



**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 annuale 2011

Periodo di riferimento 01/11/2010 – 31/10/2011

Decreto 2 Novembre 1991

ATTIVITA' SVOLTA

Attività diagnostica

Tutte le prove diagnostiche basate su metodiche/kit ELISA 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.

Benché non utilizzate in modo routinario, sono da annoverare anche le metodiche di amplificazione genomica RT-LAMP per il virus MVS e Real Time RT-PCR per i virus Afta e MVS (entrambe eseguita con due set di primer/sonda). Questi test sono stati validati e implementati presso il CERVES, che mantiene la pronta capacità di introdurli in uso corrente in caso di necessità, attraverso il loro uso saltuario per particolari applicazioni e per ricerca.

Inoltre, il CERVES si avvale del Reparto di Genomica per il sequenziamento di parti genomiche dei virus MVS e Afta finalizzato ad analisi filogenetiche.

1) Standardizzazione e validazione di metodiche diagnostiche

I Metodi di Prova (MP) adottati dal CERVES seguono, ove esistenti, i riferimenti normativi specifici.

Tuttavia, il CERVES ha acquisito nell'arco di numerosi anni una esperienza riconosciuta internazionalmente nello sviluppo e validazione di metodi diagnostici innovativi per la identificazione di antigeni e anticorpi dei virus aftosi, basati su metodologie ELISA; l'innovazione e l'apporto migliorativo in termini di standardizzazione 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.

Anche il Manuale OIE riconosce come valide le variazioni metodologiche che contemplano l'uso di anticorpi monoclonali, quindi i test in uso presso il CERVES non deviano rispetto ai riferimenti normativi. Al contrario, 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.

Questa attività di sviluppo di nuovi test diagnostici, associata alla acquisita competenza nella stabilizzazione dei reagenti e trasformazione di test in-house in kit confezionati pronto-uso, ha recentemente portato alla capacità di produrre e distribuire a livello internazionale, nell'ambito di progetti EUFMD e FAO, tre kit strategici:

- FMDV 3ABC-trapping ELISA per anticorpi anti-NSP (test DIVA)
- FMDV solid-phase competitive ELISA per Ac sierotipo O-specifici
- FMDV detection and serotyping, per la diagnosi e sierotipizzazione virale in campioni clinici

I suddetti prodotti, distribuiti col marchio italiano in numerosi paesi (Turchia, Egitto, Israele, India, Armenia, Azerbaijan, Georgia, Iran, Pakistan, Afghanistan, Tajikistan,

Turkmenistan, Uzbekistan), dove sono stati molto apprezzati grazie alle performance diagnostiche e all'enorme semplificazione rispetto ai test sino ad ora disponibili, hanno portato grande visibilità internazionale per l'Istituto e per la nazione.

Non solo, anche grazie ai progetti FAO che ne hanno supportato la distribuzione, è stata prontamente riconosciuta e diagnosticata la nuova, preoccupante variante aftosa del sierotipo Asia 1, che si è diffusa in gran parte dei paesi medio-orientali e dell'Asia centrale. Altri esempi di segnali delle positive ricadute connesse alla disponibilità ed utilizzo dei kit diagnostici italiani sono la recente notifica all'OIE di focolaio di afta (sierotipo Asia1) in Tajikistan (prima segnalazione dopo il 2003) e l'invio al Laboratorio Mondiale di Riferenza (WRL, UK) di materiale per ulteriori caratterizzazioni derivato da decine di casi diagnosticati in Pakistan e Afghanistan. Conseguentemente, i kit prodotti dal CERVES contribuiscono all'implementazione del Programma a lungo termine patrocinato da OIE e FAO per il controllo globale dell'afta denominato *Progressive Control Pathway (PCP)*.

Sempre nell'ambito di nuovi sviluppi, nel corso del 2011:

- a. È stato prodotto in collaborazione con WRL e la ditta SVANOVA un nuovo penside test (test rapido eseguibile in campo, basato sulla metodologia Lateral Flow Chromatography) per la diagnosi e tipizzazione del sierotipo Asia 1, creato con anticorpi monoclonali prodotti e forniti dal CERVES. Su richiesta della EUFMD il nuovo dispositivo diagnostico, previa validazione con campioni clinici di collezione, è stato messo a disposizione della Turchia ed è presente in FAO per forniture in emergenza e training.
- b. È stato intrapreso lo studio per lo sviluppo di un nuovo test Real Time PCR per la dimostrazione di virus MVS, in grado di identificare con pari efficienza le diverse varianti genomiche attualmente presenti sul territorio nazionale. Questa necessità è emersa in seguito ai risultati di un precedente studio, finalizzato alla valutazione delle performance diagnostiche di metodiche di amplificazione genomica del virus MVS (LAMP e RealTime PCR), descritte in letteratura ma non validate in campo. Lo studio ha dimostrato che solo il test one-step RT-PCR convenzionale, sviluppato e in uso presso il CERVES, possiede questa capacità fondamentale, pertanto per disporre di un test Real Time PCR più idoneo ad una scala medio-grande di attività diagnostica e più pratico tecnicamente è necessario disegnare e sperimentare nuovi alternativi set di primer/sonda in regioni meno variabili del genoma virale.
- c. È stata implementata la metodica RealTime PCR per la diagnosi di afta applicando la procedura consigliata e validata dallo EU/WRL.

In ambito di Qualità, il CERVES ha perseguito il programma pluriennale avente come obiettivo finale la codifica, validazione ed accreditamento di tutti i MP utilizzati dai centri di riferimento. Obiettivo di Qualità raggiunto nel periodo di riferimento è stato l'accreditamento di ulteriori tre MMPP con stesura dei relativi report di validazione:

- ✓ 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

Si confermano le informazioni ricordate anche nelle precedenti relazioni:

- 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.

2) Produzione e distribuzione di reagenti

Oltre ai reagenti e kit distribuiti all'esterno e dettagliati successivamente, vanno annoverati anche tutti i reagenti diagnostici utilizzati per l'attività analitica routinaria del CERVES (anticorpi monoclonali e policlonali, coniugati, antigeni inattivati e/o ricombinanti, matrici virali) che sono di produzione interna e il cui volume è specificato nel capitolo successivo.

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 IZZSS territorialmente competenti reagenti/kit in volume idoneo per l'esecuzione di 394.500 test, a cui si aggiungono quelli utilizzati presso il CERVES, per l'esecuzione di circa 100.000 test ELISA eseguiti per l'attività di sorveglianza nelle due regioni di competenza IZSLER (Lombardia-Emilia Romagna).

Il totale raggiunge una produzione complessiva per **circa 500.000 test**, mantenendo il trend dei due anni precedenti. I materiali sono da sempre **distribuiti gratuitamente agli IZZSS** da parte del CERVES sul quale aggravano anche le spese di spedizione. Utilizzando come stima il costo di listino dei medesimi reagenti adottato dall'Istituto per forniture extra-nazione, corrispondente a 0,76 Euro/test, il **valore di questa produzione è quantificato in € 380.000**. Utilizzando invece il costo medio dei kit sierologici commerciali (€ 1,3/test), il **valore commerciale** dei prodotti distribuiti salirebbe a **€ 650.000**.

**Numero di Kit per screening MVS distribuiti agli IIZZSS
periodo 01 Ottobre 2010-Novembre 2011**

	Kit distribuiti per N. test
IZS PLV, TORINO	37500
IZS VE, PADOVA	25000
IZS LT, ROMA	55000
IZS UM, PERUGIA	30000
IZS AM, TERAMO	25000
IZS AM, LANCIANO	50000
IZS PB, FOGGIA	16000
IZS ME, NAPOLI	50000
IZS CATANZARO	36000
IZS SI, PALERMO	25000
IZS SA, SASSARI	45000
Totale	394.500
IZSLER, BRESCIA (<i>test effettivi</i>)	102.747
Totale complessivo	497.247

Nell'ambito delle funzioni come Laboratorio di referenza OIE per la MVS, il Centro ha fornito nel periodo di riferimento reagenti per la diagnosi sierologia di Malattia Vescicolare del Suino anche a Paesi che si approvvigionano regolarmente, in particolare Polonia, Canada, Belgio, o che ne hanno fatto richiesta per la prima volta come la Russia.

Si è consolidata nel 2011 la produzione e distribuzione di **kit pronto-uso** per **diagnosi sierologica e virologica di AFTA** sia nell'ambito di ricerche collaborative che di cooperazione internazionale (progetti FAO/EUFMD). Nell'ambito delle funzioni come Centro di Referenza FAO, il CERVES si è infatti aggiudicato sulla base di qualità e costi dei servizi erogati un contratto biennale stipulato con FAO per un pannello di servizi comprendenti attività diagnostica, training e fornitura di dispositivi diagnostici, mentre attraverso Letter of agreement è stato sottoscritto un accordo con FAO per simili prestazioni in cinque paesi beneficiari dell'Asia centrale.

Rientrano in questi ambiti le produzioni/forniture di seguito elencate.

*Kit diagnostici afta PRONTO-USO sviluppati e prodotti presso il Reparto
Forniture nell'ambito di CONTRATTI – FAO/EUFMD
Distribuzione per validazione esterna e ring test nazionale*

Riferimento contratto/attività	Destinazione	Tipologia Kit		
		FMDV Antigen detection ELISA (virologico)	FMDV 3ABC-trapping ELISA (sierologico-DIVA)	FMDV serotype O SP-Antibody ELISA
Progetto EUFMD	Egitto	50 piastre	//	//
	Kenia	25 piastre (training/dimostrazione)	10 piastre (training/dimostrazione)	//
	Tunisia	5 piastre	80 piastre	//
	Armenia	50 piastre	90 piastre	20 piastre
	Iran*	235 piastre*	340 piastre*	40 piastre
	Georgia	50 piastre	90 piastre	20 piastre
	Azerbaijan	50 piastre	90 piastre	20 piastre
Progetto FAO	Pakistan	25 piastre	125 piastre	//
	Afghanistan	25 piastre	125 piastre	//
	Tajikistan	25 piastre	20 piastre	//
	Turkmenistan	//	30 piastre	//
	Uzbekistan	//	40 piastre	//
Validazione esterna	WRL-UK	130 piastre	//	//
	Israele	15 piastre	//	//
	Turchia	15 piastre	//	//
	India	15 piastre	//	//
Ring test Nazionale	IIZZSS	//	40 piastre	40 piastre
Totale		710	1080	140

Il materiale è stato organizzato in kit di cinque piastre ciascuno, completati con tutte le soluzioni e reattivi chimici e immunologici necessari all'esecuzione, e corredati di brochure, certificato di analisi del lotto e tracciabilità dei lotti dei singoli componenti.

* L'ordine ricevuto per Iran è di 420 piastre del primo kit (FMDV Antigen detection ELISA) e 670 piastre del secondo kit (FMDV 3ABC-trapping ELISA), ma in considerazione del valore economico e della considerevole quantità, la spedizione è stata divisa per ragioni di sicurezza in due tranches, la prima metà già effettuata, la prossima è stata programmata nell'ultimo trimestre 2011 per accertare il buon esito della prima. I kit sono però già prodotti e stoccati nelle celle IZSLER.

Altro:

Il CERVES gode di leadership riconosciuta internazionalmente nell'ambito scientifico degli **anticorpi monoclonali**; conseguentemente è stata soddisfatta con significativa frequenza la fornitura, su richiesta, di anticorpi monoclonali di varia specificità e caratteristiche reattive nei confronti di diversi sierotipi di virus aftosi a vari Partner

Europei e non, soprattutto nell'ambito di progetti di ricerca collaborativa e sporadicamente sottoforma commerciale. Altri materiali, in particolare antigeni inattivati o ricombinanti, anticorpi di cattura e coniugati come reattivi diagnostici, sono stati forniti ad istituti di ricerca internazionali.

3) Attività analitica routinaria

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 Periodo 1 ottobre 2010-31 settembre 2011

MALATTIA	RICERCA	REAZIONI (N°)			TOTALE
AFTA	Esami sierologici	ELISA O (1990)	ELISA A (2010)	ELISA Asia (1990)	7098
		ELISA SAT1 (36)	ELISA SAT2 (36)	ELISA 3ABC (1036)	
	Esami virologici	Isol. virale (13)	ELISA (4)	PCR (11)	28
MVS	Esami sierologici	ELISA scr. (100.740)	ELISA IgG (1107)	ELISA IgM (1107)	102.954
		Siero Neutralizzazione		1104	1104
	Esami virologici	Isol. Virale (51)	ELISA (39)	PCR (2620)	2710
	Esami genomici	Sequenza gene 3D			3
SV	Esami sierologici	Siero Neutralizzazione			40
EMC	Esami sierologici	ELISA			3448
	Esami virologici	Isol. Virale	ELISA	PCR (62)	62

Il volume di attività diagnostica "routinaria" eseguito dal CERVES si è consolidato, similmente ai due anni precedenti caratterizzati da assenza di ondate epidemiche per MVS in aree ad alta densità di allevamenti suini, nello standard dettato prevalentemente dall'attuazione del Piano Nazionale di sorveglianza della MVS.

Si segnala il rilievo persistente da anni del virus della encefalomiocardite (EMC), anche se l'attività di sorveglianza è limitata alle regioni di competenza dell'IZSLER. La diagnostica

virologica per EMCV è effettuata anche presso alcune sezioni dell'IZSLER tramite test RT-PCR, pertanto il dato riportato si riferisce solamente ai campioni conferiti alla sezione diagnostica di Brescia: in 28 casi su 62 sospetti il virus EMCV è stato individuato come causa della patologia. Il virus è stato rilevato anche in feti suini, benché molto più sporadicamente rispetto al muscolo cardiaco, indicando per la prima volta in Italia la manifestazione della patologia nella forma riproduttiva. Il riscontro di sieropositività sia in allevamenti suini che in cinghiali catturati durante la stagione di caccia ha confermato la circolazione del cardiovirus, non solo nelle specie domestiche ma anche in specie selvatiche.

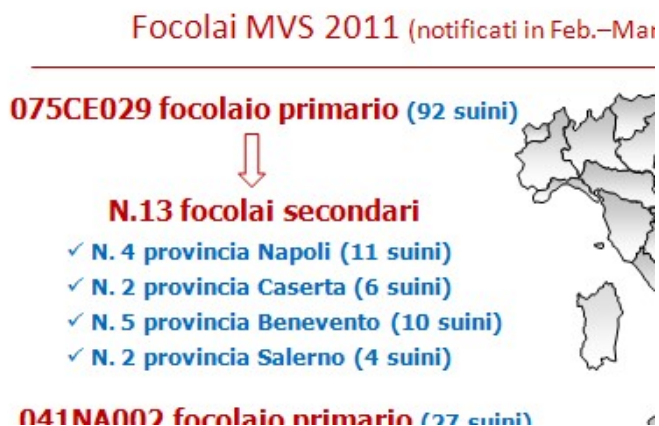
Situazione epidemiologica MVS

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.

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 16 focolai di MVS nel periodo di riferimento. Tutti i focolai sono stati registrati in Campania; la maggior parte (13 su 15) sono secondari, identificati in seguito ad indagini di rintraccio (vendita di animali per consumo familiare), mentre è rimasta sconosciuta l'origine dei due focolai primari.

Focolai di MVS notificati nel periodo 1 Ottobre 2010 al 30 Settembre 2011

01 Ott 2010 - 31 Dic 2010						
Regione	Ingrasso	Riproduz.	St. sosta	Altro	N. focolai	N. animali
CAMPANIA	1				1	11
01 Gen - 31 Sett 2011						
CAMPANIA	15				15	150
TOTALE	16				16	161



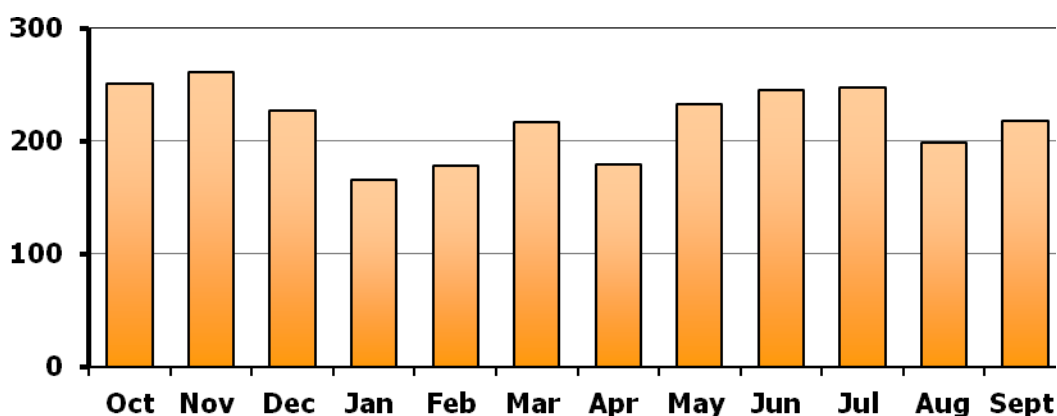
Come mostra la tabella seguente, che riassume la situazione degli ultimi quattro anni, salvo rari casi spot e sporadiche ondate epidemiche prontamente risolte che si sono manifestate in aree accreditate (anno 2008, regioni centrali), l'infezione persiste nelle due regioni meridionali che non hanno raggiunto l'accreditamento: Campania e Calabria (come confermato anche dalla numerosità di aziende sieropositive rilevate ogni anno). E' tuttavia da rilevare l'assenza di casi in Calabria nel 2011 coerente con una parallela diminuzione delle sieropositività.

N. focolai distribuiti per anno (ultimi 4 anni, aggiornato al 30 sett. 2011) e area geografica

Anno	Nord	Centro	Sud accreditate	Sud NON accreditate	Isole	Totale focolai
2008	1	46	10	8		65
2009		3		14	1	18
2010		1		2	1	4
2011				15		15

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 (tra 2500 e 3000 campioni/anno), distribuiti con frequenza mensile intorno a 200 test, come evidenziato nell'annesso grafico.

*Frequenza dei **test virologici per MVS** nel periodo 1 Ott 2010 - 30 Sett 2011
Test di screening (**PCR**) per la ricerca del virus
2.620 test (solo ufficiali)*



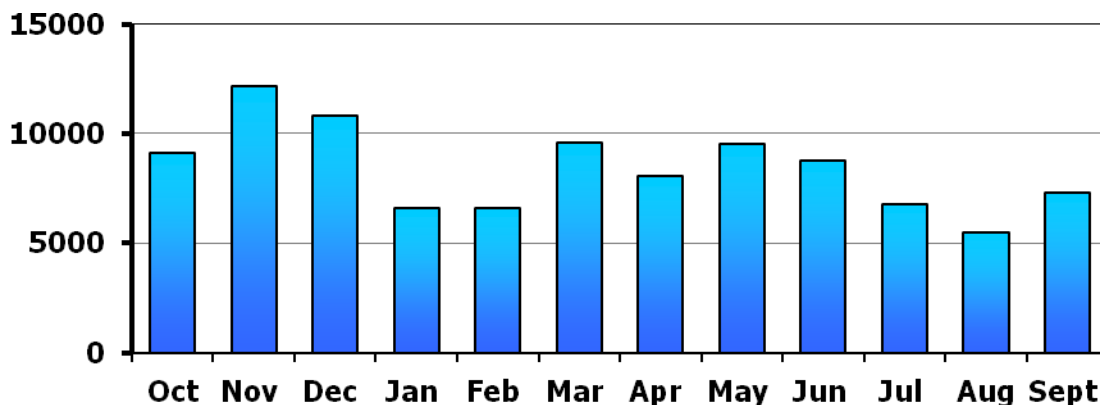
La tabella seguente estende il dettaglio dei controlli virologici eseguiti nel 2010, divisi per regione, motivo del prelievo e identificandone il risultato.

Controlli virologici per MVS eseguiti nel periodo 1 Ott 2010-30 sett 2011

REGIONE	Controllo in Stalla di sosta	Importazione	controllo in azienda per sieropositività	correlazione epidemiologica con focolaio	Controllo in azienda accreditata	movimentazioni	varie	CAMPIONAMENTI POSITIVI
Nord est	132	2			40		4	
PIEMONTE	8	6			4	3	8	
LOMBARDIA	7	1			158		15	
EMILIA R.		1	2		44	2	1	
TOSCANA	41	1	4		66		7	
MARCHE	13		3		38			
UMBRIA	44	5	12		70	1		
LAZIO	107	3	8		197	1	8	
ABRUZZO	43		3		118		5	
MOLISE	18	3	3		66		17	
CAMPANIA	29	2	37	57	533	7	39	15
BASILICATA	41	1	9	1	67	7	2	
PUGLIA	22		8		16		3	
CALABRIA	100	7	7	1	282	43	10	
SICILIA	27		4	1	10		4	
SARDEGNA			2					

Monitoraggio sierologico. Nella tabella seguente 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 oscilla intorno a 10.000 test/mese.

*Frequenza dei test sierologici per MVS nel periodo 1 Ott 2010 - 30 Sett 2011
Test di screening (ELISA competitiva) per la ricerca di anticorpi anti-MVS*



Relativamente al dato nazionale, si riporta l'estrazione riferita al 2010 completata con le risultanze relative ai riscontri di sieropositività confermate (con esclusione dei casi di singleton reactor).

Relativamente al dato nazionale, nel 2010 sono state esaminate circa 12.500 aziende per oltre 370.000 capi, con un riscontro di sieropositività dovuta ad infezione in atto o pregressa in 44 aziende, prevalentemente concentrate nelle regioni meridionali ed in particolare nelle due regioni non accreditate, Campania e Calabria. Il dettaglio per l'anno 2011 verrà presentato nella prossima relazione, essendo l'attività in itinere e le registrazioni da parte degli IZZSS competenti tuttora in corso.

Risultati del monitoraggio sierologico per MVS nel 2010

REGIONS	N° aziende esaminate	N° suini esaminati	N° aziende sieropositive	
Nord Est	682	30776		
Nord ovest	563	21291		
LOMBARDIA	1362	74347		
EMILIA R.	488	24912		
TOSCANA	992	16315	1	1 IgG
MARCHE	595	11804		
UMBRIA	738	21635		
LAZIO	276	18542	2	1 IgG, 1 IgG/IgM
ABRUZZO	655	14902		
MOLISE	297	7114		
CAMPANIA	1365	49250	26	25 IgG, 1 IgM
BASILICATA	286	11042	1	1 IgG
PUGLIA	270	2608	4	3 IgG, 1 IgG/IgM
CALABRIA	961	27350	7	6 IgG, 1 IgG/IgM
SICILIA	990	13141	1	1 IgG/IgM
SARDEGNA	1951	26694	2	2 IgG
TOTALE	12471	371723	44	

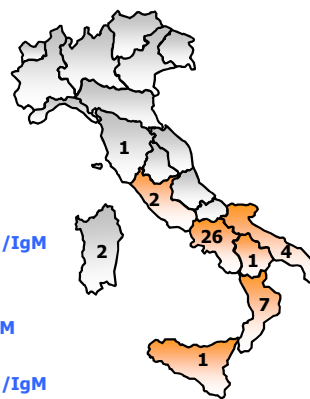
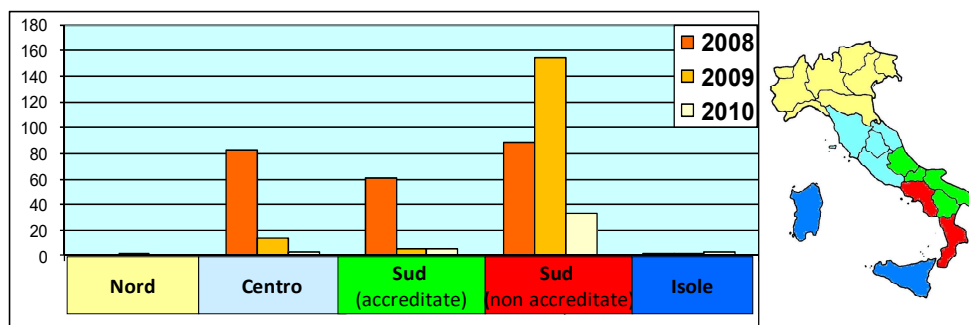


Tabella e grafico successivi mostrano il trend delle sieropositività rilevate attraverso il Piano nazionale di sorveglianza negli ultimi tre anni. E' evidente la diminuzione progressiva se si osserva il dato nazionale complessivo, che è sceso da 233 aziende sieropositive nel 2008, a 175 nel 2009 e sole 44 nel 2010. La maggior parte delle sieropositività restano confinate nelle regioni non accreditate, con forti oscillazioni in Calabria e tendenza al mantenimento dei livelli di sieroprevalenza in Campania.

Numero aziende sieropositive – Trend ultimi tre anni

Area	Regione	2008	2009	2010
Nors	Emilia-Romagna		1	
Centro	Toscana	2	2	1
	Marche	5		
	Umbria	29	3	
	Lazio	46	9	2
Sud regioni accreditate	Abruzzo	49	1	
	Basilicata	4	2	1
	Puglia	6	2	4
	Molise	2		
Sud reg. not accreditate	Calabria	51	114	7
	Campania	37	40	26
Isole	Sardegna	2	1	2
	Sicilia			1
ITALIA	Total	233	175	44

Numero aziende sieropositive, per anno e per area geografica – Visualizzazione grafica



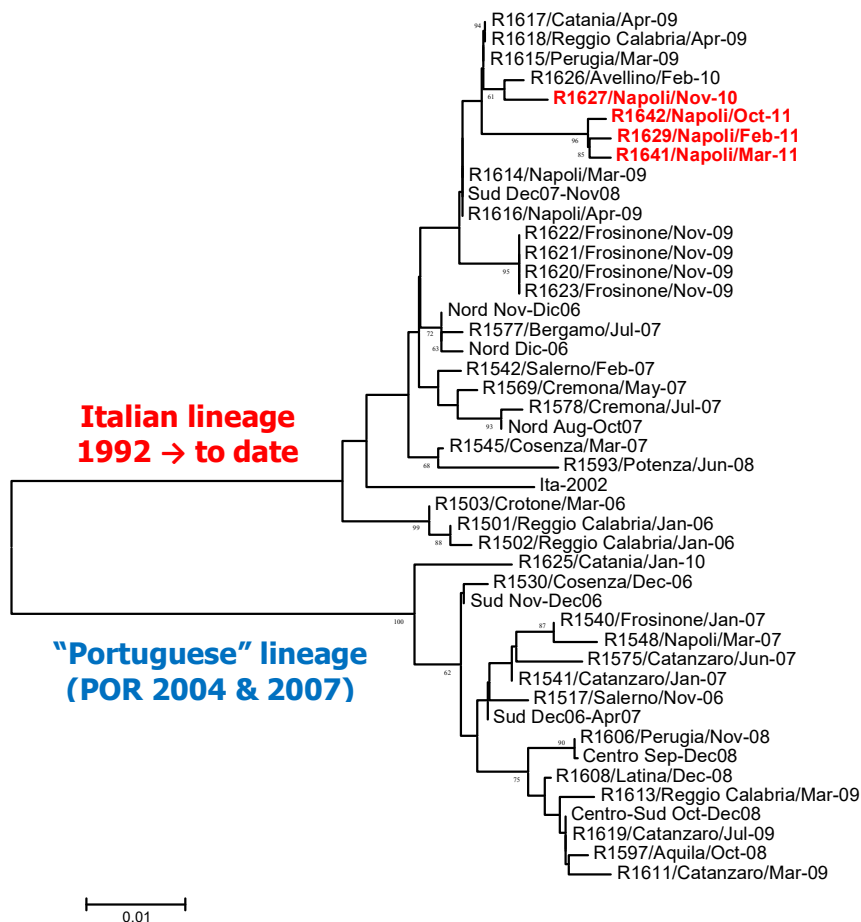
Con riferimento al periodo oggetto della presente relazione (1/10/2010 - 30/09/2011), si riporta nella tabella seguente il volume di attività di sorveglianza sierologica su scala nazionale e diviso per regioni.

Attività di monitoraggio sierologico per MVS dal 1/10/2010 al 30/09/2011

REGIONE	N° aziende controllate	N° sieri esaminati
Nord Est	555	24.913
Nord Ovest	773	33.520
LOMBARDIA	1317	70.096
EMILIA R.	525	25181
TOSCANA	987	17594
MARCHE	741	20709
UMBRIA	621	11113
LAZIO	284	12520
ABRUZZO	555	11884
MOLISE	304	6582
CAMPANIA	1291	48533
BASILICATA	310	12325
PUGLIA	309	2993
CALABRIA	926	24526
SICILIA	991	9527
SARDEGNA	2349	44332
TOTALE	12838	376348

Analisi filogenetiche. L'albero filogenetico allegato porta in evidenza (colore rosso) il posizionamento di quattro nuovi ceppi di virus MVS, rappresentativi dei focolai occorsi nel periodo nella provincia di Napoli, rispetto ai virus identificati negli anni precedenti. Mentre fino al 2010 era stata 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), la sequenziazione dei quattro nuovi isolati ha evidenziato che tutti appartengono alla sub-linea genomica "italiana". L'omologia tra i tre ceppi del 2011 è elevatissima indicando la loro stretta correlazione, nonostante la distanza temporale tra i due ceppi di inizio anno (febbraio-marzo) e l'isolato di ottobre; una deriva genetica invece è osservata rispetto ai ceppi del 2010 rilevati nella stessa zona geografica.

Analisi filogenetica, basata sulla sequenza del gene 3D, di ceppi di MVS isolati in focolai italiani in anni recenti (2006-2011)



Attività analitica non routinaria

Oltre all'attività eseguita nell'ambito della Sanità Animale con finalità di diagnostica e/o sorveglianza, è stato 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, e soprattutto nell'ambito di programmi di ricerca e programmi di sviluppo e validazione continua di nuovi saggi diagnostici.

Sono stati effettuati controlli con test analitici non routinari per valutare il profilo antigenico, il mantenimento delle caratteristiche strutturali e antigeniche dei ceppi di virus aftosi presenti nella Banca Nazionale di antigeni concentrati da utilizzare come vaccini d'emergenza.

E' continuata in convenzione l'esecuzione di test finalizzati ad escludere la presenza di virus AFTA, MVS ed EMCV in prodotti farmaceutici ad uso umano di origine suina. Nel periodo di riferimento sono stati controllati n. 72 lotti, ciascuno con test RT-PCR per i tre agenti indicati.

Infine, nell'ambito di collaborazioni internazionali e del supporto diagnostico alla FAO sono stati analizzati:

- 2400 sieri campionati per monitoraggio della circolazione di virus aftosi in Tajikistan. Tutti i campioni sono stati esaminati, durante un training della durata di due settimane per quattro trainees del Tajikistan, con il kit di produzione interna per anticorpi DIVA (3ABC-trapping ELISA), e una parte di essi (n. 300) sono stati titolati per la presenza di anticorpi verso i sierotipi O, A, Asia 1, per un totale di circa **3500 test/titolazioni**;
- 1920 sieri collezionati in Sud Africa, esaminati durante la visita di tre settimane di una collega ricercatrice dell'Onderstepoort Veterinary Institute. Tutti i campioni sono stati analizzati con il kit di produzione interna per anticorpi DIVA (3ABC-trapping ELISA) e una proporzione significativa con i test sierologici ELISA in-house per la titolazione di anticorpi verso i sierotipi SAT1 e SAT2, per un totale di circa **4000 test/titolazioni**.

Queste attività (cooperazione internazionale e collaborazioni scientifiche) oltre alla rilevanza internazionale, hanno definitivamente utili ricadute interne, quali l'accesso a campioni positivi di campo, preziosi ai fini della validazione dei MP, da perseguire anche attraverso l'applicazione e la verifica dei test in situazioni di campo.