



**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 LABORATORY FOR FOOT-AND-MOUTH DISEASE
AND SWINE VESICULAR DISEASE**

Relazione sulle attività dell'anno 2009

Relazione sulle attività dell'anno 2010

Decreto 2 Novembre 1991

ATTIVITA' SVOLTA NEL 2009 e 2010**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.

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	20	60
Isolamento	Isolamento in colture cell.	Virologico Lab P3	Si	Cod	6 giorni	8	20	60
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 [#]	Si	Si	6 ore	1	3000	15000
NSP-ELISA DIVA	3ABC-ELISA (pan-FMD)	Sierologico Lab P2/P3 [#]	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 Agenti ad alta diffusione e Biotecnologie diagnostiche (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 Genomica per il sequenziamento di parti genomiche dei virus MVS e Afta per analisi filogenetiche.

1) Standardizzazione e validazione di metodiche diagnostiche

I Metodi di Prova (MP) adottati dal CERVES seguono, ove esistenti, i riferimenti normativi specifici, pur con le varianti metodologiche migliorative valutate nel corso del loro sviluppo/applicazione. Nei metodi 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. Questa peculiarità conferisce valore aggiunto ai MP sviluppati dal CERVES in termini di standardizzazione e innovazione.

In ambito MVS, due MP sviluppati dal CERVES sono riconosciuti come test di riferimento nel manuale OIE: in particolare si tratta del test sierologico ELISA competitiva basato sull'anticorpo monoclonale 5B7, e del test per la dimostrazione del virus tramite RT-PCR.

Obiettivi di Qualità raggiunti negli anni 2009-2010 sono stati:

- Portare a termine la codifica di tutti i MP ufficiali per Afta, MVS, SV e EMC utilizzati dal Centro di Referenza, attraverso la stesura dei MP e dei relativi report di validazione, verifica della documentazione correlata (istruzioni operative, fogli di lavoro, carte di controllo, ...);
- Continuare il processo di accreditamento dei MP ufficiali del Centro, completando nel 2010 le attività per l'inoltro della domanda di accreditamento di ulteriori tre MP:
 - ✓ MP 09/050 → RT-PCR per dimostrazione di segmenti genomici di virus Aftosi
 - ✓ MP 05/020 → ELISA virologica per identificazione di virus aftosi
 - ✓ MP 05/019 → ELISA virologica per identificazione del virus MVS

Tra le attività contemplate sono incluse la programmazione ed esecuzione delle prove analitiche per la valutazione di ripetibilità e riproducibilità (accordanza e concordanza), richieste per la validazione di MP normati. Oltre a ciò, si è ritenuto opportuno riconfermare e documentare le performance (già acquisite in precedenti studi) di sensibilità e specificità analitica.

Relativamente al MP 05/020 (ELISA virologica per identificazione di virus aftosi), è stato effettuato in collaborazione con lo World Reference Laboratory un importante e strategico lavoro sperimentale per lo sviluppo e validazione di un kit pronto-uso capace di identificare pressoché tutti i virus aftosi circolanti e storici dei quattro sierotipi O, A, C, Asia 1. I risultati, recentemente presentati alla FMD Week 2010 "New Tools and Challenges for FMD progressive control", svoltosi a Vienna, 27 settembre-1 ottobre c.a., hanno permesso di migliorare il test ELISA utilizzato nel MP, attraverso la selezione di anticorpi monoclonali diagnostici con range di reattività intra-tipo più esteso e attraverso la validazione su 300 campioni clinici positivi da tutto il mondo, rappresentativi della grande variabilità genetica e antigenica all'interno di ciascun sierotipo. Sulla base dei risultati ottenuti, che faranno parte del report di validazione, il documento correlato al MP sarà sottoposto a revisione prima dell'inoltro della domanda di accreditamento.

Inoltre, particolare attenzione è stata dedicata ai controlli interni di reazione, che sono stati allestiti, calibrati e gestiti in qualità.

Con riferimento alla diagnosi virologica di MVS, durante il 2009 la variante “one-step RT-PCR” precedentemente validata tramite confronto con il test “two-step RT-PCR” descritto nel Manuale OIE, è stata utilizzata in sostituzione della procedura due-step per l’analisi routinaria di 2460 omogenati di feci esaminati nell’ambito del piano Nazionale di sorveglianza della MVS. La sensibilità analitica del test one-step è stata sperimentalmente dimostrata essere 1 log₁₀ più sensibile della procedura due-step, lasciando invariate le performance di specificità.

TUTTI i Metodi di Prova utilizzati dal CERVES sono 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.

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. Pertanto, l’attività per l’aggiornamento e lo sviluppo o la validazione di nuovi test diagnostici rappresenta una costante per il CERVES. Tra le attività di R&S di nuove metodiche intraprese/eseuite nel 2009-2010 con rilevanti outcome sono da annoverare:

- lo sviluppo e validazione di un kit stabilizzato e pronto-uso per la identificazione e tipizzazione di quattro sierotipi aftosi O, A, C, Asia1, in campioni clinici. Questo kit rappresenta il primo esemplare di test ELISA rapido e semplificato, pensato per un utilizzo anche in paesi endemici con laboratori scarsamente attrezzati, per la diagnosi di afta;
- la estensiva valutazione delle performance diagnostiche di metodiche di amplificazione genomica per la dimostrazione di virus MVS, descritte in letteratura ma non validate in campo. Si tratta di un test rapido, denominato LAMP (Loop mediated isothermal amplification) e dei test RT-PCR RealTime eseguiti con due set di primer/sonda.

I risultati dei suddetti studi sono stati divulgati in Congressi internazionali e saranno oggetto di pubblicazioni in preparazione.

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 Agenti ad alta diffusione e Biotecnologie diagnostiche 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.

Negli anni 2009-2010, per l'esecuzione del 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, il CERVES ha prodotto e distribuito agli IIZZSS territorialmente competenti il volume di kit necessario per l'esecuzione del numero di test registrato nell'annessa tabella.

Kit per screening MVS distribuiti	Kit distribuiti per N. test		
	2009	2010 10 mesi	totale
IZS PLV, TORINO	30000	25000	55000
IZS VE, PADOVA	30000	20000	50000
IZS LT, ROMA	20000	33000	53000
IZS UM, PERUGIA	38000	21000	59000
IZS AM, TERAMO	35000	40000	75000
IZS PB, FOGGIA	13000	16000	29000
IZS ME, NAPOLI	30000	35000	65000
IZS CATANZARO	38000	32000	70000
IZS SI, PALERMO	23000	15000	38000
IZS SA, SASSARI	41000	40000	81000
Totale	298.000	277.000	575.000
IZSLER, BRESCIA (test effettivi)	150.000	90.000	240000
Totale complessivo	448.000	367.000	815.000

Il volume totale di kit distribuiti agli IIZZSS nel 2009 è in linea con l'anno precedente (equivalente a 298.000 analisi nel 2009 e 289.000 analisi nel 2008), essendo rimasto invariato il Piano di sorveglianza nazionale implementato nel 2008. E parimenti il trend del 2010 ricalca quello degli anni precedenti, sia nel totale distribuito che nel dettaglio per singoli IIZZSS. A questi sono da aggiungere i kit utilizzati presso il CERVES, per l'esecuzione di circa 150.000 test ELISA nel 2009 e 90.000 nel periodo gennaio-15 novembre 2010, eseguiti per l'attività di sorveglianza nelle due regioni di competenza IZSLER (Lombardia-Emilia Romagna) oltre che per i test di conferma.

Il **valore commerciale** di kit sierologici per 815.000 determinazioni MVS corrisponde a **1.059.500 Euro** (mediamente più di 500.000 euro/anno), adottando un costo stimato di vendita/acquisto di 1,3 Euro/test (desunto dal costo di vendita dell'unico kit commerciale esistente).

Nell'ambito delle funzioni come Laboratorio di referenza OIE per la MVS, il Centro ha fornito negli anni 2009-2010 kit per la diagnosi sierologia di Malattia Vescicolare del Suino anche a Estonia, Polonia, Canada, Cipro.

Inoltre, sono stati forniti al LNR dell'Olanda 25 campioni di campo virologicamente positivi originati in diversi anni (omogenati di feci), come materiali di riferimento per la validazione interna del test PCR; 32 ceppi di MVS isolati da focolai diagnosticati nel 2007-2008 sono stati trasferiti all'IAH di Pirbright, UK, nell'ambito del suo ruolo di Community Reference Laboratory.

Di particolare **innovazione** ed interesse scientifico è stata la produzione e distribuzione di **kit pronto-uso, prototipi per diagnosi sierologica e virologica di AFTA** sia in ambito di cooperazione internazionale (progetti FAO) che di ricerca collaborativa. Rientrano in questi ambiti le produzioni/forniture di seguito elencate.

Progetto FAO GTFS/INT/907/ITA:

- kit diagnostici stabilizzati per la ricerca di anticorpi anti-NSP (test DIVA) tramite 3ABC-trapping ELISA (svilupata dal CERVES ed internazionalmente validata) per l'analisi di 30.000 sieri, suddivisi in 6.000 per ciascuno dei cinque paesi asiatici: Afghanistan, Pakistan, Azerbaijan, Georgia, Armenia
- kit diagnostici stabilizzati per la diagnosi e tipizzazione di virus aftosi in campioni clinici (tramite ELISA sandwich basata su anticorpi monoclonali) sufficienti per l'analisi di 100 campioni per ciascuno dei cinque paesi sopraelencati (500 diagnosi in totale).

Collaborazione con WRL, Pirbright:

- kit diagnostici stabilizzati per la ricerca di anticorpi anti-NSP (test DIVA) tramite 3ABC-trapping, per l'analisi di 5.000 campioni (100 piastre ELISA), finalizzata alla validazione su sieri di bufali e confronto con il miglior kit commerciale;
- kit diagnostici stabilizzati per la diagnosi e tipizzazione di quattro sierotipi aftosi (O, A, Asia 1, C) in oltre 300 campioni clinici (45 piastre ELISA nel 2009, 70 piastre ELISA nel 2010), finalizzati alla validazione con campioni clinici di campo, rappresentativi della variabilità genetica ed antigenica dei virus aftosi;
- kit diagnostici stabilizzati per la ricerca di anticorpi tipo specifici (sierotipi O e Asia 1) tramite ELISA competitiva (75 piastre ELISA per ciascun tipo), finalizzati alla verifica dei prototipi sviluppati dal CERVES.

Altro:

- fornitura di kit diagnostici stabilizzati per la diagnosi e tipizzazione di virus aftosi in campioni clinici (15 piastre ELISA) in Israele, per consulenza e collaborazione scientifica.

Inoltre è stata costante la fornitura, su richiesta, di anticorpi monoclonali a vari Partner Europei e non, conseguente alla leadership riconosciuta internazionalmente in questo ambito scientifico.

3) Attività analitica routinaria

Poiché gli anni 2009-2010 sono stati caratterizzati da assenza di ondate epidemiche di rilievo per MVS e da assenza di allerta per afta, il volume di attività diagnostica “routinaria” eseguito dal CERVES è rimasto nello standard dettato prevalentemente dall’attuazione del Piano Nazionale di sorveglianza della MVS.

Nelle tabelle successive si riportano, suddivisi per le principali tipologie di test, i dati dell’attività analitica **routinaria (intesa come test su campioni ufficiali)**, mentre sarà trattata a parte l’attività analitica in convenzione e quella eseguita per cooperazione internazionale nell’ambito di progetti FAO/EUFMD.

Numero e tipologia di esami diagnostici (ufficiali) eseguiti al CERVES nel 2009

MALATTIA	RICERCA	REAZIONI (N°)				TOTALE
AFTA	Esami sierologici	ELISA O (1219)	ELISA A (1219)	ELISA Asia (1219)	ELISA 3ABC (n.a.)	3657
	Esami virologici	Isol. virale (2)	ELISA (n.a.)	PCR (3)		5
MVS	Esami ^{a)} sierologici	ELISA scr. (146.482)	ELISA IgG (3.012)	ELISA IgM (3.012)		152.506
		Siero Neutralizzazione				1.762
	Esami ^{b)} virologici	Isol. Virale (285)	ELISA (315)	PCR (2.570)		3170
	Esami genomici	Sequenza gene 3D				10
SV	Esami sierologici	Siero Neutralizzazione				390
EMC	Esami sierologici	ELISA				2.724
	Esami virologici	Isol. virale	ELISA	PCR		78

a): includono test eseguiti per monitoraggio infezioni sperimentali (circa 1400 per ciascuna tipologia di test ELISA)

b): includono test eseguiti per monitoraggio infezioni sperimentali (circa 200 per ciascuna tipologia di test)

**Numero e tipologia di esami diagnostici (ufficiali) eseguiti al CERVES nel 2010
(1 gennaio- 15 novembre)**

MALATTIA	RICERCA	REAZIONI (N°)				TOTALE
AFTA	Esami sierologici	ELISA O (1568)	ELISA A (1568)	ELISA Asia (1568)	Altro ^{a)} (157)	4.861
	Esami virologici	Isol. virale (3)	ELISA (n.a.)	PCR (3)		6
MVS	Esami sierologici	ELISA scr. (87.684)	ELISA IgG (1.407)	ELISA IgM (1.407)		90.498
		Siero Neutralizzazione				785
	Esami virologici	Isol. Virale (19)	ELISA (10)	PCR (2.397)		2.426
	Esami genomici	Sequenza gene 3D				3
SV	Esami sierologici	Siero Neutralizzazione				785
EMC	Esami sierologici	ELISA				1.560
	Esami virologici	Isol. virale	ELISA	PCR		57

a): la voce altro include test sierologici per sierotipi SAT, test DIVA, Sieroneutralizzazioni

Interessante la segnalazione della persistenza del virus della encefalomiocardite (EMC). L'attività diagnostica sui campioni suini esaminati ha individuato il virus ECM come causa della malattia in 16 casi su 78 sospetti conferiti alla sezione diagnostica di Brescia nel 2009 e su 19 casi su 57 sospetti conferiti nei primi dieci mesi del 2010. Il riscontro di sieropositività confermato attraverso il monitoraggio sierologico per EMCV su cinghiali catturati ha confermato la circolazione del cardiovirus anche in specie selvatiche.

Poiché la parte preponderante dell'attività analitica riguarda il Piano di sorveglianza ed eradicazione della MVS, di seguito vengono riportati dati di carattere epidemiologico ed analitici relativi alla attività/situazione estesi a livello nazionale.

Situazione epidemiologica MVS. Negli anni 2009-2010 è continuata l'esecuzione del Piano di sorveglianza implementato nel 2008. Il numero di focolai accertati così come il numero di aziende sieropositive rilevato è sensibilmente diminuito rispetto al 2008, e con l'eccezione di sporadici casi in regioni precedentemente accreditate, sono stati tutti confinati in regioni meridionali che non hanno raggiunto l'accreditamento.

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 identificati 18 focolai di MVS nel 2009 e solo 4 da gennaio a novembre 2010, distribuiti per

tipologia di aziende interessate, cronologia e geografia come illustrato nella tabella che segue.

Focolai di MVS registrati negli anni 2009 e 2010

Anno 2009						
Regione	Ingrasso	Riproduz.	St. sosta	Altro	N. focolai	N. animali
CALABRIA	7	2	2	1	12	619
CAMPANIA	1		1		2	508
LAZIO	2				2	37
UMBRIA	1				1	286
SICILIA			1		1	146
TOTALE	11	2	4	1	18	1596
Anno 2010						
SICILIA		1				7
CAMPANIA	1		1			25
LAZIO		1				28
TOTALE	1	2	1		4	60

La maggior parte dei focolai registrati in Calabria nel 2009 (9 su 12) sono secondari, identificati in seguito ad indagini di rintraccio, mentre è rimasta sconosciuta l'origine dei focolai (primari) negli altri casi.

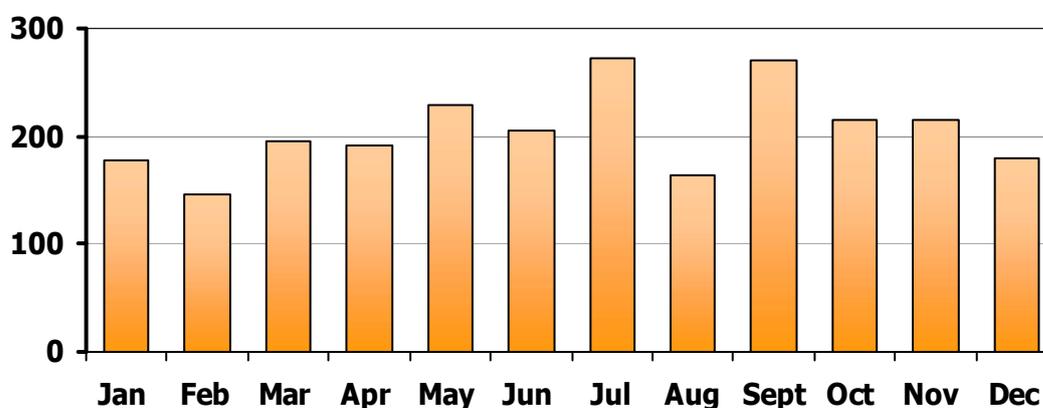
Test virologici MVS. Dal punto di vista del volume diagnostico, i test virologici in PCR, effettuati dal CERVES per l'intero territorio nazionale hanno mantenuto il trend degli anni precedenti (circa 3.000 campioni/anno).

I grafici seguenti illustrano la frequenza mensile del test di screening virologico per MVS, suddiviso negli anni 2009 (completa) e 2010 (parziale).

*Frequenza dei **test virologici per MVS** nel 2009*

*Test di screening (**PCR**) per la ricerca del virus*

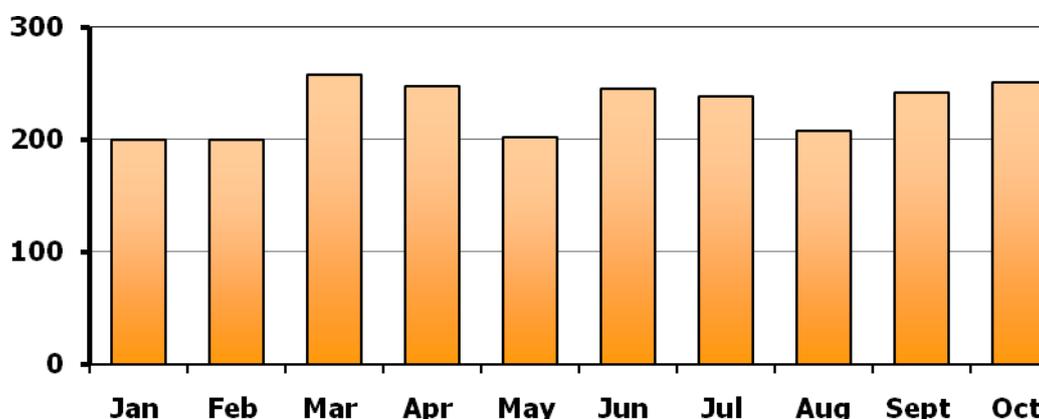
2.457 test (solo ufficiali)



*Frequenza dei **test virologici per MVS** nel 2010*

*Test di screening (**PCR**) per la ricerca del virus*

2.289 test al 31 Ott. 2010 (solo ufficiali)



La tabella seguente estende il dettaglio dei controlli virologici eseguiti nel 2009, dividendoli per regione, motivo del prelievo e identificandone il risultato (non viene fornito analogo dettaglio per l'anno 2010 essendo l'attività in itinere).

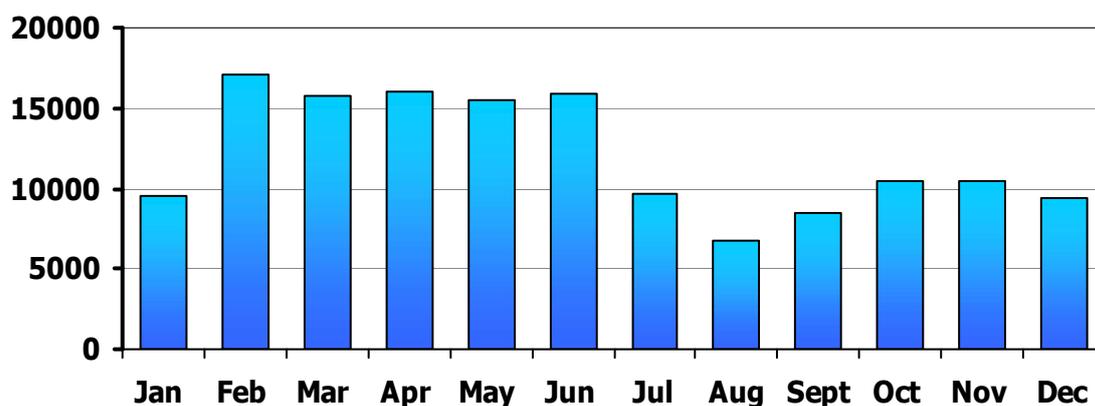
Controlli virologici per MVS eseguiti nel 2009

REGIONE	Stalle sosta	IMPORT	Controlli in Az. sieropositive	Correlaz. Epidem con focolai	controlli in aziende accreditate	vari	Conferimenti POSITIVI
Nord Est	87	7			24	4	
PIEMONTE	19	3	1	2	1	2	
LOMBARDIA	10	1			120	73	
EMILIA R.	4	2	4	2	27	21	
TOSCANA	36	7	4	2	56	3	
MARCHE	24	6	2		48	13	
UMBRIA	27	2	10		56	18	1
LAZIO	50	1	8	9	108	31	2
ABRUZZO	38	1	5	2	169	22	
MOLISE	23	4	7	1	141	13	
CAMPANIA	79	3	42	6	402	56	2
BASILICATA	25	1	2		20	23	
PUGLIA	16		3		20	4	
CALABRIA	58	27	43	8	131	36	4
SICILIA	50	6	1	1	10	19	1
SARDEGNA		2	2				
TOTALE	546	73	134	33	1333	338	10

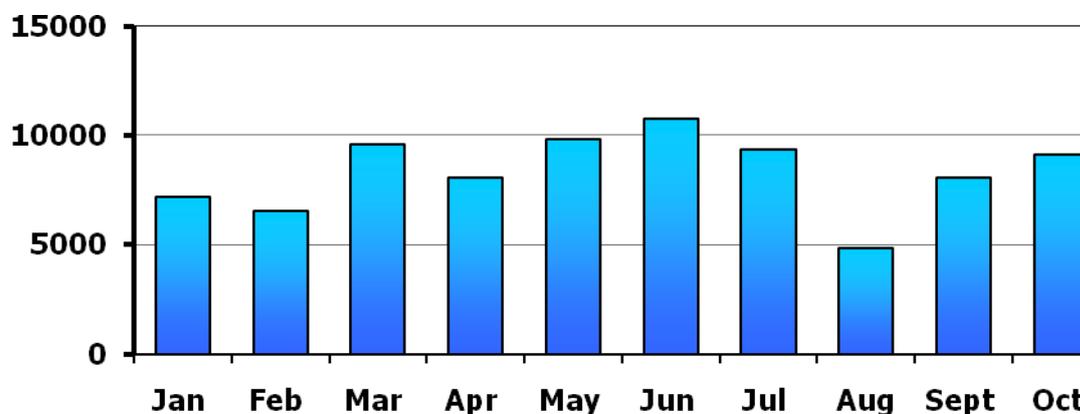
Monitoraggio sierologico. Nelle tabelle annesse è descritta la frequenza mensile dei test sierologici di screening eseguiti presso il CERVES, relativi alla sorveglianza in Lombardia

ed Emilia Romagna, territori di competenza dell'IZSLER. Il volume di attività è stato costante intorno a 15.000 test/mese nel primo semestre del 2009 e si è poi stabilizzato intorno a 10.000 test/mese nel secondo semestre, con lievi flessioni nel 2010.

*Frequenza dei test sierologici per MVS nel 2009 presso il CERVES
Test di screening (ELISA competitiva) per la ricerca di anticorpi anti-MVS*



*Frequenza dei test sierologici per MVS nel periodo gennaio-ottobre 2010 presso il CERVES
Test di screening (ELISA competitiva) per la ricerca di anticorpi anti-MVS*



Relativamente al dato nazionale, nel 2009 sono state esaminate circa 15.000 aziende per oltre 420.000 capi, con un riscontro di sieropositività dovuta ad infezione in atto o pregressa in 175 aziende (rispetto a 233 nel 2008), prevalentemente concentrate nelle due regioni non accreditate, Campania e Calabria, mentre l'individuazione di poche aziende sieropositive in Lazio e Umbria è connessa al riscontro dei 3 focolai in queste regioni. Non viene fornito analogo dettaglio per l'anno 2010 essendo l'attività in itinere e le registrazioni da parte degli IZZSS competenti tuttora in corso.

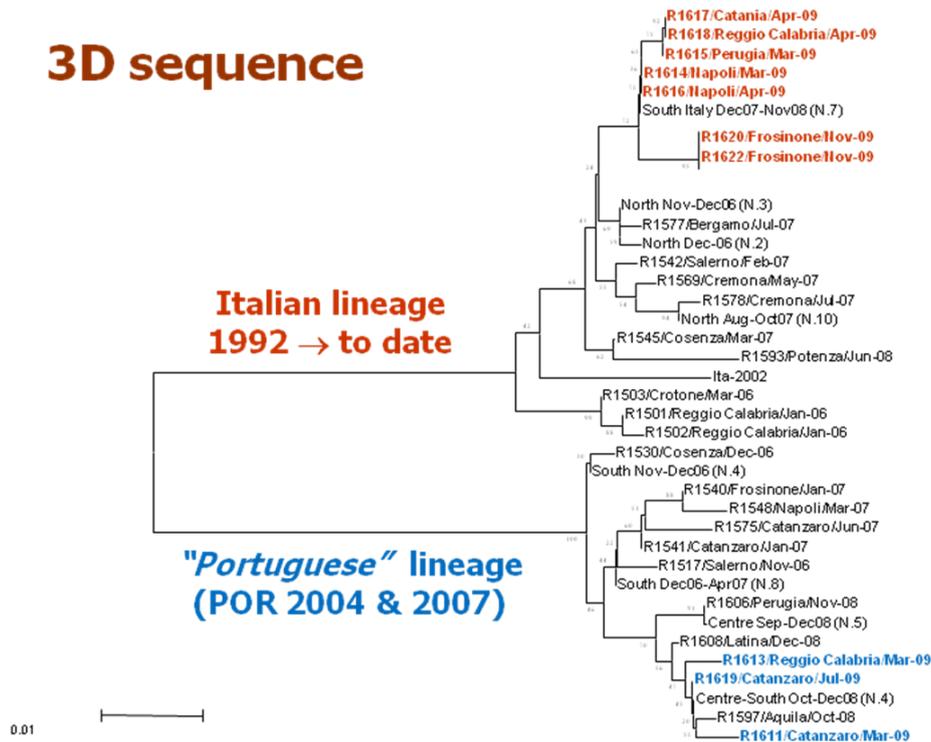
Risultati del monitoraggio sierologico per MVS nel 2009

REGIONI	N° suini esaminati	N° aziende esaminate	N° aziende sieropos.	
Nord Est	30002	740		
Nord Ovest	20889	555		
LOMBARDIA	113460	2011		
EMILIA R.	31521	578		
TOSCANA	12864	1033	2	IgG
MARCHE	8587	552		
UMBRIA	46015	702	3	2 IgG - 1 IgG/IgM
LAZIO	21773	311	10	6 IgG - 3 IgG/IgM - 1 IgM
ABRUZZO	21477	1046		
MOLISE	7940	347		
CAMPANIA	41388	1617	40	38 IgG - 1 IgG/IgM - 1 IgM
BASILICATA	6969	305		
PUGLIA	1297	76	2	IgG
CALABRIA	23860	1266	117	111 IgG - 3 IgG/IgM - 3 IgM
SICILIA	9800	1112		
SARDEGNA	22629	2262	1	IgG
TOTALE	420471	14513	175	

Analisi filogenetiche. E' continuata l'esecuzione sistematica della caratterizzazione genomica tramite sequenziazione di tutti i nuovi virus MVS identificati. 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 affiancando ed integrando gli outcome delle indagini epidemiologiche convenzionali. L'albero filogenetico allegato porta in evidenza (colore rosso e blu) il posizionamento dei ceppi individuati nel 2009 rispetto ai virus identificati negli anni precedenti: è confermata la presenza simultanea delle due sub-linee genomiche, definite rispettivamente "italiana" perché tipicamente evoluta in Italia dagli isolati del 1992, e "portoghese" perché derivata da una prima introduzione nel 2004 di un ceppo precedentemente riscontrato in Portogallo. È interessante il rilievo che i due ceppi responsabili dei due focolai in provincia di Perugia, rispettivamente in novembre 2008 e marzo 2009, appartengono alle due sub-linee genomiche diverse, indicando che i due eventi non sono correlati.

La situazione è mantenuta nel 2010: infatti il virus MVS identificato in Sicilia appartiene alla linea portoghese (diversamente dal virus isolato nel focolaio di Catania l'anno precedente, in aprile 2009) ed è quindi correlato epidemiologicamente ai focolai calabresi del 2009, mentre il ceppo responsabile del focolaio campano in febbraio appartiene alla linea italiana ed è quindi da ritenersi epidemiologicamente correlato ai focolai campani del 2009.

Analisi filogenetica, basata sulla sequenza del gene 3D, di ceppi di MVS isolati in focolai italiani in anni recenti (2006-2009)



Attività analitica non routinaria

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.

Non sono altresì elencati nell'attività analitica routinaria analisi particolari, eseguite per privati, con finalità non diagnostiche ma di controllo su prodotti destinati a specifici usi. Rientrano in queste attività:

- i test finalizzati ad escludere la presenza di virus AFTA, MVS ed EMCV in prodotti farmaceutici ad uso umano di origine suina. Nel 2009, sono stati controllati n. 61 lotti e da gennaio a ottobre 2010 n. 70 lotti, ciascuno con test RT-PCR per i tre agenti indicati;
- i test impostati *ad hoc* per la verifica dell'attività virucida sul virus MVS di disinfettanti. Tali test sono impostati conformemente alla norma di riferimento UNI EN 14675 2006; due nuovi prodotti sono stati valutati nel 2009 e uno nel 2010.

Infine, sempre intensa come da alcuni anni ad oggi è stata, nell'ambito del supporto diagnostico alla **FAO** e alla **EUFGMD**, l'attività diagnostica per afta erogata anche nella funzione di Centro di Referenza FAO.

In svariati paesi dell'Asia centrale e dell'Africa sono in atto programmi di vaccinazione e sierosorveglianza, parzialmente finanziati da FAO e/o EUFGMD. Al CERVES è stato chiesto il supporto tecnico-diagnostico per l'analisi degli anticorpi anti-aftosi, con l'obiettivo di valutare l'immunità vaccinale e l'eventuale circolazione di virus aftosi. Ognuno dei campioni ricevuti è stato analizzato con 4 test diversi, in particolare per la determinazione del titolo di anticorpi specifici per i sierotipi vaccinali O Manisa, A22 Iraq e/o A Iran96, Asia 1 e per la proteina non strutturale 3ABC, marker di differenziazione tra animali vaccinati e infetti (DIVA). Il volume di attività diagnostica erogato negli anni 2009 e 2010 per cooperazione internazionale ha compreso l'esame con le modalità sopra accennate e l'elaborazione dei risultati dei campioni di seguito descritti.

Anno 2009:

- 1.100 sieri dall'Armenia, per un totale di $1,100 \times 4$ test/titolazioni = 4.400 test
- 3.227 steri dalla Georgia, per un totale di 3.227×4 test/titolazioni = 12.908 test
- 318 sieri dall'Iran, corrispondenti a 52 bovini vaccinati e rivaccinati sperimentalmente con vaccini trivalenti O,A,Asia1 e prelevati sequenzialmente per 6 volte, per un totale di 318×4 test/titolazioni = 1.272 test

Anno 2010:

- 715 sieri dall'Azerbaijan, per un totale di 715×4 test/titolazioni = 2.860 test
- 629 sieri dall'Afghanistan, per un totale di 629×4 test/titolazioni = 2.516 test
- 480 sieri dal Tajikistan, per un totale di 480×4 test/titolazioni = 1.920 test
- 720 sieri dal Pakistan, per un totale di 720×4 test/titolazioni = 2.880 test
- 800 sieri dal Ciad, per un totale di 800×4 test/titolazioni = 3.200 test

Tutti i test applicati, per un totale di analisi di **18.652 nel 2009 e 13.376 nel 2010**, corrispondono a test in-house sviluppati dal CERVES.

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.