



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

Via Bianchi 9 - 25124 Brescia

**CENTRO NAZIONALE DI REFERENZA
PER L'AFTA E 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 2020

Periodo di riferimento 01/10/2019 – 30/09/2020

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.

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.

Durante il periodo di rendicontazione le performance del kit ELISA per dimostrazione e tipizzazione di virus aftosi in campioni clinici sono state valutate su 127 campioni di epitelio vescicolare raccolti in Tanzania negli anni 2015-2018, confrontandole con quelle di altri metodi a disposizione (isolamento e realtime RT-PCR). È continuato presso FMD World Reference Laboratory la validazione del kit attraverso la costruzione di un pannello di 200 ceppi di virus dell'afta rappresentativo di tutti i sierotipi, permettendo il monitoraggio costante della capacità del kit di riconoscere i virus circolanti.

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

- *Controlli interni*: Per il controllo della fase di estrazione e di amplificazione delle metodiche molecolari possono essere impiegati controlli endogeni o esogeni. L'amplificazione del gene delle Beta-actina come controllo endogeno nelle reazioni di Real-Time RT-PCR per la rilevazione di EMCV e dell'AFTA è stata valutata in precedenza. Durante il periodo di rendicontazione è stato aggiunto lo studio di un controllo esogeno. In particolare, è stato prodotto un controllo esogeno costituito da RNA trascritto in vitro, che viene aggiunto in fase di estrazione a ciascun campione. Questa tipologia di controllo è ottenuta facilmente e con alte rese (10^9 copie genomiche per μL) e costituisce una valida alternativa all'uso dei geni endogeni: infatti, poiché la sua amplificazione è indipendente dallo stato di conservazione del campione, l'assenza di reazione del controllo segnala la presenza di eventuali inibitori della reazione. L'uso di questo controllo è in fase di valutazione con il metodo Real-Time RT-PCR per la rilevazione di EMCV e successivamente verrà valutato con quello dell'AFTA.
- *Estrazione di acidi nucleici automatizzata*: nei laboratori ad alto contenimento è entrato nell'uso corrente l'estrattore automatico per acidi nucleici (KingFisher Duo Prime), che permette di processare 12 campioni alla volta con tecnologia basata su biglie magnetiche. Lo strumento comporta una diminuzione degli step di manipolazione, con riduzione del rischio di contaminazione tra campioni, oltre a riduzione dei tempi di esecuzione.

Test rapido multiplex per la diagnosi e tipizzazione di virus dell'Afta (tramite LFD): è continuato lo studio per lo sviluppo e validazione di Lateral Flow Device multiplex,

cioè test antigenici rapidi, eseguibili in campo grazie alla estrema facilità e rapidità. La funzionalità multiplex permette in un unico dispositivo la rivelazione simultanea di diversi target. Nel caso dell'afta l'obiettivo è quello di identificare il virus dell'afta e riconoscerne il sierotipo in una unica reazione. Poiché una strip può accomodare fino ad un massimo di 5 linee di reazione, di cui una deve essere riservata al controllo di validità del test, è in fase di sperimentazione un prototipo di LFD multiplex per la diagnosi e tipizzazione in unica strip di virus appartenenti ai sierotipi O, A o Asia1; il device è completato con una linea di test pan-Afta, che identifica qualunque virus indipendentemente dal sierotipo e variante. Poiché il LFD è realizzato con gli stessi anticorpi monoclonali già selezionati per il test ELISA-antigen detection, le performance di sensibilità/specificità sono sovrapponibili. In prove preliminari, il prototipo di test rapido ha correttamente identificato i virus isolati in colture cellulari e ha fornito risultati molto promettenti anche con campioni di epitelio vescicolare prelevati in Tanzania da focolai dovuti a virus di sierotipo O e A: una colorazione specifica della linea di test si è sviluppata in corrispondenza del sierotipo omologo, mentre è stata osservata la sola linea di controllo nei campioni negativi o positivi per altri virus o sierotipi. Lo studio continuerà, attraverso una nuova ricerca corrente, con la validazione in campo grazie alla collaborazione di Paesi dove la malattia è endemica; inoltre lo studio sarà esteso allo sviluppo di ulteriori LFD multiplex a completamento dell'identificazione degli altri principali sierotipi SAT1 e SAT2.

Produzione e distribuzione di reagenti

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

Dal 1995 il kit per il test di screening sierologico prodotto dal CERVES viene **distribuito gratuitamente agli IZS**; nell'annualità di riferimento 2019-2020 sono stati distribuiti a 10 IZS reagenti per l'esecuzione di 350.000 test, che aggiunti agli oltre 75.000 eseguiti dal CERVES per le due regioni Lombardia ed Emilia-Romagna corrispondono ad un totale complessivo di kit per oltre **426.000 analisi**.

Il valore economico di questa produzione, derivato dal costo di vendita a terzi (0,76 Euro/test) e da stime di prodotti commerciali equivalenti, è quantificato in oltre **400.000 €**, moltiplicato per tutti gli anni di esecuzione del Piano. Questo ha evidentemente comportato costi di produzione che sono stati assorbiti dal CERVES, a fronte di un significativo risparmio di risorse da parte del Servizio Sanitario nazionale.

*Reagenti per screening MVS distribuiti agli IIZZSS
periodo 1 Ottobre 2019 - 30 Settembre 2020*

Istituto/Laboratorio	Kit distribuiti per N. test
IZS PLV, TORINO	70.000
IZS VE, PADOVA	40.000
IZS LT, ROMA	40.000
IZS UM, PERUGIA	45.000
IZS AM, TERAMO	20.000
IZS PB, FOGGIA	20.000
IZS ME, NAPOLI	25.000
IZS CATANZARO	16.000
IZS SI, PALERMO	15.000
IZS SA, SASSARI	60.000
Totale	351.000
IZSLER, BRESCIA	75.205
Totale complessivo	426.205

Nella funzione di laboratorio di referenza OIE per MVS, i reagenti specifici per l'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.

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 pannello di 7 diversi kit per la diagnostica dell'afta, resa complessa dai numerosi sierotipi; si tratta di kit ELISA pronto-uso, costruiti con anticorpi monoclonali e antigeni auto-prodotti. Mantengono una esclusività mondiale i kit per la ricerca di anticorpi verso i sierotipi SAT 1 e SAT2 e lo strategico kit ELISA per la diagnosi virologica su campioni clinici con rilevazione di antigeni e identificazione del sierotipo. L'utilizzo di questo kit virologico, robusto e semplice nell'esecuzione, ha creato nuove potenzialità diagnostiche in svariati paesi dove la malattia è endemica, mentre i kit sierologici sono utilizzati per *post-vaccination monitoring* (valutazione dell'immunità indotta dal vaccino e della copertura vaccinale), per la valutazione della circolazione virale (con il test DIVA) o per l'identificazione dei sierotipi circolanti attraverso la sierologia.

A livello nazionale la diagnostica per afta è confinata al CERVES, quindi non è prevista la distribuzione di reagenti/kit ad altri IZS, 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, si è consolidata la richiesta dei kit che il Laboratorio ha distribuito nella veste di Centro Internazionale di Referenza (OIE/FAO) per l'afta. Nel periodo di rendicontazione i kit per la diagnostica di afta sono pervenuti in 47 diversi paesi nel

mondo, oltre ad essere utilizzati durante vari training organizzati da EUFMD, in numero complessivo di 3.198.

È indubbio che la notorietà dell'IZSLER è incisivamente aumentata anche grazie alla capacità di questo Centro di Referenza, a cui sono riconosciute specifiche competenze tecnico-scientifiche, di mettere a punto e produrre kit diagnostici di nuova generazione, distribuiti globalmente sia attraverso programmi supportati da organismi internazionali (FAO/EUFMD), che direttamente acquisiti dagli utilizzatori finali.

Sono illustrati nella tabella che segue i vari Paesi che hanno ricevuti i kit diagnostici, con indicazione del numero e tipologia.

KIT DIAGNOSTICI AFTA PRONTO-USO prodotti presso il Reparto e distribuiti nel periodo 1 Ottobre 2019 - 30 Settembre 2020

	Country or organization	FMDV antigen detection ELISA type O, A, C, Asia1, SAT1-2	NSP Ab ELISA 3ABC	SP Antibody ELISA Kit				
				FMDV O	FMDV A	FMDV Asia1	FMDV SAT2	FMDV SAT1
	Training FAO	19	21	1	1	1		
Asia	Nepal	5						
	Myanmar	8						
	South Korea						1	
	China		7	620	280	2		
	Japan	3		3	2			
	Malaysia	5						
	Taiwan	1		2	3	1	1	
	Bangladesh			3	3	3		
	Singapore			1	1	1		
	Mongolia	2		24	24			
Central Asia & WestEurasia	Kazakhstan			867		867		
	Georgia	2		6	6	5	5	5
	Azerbaijan			1	38	44		
	Armenia		20					
	Turkey	7		2	2	2		
	Belaurus	1		1	1	1		
	Israel	6	2	1	1	1	1	
Middle East	UAE	2						
	Kuwait	12		22	22			
	Saudi Arabia	1	1	1	1			
Africa	Egypt		2	2	2		3	
	Uganda	3		2	2			
	Nigeria		1					
	Algeria	3	14	11	11		11	
	Morocco			1	1		1	1
	Kenya	5						
	Zambia	5	15	5			5	
Ethiopia	2		1	1		1	1	
Countries FMDV-free	France	5						
	Romania	1	1	1	1	1		
	Serbia	2		2	2	2	1	
	New Zeland					1	1	
	Polonia	3	1	1	1	1	1	
	Ireland	1					1	1
	Bulgaria	1		1	1	1		
	Latvia	1						
	Estonia	3		1	1	1	1	
	Ukraine	1						
	Macedonia	1		1	1	1		
	Montenegro	1		1	1	1		
	Moldova	1		1	1	1		
	Sveden	1		1	1	1	1	1
	Greece	1		1	1	1		
	Malta	2						
	Austria		1	1	1	1	1	
	Albania	1		1	1	1		
South America	Brasil	2						
	Total N. kits	120	86	1590	415	942	36	9

Altri reagenti

Oltre ai kit sopra descritti, il CERVES detiene:

- la più vasta collezione di Anticorpi Monoclonali e relativi ibridomi, ottenuti verso svariate varianti e sierotipi di virus aftosi, verso diverse varianti antigeniche del virus MVS e verso il virus della EMC; grazie ad una ricerca corrente la collezione si è recentemente arricchita con anticorpi monoclonali specifici per il virus della LSD. Questi anticorpi monoclonali sono frequentemente richiesti e forniti attraverso MTA a gruppi di ricerca che operano in istituti pubblici e centri di referenza;
- antigeni ricombinanti, quali svariate proteine non-strutturali del virus dell'afta; a queste si sono recentemente aggiunte, nell'ambito di una ricerca corrente, varie proteine ricombinanti del virus della LSD;
- 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; la collezione si è recentemente arricchita con oltre 100 ceppi di virus aftosi, sierotipi O, A, SAT1 e SAT2, isolati da campioni provenienti dalla Tanzania;
- 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 2014);
- 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

Nella tabella successiva si riportano, suddivisi per agente eziologico e tipologie di esami, i test su campioni di origine nazionale sottoposti con finalità di diagnostica in Sanità Animale e analizzati dai Laboratori del CERVES.

Numero e tipologia di esami diagnostici eseguiti dal CERVES – Attività svolta a livello Nazionale - Periodo 1 Ottobre 2019 - 30 Settembre 2020

MALATTIA	RICERCA	REAZIONI (N.)				TOTALE
AFTA	Esami sierologici	ELISA Tipo O 1.223	ELISA tipo A 1.223	ELISA tipo Asia1 1.223	ELISA tipo SAT2 1.223	4.892
MVS	Esami sierologici	ELISA screening 75.205	ELISA IgG 273	ELISA IgM 273	SN 273	76.024
	Esami virologici	Isol. Virale 0	ELISA 0	Real Time PCR 1.106		1.106
EMCV	Esami sierologici	ELISA				5.285
	Esami virologici	PCR				264

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.

I test ELISA MVS screening si riferiscono a campioni originati dalle regioni Emilia-Romagna e Lombardia mentre gli altri test sierologici MVS (ELISA IgM, IgG e Sieroneutralizzazione) sono effettuati per approfondimento e conferma anche su sieri conferiti dagli IZS e provenienti da tutto il territorio nazionale.

Diagnostica Afta. Da più anni consecutivi nessun campione sospetto è stato sottoposto al CERVES per accertamenti di laboratorio o diagnosi differenziale. A livello nazionale la diagnostica per afta è limitata ai test sierologici effettuati per movimentazioni, import/export, esposizioni/fiere, il cui numero si è mantenuto costante rispetto all'annualità precedente. Test PCR sono stati regolarmente effettuati come controlli interni sulla strumentazione per assicurare assenza di contaminazione, come previsto in Istruzioni Operative di Reparto, permettendo di mantenere (insieme ai test eseguiti a livello internazionale e ai proficiency test) la formazione del personale e le verifiche sulle performance del metodo.

Diagnostica Encefalomiocardite virale: la ricerca del virus dell'encefalomiocardite (EMCV) è effettuata presso i Laboratori del CERVES su campioni sospetti provenienti prevalentemente da aziende in Lombardia e in rari casi da altre regioni (N. 220 conferimenti per N. 264 test eseguiti con dimostrazione della presenza del virus nel 39% dei casi sospetti) e dalle sezioni diagnostiche di Mantova, Lodi, Parma e Reggio Emilia per i campioni originati in Lombardia ed Emilia-Romagna (in totale N. 157 conferimenti per N. 232 test, con positività rilevata nel 34% dei conferimenti). Le osservazioni confermano l'endemicità dell'infezione da cardiovirus nella specie suina nell'area geografica di competenza. Oltre che nei suini il virus è stato identificato come causa di mortalità in lemuri di uno zoosafari (provincia Ravenna).

È continuato il riscontro di sieropositività per EMCV, eseguito con test ELISA in-house in cinghiali catturati durante la stagione di caccia in Lombardia ed Emilia-Romagna (4860 cinghiali esaminati), confermando circolazione del cardiovirus, anche in forma subclinica, sia nelle specie domestiche che selvatiche.

Diagnostica MVS: L'attività analitica per MVS è da riferirsi al programma di sorveglianza nazionale, che è rimasto attivo anche dopo il riconoscimento dello stato SVD-free della nazione da parte della Commissione Europea. Alla luce della nuova situazione epidemiologica, il CERVES pur proponendo una significativa revisione delle attività di sorveglianza, ha concordato con il Ministero il mantenimento per il 2019 dei controlli finalizzato a confermare lo stato di indennità nazionale e conferire ulteriore affidabilità e credibilità dei servizi veterinari, lasciando il tempo per valutare una rimodulazione dei controlli, analizzando a livello nazionale e/o regionale costi-benefici, vantaggi/svantaggi e possibile integrazione con i Programmi in vigore per altre malattie. Per il 2020 il Piano di sorveglianza per MVS è stato alleggerito, in termini di numero di aziende da controllare e frequenza dei controlli, ed è stata proposta una modalità più snella di risoluzione dei singleton reactor, resa possibile grazie all'ampia casistica affrontata nell'esperienza pluriennale.

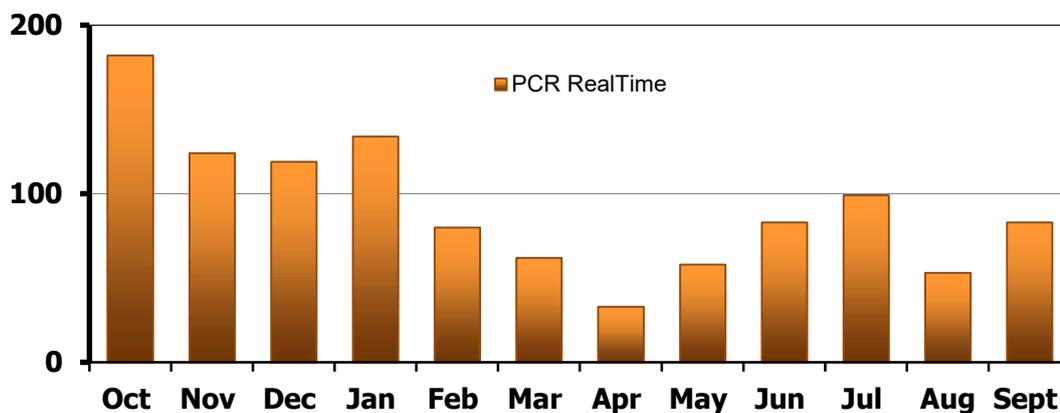
Conseguentemente alla rimodulazione del programma di sorveglianza e alla sospensione dei controlli veterinari ritenuti non indifferibili durante i mesi di lockdown per l'emergenza COVID-19, si è osservata una flessione del numero di esami eseguiti, particolarmente durante i mesi di lockdown (marzo-maggio), come evidente nei grafici della frequenza mensile degli esami eseguiti dal CERVES (riferiti alla sorveglianza nelle regioni Lombardia ed Emilia-Romagna).

In particolare, rispetto all'annualità di rendicontazione precedente, si è osservata una contrazione del 35% dei test virologici (effetto dell'esclusione degli allevamenti da ingrasso "high turnover" dal controllo) e una riduzione inferiore al 30% per i test sierologici; a livello nazionale, con il limite del dato aggiornato solo al 30 giugno per sei regioni, sono stati esaminati sierologicamente oltre 220.000 capi da circa 7600 aziende. Inoltre, la possibilità di risolvere i casi singleton reactor a livello locale ha portato ad una diminuzione dei test di conferma con Sieroneutralizzazione e test isotipo-specifici eseguiti presso il CERVES.

L'attività analitica per MVS non ha rilevato alcuna sieropositività, confermando l'assenza di circolazione virale in tutto il territorio nazionale. Un Piano di

monitoraggio della fauna selvatica in atto nelle regioni Lombardia ed Emilia-Romagna ha fornito l'occasione per esaminare anche 6.151 cinghiali catturati durante la stagione di caccia, tutti con esito negativo.

Frequenza mensile dei test virologici per MVS eseguiti dal CERVES (tutta attività) (PCR, 1.110 test totali) periodo 1 Ott 2019 - 30 Sett 2020



N. test virologici suddivisi per regione di provenienza

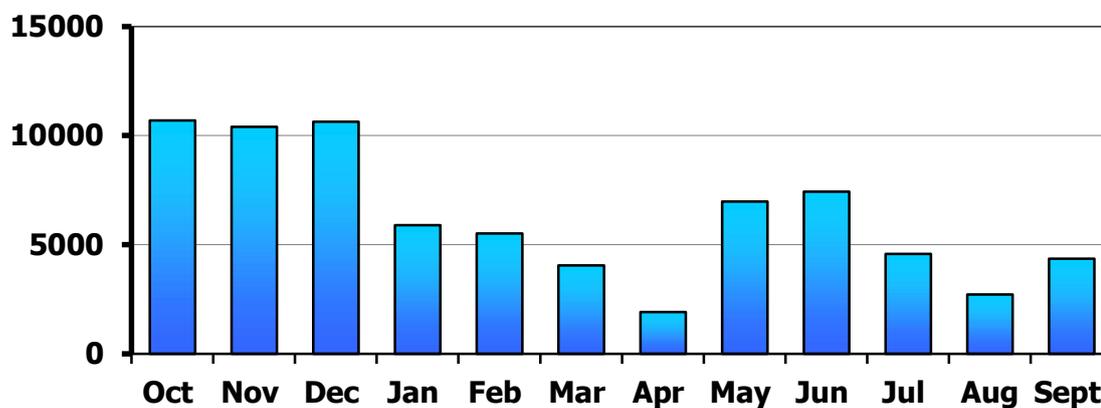
REGION	Italia settentrionale				Italia centrale						Italia meridionale				Isole	
	NORD EST	NORD OVEST	LOMBARDIA	EMILIA R.	TOSCANA	MARCHE	UMBRIA	LAZIO	ABRUZZO	MOLISE	CAMPANIA	BASILICATA	PUGLIA	CALABRIA	SICILIA	SARDEGNA
N. test	62	19	36	21	15	67	41	229	143	65	166	45	1	179	14	0

Monitoraggio sierologico per MVS a livello nazionale - periodo 1/10/2019 – 30/9/2020

REGIONE	N° aziende controllate	N° sieri esaminati
Nord Est	723	27.123
Nord Ovest*	639	24.475
LOMBARDIA	807	41.066
EMILIA R.*	402	18.879
TOSCANA	523	11.317
MARCHE	332	9.618
UMBRIA*	438	9.756
LAZIO	415	8.574
ABRUZZO*	306	6.624
MOLISE*	150	3.967
CAMPANIA	502	17.150
BASILICATA*	285	7.141
PUGLIA*	472	3.985
CALABRIA	360	12.722
SICILIA	868	10.216
SARDEGNA	350	8.869
TOTALE	7572	221.482

* dati aggiornati al 30 giugno 2020

*Frequenza mensile dei test sierologici per MVS eseguiti dal laboratorio del CERVES
Test di screening (ELISA competitiva) per la ricerca di anticorpi anti-MVS (75205 test)
 periodo 1 Ott 2019 - 30 Sett 2020*



I dati della frequenza mensile del test sierologico di screening per la sorveglianza MVS sono riferiti solo alle prove eseguite su campioni dei territori Lombardia ed Emilia-Romagna.

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.

Viene annoverata come "non routinaria" anche l'attività analitica svolta nell'ambito di cooperazioni internazionali mantenute come Laboratorio di riferimento OIE/FAO, e di programmi di ricerca e sviluppo.

Analisi sierologiche. Nel periodo di rendicontazione 2019-2020 sono continuati i test per i programmi di valutazione dei vaccini anti-aftosi adottati nei Paesi del TranCaucaso, realizzati attraverso trial di campo su gruppi omogenei di animali delle diverse specie interessate, sui quali viene verificata la cinetica e durata della risposta anticorpale protettiva raggiunta con una e con due vaccinazioni. Si sono conclusi i trial eseguiti in Armenia e in Georgia, i cui risultati sono stati esposti in workshop online organizzati da EUFMD con i Paesi interessati e saranno oggetto di una comunicazione al prossimo Congresso Internazionale "EUFMD Open Session, Special online edition", che si terrà in Dicembre 2020. L'attività analitica inerente queste indagini è stata particolarmente impegnativa per l'elevato numero di test di Sieroneutralizzazione eseguiti, oltre ai più gestibili test ELISA per la quantificazione di anticorpi tipo-specifici e per accertare l'assenza di infezione durante i trial (test DIVA).

Inoltre, la sierologia è stata utilizzata per valutare la diversità di sierotipi circolanti in una regione colpita da focolai, attraverso la misura del livello di anticorpi reattivi verso i quattro sierotipi aftosi del pool virale n. 4, presente nella regione dell'Africa orientale. Il CERVES ha esaminato 1.880 sieri di bovini campionati in Tanzania, ciascuno esaminato verso i quattro sierotipi O, A, SAT1 e SAT2, e con il test DIVA (3ABC-ELISA) per l'evidenziazione di animali infetti, per un totale di 9.400 test. I risultati saranno interpretati dal punto di vista epidemiologico con i colleghi operanti sul campo e con gli epidemiologi dell'Università di Glasgow con cui è in corso una reciproca collaborazione.

Il volume di attività delle analisi sierologiche è riportato nella tabella seguente.

*Attività analitica per test sierologici AFTA, a livello internazionale
N. test eseguiti*

	Sieroneutralizzazione				ELISA-Structural Protein Ab					ELISA DIVA (NSP Ab)
	O	A/Iran05	A/G-VII	Asia 1	O	A	Asia 1	SAT 1	SAT 2	
ARMENIA	118	117	118	114	197	117	117	//	//	120
GEORGIA	123	123	123	123	347	347	347	//	//	347
TANZANIA	//	//	//	//	1880	1880	//	1880	1880	1880
TOTALE TEST	241	240	241	237	2424	2344	464	1880	1880	2347

Analisi virologiche. Benché non siano pervenuti campioni sospetti da Paesi terzi per conferme diagnostiche, anche in considerazione delle difficoltà logistiche dovute alla pandemia da Covid-19, sono state eseguite innumerevoli e variegata analisi virologiche su 127 campioni clinici (per lo più tessuto epiteliale di vescicole), corrispondenti a focolai verificatisi in Nord Tanzania dal 2015 al 2018 e ricevuti durante il 2019, per ricostruire l'epidemiologia dell'Afta nella regione.

I campioni sono stati esaminati con tutti i test implementati presso il CERVES, che comprendono (1) isolamento virale in colture cellulari, (2) ELISA e (3) Realtime RT-PCR. Oltre alla Realtime RT-PCR pan-FMD accreditata, i campioni sono stati strategicamente applicati e verificati l'efficienza di un (4) pannello di cinque diverse Realtime RT-PCR specifiche per la tipizzazione dei virus aftosi dei sierotipi O, A, SAT1 e SAT2 circolanti in Africa orientale. Questi test molecolari sono topotipo-specifici, quindi definiscono il sierotipo e al contempo il topotipo dei virus che compongono il pool epidemico. Infine, i campioni sono stati sottoposti a sequenziazione del gene per la VP1 ed analisi filogenetica eseguita dagli isolati virali amplificati in colture cellulari. Anche questi risultati saranno oggetto di due comunicazioni (una incentrata sui metodi diagnostici e una su epidemiologia molecolare derivata dalle analisi filogenetiche) al prossimo Congresso Internazionale "EUFMD Open Session, Special online edition", che si terrà in Dicembre 2020.