



**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 SWINE VESICULAR DISEASE



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

Relazione annuale 2012

Periodo di riferimento 01/11/2011 – 31/10/2012

Decreto 2 Novembre 1991

ATTIVITA' SVOLTA

Attività diagnostica

Tutte le prove diagnostiche basate su metodiche/kit ELISA sono eseguite con test sviluppati e prodotti "in house", pertanto la valutazione delle potenzialità del CERVES deve obbligatoriamente tenere in considerazione anche i tempi e le risorse necessari alla produzione dei reagenti e dei kit utilizzati.

Benché non utilizzate in modo routinario, sono da annoverare anche le metodiche di amplificazione genomica RT-LAMP per il virus MVS e Real Time RT-PCR per i virus Afta e MVS (entrambe eseguita con due set di primer/sonda). Questi test sono stati validati e implementati presso il CERVES, che mantiene la pronta capacità di introdurli in uso corrente in caso di necessità, attraverso il loro uso saltuario per particolari applicazioni e per ricerca.

Inoltre, il CERVES si avvale del Reparto di Genomica per il sequenziamento di parti genomiche dei virus MVS finalizzato ad analisi filogenetiche.

1) Standardizzazione e validazione di metodiche diagnostiche

I Metodi di Prova (MP) adottati dal CERVES seguono, ove esistenti, i riferimenti normativi specifici.

Tuttavia, il CERVES ha acquisito nell'arco di numerosi anni una esperienza riconosciuta internazionalmente nello sviluppo e validazione di metodi diagnostici innovativi per la identificazione di antigeni e anticorpi dei virus aftosi, basati su metodologie ELISA; l'innovazione e l'apporto migliorativo in termini di standardizzazione deriva dall'utilizzo di anticorpi monoclonali prodotti e caratterizzati "in house", in sostituzione dei sieri policlonali immuni suggeriti nelle procedure per l'allestimento dei metodi normati.

Anche il Manuale OIE riconosce come valide le variazioni metodologiche che contemplano l'uso di anticorpi monoclonali, quindi i test in uso presso il CERVES non deviano rispetto ai riferimenti normativi. Al contrario, in ambito MVS, due MP sviluppati dal CERVES sono riconosciuti come test di riferimento nel manuale OIE: in particolare si tratta del test sierologico ELISA competitiva basato sull'anticorpo monoclonale 5B7, e del test per la dimostrazione del virus tramite RT-PCR.

Sviluppo di diagnostici per afta.

È inoltre continuato nel periodo di riferimento lo sviluppo e validazione di nuovi kit pronto-uso per la diagnostica dell'afta. La competenza consolidata nella stabilizzazione dei reagenti e trasformazione di test in-house in kit confezionati pronto-uso ha portato nel 2012 al lancio di quattro nuovi kit, che completano il portfolio dei diagnostici per afta basati su metodiche ELISA per la dimostrazione di anticorpi e per l'identificazione dei virus accompagnata da sierotipizzazione in campioni clinici.

È stato predisposto l'opuscolo informativo in calce al presente capitolo ed un video dimostrativo dell'esecuzione dei kit diagnostici.

I suddetti prodotti sono stati distribuiti in 35 Paesi endemici in Asia, Africa e Medio Oriente (vedi capitolo produzioni), dove sono stati molto apprezzati non solo per le performance diagnostiche ma anche per l'enorme semplificazione rispetto ai test sino ad ora disponibili.

Conseguentemente, i kit prodotti dal CERVES contribuiscono all'implementazione del Programma a lungo termine patrocinato da OIE e FAO per il controllo globale dell'afta denominato *Progressive Control Pathway (PCP)* ed hanno portato grande visibilità internazionale per l'Istituto e per la nazione.

Sempre nell'ambito di nuovi sviluppi, nel corso del 2012 è stato messo a disposizione di Paesi africani e Medio Orientali un nuovo pensile test (test rapido eseguibile in campo, basato sulla metodologia Lateral Flow Chromatography) per la diagnosi e tipizzazione del sierotipo SAT 2. Come i precedenti, anche questo nuovo strumento diagnostico, creato con un anticorpo monoclonale prodotto dal CERVES, è stato sviluppato in collaborazione con WRL e con una ditta commerciale specializzata nel settore.

Sviluppo e miglioramento di metodi diagnostici per MVS.

Durante l'ultimo anno il metodo Real-Time PCR per la ricerca del virus della Malattia Vescicolare del suino basato sulla regione 5'UTR del genoma virale e messo a punto dal Community Reference Laboratory (Pirbright) è stato migliorato al fine di poter efficacemente identificare tutti i ceppi circolanti in Italia.

Nel metodo originale sono previste due diverse reazioni che coinvolgono due diverse porzioni della regione 5'UTR denominate 2B-IR e 3-IR; la sua validazione presso il CERVES ha evidenziato delle carenze in termini di sensibilità diagnostica. In particolare sono stati valutati un totale di 81 campioni fecali positivi (selezionati da una più ampia collezione presente presso il CERVES) rappresentativi della situazione epidemiologica italiana e originati da focolai occorsi in Italia durante il periodo 1997-2012.

La reazione 2B-IR riusciva ad identificare il 90% (73/81) dei campioni testati non rilevando 8 ceppi del cosiddetto lineaggio Italiano (SVDV-ITA); la reazione con primer 3-IR non rilevava nessuno dei ceppi appartenenti al lineaggio cosiddetto Portoghese (SVDV-POR) e solo l'81% (45/55) dei ceppi appartenenti a SVDV-ITA.

L'analisi della sequenza nucleotidica della regione 5'UTR effettuata su 30 ceppi di SVDV ha evidenziato la presenza di mutazioni a livello di primers/sonda proprio nei ceppi non rilevati.

Per migliorare il metodo si è deciso di modificare i primers e la sonda coinvolti rispettivamente nella reazione 2B-IR e nella 3-IR tramite degenerazioni nucleotidiche in alcune delle posizioni di mis-matching. La reazione 2B-IR con primers degenerati (2B-IR deg) ha rilevato gli 8 ceppi SVDV-ITA negativi nel test 2B-IR originale, la sensibilità è risultata del 99% e la specificità valutata su feci negative è stata del 100%.

La reazione 3-IR con sonda degenerata si è mostrata efficace nel rilevare i ceppi ITA e POR prima non rilevati, tuttavia la specificità è attualmente da valutare perché le modifiche apportate sembrano dare dei segnali aspecifici ancora da appurare.

Il miglioramento delle capacità diagnostiche del CERVES in ambito di MVS è stato indirizzato inoltre alla messa a punto di un metodo Real-Time PCR basato sulla regione del gene 3D del virus.

La scelta di affiancare al metodo Real-time già migliorato e sopra descritto un secondo test basato su una regione diversa del genoma virale, offre la possibilità di monitorare più efficacemente il virus MVS che, essendo soggetto a mutazioni, potrebbe non essere rilevato se venisse testato in una sola regione.

La regione 3D è il target della PCR convenzionale che corrisponde al al test di referenza OIE ed è routinariamente utilizzata dal reparto.

L'allineamento di 123 sequenze della regione 3D ottenute dal CERVES ha permesso di disegnare due sonde TaqMan complementari rispettivamente ai ceppi circolanti ITA e POR. La nuova Realtime PCR è quindi stata messa a punto associando le due sonde con i primer utilizzati in routine. La validazione è preliminare ma incoraggiante; il nuovo test, valutato su un pannello di 51 campioni fecali positivi rappresentativo della situazione epidemiologica italiana, rilevato il 100% dei ceppi. La specificità valutata su 125 campioni fecali negativi e su 12 sierotipi di Enterovirus dei suini si è dimostrata del 100%.

Oltre alle sequenze della regione 3D e della regione 5'UTR, si stanno implementando quelle della regione VP1 che codifica per la proteina capsidica. La costruzione di alberi filogenetici basati su queste tre diverse porzioni potrebbe essere un valido strumento per studi epidemiologici e di filogenesi.

In ambito di Qualità, il CERVES:

- ha mantenuto gli standard conformi alla ISO17025;
- è stato oggetto di verifica ispettiva interna ed esterna (Accredia);
- TUTTI i Metodi di Prova utilizzati dal CERVES sono soggetti a valutazione attraverso **ring test internazionali**, organizzati con frequenza annuale (vedi oltre paragrafo specifico)
- la performance dei MP è regolarmente monitorata attraverso le carte di Controllo, che sono parte del controllo di qualità interno, e permettono l'analisi del trend delle reazioni.

Antigen detection ELISA kits

FMDV ANTIGEN DETECTION
ELISA and SEROTYPING
OF **FMDV O, A, ASIA 1 and C**
5 plates/kit (6 tests/plate)



FMDV ANTIGEN DETECTION
ELISA and SEROTYPING
OF **FMDV O, A, SAT1 and SAT1**
5 plates/kit (6 tests/plate)

Antibody detection ELISA kits SP Ab

SOLID-PHASE COMPETITIVE ELISA
(SPCE) FOR ANTIBODIES SPECIFIC
TO **FMDV SEROTYPE O**
5 plates/kit
90 spot tests/plate
45 test sera in two dilution/plate
22 test sera in four dilution/plate



SOLID-PHASE COMPETITIVE ELISA
(SPCE) FOR ANTIBODIES SPECIFIC
TO **FMDV SEROTYPE A**
5 plates/kit
90 spot tests/plate
45 test sera in two dilution/plate
22 test sera in four dilution/plate



SOLID-PHASE COMPETITIVE ELISA
(SPCE) FOR ANTIBODIES SPECIFIC
TO **FMDV SEROTYPE Asia 1**
5 plates/kit
90 spot tests/plate
45 test sera in two dilution/plate
22 test sera in four dilution/plate



NSP Ab
FMDV 3ABC-TRAPPING INDIRECT ELISA
5 plates/kit (45 tests/plate)



IZSLER is a Public Technical-Scientific Body, with an autonomous technical and administrative management. It offers services in the Public Veterinary sectors i.e. to the Regional and National Veterinary Services, Breeders and Consumers.

It provides services as required by national and regional laws in the fields of animal health and food security.

IZSLER is NRL for Vesicular Diseases, OIE Reference Laboratory for Swine Vesicular Disease and FAO



Reference Centre for Foot-and-Mouth Disease and Swine Vesicular Disease

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini"

BRESCIA - Headquarter

Via Bianchi 7/9, I-25124 Brescia (ITALY)
Tel. +39 030 2290.1 - Fax +39 030 2425251

email: info@izsler.it
<http://www.izsler.it>

Contacts :
emiliana.brocchi@izsler.it
santina.grazioli@izsler.it



Istituto Zooprofilattico
Sperimentale della Lombardia
e dell'Emilia Romagna
Brescia, Italy

FMD DIAGNOSTIC KITS

*developed in collaboration with
The Pirbright Institute, UK*



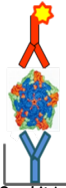


FMDV ANTIGEN DETECTION ELISA Serotyping of FMDV O, A, Asia 1, C



FMDV ANTIGEN DETECTION ELISA Serotyping of FMDV O, A, SAT 1, SAT2

TEST PRINCIPLE



DETECTOR MAb PO-conjugated

FMDV Antigen (positive sample)

CATCHING MAb (coated)

The assay is a sandwich ELISA performed with selected combinations of anti-FMDV monoclonal antibodies (MAbs), used as coated and conjugated antibodies.

The test can be applied for detection and typing of FMD viruses in homogenates of epithelium vesicles and in vesicles fluid.

Only in these clinical samples the FMD virus usually achieves the concentration required to provide a positive signal in ELISA assays.

One kit is designed for detection and typing of FMD viruses of type O, A, Asia1 and C. A pan-FMDV test, detecting any isolate of type O, A, C and Asia1 and in addition some isolates of the SATs serotypes, is included in the kit to complement the specific typing and to detect FMD viruses which might escape binding to the selected type-specific MAb.

Another kit, tailored for African countries, is designed for detection and typing of FMD viruses of type O, A, SAT1 and SAT2.

Microplates are supplied pre-coated with catching MAbs and with positive controls already incorporated onto plates.

Test samples (epithelium suspensions or vesicle fluids) are incubated with the coated MAbs. The FMD virus present in samples is captured by the homologous type-specific MAb and by an universal pan-FMDV MAb (these are the catching antibodies). After washing to remove unbound material, a unique pan-FMDV MAb, peroxidase-conjugated, is added (detector) in one kit (typing of FMDV O, A, C, Asia1) or two detector conjugates (A and B) are distributed in definite columns (as illustrated in the scheme below) in the kit for serotyping of FMDV O, A, SAT1 and SAT2.

In case of positive samples, the conjugated MAb binds to the FMD virus trapped by the catching MAb, forming an Ag-Ab complex. After incubation, the unbound conjugate is removed by washing, and the TMB-chromogen solution is delivered into wells. A colorimetric reaction develops if the conjugate has bound to the sample antigen: the colour development is proportional to the amount of viral antigen present in the test sample. After addition of a stop solution, the optical density of the developed colour is read by a microplate photometer.

The test is fast - 2.5 hours approximately at room temperature - and simple - the pre-coated plates supplying the different type-specific reagents whilst the operator handles a unique or at most two immunological reagents, corresponding to detector conjugates.

Example of results and interpretation

Catching MAbs	Unique Conjugate pan-FMDV (cross-reactive O, A, Asia1, C + some SATs)												Interp.
	Type O	Type A MAb1 MAb2		Type Asia1	Type C	Pan-FMDV		SAT1		SAT2			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Sample 1 A													Neg
Sample 2 B													+A
Sample 3 C													+O
Sample 4 D													+C
Sample 5 E													+Asia 1
Sample 6 F													Neg
+ controls G	O	A					Asia1	C	FMDV				
-controls H													

Legend: Yellow square = positive reaction (samples); Orange square = positive reaction (controls)

ELISA kits are supplied with five ELISA plates.

Up to six samples can be tested in each plate.

References

S. Grazioli, E. Brocchi, G. Dho, N.P. Ferris. A simple antigen detection ELISA kit for FMDV serotypes O, A, C and Asia 1. Sess. Res. Gr. St. Tech. Committee of the Europ. Comm. Control FMD - Vienna, Austria, 27 Sept - 1 Oct 2010.

S. Grazioli, N. Ferris, G. Dho, E. Spagnoli, E. Brocchi. Ready-to-use ELISA kit for FMDV diagnosis and serotyping tailored for Africa. Sess. Res. Gr. St. Tech. Committee of the Europ. Comm. Control FMD - Jerez, Spain, 29 Oct-31 Oct 2012.

Catching MAbs	Conjugate A: pan-FMDV (O,A,Asia1,C + some SATs)						Conjugate B (SAT1+SAT2)						interpretation
	Type O	Type A MAb1 MAb2		Pan-FMDV	Type SAT1	Type SAT2	Type O	Type A MAb1 MAb2		Pan-FMDV	Type SAT1	Type SAT2	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Sample 1 A													Neg
Sample 2 B													+A
Sample 3 C													+O
Sample 4 D													SAT1
Sample 5 E													SAT2
Sample 6 F													Pos untyped
+ controls G	O	A					FMDV	SAT1	SAT2				
-controls H													

Legend: Yellow square = positive reaction (samples); Orange square = positive reaction (controls); Grey square = SATs viruses may react positive or negative with the pan-FMDV MAb

SOLID-PHASE COMPETITIVE ELISA (SPCE) FOR ANTIBODIES SPECIFIC TO FMDV serotypes O, A, Asia 1 N. 3 kits, one per each serotype

INTRODUCTION

Animals infected or vaccinated with Foot-and-Mouth Disease Viruses (FMDV) elicit antibodies against proteins of the viral capsids, also called structural proteins (SP). Anti-SP antibodies cannot distinguish between infected and vaccinated animals and are mostly serotype-specific. Therefore, different reagents must be used for each of the seven FMDV serotypes and specific assays may be required even for antigenically distant variants within a serotype.

Applications of SP-serology in FMD diagnosis include:

- * Serosurveys during outbreaks/epidemic (in association with other diagnostic assays)
- * Exit strategy to an FMD epidemic (to regain FMD free-status)
- * Evaluation of vaccinal coverage (vaccination campaigns) and vaccine induced immunity
- * Serological monitoring in countries at risk of FMD introduction (ex. buffer zones)
- * Import/export, animal movement/trade (including exotic species, circus, zoo etc)

Serological assays commonly used for the detection of anti-SP antibodies are ELISA and Virus Neutralisation test. ELISA assays are easier, faster, suited for large scale and automation; in addition, they can make use of inactivated FMDV antigens and can consequently be adopted in a laboratory without high containment biosecurity status.

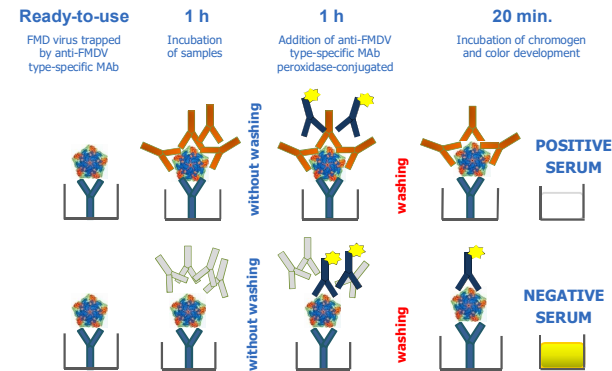
TEST PRINCIPLE

Each assay is a solid phase competitive ELISA (SPCE) based on a peroxidase-conjugated, neutralizing monoclonal antibody (MAb), specific for one FMDV serotype. Its binding to the homologous FMDV serotype immobilized onto the solid-phase is inhibited by antibodies against that serotype present in test sera. The test can be applied to measure antibodies in serum or plasma samples of FMDV infected or vaccinated animals of any susceptible species.

ELISA microplates are supplied pre-coated with inactivated FMDV antigens captured by homologous serotype-specific MAbs.

Appropriately diluted sera are incubated with the trapped antigen, enabling the specific antibodies present in the sample to bind to the antigen. Then, the anti-FMDV serotype-specific MAb, conjugated with peroxidase, is dispensed: its reaction with the homologous antigen will be inhibited by antibodies of positive sera previously bound to the virus, while in case of negative sera the conjugated MAb can bind to the FMDV antigen. After incubation, the unbound conjugate is removed by washing and the TMB substrate/chromogen solution is delivered into wells. A colorimetric reaction develops if the conjugated MAb has bound to the virus, i.e. if test serum is negative, while colour development is inhibited by positive sera. Antigen and conjugate concentrations are pre-calibrated in order to give a suitable reaction value (OD). After addition of a stop solution, the optical density of the developed colour is read by a microplate photometer.

The test is fast - 2.5 hours approximately at room temperature - and simple.



Each kit is supplied with five ELISA plates.

Serum samples can be screened at a single dilution 1/10, or in two dilutions for a semi-quantitative test (1/10, 1/30) or in four dilutions for titration (1/10, 1/30, 1/90, 1/270). Ninety or 45 or 22 test sera (with 1, 2 or 4 dilutions per each serum respectively) can be examined in one plate.

FMDV 3ABC-TRAPPING ELISA anti-NSP antibodies

INTRODUCTION

The test is a trapping-indirect ELISA for the detection of antibodies to the non-structural polypeptide 3ABC of FMD virus in serum or plasma samples of large and small ruminants.

In Foot-and-Mouth Disease (FMD) investigations, the differentiation of infected from vaccinated animals is based on the identification of antibodies against the viral non structural proteins (NSP). FMDV vaccines consist of partially purified, inactivated virus particles: the vaccine purification eliminates NSP produced during virus replication. Therefore, animals vaccinated with purified vaccines will develop antibodies against viral structural proteins (SP) only, whilst animals infected elicit antibodies against both SP and NSP.

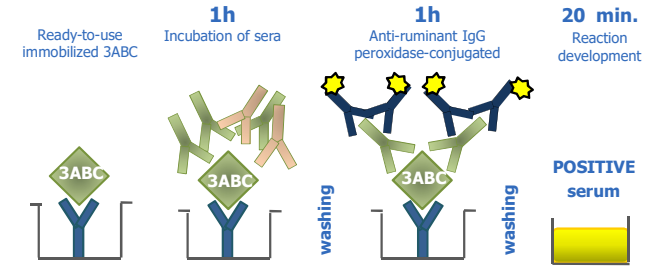
Several NSP are produced during viral replication. NSP are mostly common to the seven FMDV serotypes and, among NSP, the polypeptide 3ABC is indicated as one of the most immunogenic. The detection of anti-3ABC antibodies is indicative of a current or past infection with any of the seven FMDV serotypes, so the test reveals infected animals regardless their vaccination status.

TEST PRINCIPLE

The FMDV 3ABC-TRAPPING ELISA KIT uses an anti-3A specific monoclonal antibody (MAb) coated to the solid phase to trap the recombinant 3ABC polypeptide expressed in *E. coli*.

Microtitre plates are supplied pre-coated with the 3ABC antigen captured by the MAb.

Appropriately diluted test sera are incubated with the trapped antigen, enabling the specific antibodies present in the sample to bind to the 3ABC. After washing to remove unbound material, an anti-ruminant IgG, peroxidase-conjugated MAb is dispensed: the anti-ruminant IgG binds to the FMDV antibodies of the positive samples immune-complexed with 3ABC. After incubation, the unbound conjugate is removed by washing, and the TMB-chromogen substrate is delivered into wells. A colorimetric reaction develops if the conjugate has bound to the sample antibody: the colour development is proportional to the amount of antibodies present in the test sample. After addition of a stop solution, the optical density of the developed colour is read by a microplate photometer.



Kits are supplied with five ELISA plates.

Each sample is dispensed in duplicate wells, one well of which contains antigen (3ABC) and one which does not (buffer). Forty-five samples plus three control sera can be examined in one ELISA plate.

Reference

Brocchi E, Bergmann IE, Dekker A, Paton DJ, Sammin DJ, Greiner M, Grazioli S, De Simone F, Yadin H, Haas B, Bulut N, Malirat V, Neitzert E, Goris N, Parida S, Sorensen K, De Clercq K. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. Vaccine. 2006 Nov 17;24(47-48):6966-79

2) Produzione e distribuzione di reagenti

Oltre ai reagenti e kit distribuiti all'esterno e dettagliati successivamente, vanno annoverati anche tutti i reagenti diagnostici utilizzati per l'attività analitica routinaria del CERVES (anticorpi monoclonali e policlonali, coniugati, antigeni inattivati e/o ricombinanti, matrici virali) che sono di produzione interna e il cui volume è specificato nel capitolo successivo.

Per l'esecuzione del test ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi della Malattia Vesicolare del Suino (MVS), utilizzato come metodo di screening nel Piano Nazionale di sorveglianza/eradicazione, il CERVES ha prodotto e distribuito agli IZZSS territorialmente competenti reagenti/kit in volume idoneo per l'esecuzione di oltre 470.000 test, a cui si aggiungono quelli utilizzati presso il CERVES, per l'esecuzione di circa 100.000 test ELISA eseguiti per l'attività di sorveglianza nelle due regioni di competenza IZSLER (Lombardia-Emilia Romagna).

Il totale raggiunge una produzione complessiva per **circa 570.000 test**, mantenendo il trend dei tre anni precedenti. I materiali sono da sempre **distribuiti gratuitamente agli IZZSS** da parte del CERVES sul quale aggravano anche le spese di spedizione. Utilizzando come stima il costo di listino dei medesimi reagenti adottato dall'Istituto per forniture extra-nazione, corrispondente a 0,76 Euro/test e significativamente inferiore al costo medio dei kit sierologici commerciali, il **valore di questa produzione è quantificato in € 433.000**.

Numero di Kit per screening MVS distribuiti agli IZZSS periodo 01 Novembre 2011 – 31 Ottobre 2012

	Kit distribuiti per N. test
IZS PLV, TORINO	38000
IZS VE, PADOVA	38000
IZS LT, ROMA	25000
IZS UM, PERUGIA	20000
IZS AM, TERAMO	25000
IZS AM, LANCIANO	20000
IZS PB, FOGGIA	21000
IZS ME, NAPOLI	35000
IZS CATANZARO	32000
IZS SI, PALERMO	11000
IZS SA, SASSARI	109000
Totale	374.000
IZSLER, BRESCIA (<i>test effettivi</i>)	97227
Totale complessivo	471.227

Nell'ambito delle funzioni come Laboratorio di referenza OIE per la MVS, il Centro ha fornito nel periodo di riferimento reagenti per la diagnosi sierologia di Malattia

Vescicolare del Suino anche a Paesi che si approvvigionano regolarmente, quali Belgio, Polonia e Canada.

Nel 2012 si è intensificata la produzione e distribuzione di **kit pronto-uso per diagnosi sierologica e virologica di AFTA**. Le forniture di seguito elencate sono state distribuite nell'ambito di progetti finanziati da FAO o EUFMD.

I kit sono composti da cinque piastre ciascuno, completati con tutte le soluzioni e reattivi chimici e immunologici necessari all'esecuzione, e corredati di brochure, certificato di analisi del lotto e tracciabilità dei lotti dei singoli componenti.



*Kit diagnostici afta PRONTO-USO sviluppati e prodotti presso il Reparto
Forniture nell'ambito di CONTRATTI – FAO/EUFMD nell'anno 2012*

Riferimento contratto/attività	Paese beneficiario	TEST VIROLOGICI		TEST SIEROLOGICI			
		FMDV antigen detection ELISA		trapping ELISA	SP Antibody ELISA		
		type O, A, SAT1, SAT2	type O, A, C, Asia1	3ABC	FMDV O	FMDV A	FMDV Asia1
Distribuiti su richiesta FAO	FAO-Roma		1				
	Egitto	9					
	Israele	4	1				
	Giordania	2	1				
	Gaza	2					
	West Bank	2					
	Francia	2					
	Tunisia	2					
	Marocco	2					
	Algeria	2					
	Mauritania	2					
	Ciad	2					
	Niger	2					
	Sudan	2					
	Libia	4					
	Egitto						
	Turchia	2	2				
	Ghana	2					
	Iraq	2					
	Siria	2					
Libano	2						
Kenia	5						
Progetto finanziato da EuFMD	Georgia		1	20	8	8	8
	Armenia		5	20	5	7	7
	Azerbaijan			18	15	15	15
Progetto IDENTIFY finanziato da FAO	Cameroon	8			2	2	
	Congo	3			1	1	
	Senegal	8			2	2	
	Etiopia	8			2	2	
	Tanzania	8			2	2	
	Sudan	3			1	1	
	Nigeria	8			2	2	
	RepublCentralAfrica	3			1	1	
	Gabon	3			1	1	
	DRC	5			2	2	
	Rwanda	5			2	2	
	Botswana	8			2	2	
	Uganda	8			2	2	
FAO project GTFS/INT/907/ITA Resp. Dott. GC Ferrari	Pakistan		15	20	30	30	30
TOTALE KIT DISTRIBUITI		132	26	78	80	82	60

Altro:

Il CERVES gode di leadership riconosciuta internazionalmente nell'ambito scientifico degli **anticorpi monoclonali**; conseguentemente è stata soddisfatta con la consueta frequenza la fornitura, su richiesta, di anticorpi monoclonali di varia specificità e caratteristiche reattive nei confronti di diversi sierotipi di virus aftosi a vari Partner Europei e non, soprattutto nell'ambito di progetti di ricerca collaborativa e sporadicamente sottoforma commerciale. Altri materiali, in particolare antigeni inattivati o ricombinanti, anticorpi di cattura e coniugati come reattivi diagnostici, sono stati forniti ad istituti di ricerca internazionali.

3) Attività analitica routinaria

Nelle tabelle successive si riportano, suddivisi per le principali tipologie di test, i dati dell'attività analitica **routinaria (intesa come test su campioni ufficiali)**, mentre sarà trattata a parte l'attività analitica in convenzione e quella eseguita per cooperazione internazionale nell'ambito di progetti FAO/EUFMD.

**Numero e tipologia di esami diagnostici (ufficiali) eseguiti al CERVES
Periodo 1 Novembre 2011 - 31 Ottobre 2012**

MALATTIA	RICERCA	REAZIONI (N°)			TOTALE	
AFTA	Esami sierologici	ELISA O (1847)	ELISA A (1901)	ELISA Asia1 (1847)	ELISA 3ABC (84)	5679
	Esami virologici	Isol. virale (8)	ELISA (15)	PCR (23)		46
MVS	Esami sierologici	ELISA scr. (97.227)	ELISA IgG (1116)	ELISA IgM (1116)		99.459
		Siero Neutralizzazione			1085	
	Esami virologici	Isol. Virale (70)	ELISA (39)	PCR (2621)		2730
	Esami genomici	Sequenza gene 3D				6
SV	Esami sierologici	Siero Neutralizzazione				54
EMC	Esami sierologici	ELISA				3823
	Esami virologici	Isol. Virale	ELISA	PCR (95)		95

Il volume di attività diagnostica "routinaria" eseguito dal CERVES si è consolidato, similmente ai due anni precedenti caratterizzati da assenza di ondate epidemiche per MVS in aree ad alta densità di allevamenti suini, nello standard dettato prevalentemente dall'attuazione del Piano Nazionale di sorveglianza della MVS.

Si segnala inoltre la persistenza del virus della encefalomiocardite (EMCV) con il verificarsi di casi gravi, anche se l'attività di sorveglianza è limitata alle regioni di competenza dell'IZSLER. La diagnostica virologica per EMCV è effettuata anche presso alcune sezioni dell'IZSLER tramite test RT-PCR, pertanto il dato riportato si riferisce solamente ai campioni conferiti alla sezione diagnostica di Brescia: in 33 casi su 71 campioni di miocardio da casi clinici sospetti il virus EMCV è stato individuato come causa della patologia. La percentuale dei campioni positivi al test virologico è del 46% e conferma il dato del 45% precedentemente osservato.

E' continuato altresì il riscontro di sieropositività per EMCV, sia in allevamenti suini che in cinghiali catturati durante la stagione di caccia, confermando la circolazione del cardiovirus, non solo nelle specie domestiche ma anche in specie selvatiche.

Situazione epidemiologica MVS

La parte preponderante dell'attività analitica riguarda il Piano di sorveglianza ed eradicazione della MVS: di seguito vengono riportati dati di carattere epidemiologico ed analitici relativi a questa attività a livello nazionale.

Sulla base della dimostrazione diretta del virus in campioni di feci ambientali o di correlazioni con focolai accertati supportata da evidenza di sieropositività, sono stati identificati 15 focolai di MVS nel periodo di riferimento. Tutti i focolai sono stati registrati in Campania (n. 8) ed in Molise (n. 7) in aziende da ingrasso a conduzione familiare ad eccezione di una azienda in Molise che conteneva 560 capi.

Focolai di MVS notificati nel periodo 1 Novembre 2011 al 31 Ottobre 2012

01 Nov 2011 - 31 Dic 2011			
Regione	Ingrasso	N. focolai	N. animali
CAMPANIA	7	7	23
MOLISE	1	1	10
01 Gen - 31 Ott 2012			
CAMPANIA	1	1	20
MOLISE	6	6	631
TOTALE	15	15	684

La maggior parte (11 su 15) dei focolai sono secondari ed identificati in seguito ad indagini di rintraccio (vendita di animali per consumo familiare), mentre è rimasta sconosciuta l'origine degli altri focolai identificati a seguito di controlli eseguiti in azienda previsti dal Piano Nazionale.

Motivo del campionamento nelle aziende sede di focolaio di MVS notificati nel periodo 1 Novembre 2011 al 31 Ottobre 2012

REGIONE	Correlazione con focolaio	Controllo in azienda
CAMPANIA	6	2
MOLISE	5	2
TOTALE	11	4

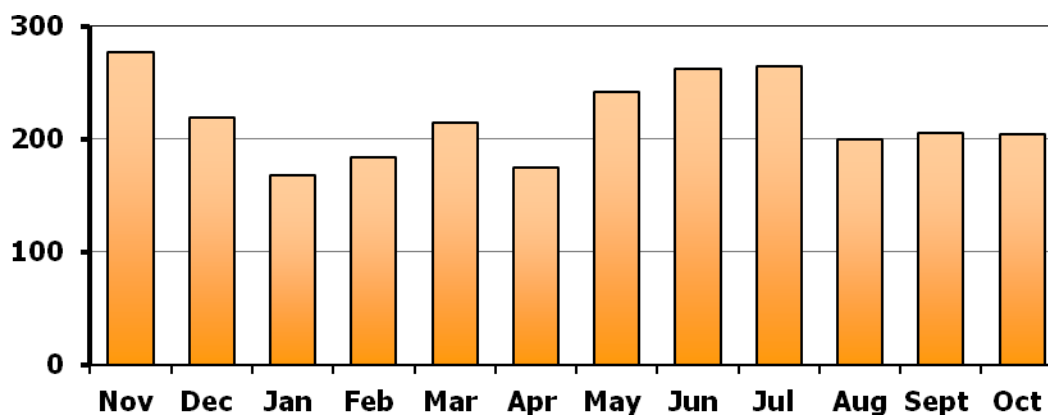
La tabella seguente riassume la frequenza e distribuzione dei focolai di MVS negli anni più recenti; l'ultima ondata epidemica in aree accreditate (che ha coinvolto regioni centrali) risale al 2008 ed è stata prontamente risolta; l'infezione è persistita nelle due regioni meridionali che non hanno raggiunto l'accreditamento: Campania e Calabria (come confermato anche dalla numerosità di aziende sieropositive rilevate ogni anno). E' tuttavia da rilevare l'assenza di casi in Calabria sia nel 2011 che nel 2012, coerente con una parallela significativa diminuzione delle aziende sieropositive. Il rilievo di focolai in Molise, iniziato nel 2011 e continuato nel 2012, ha portato la regione alla perdita temporanea dell'accreditamento con conseguente attuazione di tutti i controlli previsti nell'ordinanza e frequenti sopralluoghi della task force attivata per accelerare il raggiungimento dell'eradicazione.

N. focolai distribuiti per anno (ultimi 5 anni, aggiornato al 31 ottobre 2012) e area geografica

Anno	NORD	CENTRO	SUD	SUD NON ACCREDITATE	ISOLE	Totale focolai
2008	1	46	10	8		65
2009		3		14	1	18
2010		1		2	1	4
2011			1	22		23
2012			6	1		7

Test virologici MVS. Dal punto di vista del volume diagnostico, i test virologici in PCR, effettuati dal CERVES per l'intero territorio nazionale hanno mantenuto il trend degli anni precedenti (tra 2500 e 3000 campioni/anno), distribuiti con frequenza mensile media di 200 test, come evidenziato nell'annesso grafico.

*Frequenza dei **test virologici per MVS** nel periodo 1 Nov 2011 - 31 Ott 2012*
*Test di screening (**PCR**) per la ricerca del virus*
2.621 test (solo ufficiali)



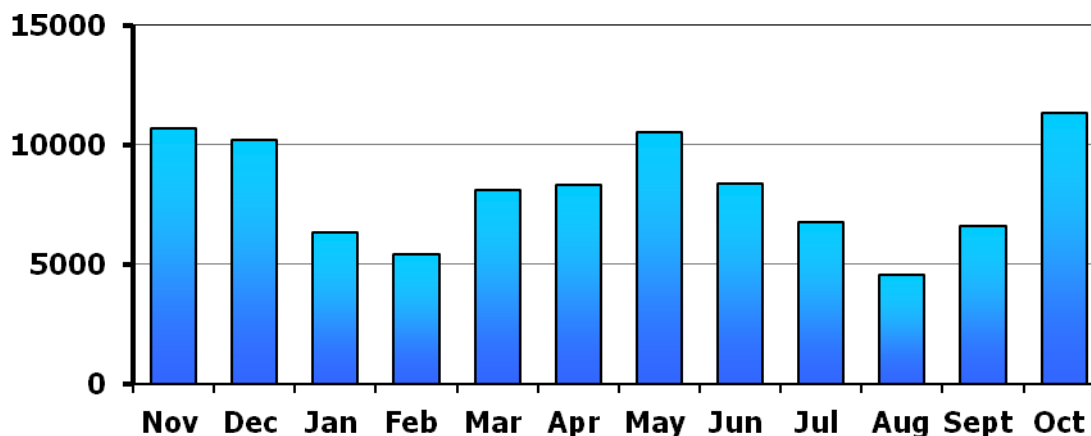
La tabella seguente estende il dettaglio dei controlli virologici eseguiti suddivisi per regione e motivo del prelievo.

Controlli virologici per MVS eseguiti nel periodo 1 Nov 2011 - 31 Ott 2012

REGIONE	Controllo in Stalla di sosta	controllo in azienda accreditata	correlazione epidemiologica con focolaio	Importazione	controllo per riacquisizione accreditamento	movimentazioni	controllo in azienda per sieropositività	Controllo in Zona protezione e sorveglianza	varie	CAMPIONAMENTI POSITIVI
NORD EST	97	20							2	
NORD OVEST	17	1		4		2			2	
LOMBARDIA	6	99							10	
EMILIA R.	6	58							4	
TOSCANA	32	50			2		3			
MARCHE	15	49								
UMBRIA	40	55							7	
LAZIO	97	159		3	8		7		4	
ABRUZZO	23	90	2	1	1	1			1	
MOLISE	26	86	28	4	90	11	9	6	9	6
CAMPANIA	15	435	40	4	19	8	23	5	13	7
BASILICATA	40	94	1			1	3		1	
PUGLIA	20	14	6	1			10		2	
CALABRIA	65	355	1	2	31	29	1		2	
SICILIA	20	14					1		4	
SARDEGNA									1	

Monitoraggio sierologico. Nella tabella seguente è descritta la frequenza mensile dei test sierologici di screening eseguiti presso il CERVES, relativi alla sorveglianza in Lombardia ed Emilia Romagna, territori di competenza dell'IZSLER: : il volume di attività è compreso tra 5000 e 10000 test/mese con oscillazioni correlate ai periodi in cui sono programmati i campionamenti semestrali delle aziende da riproduzione a cicli aperto.

Frequenza dei test sierologici per MVS nel periodo 1 Nov 2011 - 31 Ott 2012
Test di screening (ELISA competitiva) per la ricerca di anticorpi anti-MVS



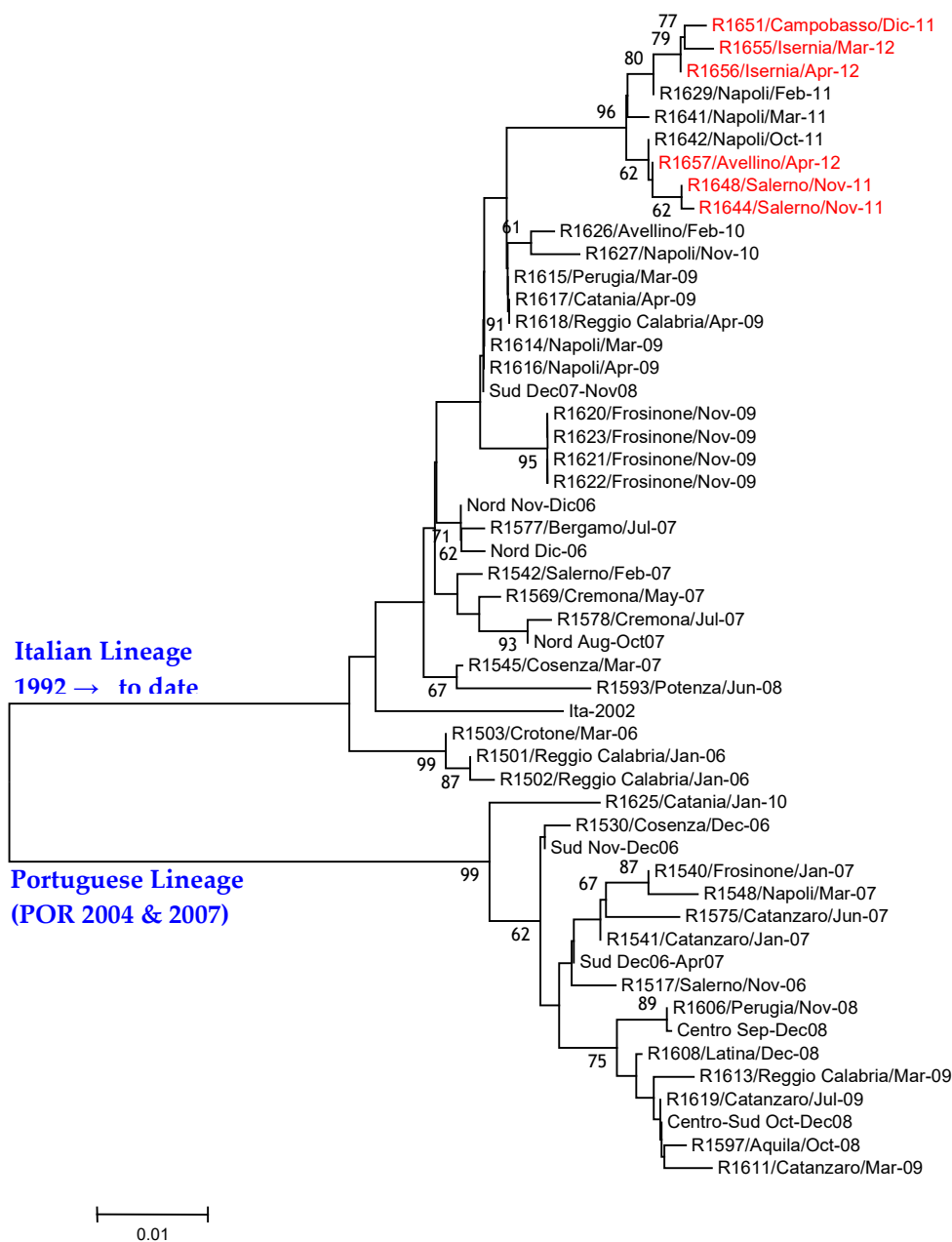
Relativamente al dato nazionale, si riporta l'estrazione riferita al periodo **1 Nov 2011-31 Ott 2012** (i dati per le regioni Abruzzo, Molise, Nord Est, Marche e Sardegna sono aggiornati a Settembre 2012): sono stati esaminati oltre 370.000 capi, controllando circa 13.700 aziende. Il volume di analisi e di aziende controllate rispecchia esattamente quello dell'anno precedente; relativamente alla distribuzione delle sieropositività, è continuato il trend in diminuzione per la regione Calabria, mentre è persistita evidenza di circolazione virale, seppur contenuta, prevalentemente in Campania, Molise (correlata a focolai), Puglia e Basilicata.

Risultati del monitoraggio sierologico per MVS nel periodo 1 Nov 2011-31 Ott 2012

REGIONE	N. aziende controllate	N. sieri esaminati
NORD OVEST	633	26682
NORD EST	837	36719
LOMBARDIA	1220	64566
EMILIA-ROMAGNA	474	26657
TOSCANA	969	16623
UMBRIA	660	15358
MARCHE	579	11351
LAZIO	389	9843
ABRUZZO	465	11197
MOLISE	302	14031
CAMPANIA	1093	44308
BASILICATA	294	12354
PUGLIA	557	6886
CALABRIA	716	26663
SICILIA	1011	9413
SARDEGNA	3514	37860
TOTALE	13713	370511

Analisi filogenetiche. L'albero filogenetico allegato porta in evidenza (colore rosso) il posizionamento di sei nuovi ceppi di virus MVS, rappresentativi dei focolai occorsi in Campania e Molise (durante il periodo di riferimento della presente relazione), rispetto ai virus identificati negli anni precedenti. I sei nuovi ceppi si posizionano in un cluster ad elevata omologia che comprende anche i ceppi responsabili dei focolai temporalmente più vicini, ed appartenenti al lineaggio cosiddetto Italiano.

Analisi filogenetica, basata sulla sequenza del gene 3D, di ceppi di MVS isolati in focolai italiani in anni recenti (2006-2012)



Attività analitica non routinaria

Oltre all'attività eseguita nell'ambito della Sanità Animale con finalità di diagnostica e/o sorveglianza, come di consueto è stato eseguito un esteso numero di esami, che non sono registrati nell'attività routinaria analitica, necessari:

- alla preparazione ed esecuzione di ring test nazionali e/o internazionali,
- a verifiche e controlli di qualità interni,
- verifica dei batch di produzione dei reagenti in-house,
- e soprattutto nell'ambito di programmi di ricerca e programmi di sviluppo e validazione continua di nuovi saggi diagnostici.

Sono stati effettuati controlli con test analitici non routinari per valutare il profilo antigenico, il mantenimento delle caratteristiche strutturali e antigeniche dei ceppi di virus aftosi presenti nella Banca Nazionale di antigeni concentrati da utilizzare come vaccini d'emergenza.

E' continuata in convenzione l'esecuzione di test finalizzati ad escludere la presenza di virus AFTA, MVS ed EMCV in prodotti farmaceutici ad uso umano di origine suina. Nel periodo di riferimento sono stati controllati n. 106 lotti, ciascuno con test RT-PCR per i tre agenti indicati.

Infine, nell'ambito di collaborazioni internazionali e del supporto diagnostico alla FAO sono stati analizzati 2865 sieri:

- 579 sieri dall'Armenia
- 1054 sieri dall'Arzerbaijan
- 687 sieri dalla Georgia
- 545 sieri dall'Iran

campionati per monitoraggio della circolazione di virus aftosi e per la valutazione dell'immunità indotta dalla vaccinazione trivalente O, A, Asia1. Tutti i campioni sono stati esaminati con il kit di produzione interna per anticorpi DIVA (3ABC-trapping ELISA), e titolati per la presenza di anticorpi verso i sierotipi O, A, Asia 1, per un totale di circa **11.500 test/titolazioni**;

Queste attività (cooperazione internazionale e collaborazioni scientifiche) oltre alla rilevanza internazionale, hanno definitivamente utili ricadute interne, quali l'accesso a campioni positivi di campo, preziosi ai fini della validazione dei MP, da perseguire anche attraverso l'applicazione e la verifica dei test in situazioni di campo.