



**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 2007

Decreto 2 Novembre 1991

ATTIVITA' SVOLTA NEL 2007

Attività diagnostica

Test diagnostici e Potenzialità diagnostica presso il CERVES

Nelle tabelle 1a e 1b sono descritti i principali test utilizzati presso il CERVES a scopo diagnostico per Afta e MVS e la capacità diagnostica in condizioni di normalità o dopo attivazione di risorse supplementari in caso di iniziale emergenza.

Va precisato che ad oggi tutte le prove diagnostiche sono eseguite con test "in house", pertanto la valutazione delle potenzialità del CERVES deve obbligatoriamente tenere in considerazione anche i tempi e le risorse necessari alla produzione dei reagenti e dei kit utilizzati.

Tabella 1a: Test Virologici e Sierologici usati per l'AFTA

Test	descrizione	Tipologia e luogo di esecuzione	OIE	S.Q.*	Tempo esecuzione saggio	Tempo risposta giorni	Potenzialità saggi per Settimana **	
							Standard	Allerta
Ag-ELISA	Rilevamento e tipizzazione di antigeni aftosi (diff. 7 tipi)	Virologico Lab P3	No/Si	No	5 ore	1	15	45
Isolamento	Isolamento Virus in cellule sensibili	Virologico Lab P3	Si	No	6 giorni	8	15	45
RT-PCR	Amplificaz. genoma (pan-afta)	Virologico Lab P3	Si	No	8 ore	2	60	100
VNT	Ac neutralizzanti, test conferma (7 sierotipi)	Sierologico Lab P3	Si	Si	2-3 giorni	n.a. test di conferma	100	300
SP-ELISA	ELISA competitiva Ac tipo-sp (4 sierotipi)	Sierologico Lab P2/P3#	Si	Si	6 ore	1	3000	15000
NSP-ELISA	3ABC-trap ELISA (pan-FMD)	Sierologico Lab P2/P3#	Si	Si	6 ore	1	3000	15000

: campioni di sangue per esami sierologici provenienti da focolai, sospetti o correlazioni con focolaio, Zone di protezione devono essere esaminati in laboratori P3 (possibile viremia).

OIE Il saggio è eseguito in accordo all'OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines

S.Q.* Il saggio è inserito nel Sistema Qualità? Si indica "prova accreditata"; No indica "prova non accreditata", ma inserita in un laboratorio accreditato.

- **Standard** potenzialità diagnostica raggiungibile con le risorse attualmente assegnate al CERVES
- **Allerta** Numero massimo dei saggi eseguibili presso il CERVES destinando tutte le risorse (umane, strumentali, ambientali) attualmente esistenti/disponibili presso il Reparto Biotecnologie (soggette a formazione continua) e tre tecnici aggiuntivi da altri reparti per affrontare le prime settimane di emergenza. Il dato deriva dall'esperienza vissuta per fronteggiare emergenze MVS.

Tabella 1b: Test Virologici e Sierologici usati per la Malattia Vescicolare del Suino

Test	descrizione	Tipologia e luogo di esecuzione	OIE	S.Q.*	Tempo esecuzione saggio	Tempo risposta giorni	Potenzialità saggi per Settimana **	
							Standard	Allerta
Ag-ELISA	Rilevamento dell'antigene MVS	Virologico Lab P3	No/Si	No	5 ore	1	20	60
Isolamento	Isolamento Virus in coltura cellulare	Virologico Lab P3	Si	No	6-7 giorni	8	20	60
RT-PCR	Amplificaz. genoma (3D)	Virologico Lab P3	Si	Si	10 ore	2	75	150
VNT	Ac neutralizzanti, test di conferma	Sierologico Lab P3	Si	Si	2-3 giorni	n.a. test di conferma	100	300
5B7 ELISA	ELISA per screening Ac	Sierologico Lab P2	Si	Si	6 ore	1	3.000	15.000
ELISA-IgG	Determinaz. Isotipo Ac (Ac tardivi)	Sierologico Lab P2	No	No	6 ore	n.a. eseguito su pos	100	300
ELISA-IgM	Determinaz. Isotipo Ac (Ac precoci)	Sierologico Lab P2	No	No	6 ore	n.a. eseguito su pos	100	300

- OIE Il saggio è eseguito in accordo all'OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines
- S.Q.* Il saggio è inserito nel Sistema Qualità? Si indica "prova accreditata"; No indica "prova non accreditata", ma inserita in un laboratorio accreditato.
- **Standard** potenzialità diagnostica raggiungibile con le risorse attualmente assegnate al CERVES
- **Allerta** Numero massimo dei saggi eseguibili presso il CERVES destinando tutte le risorse (umane, strumentali, ambientali) attualmente esistenti/disponibili presso il Reparto Biotecnologie (soggette a formazione continua) e tre tecnici aggiuntivi da altri reparti per affrontare le prime settimane di emergenza. Il dato deriva dall'esperienza vissuta per fronteggiare emergenze MVS.

NOTA: Il CERVES può avvalersi delle competenze del Reparto di Biologia Molecolare per il sequenziamento di parti genomiche dei virus MVS e Afta per indagini di epidemiologia molecolare.

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 sono necessari frequenti aggiornamenti dei Metodi di Prova, a causa dell'evoluzione antigenica/genetica dei virus e del potenziale rischio di introduzione di nuove varianti; benché questo sia particolarmente importante nel caso dell'Afta Epizootica, anche la Malattia Vescicolare del Suino richiede vigilanza e attenzione.

I numerosi Metodi di Prova adottati dal CERVES seguono, ove esistenti, i riferimenti normativi specifici, pur con le varianti metodologiche migliorative valutate nel corso del loro sviluppo. In molti test l'apporto migliorativo è derivante dall'utilizzo di anticorpi monoclonali prodotti e caratterizzati "in house", in sostituzione dei sieri policlonali immuni suggeriti nelle procedure per l'allestimento dei metodi normati.

Nel 2007 è stato predisposto un programma pluriennale, con indicazione della relativa tempistica, per la codifica, validazione ed accreditamento di tutti i metodi di prova utilizzati dal CERVES che non hanno ancora ricevuto la qualifica di metodi accreditati.

Attività inerenti la standardizzazione e validazione dei MP per Afta e/o MVS svolte nel 2007 sono state:

- rivalidazione e revisione del MP 05/006 "Metodo normato di prova per la ricerca del virus della malattia vescicolare del suino tramite PCR"
- predisposizione dei documenti ed esecuzione delle attività sperimentali per l'accreditamento della prova di Sieroneutralizzazione per virus afosi di tipo O, A, C, Asia 1.

La revisione del MP 05/006 si è resa necessaria per l'introduzione nell'uso corrente, in associazione ai primer precedentemente definiti, di una nuova coppia di primer per amplificazione, selezionati in una regione genomica con omologia completa per tutti i virus MVS circolanti. La variazione è conseguente alla dimostrazione sperimentale di una mutazione puntiforme negli isolati di virus MVS responsabili dei focolai individuati da Novembre 2006 nelle regioni settentrionali. Il processo di validazione del MP revisionato ha comportato lo studio e valutazione della Sensibilità e Specificità analitiche, l'analisi della ripetibilità e riproducibilità e la verifica delle performance diagnostiche (Specificità e Sensibilità diagnostiche). Il processo è stato descritto in uno specifico dossier di validazione.

L'attività inerente l'accreditamento della prova di Sieroneutralizzazione per virus afosi di tipo O, A, C, Asia1 ha comportato: la stesura del MP e dei relativi fogli di lavoro per la codifica, oltre ad essenziali fasi di validazione, quali la definizione della soglia di positività per le principali specie animali sensibili nelle condizioni di saggio del CERVES e l'approntamento dei controlli positivi e negativi per i tipi afosi O, A, Asia1 con riferimento agli Standard Internazionali.

Inoltre, sono state espletate le attività relative all'emissione dei documenti per la Revisione dei seguenti Metodi di Prova Accreditati

- ✓ MP 04/027: "Metodo Normato di Prova per la ricerca di anticorpi marker di infezione aftosa tramite ELISA-3ABC."
- ✓ MP 04/018: "Metodo normato di prova per la ricerca di anticorpi verso la Malattia Vescicolare del suino tramite ELISA competitiva"
- ✓ MP 05/006: "Metodo normato di prova per la ricerca del virus della Malattia Vescicolare del suino tramite PCR"

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

2) Produzione e distribuzione di reagenti

Poichè 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) utilizzato come metodo di screening nel Piano Nazionale di sorveglianza/eradicazione, è eseguito con reagenti prodotti e distribuiti dal CERVES. L'esecuzione del test di screening è demandata agli IIZZSS territorialmente competenti. Il dettaglio dei kit distribuiti nel corso del **2007**, 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 IIZZSS stessi. Lo scopo della presentazione di questi dati è quello di evidenziare la percentuale di utilizzo dei reagenti nei laboratori.

Reagenti per screening MVS distribuiti	Anno 2007		
	Campioni esaminati documentati	Numero determ. fornite	% utiliz.
IZS PLV, TORINO	11384	5000	>100*
IZS VE, PADOVA	18495	10000	>100*
IZS LT, ROMA	9059	30000	30
IZS UM, PERUGIA	4547	15000	30
IZS AM, TERAMO	23800	30000	80
IZS PB, FOGGIA	4278	6000	71
IZS ME, NAPOLI	24522	40000	61
IZS CATANZARO	9978	18000	55
IZS SI, PALERMO	5867	20000	29
IZS SA, SASSARI	903	20000	4.5
IZSLER, BRESCIA	548.136	non appl	100
Totale		194.000	

* utilizzati kit in giacenza dell'anno precedente

Complessivamente, il CERVES ha **distribuito a 10 IZZSS kit per 194.000 analisi nel 2007**. 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 **548.136 test ELISA**, per una produzione totale di circa **750.000 test**. Mentre l'attività di distribuzione ad altri IZZSS è stata in media con gli anni precedenti, il picco di produzione e attività registrato nel 2007 è il riflesso dell'incremento di controlli sierologici attivati in seguito all'accertamento di focolai di malattia in Lombardia, alla relativa eradicazione ed alle successive attività straordinarie di sierosorveglianza.

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 **975.000 Euro (equivalente ad eventuale acquisto di kit commerciali per 750.000 prove)**. Considerati i costi totali del CERVES (vedi consuntivo 2007) e le attività diagnostiche e di servizio erogate, questa cifra rappresenta un **risparmio reale** per il sistema.

Sempre in ambito di produzione di reagenti diagnostici, l'emergenza diagnostica per MVS protratta per tutto il 2007 ha rappresentato l'occasione per **introdurre i primi kit stabilizzati per la sierologia MVS**; in pratica sono state rese disponibili piastre ELISA stabilizzate, già predisposte con antigene inattivato. Tali kit sono stati utilizzati presso il CERVES, e distribuiti in due sezioni diagnostiche dell'IZSLER che sono intervenute in ausilio al CERVES durante i massimi picchi di emergenza; esemplari del kit stabilizzato sono stati forniti anche ai 10 IZZSS in occasione del ring test annuale.

Nell'ambito delle sue funzioni come Laboratorio di referenza OIE per la MVS, il Centro ha fornito nel 2007 reagenti per la diagnosi sierologia di Malattia Vescicolare del Suino a Belgio, Polonia, Slovenia, Canada per circa 20.000 analisi, oltre ai reagenti per l'identificazione del virus MVS alla Slovenia.

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 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.

Fatta eccezione per i focolai secondari clinici di MVS segnalati in Lombardia, nel 2007 la casistica di "sospetti clinici" di forme 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 sierosorveglianza. Nonostante l'allarme per i casi circoscritti di Afta verificatisi in Inghilterra nel periodo estivo, come conseguenza di una fuga dagli impianti di produzione di vaccino di Pirbright, la richiesta diagnostica per Afta in Italia non ha subito variazioni significative. Come di consueto è stato richiesto l'esame sierologico per un numero approssimativo di 2-3000 campioni (in genere per import/export, esposizioni, fiere, ecc., e soli pochi campioni di animali importati dall'Inghilterra nel periodo a rischio) che sono stati esaminati verso tre sierotipi virali (totale circa 8000 esami). Solo un lieve incremento è stato registrato per i test PCR-Afta, eseguiti su richiesta del ministero in campioni di carni importate dall'Inghilterra e conferiti al CERVES prima che fosse definita la valutazione del rischio e l'adeguamento al protocollo di comportamento europeo.

Nei riguardi della **MVS**, l'attività diagnostica si è elevata a picchi mai raggiunti in anni precedenti, dovuti prevalentemente ai controlli sierologici eseguiti per l'eradicazione e la conseguente sorveglianza della malattia in Lombardia. Dal gennaio 2007 per quasi l'intero anno, sono state coinvolte ed attivate nell'esecuzione del test sierologico di screening anche due sezioni diagnostiche (Mantova e Cremona) interessate da piani straordinari di controllo per il blocco delle movimentazioni. Mentre in condizioni standard (tempi di pace e Piano nazionale ordinario) il numero di sieri esaminati **mensilmente** al CERVES col test di screening per l'attuazione del Piano Nazionale ordinario e per le conferme su campioni da altri IZZSS si è attestato intorno a 4000-5000, nel 2007 in coincidenza delle due ondate epidemiche di MVS il numero di sieri esaminati mensilmente è salito a **40.000 fino ad oltre 80.000** in corrispondenza dei massimi picchi di attività (con picchi di 8.000 al giorno). **L'aumento di 10-20 volte rispetto all'attività standard** è stato la conseguenza dei controlli effettuati per il rintraccio dei focolai, per i controlli nelle Zone di Protezione e Sorveglianza e per il ri-controllo di tutte le aziende nella regione Lombardia come misura straordinaria per il riaccreditamento. Come parte del controllo di qualità interno, l'analisi del trend di reazione è stata effettuata allestendo le carte di controllo da 6.391 piastre di ELISA.

L'incisivo aumento del volume di attività è stato ottenuto anche introducendo l'uso di strumenti per l'automazione di test ELISA, in particolare per l'erogazione dei reagenti e per il lavaggio delle micropiastre.

L'aumento del numero di test sierologici di conferma in Sieroneutralizzazione non è stato di pari entità, mentre i test addizionali per IgG e IgM, effettuati per caratterizzare tutti i sieri riscontrati positivi allo screening e "datare" l'esposizione all'infezione degli animali sieropositivi, hanno raggiunto picchi di 1000 sieri/mese.

I test virologici in PCR, introdotta come test di screening in sostituzione dell'isolamento virale dal 2003 ed effettuati per l'intero territorio nazionale, hanno mantenuto il trend degli anni precedenti, poiché la sorveglianza virologica riguarda prevalentemente il controllo mensile nelle stalle di sosta. I singoli campioni provenienti da aziende sieropositive o sospette sono stati circa 200 e come tali non hanno variato il volume di attività diagnostica.

Tutti i campioni positivi al test PCR oltre a quelli provenienti da casi sospetti sono sottoposti al test di Isolamento Virale in colture cellulari, per cui il numero di questi test è salito da poche unità ad oltre 200.

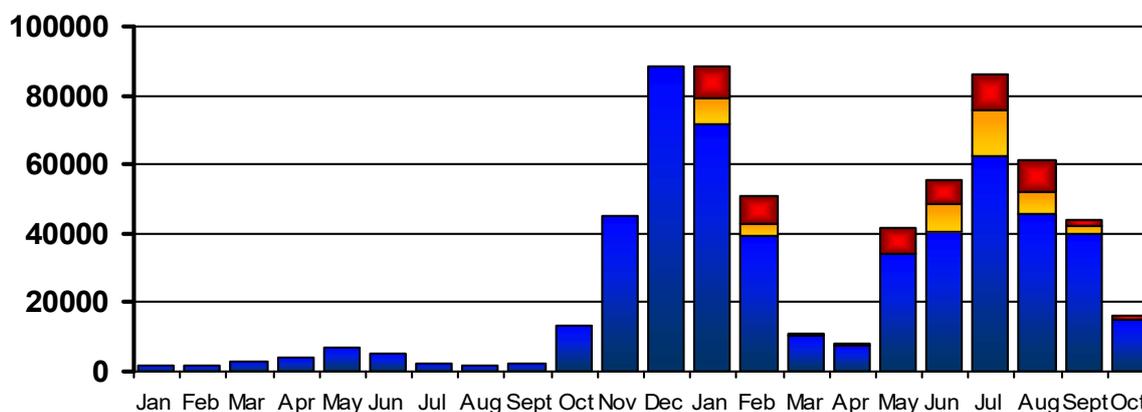
Le figure allegate illustrano la frequenza mensile dei test sierologici e virologici per MVS, evidenziando rispetto al 2006 il trend e l'entità dell'aumento.

L'incisivo aumento di attività diagnostica ha richiesto l'attivazione di una situazione di emergenza di laboratorio, che ha comportato il trasferimento temporaneo di operatori qualificati da altri laboratori oltre alla assegnazione di ore straordinarie.

In ambito diagnostico, 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 agli 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.

*Frequenza dei test sierologici per MVS nel periodo gennaio 2006-ottobre 2007
Test di screening (ELISA competitiva) per la ricerca di anticorpi anti-MVS*



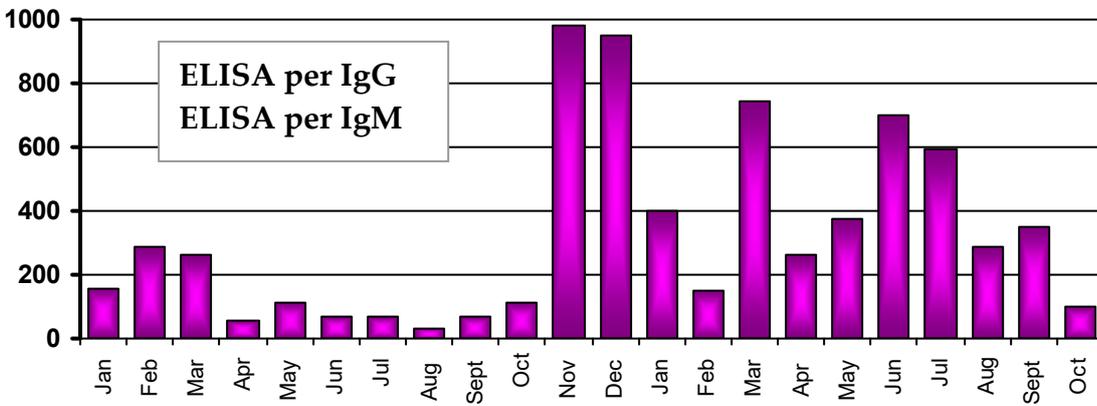
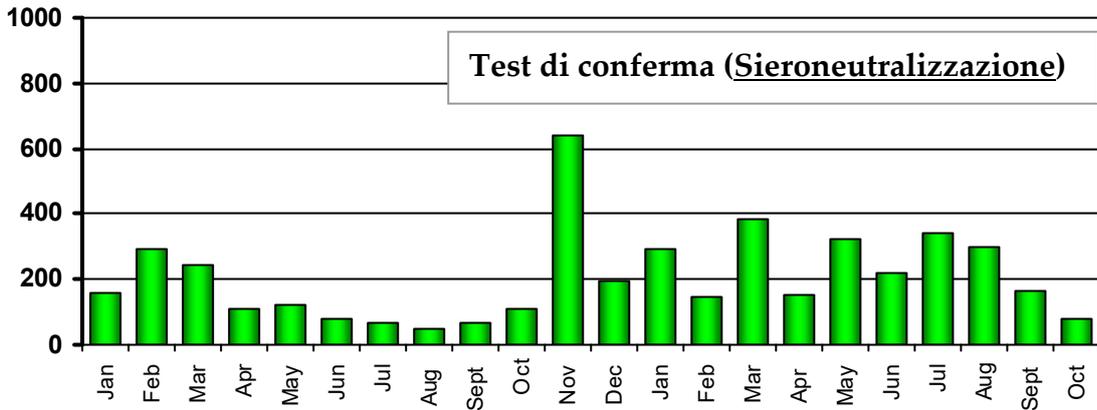
Legenda:

Blu: esami eseguiti presso il CERVES

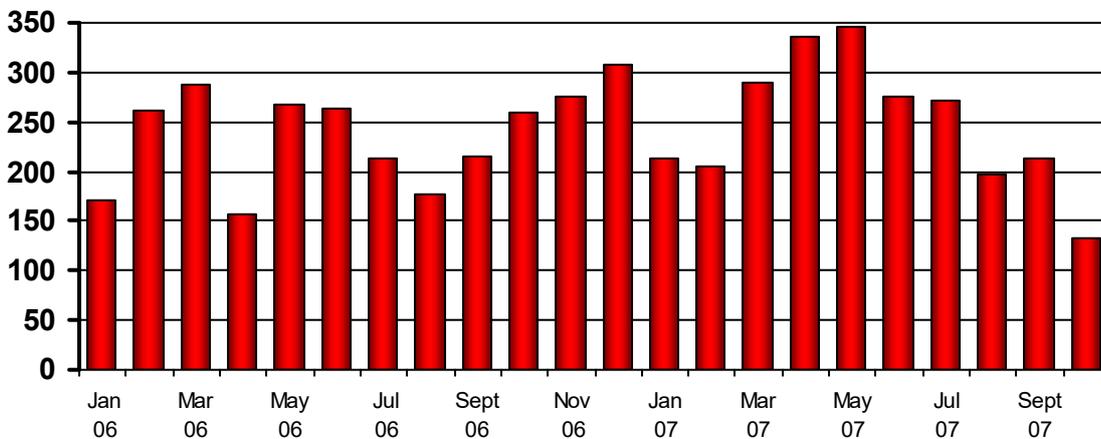
Giallo: esami eseguiti presso la Sezione diagnostica di Mantova

Rosso: esami eseguiti presso la Sezione diagnostica di Cremona

Frequenza dei test sierologici di conferma per MVS nel periodo gennaio 2006-ottobre 2007

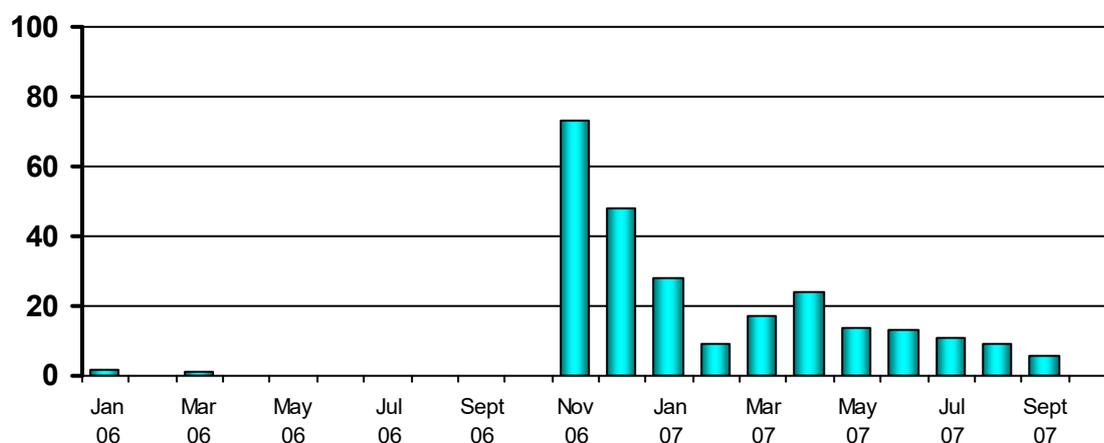


Frequenza dei test virologici per MVS nel periodo gennaio 2006-ottobre 2007
Test di screening (PCR) per la ricerca del virus



*Frequenza dei **test virologici per MVS** nel periodo gennaio 2006-ottobre 2007.*

*Test di **Isolamento Virale** in colture cellulari*



Attività connesse alla diagnostica del CERVES hanno riguardato la diagnosi di laboratorio sui casi di miocardite del suino, conferiti al CERVES da alcune sezioni diagnostiche. Pur non causando una sintomatologia vescicolare, l'**Encefalomiocardite del Suino (EMC)** può manifestarsi con sintomi e lesioni prodotte in alcune circostanze dal virus aftoso (morte improvvisa dei suinetti sotto scrofa, lesioni cardiache di aspetto necrotico o "cuore tigrato"); in questi casi è consigliata un'immediata diagnosi differenziale.

L'attività diagnostica routinaria ha confermato la presenza endemica dell'infezione dovuta a cardiovirus (EMCV) in un'area circoscritta della Lombardia meridionale, con il tipico andamento stagionale. Il riscontro di sieropositività rilevato attraverso il monitoraggio sierologico per EMCV su cinghiali catturati ha confermato la circolazione del cardiovirus anche in specie selvatiche.

L'accertamento di **Stomatite Vescicolare** è come sempre 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 nel dettaglio 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 e controlli di qualità interni, programmi di ricerca e soprattutto allo sviluppo e validazione continua di nuovi saggi diagnostici.

Infine, benché non parte dell'attività analitica routinaria, è da segnalare nell'ambito del servizio diagnostico il supporto erogato alla FAO per l'analisi con titolazione di 3500 sieri, prelevati nelle zone tampone (confinanti con la Turchia) della Armenia, Georgia, Azerbaijan con l'obiettivo di valutare l'immunità vaccinale raggiunta dopo la campagna di vaccinazione (programma di vaccinazione finanziato dalla Commissione Europea) ed evidenziare eventuale circolazione virale. I campioni sono stati analizzati con 5 test diversi (in totale circa 17.500 esami), in particolare per la determinazione (titolo) di anticorpi verso proteine strutturali specifiche per i sierotipi vaccinali O Manisa, A22 Iraq, A Iran 96, Asia1 e per la proteina non strutturale 3ABC, marker per la differenziazione tra animali vaccinati e infetti (DIVA). 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.

Numero e tipologia di esami diagnostici (ufficiali) richiesti al CERVES nel 2007

MALATTIA	RICERCA	REAZIONI (N°)				TOTALE
AFTA	Esami sierologici	ELISA O (3165)	ELISA A (2314)	ELISA Asia (2326)	ELISA 3ABC (12)	7.805
	Esami virologici	Isol. virale (1)	ELISA (1)	PCR (42)		44
MVS	Esami sierologici	ELISA scr. (548136)	ELISA IgG (4471)	ELISA IgM (4471)		557.078
		Siero Neutralizzazione				2744
	Esami virologici	Isol. virale (211)	ELISA (135)	PCR (3049)		3.395
SV	Esami sierologici	Siero Neutralizzazione				148
EMC	Esami sierologici	ELISA				952
	Esami virologici	Isol. virale (//)	ELISA (3)	PCR (98)		101
TOTALE						567.267

Nell'attività diagnostica non routinaria e/o specialistica eseguita nel 2007, non riportata nella tabella, si segnala:

- l'analisi di sequenza di 41 ceppi di virus MVS isolati nei focolai
- gli esami sierologici eseguiti per conto FAO/EUFMD Commission su campioni prelevati per siero sorveglianza in regioni Transcaucasiche per un totale di 17.500 analisi su 3500 sieri (determinazione del titolo anticorpale tramite ELISA per anticorpi tipo O, A22 Iraq, A Iran 96, Asia1 e anticorpi NSP-DIVA).