



**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 2014
Periodo di riferimento 01/10/2013 – 30/09/2014**

Decreto 2 Novembre 1991

Documento prodotto in originale informatico firmato digitalmente ai sensi del "Codice dell'Amministrazione Digitale" D.Lgs. 82/2005 e s.m.i.

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.

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,
- potenzialità per il sequenziamento di parti genomiche dei ceppi di virus aftosi e della MVS finalizzato ad analisi filogenetiche avvalendosi della collaborazione del Reparto di Genomica;
- potenzialità di utilizzo della tecnologie NGS per la sequenziazione di genomi virali completi, grazie all'acquisizione dello strumento Illumina Myseq presso la sezione diagnostica di Parma.

Sviluppo, miglioramento e validazione di metodi diagnostici per Afta Epizootica.

E' stato sviluppato e validato nel periodo di riferimento un nuovo kit pronto-uso per la diagnostica dell'afta, che completa il portfolio dei kit già disponibili. Si tratta del kit ELISA per la determinazione di anticorpi sierotipo specifici per il tipo aftoso SAT1, che si aggiunge ai quattro kit, presentati nell'anno precedente, per la determinazione degli anticorpi verso i sierotipi O, A, Asia1 e SAT2. Anche il nuovo kit sfrutta le potenzialità degli anticorpi monoclonali, ed è stato validato con sieri sperimentali e di campo forniti dall'OIE reference Laboratory del Sud Africa, Onderstepoort. I risultati sono stati presentati all'Open Session of the Standing Technical and Research Committees of the EuFMDV – Cavtat (Croazia), 29-31 Ottobre 2014.

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.

Nell'ambito del miglioramento dei metodi diagnostici per Afta Epizootica, è stato sperimentato l'utilizzo di controlli endogeni e/o esogeni nell'esecuzione delle prove del metodo di Real time PCR per la rilevazione di tutti i sette sierotipi di Afta Epizootica (pan-FMDV Real time RT PCR). L'uso di controlli di questa tipologia è utile per valutare la presenza nelle matrici in esame di eventuali inibitori della PCR.

Sempre nell'ambito del potenziamento diagnostico per afta, il laboratorio ha a disposizione protocolli e primers per l'amplificazione ed il sequenziamento del gene codificante per la proteina capsidica VP1 del sierotipo O utilizzata per effettuare analisi filogenetiche. Prossimamente verranno allestiti protocolli e acquisiti i primers per l'amplificazione ed il sequenziamento dei geni della VP1 degli altri sei sierotipi.

Sviluppo e miglioramento di metodi diagnostici per MVS.

Come anticipato nella relazione del 2013, il metodo in Real-Time per la rilevazione del virus della MVS basato sul gene codificante per la RNA polimerasi RNA dipendente (3D) è stato validato e nel corso del 2014 sottoposto ad accreditamento

Sviluppo e miglioramento di metodi diagnostici molecolari del CERVES per analisi differenziale.

Nel corso del 2014 nell'ambito dello sviluppo e miglioramento dei metodi diagnostici molecolari del CERVES, soprattutto per ciò che concerne l'analisi differenziale da afta sono state condotte sperimentazioni preliminari per la valutazione di protocolli in Real-Time PCR e PCR convenzionale per il rilevamento del Virus della Stomatite Vescicolare.

In ambito delle attività connesse al Sistema Qualità si segnala:

- Accredimento del nuovo test realtime PCR per MVS (selezionato per la visita ispettiva esterna di Accredia);
- Revisione dei Metodi di prova ELISA per la ricerca di anticorpi verso i sierotipi aftosi O, A, Asia1, SAT2 e per la dimostrazione e sierotipizzazione di virus aftosi, per l'introduzione dei kit stabilizzati e pronto-uso in sostituzione dei test in-house più lenti e laborioso per l'approntamento delle singoli fasi di reazione;
- Mantenimento degli standard operativi conformi alla ISO17025;
- 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 **Proficiency Test internazionale annuale**, organizzato dall'EURL; la performance dei MP eseguiti con maggior frequenza è regolarmente monitorata attraverso le Carte di Controllo, che contribuiscono insieme ai controlli interni presenti in ogni reazione alla verifica dei requisiti di qualità.

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, tutti di produzione interna al Laboratorio. Il volume e la tipologia di prodotti diagnostici relativi a questo ambito copre l'attività analitica descritta al capitolo successivo;
2. reagenti diagnostici assemblati per l'esecuzione del test ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi anti-MVS, utilizzato come metodo di screening sia nel Piano Nazionale di sorveglianza/eradicazione che da alcuni Istituti stranieri;
3. kit pronto-uso per la diagnostica di afta, distribuiti all'esterno nell'espletamento delle funzioni di Centro internazionale.

In attuazione del punto 2, durante i 12 mesi di riferimento il CERVES ha prodotto e distribuito agli IZZSS territorialmente competenti reagenti/kit in quantità idonea per l'esecuzione di oltre 490.000 test ELISA screening per anticorpi anti-MVS, mantenendo il trend degli ultimi anni. 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 e corrispondente a 0,76 Euro/test, il **valore di questo servizio è quantificato in oltre 380.000 Euro.**

*Reagenti in kit per screening MVS distribuiti agli IZZSS
periodo 1 Ottobre 2013 – 30 Settembre 2014*

| | Kit distribuiti per N. test |
|---|-----------------------------|
| IZS PLV, TORINO | 45.000 |
| IZS VE, PADOVA | 60.000 |
| IZS LT, ROMA | 65.000 |
| IZS UM, PERUGIA | 57.000 |
| IZS AM, TERAMO | 35.000 |
| IZS PB, FOGGIA | 32.000 |
| IZS ME, NAPOLI | 35.000 |
| IZS CATANZARO | 24.000 |
| IZS SI, PALERMO | 15.000 |
| IZS SA, SASSARI | 125.000 |
| Totale | 493.000 |
| IZSLER, BRESCIA (<i>test effettivi</i>) | 98.944 |
| Totale complessivo | 591.944 |

Nell'ambito delle funzioni di Laboratorio di referenza OIE per la MVS, il CdR ha fornito su richiesta i reagenti per la diagnosi sierologia di MVS anche ad istituti stranieri che

regolarmente utilizzano il test OIE sviluppato dal CERVES, in particolare in Polonia e Canada.

Con riferimento alla terza tipologia di prodotti, è proseguita la produzione e distribuzione di **kit pronto-uso per diagnosi sierologica e virologica di AFTA**. Sia nell'ambito di progetti supportati da organismi internazionali (FAO, EUFMD, IAEA), che su richieste pervenute da Laboratori Nazionali di Riferenza o distributori che operano in paesi dell'Asia e dell'Africa.

La tabella successiva dettaglia i tipi, la quantità di kit distribuiti e i Paesi che li hanno ricevuti.

KIT DIAGNOSTICI AFTA PRONTO-USO prodotti presso il Reparto distribuiti nel periodo 1 Ottobre 2013 - 30 Settembre 2014, prevalentemente nell'ambito di contratti FAO/EUFMD

| 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 | Tunisia | 14 | | | 2 | | | |
| | Iran | | 100 | | | | | |
| | Pakistan | | 180 | 40 | 10 | 10 | 10 | |
| | Grecia | | 1 | | | | | |
| | Georgia (richiesti da Melissa) | | | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | Egitto | 6 | | | 1 | 1 | | 1 |
| | Algeria | 5 | | | | | | |
| | FAO | 2 | | | 1 | 1 | | 1 |
| | Training EuFMD | 10 | 1 | | | | | |
| Distribuiti su richiesta IAEA | VWR | | 10 | | | | | |
| | VWR per Nepal | | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| Distribuiti su richiesta extra EUFMD & FAO | Azerbaijan (via distributore) | | 5 | | 5 | 5 | 5 | |
| | New Zeland | | | | 6 | | | |
| | Francia | 3 | | | | | | |
| | Polonia | 1 | 1 | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | Chad | 3 | | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Bio alliance (per Pakistan) | | 1 | | 1 | | 1 | 1 |
| | Egitto (via distributori) | 7 | 1 | | 5 | 5 | | 5 |
| | IDEXX Cina | | | | 3 | 2 | 2 | |
| | Libia (fornitura gratuita) | 2 | | 1 | | | | |
| | Nigeria (fornitura gratuita) | | | | | | | 3 |
| | Russia | | 3 | | 3 | 3 | 3 | |
| TOTALE KIT DISTRIBUITI | | 53 | 305 | 47 | 44 | 34 | 28 | 15 |

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.

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 o nello svolgimento delle funzioni di Centro di riferimento internazionale.

*Numero e tipologia di esami diagnostici eseguiti al CERVES
Periodo 1 Ottobre 2013 - 30 Settembre 2014*

| MALATTIA | RICERCA | REAZIONI (N.) | | | | | TOTALE |
|----------|-------------------|---------------------------|-------------------|--------------------------|----------------------|------------------|---------|
| AFTA | Esami sierologici | ELISA O 1690 | ELISA A 1689 | ELISA Asia1 1622 | ELISA SAT2 1305 | ELISA 3ABC 80 | 6386 |
| | Esami virologici | Isol. Virale 30 | ELISA 23 | Conventional PCR 357 | Real Time PCR 48 | | 458 |
| | Esami genomici | Sequenza gene VP1 | | | | | 6 |
| MVS | Esami sierologici | ELISA screening 98.944 | ELISA IgG 1074 | ELISA IgG 1074 | SN 655 | | 101.747 |
| | Esami virologici | Isol. Virale 5 | ELISA 9 | Conventional PCR 2749 | Real Time PCR 218 | | 2981 |
| | Esami genomici | Sequenza gene 3D | | | | | 2 |
| SV | Esami sierologici | Siero Neutralizzazione | | | | | 110 |
| EMCV | Esami sierologici | ELISA | | | | | 5365 |
| | Esami virologici | Isol. Virale // | | ELISA // | PCR 267 | | 267 |

*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.

Non sono inclusi i test effettuati per l'esecuzione dei ring test.

Relativamente all'attività analitica per afta, conseguentemente all'assegnazione del Laboratorio di riferimento OIE sono stati conferiti e registrati campioni clinici sospetti dalla Tunisia e dall'Algeria, mentre non sono riportati nella attività "ordinaria" della precedente tabella le prove sierologiche eseguite su sieri conferiti da paesi stranieri. A livello nazionale la diagnostica per afta è limitata ai test sierologici effettuati prevalentemente per movimentazioni, import/export, esposizioni/fiere.

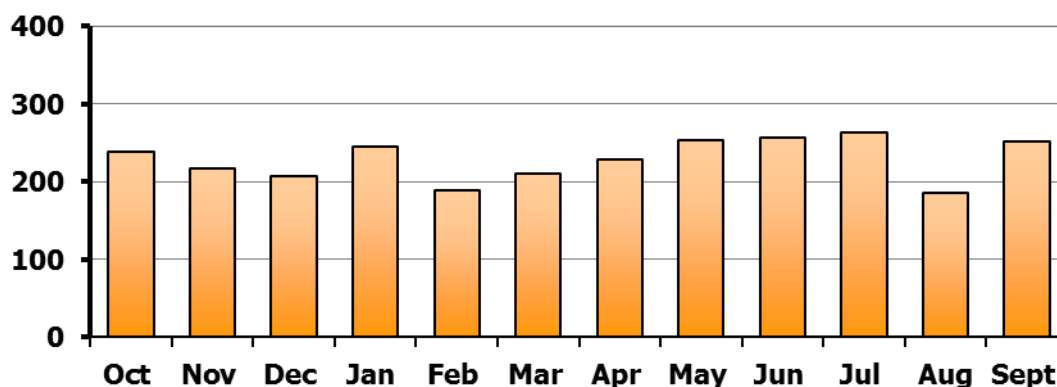
La diagnostica per la ricerca del virus dell'encefalomiocardite (EMCV) è limitata alla casistica conferita dalla sezione diagnostica di Brescia, alla quale si aggiungono nel 2014 alcuni campioni sospetti e confermati positivi conferiti dalla Spagna, evidenziando per la prima volta la presenza dell'infezione e della clinica anche in Spagna (in precedenza rilevata soltanto in Belgio, Grecia, Cipro e Italia). Il test RT-PCR ha confermato l'identificazione del virus nel 50% dei campioni suini da casi clinici sospetti, confermando l'endemicità dell'infezione nella specie suina nell'area lombarda controllata. E' 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 analitica routinaria più consistente è 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 ulteriormente diminuito 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 ai test per MVS 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 2013 - 30 Sett 2014
Test di screening (PCR) per la ricerca del virus 2.746 test*



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

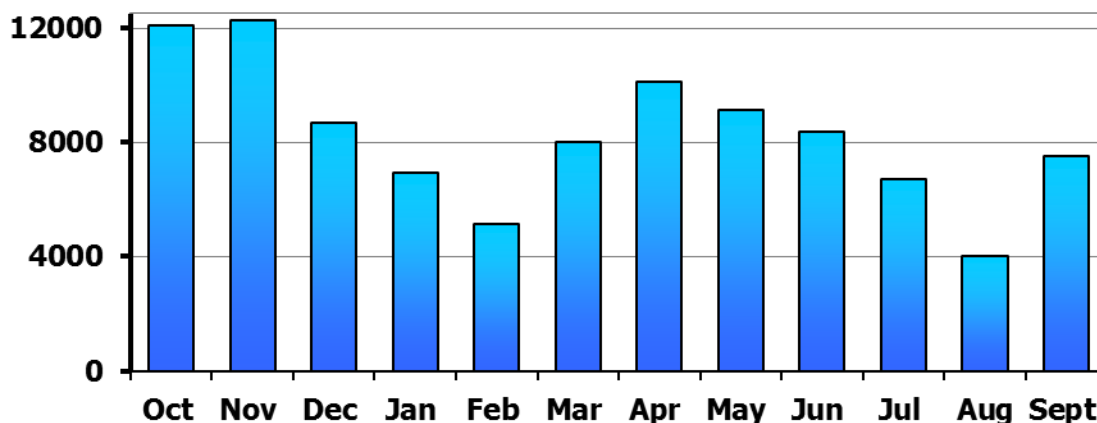
Controlli virologici per MVS eseguiti nel periodo 1 Ott 2013 – 30 Sett 2014

| 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 | 21 | 1 | | 3 | | | | | | |
| NORD OVEST | 46 | 18 | | | 1 | | | | 4 | |
| LOMBARDIA | | 109 | | | | 2 | | | | |
| EMILIA R. | 1 | 61 | | | | | | | | |
| TOSCANA | 37 | 48 | | | | | | | 3 | |
| MARCHE | 30 | 39 | | | | | 2 | | | |
| UMBRIA | 39 | 50 | | 2 | | 1 | 2 | | 10 | |
| LAZIO | 106 | 191 | | 1 | 6 | | | | 1 | |
| ABRUZZO | 34 | 66 | | | 8 | | 2 | | | |
| MOLISE | 51 | 130 | | 2 | 3 | 1 | 1 | | 2 | |
| CAMPANIA | 41 | 552 | | | 17 | 13 | 1 | | 4 | |
| BASILICATA | 42 | 85 | 10 | | 24 | 1 | 9 | | 4 | 1 |
| PUGLIA | 25 | 3 | | | 1 | | | | 1 | |
| CALABRIA | 38 | 374 | | | 43 | 1 | 4 | 1 | 2 | |
| SICILIA | 9 | 10 | | | | | | | 1 | |
| SARDEGNA | | | | | | | 4 | | | |

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 pochi campionamenti per “correlazione epidemiologica con focolaio” o “controllo in Zona di protezione/sorveglianza” sono stati eseguiti in Basilicata a seguito dell’unica positività virologica identificata in Aprile in campioni di feci ambientali prelevati in una azienda da riproduzione a ciclo aperto della provincia di Potenza.

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 nelle precedenti relazioni (vedi grafico sottostante). Il volume di attività è compreso tra 5000 e 12000 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 2013 - 30 Sett 2014
Test di screening (ELISA competitiva) per la ricerca di anticorpi anti-MVS



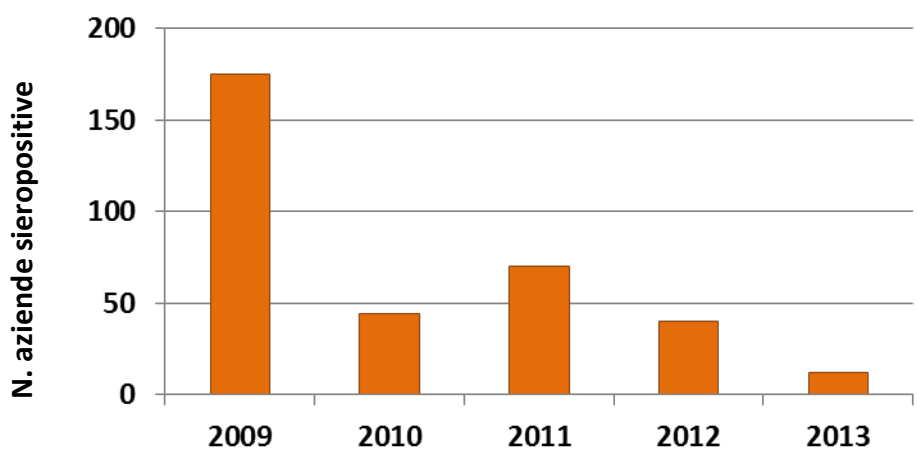
Relativamente al dato nazionale, sono stati esaminati circa 420.000 capi (aumentato di circa 10% rispetto alla annualità precedente), controllando oltre 12.000 aziende.

Monitoraggio sierologico per MVS a livello nazionale - periodo 1 Ottobre 2013 – 30 Settembre 2014

| REGIONE | N. aziende controllate | N. sieri esaminati |
|----------------|------------------------|--------------------|
| NORD OVEST | 762 | 35437 |
| NORD EST | 989 | 37078 |
| LOMBARDIA | 1198 | 64.851 |
| EMILIA-ROMAGNA | 479 | 24.009 |
| TOSCANA | 901 | 16.460 |
| UMBRIA | 682 | 14.741 |
| MARCHE | 498 | 11.159 |
| LAZIO | 401 | 11.263 |
| ABRUZZO | 366 | 9.455 |
| MOLISE | 305 | 10.925 |
| CAMPANIA | 805 | 51.286 |
| BASILICATA | 279 | 19.887 |
| PUGLIA | 581 | 5.783 |
| CALABRIA | 530 | 27.434 |
| SICILIA | na | 10575 |
| SARDEGNA | 3722 | 71.555 |
| TOTALE | 12498 | 421898 |

Mentre il numero di aziende con singleton reactor rimane costante, il numero di aziende sieropositive per esposizione all'infezione ha presentato un trend in diminuzione, essendo passato da n. 70 aziende nel 2011, a 40 nel 2012 a 12 nel 2013.

Rappresentazione del trend in diminuzione negli anni del N. di aziende sieropositive per MVS



La progressiva diminuzione del numero di focolai e di aziende sieropositive pone solide basi per il concreto raggiungimento della eradicazione della malattia nel paese, alla quale contribuiscono anche i sopralluoghi della task force attivata per accelerarne il conseguimento.

Tuttavia, persistono evidenze di comportamenti non conformi sia nelle modalità di campionamento che nelle movimentazioni animali e nei criteri di biosicurezza che inficiano il raggiungimento dell'obiettivo.

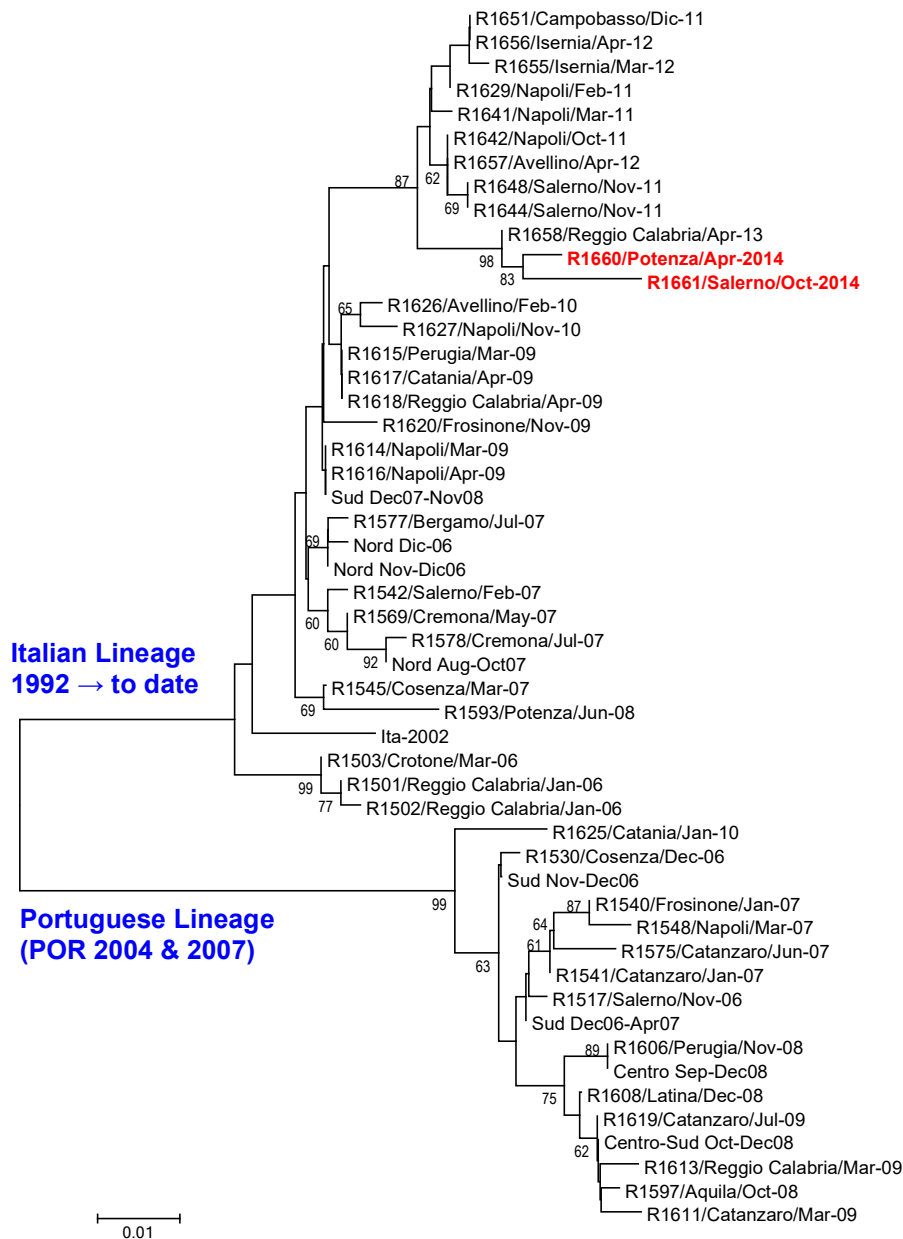
Analisi filogenetiche

L'albero filogenetico evidenzia la presenza in anni recenti di due sub-lineaggi genomici, denominati rispettivamente "Italiano" e "Portoghese"; il primo presente ed evoluto in Italia dal 1992, il secondo definito "portoghese" perché individuato in Portogallo (anni 2003 e successivamente 2007) temporalmente prima che in Italia (primo riscontro nel 2004). Sulla base della regione genomica 3D i due ceppi virali identificati nel 2014 si collocano nel lineaggio italiano, presentando la maggiore similitudine con il virus isolato nel 2013 (R1658/Reggio Calabria-Aprile 2013).

Analisi genetiche più approfondite e rivolte anche ad altre regioni genomiche (5'UTR e VP1) hanno messo in evidenza una interessante osservazione di carattere scientifico sull'evoluzione virale: alcuni ceppi, classificati nel lineaggio Italiano sulla base della regione 3D, risultano invece appartenenti al lineaggio Portoghese rispetto alle nuove regioni analizzate, suggerendo un possibile evento di ricombinazione tra i ceppi dei due lineaggi circolanti sul territorio Italiano. Il sequenziamento completo del genoma di alcuni isolati rappresentativi, ottenuto grazie all'utilizzo delle nuove tecnologie di Next Generation Sequencing (NGS), ha confermato l'evento di ricombinazione, sulla base del quale i ceppi ricombinanti presentano la regione delle proteine capsidiche di un lineaggio e quella delle proteine non strutturali dell'altro lineaggio.

Tutti e tre i ceppi più recenti (anni 2013 e 2014) appartengono al gruppo dei virus ricombinanti, rafforzando la correlazione già evidenziata attraverso l'analisi filogenetica basata sulla regione 3D.

Analisi filogenetica, basata sulla sequenza del gene 3D, di 2 ceppi di MVS isolati nel 2014, in relazione ai ceppi identificati in focolai italiani di recenti anni precedenti (2006-2013).



Attività analitica non routinaria

Nell'ambito di cooperazioni internazionali e del supporto diagnostico alle organizzazioni internazionali, il Centro, espletando anche la funzione di centro di referenza internazionale OIE/FAO, ha eseguito l'attività analitica riferita a test diagnostici di laboratorio per afta sui campioni di seguito dettagliati.

Test virologici per conferma sospetto e caratterizzazione isolati:

- 15 campioni sospetti comprendenti tessuto, liquido o tamponi vescicolari, o sangue, inviati dalle autorità competenti della Libia.
- 5 omogenati epitelio vescicolare, inviati dalle autorità competenti della Tunisia, per conferma diagnostica.
- 4 campioni di epitelio vescicolare, inviati dalle autorità competenti della Algeria

I campioni sono stati esaminati con tutte le prove diagnostiche disponibili, comprendenti: ELISA per identificazione e sierotipizzazione del virus, Isolamento virale, RT-PCR convenzionale e due Real-time RT-PCR. Il CdR ha rapidamente confermato la diagnosi con identificazione del sierotipo O, ed eseguito sui campioni dalla Tunisia e dall'Algeria la sequenziazione della VP1 per l'analisi filogenetica. I report dettagliati dei risultati sono stati prontamente trasmessi alle autorità competenti dei Paesi interessati e alle organizzazioni internazionali (OIE/FAO/EuFMD), oltre che per conoscenza al ministero italiano, mantenendo con tutti una costante comunicazione.

Le sequenze e tutti i virus isolati sono stati inviati al World Reference Laboratory, Pirbright, UK, per alimentare la collezione mondiale e per l'esecuzione delle prove di vaccine matching.

Test sierologici:

- 600 sieri inviati dalla Libia come ultima tranche del serosurvey 2013, esaminati nell'ambito della collaborazione stipulata tra Ministero e IZSLER a favore della Libia
- 68 sieri prelevati da animali presenti in sospetti focolai di ottobre-novembre 2014.
- 120 sieri prelevati da animali presenti in sospetti focolai di aprile 2014.

Tutti i suddetti 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 3200 test sierologici quantitativi.

Queste attività di supporto a paesi terzi nello svolgimento delle funzioni di CdR internazionali OIE/FAO o nell'ambito di programmi di cooperazione, oltre ad avere rilevanza internazionale, consentono al CERVES di avere accesso a campioni di campo positivi e di monitorare le performance dei test.

Come ogni anno va segnalato che, oltre all'attività eseguita nell'ambito della Sanità Animale con finalità di diagnostica e/o sorveglianza, un esteso numero di test analitici viene regolarmente effettuato per scopi diversi, nell'ambito delle attività di produzione e controllo di reagenti e kit, attività di ricerca e sviluppo, attività di validazione di nuovi o

migliorati test diagnostici, attività di preparazione di ring test nazionali ed esecuzione di proficiency test internazionali.

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 circa 170 lotti, ciascuno con test RT-PCR per i tre agenti indicati.