



**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)**



World Organisation
for Animal Health
Founded as OIE

WOAH REFERENCE LABORATORY FOR FOOT AND MOUTH DISEASE

WOAH REFERENCE LABORATORY FOR SWINE VESICULAR DISEASE



**FAO REFERENCE CENTRE FOR FOOT-AND-MOUTH DISEASE
AND SWINE VESICULAR DISEASE**

Relazione annuale 2023

Periodo di riferimento 01/10/2022 – 30/09/2023

Decreto 2 Novembre 1991

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 WOAHA 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. Nella visita ispettiva esterna di Giugno, è stata campionata come prova di primo livello il MP 04/027 (Ricerca di anticorpi marker di infezione aftosa tramite ELISA 3-ABC) e non sono state riscontrate osservazioni
- Come oramai da consuetudine tutti i Metodi di Prova per Afta, MVS e SV sono regolarmente sottoposti a verifica attraverso i **Proficiency Test internazionali**, organizzati dell'EURL e dal WRL;
- 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.
- Si è concluso il processo di certificazione ISO 9001 del laboratorio di produzione di kit diagnostici con la visita ispettiva dell'Ente di accreditamento del 12-13 Settembre 2023. La certificazione ISO 9001 è stata ottenuta con 4 NC e 5 spunti di miglioramento che il laboratorio sta gestendo

Nel periodo di riferimento (01/10/2022 – 30/09/2023), sono stati codificati e messi a sistema i seguenti metodi:

- Metodo molecolare per la identificazione di Senecavirus tramite Real Time PCR utilizzato nella diagnosi differenziale dei due campioni sospetti conferiti al CERVES nel 2023.
- Metodo ELISA per la ricerca del virus EMCV.

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. In questo contesto il CERVES ha collaborato con il The Pirbright Institute alla caratterizzazione antigenica di 68 isolati di virus aftosi provenienti dall'East Africa nell'ambito del progetto internazionale AgResults.
- 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 sequenziamento con metodo Sanger;
- Next Generation Sequencing (NGS) per il sequenziamento di genomi virali completi, avvalendosi della collaborazione della Sezione Diagnostica di Parma e del reparto di Genomica dove sono presenti strumenti della ditta Illumina. Si sta inoltre valutando la messa a punto di protocolli per l'utilizzo dello strumento MiniIon che è stato acquisito e verrà portato nei laboratori BSL3+. È utile rilevare che, il sequenziamento NGS, è diventata importante per l'attività di ricerca e sviluppo del CERVES, in considerazione anche del livello di approfondimento che viene richiesto ai laboratori internazionali.

Sviluppo, miglioramento e validazione di metodi diagnostici

Il continuo sviluppo, implementazione, miglioramento e validazione di esistenti e nuovi metodi diagnostici rappresenta una attività continua, 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: Si riconferma l'apprezzamento internazionale per i kit ELISA per la diagnosi di afta. Il sito web, che raccoglie tutti i documenti dei prodotti presenti nel portfolio IZLSER (schede di sicurezza, bibliografia, brochure tradotte in tre lingue, video tutorial) è in fase di validazione e sarà utilizzabile da Gennaio 2024.

Metodi molecolari: Nel corso dell'anno è stato codificato e messo a sistema il metodo molecolare per la ricerca di Seneca Valley Virus da utilizzare per diagnosi differenziale in caso di sospetto di Malattie vescicolari.

È stata preparata tutta la documentazione necessaria per la richiesta di accreditamento del metodo molecolare per la rilevazione del virus dell'EMCV attraverso Real-time RT-PCR (MP 09/331). Sono state effettuate le prove di validazione secondo le procedure generali IZSLER (PG 00/100), che hanno previsto la determinazione dei parametri di sensibilità e specificità analitica e diagnostica, la ripetibilità e riproducibilità.

Test rapido multiplex per la diagnosi e tipizzazione di virus dell'Afta (tramite LFD):

Il Lateral Flow Device multiplex sviluppati e validati nell'ambito di progetti nazionali sono stati estensivamente validati per definire le performance diagnostiche.

Parallelamente è stato completato l'iter per esternalizzare la produzione consentendo quindi l'immissione sul mercato di questi nuovi prodotti.

Produzione e distribuzione di reagenti

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

Nell'annualità di riferimento 2022-2023 sono stati distribuiti, a 5 IZS, reagenti per l'esecuzione di 32.500 test, che aggiunti agli oltre 13.000 eseguiti dal CERVES per le due regioni di competenza (Lombardia ed Emilia-Romagna) corrispondono ad un totale complessivo di kit per oltre **45.500 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 **34.580 €**.

Reagenti per screening MVS distribuiti agli IZZSS periodo 1 Ottobre 2022 - 30 Settembre 2023

Istituto/Laboratorio	Kit distribuiti per N. test
IZS PLV, TORINO	20.000
IZS VE, PADOVA	55.000
IZS UM, PERUGIA	500
IZS AM, TERAMO	2.000
IZS ME, NAPOLI	5.000
Totale	32.500
IZSLER, BRESCIA	13.000
Totale complessivo	45.500

Si riconferma rispetto alla precedente relazione una ulteriore diminuzione dei test sierologici distribuiti per l'esecuzione delle prove sierologiche per MVS agli IZS.

La riduzione del numero di test richiesti ha conseguentemente comportato una diminuzione della produzione di reagenti, in particolare di antigene inattivato, prodotto nei laboratori ad alto contenimento ed esternalizzato a seguito di procedura di inattivazione.

Nella funzione di laboratorio di riferimento WOAHP per MVS, i reagenti specifici per l'esecuzione del test sierologico di riferimento e di test ELISA per identificazione dell'antigene MVS sono stati distribuiti anche a livello internazionale in Polonia, Repubblica Ceca.

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

Nel periodo di rendicontazione della presente relazione si segnala una ripresa della distribuzione di kit a livello internazionale, registrando un incremento di oltre il 20% rispetto al periodo 01/10/2021-30/09/2022 a dimostrazione di una completa ripresa delle attività di diagnostica e sorveglianza della malattia, terminata l'emergenza COVID19.

La tabella di seguito riassume tipologia e paese a cui sono sati inviti i kit ELISA.

*KIT DIAGNOSTICI AFTA PRONTO-USO prodotti presso il Reparto
e distribuiti nel periodo 1 Ottobre 2022 - 30 Settembre 2023*

	Country or organization	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 Asia1	FMDV SAT2	FMDV SAT1
Asia	Myanmar	4						
	Bangladesh			1	1	1		
	South Korea		5	20		3		
	Indonesia		5	250				
	Taiwan	4		17	7	1	1	1
	Singapore	1		1	1	1	1	
	Mongolia	3		22	21	2		
Central Asia & WestEurasia	Iraq	5	1	1	1	1	1	
	Iran	1						
	Turchia	25		2	2	2	4	
	Palestina						2	
	Giordania	3	8	2			9	
	Kirghikistan	2	2	12	12	12		
	Armenia	3	20	10	10	10		
	Azerbaijan	1						
	Georgia	4		4	4	4	4	
	Pakistan	1						
Middle East	UAE	6		13	11	3	7	2
	Barahin	3	2					
	Saudi Arabia	13	3	10			6	
Africa	Egypt	12	6	10	10		11	
	Botswana	5		1	1		1	1
	Libia	1						
	Malawi		6	2			2	
	Marocco	1		8	25			
	Zambia			5	5	5	5	
	Nigeria		3	2	2		2	
	Kenya	8						
Countries FMDV-free	France	2						
	Svezia	1		1	1	1	1	1
	Irlanda	1	2	1	1	1	1	1
	Malta	1		1	1	1	1	1
	Kosovo	1		1	1	1		
	Polonia	3		16	16	16	16	15
	Montenegro	1		1	1	1		
	Nuova Zelanda				1	1	1	1
	Repubblica Ceca	1	1	1	1	1	1	1
	Macedonia	1		1	1	1		
	Bulgaria	1		1	1	1	1	
	Lituania	1		1	1	1		
	Lettonia	1						
	Cipro	2						
	Greece	2		1	1	1	1	
	Germania	2		2	2	2	2	
	Austria	3	1	1	1	1	1	1
	Argentina	5		1	1			
Albania	2		2	2	2			
Total N. kits		137	65	425	146	77	82	25

La produzione dei kit diagnostici afta è certificata ISO 9001 dal settembre 2023, che si aggiunge quindi alla Certificazione ISO 17025 già in essere. Il laboratorio ha intrapreso questo nuovo percorso di certificazione al fine di valorizzare e consolidare l'attività pluriennale del Reparto nello sviluppo e successiva produzione di kit ELISA.

Il percorso di certificazione ha portato alla stesura di un Manuale della Qualità ISO 9001 costituito da 11 sezioni con relativi documenti correlati che descrive i processi di produzione, le loro interazioni, l'organizzazione del laboratorio, il contesto generale in cui opera la Struttura, le parti interessate e i principi e gli obiettivi di qualità che la Struttura intende perseguire. Accanto al Manuale sono state sviluppate 54 Procedure Operative Standard con relativi documenti correlati che descrivono nel dettaglio le fasi di produzione dei kit, di controllo qualità degli stessi, di approvvigionamento dei materiali, di produzione dei reagenti componenti i kit, di analisi e valutazione degli obiettivi di qualità e dell'efficacia dei processi produttivi, oltre a tutti i documenti necessari per la registrazione dei kit prodotti e delle loro destinazioni.

Grande attenzione è stata posta alla definizione degli standard di qualità necessari per la validazione dei lotti dei kit prodotti e della modalità di controllo finale degli stessi prima della loro commercializzazione, al fine di garantire ai laboratori prodotti che conformi ai requisiti e le performance dichiarate.

Tutto il personale coinvolto nel processo produzione è stato adeguatamente formato sui requisiti previsti dalla ISO 9001.

La visita ispettiva dell'Ente Certificatore (CSQA) è durata due giorni con la presenza anche del Responsabile della Qualità dell'IZSLER e sono stati analizzati i processi identificati, le procedure di produzione dei kit e di registrazione, la metodologia di analisi delle parti interessate e del contesto generale, la modalità di valutazione del rischio del laboratorio e del Riesame annuale. La visita ispettiva si è conclusa con un giudizio estremamente positivo per il laboratorio con l'ottenimento della certificazione ISO 9001 (attestato n° 81530).

È stata certificata quindi tutto il portfolio kit per la diagnosi sierologica e virologica di virus aftosi.

Il laboratorio sarà oggetto ogni anno di un audit interno dell'IZSLER e uno dell'Ente Certificatore specifici per l'attività di produzione dei kit ELISA che garantiranno il mantenimento degli standard elevati di qualità dell'attività di produzione

Altri reagenti distribuiti

Lumpy skin Disease (LSD): nell'ambito del progetto in collaborazione con FAO e i Laterl Flow Device (LFD) per la ricerca dell'antigene virale LSD sviluppati in collaborazione con l'Università di Torino, sono stati inviati all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Teramo, al Friedrich-Loeffler-Institut (Laboratorio di riferimento Europeo per LSD) e a Sciensano (Laboratorio di riferimento WOAHP per capripoxvirus), per valutarne le performance in termini diagnostici su diversi campioni biologici.

Lateral Flow Device (LFD1 e LFD2) per identificazione e tipizzazione di virus aftosi:
nell'ambito di collaborazioni internazionali e di supporto a EuFMD sono stati inviati i seguenti dispositivi:

Fornitura di LFDs a EuFMD da utilizzare nei Real Time Training effettuati in Kenya

N. 30 LFD1 e 30 kit di estrazione (Dicembre 2022)

N. 13 LFD1 e 13 kit di estrazione (Febbraio 2023)

N. 15 LFD1 e 15 kit di estrazione (Giugno 2023)

Fornitura di LFDs a paesi interessati dall'emergenza SAT2 in medio Oriente

N.27 LFD1, N. 40 LFD2 e 10 kit di estrazione (Iraq)

N. 6 LFD1, 6 LFD2 e 10 kit di estrazione (Siria)

N. 10 LFD2 (Giordania)

N. 10 LFD2 e 10 kit di estrazione (Libano)

N. 10 LFD2 e 10 kit di estrazione (Iran)

N. 10 LFD1 e 10 kit di estrazione inviati alle Comoros a seguito per incursione FMDV-O

N. 30 LFD1, N.30 LFD2 e N. 60 kit di estrazione inviati ai colleghi in Uganda

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 2022 - 30 Settembre 2023

MALATTIA	RICERCA	REAZIONI (N.)				TOTALE
AFTA	Esami sierologici	ELISA Tipo O 4	ELISA Tipo A 4	ELISA Tipo Asia 1 4	ELISA Tipo SAT2 4	16
	Esami virologici	Isol. Virale 2	ELISA 1	RT-PCR 0	Real Time PCR 1	4
MVS	Esami sierologici	ELISA screening 13.161	ELISA IgG 1	ELISA IgM 1	SN 1	13.164
	Esami virologici	Isol. Virale 2	ELISA 2	RT-PCR 81	Real Time PCR 38	123
EMCV	Esami sierologici	ELISA				349
	Esami virologici	RT-PCR 276		Real Time PCR 165		441

Nella tabella non sono conteggiati i test effettuati sui campioni dei due Proficiency Test Internazionali e effettuati per l'allestimento per l'organizzazione dei ring test nazionali (sierologia MVS e Afta e metodi molecolari per afta), né i test PCR destinati ai controlli interni previsti nell'ambito delle procedure per la Biosicurezza (verifica assenza di contaminazioni da virus delle cappe biologiche, cappe PCR e incubatori, effettuati con frequenza mensile).

La sensibile diminuzione del numero dei test ELISA MVS screening per la ricerca di anticorpi comporta conseguentemente una drastica diminuzione degli altri test sierologici MVS di conferma (ELISA IgM, IgG e Sieroneutralizzazione).

Diagnostica Afta. Il numero delle prove eseguite su campioni di siero per la ricerca di anticorpi verso virus aftosi, solitamente eseguite per movimentazioni, import/export, esposizioni/fiere, è drasticamente diminuito rispetto alla precedente rendicontazione (4 campioni nel periodo 2022-2023 a fronte di 369 nel periodo 2021-2022).

Il personale del CERVES utilizza quasi regolarmente i kit per le prove sierologiche afta, in quanto effettua i controlli di qualità sui lotti di reagenti e dei prodotti che costituiscono i kit e per esecuzione di siero sorveglianza su campioni provenienti da paesi endemici, mantenendo quindi elevate competenze nell'esecuzione ed interpretazione dei risultati.

Nel periodo di interesse sono stati inoltre conferiti al CERVES due campioni di lesioni vescicolari:

- 11/01/2023: conferimento sangue (Darwin 4770/2023) e lesioni vescicolari (Darwin 4945/2023) prelevate da un cinghiale della provincia di Pavia. L'animale molto piccolo è stato soppresso dai veterinari e in corso di visita autoptica presso la sezione sono state rinvenute le lesioni di cui si allega una immagine.



Sui campioni sono state effettuate prove diagnostiche (sierologiche e virologiche) per virus aftosi e della Malattia Vescicolare del suino, inoltre il campione di epitelio è stato esaminato in Real Time PCR anche per la ricerca di Seneca Valley Virus. Tutte le prove hanno dato esito negativo.

- 14/07/2023: IZS di Perugia invia tre campioni per sospetto clinico (1 lesione podale e due lesioni del grugno di cui si allegano le immagini, Darwin 220497/2023) e un campione di sangue (Darwin 220498/2023) prelevato da un suino morto.



Sui campioni sono state effettuate prove diagnostiche (sierologiche e virologiche) per virus aftoso, della Malattia Vescicolare del suino, Seneca Valley e Stomatite Vescicolare. Tutte hanno dato esito negativo.

L'esame in microscopia elettronica non ha identificato alcuna particella virale.

Relativamente alle prove molecolari in PCR, quest'ultime sono eseguite regolarmente, con frequenza trimestrale, per assicurare assenza di contaminazione di cappe ed incubatori dei laboratori ad alto contenimento.

L'intensa attività di produzione permette al personale del CERVES di mantenere elevate competenze e manualità per l'utilizzo di colture cellulari in quanto il

laboratorio produce regolarmente lotti di antigeni virali, che dopo inattivazione, sono esternalizzati ed utilizzati per la produzione di kits diagnostici.

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 (eseguiti N. 441 test con dimostrazione della presenza del virus nel 34% dei casi sospetti).

La ricerca del virus è stata effettuata, con esito positivo, anche su 4 campioni di visceri prelavati da scimmie di parchi naturalistici lombardi. Anche la positività virologica di campioni prelevati da suini si attesta intorno al 26% confermando di fatto la circolazione del virus e la sua endemicità.

Non essendo più previsto dal piano di sorveglianza della fauna selvatica attivo in Lombardia, nel periodo di riferimento non sono state eseguite indagini sierologiche sulla specie cinghiale.

Diagnostica MVS: L'attività diagnostica per MVS è da riferirsi ai campioni prelevati nelle aziende inserite nel circuito export. Relativamente ai dati per la rendicontazione dei test effettuati nel periodo Ottobre 2022-Settembre 2023, il CdR ha chiesto ai colleghi degli IZZSS, che eseguono il test ELISA screening, di comunicare per vie brevi il numero dei campioni esaminati riportando anche il dettaglio del numero di test effettuati per finalità Export. Tuttavia alcune regioni non hanno riportato alcuna attività (vedi tabella sottostante).

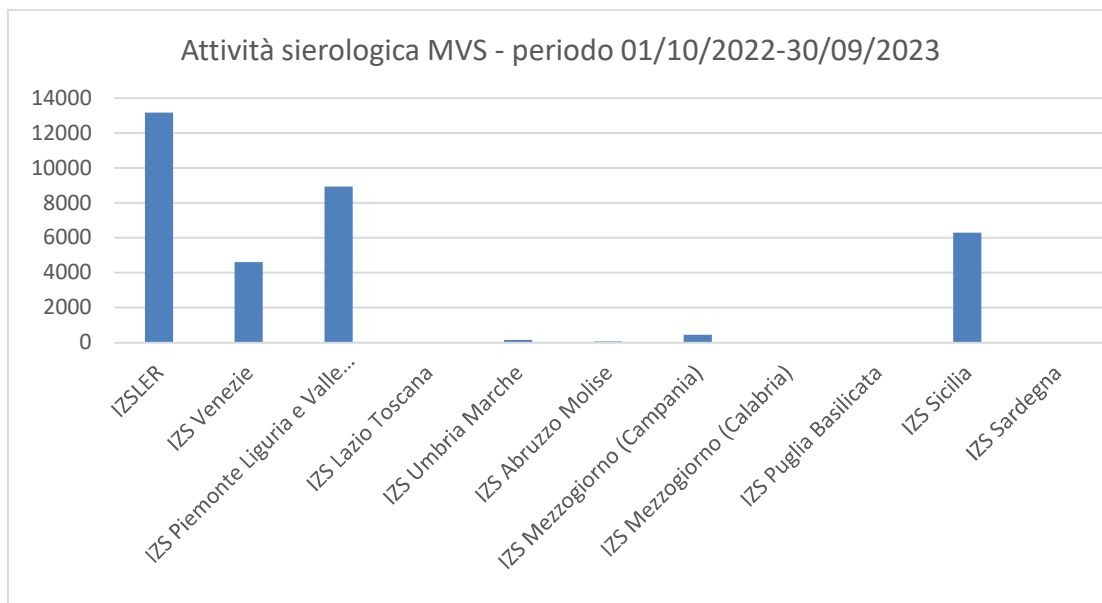
Nel corso dell'anno sono state controllate 1.159 aziende per un totale di 26.803 sieri.

Monitoraggio sierologico per MVS a livello nazionale - periodo 01/10/2022 – 30/09/2023

REGIONE	N° aziende controllate	N° sieri esaminati
Nord Est	178	4608
Nord Ovest	535	8930
LOMBARDIA	363	11087
EMILIA R.	69	2074
TOSCANA	nr*	nr
MARCHE	9	99
UMBRIA	3	52
LAZIO	nr	nr
ABRUZZO	1	59
MOLISE	0	0
CAMPANIA	39	448
BASILICATA	0	0
PUGLIA	2	11
CALABRIA	0	0
SICILIA	501	6290
SARDEGNA	0	0
TOTALE	1700	33.658

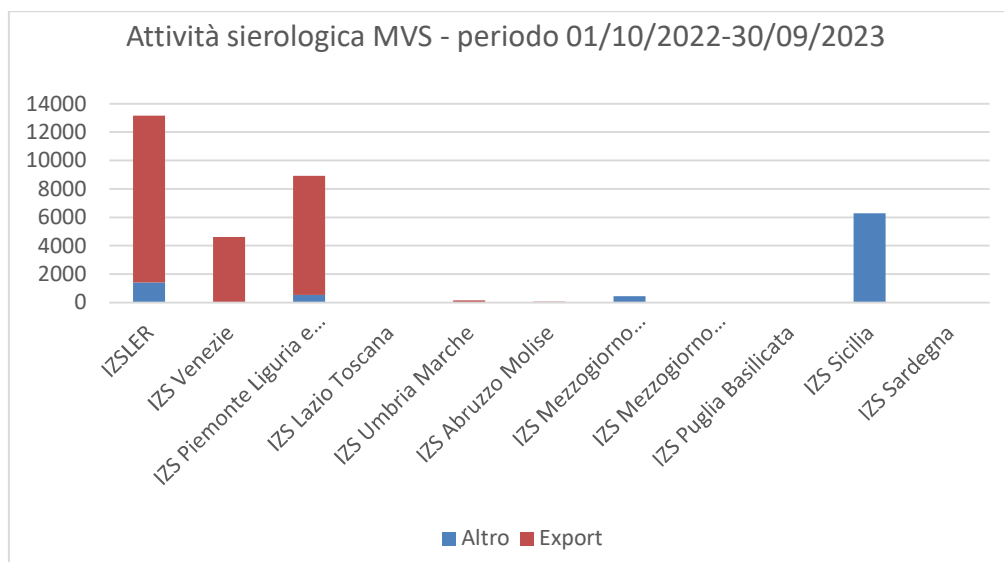
*nr=non riportato

*Monitoraggio sierologico per MVS a livello nazionale - periodo 01/10/2022 – 30/09/2023
(Totale test: 33.658)*



Analizzando il dettaglio dell'attività analitica eseguita per finalità export si evince che è effettuata prevalentemente nelle regioni del nord Italia, e i territori di competenza dei suddetti IZZSS rientrano nella macro regione indenne per APHIS.

Dettaglio dei campioni eseguiti per finalità Export e diversa da Export - periodo 01/10/2022 al 30/09/2023 (Totale test: 33.658)



L'attività diagnostica eseguita dal CERVES per le regioni di competenza (Lombardia ed Emilia Romagna) ha registrato un ulteriore calo di circa il 30% rispetto al numero di campioni analizzati nello stesso periodo dell'anno precedente (N=17.900 per il periodo 2021-2022 vs N=13.161 per il periodo 2022-2023). Questo dato riflette l'andamento a livello nazionale: nel periodo 2021-2022 sono stati effettuati in totale

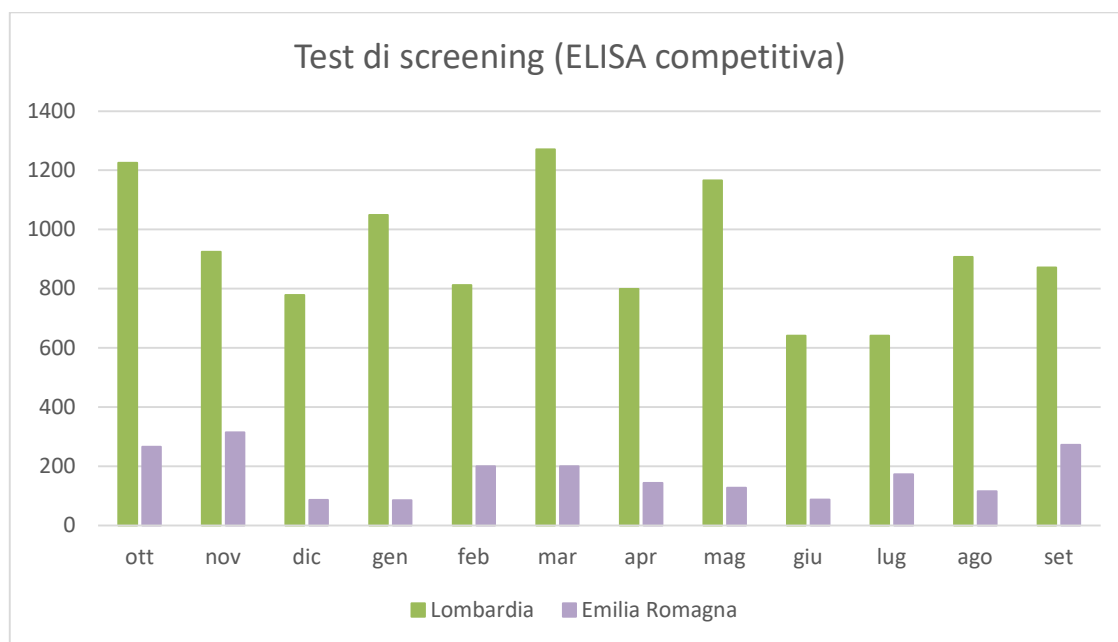
46.311 campioni, mentre nel periodo di interesse (2022-2023) ne sono stati analizzati 33.658.

È plausibile che il calo sia stato registrato anche grazie all'adeguamento della numerosità campionaria prevista per l'export. La stessa era infatti molto eterogenea e per aziende con un numero di capi maggiore di 200, prevedeva il campionamento di 22 animali. Una nota del ministero (prot. 526376 data 14/11/2022) ha uniformato tutte le aziende prevedendo il campionamento di 14 animali.

Anche l'identificazione di diversi focolai di peste suina africana, sia in cinghiali che in alcuni allevamenti di suini, potrebbe avere influito sul calo delle movimentazioni (e conseguentemente delle analisi).

Nei seguenti grafici viene illustrata l'attività del CERVES riguardante le diverse tecniche diagnostiche.

Dettaglio dei campioni eseguiti mensilmente dal CERVES per il test ELISA screening - periodo 01/10/2022 al 30/09/2023 (Totale test: 13.161)



Analogamente, con la cessazione del piano non è stato esaminato nessun campione di feci per ricerca di virus.

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 esegue un importante numero di test analitici non inerenti attività diagnostica ma effettuati per vari scopi quali:

- titolazioni e verifiche di reagenti, componenti di kit ELISA utilizzati nelle prove di routine e destinati alla vendita;
- reazioni di controllo sui kit prodotti per la verifica dei lotti e successiva preparazione dei certificati di analisi dei prodotti (kit diagnostici),
- continua attività di sviluppo, ottimizzazione, validazione o miglioramento di test diagnostici,
- reazioni per l'allestimento dei pannelli di campioni destinati ai Proficiency test nazionali.

In aggiunta a quanto sopra nel periodo di interesse il CERVES è stato fortemente impegnato in attività internazionali che possono essere annoverate come "non routinaria" e comprendono l'attività analitica e di supporto per cooperazioni internazionali mantenute come Laboratorio di referenza WOA/FAO.

Attività svolte nell'ambito del Centro di Referenza FAO.

Le attività svolte nell'ambito del Centro di Referenza FAO sono state dettagliate nella Letter of Agreement (LoA) sottoscritta con IZSLER (Decreto N. 307 IP 859/2022 del 02/11/2022) e successiva integrazione (Amendment LoA – Decreto N. 263 IP 591/2023 del 25/07/2023) e sono di seguito riassunte:

OUTPUT 1: Banca di reagenti presso il CERVES

Allestimento e mantenimento di una Banca di reagenti presso il CERVES, destinata a 10 paesi della penisola Balcanica, sia per l'esecuzione dei Proficiency Test annuali che in caso di emergenza conseguente a focolai nella regione. Le attività hanno previsto: (i) fornitura di kit diagnostici, (ii) allestimento e fornitura di kit PCR, (iii) preparazione di standard di riferimento.

OUTPUT 2 Sierosorveglianza su 2574 campioni di siero ricevuti dal Libano.

Ciascun campione è stato esaminato in titolazione verso i tre sierotipi O, A, Asia1 e con il test DIVA (3ABC-ELISA) per l'evidenziazione di animali infetti.

OUTPUT 4: Immunogenicity Study e support diagnostico

Activity 4.2: Immunogenicity Study in Giordania.

Lo scopo di questo studio è quello di condurre un monitoraggio post-vaccinazione sul campo, per valutare l'efficacia del vaccino trivalente Bioaftogen (O1 Campos, A24 Cruzeiro, A Arg 2001 C3 Indaial) nell'introduzione dell'immunità di gregge e della protezione dall'afta epizootica. Secondo le linee guida FAO/WOAH, l'approccio consiste nel selezionare una coorte di animali che saranno vaccinati e monitorati longitudinalmente nel tempo.

Per lo studio sono stati ricevuti un totale di 636 sieri prelevati sequenzialmente da due gruppi di animali (pecore e capre). I campioni sono stati esaminati per:

- Ricerca di anticorpi verso le proteine strutturali (SP-Ab) verso i sierotipi O, A tramite ELISA
- Ricerca di anticorpi verso le proteine non strutturali (NSP-Ab) tramite ELISA
- Ricerca di anticorpi neutralizzanti mediante sieroneutralizzazione con virus omologo al ceppo vaccinale (OBFS) e con virus circolante in Giordania.

L'analisi dei risultati ottenuti ha permesso di concludere che:

- Il protocollo utilizzato per la vaccinazione è risultato appropriato per ottenere una risposta immunitaria significativa nei piccoli ruminanti.
- La formulazione del vaccino è risultata idonea a indurre nei piccoli ruminanti una risposta immunitaria in grado di produrre anticorpi neutralizzanti contro il ceppo di FMDV di sierotipo O incluso nel vaccino (omologo di O BFS) e anche contro il ceppo di FMDV di sierotipo O recentemente circolato nelle regioni del Medio Oriente.
- Sono state rilevate differenze nella conversione immunitaria tra capre e pecore.
- Una seconda somministrazione del vaccino ha contribuito a raggiungere un livello efficace di immunizzazione (95% di probabilità di protezione) nella maggior parte della popolazione.

Activity 4.4: Immunogenicity Study in Libya.

Ricevuti 387 sieri prelevati in differenti regioni del paese. I campioni sono stati esaminati in titolazione per la ricerca SP-Ab verso i quattro sierotipi O, A, SAT1 e SAT2 e per la ricerca di NSP-Ab. L'analisi preliminare dei risultati identifica una sieroprevalenza di positività al test per ricerca di NSP-Ab di circa il 20% confermando il dato riscontrato nella sierosorveglianza effettuata nel 2012.

Activity 4.5 e 4.6 ha previsto la fornitura di numerosi kit ELISA per diagnosi di virus aftosi in Egitto e Libya.

OUTPUT 5: organizzazione di Training di diagnostica di laboratorio.

Il CERVES ha ospitato dal 15 Maggio al 26 Maggio 4 colleghi (due dalla Giordania e due dall'Iraq) per partecipare ad un training teorico/pratico sull'uso delle metodiche sierologiche e virologiche per la ricerca di virus aftosi e sull'interpretazione dei risultati. Sono stati inoltre affrontati temi relativi biosicurezza nelle fasi di manipolazione del virus.

OUTPUT 6: fornitura in emergenza di diagnostici a paesi interessati dall'emergenza del sierotipo SAT 2 in Medio Oriente. Con la fornitura dei reagenti di Biologia molecolare, sono state inviate le informazioni sulla tipologia di reazione da eseguire ed i protocolli per risospendere i reagenti.

Analisi virologiche su campioni provenienti dalla Libia.

Nel 2023 il sono pervenuti al CdR campioni sospetti per afta dalla Libia per conferma diagnostica.

- Marzo 2023: Ricevute 13 FTA Card sulle quali sono stati tamponati campioni di epitelio e sangue. Le indagini diagnostiche hanno richiesto inizialmente l'estrazione del materiale genetico sul quale eseguire indagini esclusivamente di tipo molecolare. Stante la tipologia di campione sono state ottenute debole positività solo nei campioni estratti da FTA card sulle quali era stato deposto epitelio e solo da un campione, è stato possibile effettuare il sequenziamento che ha confermato la presenza del sierotipo aftoso O.
- Maggio 2023: ricevuti 14 campioni di tessuto epiteliale bovino e un fluido vescicolare. Sui campioni sono state effettuate tutte le prove di virologiche per l'identificazione di virus aftosi.
I test utilizzati hanno riconfermato la circolazione del sierotipo O topotipo EA-3 sul territorio libico già identificato in passato in nord Africa.

Supporto per interpretazione dati per sierosorveglianza in Siria.

Anche per tutto il 2023 è continuato il supporto tecnico ai colleghi siriani nell'esecuzione e interpretazione dei risultati delle prove sierologiche su campioni prelevati nell'ambito del post vaccination monitoring per afta in Siria. La proficua collaborazione ha consentito di ottenere set di dati fruibili e idonei per la stesura di una pubblicazione.