



**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 SWINE VESICULAR DISEASE**



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

**Relazione sulle attività dell'anno 2008  
Decreto 4 Ottobre 1999, Art. 5**

## ATTIVITA' SVOLTA NEL 2008

### Attività diagnostica

#### Test diagnostici e Potenzialità diagnostica presso il CERVES

Il CERVES si è dotato di un Piano di emergenze di laboratorio che, benché debba essere completato in alcuni aspetti che coinvolgono organizzazioni amministrative e direzionali dell'IZSLER, contempla le informazioni richieste in questo paragrafo, che vengono quindi riportate integralmente.

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.

**Le valutazioni sono state effettuate considerando che l'emergenza Afta ed MVS non siano contemporanee.**

**Va precisato che ad oggi tutte le prove diagnostiche sono eseguite con test sviluppati e prodotti "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	Identificaz. ag aftosi (7 sierotipi)	Virologico Lab P3	Si	Cod	5 ore	1	15	45
Isolamento	Isolamento in colture cell.	Virologico Lab P3	Si	Cod	6 giorni	8	15	45
RT-PCR	Rilev. genoma (3D, pan-afta)	Virologico Lab P3	Si	Cod	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 (6 sierotipi)	Sierologico Lab P2/P3 <sup>#</sup>	Si	Si	6 ore	1	3000	15000
NSP-ELISA DIVA	3ABC-ELISA (pan-FMD)	Sierologico Lab P2/P3 <sup>#</sup>	Si	Si	6 ore	1	3000	15000

**# : campioni di sangue per esami sierologici provenienti da focolai, da casi sospetti o correlati con focolaio, Zone di Protezione devono essere esaminati in laboratori P3 (possibile viremia)**

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	Si	Cod	5 ore	1	20	60
Isolamento	Isolamento virus in coltura cellulare	Virologico Lab P3	Si	Cod	6-7 giorni	8	20	60
RT-PCR	rilevamento 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	Cod	6 ore	n.a. eseguito su pos	100	300
ELISA-IgM	Determinaz. Isotipo Ac (Ac precoci)	Sierologico Lab P2	No	Cod	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.\* Inserito nel Sistema Qualità? Si indica "prova accreditata" in accordo alla norma 17025; Cod. indica prova codificata, 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.

n.a. non applicabile

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

#### 4) 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. Ad esempio, nella nuova Edizione 2008 del Manuale OIE sono state inseriti importanti aggiornamenti al capitolo della Malattia Vescicolare del Suino: oltre al test sierologico ELISA competitiva, ora anche il test descritto nel Manuale per la dimostrazione del virus tramite RT-PCR corrisponde al MP sviluppato ed adottato dal CERVES.

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. Nei test di tipo immunologico l'apporto migliorativo deriva 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 2008 è stato attivato il programma pluriennale per la codifica, validazione ed accreditamento di tutti i MP utilizzati dal CERVES che non hanno ancora ricevuto la qualifica di metodi accreditati.

Come parte dei risultati di questa attività, sette Metodi di Prova sono passati alla definizione di Metodi Codificati, in particolare i seguenti:

- Metodo normato di prova per la ricerca di virus aftosi tramite PCR;
- Metodo interno di prova per la ricerca di anticorpi di classe IgG e IgM anti-MVS tramite ELISA trapping isotipo-specifica;
- Metodo interno di prova per la dimostrazione di virus/antigeni aftosi tramite ELISA;
- Metodo interno di prova per la dimostrazione di virus aftosi tramite isolamento in colture cellulari;
- Metodo interno di prova per la dimostrazione di virus MVS tramite ELISA;
- Metodo interno di prova per la dimostrazione di virus/antigene MVS tramite isolamento in colture cellulari.

Sempre nell'ambito del mantenimento e miglioramento del SQ, sono state emesse le revisioni di tre Metodi di Prova Accreditati (per afta e MVS), effettuate per adeguamento a riferimenti normativi, range di temperature, scadenza reagenti, ecc.

Altre attività inerenti la standardizzazione e validazione dei MP per Afta e/o MVS svolte nel 2008 sono state:

- La revisione del MP 05/006 "Metodo normato di prova per la ricerca del virus della malattia vescicolare del suino tramite PCR"; la revisione ha contemplato l'inserimento di una procedura "one step" di RT-PCR in alternativa al metodo classico a due step. La nuova procedura è stata preventivamente valutata in parallelo al metodo classico, su campioni sperimentali e su campioni di campo, dimostrando una sensibilità analitica circa 10 volte superiore.
- Il completamento delle attività sperimentali per l'accreditamento della prova di Sieroneutralizzazione per virus aftosi di tipo O, A, C, Asia 1 e inoltra della domanda per l'accreditamento.

TUTTI i Metodi di Prova utilizzati dal CERVES sono regolarmente soggetti a valutazione attraverso **ring test internazionali**, organizzati con frequenza annuale (vedi oltre paragrafo specifico).

La performance dei MP è regolarmente monitorata attraverso le carte di Controllo, che sono parte del controllo di qualità interno, e permettono l'analisi del trend delle reazioni; ad esempio, per il test sierologico ELISA competitiva per anticorpi anti-MVS, eseguito con maggiore frequenza, sono state valutate nella costruzione della rispettiva carta di controllo 2823 piastre ELISA nel 2008.

Come nella tradizione del CERVES è stata particolarmente intensa e proficua l'attività per l'aggiornamento e lo sviluppo di nuovi test diagnostici. 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; questo è particolarmente importante nel caso dell'Afta Epizootica, sia per una maggiore frequenza di variazioni che per l'esistenza di sette diversi sierotipi. Coerentemente con questa esigenza, nel 2008 è stato esteso e/o modificato il pannello di anticorpi monoclonali utilizzati nel test ELISA sandwich per la identificazione e tipizzazione dei sierotipi aftosi O, A, Asia1.

Tra le attività di sviluppo e standardizzazione di nuove metodiche che hanno impegnato il CERVES nel 2008 con rilevanti output è da annoverare lo sviluppo e validazione dei metodi di prova tramite ELISA competitiva per la identificazione di anticorpi verso i sierotipi SAT 1 e SAT 2. I test, già introdotti nell'applicazione diagnostica, sfruttano l'utilizzo di anticorpi monoclonali, opportunamente selezionati, per la competizione con i sieri in esame. L'uso di anticorpi monoclonali conferisce ai test rilevanti vantaggi in termini di standardizzazione, specificità, riproducibilità.

Infine, l'obiettivo di trasformare alcune reazioni ELISA in-house in "kit pronto-uso" stabilizzati è progredito con successo: in particolare sono stati allestiti i prototipi di kit stabilizzati per tre diverse tipologie di test ELISA, che impiegano antigeni e principi differenti:

- ricerca di anticorpi marker di infezione aftosa tramite ELISA-3ABC (test DIVA);
- dimostrazione di virus/antigeni aftosi tramite ELISA sandwich;
- ricerca di anticorpi verso la Malattia Vescicolare del suino tramite ELISA competitiva

Per i tre prototipi è stato "validato" anche l'uso del substrato cromogeno TMB in sostituzione del cromogeno OPD.

Rappresenta infine una pietra miliare nella diagnostica dell'AFTA lo sviluppo, validazione ed immissione in commercio del primo test rapido "pen-side" per la diagnosi immediata sul campo. Il prodotto è nato da una fruttuosa collaborazione, con integrazione di specifiche competenze ed expertise, tra CERVES, World Reference Laboratory e Svanova e l'anno 2008 ha rappresentato la conclusione del percorso.

## 5) 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 in cui il CERVES è integrato, 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 IZZSS territorialmente competenti, ai quali nel corso del **2008, il CERVES ha distribuito** un volume di kit come registrato nell'annessa tabella; i dati presentati riportano anche il numero di sieri esaminati, estratti dai record trasmessi dagli IZZSS stessi, permettendo di evidenziare la percentuale di utilizzo dei reagenti nei laboratori: è positivo il rilievo di una percentuale di utilizzo del materiale fornito ai vari IZZSS molto migliorata rispetto al 2007; questo è indice di un uso più accorto o più corretto, può essere al consumo di scorte in giacenza da anni precedenti e, per alcune realtà (in genere coincidenti con emergenze diagnostiche), anche alla riduzione delle diluizioni esaminate dei sieri da due ad una.

Reagenti per screening MVS distribuiti	Anno 2008		
	Campioni esaminati documentati	Numero determ. fornite	% utiliz.
IZS PLV, TORINO	28292	25000	>100*
IZS VE, PADOVA	35434	43000	82
IZS LT, ROMA	29434	25000	>100*
IZS UM, PERUGIA	77070	36000	>100*
IZS AM, TERAMO	30608	40000	76
IZS PB, FOGGIA	20084	21000	95
IZS ME, NAPOLI	60194	30000	>100*
IZS CATANZARO	19016	24000	79
IZS SI, PALERMO	8910	15000	59
IZS SA, SASSARI	36091	30000	>100*
IZSLER, BRESCIA	271433	non appl	
<b>Totale</b>	<b>616566</b>	<b>289.000</b>	

\* utilizzati kit in giacenza dell'anno precedente

Complessivamente, il CERVES ha **distribuito a 10 IZZSS kit per l'analisi di 289.000 campioni, circa il 50% in più rispetto all'anno precedente (194.000 analisi nel 2007)**, sia in considerazione dell'attivazione del nuovo Piano di sorveglianza nazionale implementato nel 2008, che ha comportato una intensificazione dei controlli, sia conseguentemente alle azioni straordinarie in province nelle quali è stato sospeso l'accreditamento. A questi sono da aggiungere quelli utilizzati presso il CERVES,

corrispondenti a **271.433 test ELISA** eseguiti per l'attività di sorveglianza nelle due regioni territorialmente competenti (Lombardia-Emilia Romagna) e per i test di conferma, arrivando ad una produzione totale di oltre **600.000 test**.

La "**Valorizzazione commerciale**" dell'attività di produzione e distribuzione di kit per 600.000 test, 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 **780.000 Euro**. Un sicuro avanzamento nella tecnologia e facilitazione per gli IZZSS utenti dei reagenti forniti dal CERVES sarebbe la messa a disposizione del **kit stabilizzato per la sierologia MVS**, già collaudato nel 2007 durante l'emergenza diagnostica per MVS verificatasi in Lombardia e in occasione del ring test annuale organizzato per i 10 IZZSS. Tuttavia, questa innovazione comporterebbe risorse economiche aggiuntive a carico del CERVES e la sua implementazione potrebbe essere considerata a fronte di un finanziamento ad hoc per la realizzazione.

Nell'ambito delle sue funzioni come Laboratorio di referenza OIE per la MVS, il Centro ha fornito nel 2008 reagenti per la diagnosi sierologia di Malattia Vescicolare del Suino al Belgio e alla Polonia. Campioni e reagenti sono stati forniti anche alla Germania, come materiali di riferimento per la validazione dei rispettivi metodi di prova interni per MVS; il materiale fornito include 14 campioni di feci positive in PCR e/o isolamento virale, 25 sieri positivi, un campione del kit ELISA sierologico stabilizzato e il pannello di 25 sieri codificati utilizzati per il ring test nazionale.

Nell'ambito di collaborazioni internazionali, il CERVES ha fornito anche nel 2008 anticorpi monoclonali a svariati Partner Europei (Spagna, Francia, Olanda, UK, ecc.) ed extra-Europei (ad es. Ondesterpoort, Sud Africa, Lanzhou Veterinary Research Institute – China), mantenendo una leadership riconosciuta internazionalmente per le capacità produttive e per disponibilità di una Banca per questa tipologia unica di reagenti.

## **6) 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.

Nel 2008 la casistica di "sospetti clinici" di forme vescicolari, sottoposti a diagnosi differenziale di laboratorio, è stata limitata a pochi casi, confermando il trend tipico degli anni precedenti (fatta eccezione per il periodo epidemico di MVS in Lombardia nel 2006-2007). Complessivamente, sono pervenuti al CERVES:

- campioni da forme cliniche in due allevamenti ovini, province di Brescia e Parma rispettivamente, risultati positivi per parapoxvirus;
- campioni di tessuto epiteliale da una forma clinica in un allevamento bovino, provincia di Parma, risultato negativo;
- campioni di epitelio suino da un caso in provincia di Brescia, risultato negativo;
- campioni di epitelio suino da un caso in provincia di Arezzo, risultato positivo per MVS;

A questi andrebbero aggiunti i numerosi casi di miocardite nei suini, conferiti al CERVES da alcune sezioni diagnostiche dell'IZSLER per la diagnosi di laboratorio di **Encefalomiocardite virale del Suino (EMC)**. Pur non causando una sintomatologia vescicolare, l'infezione può manifestarsi con sintomi e lesioni prodotti 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 una diagnosi differenziale. L'attività diagnostica sui campioni esaminati nel 2008 ha individuato il virus ECM come causa della malattia in 22 casi su 62 sospetti conferiti, confermando la presenza dell'infezione da cardiovirus. Il riscontro di sieropositività rilevato attraverso il monitoraggio sierologico per EMCV su cinghiali catturati ha confermato la circolazione del cardiovirus anche in specie selvatiche.

Nei confronti dell'**afta epizootica** non è in vigore un piano di siero sorveglianza attivo, per cui la richiesta diagnostica per Afta in Italia si è mantenuta nei livelli standard degli anni "di pace". Le ragioni per le quali viene richiesto l'esame sierologico per Afta comprendono import/export, esposizioni, fiere, ecc., per un numero approssimativo di 2000 campioni nel 2008, che sono stati esaminati verso tre sierotipi virali (totale circa 6000 esami).

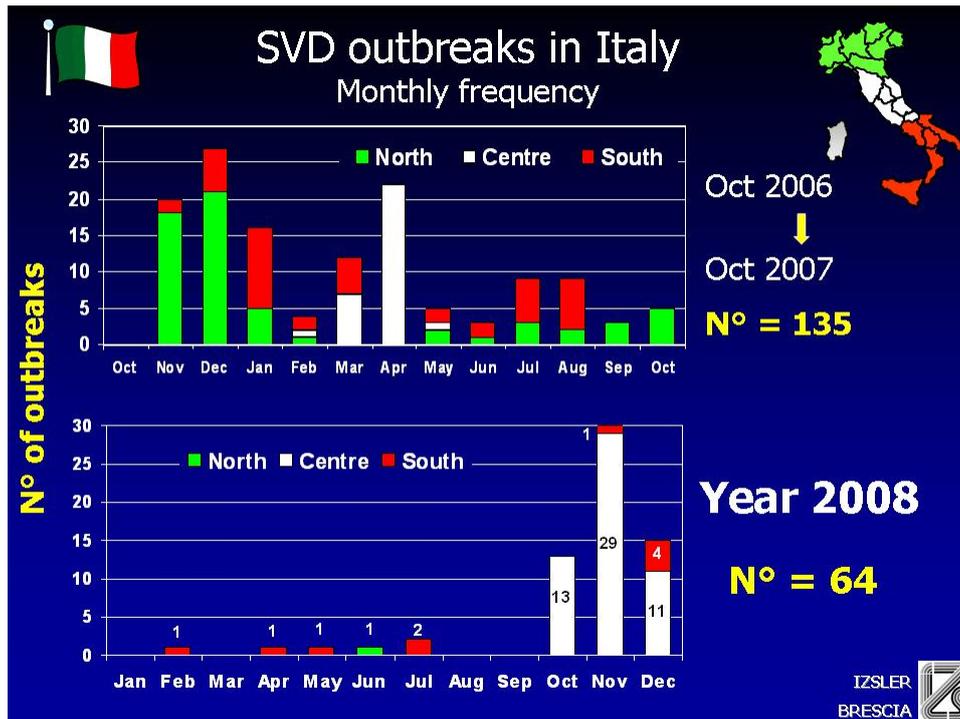
Nei riguardi della **MVS**, l'attività diagnostica si è mantenuta a livelli elevati.

*Situazione epidemiologica.* Durante il 2008 è stato attivato il nuovo revisionato Piano di sorveglianza che comporta una intensificazione dei controlli sierologici e virologici, reintroducendo il monitoraggio negli allevamenti da ingrasso.

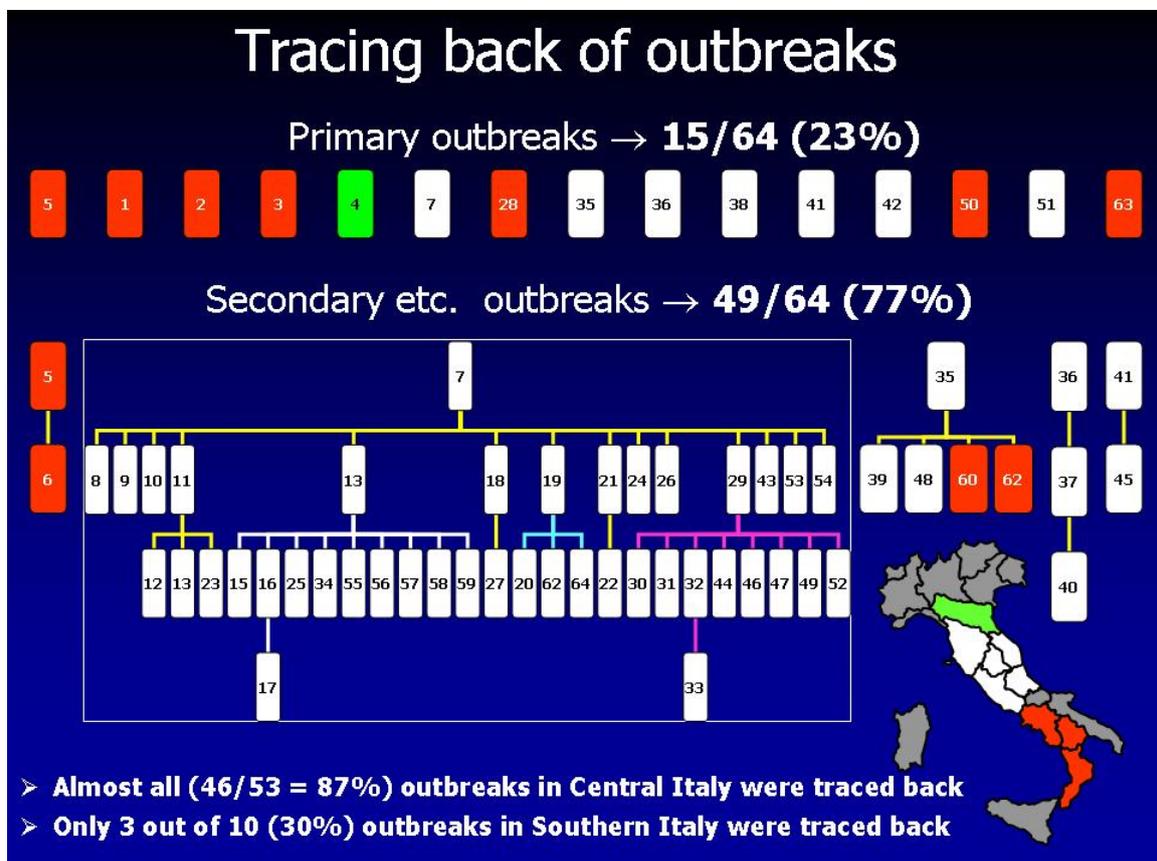
Sulla base della dimostrazione diretta del virus in campioni di feci ambientali o di correlazioni con focolai accertati supportata da evidenza di sieropositività, sono stati dichiarati 64 focolai di MVS, distribuiti per tipologia di aziende interessate, cronologia e geografia come illustrato nella tabella e nel grafico che seguono. Rapportata alla situazione epidemiologica del 2007, le principali considerazioni sono l'estinzione dei focolai nelle regioni settentrionali e una nuova recrudescenza dell'infezione nelle regioni centrali. E' rimasta invariata la situazione nelle regioni meridionali non accreditate (Campania, Calabria), con sporadici ma continui focolai.

*Focolai di MVS registrati nel 2008*

Regione	Ingrasso	Riproduz.	St. sosta	Altro	N. focolai	N. animali
<b>EMILIA R.</b>				<b>1</b>	<b>1</b>	<b>29</b>
<b>TOSCANA</b>	<b>2</b>				<b>2</b>	<b>2362</b>
<b>LAZIO</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>		<b>8</b>	<b>2520</b>
<b>UMBRIA</b>	<b>26</b>	<b>1</b>	<b>3</b>		<b>30</b>	<b>6611</b>
<b>MARCHE</b>	<b>6</b>				<b>6</b>	<b>70</b>
<b>ABRUZZO</b>	<b>6</b>	<b>1</b>			<b>7</b>	<b>305</b>
<b>CAMPANIA</b>	<b>2</b>	<b>1</b>			<b>3</b>	<b>129</b>
<b>CALABRIA</b>		<b>2</b>	<b>2</b>		<b>4</b>	<b>1651</b>
<b>BASILICATA</b>	<b>2</b>	<b>1</b>			<b>3</b>	<b>2871</b>
<b>TOTALE</b>	<b>48</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>64</b>	<b>16548</b>



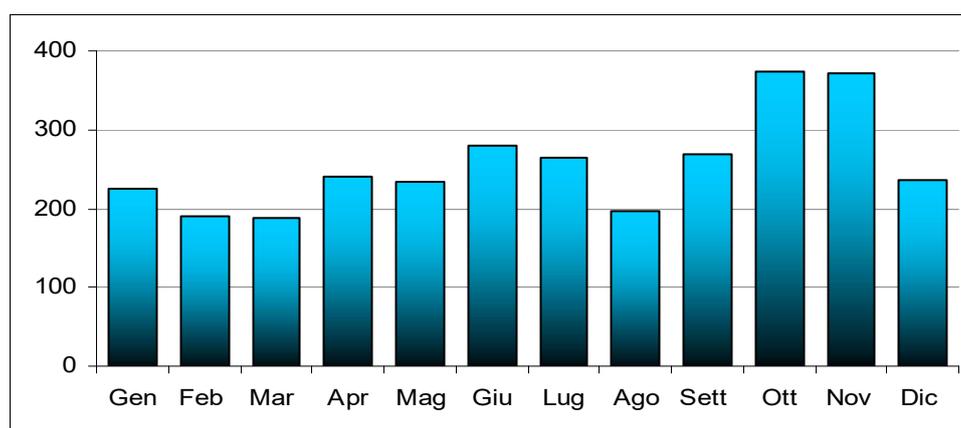
Lo schema successivo evidenzia come la maggior parte dei focolai registrati nelle regioni centrali sono secondari (o terziari, ecc) identificati in seguito ad indagini di rintraccio, mentre permane sconosciuta l'origine dei focolai, quasi tutti primari, nelle regioni meridionali non accreditate.



*Test virologici MVS.* Dal punto di vista del volume diagnostico, i test virologici in PCR, effettuati per l'intero territorio nazionale, hanno mantenuto il trend degli anni precedenti (circa 3.000 campioni), poiché la sorveglianza virologica riguarda prevalentemente il controllo mensile nelle stalle di sosta e la casistica di controlli virologici effettuati per sospetto e/o rintraccio dei numerosi focolai verificatisi nel 2008 in Italia centrale non ha inciso significativamente sul numero complessivo degli esami.

La figura allegata illustra la frequenza mensile del test di screening virologico per MVS.

*Frequenza dei **test virologici per MVS** nel 2008  
Test di screening (**PCR**) per la ricerca del virus  
3.016 test*



La tabella seguente estende il dettaglio dei controlli virologici eseguiti nel 2008, dividendoli per regione, motivo del prelievo e identificandone il risultato.

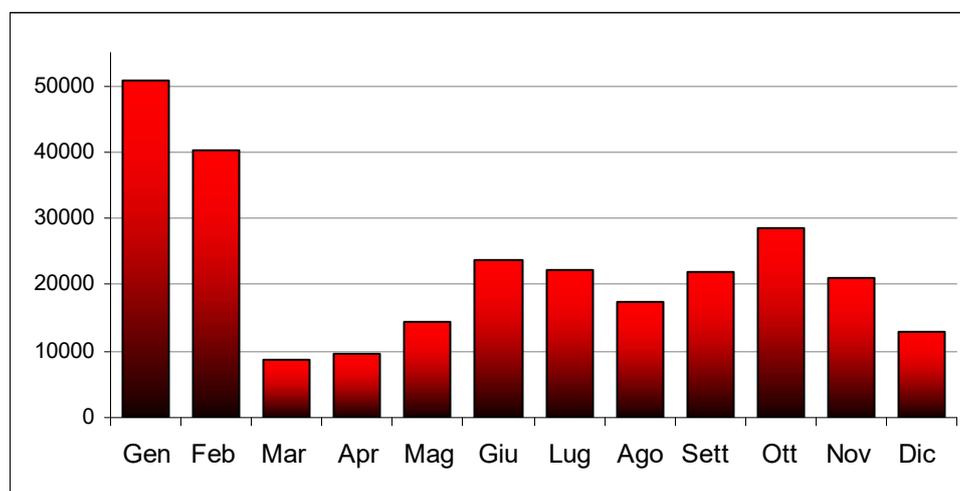
REGION	DELEARS' PREMISES		IMPORT	Suspect (Seropos herds)	Epidem. connec. with outbreak	various	POSITIVE SAMPLINGS
	n° DP controlled	n° samplings					
PIEMONTE	6	28	3	2	5	0	
LOMBARDIA	9	28	0	23	4	26	26
TRENTINO	7	25	0	0	0	0	
VENETO	21	110	0	0	9	4	
FRIULI	6	29	0	0	0	1	
E.ROMAGNA	5	56	1	3	7	29	
TOSCANA	17	88	1	2	1	29	
UMBRIA	7	39	0	1	3	0	
MARCHE	11	57	2	0	1	6	1
LAZIO	56	167	0	9	179	94	19
ABRUZZO	25	75	0	4	14	12	2
MOLISE	13	72	1	2	9	5	4
CAMPANIA	46	123	7	67	1	204	6
BASILICATA	7	45	1	5	1	0	
PUGLIA	8	32	0	1	1	1	
CALABRIA	74	178	11	42	0	36	4
SICILIA	17	47	4	2	0	4	
SARDEGNA	0	0	2	0	0	1	
<b>Total</b>	<b>335</b>	<b>1199</b>	<b>33</b>	<b>163</b>	<b>235</b>	<b>452</b>	<b>62</b>

*Monitoraggio sierologico.* L'esecuzione del test sierologico di screening è demandato agli IZZSS territorialmente competenti, quindi il CERVES esegue i test per le regioni Lombardia ed Emilia Romagna, oltre ai test di conferma in Sieroneutralizzazione e di caratterizzazione dell'isotipo IgG e IgM per tutti i campioni dubbi e positivi a livello nazionale. Desto preoccupazione la estesa distribuzione di sieropositività, con circa 250 aziende sieropositive alcune delle quali individuate in regioni non interessate da focolai ed accreditate (es. Sardegna e Puglia).

Quasi il 50% dei test per il monitoraggio sierologico nazionale è stato effettuato dal CERVES per le regioni Lombardia ed Emilia Romagna; la figura seguente illustra la frequenza mensile delle analisi sierologiche (test di screening). Il 30% dei test eseguiti dal CERVES è concentrato in un picco all'inizio del 2008 (gennaio e febbraio) dovuto ai controlli sierologici eseguiti per il riaccreditamento e ripopolamento dell'area più colpita della Lombardia nell'anno precedente; successivamente la frequenza è stata mediamente costante nell'anno. Pur non raggiungendo il massimo picco di analisi del 2007, il numero di sieri esaminati nel 2008 si è avvicinato a 300.000, che corrisponde mediamente a 5 volte l'attività degli anni precedenti il 2006.

Sono stati nella media i test sierologici di conferma in Sieroneutralizzazione e i test addizionali per IgG e IgM, effettuati per caratterizzare i sieri positivi allo screening al fine di stabilire se l'esposizione all'infezione degli animali sieropositivi è recente o pregressa.

*Frequenza dei test sierologici per MVS nel 2008*  
**Test di screening (ELISA competitiva) per la ricerca di anticorpi anti-MVS**  
**271.433 esami**



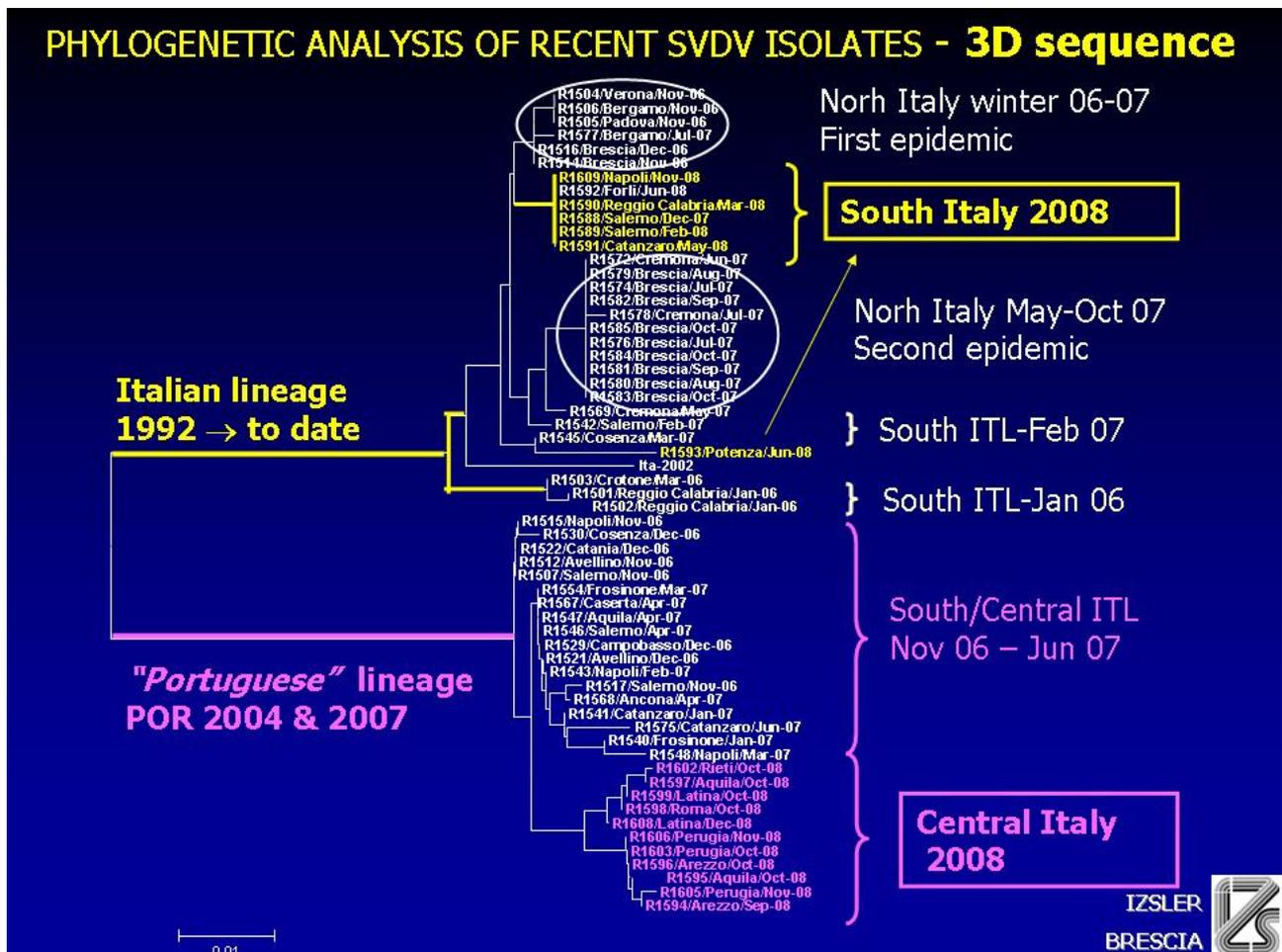
*Analisi filogenetiche.* È da segnalare come avanzamento e miglioramento del servizio diagnostico l'esecuzione sistematica della caratterizzazione genomica tramite sequenziazione di tutti i virus MVS identificati nell'anno. La sequenziazione permette di definire similitudini, uguaglianze, correlazioni tra ceppi sulla base del confronto delle sequenze delle basi nucleotidiche del tratto genomico esaminato, e può essere utilizzata come strumento per l'epidemiologia molecolare.

L'analisi filogenetica dei virus MVS isolati in Italia a partire dal 2006 ad oggi ha messo in evidenza la presenza contemporanea di due sotto-gruppi.

Uno, definito **“linea portoghese”**, comprende un cluster di isolati tra loro geneticamente correlati, isolati da novembre 2006 a giugno 2007 esclusivamente in regioni centro-meridionali. La definizione di **“linea portoghese”** deriva dalla omologia che questi virus hanno con i ceppi identificati in Portogallo nel 2004 e nel 2007. **Questo virus è riemerso come responsabile di tutti i focolai in Italia centrale nell’anno 2008**, pur con minime variazioni genomiche che rendono gli isolati 2008 distinguibili da quelli precedenti.

Tutti gli isolati dell’altro cluster, definito **“linea italiana”**, appartengono ad un gruppo genetico già presente in Italia in anni precedenti (introdotto dall’Olanda nel 1992) e tipicamente evoluto in Italia. Questo gruppo è meno omogeneo del precedente e a sua volta differenziabile in diverse sub-linee, plausibilmente evolute cronologicamente. Appartengono a questo sotto-gruppo tutti gli isolati della prima e seconda ondata epidemica verificatesi nel nord Italia rispettivamente nel periodo temporale novembre 2006-gennaio 2007 e maggio-ottobre 2007, che sono geneticamente correlati ai virus isolati in focolai del Sud fino all’inizio del 2006; nello stesso sottogruppo rientrano anche i virus responsabili di focolai nel 2008 in regioni meridionali (pur appartenendo a questo cluster, il virus isolato nel focolaio di Piperno, Potenza, alla fine di giugno 2008 è distinguibile dagli altri) e il virus isolato nell’azienda di Bertinoro, Forlì in maggio 2008.

L’analisi dei risultati di sequenziazione ha dimostrato come l’epidemiologia molecolare possa essere utilizzata come strumento per rintracciare l’origine delle infezioni, affiancando e spesso integrando l’indagine epidemiologica classica.



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.

### Numero e tipologia di esami diagnostici (ufficiali) richiesti al CERVES nel 2008

MALATTIA	RICERCA	REAZIONI (N°)				TOTALE
<b>AFTA</b>	Esami sierologici	ELISA O (1892)	ELISA A (1976)	ELISA Asia (1892)	ELISA 3ABC ( n.a.)	<b>5760</b>
	Esami virologici	Isol. virale (32)	ELISA (n.a.)	PCR (26)		<b>58</b>
<b>MVS</b>	Esami sierologici	ELISA scr. (271.433)	ELISA IgG (3.016)	ELISA IgM (3.016)		<b>277.465</b>
		Siero Neutralizzazione				<b>3.067</b>
	Esami virologici	Isol. virale (125)	ELISA (60)	PCR (3.068)		<b>3.253</b>
	Esami genomici	Sequenza gene 3D				<b>25</b>
<b>SV</b>	Esami sierologici	Siero Neutralizzazione				<b>236</b>
<b>EMC</b>	Esami sierologici	ELISA				<b>2.200</b>
	Esami virologici	Isol. virale (1)	ELISA (4)	PCR (65)		<b>70</b>

Non sono elencati nell'attività analitica routinaria i test che il CERVES ha eseguito, finalizzati ad escludere la presenza di virus aftosi, MVS ed EMCV in prodotti farmaceutici ad uso umano di origine suina. Nel 2008, sono stati controllati n. 70 lotti.

Oltre all'attività eseguita nell'ambito della Sanità Animale con finalità di diagnostica e/o sorveglianza, viene regolarmente eseguito un esteso numero di esami, che non sono registrati nell'attività routinaria analitica, necessari ad esempio alla preparazione ed esecuzione di ring test nazionali e/o internazionali, a verifiche e controlli di qualità interni, verifica dei batch di produzione dei reagenti in-house, programmi di ricerca e soprattutto allo sviluppo e validazione continua di nuovi saggi diagnostici.

Infine, nell'ambito del servizio diagnostico e del supporto erogato alla FAO, si segnala l'analisi con titolazione di circa 400 sieri, selezionati come sub-set da un più ampio

pannello campionato per sierosorveglianza post-vaccinazione in aree tampone sottoposte a vaccinazione antiaftosa dell'Armenia e Georgia (quelle confinanti con la Turchia), con l'obiettivo di valutare l'immunità vaccinale raggiunta dopo la campagna di vaccinazione primaverile 2008 (programma di vaccinazione finanziato dalla Commissione Europea). I campioni sono stati analizzati con 4 test diversi, in particolare per la determinazione (titolo) di anticorpi specifici per i sierotipi vaccinali O Manisa, A Iran 96, Asia1 e per la proteina non strutturale 3ABC, marker di differenziazione tra animali vaccinati e infetti (DIVA). La collaborazione con FAO ha un rilievo internazionale, oltre ad utili ricadute interne, quali l'accesso a campioni positivi di campo, preziosi ed utili ai fini della validazione continua dei MP, da perseguire anche attraverso l'applicazione e la verifica dei test in situazioni di campo.