



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**

Via Bianchi 9 - 25124 Brescia

**CENTRO NAZIONALE DI REFERENZA PER LE MALATTIE VESICOLARI
(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 annuale 2013

Periodo di riferimento 01/10/2012 – 30/09/2013

Decreto 2 Novembre 1991

ATTIVITA' SVOLTA

Attività diagnostica

1) Standardizzazione e validazione di metodiche diagnostiche

I Metodi di Prova (MP) adottati dal CERVES seguono, ove esistenti, i riferimenti normativi specifici. Tutti i MP per afta e MVS elencati nelle precedenti tabelle sono soggetti a verifica ogni anno nel corso dei Proficiency Testing Scheme internazionali.

Tutte le prove diagnostiche per Afta, MVS e EMCV basate su metodiche ELISA sono state sviluppate dal Centro di Referenza stesso, con l'utilizzo di anticorpi monoclonali autoprodotti, che apportano miglioramento in termini di standardizzazione e innovazione. Il Manuale OIE riconosce valide le variazioni metodologiche che contemplano l'utilizzo di anticorpi monoclonali, quindi i test in uso presso il CERVES non deviano rispetto ai riferimenti normativi.

Tutti le metodiche ELISA adottate dal CERVES sono state sottoposte a processo di validazione riconosciuto a livello internazionale.

Il Laboratorio mantiene anche la capacità di produzione dei reagenti che compongono i test, oltre che dei kit pronto-uso stabilizzati per tutte le tipologie di test ELISA per Afta.

Rispetto all'anno precedente sono stati inseriti nuovi test diagnostici Real time PCR, sia per afta che per MVS, essendo stata completata la rispettiva validazione.

Tra le tecnologie diagnostiche più avanzate, il CERVES dispone di

- test ELISA per la determinazione del profilo antigenico degli isolati di Afta e MVS utilizzando pannelli caratterizzati di anticorpi monoclonali,
- si avvale del Reparto di Genomica per il sequenziamento di parti genomiche dei ceppi di virus MVS finalizzato ad analisi filogenetiche.

Sviluppo e validazione di nuovi diagnostici per afta

E' continuato nel periodo di riferimento lo sviluppo e validazione di un nuovo kit pronto-uso per la diagnostica dell'afta che completa il portfolio dei kit già presentati nell'anno precedente. Si tratta in particolare del kit ELISA pronto-uso per la determinazione di anticorpi sierotipo specifici per il tipo aftoso SAT2, che va ad aggiungersi agli altri tre kit per la determinazione dei sierotipi O, A e Asia1. Il nuovo kit, che sfrutta le potenzialità degli anticorpi monoclonali precedentemente prodotti e caratterizzati, è stato estensivamente validato con sieri sperimentali noti e con sieri di campo da paesi africani che hanno avuto focolai di afta causati dal sierotipo SAT2 e che praticano la vaccinazione. Inoltre, il kit è stato distribuito ad altri Centri di referenza internazionali, in particolare l'World Reference Laboratory (Pirbright, UK) e il centro di referenza OIE Sud Africano di Onderstepoort, dove è in corso la valutazione.

E' stata completata nell'anno di riferimento la validazione e l'implementazione nel laboratorio dei test Real time PCR per afta, aventi due regioni target diverse per

l'amplificazione. Si intende intraprendere il processo per portare all'accreditamento i nuovi MP.

Sviluppo e miglioramento di metodi diagnostici per MVS.

Nell'ultimo anno sono stati completati gli esperimenti per la validazione del metodo Real-time PCR per la rilevazione del virus della MVS basato sul gene 3D, che codifica per l'enzima RNA polimerasi RNA dipendente; questo saggio è stato sviluppato dal CERVES dopo avere verificato che i due test Real time PCR proposti dal Laboratorio di referenza Europeo (EURL, Pirbright UK) non identificavano efficientemente tutti i ceppi circolanti in Italia, appartenenti a due sub-lineaggi genomici (denominati Italiano e Portoghese). La strategia adottata col nuovo test Real-time PCR per il riconoscimento di tutte le possibili varianti virali consiste nell'utilizzo combinato di due sonde TaqMan, complementari rispettivamente ai ceppi circolanti dei due lineaggi e disegnate dall'allineamento di 123 sequenze ottenute al CERVES, in associazione con gli stessi collaudati primer FOR e REV utilizzati dal test convenzionale.

Nell'anno in corso, oltre ad aver testato un numero statisticamente significativo di campioni di feci positivi per MVS collezionati nell'arco di anni presso il CERVES, ottenendo una elevata sensibilità diagnostica equivalente a quella del test convenzionale, e aver confermato la specificità del 100% confrontando il metodo nuovo con il test RT-PCR convenzionale su ulteriori 408 campioni fecali conferiti al laboratorio in attuazione del Piano Nazionale di Sorveglianza per MVS, sono stati valutati i parametri di sensibilità analitica, ripetibilità e riproducibilità.

Dato che il metodo è stato messo a punto per rilevare tutti i ceppi appartenenti ai due sub-lineaggi (Italiano e Portoghese) circolanti in Italia, la sua sensibilità analitica è stata valutata su diluizioni di due ceppi di MVS appartenenti ciascuno ad un diverso lineaggio. La sorgente virale a titolo infettante noto, corrispondente a virus coltivato sulla linea cellulare IB-RS2, è stata diluita scalarmente (5 diluizioni in base 10) in pool di feci negative e testata in parallelo con il metodo PCR classico usato in routine: il limite di rilevamento di entrambi i test per i due ceppi in esame è risultato essere di 10 TCID₅₀/ml. I parametri di precisione del metodo (ripetibilità e riproducibilità) sono stati valutati su cinque repliche di tre diluizioni virali testate da due operatori, l'accordanza tra replicati (ripetibilità) e tra operatori (riproducibilità) è risultata del 100%.

In ambito di Qualità:

- Il CERVES ha mantenuto gli standard conformi alla ISO17025 ed è stato oggetto di verifica ispettiva interna ed esterna (Accredia);
- TUTTI i Metodi di Prova per afta e MVS utilizzati dal CERVES sono stati sottoposti a valutazione attraverso il **ring test internazionale**, organizzati dall'EURL;
- la performance dei MP eseguiti con maggior frequenza 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

Le attività del Centro riferite a questo settore si esplicano in tre ambiti di produzione:

1. reagenti diagnostici utilizzati per l'attività analitica routinaria del CERVES, particolarmente per i test ELISA e Sieroneutralizzazione: questi comprendono anticorpi monoclonali, coniugati, antigeni virali inattivati e/o ricombinanti, matrici virali, colture cellulari, che sono tutti di produzione interna al Laboratorio;
2. reagenti diagnostici assemblati per l'esecuzione del test ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi anti-MVS, utilizzato come metodo di screening nel Piano Nazionale di sorveglianza/eradicatione;
3. reagenti e kit distribuiti all'esterno nell'espletamento delle funzioni di Centro internazionale.

Il volume e la tipologia di prodotti diagnostici relativi al punto 1 è derivato dal volume di attività analitica dettagliato al capitolo successivo.

In attuazione del punto 2, durante i 12 mesi di riferimento il CERVES ha prodotto e distribuito agli IIZZSS territorialmente competenti reagenti/kit in quantità idonea per l'esecuzione di oltre 480.000 test ELISA screening per anticorpi anti-MVS, mantenendo il trend degli ultimi anni. I materiali sono da sempre **distribuiti gratuitamente agli IIZZSS** 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 e corrispondente a 0,76 Euro/test, il **valore di questo servizio è quantificato in oltre 350.000 Euro.**

*Reagenti in kit per screening MVS distribuiti agli IIZZSS
periodo 1 Ottobre 2012 – 30 Settembre 2013*

| | Kit distribuiti per N. test |
|---|-----------------------------|
| IZS PLV, TORINO | 40000 |
| IZS VE, PADOVA | 80000 |
| IZS LT, ROMA | 20000 |
| IZS UM, PERUGIA | 20000 |
| IZS AM, TERAMO | 30000 |
| IZS PB, FOGGIA | 11000 |
| IZS ME, NAPOLI | 40000 |
| IZS CATANZARO | 32000 |
| IZS SI, PALERMO | 15000 |
| IZS SA, SASSARI | 201000 |
| Totale | 489000 |
| IZSLER, BRESCIA (<i>test effettivi</i>) | 97246 |
| Totale complessivo | 586246 |

Relativamente al punto 3, il Centro, nell'ambito delle funzioni come Laboratorio di referenza OIE per la MVS, ha continuato l'approvvigionamento di reagenti per la diagnosi

sierologia di MVS a Polonia e Canada, che regolarmente utilizzano il test OIE sviluppato dal CERVES.

E' inoltre proseguita la produzione e distribuzione di **kit pronto-uso per diagnosi sierologica e virologica di AFTA**. Le forniture di tali kit sono state effettuate soprattutto nell'ambito di progetti finanziati da organismi internazionali (FAO, EUFMD, IAEA), ma si è cercato di dar seguito anche a richieste pervenute direttamente da alcuni Laboratori Nazionali di Referenza.

I kit sono composti da 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 singoli componenti. La tabella successiva dettaglia i tipi, la quantità di kit distribuiti e i Paesi che li hanno ricevuti; a questi vanno aggiunti i kit di ciascuna tipologia distribuiti a cinque partner del progetto europeo FMD-Disconvac, come attività programmata nella fase finale del progetto stesso.

*Kit diagnostici afta PRONTO-USO sviluppati e prodotti presso il Reparto
Forniture nell'ambito di CONTRATTI – FAO/EUFMD nel periodo 01/11/2012-15/10/2013*

| Riferimento contratto/attività | Paese beneficiario | TEST VIROLOGICI | | TEST SIEROLOGICI | | | | |
|---|--------------------|------------------------------|---------------------|------------------|-------------------|-----------|------------|-----------|
| | | FMDV antigen detection ELISA | | trapping ELISA | SP Antibody ELISA | | | |
| | | type O, A, SAT1, SAT2 | type O, A, C, Asia1 | 3ABC | FMDV O | FMDV A | FMDV Asia1 | FMDV SAT2 |
| Distribuiti su richiesta EUFMD & FAO | Pakistan | | 60 | 40 | 15 | 15 | 15 | |
| | Turchia | 1 | 5 | | 3 | 3 | 3 | |
| | Grecia | | 2 | | 1 | 1 | 1 | |
| | Iran | | 34 | 2 | 3 | 3 | 3 | |
| | Libano | 1 | 1 | | | | | |
| | Training in Nepal | | 1 | 1 | 1 | | | |
| Distribuiti su richiesta IAEA | Mali | 2 | | | | | | |
| | Myanmar | | 4 | 3 | 3 | 2 | | |
| Distribuiti su richiesta extra EUFMD & FAO | Nuova Zelanda | 1 | 1 | | 1 | 1 | 1 | |
| | Russia | 3 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | |
| | Polonia | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | Chad | | | | 3 | 3 | | 3 |
| Utilizzati al CERVES per training e sierosorveglianza | Libia | 4 | | 24 | 47 | 47 | | 47 |
| | Egitto | 1 | | 8 | 15 | 15 | | 15 |
| TOTALE KIT DISTRIBUITI | | 14 | 111 | 83 | 96 | 94 | 27 | 66 |

I suddetti prodotti sono molto apprezzati non solo per le performance diagnostiche ma anche per l'enorme semplificazione rispetto ai test sino ad ora disponibili.

I kit prodotti dal CERVES hanno portato grande visibilità internazionale per l'Istituto e per la nazione, hanno creato reale capacità diagnostica in Paesi endemici che sono stati in grado di effettuare per la prima volta una diagnosi locale di afta con sierotipizzazione del virus, requisito essenziale per intraprendere il Programma patrocinato da EuFMD, FAO e OIE per il controllo globale dell'afta denominato *Progressive Control Pathway (PCP)*.

Infine, come di consuetudine grazie alla consolidata leadership internazionale nella produzione di anticorpi monoclonali, sono state soddisfatte le richieste di anticorpi monoclonali di varia specificità e reattività nei confronti di diversi sierotipi aftosi, da parte di ricercatori che lavorano sia in Istituti europei che extra europei. Tali forniture sono state regolamentate da Material Transfer Agreements.

3) Attività analitica routinaria (e cenni epidemiologici)

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 eseguiti al CERVES
Periodo 1 Ottobre 2012 - 30 Settembre 2013*

| MALATTIA | RICERCA | REAZIONI (N°) | | | TOTALE | |
|-------------|-------------------|------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|--------------|
| AFTA | Esami sierologici | ELISA O (1431) | ELISA A (1431) | ELISA Asia1 (1390) | ELISA 3ABC (53) | 4305 |
| | Esami virologici | Isol. virale (24) | ELISA (10) | PCR* (301) | | 335 |
| MVS | Esami sierologici | ELISA scr. (97246) | ELISA IgG (405) | ELISA IgM (405) | | 98056 |
| | | Siero Neutralizzazione | | | 394 | |
| | Esami virologici | Isol. Virale (13) | ELISA (9) | PCR* (2694) | | 2716 |
| | Esami genomici | Sequenza gene 3D | | | | 1 |
| SV | Esami sierologici | Siero Neutralizzazione | | | | 28 |
| EMC | Esami sierologici | ELISA | | | | 5567 |
| | Esami virologici | Isol. Virale | ELISA | PCR (36) | | 36 |

*I test PCR includono i controlli interni delle cappe biologiche e PCR, effettuati con regolare frequenza per escludere contaminazioni da virus aftosi e della MVS.

Relativamente all'afta, l'assenza di sospetti e lo stato sanitario nazionale, comunemente agli altri stati membri della UE, limitano la diagnostica ai test sierologici effettuati prevalentemente per movimentazioni, import/export, esposizioni/fiere. Si prevede tuttavia che con l'assegnazione del nuovo Laboratorio di riferimento OIE per afta e nell'ambito della cooperazione Italia-Libia potrà essere nel futuro richiesta anche una attività di conferma

diagnostica su sospetti clinici da paesi affetti: infatti è di fine settembre la segnalazione che campioni biologici da alcuni casi clinicamente sospetti verranno inviati al CERVES per conferma diagnostica.

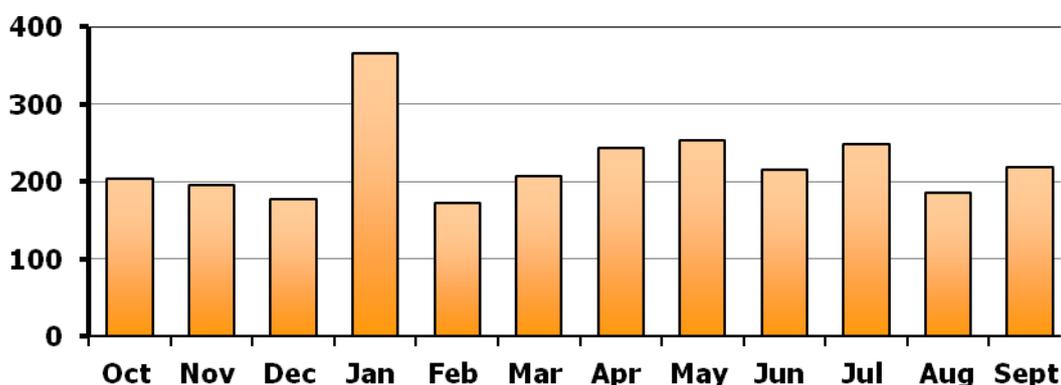
La diagnostica per la ricerca del virus dell'encefalomiocardite (EMCV) è stata limitata alla casistica conferita dalla sezione diagnostica di Brescia; il test RT-PCR ha confermato l'identificazione del virus nel 40% dei campioni suini da casi clinici sospetti, confermando l'endemicità dell'infezione nella specie suina nell'area controllata (Lombardia meridionale). È continuato il riscontro di sieropositività per EMCV, sia in allevamenti suini che in cinghiali catturati durante la stagione di caccia, confermando la circolazione del cardiovirus, non solo nelle specie domestiche ma anche in specie selvatiche.

L'attività più consistente è come di consueto riferita all'attuazione del Piano Nazionale di sorveglianza della MVS, che si è consolidata simile in volume agli anni precedenti per i test di screening sierologico (circa 100.000 test ELISA, effettuati per il territorio di competenza dell'IZSLER, Regioni Lombardia ed Emilia Romagna) e virologico (circa 2700 test RT-PCR, effettuati a livello nazionale). Coerentemente con la progressiva diminuzione dei riscontri di sieropositività, è invece sensibilmente (circa 60%) sceso il numero di campioni che hanno richiesto test di conferma tramite Sieroneutralizzazione e individuazione della classe immunoglobulinica coinvolta.

Di seguito vengono riportati dati di carattere epidemiologico ed analitici relativi a questa attività a livello nazionale.

Test virologici MVS. I test virologici in PCR effettuati dal CERVES per tutto il territorio nazionale hanno mantenuto il trend degli anni precedenti (tra 2500 e 3000 campioni/anno), distribuiti con frequenza mensile media di 200 test, come evidenziato nell'annesso grafico.

*Frequenza dei **test virologici per MVS** nel periodo 1 Ott 2012 - 30 Sett 2013
Test di screening (**PCR**) per la ricerca del virus **2.694 test***



La tabella seguente riporta il dettaglio dei controlli virologici suddivisi per regione e motivo del prelievo.

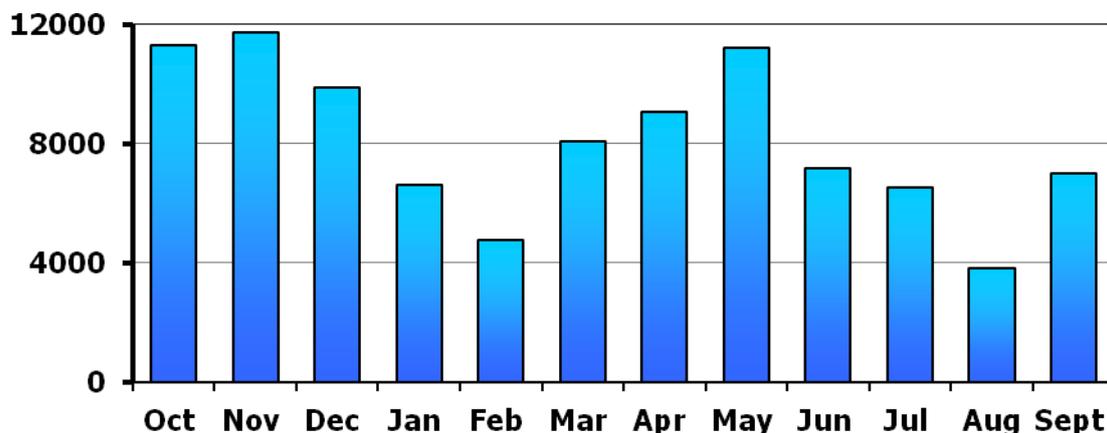
Controlli virologici per MVS eseguiti nel periodo 1 Nov 2012 – 30 Sett 2013

| REGIONE | Controllo in Stalla di sosta | controllo in azienda accreditata | correlazione epidemiologica con focolaio | Importazione | controllo per riacquisizione accreditamento | movimentazioni | controllo in azienda per sieropositività | Controllo in Zona protezione e sorveglianza | Varie/non indicato | CAMPIONAMENTI POSITIVI |
|------------|------------------------------|----------------------------------|--|--------------|---|----------------|--|---|--------------------|------------------------|
| NORD EST | 71 | 9 | | 1 | | | | | 4 | 1 |
| NORD OVEST | 19 | 2 | | 2 | | | | | | |
| LOMBARDIA | | 95 | | | | | | | 1 | |
| EMILIA R. | 7 | 46 | | | | 2 | | | | |
| TOSCANA | 35 | 45 | | | | | | | | |
| MARCHE | 14 | 43 | | | | | | | | |
| UMBRIA | 36 | 46 | | | 1 | 1 | 3 | | 6 | |
| LAZIO | 77 | 171 | | | 2 | | 1 | | | |
| ABRUZZO | 26 | 71 | | | 3 | | 3 | | 1 | |
| MOLISE | 28 | 113 | | 1 | | 1 | 1 | | 5 | |
| CAMPANIA | 32 | 469 | | 1 | 11 | 10 | | | 7 | |
| BASILICATA | 37 | 64 | | | | | 5 | | 2 | |
| PUGLIA | 26 | 7 | | | 3 | | 4 | | | |
| CALABRIA | 42 | 279 | | | 20 | 5 | 6 | 4 | 4 | |
| SICILIA | 7 | 15 | | | 1 | | | | | |
| SARDEGNA | 1 | | | | | | 3 | | | |

Per la grande maggioranza le motivazioni del campionamento effettuato nel periodo relazionato sono riferibili alla sorveglianza attiva prevista nel Piano nazionale (“controlli in stalla di sosta” e “controlli in azienda accreditata”), mentre i campionamenti per “correlazione epidemiologica con focolaio” o “controllo in Zona di protezione/sorveglianza” sono nulli, poiché l’unica positività virologica nel 2013 è stata identificata in campioni di feci ambientali prelevati per controllo routinario in una stalla di sosta della Calabria; l’origine dei 4 suini presenti al momento del campionamento, che hanno successivamente sierconvertito, è rimasta dubbia, per cui il focolaio è stato considerato primario e l’indagine non ha identificato aziende correlate epidemiologicamente. Questo caso è l’unico focolaio di MVS identificato nell’anno temporale di riferimento.

Monitoraggio sierologico. Il numero degli esami sierologici di screening eseguiti presso il CERVES, relativi alla sorveglianza nei territori di competenza IZSLER (Lombardia ed Emilia Romagna) e la frequenza mensile ripropone lo stesso profilo osservato e riportato nella precedente relazione (vedi grafico sottostante). Il volume di attività è compreso tra 5000 e 10000 test/mese con oscillazioni probabilmente correlate ai periodi in cui sono programmati i campionamenti semestrali delle aziende da riproduzione a cicli aperto

*Frequenza dei test sierologici per MVS nel periodo 1 Ott 2012 - 30 Sett 2013
Test di screening (ELISA competitiva) per la ricerca di anticorpi anti-MVS*



Relativamente al dato nazionale, sono stati esaminati circa 385.000 capi, controllando oltre 18.000 aziende.

Il volume di analisi e il numero di aziende controllate rispecchia quello dello stesso arco temporale precedente se pur con oscillazione di un ± 10 , ad eccezione delle regioni Toscana, Lazio e Sardegna. In Toscana e nel Lazio, regioni afferenti allo stesso IZS, il numero di sieri esaminati e aziende controllate ha subito una diminuzione del 50%, mentre in Sardegna l'attività è pressoché triplicata. Ciò è stato determinato dalla scelta di esaminare tutti i sieri degli animali prelevati nell'ambito del piano straordinario per la Peste Suina Classica anche per MVS; per consentire ai colleghi sardi di ridurre i tempi di risposta e distribuire il significativo incremento di attività, il CERVES ha acconsentito all'esecuzione della prova anche nelle sezioni diagnostiche dell'IZS della Sardegna.

Monitoraggio sierologico per MVS a livello nazionale nel periodo 1 Nov 2012-30 Sett 2013

| REGIONE | N. aziende controllate | N. sieri esaminati |
|----------------|------------------------|--------------------|
| NORD OVEST | 698 | 28.400 |
| NORD EST | 918 | 37.071 |
| LOMBARDIA | 1186 | 57.243 |
| EMILIA-ROMAGNA | 454 | 23.359 |
| TOSCANA | 560 | 7.417 |
| UMBRIA | 610 | 13.225 |
| MARCHE | 747 | 11.732 |
| LAZIO | 194 | 4.428 |
| ABRUZZO | 442 | 10.904 |
| MOLISE | 338 | 9.246 |
| CAMPANIA | 828 | 39.951 |
| BASILICATA | 277 | 10.731 |
| PUGLIA | 467 | 4.450 |
| CALABRIA | 621 | 25.550 |
| SICILIA | 928 | 8.221 |
| SARDEGNA | 9164 | 94.936 |
| TOTALE | 18.232 | 386.846 |

Con riferimento ai risultati della sorveglianza sierologica, la tabella sottostante riporta il dettaglio per regione del numero di aziende con sieri positivi Singleton Reactor (assenza di contatto/esposizione al virus MVS) e aziende con sieri veri positivi (esposizione all'infezione) paragonando il dato dell'intero anno 2012 rispetto a quello del primo semestre 2013.

N. aziende con sieropositività sierologica MVS e distinzione tra positività da Singleton Reactor o vera positività MVS; confronto anno 2012 - primo semestre 2013

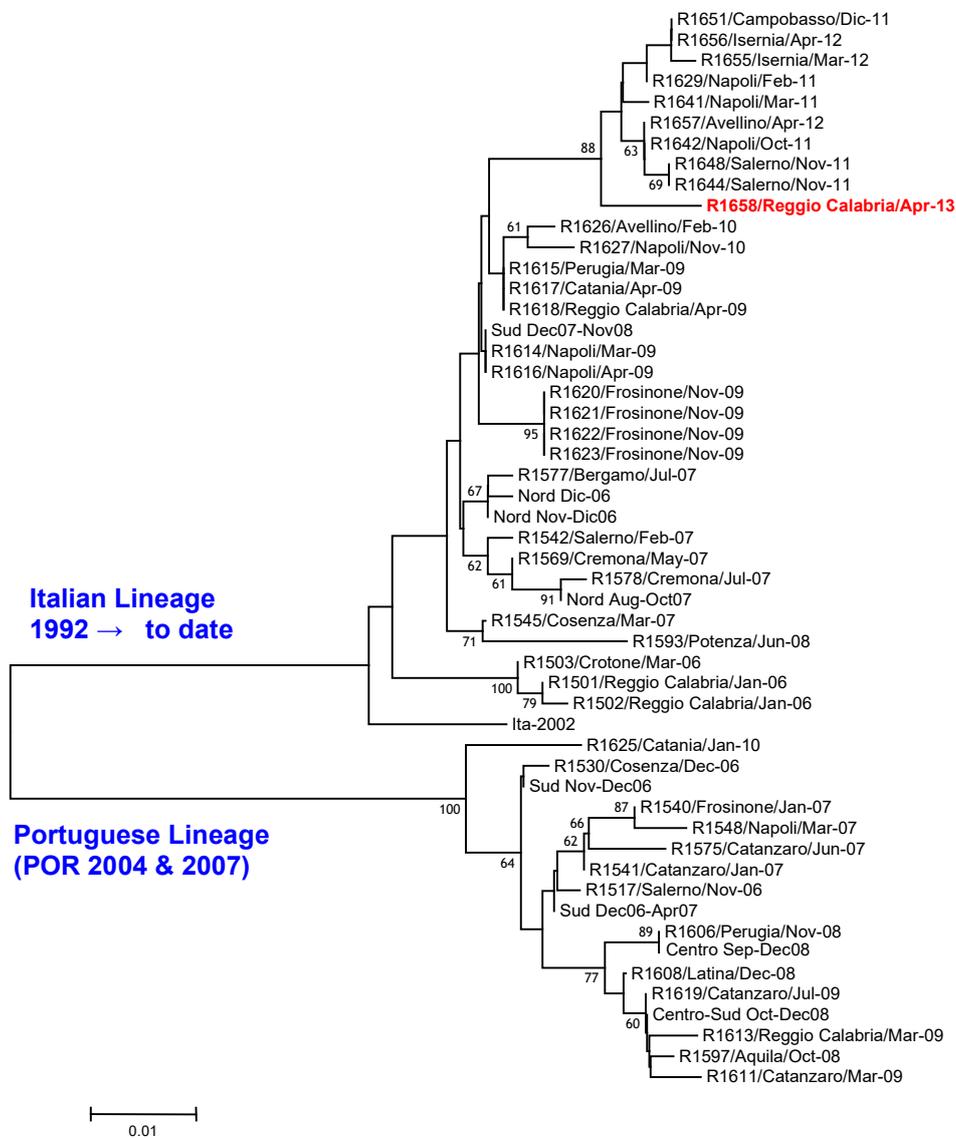
| | anno 2012 | | 1° semestre 2013 | |
|-----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | N. aziende con Singl | N. aziende vere pos | N. aziende con Singl | N. aziende vere pos |
| VALLE D'AOSTA | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PIEMONTE | 6 | 0 | 2 | 0 |
| LIGURIA | 1 | 0 | 0 | 0 |
| LOMBARDIA | 18 | 0 | 6 | 0 |
| TRENTINO ALTO-ADIGE | 1 | 0 | 0 | 0 |
| VENETO | 3 | 0 | 2 | 0 |
| FRIULI VENEZIA GIULIA | 2 | 0 | 1 | 0 |
| EMILIA-ROMAGNA | 2 | 0 | 2 | 0 |
| TOSCANA | 3 | 0 | 3 | 0 |
| UMBRIA | 5 | 0 | 2 | 0 |
| MARCHE | 2 | 0 | 1 | 0 |
| LAZIO | 7 | 0 | 0 | 0 |
| ABRUZZO | 5 | 0 | 5 | 0 |
| MOLISE | 4 | 9 | 0 | 0 |
| CAMPANIA | 1 | 16 | 0 | 1 |
| BASILICATA | 2 | 1 | 2 | 1 |
| PUGLIA | 2 | 13 | 2 | 0 |
| CALABRIA | 8 | 0 | 1 | 1 |
| SICILIA | 1 | 0 | 1 | 0 |
| SARDEGNA | 13 | 1 | 9 | 0 |
| TOTALE | 86 | 40 | 39 | 3 |

Mentre il numero di aziende con singleton reactor, rapportando all'anno anche il dato del 2013, è rimasto costante, il numero di aziende sieropositive per esposizione all'infezione continua il trend in diminuzione, essendo passato da n. 70 aziende nel 2011, a 40 nel 2012 a solo 3 nel primo semestre 2013.

La progressiva diminuzione del numero di focolai e di aziende sieropositive pone solide basi per il concreto raggiungimento dell'obiettivo di eradicazione della malattia in tutto il paese, al quale contribuiscono anche i frequenti sopralluoghi della task force attivata per accelerarne il raggiungimento.

Analisi filogenetiche. L'albero filogenetico allegato mette in evidenza (colore rosso) il posizionamento dell'unico ceppo di virus MVS, isolato in Calabria in Aprile 2013, rispetto ai virus identificati negli anni precedenti. Il virus (R1658) si posiziona nel cluster dei ceppi di lineage italiano responsabili dei focolai temporalmente più vicini (2011-2012), pur chiaramente divergendo, ma in posizione chiaramente separata dal gruppo da cui appare derivato. Questa divergenza del nuovo ceppo, identificato a distanza temporale di un anno dall'ultimo caso, suggerisce un accumulo di differenze nucleotidiche dovute presumibilmente a replicazioni virali avvenute nel corso di infezioni ripetute in passaggi animali.

Analisi filogenetica, basata sulla sequenza del gene 3D, di ceppi di MVS isolati in focolai italiani in anni recenti (2006-2013).



Attività analitica non routinaria

Come di consuetudine, oltre all'attività eseguita nell'ambito della Sanità Animale con finalità di diagnostica e/o sorveglianza, è stato eseguito un esteso numero di test analitici, che non sono registrati nell'attività routinaria, ma che vengono regolarmente effettuati nell'ambito delle attività di produzione di reagenti e kit, di ricerca e sviluppo, o nello svolgimento delle funzioni di Centro di referenza; in particolare sono stati eseguiti in numero difficilmente quantificabile ma significativamente elevato, test necessari:

- 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,
- controllo su tutti i lotti di kit prodotti con stesura dei certificati di analisi,
- costante monitoraggio della validità delle performance dei saggi diagnostici e validazione di test di nuovo sviluppo.

È 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. 156 lotti, ciascuno con test RT-PCR per i tre agenti indicati.

Nell'ambito di collaborazioni internazionali e del supporto diagnostico alla FAO, il Centro, espletando anche la funzione di centro di referenza internazionale OIE/FAO, ha eseguito analisi sierologiche specializzate su:

- 1150 sieri dall'Egitto, (programma supportato da EuFMD)
- 4500 sieri dalla Libia, esaminati nell'ambito della collaborazione stipulata tra Ministeri Italia e IZSLER a favore della Libia.

Tutti i campioni sono stati esaminati con i kit, prodotti internamente, per la ricerca di anticorpi DIVA (3ABC-trapping ELISA), e titolati per la quantificazione di anticorpi verso i sierotipi O,A, SAT2, per un totale di circa 20.500 test sierologici quantitativi.

I serosurvey in Egitto e Libia sono stati eseguiti per il monitoraggio della circolazione di virus aftosi e per la valutazione dell'immunità indotta dalla somministrazione di vaccini contenenti i sierotipi aftosi O, A, SAT2.

Inoltre nel mese di settembre sono stati eseguiti tutti i test virologici per la diagnosi di afta in 25 campioni biologici (epitelio e tamponi da vescicole, sangue) da casi sospetti inviati dalle autorità competenti della Libia (Isolamento virale, ELISA per identificazione e sierotipizzazione del virus, RT-PCR convenzionale e Real-time). Il CdR ha rapidamente confermato la diagnosi con identificazione del sierotipo O, ha trasmesso all'OIE un breve report dei risultati mantenendo una costante comunicazione con i servizi veterinari della Libia e con l'organizzazione internazionali coinvolte (FAO/EuFMD/World Reference Laboratory).

Queste attività di supporto a paesi terzi nell'ambito di programmi internazionali oltre ad avere rilevanza internazionale, consentono al CERVES di avere accesso a campioni di campo positivi e di monitorare le performance dei test in situazioni di campo.