



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**

Via Bianchi 9 - 25124 Brescia

**CENTRO NAZIONALE DI REFERENZA
PER LE MALATTIE VESCICOLARI
(CERVES)**

Tel. 030-2290310 Fax 030-2290369



OIE REFERENCE LABORATORY FOR FOOT AND MOUTH DISEASE

OIE REFERENCE LABORATORY FOR SWINE VESICULAR DISEASE



**FAO REFERENCE CENTRE FOR FOOT-AND-MOUTH DISEASE
AND SWINE VESICULAR DISEASE**

**Relazione sulle attività degli anni 2003-2004
Decreto 4 Ottobre 1999, Art. 5**

ATTIVITA' SVOLTA NEL 2003 e 2004

Attività diagnostica

L'attività diagnostica del CERVES comprende servizi diagnostici specializzati, erogati a livello nazionale.

Pressoché tutti i Metodi di Prova (MP) adottati dal CERVES utilizzano metodologie e reagenti sviluppati nell'ambito del Centro stesso. Tra questi, tre metodi sono riconosciuti internazionalmente (OIE, Legislazione Europea) come test di riferimento, in particolare l'ELISA competitiva basata sull'anticorpo monoclonale 5B7 per la determinazione di anticorpi anti-MVS, l'immuno-PCR per la ricerca del virus MVS in campioni biologici, la 3ABC-trapping ELISA per la differenziazione di animali infetti o vaccinati con virus aftosi.

Frequenti aggiornamenti dei MP sono necessari nella diagnostica dell'Afta, a causa dell'evoluzione antigenica dei virus e del rischio di introduzione di nuovi tipi o varianti. Nel 2003, alla diagnostica afta corrente sono stati affiancati nuovi MP per la identificazione di anticorpi e virus del tipo Asia 1 e della variante A Iran, sviluppati e validati presso il CERVES.

I Metodi di Prova utilizzati dal CERVES sono regolarmente soggetti a valutazione attraverso ring test internazionali, organizzati solitamente con frequenza annuale.

La mole di attività diagnostica richiesta al CERVES non è costante, ma soggetta a variazioni conseguenti alla situazione epidemiologica e alla attuazione di piani di sorveglianza.

Negli anni 2003 e 2004 le richieste di esami diagnostici per **afta epizootica** sono state molto contenute, rispecchiando la situazione tipica di "tempi di pace", con un numero di test sierologici nel range di 2000-3000 esami per ciascuno di tre tipi virali e una casistica di sospetti clinici da sottoporre a diagnosi differenziale di laboratorio limitata a 4-10 casi.

Nei riguardi invece della **MVS**, l'attività diagnostica si è mantenuta su livelli intensi, dovuti prevalentemente ai controlli virologici e sierologici eseguiti in ottemperanza al piano nazionale MVS oltre che ai Piani straordinari regionali. Mentre i test virologici, effettuati per l'intero territorio nazionale si attestano per entrambi gli anni ad oltre 2000 test/anno, si è verificata una flessione da oltre 100000 a circa 50000 esami sierologici, eseguiti dal CERVES per i territori delle regioni Lombardia ed Emilia Romagna o per la conferma di sieropositività al test di screening eseguito dagli IIZZSS territorialmente competenti. La ragione principale di tale flessione è stata la sospensione nel 2004 dei controlli sierologici su tutte le partite di animali introdotti in Lombardia.

Si è consolidato nel 2003 e 2004 l'uso del test immuno-PCR come test d'elezione per la ricerca del virus MVS, introdotto nel 2001 dopo estensiva validazione come test di screening in sostituzione dell'isolamento virale; l'adozione del test PCR ha permesso sia una maggiore sensibilità, sia la riduzione dei tempi di risposta da 10 a 2 giorni rispetto al test di isolamento virale, con la conseguente tempestività nella identificazione di focolai da un lato e nello sblocco del sequestro cautelativo delle aziende negative dall'altro.

Oltre all'attività diagnostica, il CERVES ha coordinato l'attività di screening (sierosorveglianza) eseguita dagli IIZZSS per il piano nazionale MVS ed ha continuato la produzione e fornitura dei kit diagnostici per il test di screening a tutti gli IIZZSS (per un totale approssimativo di 200000 test/anno).

Attività connesse alla diagnostica del CERVES hanno riguardato la diagnosi di laboratorio specialistica sui casi di miocardite del suino, conferiti al CERVES da alcune sezioni diagnostiche, che ha confermato la presenza endemica dell'infezione dovuta a cardiovirus (EMCV) in un'area circoscritta della Lombardia meridionale, con il tipico andamento stagionale.

Pur non causando una sintomatologia vescicolare, l'**Encefalomiocardite del Suino (EMC)**, sostenuta da *Cardiovirus*, si è dimostrata una patologia emergente ed inoltre responsabile di sintomi e lesioni prodotte in alcune circostanze dal virus aftoso (morte improvvisa dei suinetti sotto scrofa, lesioni cardiache di aspetto necrotico o "cuore tigrato"). Quanto sopra consiglia un'immediata diagnosi differenziale.

L'accertamento di **Stomatite Vescicolare** è di scarsa consistenza numerica: esso non è mai stato richiesto come accertamento virologico ed è limitato alla sierologia connessa all'import-export o al controllo di animali sperimentali.

L'attività diagnostica ufficiale per Afta (FMD), Malattia Vescicolare del Suino (MVS), Stomatite Vescicolare (VS) ed Encefalomiocardite (EMC) è riportata nella tabella seguente.

È tuttavia da sottolineare che, oltre all'attività ufficiale eseguita nell'ambito della Sanità Animale con finalità di diagnostica e/o sorveglianza, viene regolarmente eseguito un esteso numero di esami, non apparenti nell'attività di servizio, necessari all'esecuzione di ring test internazionali e soprattutto allo sviluppo e validazione continua di nuovi saggi diagnostici.

Numero e tipologia di esami diagnostici (ufficiali) richiesti al CERVES nel 2003

MALATTIA	RICERCA	REAZIONI (N°)				TOTALE
AFTA	Esami sierologici	ELISA O (3017)	ELISA A (2450)	ELISA Asia (1869)	ELISA 3ABC (14)	7440
	Esami virologici	Isol. virale (4)	ELISA (2)	PCR (4)		10
MVS	Esami sierologici	ELISA scr. (103607)	ELISA IgG (1807)	ELISA IgM (1807)		107221
		Siero Neutralizzazione				1686
	Esami virologici	Isol. virale (63)	ELISA (33)	PCR (2263)		2359
SV	Esami sierologici	Siero Neutralizzazione				631
EMC	Esami sierologici	ELISA				792
	Esami virologici	Isol. virale (47)	ELISA (179)	PCR (146)		372
TOTALE						120511

Numero e tipologia di esami diagnostici (ufficiali) richiesti al CERVES nel 2004

MALATTIA	RICERCA	REAZIONI (N°)				TOTALE
AFTA	Esami sierologici	ELISA O (2205)	ELISA A (2205)	ELISA Asia (2205)	ELISA 3ABC (12)	6627
	Esami virologici	Isol. virale (11)	ELISA (10)	PCR (10)		31
MVS	Esami sierologici	ELISA scr. (55271)	ELISA IgG (3769)	ELISA IgM (3769)		62809
		Siero Neutralizzazione				3724
	Esami virologici	Isol. virale (68)	ELISA (3+60)	PCR (2465)		2596
SV	Esami sierologici	Siero Neutralizzazione				411
EMC	Esami sierologici	ELISA				1167
	Esami virologici	Isol. virale (10)	ELISA (110)	PCR (112)		232
TOTALE						75559

Attività Produttiva 2003-2004 di supporto ad attività Istituzionali del CERVES

Le reazioni diagnostiche in uso presso il CERVES sono state sviluppate (produzione di anticorpi monoclonali e policlonali, messa a punto di metodi diagnostici e loro validazione) nell'ambito del Reparto Biotecnologie, Struttura a cui il CERVES afferisce; pertanto tutti i reagenti diagnostici sono di produzione interna.

L'attività produttiva di kit diagnostici avviene su piccola o media scala, in forma di reagenti controllati, utilizzabili da laboratori con una buona capacità operativa (non si tratta di kit commerciali "tutto incluso"). Questo standard produttivo è idoneo per la maggior parte dei Laboratori di Referenza con cui il CERVES collabora e, in particolare, con i Laboratori degli IZZSS Italiani incaricati dello screening sierologico per MVS nell'ambito del piano di sorveglianza per l'eradicazione della malattia dal territorio Nazionale, supportato finanziariamente dalla UE.

Nel corso del **2003 e del 2004**, ai dieci **Istituti Zooprofilattici Italiani**, incaricati dell'esecuzione del **test di screening per gli anticorpi anti-MVS** nell'ambito del Piano Nazionale, sono stati prodotti e distribuiti kit in quantità idonea ad eseguire **400.00 esami sierologici (200.000/anno)**; a questi sono da aggiungere quelli utilizzati presso il CERVES (corrispondenti a **circa 170.000**), per una produzione totale di circa **670.000 analisi**.

La "**Valorizzazione**" commerciale di questa attività di produzione e distribuzione, limitata al solo test di screening per anticorpi anti-MVS ed adottando un costo stimato di vendita/acquisto potenziale di 0,76 Euro/test, risulterebbe in un incasso di 509.200 Euro nei due anni citati di attività, con un **valore medio annuo di circa 255.000 Euro**.

Nell'ambito delle sue funzioni come Laboratorio di referenza OIE per la MVS, il Centro ha fornito reagenti per la diagnosi di Malattia Vescicolare del Suino anche al Canada, Polonia, Corea, Belgio e, per intermediazione dell'organizzazione internazionale IAEA, alla Birmania; inoltre ha reso disponibili al Centro di Referenza Comunitario presso l'IAH di Pirbright, Regno Unito, sieri

positivi di suini naturalmente o sperimentalmente infettati con il virus MVS, per la predisposizione di pannelli di standards internazionali.

Infine, ceppi virali e anticorpi monoclonali sono stati forniti a vari Partner Europei nell'ambito di progetti di ricerca collaborativi internazionali su Afta in cui il CERVES è coinvolto.

Rapporti Internazionali

Nell'ambito delle sue attività il CERVES mantiene contatti frequenti a livello internazionale, avendo come interlocutori Organismi quali Commissione Europea, OIE, FAO/EUFMD, oltre ai centri di referenza nazionali degli altri Stati Membri.

Nel 2003 e 2004 gli impegni più significativi, espletati da esperti del CERVES, sono stati:

- la presentazione della situazione italiana relativa ad MVS (infezione e controllo) in specifiche riunioni del **Comitato Veterinario Permanente** (Bruxelles, gennaio 2003, aprile 2004);
- il contributo fornito in occasione della visita ispettiva della **Commissione Europea** per la valutazione dei Piani di emergenza per le malattie della lista A (Perugia, maggio 2003);
- il supporto tecnico fornito al Ministero della Salute e alla Regione Lombardia e gli interventi esplicativi durante la visita di delegazioni di **ispettori argentini** (maggio 2003), **uruguaiani** (novembre 2004) e **messicani** (dicembre 2004) incaricati della valutazione delle attività di controllo per la MVS implementate in Italia ed in Lombardia;
- il supporto tecnico fornito al Ministero della Salute per la visita ispettiva delle **Autorità Veterinarie giapponesi** incaricate della valutazione delle attività di controllo realizzate per la MVS e per l'afta epizootica sul territorio nazionale (2003);
- le riunioni in qualità di membro dell'“**ad hoc group**” dell'OIE per la valutazione dei test differenziali tra infezione e vaccinazione aftosa (OIE, settembre 2003, OIE settembre 2004);
- la partecipazione ai meeting dei **progetti di ricerca europei**, sul miglioramento dei sistemi di controllo e diagnostici per l'Afta, con presentazione dei risultati della ricerca italiana (Bruxelles, ottobre 2003, giugno 2004, novembre 2004);
- la partecipazione ai **meeting annuali dei centri di referenza per MVS**, con presentazione della situazione epidemiologica italiana e presentazioni scientifiche sull'efficienza dei test di laboratorio (Bruxelles, ottobre 2003, novembre 2004);
- la partecipazione come **relatore ad invito all'workshop internazionale**, organizzato dall'Istituto CISA-INIA di Valdeolmos (Madrid), dal titolo “Current Trends in Diagnosis of Viral Diseases” (dicembre 2003);
- la partecipazione ad invito da parte della DG Research della Commissione Europea allo **workshop: “EU funded research in foot and mouth disease and classical swine fever”**
- la partecipazione in qualità di esperto all'**EU-Canada meeting on “Animal Health and Regionalisation”** (Bruxelles: 14-16 aprile 2004);
- la partecipazione come **relatore ad invito alla “OIE International Conference on the Control of Infectious Animal Diseases by Vaccination”** (Buenos Aires, aprile 2004);
- la partecipazione, anche come **relatore ad invito**, al workshop sui **Piani di Laboratorio per affrontare le emergenze diagnostiche per l'afta**, organizzato dalla EUFMD Commission (Cordoba, aprile 2004);
- l'invito all'evento per la ricorrenza del **50° anniversario di fondazione della FAO/EU Commission per il Controllo dell'Afta** (Dublino, luglio 2004), durante la quale la dott.ssa Brocchi è stata premiata con una **medaglia** per il riconoscimento del suo contributo scientifico nel settore;
- la partecipazione in qualità di esperto alla riunione dell'“**Ad hoc group dell'OIE” on Epidemiology** (OIE, giugno 2004);

- la partecipazione, con presentazioni di lavori scientifici, alla **Session of the Research Group of the European Commission for the control of FMD** (Creta, ottobre 2004)

*Particolarmente rilevante per l'impegno richiesto, oltre che per i risultati conseguiti, la visibilità internazionale del Centro di Referenza Italiano e le ricadute strategiche, è stata l'organizzazione e la realizzazione dello **workshop internazionale** sul confronto e validazione dei test commerciali e "in house" (**FMD NSP assays**) per la distinzione di animali infettati o vaccinati con virus aftosi. Lo workshop si è svolto presso i laboratori del CERVES, Brescia, 3-15 maggio 2004, con la partecipazione di rappresentanti di 10 Stati Europei ed extra-europei, inclusi rappresentanti del Centro Mondiale di referenza, di due centri OIE, della EUFMD/FAO. Durante le fasi di laboratorio, con la collaborazione e la supervisione di colleghi di altri laboratori di referenza, sono stati analizzati più di 3000 sieri di campo e sperimentali, pervenuti dai vari Laboratori partecipanti, con 7 diverse metodiche, incluso il test 3ABC-ELISA sviluppato dal CERVES ed il test index dell'OIE sviluppato dal Centro PanAmericano. I risultati, molto soddisfacenti per le performance dimostrate dal test nazionale (che potrebbe essere proposto come test di riferimento per la UE) e per le prospettive di impiego di questi metodi, sono stati collegialmente elaborati durante 2-3 giorni di intense analisi, ed il report preliminare è stato distribuito, su richiesta, alle organizzazioni internazionali interessate e coinvolte.*

C'è ora una forte pressione da parte della Commissione Europea a disporre del report definitivo, che sarà elaborato all'inizio del 2005.

Centro di Referenza OIE per MVS: è proseguita l'azione di supporto alla Istituzione Internazionale di Parigi tramite le consuete forme di collaborazione, consulenza ed assistenza. L'attività è riassunta nei report annuali all'OIE.