



**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 2017**

**Periodo di riferimento 01/10/2016 – 30/09/2017**

**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

#### **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. 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 per le reazioni di sequenziazione;
- Next Generation Sequencing (NGS) per la sequenziazione di genomi virali completi, avvalendosi della collaborazione della Sezione Diagnostica di Parma dove è in funzione lo strumento Illumina Myseq. È utile rilevare come questo strumento di approfondita caratterizzazione dei virus, seppur non utilizzato come mezzo diagnostico, stia divenendo indispensabile per l'attività di ricerca e sviluppo del CERVES, ma anche in considerazione del livello di approfondimento che viene richiesto ai laboratori internazionali.

#### **Sviluppo, miglioramento e validazione di metodi diagnostici per Afta Epizootica**

Metodi ELISA: Tutti i metodi immunoenzimatici (ELISA) sono eseguiti con kit di nuova generazione per la diagnostica di afta, stabilizzati e all-inclusive, prodotti dai laboratori del Reparto in cui insiste in CERVES; come da Tabella 1a questi comprendono una gamma di cinque kit sierologici per la dimostrazione di anticorpi sierotipi-specifici verso i sierotipi O, A, Asia1, SAT1 e SAT2, un kit sierologico DIVA per la differenziazione tra vaccinati e infetti, e il kit per la diagnosi virologica, attraverso dimostrazione e sierotipizzazione di virus aftosi in campioni clinici e/o colture cellulari. Dell'utilizzo di kit stabili e pronto-uso ne beneficiano, in termini di standardizzazione, rapidità, semplificazione e pronta-disponibilità, sia l'attività diagnostica del CERVES che, a livello globale, i numerosi Paesi che ne fanno richiesta.

Durante il periodo di questa rendicontazione,

- È stato reso disponibile un nuovo kit pronto-uso derivato dalla trasformazione e stabilizzazione del test in-house per anticorpi anti-FMDV SAT1;
- In collaborazione e parternship con World Reference Laboratory (WRL, Pirbright, UK) è progredito il processo di validazione continua dell'unico kit ELISA pronto-uso disponibile globalmente per la dimostrazione e sierotipizzazione di virus aftosi, con acquisizione di risultati derivati dall'esame di ulteriori 216 ceppi aftosi appartenenti ai diversi sierotipi, sia selezionati dalla collezione storica depositata allo WRL che isolati negli ultimi 2-3 anni, quindi rappresentativi dei ceppi attualmente circolanti: i risultati hanno confermato performance significativamente superiori per il kit IZSLER rispetto al test in-house storico.
- È stato impostato ed è in corso in collaborazione con WRL lo studio del livello di cross-reattività sierologica tra anticorpi dei diversi sierotipo aftosi identificati tramite i kit ELISA-IZSLER.

Metodi molecolari: poiché la sequenziatura di parti e tutto il genoma virale è uno strumento di approfondimento importante per un centro di referenza,

- è stata estesa la gamma di test specifici per la sequenziatura della regione VP1 di tutti i principali sierotipi e varianti;
- inoltre, sono state poste le basi per il metodo di amplificazione di genomi completi basato su tecnologia SISPA (Sequence-Independent Single-Primer-Amplification), per ottenere amplicon di cDNA in grado di coprire l'intero genoma, finalizzato alla successiva sequenziatura. Poiché la piattaforma Illumina MiSeq per il NGS non è disponibile all'interno dei laboratori ad elevato contenimento, il pre-ottenimento di amplificati costituiti da cDNA è l'unico mezzo possibile per esternalizzare materiali in sicurezza (assenza di residui rischi di infettività) destinati ai test di sequenziatura.

### **Sviluppo e miglioramento di metodi diagnostici per MVS**

Nel periodo rendicontato è stata completata la validazione del metodo Real-Time RT-PCR revisionato 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.

La validazione ha dato esiti soddisfacenti, oltre che per le performance diagnostiche anche in termini di ripetibilità e riproducibilità; pertanto il metodo revisionato, per il quale è stato steso il report di validazione ed esteso il rispettivo accreditamento, è stato introdotto nell'uso corrente.

### **In ambito delle attività connesse al Sistema Qualità:**

- Non sono state effettuate modifiche sostanziali per Metodi di Prova esistenti, ad eccezione del metodo Realtime RT-PCR interno per la diagnosi di Malattia

Vescicolare, che è stato revisionato per la sostituzione del rilevamento mediante sonda TaqMan con il fluoroforo Sybergreen;

- Sono mantenuti gli standard operativi conformi alla ISO17025, come verificato attraverso Verifica Ispettiva Interna;
- Tutti i Metodi di Prova per Afta, MVS e SV sono regolarmente sottoposti a verifica attraverso il **Proficiency Test internazionali**, organizzato 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/eradicatione 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 445.000 test ELISA screening per anticorpi anti-MVS, a cui si aggiungono quelli per i test eseguiti direttamente dal CERVES per le due regioni di competenza e per le conferme, per un totale complessivo di circa **535.000 analisi**, mantenendo sostanzialmente costante questa tipologia di produttività.

E' questa un'occasione per ribadire che sono ormai circa 25 anni, cioè dall'implementazione del Piano Nazionale di sorveglianza per MVS, che il kit per il test di screening sierologico prodotto dal CERVES viene **distribuito gratuitamente agli IZZSS, rappresentando sicuramente un servizio unico e di maggior durata rispetto a ogni altro Centro di Referenza Nazionale.**

Utilizzando come stima il prezzo di listino (corrispondente a 0,76 Euro/test) applicato dall'Istituto per forniture internazionali, oltre che per la rendicontazione economica che il Ministero ha sottoposto alla Commissione Europea per tutti gli anni in cui il Piano è stato cofinanziato, il **valore economico di questo servizio di produzione è quantificato in circa 410.000 Euro/anno**, rappresentando un importante risparmio per il sistema veterinario nazionale.

*Reagenti per screening MVS distribuiti agli IIZZSS  
periodo 1 Ottobre 2016 - 30 Settembre 2017*

	Kit distribuiti per N. test
IZS PLV, TORINO	50.000
IZS VE, PADOVA	60.000
IZS LT, ROMA	30.000
IZS UM, PERUGIA	30.000
IZS AM, TERAMO	25.000
IZS PB, FOGGIA	22.000
IZS ME, NAPOLI	70.000
IZS CATANZARO	48.000
IZS SI, PALERMO	20.000
IZS SA, SASSARI	90.000
<b>Totale</b>	<b>445.000</b>
IZSLER, BRESCIA	90.000
<b>Totale complessivo</b>	<b>535.000</b>

*Reagenti e Kit pronto-uso per la diagnostica di afta, prodotti dal Centro di Referenza*

Con riferimento alla disponibilità di reagenti e kit per diagnostica di afta, il laboratorio ha sviluppato e mantiene la capacità di produrre un range di kit ELISA di nuova generazione, pronto-uso, basati su reagenti auto-prodotti, e di distribuirli globalmente. Il pannello di kit attualmente disponibili copre la diagnostica dei sei principali sierotipi aftosi e include:

- FMDV Antigen Detection ELISA and serotyping (O, A, Asia1, C, SAT1 and SAT2): si tratta di un kit ELISA basato su una batteria di anticorpi monoclonali tipo-specifici per la diagnosi in campioni clinici con identificazione del sierotipo
- 3ABC-TRAPPING ELISA for antibodies to FMDV NSP (anticorpi marker di infezione)
- Competitive ELISA for antibodies specific to FMDV serotype O
- Competitive ELISA for antibodies specific to FMDV serotype A
- Competitive ELISA for antibodies specific to FMDV serotype Asia 1
- Competitive ELISA for antibodies specific to FMDV serotype SAT 1
- Competitive ELISA for antibodies specific to FMDV serotype SAT 2

Si è consolidata la forte richiesta dei suddetti kit, che durante gli ultimi due anni sono stati distribuiti in oltre 50 Paesi nel mondo, prevalentemente in regioni endemiche, ma anche in alcuni paesi EU e non-EU FMD-free; i kit sono stati impiegati per i Proficiency test annuali, non solo dal Centro di referenza nazionale, ma anche in alcuni altri LNR.

La capacità di mettere a punto e produrre kit diagnostici di nuova generazione, alcuni dei quali esclusivi, rappresenta un altro 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 nel periodo di riferimento della presente relazione; si tratta, come nell'anno precedente, di circa 1000 kit distribuiti in 45 diversi paesi nel mondo, ed è in corso una valutazione per l'introduzione in Kazakistan di un kit sierologico per il piano nazionale di post vaccination monitoring.

*KIT DIAGNOSTICI AFTA PRONTO-USO prodotti presso il Reparto  
e distribuiti nel periodo 1 Ottobre 2016 - 30 Settembre 2017*

Paese Beneficiario	TEST VIROLOGICI	TEST SIEROLOGICI					
	FMDV antigen detection ELISA type O, A, C, Asia1, SAT1-2	NSP Ab ELISA KIT	SP Antibody ELISA Kit				
		3ABC	FMDV O	FMDV A	FMDV Asia 1	FMDV SAT2	FMDV SAT1
Camerun	1						
Slovenia				1	1	1	
Nuova Zelanda	1			1	1	1	
Spagna	1			1			
Turchia			1	1	1		
Egitto		20					
Oman	2	3					
Georgia			3	3	3		
UAE			26	26			
Giappone	3		1	1	1		
Lettonia	1		1	1	1	1	
Afghanistan	10		4	4		4	
Myanmar	11	4	7	1	1	1	
Taiwan	1		1	1			
Georgia	1		2	2	17		
Libano	2						
Arabia Saudita	12						
Corea del sud	11						
Nepal	7						
Russia	1		3	3	2		
Etiopia			1	1	1	1	
Brasile	1						
Pakistan	75	10	18	17	17		
Mauritius	1						
Cina	5		280	140	10		
Algeria	6	20	5	5			
Kazakistan			1	1	1		
Senegal	1						
Romania		1					
Svezia	1						
Tunisia	1		1	1			
Mongolia	10		5	4	4		
Sudan	4		3	3	3	3	
Irlanda	1		1	1	1	1	
Turchia	6		3	3	4		
Belgio	1					2	
Croazia	1		1	1	1	1	
Polonia	1		1	1	1	1	
Nigeria	2	1	1	1			
Singapore	1		1	1	1		
Israele	5		1	1	1		
Lituania	1						
Kenya	9	4	4	4		4	4
FAO per training	3	4	2	1	1		
The PI			4	4	4	4	
<b>TOTALE</b>	<b>201</b>	<b>67</b>	<b>382</b>	<b>236</b>	<b>78</b>	<b>25</b>	<b>4</b>

Altri reagenti strategici auto-prodotti sono disponibili presso il laboratorio del CERVES, in particolare:

- Anticorpi monoclonali (MAb): il laboratorio ha una consolidata esperienza nella produzione di MAb e possiede la più vasta collezione di MAb e relativi ibridomi, ottenuti verso svariate varianti e sierotipi di virus aftosi così come verso diverse varianti antigeniche del virus MVS. MAb accuratamente selezionati nel corso di ricerche sono utilizzati nello sviluppo dei kit diagnostici;
- Proteine non-strutturali dei virus aftosi ottenute per via ricombinante, utilizzate per valutare il profilo della risposta immune in animali infetti;
- Antigeni dei virus MVS e dei vari sierotipi aftosi: il laboratorio dispone delle infrastrutture e della capacità di produrre antigeni inattivati con BEI, correntemente utilizzati come reagenti diagnostici e nella produzione dei kit pronto-uso.

Infine il laboratorio del CERVES mantiene una collezione di ceppi aftosi dei sette sierotipi (ad oggi composta da 225 ceppi di afta tipo A, 188 tipo O, 111 tipo C, 30 tipo Asia 1, 16 tipo SAT1, 6 tipo SAT2 e 2 tipo SAT3), così come una ampia collezione di ceppi di MVS (oltre 1.000, rappresentativi di diversi lineaggi antigenici e genetici, dalla scoperta della malattia nel 1966 ad oggi).



**Attività analitica routinaria**

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

*Numero e tipologia di esami diagnostici eseguiti dal CERVES su campioni sottoposti al laboratorio per scopi diagnostici - Periodo 1 Ottobre 2016 - 30 Settembre 2017*

MALATTIA	RICERCA	REAZIONI (N.)							TOTALE
AFTA	Esami sierologici	ELISA O	ELISA A	ELISA Asia1	ELISA SAT2	Sieroneutralizzazione O	A	ELISA DIVA 3ABC	4062
		1015	1015	1015	1011	6	6	6	6
	Esami virologici	Isol. Virale		ELISA	Conventional PCR		Real Time PCR	270	
		15		14	138		103		
MVS	Esami * sierologici	ELISA screening		ELISA IgG	ELISA IgM		SN	89.570	
		87.458		704	704		704		
	Esami virologici	Isol. Virale		ELISA	Conventional PCR		Real Time PCR**	3.005	
		6		3	2496		500		
SV	Esami sierologici	Siero Neutralizzazione							63
	Esami virologici	PCR							0
EMCV	Esami sierologici	ELISA							3804
	Esami virologici	PCR							435

\* Rispetto agli esami sierologici per MVS, i test ELISA screening si riferiscono a campioni delle regioni Emilia Romagna e Lombardia mentre gli altri test sono effettuati per approfondimento e conferma su sieri da tutto il territorio nazionale.

\*\* Benché non ufficialmente registrati nel sistema informativo dell'IZSLER e non riportati nei rapporti di Prova, circa 500 campioni sono stati esaminati parallelamente con i test conventional PCR e Real Time PCR per MVS, per la fase di validazione delle performance diagnostiche del metodo revisionato.

I test PCR includono i controlli interni delle cappe biologiche, cappe PCR e incubatori, effettuati con frequenza mensile per escludere contaminazioni da virus aftosi e MVS, oltre a 152 prove eseguite in convenzione per una ditta farmaceutica per i controlli di qualità su un farmaco ad uso umano di derivazione suina.

In tabella non sono inclusi i test effettuati sui campioni dei proficiency test internazionali.

**Diagnostica Afta.** A livello nazionale la diagnostica per afta è limitata ai test sierologici effettuati per movimentazioni, import/export, esposizioni/fiere; nessun caso sospetto è stato sottoposto ad accertamenti di laboratorio nel periodo di rendicontazione; la maggior parte dei test PCR sono effettuati come controlli interni sulla strumentazione per assicurare assenza di contaminazione.

Gli esami virologici per afta comprendono l'attività diagnostica sui campioni sospetti inviati dall'Algeria al laboratorio di referenza OIE, mentre gli esami sierologici eseguiti su campioni dall'estero per specifici programmi di cooperazione sono trattati nel paragrafo dell'attività analitica non routinaria.

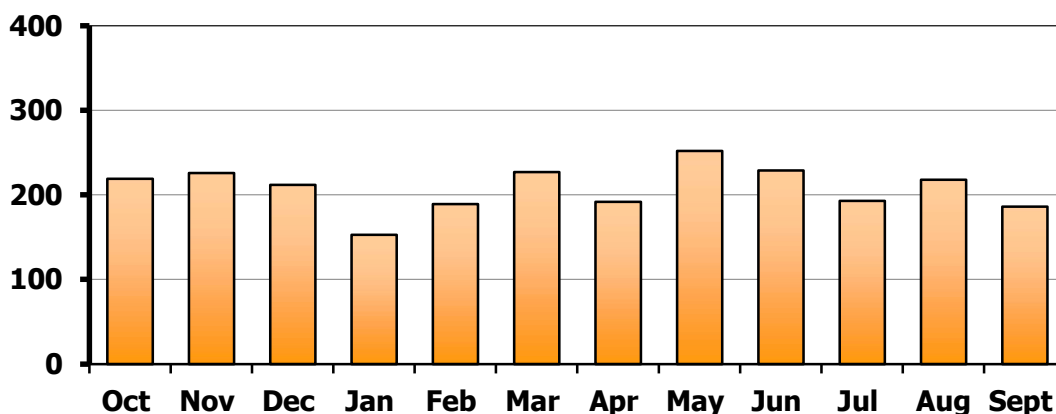
**Diagnostica Encefalomiocardite virale:** la ricerca del virus dell'encefalomiocardite (EMCV) è effettuata su campioni sospetti conferiti dalle sezioni diagnostiche di Brescia e Cremona, mentre altri sospetti, benché con minor frequenza, sono gestiti direttamente dalle sezioni diagnostiche territorialmente 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 129 conferimenti su 214 sospetti sottoposti; il livello di endemicità dell'infezione nella specie suina nell'area geografica di competenza è mantenuto e i danni rilevanti subiti in alcuni allevamenti con alto tasso di mortalità e recidive inducono una domanda crescente di vaccino stabulogeno.

È 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. Inoltre, come parte degli obiettivi di una ricerca corrente, è stato portato a termine un monitoraggio sierologico a posteriori, eseguito sfruttando la disponibilità di sieri campionati per il Piano nazionale MVS, per valutare attraverso la presenza di anticorpi anti-EMCV la diffusione del virus. Con i test completati nel 2017 sono stati esaminati in totale circa 20.000 sieri da 700 aziende suinicole della Lombardia ed Emilia Romagna, prelevati durante il 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, già parzialmente riportati nella precedente relazione, hanno evidenziato un aumento della proporzione di aziende con riscontro di sieropositività dal 54% nel 2010 al 76% nel 2016, con un parallelo lieve aumento della sieroprevalenza intra-allevamento: nella maggioranza delle aziende con sieropositività la prevalenza è risultata nel range 5-50% e supera il 50% solo nel 15% delle aziende sieropositive. È significativo il riscontro di livelli di sieropositività simili tra aziende focolaio e allevamenti senza segnalazione di manifestazioni cliniche, dato che sostanzia la circolazione anche subclinica del virus EMCV.

**Diagnostica MVS:** Il programma di sorveglianza nazionale è stato sostanzialmente confermato per il 2017, 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.

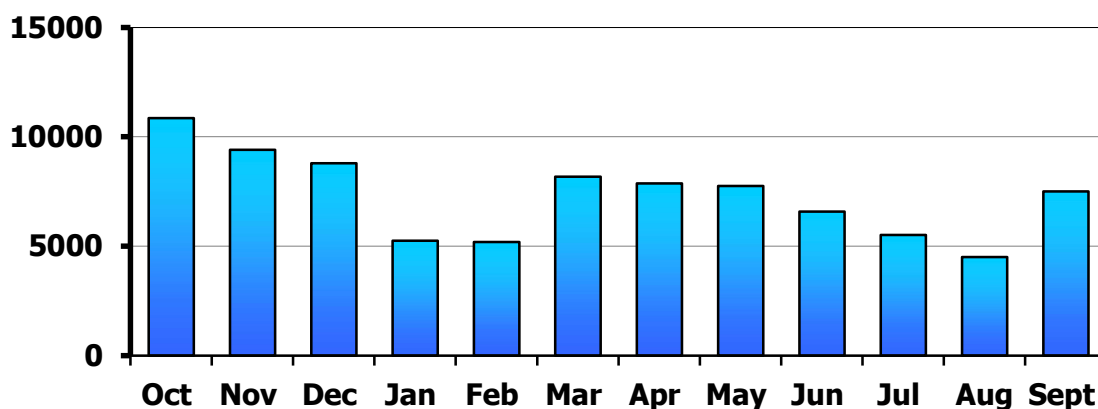
*Frequenza mensile dei test virologici per MVS eseguiti al CERVES  
(PCR, 2.496 test totali, inclusi controlli interni strumentazione)  
periodo 1 Ott 2016 - 30 Sett 2017*



*Conferimenti virologici (solo Piano nazionale MVS) suddivisi per regione di provenienza*

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. conferimenti	25	74	115	32	66	69	147	340	117	148	555	106	28	198	14	2

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



I dati di frequenza mensile dei test sopra-riportati si riferiscono alle prove eseguite su campioni dei territori Lombardia ed Emilia Romagna.

Relativamente al dato nazionale, con il contributo degli IZZSS territorialmente competenti, sono stati esaminati 377.213 capi, da circa 10.000 aziende.

*Monitoraggio sierologico per MVS a livello nazionale - periodo 1/10/2016 – 30/9/2017*

REGIONE	N° aziende controllate	N° sieri esaminati
Nord Est	776	40.321
Nord Ovest	893	38.058
LOMBARDIA	897	53.226
EMILIA R.	494	25.654
TOSCANA	697	13.288
MARCHE	371	10.839
UMBRIA	487	14.910
LAZIO	399	10.655
ABRUZZO	424	12.756
MOLISE	254	11.812
CAMPANIA	720	48.061
BASILICATA	321	12.833
PUGLIA	560	4.362
CALABRIA	421	18.808
SICILIA	888	12.768
SARDEGNA	1513	49.563
<b>TOTALE</b>	<b>10115</b>	<b>377.213</b>

**Attività analitica non routinaria**

Oltre all'attività svolta nell'ambito della Sanità Animale con finalità di diagnostica e/o sorveglianza, il CERVES esegue ogni anno un vasto numero di test analitici non rendicontati nel sistema informativo ma regolarmente effettuati per scopi diversi, ad esempio:

- titolazioni e verifiche nell'ambito delle attività di produzione e controllo di reagenti e kit,
- preparazione dei certificati di analisi dei prodotti (kit diagnostici),
- attività di sviluppo, ottimizzazione, validazione o miglioramento di test diagnostici,
- attività di preparazione e controllo dei campioni destinati a Proficiency test.

Conferme diagnostiche e caratterizzazioni virali su campioni conferiti dall'Algeria. Nel 2017 sono stati sottoposti a conferma diagnostica per afta campioni sospetti spediti dall'Algeria, in due conferimenti distanziati di una settimana, il primo con iniziale diagnosi positiva per tipo A e il secondo (provincia Setif) con iniziale diagnosi positiva per tipo SAT 1. L'urgenza di confermare l'introduzione di nuovi virus aftosi nel Maghreb, dopo l'ondata epidemica 2014-2015 causata dal virus esotico FMDV O/Ind-2001, e fornire al tempo stesso evidenze sulla loro origine attraverso analisi filogenetica, ha rappresentato per il CERVES l'occasione di mettere

a prova il proprio Laboratory Contingency Plan. In entrambi i casi, con il coordinamento del CERVES i campioni sono pervenuti all'aeroporto di Bergamo in 24 ore dalla spedizione e, dopo le immediate verifiche sanitarie e doganali, sono stati ritirati da personale IZSLER già pronto in aeroporto. I campioni sono stati consegnati al Laboratorio alle ore 16 pomeridiane ed immediatamente processati per l'esecuzione di tutti i test diagnostici, con presenza di personale in orari notturni, seguiti da sequenziazione genomica per una approfondita caratterizzazione dei virus riscontrati. Nel tempo record di 24 ore per il primo conferimento e 48 ore per il secondo, il Laboratorio ha prodotto alle autorità coinvolte e organizzazioni internazionali interessate (OIE, FAO, EUFM, Commissione EU e Ministero Italiano) il report con i risultati delle conferme diagnostiche, dell'isolamento virale e analisi filogenetiche, che hanno permesso di identificare nei campioni di entrambi i conferimenti virus aftoso tipo A, topotipo A/Africa G-IV, e individuare come ceppi filogeneticamente più vicini (98% identità) i virus di sierotipo A isolati in Nigeria nel 2015.

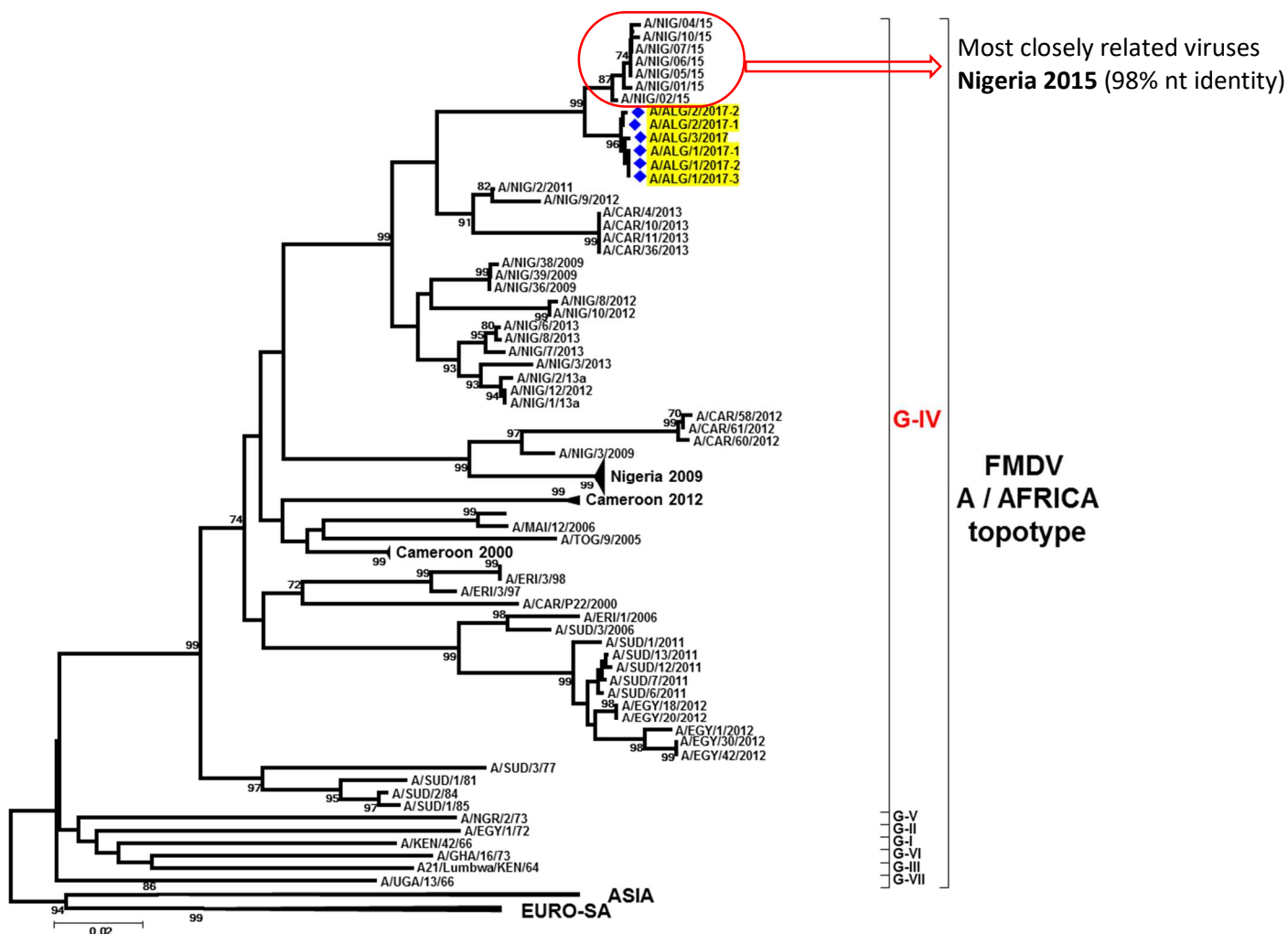
Seguono i risultati essenziali (test diagnostici e analisi filogenetica) di questa attività.

*Test diagnostici eseguiti su campioni sospetti afta conferiti da Algeria e risultati*

ORIGIN	Sample ID	Quality Quantity	ELISA (IZSLER kit)	Real-time PCR Pan-FMD		VIRUS ISOLATION LFBK* IBRS2 BHK21	Sent to Pirbright	VP1 PCR for sequence
				3D	5'UTR			
RELIZANE	6437	sufficient	+ type A	+	+	+ A 1 <sup>st</sup> pass	2 <sup>nd</sup> pass LFBK	+ A
	6837			+	+			+ A
	5279			+	+			+ A
MEDEA	26BV11032	sufficient	+ type A	+	+	+ A 1 <sup>st</sup> pass	2 <sup>nd</sup> pass LFBK	+ A
	26BV11034		+ type A	+	+			+ A
SETIF	659-2017	poor	not done	+	+	+ A 1 <sup>st</sup> pass	2 <sup>nd</sup> pass	+ A (- SAT1)

\* La linea cellulare LFBK si è dimostrata più veloce nella generazione di effetto citopatico, tuttavia i virus sono stati isolati da tutte le tre linee cellulari.

*Analisi filogenetica dei ceppi virali riscontrati nei campioni conferiti da Algeria (in evidenza)*



Produzione di sequenze. 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 specifico capitolo), ed è in parte svolta anche in funzione del 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 10	10 (VP1 – campioni Algerini)	4 campioni Algerini Tipo A
MVS	52	21
EMCV	50	//
LSD	25 (clonaggi)	//
Camelpox	6 (clonaggi)	//

Analisi sierologiche.

Nell'anno in corso, su richiesta di cooperazione al Centro di Referenza OIE/FAO FMD da parte del laboratorio nazionale del Kenya (ILRI), sono stati esaminati 1.535 sieri in titolazione verso 4 diversi sierotipi virali (O, A, SAT1 e SAT2) e per la determinazione di anticorpi differenziali tra infezione e vaccinazione (anti-NSP). Le finalità sono state: valutazione della risposta anticorpale, in coorti identificate, alla somministrazione di vaccino tetravalente prodotto in Kenya, e indagine su sierotipi presenti in una regione colpita da focolai. Questa attività ha comportato l'esecuzione di oltre 7.500 analisi sierologiche quantitative, suddivise come mostrati in tabella, con relativa elaborazione dei risultati.

*N. sieri (1.535 in totale) dal Kenya sottoposti a titolazione anticorpale*

Finalità	SP-O	SP-A	SP-SAT1	SP-SAT2	NSP
<b>Vaccine trial <sup>1)</sup></b>	<b>736</b>	<b>736</b>	<b>736</b>	<b>736</b>	<b>736</b>
<b>Determinazione sierotipo (Narok County) <sup>2)</sup></b>	<b>799</b>	<b>799</b>	<b>799</b>	<b>799</b>	<b>799</b>

- 1) Valutazione efficacia vaccino tetravalente, misurata in:
  - 92 bovini prelevati sequenzialmente 0, 2, 4, 7, 10, 16 settimane post vaccinazione e 2 settimane post vaccinazione booster
- 2) Determinazione della diversità di sierotipi circolanti attraverso la misura del livello di anticorpi reattivi con i quattro sierotipi virali.