



**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 dell'anno 2005-2006

Decreto 4 Ottobre 1999, Art. 5

ATTIVITA' SVOLTA NEL 2005 e 2006

Attività diagnostica

1) *Standardizzazione e validazione di metodiche diagnostiche*

Pressoché tutti i Metodi di Prova (MP) adottati dal CERVES utilizzano metodologie e reagenti sviluppati nell'ambito del Centro stesso. Alcuni di questi sono riconosciuti internazionalmente (OIE, Legislazione Europea) come test di riferimento.

Nella diagnostica di laboratorio delle Malattie Vescicolari, con particolare riferimento all'Afta ma attenzione deve essere posta anche per la Malattia Vescicolare del Suino, sono necessari frequenti aggiornamenti dei MP, a causa dell'evoluzione antigenica/genetica dei virus e del potenziale rischio di introduzione di nuove varianti.

Attività inerenti la standardizzazione e validazione dei MP per Afta e/o MVS svolte nel 2005-2006 includono:

- *Accreditamento di MP:* nel 2005-2006 il CERVES ha esteso l'accreditamento ad ulteriori quattro Metodi di Prova, di seguito elencati:
 - MP04/026: Metodo Normato di prova per la ricerca di anticorpi specifici verso virus aftosi tramite ELISA competitiva (il MP contempla l'adattamento a molteplici tipi e sottotipi virali, attraverso scelta e produzione di reagenti specifici);
 - MP04/027: Metodo Normato di prova per la ricerca di anticorpi marker di infezione aftosa tramite ELISA-3ABC;
 - MP04/024: Metodo Normato di prova per la ricerca di anticorpi verso la malattia vescicolare del suino tramite sieroneutralizzazione;
 - MP05/006: Metodo Normato di prova per la ricerca del virus della malattia vescicolare del suino tramite PCR;

Ai fini dell'accreditamento il CERVES ha eseguito il programma di attività di seguito riassunto:

- validazione dei MMPP in conformità alle linee guida dell'OIE e alle indicazioni della legge 17025 e delle Procedure Generali relative dell'IZSLER;
 - stesura del procedimento per l'esecuzione dei MMPP;
 - gestione dei Materiali di riferimento, preparazione e gestione dei controlli interni e della relativa documentazione;
 - allestimento delle Carte di Controllo dei MMPP e dei Fogli di Lavoro;
 - adeguamento dei laboratori P3 al Sistema Qualità unificato dell'Ente, con il superamento delle difficoltà riscontrate a causa della necessaria segregazione a cui tali laboratori devono sottostare.
- Particolarmente rilevanti anche per le ricadute internazionali sono state le attività inerenti la validazione ed uso delle seguenti metodiche sierologiche per Afta:
 - *ELISA per la ricerca di anticorpi anti-NSP FMD:* durante tutto il 2005 è continuata l'elaborazione dei risultati dello workshop internazionale organizzato presso il CERVES nel 2004, avente come obiettivo il confronto e validazione di sei test ELISA per la ricerca di anticorpi anti-NSP FMD. L'elaborazione è stata condotta in

- collaborazione con colleghi di cinque Istituti partecipanti (Belgio, UK, NL, DN, Panaftosa Brasile), anche in occasione di incontri specifici, ed è sfociata in varie pubblicazioni collaborative (vedi elenco nel paragrafo specifico): la prima tra queste è stata coordinata dal CERVES e rappresenta un punto di riferimento internazionale nell'applicazione della strategia DIVA per l'afta. Tra i test validati era presente la 3ABC-ELISA sviluppata presso il CERVES, che oltre ad essere risultata nella rosa dei tre test migliori, ha ricevuto il riconoscimento della validazione internazionale;
- *ELISA competitiva (SPCE) per la determinazione di anticorpi anti-FMDV tipo O (Manisa), A (Iran 96), Asia 1*: nella funzione di Centro collaborativo FAO/EUFMD, il CERVES ha esaminato circa 3000 sieri prelevati nelle zone tampone (confinanti con la Turchia) della Armenia, Georgia, Azerbaijan con l'obiettivo di valutare l'immunità vaccinale (programma di vaccinazione finanziato dalla Commissione Europea) ed evidenziare eventuale circolazione virale. L'indagine ha permesso di perseguire gli obiettivi preposti, ma anche di applicare lo step n° 5 delle linee guida dell'OIE sulla validazione dei test diagnostici, cioè la validazione continua attraverso l'applicazione e la verifica dei test in situazioni di campo. I tre test sopra menzionati, insieme alla 3ABC-ELISA, sono stati utilizzati per la titolazione dei sieri delle regioni caucasiche, per un totale di circa 12.000 titolazioni.

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

2) *Produzione e distribuzione di reagenti*

Poiché le reazioni diagnostiche in uso presso il CERVES sono state sviluppate nell'ambito del Centro stesso, coadiuvato dagli altri laboratori del Reparto Biotecnologie a cui il CERVES afferisce, tutti i reagenti diagnostici utilizzati per l'attività analitica routinaria (anticorpi monoclonali e policlonali, coniugati, antigeni inattivati e/o ricombinanti, matrici virali) sono di produzione interna.

Il test ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi della Malattia Vescicolare del Suino (MVS) è utilizzato dal 1995 come metodo di screening nel Piano Nazionale di sorveglianza/eradicatione, con reagenti prodotti e distribuiti dal Centro Nazionale di Referenza per le Malattie Vescicolari (CERVES). L'esecuzione del test di screening è demandata agli IZZSS territorialmente competenti. Il dettaglio dei kit distribuiti nel corso del **2005-2006**, su specifica richiesta, agli **Istituti Zooprofilattici** incaricati dell'esecuzione del **test di screening per gli anticorpi anti-MVS** nell'ambito del Piano Nazionale, è registrato nell'annessa tabella; la tabella riporta anche il numero di sieri esaminati, estratti dai record trasmessi dagli IZZSS stessi. Lo scopo della presentazione di questi dati è anche quello di evidenziare la ridotta percentuale di utilizzo dei reagenti in buona parte dei laboratori, a fronte di un impegno considerevole di risorse da parte del CERVES.

	Anno 2005			Anno 2006		
	Campioni esaminati documentati	Numero determ. fornite	% utiliz.	Campioni esaminati documentati	Numero determ. fornite	% utiliz.
IZS PLV, TORINO	8289	15000	55	11812	25000	47
IZS VE, PADOVA	6602	8000	83	43110	30000	>100*
IZS LT, ROMA	5688	10000	57	6244	10000	62
IZS UM, PERUGIA	4813	17000	28	6229	15000	41
IZS AM, TERAMO	6528	25000	26	21128	42000	50
IZS PB, FOGGIA	5234	9000	58	6130	11000	56
IZS ME, NAPOLI	17744	40000	44	31568	70000	45
IZS CATANZARO	10901	22000	50	16102	26000	62
IZS SI, PALERMO	6682	20000	33	9876	20000	49
IZS SA, SASSARI	17248	30000	57	4197	30000	14
IZSLER, BRESCIA	43338 ^{a)}	non appl	//	172834 ^{a)}	non appl	*
Totale		196000			279.000	

a) Il numero di campioni riportati per IZSLER si riferisce esclusivamente all'attività di sorveglianza sierologica in Lombardia-Emilia Romagna; non è comprensivo delle analisi eseguite per conferme su campioni di altri IIZZSS.

* a causa dell'elevato carico di lavoro, conseguente alla sorveglianza attivata in seguito all'accertamento di focolai, i campioni ricevuti nel periodo Novembre-Dicembre 2006 sono stati esaminati solo ad una diluizione (rispetto alle due diluizioni previste nella procedura standard), comportando una economia di reagenti (oltre che di risorse temporali e personali)

Complessivamente, il CERVES ha **distribuito a 10 IIZZSS kit per 196.000 analisi nel 2005 e per 279.000 analisi nel 2006**. A questi sono da aggiungere quelli utilizzati presso il CERVES sia per l'attività di sorveglianza nelle due regioni territorialmente competenti (Lombardia-Emilia Romagna), sia per i test ELISA di conferma, corrispondenti a 52.294 test ELISA nel 2005 e 188.369 test ELISA nel 2006, per una produzione totale di circa **250.000 analisi nel 2005 e 470.000 nel 2006**. Mentre l'attività di produzione e distribuzione nel 2005 è stata in media con il biennio precedente, il picco registrato nel 2006 è il riflesso dell'incremento di controlli sierologici attivati in seguito all'accertamento di focolai di malattia in regioni settentrionali (Lombardia e Veneto).

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 1,3 Euro/test (desunto dal costo di vendita dell'unico kit commerciale esistente), risulta in un **risparmio** teorico per l'attuazione del Piano di **936.000 Euro per il biennio 2005-2006 (equivalente ad eventuale acquisto di kit commerciali per 720.000 prove)**. E' evidente che nella voce "risparmio teorico" non sono contemplati i costi di gestione e le risorse impiegate dal CERVES.

Sempre in ambito di produzione e distribuzione di reagenti, è da segnalare l'organizzazione da parte del CERVES di ring test per n° 2 prove sierologiche per Afta a cui hanno partecipato i 10 IIZZSS referenti, oltre a due Sezioni diagnostiche rappresentative della Lombardia e dell'Emilia Romagna (vedi paragrafo 4): questa

iniziativa ha comportato la produzione, controllo e distribuzione dei kit per l'esecuzione delle relative prove ai 12 laboratori partecipanti.

Infine, nell'ambito delle sue funzioni come Laboratorio di referenza OIE per la MVS, il Centro ha fornito reagenti per la diagnosi sierologia di Malattia Vescicolare del Suino a Estonia, Polonia, Belgio per circa 20.000 analisi nel 2005, Portogallo, Belgio, Cina, Polonia e Canada nel 2006.

Su specifica richiesta, il CERVES ha fornito il kit 3ABC-ELISA per un totale di 1000 analisi al laboratorio nazionale di referenza del Belgio, come unico test non commerciale di riferimento in ambito europeo.

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

3) Attività analitica routinaria

Il CERVES eroga un servizio diagnostico a livello nazionale. Tutti i Metodi di Prova si basano su metodologie e reagenti sviluppati all'interno del reparto stesso; alcuni di questi sono test di riferimento, riconosciuti internazionalmente (OIE, Legislazione Europea). Tutti i MP utilizzati dal CERVES sono stati soggetti a valutazione nel 2005 attraverso ring test internazionali.

Il volume di attività diagnostica richiesta al CERVES non è costante, ma soggetto a variazioni conseguenti alla situazione epidemiologica e alla attuazione di piani di sorveglianza.

Ad eccezione del periodo novembre-dicembre 2006 durante il quale focolai secondari clinici di MVS sono stati segnalati in Lombardia, nel biennio 2005-2006 la casistica di "sospetti clinici" di malattia vescicolare da sottoporre a diagnosi differenziale di laboratorio è stata limitata a pochi casi, confermando il trend tipico degli anni precedenti.

Nei confronti dell'**afta epizootica** non è in vigore un piano di siosorveglianza: è stato richiesto l'esame sierologico per un numero medio di circa 2000 campioni/anno (in genere per import/export, esposizioni, fiere, ecc) che vengono esaminati verso tre sierotipi virali (totale 6000 esami/anno).

Inoltre, nella funzione di Centro collaborativo FAO/EUFMD, il CERVES ha esaminato nel 2005 circa 3000 sieri prelevati nelle zone tampone (confinanti con la Turchia) della Armenia, Georgia, Azerbaijan con l'obiettivo di valutare l'immunità vaccinale (programma di vaccinazione finanziato dalla Commissione Europea) ed evidenziare eventuale circolazione virale. I campioni sono stati analizzati con 4-5 tests diversi (in totale circa 12.000 esami), incluso il test per la differenziazione tra animali vaccinati e infetti. L'indagine ha avuto un rilievo internazionale, oltre ad utili ricadute interne, quali la validazione continua dei MP attraverso l'applicazione e la verifica dei test in situazioni di campo.

Nei riguardi 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. I test virologici, effettuati per

l'intero territorio nazionale si attestano per entrambi gli anni ad oltre 2600 test/anno; relativamente ai test sierologici, si è stabilizzato nel 2005 il volume di attività diagnostica dell'anno precedente, con circa 50.000 esami sierologici eseguiti dal CERVES per i territori delle regioni Lombardia ed Emilia Romagna, a cui si aggiungono le conferme di sieropositività dei campioni identificati al test di screening dagli IZZSS territorialmente competenti, per un totale di circa 6.000 esami addizionali, eseguiti con test specializzati (quali la sieroneutralizzazione e la determinazione delle classi anticorpali coinvolte). Nel 2006 il volume di esami sierologici per MVS è quasi quadruplicato (circa 200.000 test), con il picco di attività concentrato nei mesi di Novembre-Dicembre, a causa dei controlli attivati in seguito all'accertamento di focolai di malattia in Lombardia.

Oltre all'attività diagnostica, il CERVES ha coordinato l'attività di screening (sierosorveglianza) eseguita dagli IZZSS per il piano nazionale MVS ed ha continuato la produzione e fornitura dei kit diagnostici per il test di screening a tutti gli IZZSS. Report ed elaborati dell'attività di sorveglianza per MVS eseguita e/o coordinata su base nazionale dal CERVES sono stati regolarmente preparati per il Ministero e la UE.

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 analitica routinaria, registrata per Afta (FMD), Malattia Vescicolare del Suino (MVS), Stomatite Vescicolare (VS) ed Encefalomiocardite (EMC), è riportata nella tabella seguente.

E' tuttavia da sottolineare che, oltre all'attività 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 ad esempio alla preparazione ed esecuzione di ring test nazionali e/o internazionali, a verifiche interne, programmi di ricerca e soprattutto allo sviluppo e validazione continua di nuovi saggi diagnostici.

Numero e tipologia di esami diagnostici (ufficiali) richiesti al CERVES nel 2005

MALATTIA	RICERCA	REAZIONI (N°)				TOTALE
AFTA	Esami sierologici	ELISA O (5152)	ELISA A (5146)	ELISA Asia (5156)	ELISA 3ABC (3000)	15.454
	Esami virologici	Isol. virale (10)	ELISA (2)	PCR (18)		30
MVS	Esami sierologici	ELISA scr. (48291)	ELISA IgG (2002)	ELISA IgM (2002)		52.295
		Siero Neutralizzazione				1990
	Esami virologici	Isol. virale (240)	ELISA (25)	PCR (2641)		2906
SV	Esami sierologici	Siero Neutralizzazione				479
EMC	Esami sierologici	ELISA				469
	Esami virologici	Isol. virale (//)	ELISA (36)	PCR (97)		133
TOTALE						73.756

Numero e tipologia di esami diagnostici (ufficiali) richiesti al CERVES nel 2006

MALATTIA	RICERCA	REAZIONI (N°)				TOTALE
AFTA	Esami sierologici	ELISA O (2154)	ELISA A (2164)	ELISA Asia (2144)	ELISA 3ABC (17)	6.479
	Esami virologici	Isol. virale (12)	ELISA (2)	PCR (51)		65
MVS	Esami sierologici	ELISA scr. (181859)	ELISA IgG (3205)	ELISA IgM (3205)		188.269
		Siero Neutralizzazione				2.146
	Esami virologici	Isol. virale (315)	ELISA (90)	PCR (2873)		3.278
SV	Esami sierologici	Siero Neutralizzazione				150
EMC	Esami sierologici	ELISA				1698
	Esami virologici	Isol. virale (//)	ELISA (23)	PCR (89)		112
TOTALE						202.197