



**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 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 2016
Periodo di riferimento 01/10/2015 – 30/09/2016**

Decreto 2 Novembre 1991

*Documento prodotto in originale informatico firmato digitalmente (dott.ssa Emiliana Brocchi)
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 sono soggetti a verifica annuale nel corso dei Proficiency Test internazionali. I test di Sieroneutralizzazione e Real Time RT-PCR per Stomatite Vescicolare sono verificati mediante circuito interlaboratorio biennale organizzato dal EURL (ANSES, Francia).

Tutte le prove diagnostiche basate su metodiche ELISA sono state sviluppate dal Centro di Referenza, con l'utilizzo di anticorpi monoclonali prodotti e caratterizzati nell'arco di anni, che apportano miglioramento in termini di standardizzazione e innovazione. Le metodiche sono state sottoposte a processo di validazione riconosciuto a livello internazionale. Il Manuale OIE riconosce le variazioni metodologiche che contemplano l'utilizzo di anticorpi monoclonali, quindi i test in uso presso il CERVES non deviano rispetto ai riferimenti normativi.

Inoltre, tra le tecnologie diagnostiche più avanzate, Il CERVES dispone di:

- test per la determinazione del profilo antigenico degli isolati di Afta, MVS e EMC utilizzando pannelli caratterizzati di anticorpi monoclonali,
- sequenziamento di parti genomiche dei ceppi di virus aftosi e della MVS finalizzato ad analisi filogenetiche, avvalendosi della collaborazione del Reparto di Genomica;
- NGS per la sequenziazione di genomi virali completi, avvalendosi della collaborazione della Sezione Diagnostica di Parma dove è in funzione lo strumento Illumina Myseq.

Sviluppo, miglioramento e validazione di metodi diagnostici per Afta Epizootica

I metodi ELISA per la diagnostica di afta, che comprendono una gamma di test sierologici per la dimostrazione di anticorpi sierotipi-specifici e DIVA e il test per la dimostrazione e sierotipizzazione di virus aftosi in campioni clinici, vengono prodotti dai Laboratori afferenti al CERVES sotto forma di kit stabili e pronto-uso. Ne beneficiano sia l'attività diagnostica del CERVES che, a livello globale, i numerosi Paesi che ne fanno richiesta.

Durante il 2016, il kit ELISA per la dimostrazione e sierotipizzazione di virus aftosi è stato modificato nel layout, riunendo in un unico kit la sierotipizzazione di sei sierotipi. Nel nuovo format il kit "IZSLER" è stato valutato in parallelo con il test ELISA convenzionale del World Reference Laboratory (UK), basato su sieri policlonali, esaminando ulteriori 132 ceppi aftosi rappresentativi dei sei sierotipi e comprensivi di isolati recenti: i risultati hanno indicato performance significativamente superiori per il kit IZSLER, sia in termini di capacità di

riconoscere gli isolati soprattutto per i sierotipi O e A, sia in termini di valori amplificati della reazione che di assenza di cross-reazioni tra sierotipi.

Sviluppo e miglioramento di metodi diagnostici per MVS

Nel periodo rendicontato è stata condotta la validazione del metodo Real-Time RT-PCR modificato per sostituire l'utilizzo della sonda TaqMan, che può fallire nel riconoscimento di alcuni ceppi mutati nella regione target, con il metodo di rilevazione basato su sybrgreen. Il metodo si avvale della coppia di primer già estensivamente validati e affidabili nella rilevazione di tutti i ceppi di MVS, escludendo la necessità di una terza sonda. Il metodo è stato valutato per la sensibilità analitica, riuscendo a rilevare fino a 10 TCID₅₀/ml, e per la specificità e sensibilità diagnostica. Sono stati valutati in parallelo con la RT-PCR convenzionale 300 campioni di campo, provenienti per la maggior parte da zone indenni da MVS, tutti i campioni in entrambe le metodiche sono risultati negativi. Sono stati testati 52 campioni positivi provenienti da focolai dichiarati di MVS, tutti sono risultati conformi all'atteso.

La validazione ha dato esiti soddisfacenti, pertanto si intende richiedere la revisione del test Realtime RT-PCR accreditato basato su sonda TaqMan.

Messa a punto di metodi molecolari per diagnosi differenziale

E' stato esteso il pannello di test diagnostici molecolari per diagnosi differenziale di malattie vescicolari, che comprende:

Stomatite Vescicolare. È stato codificato il test realtime PCR per la rilevazione e caratterizzazione del virus della Stomatite Vescicolare con chimica TaqMan.

Ectima contagioso. Entrambe le metodiche molecolari valutate per il rilevamento del virus dell'Ectima contagioso, PCR di tipo convenzionale e realtime con sybrgreen, hanno dato risultati promettenti; il metodo è pronto per passare alla codifica con introduzione nell'uso corrente.

Lumpy Skin Disease. In seguito all'allerta derivata dai casi di LSD in Paesi della UE e dei Balcani, è stato implementato un nuovo metodo per la rilevazione dei capripox virus, consistente nella Real Time PCR (con chimica TaqMan).

In ambito delle attività connesse al Sistema Qualità:

- Non sono state effettuate revisioni sostanziali dei Metodi di Prova esistenti; unici aggiornamenti hanno riguardato i riferimenti normativi;
- Ha ricevuto la qualifica di accreditamento il metodo Realtime RT-PCR per la diagnosi di afta (con predisposizione del protocollo e report di validazione);
- E' stato steso e codificato il MP interno per il rilevamento dei virus della Stomatite Vescicolare con metodica Realtime RT-PCR;
- Sono mantenuti gli standard operativi conformi alla ISO17025, come verificato attraverso Verifica Ispettiva Interna ed Esterna (Accredia);
- Tutti i Metodi di Prova per Afta, MVS e SV sono stati sottoposti durante il 2016 a verifica attraverso i **Proficiency Test internazionali**, organizzati dai rispettivi EURL;

- Le performance dei MP eseguiti con maggior frequenza sono regolarmente monitorate attraverso le Carte di Controllo, che contribuiscono insieme ai controlli interni presenti in ogni reazione, alla verifica dei requisiti di qualità.

Produzione e distribuzione di reagenti

Test ELISA per lo screening sierologico previsto dal Piano Nazionale di sorveglianza/eradicaione della MVS

Durante il periodo di riferimento il CERVES ha prodotto e distribuito agli IZZSS territorialmente competenti reagenti/kit in quantità idonea per l'esecuzione di oltre 576.000 test ELISA screening per anticorpi anti-MVS, a cui si aggiungono quelli per i test eseguiti direttamente dal CERVES per le regioni di competenza e per le conferme, per un totale complessivo di circa **577.000 analisi**, in lieve aumento rispetto all'anno precedente. Si sottolinea che da più di 20 anni, cioè dall'implementazione del Piano nazionale di sorveglianza per MVS, il kit è **distribuito gratuitamente agli IZZSS**; utilizzando come stima il prezzo di listino (corrispondente a 0,76 Euro/test) applicato dall'Istituto per forniture extra-nazione oltre che per la rendicontazione economica del Ministero alla Commissione Europea, che ha cofinanziato il Piano fino all'anno scorso, il **valore economico di questo servizio di produzione è quantificato in circa 440.000 Euro**, rappresentando un importante risparmio per il sistema veterinario nazionale.

Reagenti in kit per screening MVS distribuiti agli IZZSS periodo 1 Ottobre 2015 - 30 Settembre 2016

	Kit distribuiti per N. test
IZS PLV, TORINO	50.000
IZS VE, PADOVA	70.000
IZS LT, ROMA	40.000
IZS UM, PERUGIA	45.000
IZS AM, TERAMO	30.000
IZS PB, FOGGIA	22.000
IZS ME, NAPOLI	60.000
IZS CATANZARO	56.000
IZS SI, PALERMO	23.000
IZS SA, SASSARI	180.000
Totale	576000
IZSLER, BRESCIA	101.000
Totale complessivo	677.000

Kit pronto-uso per la diagnostica di afta, distribuiti a livello internazionale nell'espletamento delle funzioni di Centro di Referenza internazionale

Il pannello di **kit pronto-uso** di nuova generazione prodotti dal Centro per la diagnostica **AFTA** comprende:

- un kit ELISA basato su una batteria di anticorpi monoclonali tipo-specifici per la diagnosi in campioni clinici con identificazione del sierotipo
- cinque kit ELISA sierologici, rispettivamente per la ricerca di anticorpi anti-SP verso i sierotipi O, A, Asia1, SAT1, SAT2
- un kit ELISA per la dimostrazione di anticorpi marker di infezione (DIVA)

Si è consolidata la forte richiesta dei suddetti kit, con estensione dell'interesse anche da parte di nuovi Paesi/Laboratori Nazionali, inclusi Laboratori di Stati FMD-free che probabilmente intendono aggiornare la propria capacità diagnostica per affrontare eventuali emergenze.

La capacità di mettere a punto e produrre kit diagnostici di nuova generazione, alcuni dei quali esclusivi, rappresenta un carattere distintivo di questo Centro di Referenza e porta all'Istituto e alla nazione visibilità e riconoscimento di competenze tecnico-scientifiche.

La tabella successiva riporta il dettaglio dei kit distribuiti (in numero totale di 1068 kit diversificati nelle varie tipologie) nel periodo di riferimento della presente relazione.

*KIT DIAGNOSTICI AFTA PRONTO-USO prodotti presso il Reparto
e distribuiti nel periodo 1 Ottobre 2015 - 30 Settembre 2016*

Paese Beneficiario	TEST VIROLOGICI			NSP Ab ELISA KIT	TEST SIEROLOGICI				
	FMDV antigen detection ELISA				3ABC	SP Antibody ELISA Kit			
	type O, A, SAT1, SAT2	type O, A, C, Asia1	type O, A, C, Asia1, SAT1-2			FMDV O	FMDV A	FMDV Asia1	FMDV SAT2
EUFMD/Rome					3	3	1	1	1
Nepal		3							
Algeria	1			4		3			
Slovenia					1				
Taiwan		1	1		3	2	2		
Grecia		3			2	2	2		
Afghanistan		3		5					
N. 6 Paesi Balcani		6			6	6	6		
Cina		14		6	443	277	86		
Pakistan					11	10	10		
Nuova Zelanda	1	1			1	1		1	
Kenya	5			3					
Marocco				7					
Kuwait		3							
Mongolia		12							
Cipro	2	2							
Estonia	2	2							
Georgia					2	2	2		
Egitto	15	4			9	9		9	
Korea del sud	3	3			2				
Svizzera	1	1							
Israele	3	3		2	2	2	2	2	
Vietnam		5	6						
Hong Kong		1							
Bulgaria		1			1	1	1		
Oman			3					5	
Romania			2		1	1	1		
Uganda			2						
Remesa (Magreb)					3	3			
Totale N. kit	33	68	14	27	490	322	113		1

2) Attività analitica routinaria (e cenni epidemiologici)

Nelle tabelle successive si riportano, suddivisi per le principali tipologie di test, i dati dell'attività analitica.

*Numero e tipologia di esami diagnostici eseguiti al CERVES
Periodo 1 Ottobre 2015 - 30 Settembre 2016*

MALATTIA	RICERCA	REAZIONI (N.)							TOTALE
AFTA	Esami sierologici	ELISA O	ELISA A	ELISA Asia1	ELISA SAT2	Sieroneutralizzazione O A		ELISA DIVA 3ABC	6470
		1559	1191	1030	1145	976	8	561	
	Esami virologici	Isol. Virale		ELISA		Conventional PCR		Real Time PCR	421
		29		14		346		51	
MVS	Esami sierologici	ELISA screening		ELISA IgG		ELISA IgM		SN	101.944
		100.278		563		564		539	
	Esami virologici	Isol. Virale		ELISA		Conventional PCR		Real Time PCR	2676
		21		17		2630		8	
SV	Esami sierologici	Siero Neutralizzazione							30
	Esami virologici	PCR							1
EMCV	Esami sierologici	ELISA							2183
	Esami virologici	PCR							297

* I test PCR includono i controlli interni delle cappe biologiche e cappe PCR, effettuati con frequenza trimestrale per escludere contaminazioni da virus aftosi e della MVS, oltre a controlli in convenzione su un farmaco di origine suina.

Diagnostica Afta. A livello nazionale la diagnostica per afta è limitata ai test sierologici effettuati prevalentemente per movimentazioni, import/export, esposizioni/fiere; solo due casi sospetti in Lombardia sono stati gestiti con prove virologiche nel periodo di rendicontazione; altri test virologici sono riferiti ai campioni dei proficiency test internazionali, mentre la maggior parte dei test PCR sono effettuati come controlli interni sulla strumentazione per assicurare assenza di contaminazione o per prove in convenzione eseguite su prodotto farmaceutico.

Con riferimento ad attività diagnostica su campioni di provenienza straniera, sono presenti nella tabella alcune prove in PCR eseguite su campioni algerini e prove sierologiche con ELISA e Sieroneutralizzazione per virus di sierotipo O, su sieri provenienti da trial di vaccinazione per valutare la cross-protezione conferita da vaccini eterologhi nei confronti dei virus O/Ind-2001 circolante nel Maghreb.

Diagnostica Encefalomiocardite virale: la ricerca del virus dell'encefalomiocardite (EMCV) è effettuata su campioni sospetti conferiti dalla sezione diagnostica di Brescia, mentre altri sospetti, benchè con minor frequenza, sono gestiti direttamente dalle sezioni diagnostiche territorialmente competenti, di Mantova, Lodi, Parma e Reggio Emilia. I test RT-PCR effettuati presso il laboratorio del CERVES hanno confermato l'identificazione del virus in 63 campioni suini da casi clinici sospetti su 124 conferiti, confermando l'endemicità dell'infezione nella specie suina nell'area geografica di competenza.

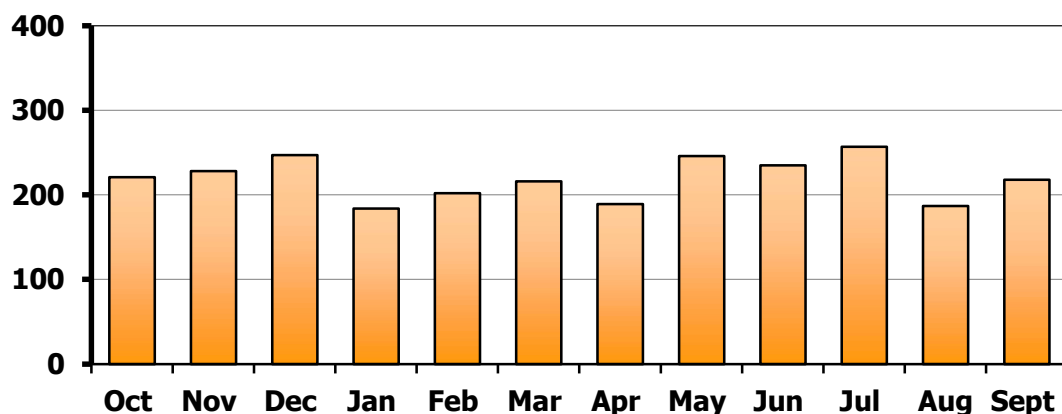
E' continuato il riscontro di sieropositività per EMCV, eseguito con test ELISA in-house, sia in allevamenti suini che in cinghiali catturati durante la stagione di caccia in Lombardia ed Emilia Romagna, confermando circolazione del cardiovirus anche in specie selvatiche. Sfruttando la disponibilità di sieri campionati nell'ambito del Piano nazionale MVS è stato eseguito, come parte degli obiettivi di una ricerca corrente, un monitoraggio sierologico più esteso con l'inclusione di allevamenti problema e allevamenti senza segnalazioni per valutare attraverso la presenza di anticorpi anti-EMCV la diffusione del virus. Sono stati esaminati 12.000 sieri da 403 aziende suinicole della Lombardia ed Emilia Romagna, campionati nel primo semestre 2016. I risultati sono stati paragonati con quelli di un analogo studio retrospettivo eseguito nel 2010 in 607 allevamenti della medesima area. I risultati del monitoraggio hanno evidenziato un aumento della proporzione di aziende con riscontro di sieropositività dal 54% nel 2010 al 73% nel 2016; un trend in aumento della sieroprevalenza intra-allevamento; livelli di sieropositività non significativamente dissimili tra aziende focolaio e allevamenti senza segnalazione di manifestazioni cliniche.

Diagnostica MVS: Il programma di sorveglianza nazionale è stato sostanzialmente confermato per il 2016, pertanto il numero complessivo e la frequenza mensile dei test rispecchiano l'andamento degli anni precedenti.

Di seguito vengono riportati i dati analitici relativi ai diversi test.

Test virologici MVS. Il CERVES ha eseguito per tutto il territorio nazionale un numero complessivo di 2630 test in PCR con frequenza media mensile di circa 200 test (comprensivi dei controlli interni per esclusione di contaminazione negli strumenti di laboratorio e alcune analisi private su farmaco).

Frequenza dei test virologici per MVS nel periodo 1 Ott 2015 - 30 Sett 2016
Test di screening (PCR) per la ricerca del virus - 2.630 test



Controlli virologici inerenti il Piano nazionale MVS suddivisi per regione di provenienza dei campioni

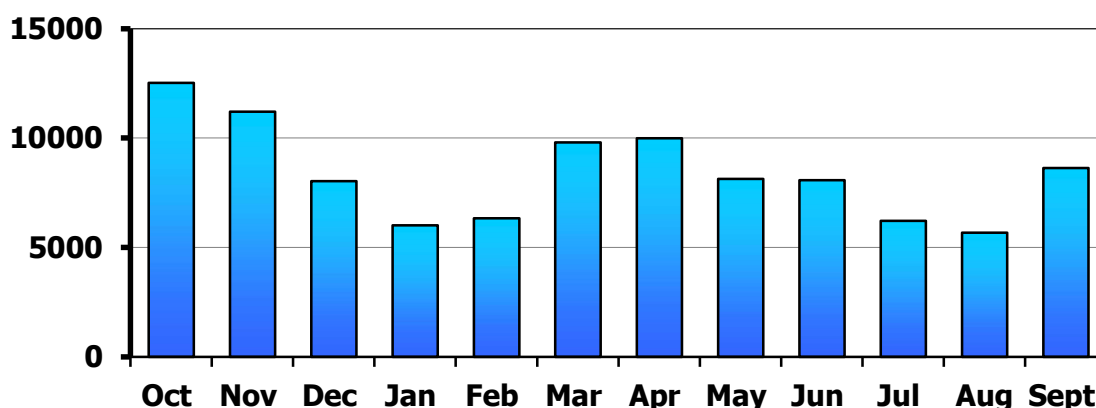
REGION	Italia settentrionale				Italia centrale						Italia meridionale				Isole	
	NORD EST	NORD OVEST	LOMBARDIA	EMILIA R.	TOSCANA	MARCHE	UMBRIA	LAZIO	ABRUZZO	MOLISE	CAMPANIA	BASILICATA	PUGLIA	CALABRIA	SICILIA	SARDEGNA
N. tests	85	24	110	48	77	65	96	354	132	172	283	115	22	621	15	3

* Dati aggiornati al 30/09/2016 ad eccezione del Molise aggiornato al 30/06/2016

Monitoraggio sierologico MVS. Gli esami sierologici di screening eseguiti presso il CERVES sono quelli relativi alla sorveglianza nei territori di competenza IZSLER (Lombardia ed Emilia Romagna). Confermando il trend degli anni precedenti, il volume di attività è oscillato tra 5000 e 12000 test/mese in relazione ai periodi in cui sono programmati i campionamenti semestrali delle aziende da riproduzione a cicli aperto.

E' diminuito il numero di campioni che hanno richiesto test di conferma (livello nazionale) tramite Sieroneutralizzazione e determinazione della classe immunoglobulinica, in concomitanza con la diminuzione dei riscontri di sieropositività al test di screening.

Frequenza dei test sierologici per MVS eseguiti dal laboratorio del CERVES
Test di screening (ELISA competitiva) per la ricerca di anticorpi anti-MVS



Relativamente al dato nazionale, con il contributo degli IZZSS territorialmente competenti, sono stati esaminati 394.181 capi, da circa 10.000 aziende.

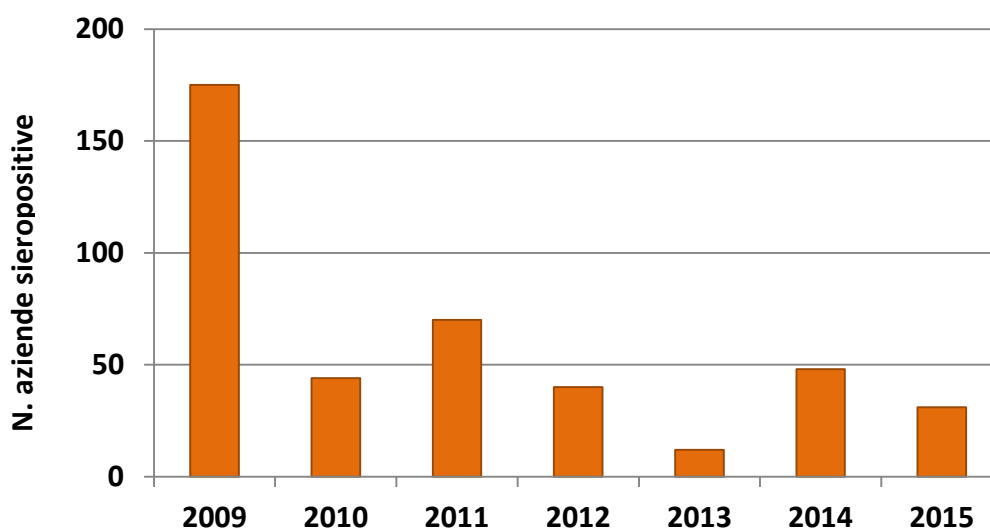
Monitoraggio sierologico per MVS a livello nazionale - periodo 1/10/2015 – 30/9/2016

REGIONE	N° aziende controllate	N° sieri esaminati
Nord Est	715	35.878
Nord Ovest	952	38.991
LOMBARDIA	1107	64.257
EMILIA R.	453	24.749
TOSCANA	733	12.417
MARCHE	381	8.922
UMBRIA	620	13.273
LAZIO	375	11.342
ABRUZZO	478	11.832
MOLISE	322	9.831
CAMPANIA	762	5.2129
BASILICATA	313	13.768
PUGLIA	570	5.039
CALABRIA	519	22.711
SICILIA	888	12.458
SARDEGNA	unknown	56.584
TOTALE	9188	394.181

* Dati aggiornati al 30/09/2016 ad eccezione del Molise aggiornato al 30/06/2016

Escludendo le aziende con singleton reactor che rimangono in numero proporzionalmente costante, il numero di aziende sieropositive per esposizione all'infezione si mantiene dal 2012 sotto la soglia di 50; sono state solo 31 nel 2015, ed è di rilievo l'osservazione che nel primo semestre del 2016 solo 3 aziende familiari (2 in provincia di Reggio Calabria e 1 in provincia di Benevento) hanno presentato al controllo sieropositività con anticorpi di classe IgG.

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



La bassa sieroprevalenza confinata nelle regioni Campania e Calabria, riscontrata negli anni più recenti, suggerisce che, benché l'infezione non sia ancora completamente eradicata, la diffusione del virus è ormai estremamente limitata, e a conferma di questo stato epidemiologico nessun focolaio è stato diagnosticato nell'anno rendicontato, attraverso la sorveglianza attiva per la ricerca del virus nelle stalle di sosta e negli allevamenti da ingrasso ad elevato turn over.

Attività analitica non routinaria

Particolarmente intensa è stata l'attività analitica per la produzione di sequenze parziali o totali del genoma dei virus di interesse del CERVES.

Questa attività rientra prevalentemente tra i programmi di ricerca del CERVES (vedi oltre), ed è in parte svolta anche nelle funzioni di Laboratorio di Referenza Internazionale OIE/FAO per afta e per MVS.

Numero e tipologia di sequenze prodotte

Periodo 1 Ottobre 2015 - 30 Settembre 2016

Agente virale	Metodo classico Sanger	NGS – Genoma completo
Afta	22 (VP1)	17 (ceppi Algerini e Tunisini)
MVS	//	156 (collezione isolati italiani)
EMCV	50 (VP1) – 51 (3D)	//
LSD	2	//

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 sviluppo, ottimizzazione, validazione o miglioramento di test diagnostici, attività di preparazione di ring test (sia nazionali che internazionali).