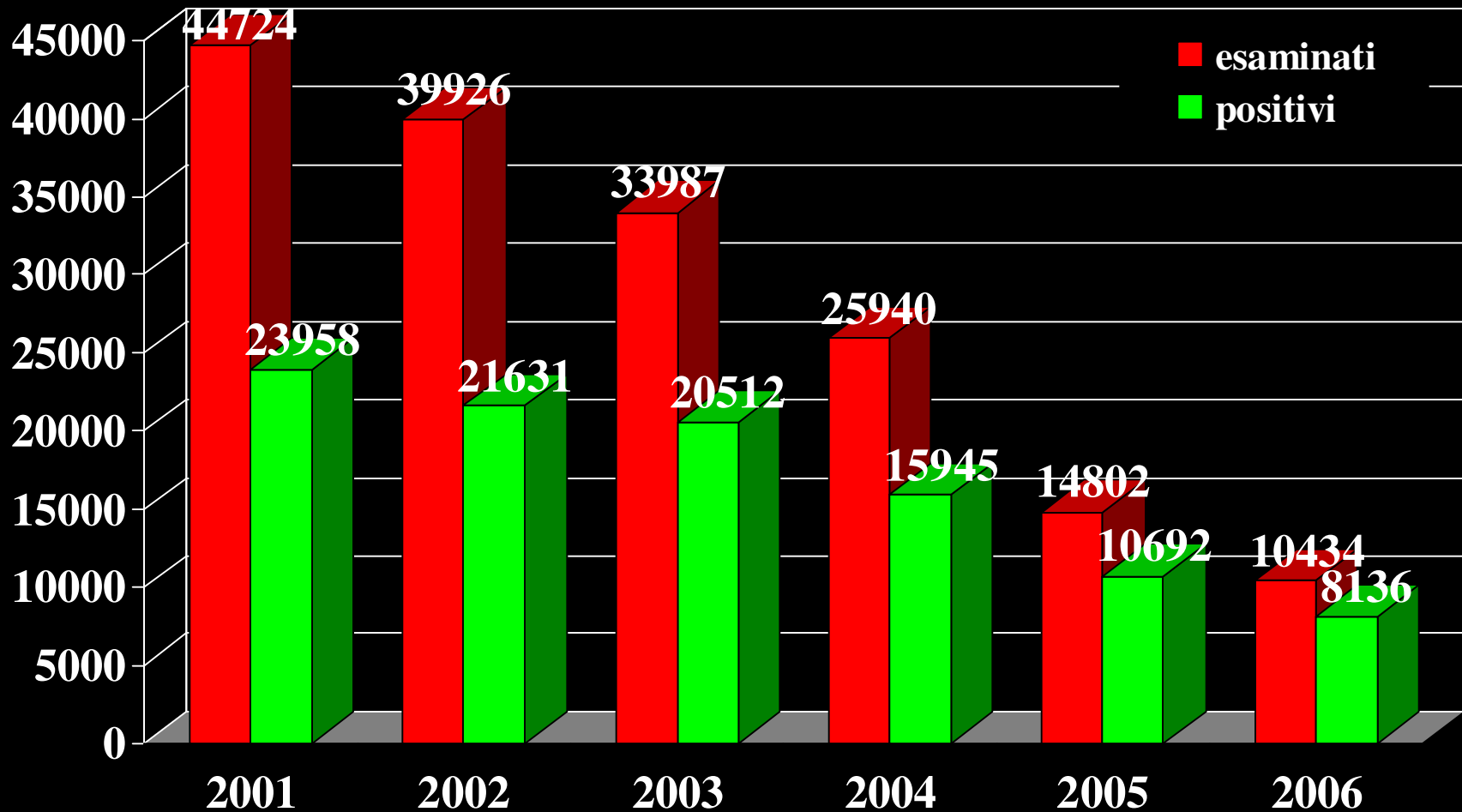
Test IDEXX (Elisa indiretta)

Test IZSLER

Sieri	-	+	Totale
-	356	41	397
+	32	602	634
Totale	388	643	1031

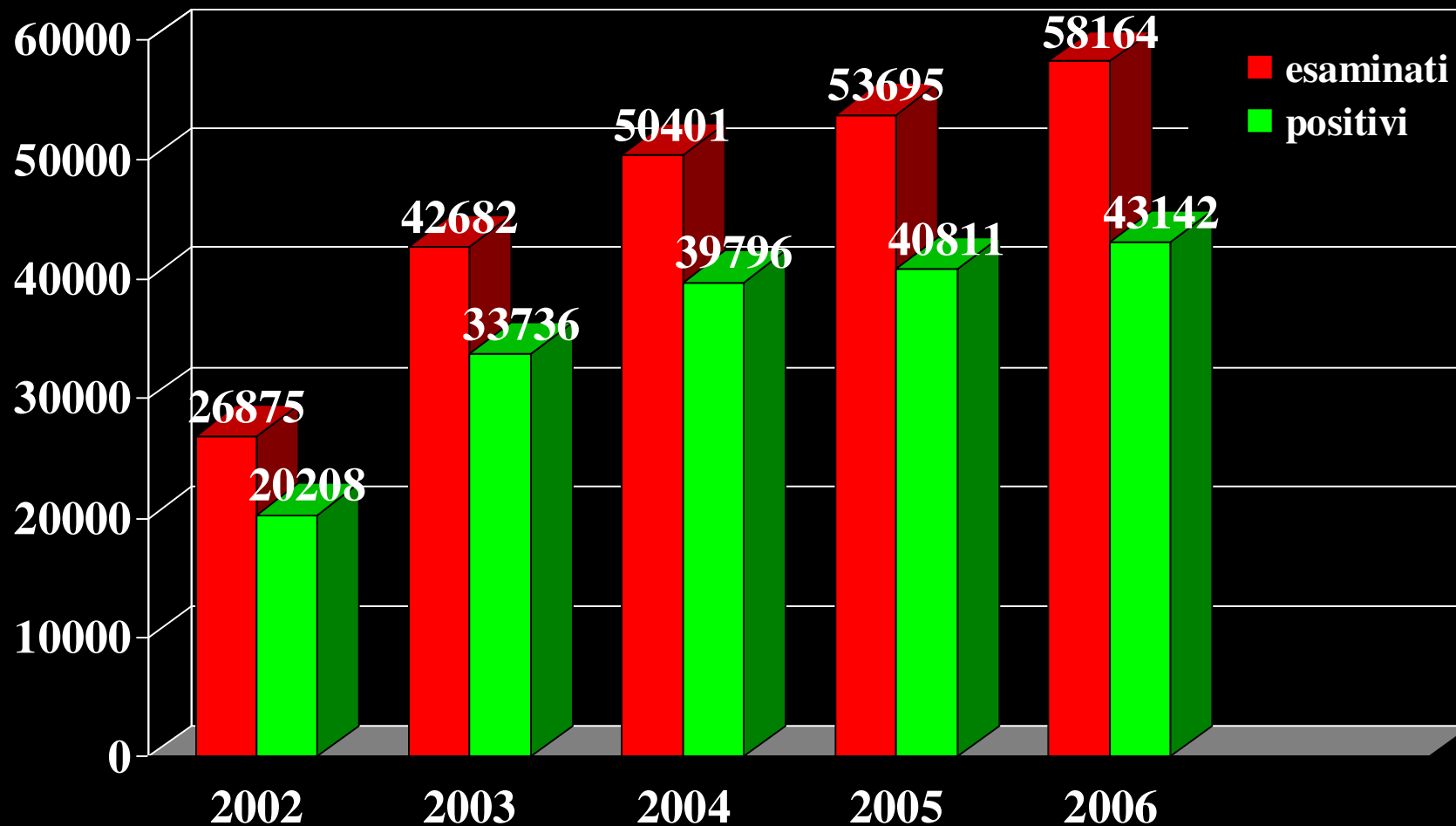
Esami sierologici per PRRS

Test IZS- Brescia 2001-2006



Esami sierologici per PRRS

IZSLER test IDEXX 2002-2006



CASO CLINICO

- **Allevamento a ciclo chiuso**
- **1000 scrofe**
- **No introduzione recente di animali dall'esterno**
- **No vaccinazione**
- **Ultimo controllo sierologico per PRRS (1 mese prima) ha evidenziato nelle scrofette risultati negativi o bassi titoli (1/15).**

Dopo un mese dall'ultimo controllo.....

- Circa **50 aborti** tardivi e natimortalità in pochi giorni
- **Mortalità nelle scrofe** (8 casi). Sintomatologia acuta con dispnea e cianosi auricolare
- Dopo due gironi dall'inizio della sintomatologia si registravano **70 aborti totali e 10 scrofe morte**

Quali indagini?

- Peste Classica

Indagine virologica

Indagine sierologica

NEG.

- Malattia di Aujeszky

Indagine sierologica

NEG.

- PRRS

Indagine virologica

PCR FETI

Indagine sierologica

KIT IDEXX

KIT IZSLER

RISULTATI

- Indagine sierologica ELISA IDEXX :
 - 12 campioni SP tra 1,8 e 3
 - 8 campioni SP tra 0,4 e 0,9
 - 12 campioni negativi

NB: 30 giorni prima questi animali erano sierologicamente negativi o con titoli di 1/15 (ELISA BS-IZS)

- PCR positiva da feti

Confronto ELISA IDEXX – ELISA BS-IZS

	IDEXX	BS-IZS
	3	1/405
	2,8	1/405
	2,5	1/405
	3	1/405
	2	1/135
	3,1	1/405
	2,5	1/405
	3	1/405
	3,1	1/405
	1,8	1/405
	2,9	1/405
	2,8	1/405

**12 Positivi con
SP elevato.**

Confronto ELISA IDEXX – ELISA BS-IZS

	IDEXX	BS-IZS
	0,4	N
	0,9	1/15
	0,4	N
	0,6	N
	0,5	1/15
	0,6	1/45
	0,4	N
8 Positivi con SP basso.	0,4	1/15

Confronto ELISA IDEXX – ELISA BS-IZS

IDEXX

BS-IZS

N

N

N

N

N

1/15

N

1/15

N

1/15

N

1/15

N

N

N

N

N

N

N

N

N

N

N

N

12 Negativi.

Circovirus suino

- ✓ Famiglia Circoviridae
 - DNA circolare senza envelope
- ✓ 15-17 nm
- ✓ 2 sierotipi distinti presenti da molto tempo nella popolazione suina
- ✓ Sierologia
 - IPMA
 - IIF
 - ELISA blocking

Sierologia Circovirus suino

- TIPO 2
- PMWS
- Sieroconversione a 70-90
- Positività diffusa
- Nell'ELISA blocking i sieri vengono esaminati in 4 diluizioni da 1/10 a 1/10000
- Sieri ad alto titolo nel 100% degli animali in casi di PMWS

MAb-based Liquid Phase Blocking ELISA for PCV2

FIG 1

Days p.i. | 0 | 11 | 15 | 18 | 22 | 28 |

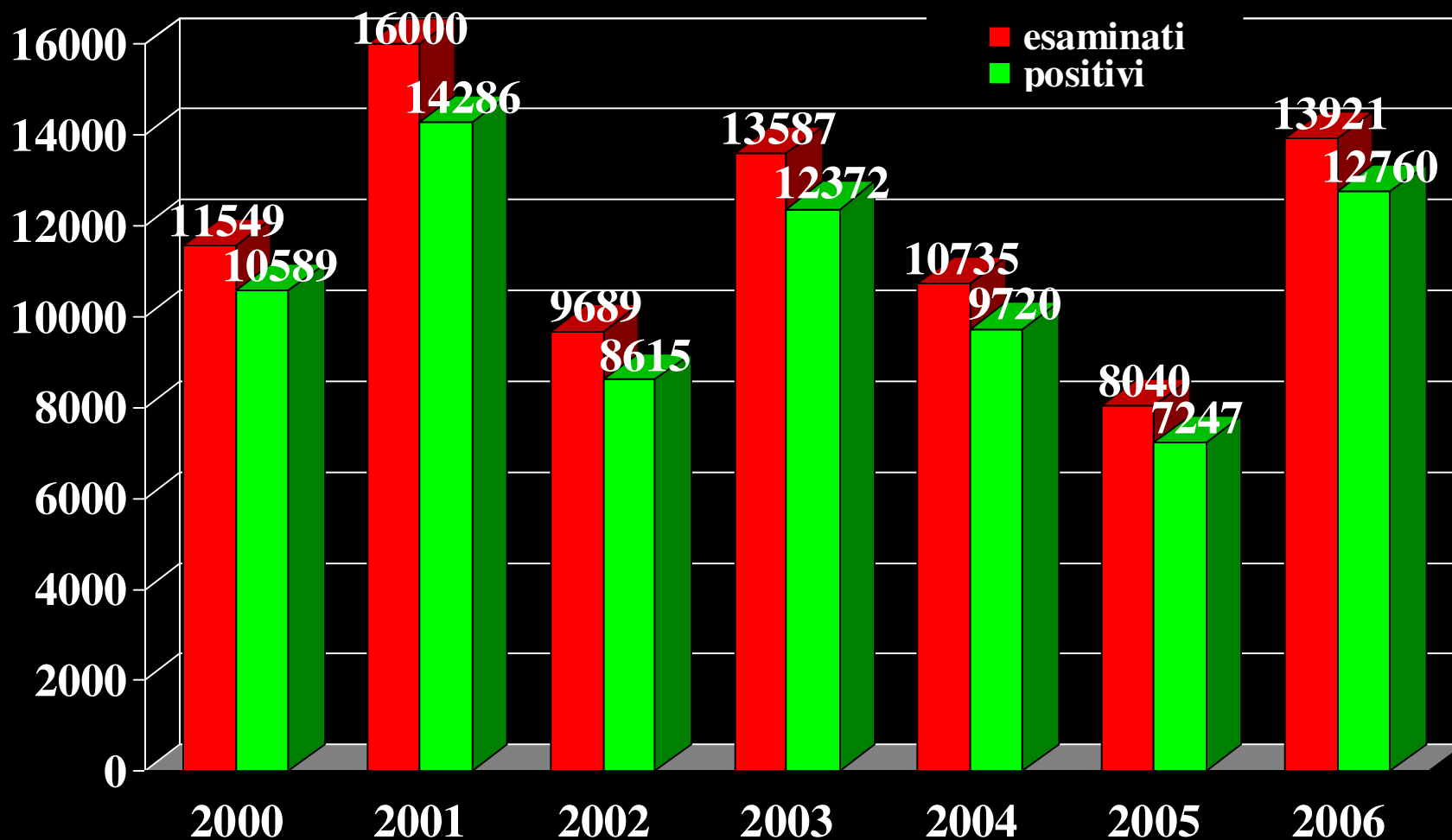
FIG 4

Days p.i. | 0 | 11 | 15 | 18 | 22 | 28 |

FIG 2

Days p.i. | 0 | 11 | 15 | 18 | 22 | 28 |

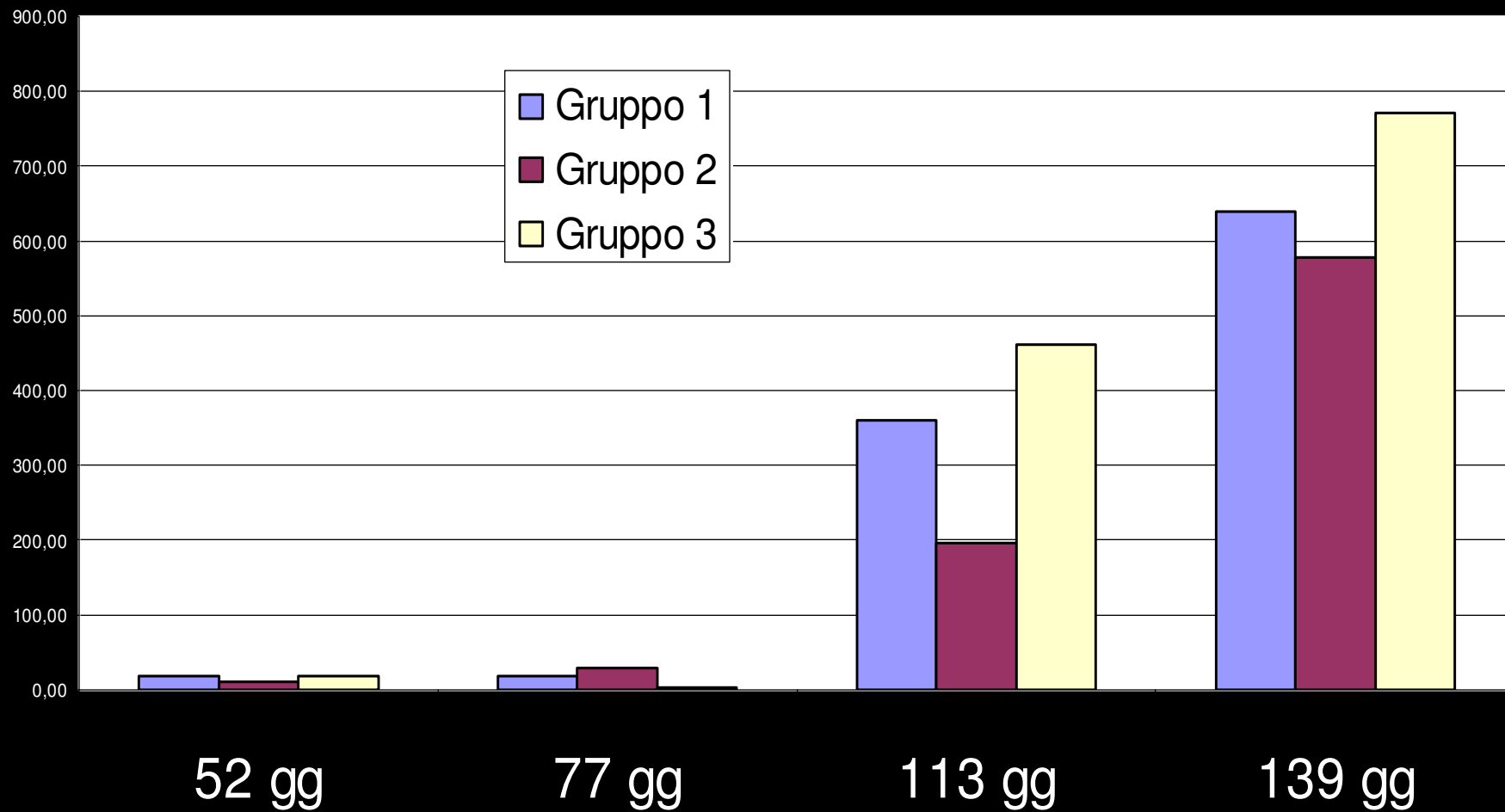
ELISA PCV2 (2000-2006)



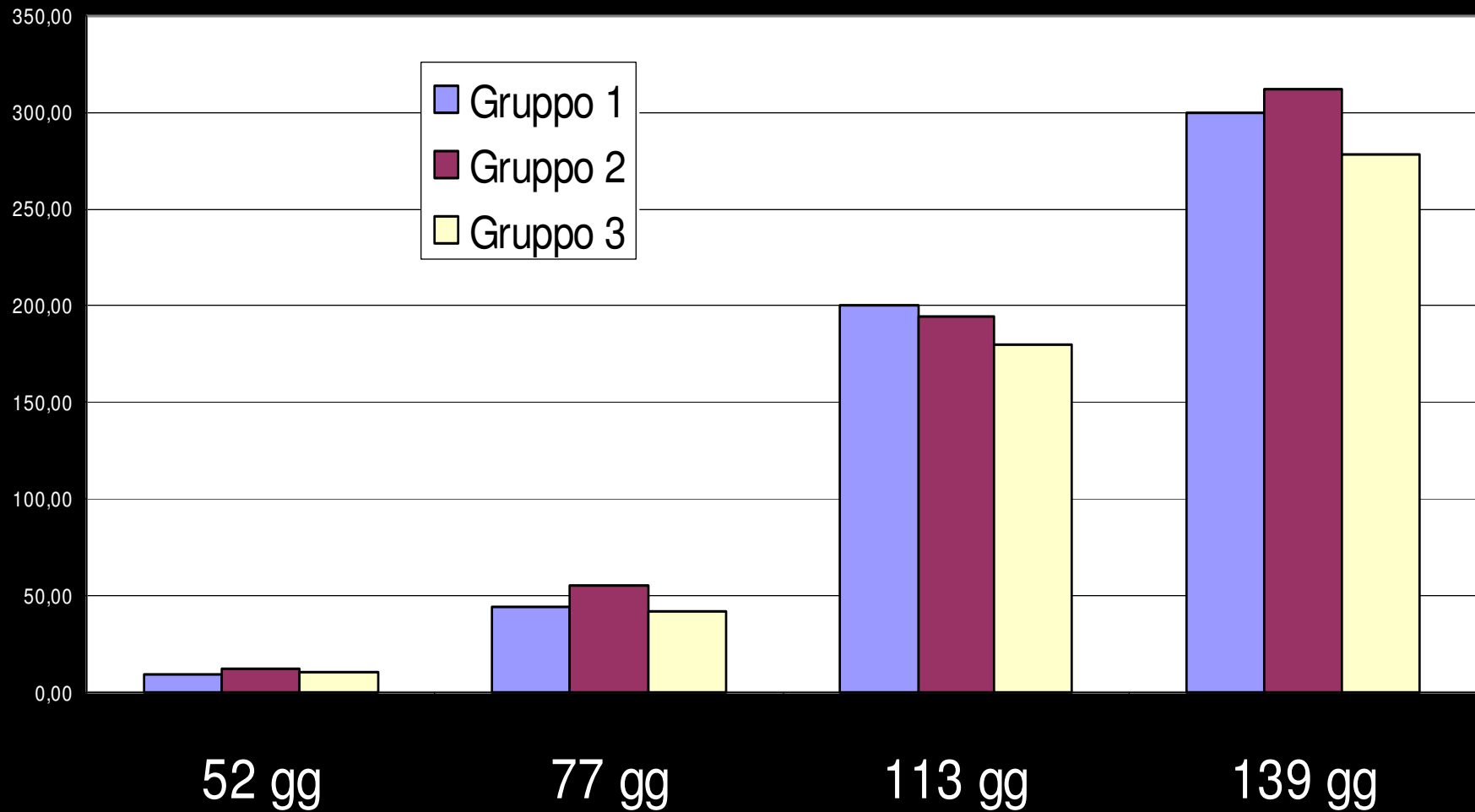
Caso Clinico

- Allevamento ciclo aperto di 1000 scrofe, suini di 25-35 kg spostati in ingrassi separati
- Sintomatologia clinica caratterizzata da deperimento con formazione di scarti e mortalità del 5-10 % tra i 75 e i 110 giorni
- Effettuati controlli batteriologici, virologici e sierologici
- Controlli sierologici su tre gruppi di animali svezzati prelevati a 52-61, 77-86, 113-122, 139-148 gg per PCV-2, *M. hyopneumoniae*, Influenza (NpA)

Sierologia PCV-2



Sierologia per Nucleoproteina A Influenza



9° Congresso Nazionale SIVAR
“Percorsi diagnostici in patologia suina”
Palazzo Trecchi, Cremona 11 maggio 2007

*Grazie per
l'attenzione!!*



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia Romagna

I.Z.S.L.E.R.

