



**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 2019

Periodo di riferimento 01/10/2018 – 30/09/2019

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, riferimenti normativi specifici.

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 sono coerenti con i riferimenti normativi.

Rispetto al Sistema Qualità:

- sono mantenuti gli standard operativi conformi alla ISO17025, come verificato attraverso le regolari Verifiche Ispettive Interne ed esterne effettuate dall'Ente accreditante nazionale (Accredia), entrambe effettuate con cadenza annuale;
- tutti i Metodi di Prova per Afta, MVS e SV sono regolarmente sottoposti 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 costante dei requisiti di qualità.

Il CERVES dispone di tecnologie avanzate, utili ad integrare i metodi diagnostici standard, in particolare:

- metodiche 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, virus MVS e virus EMCV, 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 Miseq. 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

Presso il CERVES lo sviluppo, implementazione, miglioramento e validazione di nuovi metodi diagnostici è una attività continua, che rappresenta un aspetto caratterizzante del Centro.

Queste attività sono parzialmente contemplate all'interno di progetti di R&S e generano impatto positivo in termini di riconoscimento internazionale delle competenze e di visibilità.

Segue descrizione degli elementi affrontati nell'anno di rendicontazione.

Kit ELISA per diagnostica AFTA: i vari kit di nuova generazione, stabilizzati e all-inclusive, sviluppati e in uso presso il CERVES e distribuiti globalmente, sono soggetti a validazione continua.

Ad esempio, durante il periodo di riferimento di questo report:

- i kit per l'identificazione e titolazione di anticorpi sierotipo-specifici sono stati valutati per la capacità di misurare la risposta a vari vaccini, somministrati a gruppi di animali diversificati per specie, età e stato immunitario, confrontando il risultato con quello fornito dal test di Sieroneutralizzazione, applicato come gold standard per la valutazione dell'immunità protettiva.
- le performance del kit ELISA per dimostrazione e tipizzazione di virus aftosi in campioni clinici sono state valutate presso il CERVES su campioni di epitelio vescicolare sospetti, raccolti in Tanzania negli anni 2015-2018, confrontandole con quelle di altri metodi a disposizione (isolamento e realtime RT-PCR). È altresì continuato presso FMD World Reference Laboratory l'utilizzo del kit per l'identificazione dei virus nei campioni sottoposti da svariati paesi endemici permettendo il monitoraggio costante della capacità del kit di riconoscere i virus circolanti.

Sieroneutralizzazione per anticorpi verso Seneca Valley Virus: è stato implementato un test sierologico per la rilevazione di anticorpi specifici verso il virus di recente identificazione Seneca Valley Virus, responsabile di forme vescicolari nei suini in Canada, Stati Uniti, Sud America e Paesi dell'estremo oriente. Grazie alla disponibilità di sieri positivi di campo e sperimentali, richiesti al NRL canadese, il test di sieroneutralizzazione è stato standardizzato e successivamente applicato su un numero cospicuo di sieri suini italiani, dimostrandone la negatività. Unitamente al test realtime RT-PCR per la rilevazione del virus, implementato l'anno scorso, il CERVES dispone ora della diagnostica essenziale per riconoscere prontamente il virus in caso di introduzione nella nazione e per eventuali diagnosi differenziali.

Metodi molecolari: Nuovi sviluppi relativi a metodi diagnostici basati sull'identificazione di acidi nucleici hanno riguardato le applicazioni di seguito descritte.

- *Realtime RT-PCR per rilevazione del virus della Encefalomiocardite (EMCV)*: il test, messo a punto nell'ambito del Progetto di ricerca corrente PRC2013/001, è stato utilizzato in parallelo al MP correntemente in uso basato su RT-PCR

- convenzionale per risolvere casi dubbi. Il nuovo metodo, completamente validato, ha i requisiti per sostituire il test convenzionale.
- *Pannello di Realtime RT-PCR specifiche per alcuni sierotipi di virus aftosi*: cinque diverse realtime RT-PCR sono state implementate per la tipizzazione dei virus aftosi dei sierotipi O, A, SAT1 e SAT2 circolanti in Africa orientale. I test sono topotipo-specifici, quindi definiscono il sierotipo e al contempo il topotipo dei virus, pur con il limite di riconoscere solo quelli presenti nel pool endemico 4 circolante in Africa orientale. Un'altra realtime RT-PCR è stata sviluppata per diagnosticare ed identificare in modo esclusivo il topotipo virale O/EA-3, attualmente circolante nel pool virale 5 presente in Africa occidentale, in occasione dell'attività diagnostica richiesta al lab OIE/FAO su campioni ricevuti da Algeria e Libia nel 2019.
 - *Realtime RT-PCR per ricerca di virus aftosi applicata a campioni libici inattivati, depositati su FTA card*: l'utilizzo di FTA card per l'invio in sicurezza di campioni sospetti inattivati dalla Libia ha rappresentato l'occasione per sperimentare l'applicazione dei test realtime RT-PCR pan-afta e topotipo-specifici su questa tipologia di materiali. I test sono risultati positivi sui campioni del 2019 e negativi per quelli predisposti nel 2018, indicando uno stato di conservazione dell'RNA virale sufficiente a permettere l'amplificazione di frammenti target, idonei per diagnosi e sequenziazione del gene VP1, pur per tempi di stoccaggio non superiori a qualche mese.
 - *Estrazione di acidi nucleici automatizzata*: nei laboratori ad alto contenimento è stato implementato l'uso di un estrattore automatico per acidi nucleici (KingFisher Duo Prime), che permette di processare 12 campioni alla volta con tecnologia basata su biglie magnetiche. Lo strumento permette una diminuzione degli step di manipolazione, con riduzione del rischio di contaminazione tra campioni, oltre a riduzione dei tempi di esecuzione. Questi vantaggi, unitamente alla possibilità di processare un maggior numero di campioni, sono particolarmente utili in caso di emergenza.
 - *Controlli interni*: L'amplificazione del gene della beta-actina come controllo endogeno nelle reazioni di Realtime RT-PCR è stata sperimentata e verrà implementata nella reazione per Afta epizootica (MP09/260), è prevista nella Realtime RT-PCR messa a punto per EMCV ed è inclusa nel metodo interno per la rilevazione del virus della Stomatite vescicolare. Si sta inoltre cercando di produrre un controllo esogeno costituito da RNA trascritto in vitro secondo quanto messo a punto dal centro di collaborazione OIE sulla Validazione, Sistema di qualità e controlli dei test diagnostici e dei vaccini per le malattie vescicolari in Europa (Istituto SCIENSANO, Belgio).

Test rapido multiplex per la diagnosi e tipizzazione di virus dell'Afta (tramite LFD): gli anticorpi monoclonali selezionati per il kit ELISA sono stati utilizzati per lo sviluppo di due prototipi di test pen-side, basati su tecnica Lateral Flow, che permettono in un unico dispositivo la rivelazione simultanea di diversi target. In particolare, un

prototipo di LFD permette l'identificazione e la tipizzazione dei sierotipi di FMDV O, A e Asia 1, un altro dei sierotipi SAT 1 e SAT 2; inoltre, entrambi i dispositivi contengono una reazione pan-afta, oltre al test di controllo che ha lo scopo di garantire la validità del test. In prove preliminari, i prototipi di test rapido hanno correttamente identificato i campioni analizzati, attraverso la colorazione specifica della linea di test in corrispondenza del sierotipo omologo, mentre è stata osservata la sola linea di controllo nei campioni negativi o positivi per altri virus o sierotipi.

Produzione e distribuzione di reagenti

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

Essendo stato prorogato il Piano Nazionale di sorveglianza della MVS con le medesime modalità degli anni precedenti, è continuata nell'annualità di riferimento di questa relazione la produzione del kit ELISA per anticorpi anti-MVS, sia distribuito a 10 IIZZSS in quantità idonea per l'esecuzione di circa 480.000 test che utilizzato direttamente dal CERVES per le due regioni di competenza (Lombardia ed Emilia-Romagna) e per le conferme, per un totale complessivo di **555.000 analisi**. Il volume di questa importante produzione si è mantenuto sostanzialmente costante negli ultimi 10 anni (come anche evidenziabile dal grafico riferito al numero di animali esaminati annualmente a livello nazionale, visibile più avanti).

Dal 1995 il kit per il test di screening sierologico prodotto dal CERVES viene **distribuito gratuitamente agli IIZZSS**; si ritiene importante sottolineare che, 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 oltre 400.000 Euro/anno**.

Reagenti per screening MVS distribuiti agli IIZZSS periodo 1 Ottobre 2018 - 30 Settembre 2019

Istituto/Laboratorio	Kit distribuiti per N. test
IZS PLV, TORINO	60.000
IZS VE, PADOVA	80.000
IZS LT, ROMA	30.000
IZS UM, PERUGIA	45.000
IZS AM, TERAMO	35.000
IZS PB, FOGGIA	27.000
IZS ME, NAPOLI	50.000
IZS CATANZARO	48.000
IZS SI, PALERMO	15.000
IZS SA, SASSARI	90.000
Totale	480.000
IZSLER, BRESCIA	75.003
Totale complessivo	555.003

Nella funzione di laboratorio di referenza OIE per MVS, i reagenti specifici per esecuzione del test sierologico di referenza e di test ELISA per identificazione dell'antigene MVS sono stati distribuiti anche a livello internazionale, in Russia, Canada, Polonia, Svezia, Taiwan, Brasile.

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

Con il contributo essenziale dei laboratori di biotecnologie del reparto a cui afferisce il Centro di Referenza, è stato sviluppato negli anni un range di 7 diversi kit ELISA, sia sierologici che virologici, per la diagnostica dell'afta; si tratta di kit di nuova generazione, pronto-uso, basati su reagenti auto-prodotti.

Il pannello di kit attualmente disponibili copre la diagnostica dei 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 uno spettro di anticorpi monoclonali tipo-specifici, idoneo per la diagnosi rapida con identificazione del sierotipo in campioni di epitelio vescicolare.
- 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

A livello nazionale la diagnostica per afta è confinata al CERVES, quindi non è prevista la distribuzione di reagenti ad altri IZZSS, se non nell'ambito di ring test finalizzati al mantenimento delle competenze dei laboratori che potranno coadiuvare il CERVES in caso di emergenze nazionali.

Diversamente, nel ruolo di Centro Internazionale di Referenza (OIE/FAO) per l'afta, il Laboratorio ha distribuito globalmente i suddetti kit in 53 diversi paesi nel mondo, in numero di 2074 nell'arco temporale di rendicontazione. Poiché l'arco temporale non corrisponde all'anno solare ma è a cavallo tra due anni consecutivi, il confronto tra anni non rispecchierebbe la reale pianificazione e uso da parte degli utilizzatori, tuttavia è sicuramente consolidata la richiesta in molte regioni endemiche del kit più strategico, ad oggi esclusivamente prodotto dal CERVES, per la diagnosi e tipizzazione della malattia; si tratta di un kit semplice e robusto nell'esecuzione, che ha creato capacità diagnostica in molti paesi, ma particolarmente complesso nella produzione per la varietà di reagenti strategici e unici (anticorpi monoclonali selezionati) che lo compongono.

I kit sierologici sono invece utilizzati per valutazione dell'immunità vaccinale, della copertura vaccinale, del livello di circolazione virale o per l'identificazione dei sierotipi circolanti attraverso la sierologia.

Si è confermata anche la distribuzione dei kit in alcuni paesi EU e non-EU indenni, dove sono utilizzati dai Laboratori Nazionali di Referenza per l'esecuzione di Proficiency test e/o come complemento dei rispettivi Contingency Plans.

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 la loro distribuzione globale, anche attraverso programmi supportati da organismi internazionali (FAO/EUFMD), comporta un carico di lavoro significativo offrendo un ritorno di grande visibilità e riconoscimento di specifiche competenze tecnico-scientifiche.

KIT DIAGNOSTICI AFTA PRONTO-USO prodotti presso il Reparto e distribuiti nel periodo 1 Ottobre 2018 - 30 Settembre 2019

	Country or organization	FMDV antigen detection ELISA type O, A, C, Asia1, SAT1-2	NSP Ab ELISA	SP Antibody ELISA Kit				
			3ABC	FMDV O	FMDV A	FMDV Asia1	FMDV SAT2	FMDV SAT1
	Training FAO	8	13	1	1			
Asia	Nepal	6						
	Myanmar	12						
	South Korea	30		2				
	China	5	3	400	50	30		
	India	3		3	3	3		
	Taiwan			3	1			
	Singapore	2		1	1	1		
	Vietnam			1				
	Mongolia	2		18	18			
Central Asia & WestEurasia	Iran	15		7	7	7		
	Iraq	1						
	Kazakhstan			869				
	Georgia	2		6	6	6		
	Russia	2		8	8	4	1	1
	Armenia		4	6	6	6		
	Turkey	1	1	1	1	1		
	Belaurus	1		1	1	1		
	Pakistan	35	10	10	10	10		
	Palestine			1	1	1		
	Israel	5		1	1	1	1	
	UAE	1		24	24		3	3
	Oman	2						
	Saudi Arabia	10	2	6				
Africa	Egypt	4						
	Tunisia	3						
	Mauritania	5						
	Morocco	7		5	6	1		
	Kenya	17	20	10	10	10	10	10
	Uganda	10						
	Zambia	6		1				
	Mali	1						
	South Sudan	5	30	10	10		10	
Countries FMDV-free	Libya	2	2					
	Cyprus	1						
	Ireland	1		1	1	1	1	1
	Bosnia	1		1	1	1		
	Bulgaria	2		2	2	2		
	Latvia	1		1	1	1		
	Macedonia	2		2	2	2		
	Denmark	3						
	Montenegro	2		2	2	2		
	Moldova	2		1	1	1		
	Ukraine	1		1	1	1		
	Hungary	1			1			
	Spain	1						
	Sveden	1					1	1
	France	3					1	
	Greece	1		1	1	2		
	Swiss	2						
	Kosovo	2		2	2	2		
	Slovenia	1	1	1	1	1	1	1
	Austria	3		3	3	3	3	3
Albania	1		1	1	1			
	Total N. kits	235	86	1414	185	102	32	20

Altri reagenti

Oltre ai kit sopra descritti, il CERVES detiene e mantiene controllati:

- la più vasta collezione di Anticorpi monoclonali e relativi ibridomi, ottenuti verso svariate varianti e sierotipi di virus aftosi, così come verso diverse varianti antigeniche del virus MVS e verso il virus della EMC;
- uno stock di Antigeni dei virus MVS e dei vari sierotipi aftosi inattivati con BEI, in completa conformità alle norme europee;
- una collezione controllata di oltre 600 ceppi di virus aftosi di referenza e isolati di campo rappresentativi di ciascuno dei sette sierotipi, in continuo aggiornamento con l'inclusione dei virus isolati da campioni sospetti sottoposti al laboratorio di referenza internazionale;
- una vasta collezione di ceppi italiani e stranieri di virus MVS (oltre 1000, rappresentativi dei diversi lineaggi antigenici e genomici, a partire dalla sua scoperta nel 1966 sino all'ultimo e più recente isolato del 2015);
- sono conservati e catalogati anche i ceppi di referenza di altri virus causa di lesioni vescicolari o che possono richiedere una diagnosi differenziale (Stomatite Vescicolare, Seneca Valley Virus, Lumpy Skin Disease, ecc.).
- sono disponibili molteplici isolati di campo italiani ed alcuni stranieri del virus della Encefalomiocardite Virale.

Attività analitica routinaria

Nelle tabelle successive si riportano, suddivisi per agente eziologico e tipologie di test, i dati dell'attività analitica "routinaria" eseguita direttamente dai Laboratori del CERVES. Sono intesi come attività analitica "routinaria" solamente i test su campioni di origine nazionale sottoposti con finalità di diagnostica in Sanità Animale.

Numero e tipologia di esami diagnostici eseguiti dal CERVES – Attività svolta a livello Nazionale - Periodo 1 Ottobre 2018 - 30 Settembre 2019

MALATTIA	RICERCA	REAZIONI (N.)				TOTALE
AFTA	Esami sierologici	ELISA Tipo O 1.124	ELISA tipo A 1.124	ELISA tipo Asia1 1.124	ELISA tipo SAT2 1.124	4.496
MVS	Esami sierologici	ELISA screening 89.352	ELISA IgG 564	ELISA IgM 564	SN 564	91.000
	Esami virologici	Isol. Virale 0	ELISA 0	PCR (conventional & Real Time) 1708		1.708
EMCV	Esami sierologici	ELISA				3.910
	Esami virologici	PCR				426

Non sono conteggiati i test effettuati sui campioni dei proficiency test internazionali e quelli preparatori per l'organizzazione dei ring test nazionali, né i test PCR destinati ai controlli interni delle cappe biologiche, cappe PCR e incubatori, effettuati con frequenza mensile per escludere contaminazioni da virus.

Non sono stati inclusi nella tabella i test di sieroneutralizzazione e PCR effettuati per i sierotipi Indiana e NewJersey del virus della Stomatite Vescicolare, data l'esiguità dei campioni sottoposti con richiesta di diagnostica per SV.

I test ELISA MVS screening si riferiscono a campioni originati prevalentemente dalle regioni Emilia-Romagna e Lombardia mentre gli altri test sierologici MVS (ELISA IgM, IgG e Sieroneutralizzazione) sono effettuati per approfondimento e conferma su sieri conferiti dagli IZZSS e provenienti da tutto il territorio nazionale. La tabella annovera i test sierologici MVS eseguiti dai laboratori del CERVES, mentre l'attività sierologica MVS complessiva è dettagliata, regione per regione, in una tabella successiva, al sotto-paragrafo "Diagnostica MVS".

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, come previsto in Istruzioni Operative di Reparto.

Diagnostica Encefalomiocardite virale: la ricerca del virus dell'encefalomiocardite (EMCV) è effettuata presso i Laboratori del CERVES su campioni sospetti conferiti dalle sezioni diagnostiche di Brescia e Cremona (N. 189 conferimenti per N.196 test eseguiti) e dalle sezioni diagnostiche di Mantova, Lodi, Parma e Reggio Emilia per i campioni originati da altre province della Lombardia ed Emilia-Romagna (in totale N. 193 conferimenti per N. 230 test). I test RT-PCR effettuati presso il laboratorio del CERVES hanno confermato l'identificazione del virus nel 47% dei campioni sospetti (92/196), a cui si aggiunge la positività rilevata in 78/230 campioni (24%) esaminati nelle altre sezioni diagnostiche IZSLER. Il dato conferma l'endemicità dell'infezione da cardiovirus nella specie suina nell'area geografica di competenza e i danni rilevanti subiti in alcuni allevamenti con alto tasso di mortalità e recidive inducono la domanda di vaccini stabulogeni da parte degli stakeholder.

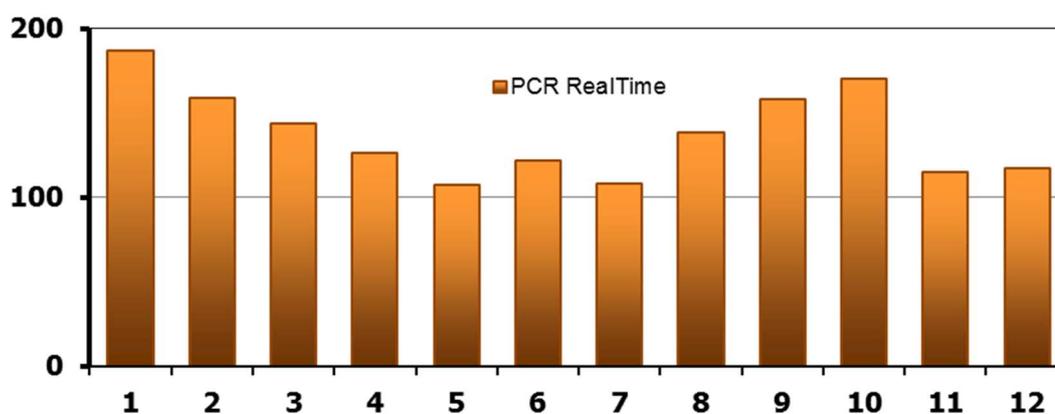
Va tuttavia precisato che il virus della EMCV è geneticamente e antigenicamente stabile, come anche evidenziato dai risultati dei Progetti Europei su EMCV (programma quadro Framework V e VI) a cui il CERVES ha partecipato e del Progetto di Ricerca Corrente PRC2013/001 terminato alla fine del 2017. In virtù di queste caratteristiche, e data la complessità di produrre vaccini stabulogeni virali con la relativa tempistica, incompatibile con l'efficacia della vaccinazione, dovrebbe essere valutata e considerata la possibilità di utilizzare per la trasformazione in vaccino stabulogeno un isolato italiano standard, rappresentativo dei ceppi isolati nei vari focolai, già adattato alle colture cellulari e con rese di produzione note ed adeguate.

È continuato il riscontro di sieropositività per EMCV, eseguito con test ELISA in-house (13% prevalenza su circa 4000 capi esaminati), sia in allevamenti suini che in cinghiali catturati durante la stagione di caccia in Lombardia ed Emilia-Romagna, confermando circolazione del cardiovirus, anche in forma subclinica, sia nelle specie domestiche che selvatiche.

Diagnostica MVS: Il numero complessivo e la frequenza mensile dei test sierologici e virologici per MVS rispecchiano l'andamento degli anni precedenti, coerentemente col dato che il programma di sorveglianza nazionale è stato sostanzialmente confermato per il 2019.

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

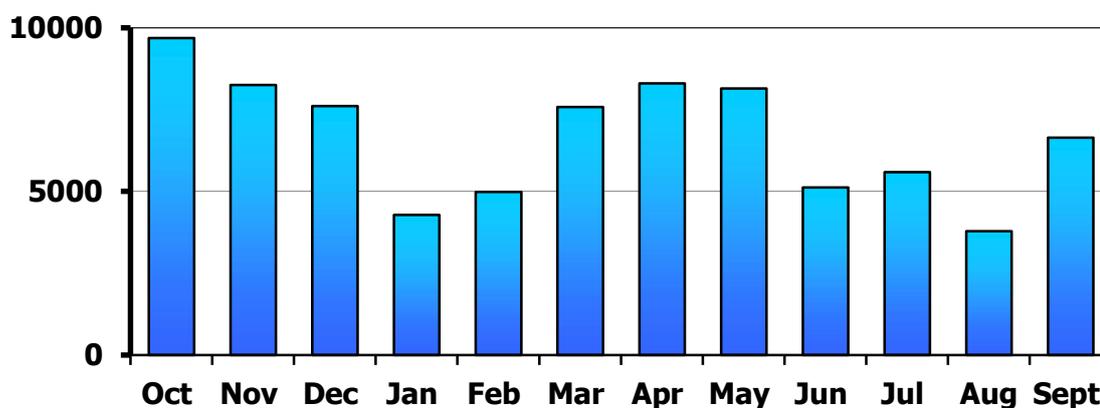
*Frequenza mensile dei test virologici per MVS eseguiti dal CERVES
(PCR, 1.703 test totali)
periodo 1 Ott 2018 - 30 Sett 2019*



N. test virologici 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. test	87	17	92	62	35	99	89	275	201	125	300	88	6	155	15	1

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



I dati della frequenza mensile del test sierologico di screening per la sorveglianza MVS sono riferiti 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 oltre 320.000 capi, da circa 10.000 aziende.

Monitoraggio sierologico per MVS a livello nazionale - periodo 1/10/2018 – 30/9/2019

REGIONE	N° aziende controllate	N° sieri esaminati
Nord Est	814	35.288
Nord Ovest	977	39.451
LOMBARDIA	866	52.269
EMILIA R.	464	22.734
TOSCANA	566	12.195
MARCHE	375	12.571
UMBRIA	514	14.592
LAZIO	378	9.626
ABRUZZO	375	9.780
MOLISE	215	7.595
CAMPANIA	669	25.469
BASILICATA	291	8.405
PUGLIA	466	4.220
CALABRIA	411	15.742
SICILIA	382	10.260
SARDEGNA	1628	42.472
TOTALE	9842	322.669

Attività analitica non routinaria

Come ogni anno, oltre all'attività svolta nell'ambito della Sanità Animale con finalità di diagnostica e/o sorveglianza, il CERVES ha eseguito un volume importante di test analitici che non vengono rendicontati nel sistema informativo dell'IZSLER, in quanto non inerenti attività diagnostica ma effettuati per vari scopi, quali:

- 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 all'organizzazione dei Proficiency test nazionali.

Inoltre, nell'ambito delle cooperazioni internazionali come laboratorio di referenza OIE/FAO e dei programmi di ricerca e sviluppo anche a carattere internazionale, il CERVES ha eseguito indagini sierologiche specializzate per Afta Epizootica, volte a predire l'efficacia dei vaccini adottati in vari Paesi, sia in termini di qualità dei vaccini, che di capacità di indurre cross-protezione verso ceppi eterologhi circolanti. Per questi obiettivi, il CERVES ha eseguito centinaia di test di sieroneutralizzazione, utilizzando in parallelo ceppi vaccinali e ceppi di campo circolanti, per valutare nel tempo la cinetica e durata della risposta anticorpale alla vaccinazione in coorti di animali in condizioni controllate di campo; i trial sono stati eseguiti in Algeria, Tunisia, Marocco, Georgia. Tutti i campioni sono stati esaminati presso il Laboratorio di referenza nazionale/OIE/FAO, oltre che in sieroneutralizzazione anche con i kit ELISA autoprodotti per la quantificazione di anticorpi tipo-specifici e con il test DIVA per accertare l'assenza di infezione durante i trial. Dettagliati report tecnico-scientifici per ciascun Paese coinvolto sono stati elaborati e forniti ai rispettivi CVO e Laboratori nazionali coinvolti e sono a disposizione per il Ministero nel caso di manifestazione di interesse.

Approfondite analisi virologiche e sierologiche per Afta sono state eseguite su campioni sospetti conferiti dall'Algeria in gennaio 2019. I campioni virologici sono stati esaminati con tutti i test implementati presso il CERVES – isolamento virale, ELISA, Realtime RT-PCR su diverse regioni genomiche target, sequenziamento ed analisi filogenetica eseguita direttamente dai campioni biologici e successivamente dagli isolati virali amplificati in colture cellulari. I risultati comprensivi dell'analisi filogenetica dei virus identificati, sono stati trasmessi con report ufficiali alle autorità competenti, entro 48 ore dal ricevimento campioni, e per conoscenza al Ministero.

Analisi virologiche per Afta sono state eseguite anche su campioni inviati dalla Libia nel mese di giugno 2019 sottoforma di FTA cards. Queste analisi hanno comportato la rapida messa a punto e sperimentazione di protocolli di estrazione da una nuova tipologia di matrice/campione, che hanno permesso una diagnosi rapida con identificazione del lineaggio virale coinvolto in tempi brevi e nonostante la scarsità

ed inattivazione dei campioni sottomessi. Alle conferme diagnostiche iniziali è seguita l'analisi filogenetica di un campione il cui stato di conservazione ha reso possibile la sequenziazione dell'intero gene VP1.