ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)
BRESCIA
Sede Legale: Via Bianchi, 9 – 25124 Brescia
Tel 03022901 – Fax 0302425251 – Email info@izsler.it
C.F. - P.IVA 00284840170
N. REA CCIAA di Brescia 88834
Centro di Referenza Nazionale per la Malattia di Aujeszky

Via Bianchi, 9
25124 BRESCIA
(Italy)
Tel. + 39 030-2290289
Fax: +39 030-2290535
E-mail:
virologia@izsler.it

CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE PER LA MALATTIA DI AUJESZKY

Dirigente Responsabile Dr.ssa Ana Moreno

RELAZIONE SULL'ATTIVITA' DELL'ANNO 2018

PIANO DI ATTIVITA' PER L'ANN0 2019

Novembre 2018

1. Obiettivi strategici

Il Centro di Referenza Nazionale (CRMA) è stato impegnato nell'anno 2018 come negli anni precedenti nella verifica dell'applicazione e dell'andamento del vigente Piano di controllo nazionale per la Malattia di Aujeszky (MA). L'esecuzione dei test sierologici e virologici per il virus della malattia di Aujeszky (ADV) è stata demandata agli altri IIZZSS per il territorio di propria competenza e quindi l'attività diagnostica del CRMA è stata centrata fondamentalmente nell'analisi di campioni provenienti dal territorio della Lombardia e dell'Emilia Romagna e di campioni sia sierologici sia virologici inviati dalle altre regioni per una successiva conferma o tipizzazione.

I dati concernenti il controllo a livello di singole Regioni sono riportati secondo quanto dedotto dalla Banca dati del Centro di Referenza nella Tabella 1.

Il CRMA è stato inoltre impegnato nelle attività di supporto e di consulenza per il Ministero della Salute, le Regioni e le singole ATS. In particolare, sono stati forniti pareri al Ministero della Salute su diversi argomenti quali approvazioni di piani regionali, presentazione della documentazione alla Comunità Europea per la richiesta di inserimento nel allegato II per regioni con in atto un piano di eradicazione per MA approvato dalla CE.

Sono stati forniti anche alle diverse ATS pareri e attività di consulenza sulla verifica dell'applicazione e dell'andamento del vigente Piano di controllo nazionale per la Malattia di Aujeszky.

Altra parte preponderante degli obiettivi strategici del CRMA riguarda l'attività di consulenza alle Regioni in merito alla preparazione dei nuovi piani di controllo ed eradicazione. Nell'anno 2018, diverse regioni si sono attivate per la presentazione della documentazione necessaria per chiedere l'inserimento nell'allegato II della decisione 2008/185/CE che include gli stati membri o relative regione in cui si applicano programmi nazionali riconosciuti di controllo per l'eradicazione della MA.

Il Piemonte e l'Umbria hanno presentato il relativo dossier alla Commissione per la richiesta di inserimento nel allegato II della decisione 2008/185/CE e sono in attesa del parere favorevole da parte della Commissione.

Anche alle singole ASL ed agli altri IIZZSS il CRMA ha dato pareri e consulenze su diversi argomenti quali interpretazione del decreto ministeriale nazionale, chiarimenti sulle procedure di revoca e sospensione della qualifica di aziende indenni e sull'esecuzione e l'interpretazione delle metodiche di analisi sierologiche e di biologia molecolare.

Presso il CRMA sono state mantenute le attività di preparazione di materiali di riferimento per la sierologia sia per uso interno sia per la rete degli IIZZSS e quella di organizzazione di circuiti inter laboratorio (ring test). Il CRMA sta organizzando il ring test sierologico 2018-2019 con lo scopo di continuare il monitoraggio delle prestazioni dei laboratori coinvolti nel piano di sorveglianza sierologica. Il ring test inizierà a dicembre 2018 con la spedizione di un pannello di sieri a 21 laboratori nazionali e finirà a gennaio 2019 con l'invio dei risultati da parte di tutti i laboratori partecipanti.

Il CRMA partecipa regolarmente al ring test internazionale, organizzato dal centro di riferimento OIE per MA, Laboratoire de Ploufragan-Plouzane (Francia).

Per quanto riguarda la ricerca, quest'anno c'è da sottolineare il progredire del Progetto di Ricerca Corrente PRC2005001 su "Studio eco-epidemiologico del virus della Malattia di Aujeszky nei cinghiali in Italia" che è iniziato il 4 ottobre 2016 e che è stato prorogato per un anno. L'obbiettivo di questo progetto è quello di approfondire le conoscenze sulla diffusione e il mantenimento dell'infezione ADV nei cinghiali in Italia. Per questo obbiettivo sono state scelte quattro aree geografiche ed ecologiche diverse, quali Alpi, Appennini Nord, Centro e Sud in modo di rappresentare tutto il territorio italiano. In ogni area ecologica si sta investigando l'effetto di diverse variabili di tipo spaziale, gestionale, ambientale e sanitario sulla dinamica di infezione ADV nei cinghiali.

A questo si è aggiunta la costante attività di ricerca e sperimentazione, le collaborazioni con enti di ricerca nazionali e internazionali e la divulgazione di indagini scientifiche a convegni nazionali e internazionali. Infine si sottolinea l'impegno del Centro di Referenza nel mantenimento e nel miglioramento del nuovo portale Aujeszky che si integra con le banche dati dei portali Cerves e TBCcentro.

2. Attività di sorveglianza per la Malattia di Aujeszky a livello nazionale per l'anno 2017

Nel corso del 2018 è continuata l'attività di sorveglianza per la MA in tutto il territorio nazionale sia negli allevamenti suini di riproduzione e di ingrasso sia nei centri genetici. Nella tabella n.1 sono riportati i dati dell'attività di sorveglianza nazionale divisa per regioni e per tipologia allevamenti. I dati riportati nella tabella si riferiscono ai controlli sierologici per ricerca anticorpi anti-gE eseguiti come previsto nel piano nazionale ADV. L'unica eccezione riguarda i controlli eseguiti nella provincia di Bolzano che si riferiscono alla ricerca di anticorpi anti-gB. Questa differenza è motivata dal fatto

che la provincia di Bolzano è inclusa nel allegato I Decisione 2008/185/CE ed è vietata la vaccinazione ADV.

Tabella n.1. Esiti delle indagini sierologiche per AD per gli allevamenti suini da riproduzione (a) e ingrasso (b) e per i centri genetici (c), riportati sul Database del Centro di Referenza suddivisi per Regione.

a- Dati relativi agli allevamenti da riproduzione*

Regione	Numero di aziende suinicole da riproduzione	Numero di aziende suinicole da riproduzione oggetto di un programma per la malattia di Aujeszky	Numero di aziende suinicole da riproduzione e con controllo sierologico per la malattia di Aujeszky	Numero di aziende suinicole da riproduzione e positive alla malattia di Aujeszky	Numero di aziende suinicole da riproduzione non contaminate dalla malattia di Aujeszky (con vaccinazione)	Numero di aziende suinicole da riproduzione indenni dalla malattia di Aujeszky (senza vaccinazione)
ABRUZZO	384	359	141	1	140	-
BASILICATA	265	264	153	1	152	-
CALABRIA	341	324	252	18	234	-
CAMPANIA	284	281	263	2	261	-
EMILIA ROMAGNA	299	287	252	7	245	-
FRIULI VENEZIA GIULIA	59	57	48	0	48	-
LAZIO	600	586	296	15	281	-
LIGURIA	61	57	31	2	29	-
LOMBARDIA	662	642	603	4	599	-
MARCHE	299	287	210	2	208	-
MOLISE	175	170	48	0	48	-
PIEMONTE	298	294	272	5	267	-
PUGLIA	554	544	408	4	404	-
SARDEGNA	14033	13838	3740	247	3493	-
SICILIA	1234	1159	684	77	607	-
TOSCANA	614	591	413	38	375	-
TRENTINO - ALTO ADIGE (BZ)+	133	124	104+	0	0	-
TRENTINO - ALTO ADIGE (TN)	2	2	1	0	1	-
UMBRIA	392	386	292	11	281	-
VALLE D'AOSTA	2	2	0	0	0	-
VENETO	213	201	167	1	166	-
Totale	20904	20455	8276	435	7841	-

* dati aggiornati al 30 Settembre 2018

\+ Si tratta di esami sierologici per la ricerca di anticorpi anti-gB in quanto nella provincia di Bolzano è vietata la vaccinazione ADV

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA "BRUNO UBERTINI"
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)
BRESCIA
Sede Legale: Via Bianchi, 9 – 25124 Brescia
Tel 03022901 – Fax 0302425251 – Email info@izsler.it
C.F. - P.IVA 00284840170
N. REA CCIAA di Brescia 88834

Via Bianchi, 9
25124 BRESCIA
(Italy)
Tel. + 39 030-2290289
Fax: +39 030-2290535
E-mail:
virologia@izsler.it

Centro di Referenza Nazionale per la Malattia di Aujeszky

b- Dati relativi agli allevamenti da ingrasso*

Regione	Numero di aziende suinicole da ingrasso	Numero di aziende suinicole da ingrasso oggetto di un programma per la malattia di Aujeszky	Numero di aziende suinicole da ingrasso con controllo sierologico per la malattia di Aujeszky	Numero di aziende suinicole da ingrasso positive alla malattia di Aujeszky	Numero di aziende suinicole da ingrasso non contaminate dalla malattia di Aujeszky (con vaccinazione)	Numero di aziende suinicole da ingrasso indenni dalla malattia di Aujeszky (senza vaccinazione)
ABRUZZO	541	462	55	0	55	-
BASILICATA	117	104	31	1	30	-
CALABRIA	210	153	65	4	61	-
CAMPANIA	429	340	273	0	273	-
EMILIA ROMAGNA	1023	804	571	8	563	-
FRIULI VENEZIA GIULIA	562	235	181	0	181	-
LAZIO	466	421	62	1	61	-
LIGURIA	65	55	13	0	13	-
LOMBARDIA	2038	1891	1097	3	1094	-
MARCHE	795	612	122	1	121	-
MOLISE	288	183	40	1	39	-
PIEMONTE	1179	1001	692	4	688	-
PUGLIA	109	100	49	0	49	-
SARDEGNA	75	73	16	1	15	-
SICILIA	388	339	123	11	112	-
TOSCANA	663	375	94	4	90	-
TRENTINO - ALTO ADIGE (BZ)+	197	133	102+	0	0	-
TRENTINO - ALTO ADIGE (TN)	21	20	7	0	7	-
UMBRIA	505	405	94	2	92	-
VALLE D'AOSTA	43	18	3	0	3	-
VENETO	1799	891	548	0	548	-
Totale	11513	8615	4138	41	4097	-

* dati aggiornati al 30 Settembre 2018

+ Si tratta di esami sierologici per la ricerca di anticorpi anti-gB in quanto nella provincia di Bolzano è vietata la vaccinazione ADV

c- Dati relativi ai centri genetici*

Regione	Numero di aziende suinicole	Numero di aziende suinicole oggetto di un programma per la malattia di Aujeszky	Numero di aziende suinicole con controllo sierologico per la malattia di Aujeszky	Numero di aziende suinicole positive alla malattia di Aujeszky	Numero di aziende suinicole non contaminate dalla malattia di Aujeszky (con vaccinazione)	Numero di aziende suinicole indenni dalla malattia di Aujeszky (senza vaccinazione)
ABRUZZO	1	1	0	0	0	-
CAMPANIA	1	1	0	0	0	-
EMILIA ROMAGNA	7	6	6	0	6	-
FRIULI VENEZIA GIULIA	2	2	2	0	2	-
LOMBARDIA	9	9	6	0	6	-
PIEMONTE	8	7	5	0	5	-
TOSCANA	1	1	1	0	1	-
UMBRIA	1	1	1	0	1	-
VENETO	2	1	1	0	1	-
Totale	32	29	22	0	22	-

* dati aggiornati al 30 Settembre 2018

3. Applicazione dei nuovi piani regionali di controllo ed eradicazione della Malattia di Aujeszky delle regioni incluse in allegato II alla Decisione 2008/185/CE

Negli ultimi anni si rileva il notevole miglioramento raggiunto dalla maggior parte delle regioni italiane con l'inclusione in allegato II alla Decisione 2008/185/CE delle Regioni Veneto, Friuli Venezia Giulia, Lombardia ed Emilia Romagna e con la presentazione della documentazione alla Comunità Europea per richiesta d'inserimento nel suddetto allegato per le regioni Piemonte e Umbria.

Le applicazioni dei nuovi piani regionali hanno permesso di ottenere dei netti miglioramenti e una notevole diminuzione delle percentuali di allevamenti positivi per malattia di Aujeszky sia nella categoria riproduzione sia in quella d'ingrasso. Questi miglioramenti sono soprattutto il risultato dello sforzo congiunto e della collaborazione tra tutti gli enti interessati, Ministero della Salute, Regioni, ASL, Veterinari Aziendali, Osservatori Epidemiologici e Centro di Referenza.

L'applicazione delle misure previste nei piani regionali emessi negli ultimi cinque anni ha determinato un drastico calo della prevalenza dell'infezione e un aumento delle aziende controllate come riportato nei grafici 1, 2, 3 e 4. Per le aziende da riproduzioni le percentuali di positività nell'ultimo

periodo sono inferiori al 4% con valori addirittura sotto 1% per Veneto e Lombardia e dello 0% per Friuli Venezia Giulia. Anche per le aziende da ingrasso le percentuali di positività nell'ultimo periodo sono estremamente basse inferiori al 2,5% con valori sotto 1% per Lombardia e Piemonte e di 0% per Veneto e Friuli Venezia Giulia.

Grafico n. 1 – Percentuale di aziende da riproduzione controllate

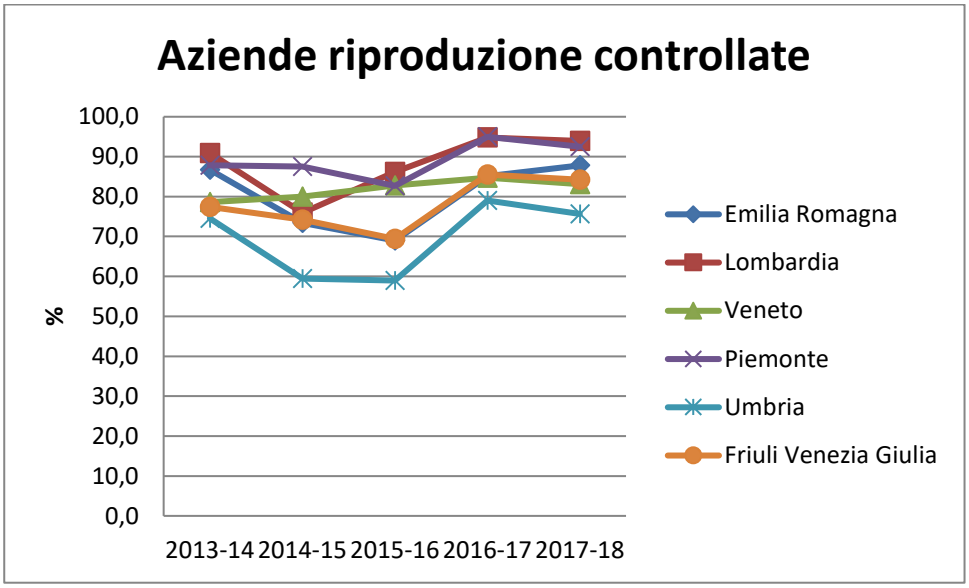


Grafico n.2 - Percentuale di aziende da riproduzione risultate positive alla ricerca anticorpi gE

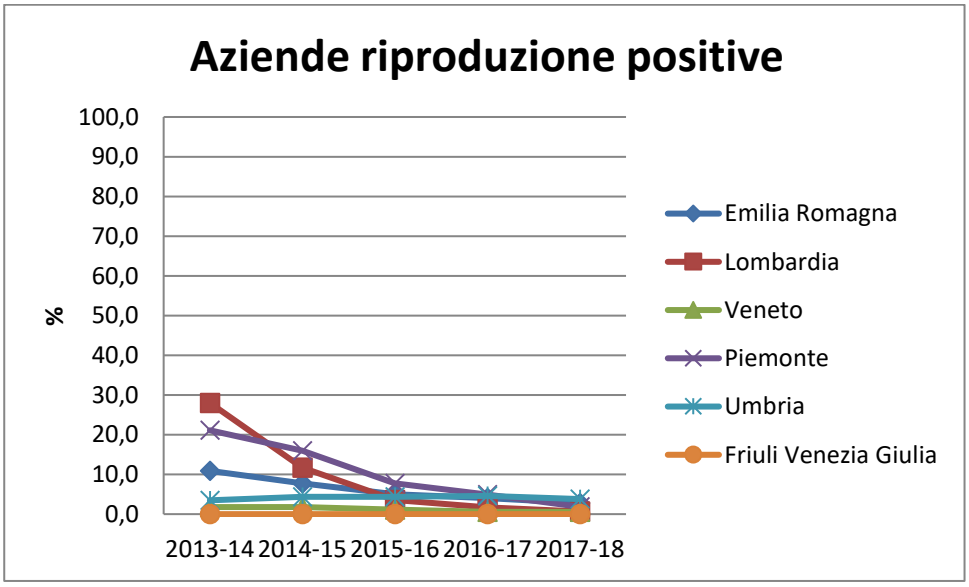


Grafico n. 3 – Percentuale di aziende da ingrasso controllate

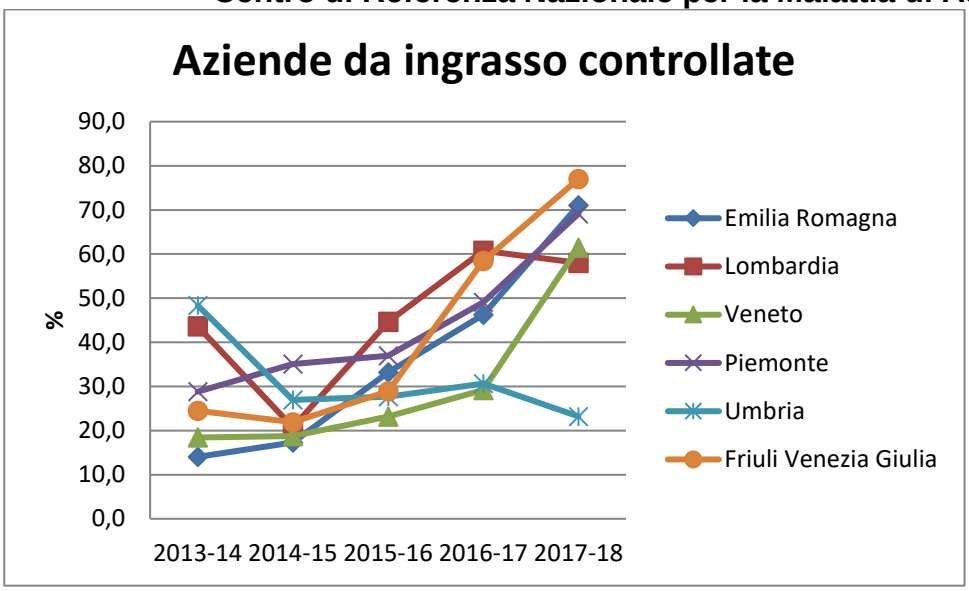
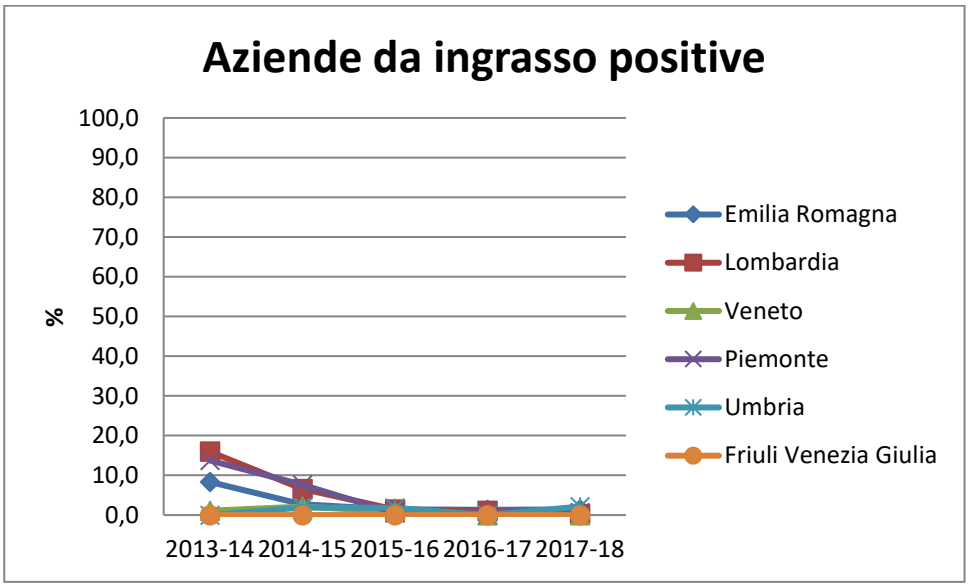


Grafico n. 4 - Percentuale di aziende da ingrasso risultate positive alla ricerca anticorpi gE



I piani regionali attualmente in vigore interessano tutte le categorie produttive e prevedono fondamentalmente le seguenti attività:

- Vaccinazioni
- Accreditamento aziendale
- Mantenimento accreditamento
- Piano sierologico di sorveglianza per monitorare l'andamento del piano
- Sorveglianza passiva
- Gestione delle positività

- Gestione delle movimentazioni
- Monitoraggio della fauna selvatica
- Controllo della biosicurezza in allevamento
- Formazione

Alcuni degli aspetti più innovativi e restrittivi dei nuovi piani rispetto il piano nazionale di monitoraggio riguardano le procedure per la sospensione o revoca della qualifica d'indennità e la presentazione di un piano di gestione obbligatorio per la riacquisizione della qualifica. Alcuni punti essenziali vengono sotto riportati:

1) Sospensione e revoca della qualifica d'indennità da MA

La qualifica di allevamento indenne da MA è sospesa nei seguenti casi:

− singolo animale sieropositivo, in allevamento o al macello;

− più animali sieropositivi, prelevati al macello e provenienti da allevamenti da ingrasso.

La qualifica di allevamento indenne da MA è revocata nei seguenti casi:

− presenza di più di un'animale sieropositivo, riscontrata in allevamento;

− singolo animale sieropositivo, conseguente agli accertamenti successivi al riscontro di singola sieropositività;

− introduzione di animali provenienti da allevamenti senza qualifica o con qualifica scaduta (riportante data di aggiornamento superiore a 12 mesi).

Nel caso in cui la qualifica di allevamento indenne da MA venga revocata a causa di sieropositività, deve essere condotta un'indagine epidemiologica, ed eventualmente anche un controllo sierologico di tutti gli allevamenti suini presenti nel raggio di 2 km.

Vengono inoltre previsti dei provvedimenti conseguenti alla sospensione e alla assenza o revoca della qualifica di allevamento indenne da MA divisi per tipologia di allevamento.

2) Presentazione di un "piano di gestione obbligatorio"

In tutti i casi di revoca della qualifica si prevede l'obbligo di presentare un "Piano di Gestione Obbligatorio" finalizzato all'acquisizione dell'indennità per la MA predisposto in collaborazione con il Veterinario responsabile del piano di vaccinazione e sottoscritto dallo stesso, che deve essere approvato dal Servizio Veterinario della Azienda USL.

Nelle aziende da riproduzione, il piano deve prevedere almeno le seguenti azioni:

- controllo sierologico di tutti i riproduttori;
- identificazione di tutti i riproduttori positivi;
- verifica dell'efficacia del programma vaccinale;
- programma di riforma degli animali sieropositivi, che deve essere completato entro 6 mesi.

Nelle aziende da ingrasso, devono essere previste almeno le seguenti azioni:

- effettuazione del tutto pieno/tutto vuoto nel capannone in cui sono stati rinvenuti gli animali sieropositivi, e
- rispetto del vuoto sanitario di almeno 3 giorni, dal termine delle operazioni di pulizia e disinfezione, svolte sotto il controllo del Servizio Veterinario dell'Azienda USL, prima di introdurre solo animali provenienti da allevamenti indenni;
- dopo 180 giorni, sottoporre a controllo sierologico gli animali reintrodotti nel capannone, secondo la numerosità campionaria di cui all'Allegato 4 (prevalenza attesa del 5% con un IC del 95%); in caso di positività dovrà essere effettuato il tutto pieno/tutto vuoto dell'azienda e nel caso riacquisizione della qualifica, essa viene revocata;
- verifica dell'efficacia del programma vaccinale, mediante l'attuazione di uno specifico programma sierologico.

3) Possibilità di eseguire i controlli al macello

4) Indagini integrative eseguite sugli allevamenti famigliari basate nella ricerca di anticorpi anti-gE nella matrice meat juice.

4. Attività diagnostica e di ricerca effettuata presso il Centro

4.1 - Analisi sierologiche e virologiche

L'attività di diagnostica e di ricerca effettuata presso il CRMA consiste fondamentalmente in esami sierologici, virologici e di biologia molecolare. I primi sono indirizzati verso la ricerca di anticorpi nei confronti della glicoproteina gE per rilevare la presenza dell'infezione e nei confronti della glicoproteina gB per verificare l'efficacia della vaccinazione. Le prove di biologia molecolare includono due PCR real time con due target diversi, gene gB e gE e PCR tradizionali che amplificano geni diversi per sequenziamento e caratterizzazione genomica. Gli esami virologici infine consistono in inoculazione dei campioni PCR positivi su colture cellulari per isolamento virale.

Le indagini sierologiche per la ricerca degli anticorpi anti-gE eseguite nel periodo 1/10/2017-30/09/2018 hanno confermato il trend di miglioramento osservato negli anni precedenti con una notevole diminuzione delle positività per gE. Nel periodo in oggetto è stata rilevata una percentuale complessiva dei campioni positivi estremamente basa (0,1%) che conferma il miglioramento della situazione epidemiologica osservato negli ultimi anni. Si è rilevato inoltre un netto incremento dei campioni analizzati rispetto l'anno precedente (30.000) con il superamento dei 280.000 campioni (grafico n. 5). Quest'aumento è da imputare da una parte all'applicazione dei piani regionali per Lombardia ed Emilia Romagna, in seguito all'inserimento di entrambe regioni nell'allegato II, e al

controllo all'interno dei rispettivi piani delle aziende familiari e di piccole dimensioni con una numerosità campionaria in grado di rilevare una prevalenza attesa dello 0,5% (livello di confidenza 95%). Da altra parte, quest'aumento è da imputare al protocollo interregionale per le movimentazioni di suini verso territori in allegato II alla Decisione 2008/185/CE che prevede per la movimentazione da suini da riproduzione controlli sierologici su tutte le partite movimentate.

Si teniamo in considerazione i campioni eseguiti all'interno dei piani di controllo per MA delle regioni Lombardia ed Emilia Romagna, il numero di campioni analizzati è di 276.368, di questi il 71% è stato analizzato presso il Reparto di Virologia mentre i restanti campioni sono stati eseguiti nelle Sezioni di Mantova (21%) e di Lodi (8%). I dati totali sono riportati in tabella n.2

Il netto miglioramento della situazione epidemiologica ha invece determinato una riduzione dei campioni per la ricerca di anticorpi anti-gB eseguita per verificare l'efficacia della vaccinazione. Gli esami sierologici per rilevare la presenza di anticorpi anti-gB eseguiti nello stesso periodo hanno evidenziato una percentuale complessiva di positività del 83% in linea con i buoni risultati del periodo precedente. Questi dati sono molto positivi in quanto indicano un maggior rispetto delle procedure di vaccinazione. I campioni divisi per regione, per le due regioni di competenza IZSLER, e per il restante territorio nazionale sono riportati nella tabella n. 3 e grafico n. 6.

Tabella n. 2 - Risultati delle indagini sierologiche e virologiche eseguite ei suini nel periodo 1/10/2017 – 30/09/2018 nei laboratori dell'IZSLER

	Esaminati	**Positivi**	**%**
anticorpi gB	9718	8106	**83**
anticorpi gE	280388	262	**0,1**
Indagini virologiche	64	0	**0**

Grafico n. 5 – Numero totale dei campioni analizzati per ricerca anticorpi anti-gE negli ultimi anni

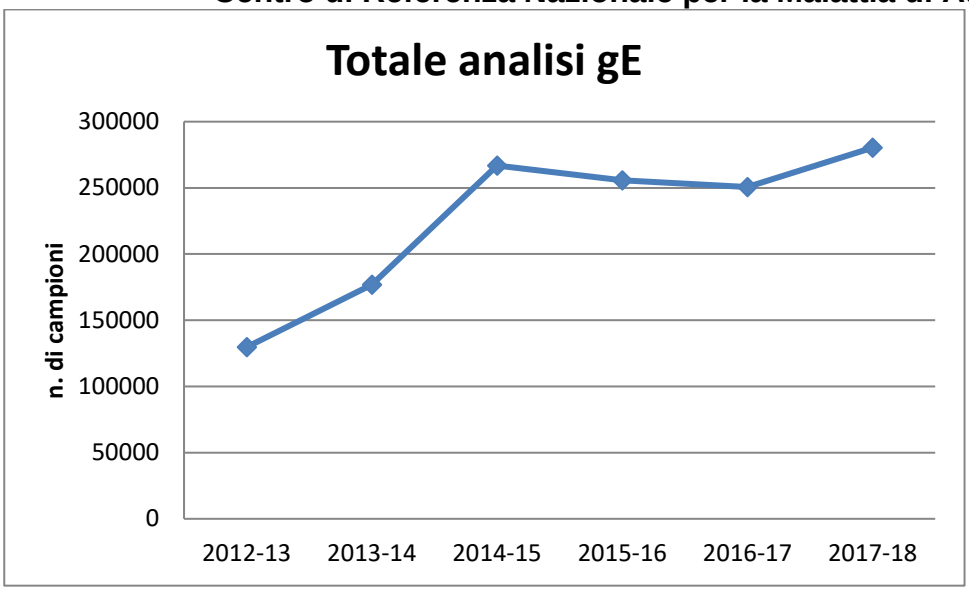
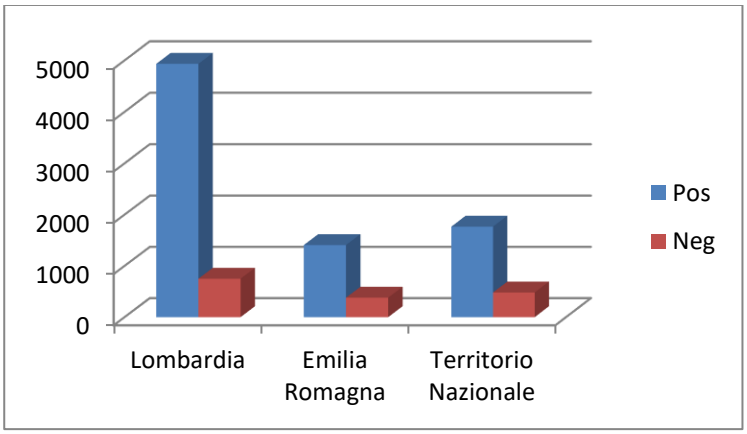


Tabella n.3 – Esami sierologici eseguiti per verifica vaccinazione

Anticorpi anti-gB	Pos	Neg	Totale	% positivi
Lombardia	4933	750	5683	87
Emilia Romagna	1407	381	1788	79
Restante territorio nazionale	1766	481	2247	79
Totale	8106	1612	9718	83

Grafico n. 6 - Esami sierologici eseguiti per verifica vaccinazione



La ricerca del genoma virale è stata anche eseguita su campioni di altre specie sensibili quali cani e lupi e i risultati vengono riassunti in tabella n. 4. Sono risultati positivi otto campioni originati da cani da caccia con sintomatologia nervosa e un campione da una volpe con forma nervosa ma senza prurito e lesioni cutanee.

Tabella n. 4 - Numero di campioni di altre specie sensibili a MA analizzate con real time PCR e numero di positivi.

	Esaminati	**Positivi**
Cane	10	8
Lupo	6	0
Gatto	1	0
Faina	1	0
Tasso	1	0
Volpe	1	1
Totale	20	9

Anche i cinghiali presenti nel territorio di competenza IZSLER sono stati sottoposti a indagini per la MA all'interno del piano di monitoraggio della fauna selvatica. Sono stati controllati i cinghiali delle regioni Lombardia ed Emilia Romagna per la ricerca di anticorpi anti-gE e quando possibile la ricerca del genoma virale tramite PCR real time. Di seguito vengono inoltre riportati i risultati delle indagini sierologiche e di biologia molecolare eseguite nei cinghiali e il totale di campioni analizzati in PCR divisi per provincia (tabella n. 5 e grafico n. 6, 7, 8, 9 e 10).

Tabella n. 5 - Risultati delle indagini sierologiche e virologiche eseguite nei cinghiali nel periodo 1/10/2017 – 30/09/2018 nei laboratori dell'IZSLER

	Esaminati	**Positivi**	**%**
anticorpi gE	7767	1827	**23,52**
PCR	309	2	**0,65%**

Grafico n. 6– Numero di campioni sierologici da cinghiali prelevati nella Regione Lombardia testati per ricerca anticorpi anti-gE divisi per provincia e per esito sierologico. Il periodo presso in considerazione va da 1/10/2017 al 30/09/2018.

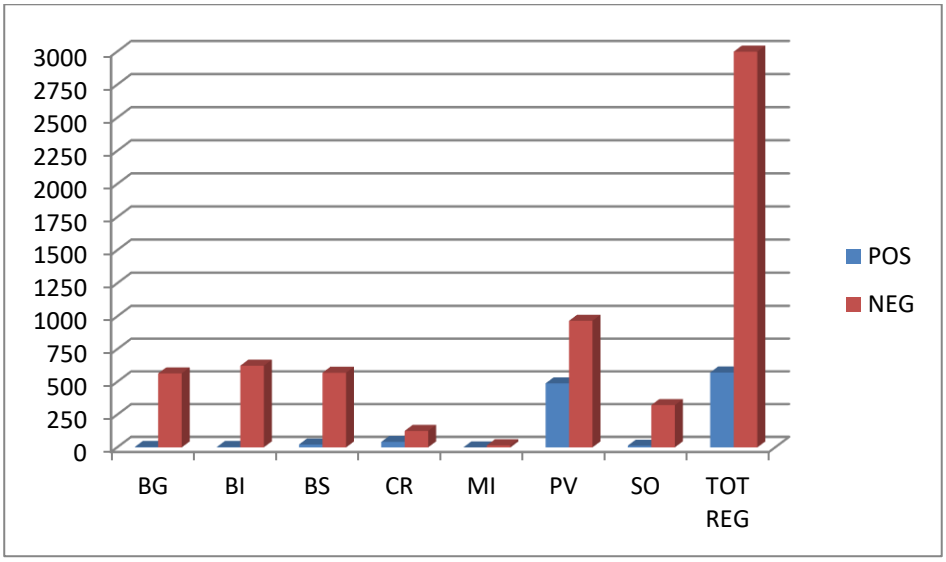


Grafico n. 7– Numero di campioni sierologici da cinghiali prelevati nella Regione Emilia Romagna testati per ricerca anticorpi anti-gE divisi per provincia e per esito sierologico. Il periodo presso in considerazione va da 1/10/2017 al 30/09/2018.

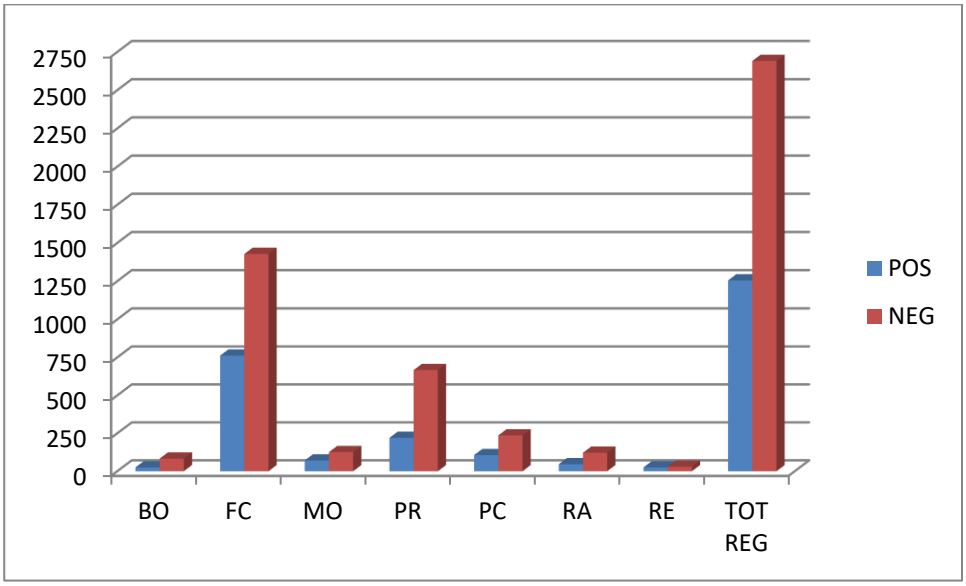


Grafico n.8 - Positività sierologiche in percentuale osservate nei cinghiali divise per provincia e per regione per le due regione di competenza dell'IZSLER.

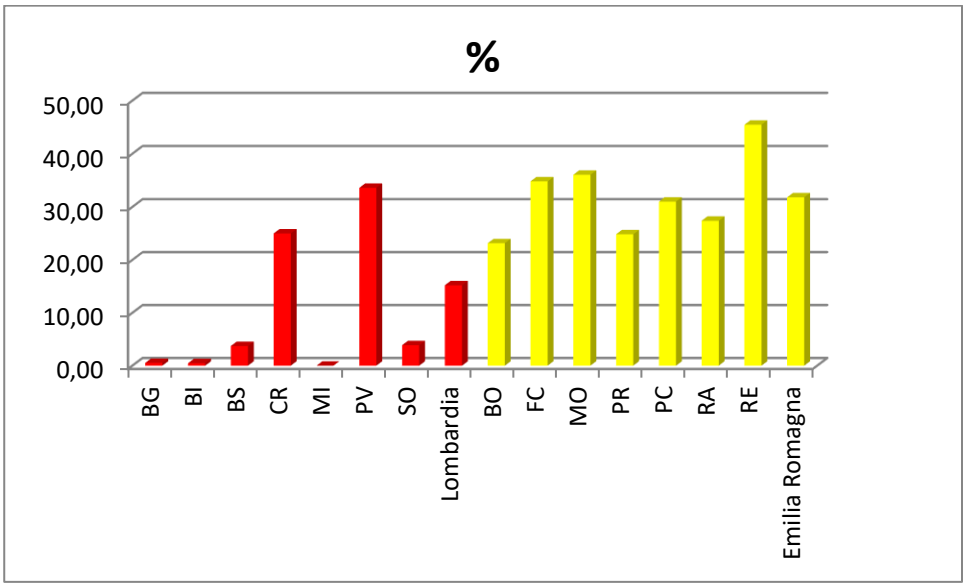
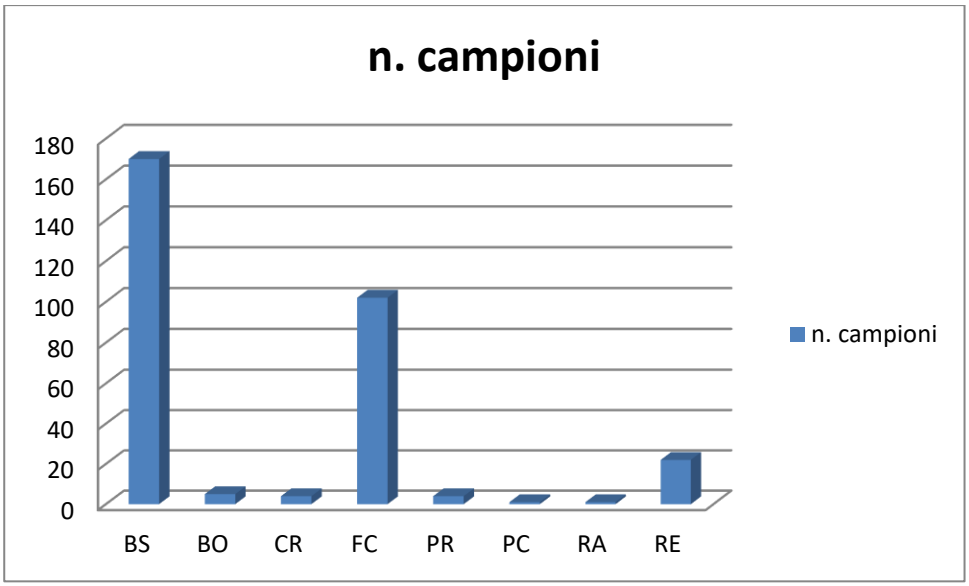


Grafico n. 9 - Numero totale di campioni originati da cinghiali analizzati in PCR real time nel periodo 1/10/2017- 30/09/2018 e divisi per provincia.

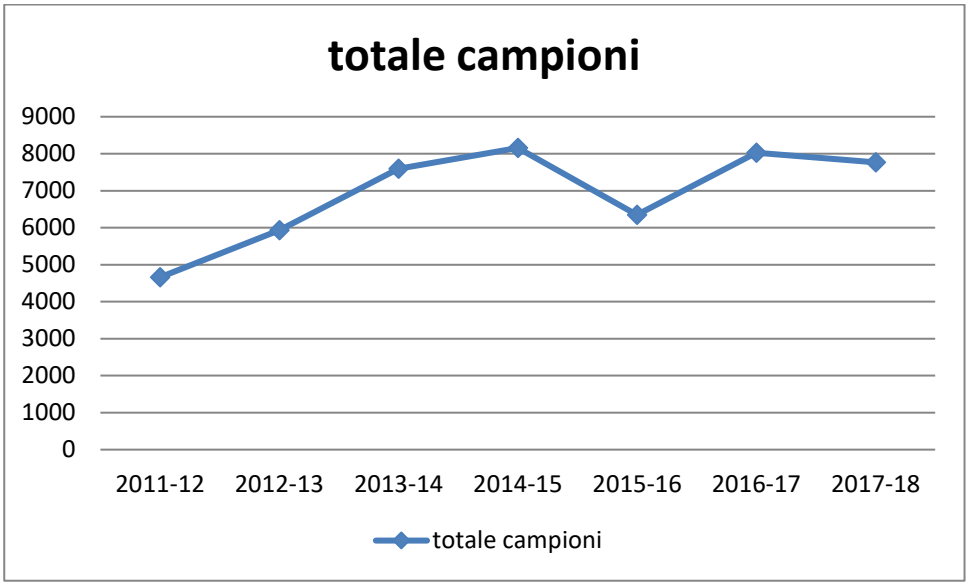


Le analisi sierologiche hanno evidenziato, come negli anni precedenti, una percentuale di positività molto superiore in tutte le provincie della Regione Emilia Romagna (32%) rispetto la Lombardia (15%). La percentuale di positività osservata in Lombardia è dovuta fondamentalmente ai campioni

raccolti nella provincia di Pavia dove storicamente la percentuale di cinghiali positivi è più elevata ed è molto simile a quella riscontrata in Emilia Romagna. Questo dato è da imputare soprattutto all'appartenenza della popolazione di cinghiali della provincia di Pavia all'area ecologia appenninica dove notoriamente il virus circola di più che nell'area alpina. Quest'anno è stata osservata anche una percentuale di positività sierologica elevata (25%) e in linea con quelle rilevate in Emilia Romagna nei cinghiali catturati nella provincia di Cremona, provincia che non era stata controllata negli anni precedenti. Anche in questo caso la percentuale di positività elevata è probabilmente da imputare a cinghiali appartenenti all'area ecologica appenninica caratterizzata da una maggiore circolazione virale.

Inoltre c'è da rilevare la bassa percentuale di positività alla PCR (0,65%) rilevata solo in due cinghiali cacciati nella provincia di Brescia. Questo dato, in linea con quanto rilevato gli anni precedenti, risulta particolarmente interessante se consideriamo che negli ultimi anni le positività alla PCR siano state riscontrate solo in quelle zone dove la positività sierologica è più bassa, in provincia di Brescia (Alpi Nord) e in provincia di Avellino (Appennini Sud). Nelle aree appenniniche del Nord e Italia centrale, dove regolarmente si rileva una percentuale sierologica elevata, i campioni analizzati per la ricerca del genoma Aujeszky sono risultati sempre negativi.

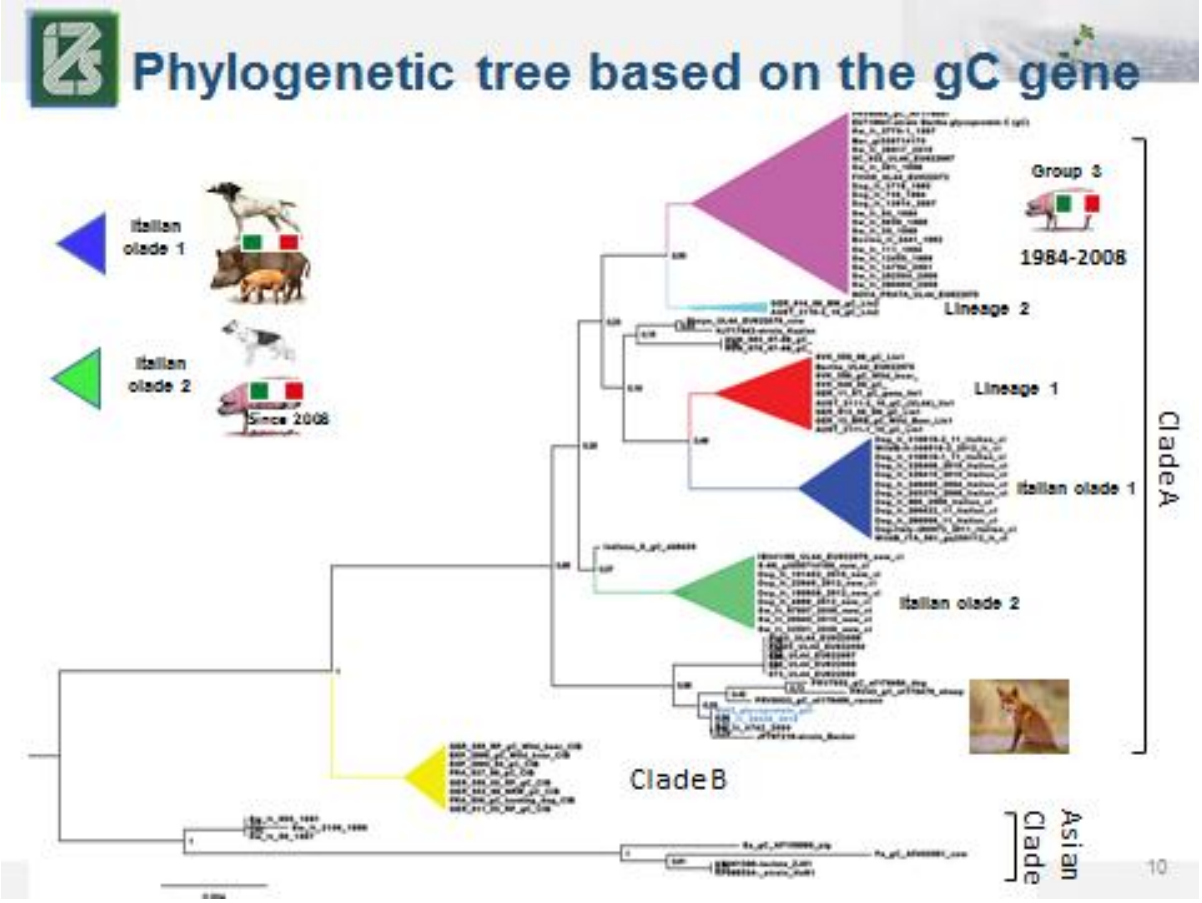
Grafico n. 10 - Numero totale di campioni di siero da cinghiale esaminati per ricerca anticorpi anti-gE negli ultimi anni.



4.2 - Analisi filogenetica

I campioni risultati positivi alla PCR per Aujeszky sono stati inoculati sulla linea cellulare PK15 per l'isolamento virale. Inoltre il sequenziamento parziale di alcuni geni quali gC, gE, UL49.5 e US9 è stato eseguito sul materiale patologico e sugli isolati per la caratterizzazione genomica dei ceppi. L'analisi filogenetica condotta sul gene più informativo il gC ha rilevato in primo luogo una netta separazione tra i ceppi che circolavano nella popolazione suina italiana o nei cani presenti in aziende suine e i ceppi circolanti nei cinghiali o nei cani da caccia. In secondo luogo è stata rilevata negli ultimi dieci anni la circolazione di ceppi tipicamente italiani che formano clades ben differenti rispetto i ceppi circolanti nel territorio europeo. I ceppi italiani recenti quindi si dividono i due gruppi: uno che riguarda le sequenze correlate con i ceppi circolanti nel suino domestico definito Italian Clade 2 e un altro che raggruppa le sequenze correlate con i ceppi circolanti nei cinghiali definito Italian Clade 1 (figura n. 1).

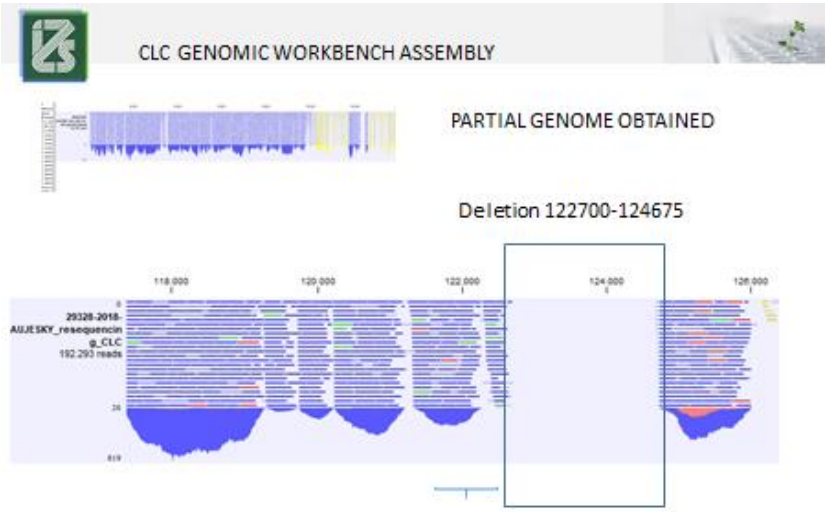
Figura n. 1 – Albero filogenetico basato nel sequenziamento parziale del gene gC



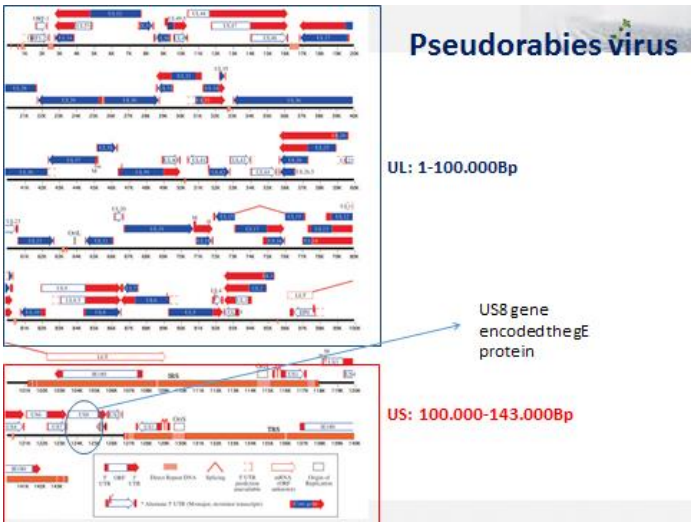
Un altro dato interessante riguarda il ceppo isolato da una volpe catturata un centro urbano in provincia di Perugia che manifestava atassia, incoordinazione motoria e sintomatologia nervosa ma senza prurito e lesioni cutanee. Le prove per la diagnosi virologica hanno rilevato la presenza di un virus della malattia di Aujeszky caratterizzato per la delezione del gene gE. Il sequenziamento del genoma completo ha, infatti, identificato un ceppo gE-deleto che presentava un'elevata percentuale d'identità con il ceppo NIA presente in forma gE-deleta in alcuni vaccini commerciali (figura n. 2). Risulta molto interessante la correlazione tra la forma clinica stranamente caratterizzata da un'assenza di prurito e lezioni cutanee con l'isolamento di un ceppo gE deleto.

Figura n. 2 – Risultati del sequenziamento completo del genoma dal ceppo ADV isolato dalla volpe

a) Genomic workbench assembky



b) Posizionamento della delezione nel genoma completo



5. Sito Web

Sono consultabili e aggiornate le pagine dedicate al Centro di Referenza per la Malattia di Aujeszky-Pseudorabbia (CRMA), pubblicate sul sito dell'IZSLER nella sezione Centri di referenza, all'indirizzo http://www.izsler.it/izs_bs/s2magazine/index1.jsp?idPagina=388

6. Mantenimento e aggiornamento della banca dati del nuovo portale Aujeszky

Il portale racchiude in un unico ambiente i sistemi informativi, ad oggi attivati, dei Centri di Referenza Nazionale per la "Malattia di Aujeszky", per la "tubercolosi da M. bovis (TBCentro)" e per il "Centro per lo studio e le diagnosi dell'afta epizootica e delle malattie vescicolari".

Lo scopo del portale è quello di offrire una consultazione in tempo reale del sistema informativo. Il portale utilizza il sistema di test ed il sistema di produzione trovato su Microsoft Azure. L'applicativo utilizza due ambienti distinti:

- un ambiente per il web server IIS per l'esecuzione del codice .NET;
- un ambiente per il database.

Il sistema di sviluppo si trova in una macchina virtuale con la stessa configurazione dell'ambiente di produzione/test. A ciò si aggiungono gli strumenti necessari per lo sviluppo (Visual Studio 2015 Community Edition) e per il versioning del codice (git).

Il processo di reingegnerizzazione del portale ha previsto il coinvolgimento dei seguenti seguenti Sistemi Informativi:

- Banca Dati Nazionale (BDN): cooperazione applicativa con i Sistemi Informativi di BDN per acquisire i dati relativi all'anagrafica. In questo caso viene utilizzato il protocollo FTP (File Transfer Protocol) che mensilmente aggiorna le informazioni contenute nella base dati del portale Aujeszky;
- SIMAN: cooperazione applicativa con i Sistemi Informativi del SIMAN (Sistema informativo Malattie Animali Nazionale) per il recupero delle informazioni relative ai focolai nazionali;
- SIR: cooperazione applicativa con il sistema di rendicontazione dei piani-cofinanziati per la rendicontazione semestrale ed annuale tramite appositi Web Services;
- IZSLER: cooperazione applicativa con i Sistemi Informativi dell'Istituto Zooprofilattico e Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna per il recupero delle informazioni relative ai controlli virologici del sistema Darwin;

- IZS: cooperazione applicativa con i Sistemi Informativi degli Istituti Zooprofilattici e Sperimentali per il recupero dei dati sierologici relativi alle analisi di laboratorio svolte dai Servizi Veterinari delle ASL nell'ambito del piano di monitoraggio della Malattia di Aujeszky

Dopo la creazione e collaudo del nuovo portale del Centro di Referenza si è reso necessario lo sviluppo di una serie di processi per la manutenzione e costante aggiornamento del portale. Questi processi hanno riguardato:

- la manutenzione continuativa che comprende una manutenzione correttiva e una adeguativa sia per diagnosticare e rimuovere le cause e gli effetti dei malfunzionamenti dei sistemi software rientranti nell'ambito della fornitura sia per assicurare la costante aderenza dei sistemi software, rientranti nell'ambito della fornitura, alle mutate esigenze normative e all'evoluzione dell'ambiente tecnologico (sistema operativo, DBMS, ecc.) nel quale sono ospitati.
- la manutenzione evolutiva volta alla modifica di funzionalità esistenti o alla realizzazione di nuove funzionalità complementari ai sistemi software rientranti nell'ambito della fornitura, necessarie per mantenere l'applicazione costantemente allineata con l'evoluzione delle esigenze degli utenti e dell'IZSLER.
- l'assistenza I e II livello, Help-desk in grado di garantire l'assistenza e supporto all'utente finale, per l'uso corretto ed efficace dei sistemi software rientranti nell'ambito della fornitura.

L'infrastruttura del Nuovo Portale dei Centri di Referenza Nazionale è così composta:

- piattaforma tecnologica: piattaforma di sviluppo Microsoft .Net, utilizzando Microsoft SQL Server come componente database server e Microsoft Azure come piattaforma di cloud computing;
- sistema di Content Management e application container: sistema DotNetNuke, CMS open source basato su piattaforma Microsoft, come componente per le funzionalità di Content Management e come application container;
- sistema di test: ambiente di test da utilizzare durante l'addestramento degli utenti amministratori e da impiegare nelle fasi di manutenzione evolutiva per il collaudo delle nuove funzioni implementate.

Le funzioni presenti nel nuovo portale riguardano: 1) la gestione della documentazione e dei riferimenti legislativi; 2) moduli e reportistiche ad hoc per il monitoraggio delle malattie di interesse; 3) moduli di caricamento dei dati da parte di tutti gli IZS presenti sul territorio nazionale e da parte delle Regioni; 4) moduli di rendicontazione delle informazioni verso i sistemi informativi del Ministero della Salute.

7. Pubblicazioni scientifiche e divulgative

Moreno A , Chiapponi C , Lelli D, Morelli A, Silenti V, Gobbi M, Lavazza A, Paniccià M. Detection of a gE-deleted PRV strain in an Italian red fox. 12th Annual Meeting EPIZONE, 11th International Congress for Veterinary Virology , Vienna, 27-30 August 2018, pp106

Calò Stefania, Vitale Nicoletta, Formenti Nicoletta, Chiari Mario, Faccin Francesca, Tamba Marco, Pannicià Marta, Morelli Alessandra, D'Alessio Nicola, Guberti Vittorio, Zanoni Mariagrazia, Moreno Martin Ana. Epidemiological analysis of Aujeszky disease in wild boar in Italy. 13th EWDA Conference, Larissa, Thessaly, Greece, 27 – 31 august 2018.