

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**IV Workshop nazionale
di virologia veterinaria**

Brescia, 9-10 giugno 2011

RIASSUNTI

A cura di

Marina Monini (a), Susan Babsa (a), Franco M. Ruggeri (a)
Antonio Lavazza (b), Paolo Cordioli (b), Emiliana Brocchi (b)

*(a) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia*

ISSN 0393-5620
ISTISAN Congressi
11/C3

Istituto Superiore di Sanità

IV Workshop nazionale di virologia veterinaria. Brescia, 9-10 giugno 2011. Riassunti.

A cura di Marina Monini, Susan Babsa, Franco M. Ruggeri, Antonio Lavazza, Paolo Cordioli, Emiliana Brocchi

2011, v, 101 p. ISTISAN Congressi 11/C3

Il Workshop, svolto in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, ha l'obiettivo di riunire veterinari, biologi e tecnici di laboratorio delle strutture del SSN (ISS, IZS, servizi veterinari di ASL e Regioni) e dell'Università, che operano nei campi della patogenesi, diagnostica, epidemiologia e profilassi delle infezioni virali degli animali, al fine di facilitare contatti e scambi di informazioni e metodologie tra gli operatori impegnati nel settore. Il Workshop intende fornire un aggiornamento sulle nuove conoscenze di base e lo sviluppo di tecniche innovative per l'identificazione e la caratterizzazione dei diversi agenti virali implicati nelle principali patologie animali, e analizzare le nuove acquisizioni in tema di eziopatogenesi ed epidemiologia di agenti patogeni virali classici, emergenti e riemergenti in campo veterinario.

Parole chiave: Virologia, Sanità pubblica veterinaria, Zoonosi, Sorveglianza, Diagnostica, Patogenesi, Immunologia

Istituto Superiore di Sanità

IV national Workshop on veterinary virology. Brescia, 9-10 June 2011. Abstract book.

Edited by Marina Monini, Susan Babsa, Franco M. Ruggeri, Antonio Lavazza, Paolo Cordioli, Emiliana Brocchi

2011, v, 101 p. ISTISAN Congressi 11/C3 (in Italian and in English)

The Workshop is organized in collaboration with the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna. It is aimed to gather veterinarians, biologists and technicians from the bodies of SSN (ISS, IZS, Veterinary Services of ASLs and Regions) and from the University working in the areas of pathogenesis, diagnosis, epidemiology and prevention of viral infections of animals, to facilitate contacts and exchange of knowledge and methods between workers of the field. The Workshop will provide an update of the new basic knowledge and the development of innovative techniques for identification and characterization of the different viral agents involved in the main pathologies of animals, and will review the new advances on etiology and pathogenesis as well as epidemiology of classical, emerging and re-emerging animal and zoonotic viral pathogens.

Key words: Virology, Veterinary public health, Zoonosis, Surveillance, Diagnosis, Pathogenesis, Immunology

Responsabile scientifico: Franco Maria Ruggeri, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Per informazioni su questo documento scrivere a: virvet@iss.it

Il Rapporto è disponibile online sul sito di questo Istituto: www.iss.it

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Egiziana Colletta e Patrizia Mochi*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© 2011 Istituto Superiore di Sanità



INDICE

Programma	i
Note per la consultazione	ii
Relazioni	1
Comunicazioni orali e Poster	9
Indice degli autori	97

PROGRAMMA

Giovedì 9 giugno 2011

12.30 Registrazione dei partecipanti

13.30 Indirizzo di benvenuto e introduzione

Prima sessione

VECCHI E NUOVI VIRUS DI ATTUALITÀ

Moderatori: Antonio Lavazza, Franco Mutinelli

14.00 *Myxoma Virus: the past and the future*
Grant Mc Fadden

14.30 Comunicazioni orali

16.15 Intervallo e visita ai poster

Seconda sessione

PROPRIETÀ ANTIGENICHE E MOLECOLARI DEI VIRUS: DIAGNOSI, CARATTERIZZAZIONE E RAPPORTI CON L'OSPITE

Moderatori: Emiliana Brocchi, Gian Mario De Mia

17.00 *La nuova rivoluzione dell'approccio molecolare nello studio e nella diagnosi
dei virus: i metodi di sequenziamento di nuova generazione*
Maria Capobianchi

17.30 Comunicazioni orali

Venerdì 10 giugno 2011

Terza sessione

VIRUS ENTERICI ED EPATOTROPI A TRASMISSIONE ZOOTICA O ALIMENTARE

Moderatori: Franco Maria Ruggeri, Fulvio Marsilio

08.30 Comunicazioni orali

10.00 *Hepatitis E virus dynamics in swine and public health risks from the food chain*
Wim van der Poel

10.30 Intervallo e visita ai poster

Quarta sessione

EPIDEMIOLOGIA ED EVOLUZIONE DEI VIRUS INFLUENZALI

Moderatori: Paolo Cordioli, Gian Luca Autorino

11.15 Comunicazioni orali

12.45 Pausa pranzo

Quinta sessione

LENTIVIRUS E PRIONI

Moderatori: Lorenzo Capucci, Umberto Agrimi

13:45 *Friendly viruses: the special relationship between endogenous retroviruses and their host*
Massimo Palmarini

14.15 Comunicazioni orali

15.30 Presentazione lavori selezionati

16.00 Conclusioni e chiusura dei lavori
Alfredo Caprioli, Antonio Lavazza

NOTE PER LA CONSULTAZIONE

Il presente libro raccoglie tutti i contributi presentati al Workshop. I lavori sono divisi in: Relazioni e Comunicazioni orali e Poster. Per comodità di consultazione i riassunti delle Comunicazioni libere e dei Poster sono presentati in ordine alfabetico rispetto al primo autore, dopo quelli delle Relazioni. I Poster sono contrassegnati da una lettera "P" sulla pagina relativa e numerati secondo la presentazione.

Alla fine del volume è incluso un indice di tutti gli autori di ogni singolo contributo.

Relazioni

MYXOMA VIRUS: THE PAST AND THE FUTURE

Grant McFadden

Department of Molecular Genetics and Microbiology, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

Myxoma Virus (MYXV) is a leporipoxvirus that causes lethal infection only in European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), but in evolutionary terms the virus evolved in American lagomorphs of the genus *Sylvilagus* where it causes only very minor cutaneous lesions. The first report of MYXV leaping host species from *Sylvilagus* to *Oryctolagus* rabbits was made in 1896 by Guiseppe Sanarelli but the identity of this apparently new veterinary pathogen as a novel poxvirus was not made until several decades later by Brazilian microbiologists. The molecular mechanism underlying the strict MYXV species tropism for rabbits is poorly understood. Although MYXV is pathogenic only in European rabbits, the virus can replicate in cultured mammalian cells derived from a variety other species, including humans. The checkpoint for determining whether a poxvirus infection will be permissive or nonpermissive is usually made downstream from the binding/fusion/entry events, unlike many other viruses that depend upon specific host cell receptors for entry. It is believed that MYXV can effectively subvert all of the elements of the innate immune system of rabbits but cannot block all of these responses from non-lagomorphs like mice and humans. Like all poxviruses, MYXV expresses a wide array of immunomodulatory proteins, but only some of these are actually rabbit-specific when tested *in vitro*. At least one such species-nonspecific immunomodulatory protein derived from MYXV, a secreted virus-encoded serpin called SERP-1, has now completed human phase II clinical trials as an anti-inflammatory drug to treat acute coronary disease. Our studies on MYXV tropism also revealed that the virus is permissive for a wide spectrum of human cancer cells. We are investigating the use of MYXV as an oncolytic virus to treat human cancers that exhibit defective signaling responses. In 2006, we reported that the ability of human cancer cells to support the productive replication of MYXV is related to the activation state of the Akt signaling pathway of the host cell. The MYXV-encoded M-T5 protein is an ankyrin-repeat protein that regulates tropism of MV for rabbit lymphocytes as well as for a spectrum of human cancer cells, binds and alters at least two distinct host proteins: Akt and the Skp1 component of the cellular SCF (Skp1-Cullin-F-box) complex that controls cell cycle progression. Also, in primary human cells, MYXV is highly sensitive to inhibition by several anti-viral cytokines, particularly type I interferon and tumor necrosis factor, whereas these anti-viral signaling pathways are frequently defective or absent in human cancer cells. We have recently shown that MYXV is very effective at eliminating disseminated human pancreatic cancer cells from xenografted immunodeficient mice. Also, we have begun to explore using MYXV to selectively infect and kill human cancer cells that contaminate bone marrow samples from patients with leukemia or lymphoma but spare the normal hematopoietic stem and progenitor cells within the sample needed to reconstitute the immune system following autologous bone marrow transplantation. In conclusion, the fundamental study of a rabbit-specific poxvirus pathogen has revealed unexpected applications for treating human diseases as diverse as cardiovascular disease and cancer.

LA NUOVA RIVOLUZIONE DELL'APPROCCIO MOLECOLARE NELLO STUDIO E NELLA DIAGNOSI DEI VIRUS: I METODI DI SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE

Maria Capobianchi, Gabriella Rozera

Laboratorio di Virologia, Istituto Nazionale Malattie Infettive L. Spallanzani, Roma

Recentemente l'evoluzione delle tecniche di sequenziamento ha subito un'accelerazione che ha portato allo sviluppo dei cosiddetti "sequenziatori di ultima generazione" *Next Generation Sequencing*, (NGS), caratterizzati dall'elevata capacità di generare dati di sequenza (sequenziamento massivo, *high throughput*).

Esistono in commercio diverse piattaforme: la tecnologia 454 utilizzata dal sistema GS-FLX Roche rappresenta la piattaforma più diffusa, che consente l'analisi di sequenze abbastanza lunghe da permettere diverse applicazioni in campo virologico.

L'approccio di sequenziamento massivo consente l'analisi clonale ultrafine (approccio *ultra-deep*) che, nel contesto dei genomi virali, si traduce nella possibilità di indagare la variabilità genetica dei virus caratterizzati da un'enorme diversità, come l'HIV, l'HCV e l'HBV. Ciò comporta anche la possibilità di evidenziare varianti presenti come componenti minoritarie, e di studiarne l'evoluzione dinamica.

Fin dalle prime applicazioni all'ambito virologico, il sequenziamento NGS ha rivelato scenari insospettati e potenzialità enormi, con un conseguente cambiamento rivoluzionario che ha investito prepotentemente i laboratori che si dedicano allo studio ed alla diagnosi delle infezioni virali.

Le applicazioni delle tecnologie di sequenziamento di ultima generazione si stanno rapidamente evolvendo da un'affascinante prospettiva scientifica verso uno strumento di utilizzo pratico nella gestione clinica delle malattie da infezione. Ecco un esempio: l'approccio *ultra-deep* è stato utilizzato per l'analisi delle resistenze di HIV ed HBV ai farmaci antivirali, evidenziando la presenza di varianti resistenti presenti come componenti minoritarie della quasispecie virale, che influenzano in maniera negativa la risposta alla terapia sia in pazienti naive che *multi-experienced*.

Tuttavia, affinché queste innovazioni tecnologiche siano tradotte in un reale beneficio per le applicazioni cliniche, in primo luogo sarà necessaria una reale semplificazione delle piattaforme strumentali, che per il momento sono sofisticate e ad alto costo, e necessitano di competenze tecniche e professionali molto specializzate.

Comunque, è pensabile che le tecniche di sequenziamento di ultima generazione continueranno ad essere sviluppate e rese sempre più accessibili, e che a breve esse potranno diventare patrimonio comune dell'armamentario diagnostico e nello studio delle infezioni virali.

HEPATITIS E VIRUS DYNAMICS IN SWINE AND PUBLIC HEALTH RISKS FROM THE FOOD CHAIN

Wim H. M. van der Poel

Central Veterinary Institute, Wageningen University and Research Centre, Lelystad, The Netherlands

Hepatitis E Virus (HEV) is endemic in much of the developing world. Infections in humans can result in acute hepatitis and especially in pregnant women the infection may cause serious complications. The most important route of transmission is faecal-orally, and HEV disease outbreaks are often associated with contaminated drinking water or bad hygienic conditions. Of four HEV genotypes, genotype 3 is responsible for indigenous in industrialized countries worldwide. Genotype 4 is observed in sporadic cases in developed as well as developing countries in Asia, while genotype 1 is dominant in the endemic countries in the developing world. In the industrialised countries of Europe, seroprevalence is rather low (1-5%) but in recent years there has been an increasing number of diagnoses of HEV infection due to locally acquired strains. In 1997, confirmed HEV isolates were recovered from pigs in the USA and these isolates showed similar genetic and antigenic properties to isolates recovered from humans from the same region. In 2001, HEV was shown to be present on more than 20% pig farms in different countries in Europe. Since that time evidence has been compiling of HEV genotype 3 and 4 being zoonoses involving several comestible animals.

In pig populations the HEV transmission ratio has been estimated as 8.8 which is significantly larger than 1. This indicates that HEV can spread within populations of susceptible pigs and pigs can be a true animal reservoir for HEV. Faecal shedding seems to be the major transmission mode and humans may be exposed to HEV when porcine faeces are discharged into the environment. Besides direct exposure, environmental discharge may cause indirect human HEV-exposure via contaminated surface water or via food that is contaminated through irrigation water. In addition to pigs, other local HEV sources may include wild boar, deer, surface water, oysters and mussels. In low-endemicity areas special groups such as farmers, veterinarians, butchers and persons handling animal meat or consumers of undercooked swine, wild boar or deer meat present with a considerably higher seroprevalence than the general population.

In the Netherlands in four of sixty-two (6.5%) porcine livers HEV RNA could be detected, which means humans can be exposed to HEV by eating pig liver. In contact-infected pigs, HEV RNA could also be detected in more than 50% of muscle samples and urine samples, thereby identifying meat and urine as additional possible transmission routes for pig-to-pig or pig-to-human transmission.

There may still be an underdiagnosis of HEV infections in Europe; however tens of infections are reported yearly in all countries in North West Europe. In almost all cases this involves HEV genotype 3 strains closely related to HEVs detected in domestic pig, wild boar or deer from the same geographical region. Recently a HEV genotype 4 strain was first isolated from swine in Europe and a closely related HEV sequence was reported from an autochthonous case in Germany. Moreover detections of several "new" HEV strains

have been described over the last few years. These observations indicate HEVs may be emerging in Europe. In future HEV genotype 3 and 4 infections might even evolve from a zoonosis to an established human infection. For this reason in several EU countries there is an increasing effort for monitoring and control of HEVs along the pork production chain. The risk of foodborne HEV infection can be reduced by adequate heating of the food product and by preventing cross-contamination during food preparations in the kitchen.

UNIQUE COEVOLUTIONARY MECHANISMS BETWEEN RETROVIRUSES AND THEIR HOST

Massimo Palmarini

*MRC, Medical Research Council, Centre for Virus Research, University of Glasgow,
Glasgow, Scotland, United Kingdom*

The domestic sheep (*Ovis aries*) provides a unique model system to study retrovirus-host coevolution in an outbred animal species. The pathogenic and oncogenic exogenous Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV) co-exists with highly related and biologically active endogenous Retroviruses (enJSRVs). Co-evolution of JSRV, enJSRVs and their host is governed by a variety of unique mechanisms. Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV) is a pathogenic exogenous retrovirus and the causative agent of ovine pulmonary adenocarcinoma. JSRV is the only virus causing a naturally occurring lung cancer and possessing a major structural protein that functions as a dominant oncoprotein. The presence of a powerful oncoprotein expressed at high levels in conjunction with productive viral infection is unique among oncogenic viruses and raise interesting questions on how virus and host have reached equilibrium. Our recent studies, using a variety of *in vivo* and *in vitro* approaches, have shown that JSRV and its host have reached an evolutionary equilibrium in which productive infection (and transformation) can occur only in cells that are scarce for most of the lifespan of the sheep. The sheep genome contains several copies of endogenous Retroviruses (enJSRVs) highly related to JSRV. enJSRVs have played several roles in the evolution of the domestic sheep as they are able to block JSRV replication and play a critical role in sheep conceptus development and placental morphogenesis. Available data strongly suggest that dominant negative enJSRV proviruses (*i.e.* able to block JSRV replication) have been positively selected during evolution. Interestingly, viruses escaping the transdominant enJSRV *loci* have recently emerged (less than 200 years ago) and endogenization of these retroviruses may still be occurring today. In conclusion, the three-way interaction between enJSRVs, their exogenous counterparts and the domestic sheep provides a unique outlook to the complex interplay between retroviruses and their host during evolution.

Comunicazioni orali e Poster

ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) UNA PATOLOGIA EMERGENTE NEL TERRITORIO SICILIANO: PROGRAMMA VOLONTARIO DI ERADICAZIONE

Stefano Agnello (a), Alessandra Stancanelli (a), Francesco Campo (a), Francesco Feliziani (c), Santo Caracappa (b), Giuseppa Purpari (b), Annalisa Guercio (a)

(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Caltanissetta*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo*

(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia*

L'Artrite-Encefalite Virale Caprina è una malattia infettiva segnalata per la prima volta nel 1974; l'agente causale è stato isolato solamente nel 1979: si tratta di un virus della famiglia *Retroviridae*, genere *Lentivirus*. Il virus si diffonde principalmente attraverso colostro, latte (durante la mungitura) e, in minor misura, attraverso sangue, saliva, espettorato, secrezioni vaginali. La malattia può evolvere in forma subdola e tende ad essere sottostimata negli allevamenti infetti. Le forme cliniche negli animali adulti si presentano sotto forma di artrite e/o mastite, mentre negli animali giovani, nei quali l'evidenza è ancora più rara, si osserva sintomatologia clinica riferibile ad encefalite. La CAEV, la cui presenza è stata segnalata in tutti i continenti, è stata più volte diagnosticata anche in allevamenti caprini Siciliani ed attualmente rappresenta uno dei maggiori problemi dell'allevamento caprino, soprattutto nelle razze lattifere cosmopolite (Saanen, Camosciata delle Alpi) di nuova introduzione in Sicilia per i gravi danni economici che determina (riduzione della produzione latte, fino al 25-30%; riduzione delle difese immunitarie con maggiore predisposizione a contrarre malattie; maggiori costi di gestione aziendale; minore longevità e carriera produttiva degli animali colpiti dalla malattia; disturbi nello sviluppo dei soggetti giovani). Da recenti studi di prevalenza, basati su un campione di allevamenti caprini delle province di Agrigento e Palermo, la percentuale di distribuzione della malattia si stima rispettivamente intorno al 60,6% e al 63,3%. Questo lavoro rappresenta la proposta operativa elaborata dall'IZS della Sicilia, in collaborazione con il centro di Referenza e le ASP competenti, allo scopo di attivare un programma di controllo ed eradicazione volontario nei confronti dell'Artrite Encefalite Caprina (CAEV) presso alcune aziende caprine sensibili al problema. Le tre aziende che hanno chiesto l'attivazione di questo piano dovrebbero, attraverso l'adozione delle misure di profilassi disposte, prima ridurre la percentuale di positività in azienda e poi puntare alla completa eradicazione. Tale obiettivo potrà essere raggiunto mediante strategie e modalità operative diverse che dovranno tenere conto delle strutture, della tipologia di allevamento e della percentuale di diffusione della malattia all'interno dell'azienda. La finalità ultima è quella di portare ad un miglioramento complessivo dell'allevamento e, soprattutto, alla tutela e conservazione del patrimonio caprino Siciliano.

P.2 **SORVEGLIANZA VIROLOGICA DEL VIRUS DELL'EPATITE E (HEV) IN UN ALLEVAMENTO DI SUINI ALL'INGRASSO**

Giorgia Angeloni (a), Ilaria Di Bartolo (a), Fabio Ostanello (b), Franco Maria Ruggeri (a)
(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*
(b) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi, Ozzano dell'Emilia, Bologna*

L'Epatite E (HEV) è una zoonosi che può essere responsabile di casi di malattia clinica nell'uomo, segnalati con sempre maggiore frequenza anche in Europa e caratterizzati da sintomi di gravità variabile (da simil-influenzali fino a casi di epatite acuta fulminante). Mentre nei Paesi in via di sviluppo questo virus presenta principalmente un ciclo oro-fecale, nei Paesi industrializzati i casi di epatite E nell'uomo sono generalmente di origine alimentare associati, nella maggior parte dei casi, al consumo di fegato di suino e di cinghiale crudo o poco cotto. Il suino sembra essere il principale serbatoio asintomatico del virus. Infine, benché ad oggi non siano stati ben documentati casi di infezione umana associati al consumo di carne di suino, è stata dimostrata la possibilità che HEV possa essere presente a livello muscolare durante la viremia nel suino. Ciò rappresenterebbe un importante fattore di rischio per la trasmissione zoonosica di HEV. Per tali ragioni, è importante monitorare la presenza di HEV all'interno degli allevamenti suinicoli e valutarne la prevalenza nelle varie fasce d'età. Nel presente lavoro è stata condotta un'indagine di prevalenza virologica nel settore di ingrasso di un allevamento multisito della provincia di Modena. Complessivamente, sono stati prelevati campioni fecali dall'ampolla rettale da 100 suini di diverse età (dai 100 ai 300 giorni). Da questo materiale è stata effettuata la ricerca del genoma di sw-HEV mediante trascrizione inversa e PCR utilizzando *primers* che amplificano una porzione di 348bp della regione genomica ORF2 (proteina capsidica). Il 27% dei campioni è risultato positivo per sw-HEV. In accordo con quanto presente in bibliografia, i soggetti con una maggiore prevalenza virologica sono risultati essere quelli di circa 140 giorni di età (10%). Alcuni campioni sono stati purificati, sequenziati e i frammenti ottenuti sono stati allineati con quelli presenti nella banca dati NCBI. Tutti i ceppi appartenevano al genotipo 3 e hanno dimostrato di avere, tra loro, un'omologia nucleotidica variabile dall'80% al 99,8%.

PROVE DI INATTIVAZIONE DI VIRUS ENTERICI IN MOLLUSCHI BIVALVI

Giuseppe Arcangeli (a), Calogero Terregino (a), Cristian Magnabosco (a), Elisabetta Cappelozza (a), Andrea Brutti (b)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

(b) Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari, Parma

In questi ultimi anni gli “allerta” per infezioni da virus enterici a seguito di consumo di MB crudi sono aumentati in tutta Europa, soprattutto sostenuti da Norovirus (NV) (fam. *Caliciviridae*) e dal virus dell'epatite A (HAV) anche per l'aumentata sensibilità dei test diagnostici. La tecnologia delle alte pressioni (HHP- High Hydrostatic Pressure) applicata ai MB può essere una garanzia per il consumatore in quanto in grado di inattivare eventuali virus enterici presenti garantendo al tempo stesso la conservazione delle proprietà nutrizionali dei MB che con la cottura andrebbero perse. Anche la pastorizzazione applicata con temperature intorno ai 90°C, alterando le proteine del capsido virale, risultano efficaci. In questo studio sono state applicate entrambe queste tecnologie di trasformazione:

- 1) È stata verificata l'efficacia delle HHP nei confronti di un ceppo di Norovirus murino (MNV-1), un surrogato del NV in grado di replicare su coltura cellulare. *Pool* di vongole veraci (*R. philippinarum*) infettate sperimentalmente con MNV-1 sono stati sottoposti a HHP a differenti intervalli di tempo e temperatura. La ricerca è stata condotta sulla ghiandola digestiva del MB. Il ceppo di MNV-1 è stato gentilmente fornito dal Prof. H. W. Virgin, della *Washington University School of Medicine*, MO, USA. Le linee cellulari: RAW 264.7. Il numero di unità formanti placca (PFU)/ml, è stato determinato con il metodo proposto da Wobus nel 2004. Contaminazione delle vongole: 200 soggetti sono state messe in una vasca con 100 lt di acqua con salinità del 3,5‰ a 15°C e con il 90% di ossigeno disciolto. Dopo 24 ore di acclimatazione l'acqua della vasca è stata contaminata con MNV-1 in modo da ottenere un titolo finale in acqua pari a 4 log TCID₅₀ ml⁻¹. Le vongole, sono state lasciate 24 ore in acqua contaminata. La prova è stata ripetuta per tre volte a distanza di un mese ciascuna. Con 500 MPa per 10 minuti è stata ottenuta la completa inattivazione virale.
- 2) Trattamenti di pastorizzazione sono stati applicati a vongole veraci inoculate con HAV. *R. philippinarum* infettate sperimentalmente con 50 µl di sospensione virale a titolo noto (107.20 TCID₅₀/ml) sono state sottoposte a pastorizzazione a vapore per tempi (5-30 minuti) e temperature (60°, 70°, 80° e 90°C) diverse in forno industriale e successivamente analizzate mediante isolamento in colture cellulari (FrP3) e semi-nested-PCR eseguita sul criolisato del quarto passaggio cellulare. I molluschi trattati per almeno 10 minuti a 90°C sono risultati negativi all'isolamento virale.

VALIDAZIONE DI UN ELISA COMPETITIVA PER LA RICERCA DI ANTICORPI CONTRO LA P26 DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA EQUINA NEL SIERO DI EQUIDI

Gian Luca Autorino (a), Roberto Nardini (a), Ilaria Ciabatti (a), Raniero Lorenzetti (a), Paolo Cordioli (b), Daniela Caciolo (a), Elena Letizia (a), Maria Teresa Scicluna (a)
(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma*
(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia*

Lo scopo di questo lavoro è la presentazione dei dati relativi alla validazione del test ELISA di tipo competitivo in fase semi-liquida (CTB-ELISA), per la ricerca di anticorpi per il virus dell'Anemia Infettiva Equina (AIE), messo a punto nell'ambito di un precedente progetto di ricerca corrente (art.12 DL.vo 502/1992). Ad una valutazione preliminare, il test ELISA sviluppato dimostrava caratteristiche di elevata sensibilità e specificità.

Con il fine di valutare le caratteristiche analitiche e diagnostiche, si è proceduto alla validazione del metodo secondo i criteri indicati dal WOA. Sono stati utilizzati sieri di riferimento internazionale, prodotti dal Centro di Riferenza Internazionale per l'AIE, sieri di campo collezionati dal Centro di Riferenza Nazionale per l'AIE, sieri della collezione dell'*European Union-Community Reference Laboratory* e sieri di equini sperimentalmente infettati e prelevati a diversi giorni dopo l'infezione, forniti dal *Gluck Equine Research Center* del *Kentucky University*. Test statistici appositi sono stati impiegati per la valutazione di alcuni parametri della validazione.

Il CTB-ELISA è risultato robusto, ripetibile e riproducibile. Confrontato con il test di Immunodiffusione in Gel di Agar (AGID), è risultato avere una sensibilità diagnostica relativa del 100%, una specificità diagnostica relativa dell'80,3%, un valore predittivo positivo del 94,8% ed un valore predittivo negativo del 100%.

Anche se l'ELISA pare avere una specificità più bassa del metodo di riferimento, il confronto tra i due metodi sui sieri di animali sperimentalmente infetti ha mostrato che il test ELISA svela, in effetti, più precocemente la positività rispetto all'AGID. Inoltre, una certa percentuale di campioni esaminati (negativi in AGID e positivi in ELISA), è stata confermata come positiva in *Immunoblotting*. Queste evidenze sono da considerare a favore del test ELISA nella valutazione del suo apparente modesto valore di specificità. Un altro vantaggio è rappresentato dall'oggettività di lettura dei risultati che risolve i noti problemi legati all'interpretazione degli stessi in caso di impiego del test AGID.

I nostri dati dimostrano una maggiore sensibilità del test ELISA rispetto all'AGID in quanto è in grado di individuare soggetti, infetti ma ancora non reattivi in AGID, che necessiterebbero di approfondimenti diagnostici con metodi alternativi di conferma riportati dal WOA o di un monitoraggio sierologico. L'impiego di questo strumento diagnostico risulta particolarmente indicato come test di *screening* nel Piano di Sorveglianza e Controllo dell'AIE al fine di reclutare il maggior numero di soggetti positivi.

P.3 ISOLAMENTO DI UN CEPPO BHV-1 A BASSA DIFFUSIONE IN UN GRUPPO DI BOVINE DA LATTE

Luca Bano (a), Barbara Marcon (a), Elena Tonon (a), Lucia Selli (b), Monica Mion (b), Roberto Biz (c), Daniele De Lucchi (d), Stefano De Rui (d), Roberta Fontana (e), Stefano Nardelli (b)

(a) *Sezione di Diagnostica Clinica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Treviso*

(b) *Diagnostica Virologica e Sierologica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

(c) *Medico Veterinario Libero Professionista, Montebelluna, Treviso*

(d) *Servizio Veterinario, ULSS Veneto 08, Montebelluna, Treviso*

(e) *Laboratorio di Virologia Speciale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia*

A settembre 2010, in una stalla ufficialmente indenne per IBR composta da 77 bovine da latte allevate a stabulazione libera, si è osservata la comparsa di 3 capi sierologicamente positivi per herpesvirus bovino (BHV-1), sia in ELISA (anticorpi totali, gB, gE) che in sieroneutralizzazione. Gli animali sono nati in stalla nel 2009 e non si sono mai allontanati dall'azienda (ad es. per alpeggio o mostre), nella quale non sono stati impiegati vaccini per IBR. Il test di sieroneutralizzazione con herpesvirus caprino (CapHV-1) ha evidenziato in 2 soggetti titoli anticorpali rispettivamente doppi e quadrupli rispetto ai titoli espressi nei confronti di BHV-1. Questi ultimi rilievi sierologici, unitamente alla mancanza di ulteriori sieroconversioni nella mandria testata a distanza di 20 giorni e all'assenza di sintomatologia clinica, hanno fatto sospettare la circolazione di un herpesvirus dei ruminanti diverso da BHV-1. Per indagare tale ipotesi, due dei tre capi sierologicamente positivi sono stati allontanati dalla mandria d'origine e stabulati in altro ricovero per tentare la riattivazione virale attraverso trattamento parenterale con glucocorticoidi ad elevati dosaggi per 5 giorni. Durante i 10 giorni successivi alla sospensione del trattamento farmacologico sono stati eseguiti tamponi nasali e vaginali, dai quali è stata condotta la ricerca del virus IBR mediante PCR ed isolamento su coltura cellulare. I tamponi nasali prelevati da entrambi i capi il 3° giorno dalla fine del trattamento farmacologico, sono risultati positivi per BHV-1 sia alla PCR che all'esame virologico colturale, mentre i tamponi vaginali hanno dato esito negativo. Nella mandria d'origine, saggiata nuovamente dopo 72 gg dalla comparsa delle prime sieropositività, non è emersa alcuna nuova sieroconversione, nonostante la costante presenza di un capo sierologicamente positivo. I ceppi virali isolati sono stati identificati come BHV-1.1 (gE positivi) mediante l'impiego di anticorpi monoclonali specifici, e sono attualmente sottoposti ad ulteriori caratterizzazioni genotipiche presso il laboratorio di referenza tedesco (FLI). Il caso clinico sopra esposto mette in evidenza come un ceppo BHV-1, giunto in un allevamento di bovine sieronegative, abbia infettato un numero estremamente limitato di soggetti (3/77). Non sappiamo ancora se il ceppo virale isolato

possessa caratteristiche di minor virulenza rispetto al virus classico, ma questa possibilità viene sospettata alla luce della scarsa diffusione accertata nella mandria e dall'assenza di sintomatologia clinica.

DESCRIZIONE DI UN CASO DI COINFEZIONE DA PARVOVIRUS FELINO E CANINO IN UN GATTO

Mara Battilani, Andrea Balboni, Massimo Giunti

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi, Ozzano dell'Emilia, Bologna

Il ruolo delle infezioni multiple in termini di virulenza, persistenza e diffusione delle malattie infettive emergenti è attualmente oggetto di numerosi studi. Infezioni multiple da specie differenti di parvovirus sono già state descritte, evidenziando un elevato grado di eterogeneità genetica del virus. I gatti essendo recettivi sia al virus della Panleucopenia Felina (FPV) che alle nuove varianti del parvovirus canino, CPV-2a, 2b, 2c, potenzialmente possono essere co-infettati con entrambe le specie virali.

Nel presente studio viene riportato, per la prima volta, a conoscenza degli autori, un caso di infezione spontanea da CPV-2a e FPV in un gatto. Il soggetto, di razza europea, 3 mesi d'età, maschio, è stato condotto all'Ospedale Didattico Veterinario dell'Università degli Studi Bologna per insorgenza acuta di diarrea acquosa profusa, letargia ed anoressia; il quadro clinico è progressivamente peggiorato nei primi due giorni di ospedalizzazione portando a morte il gatto nonostante le cure intensive. La diagnosi clinica di infezione da parvovirus è stata confermata da un test immunocromatografico (SNAP *Canine Parvovirus Antigen Test*, IDEEX Laboratories, Inc., Maine, USA), eseguito su un campione di feci raccolto durante la fase acuta della malattia. Successivamente, il DNA virale è stato estratto dal medesimo campione e, mediante *primer* specifici sia per il parvovirus felino che canino, si è proceduto all'amplificazione dei geni VP2 e NS. I prodotti ottenuti sono stati sottoposti a clonaggio e successiva analisi delle sequenze ottenute, evidenziando un elevato tasso di mutazioni, paragonabile ad un virus a RNA. Inoltre, è stata rilevata la presenza di una variante con caratteristiche intermedie al CPV ed al FPV. Essendo stata esclusa, mediante analisi delle sequenze con appositi algoritmi, che siano avvenuti fenomeni di ricombinazione, si ipotizza che tali mutazioni siano il risultato di un nuovo processo di riadattamento del CPV all'ospite felino.

Le infezioni multiple, favorendo la complessità genetica e l'emergenza di nuove varianti virali, potrebbero quindi aumentare le possibilità del virus di stabilire infezioni persistenti nel gatto, sottolineando l'importanza epidemiologica di questo ospite come serbatoio per i parvovirus dei carnivori.

LA CARATTERIZZAZIONE DI UN NUOVO GENOTIPO DI LENTIVIRUS DEI PICCOLI RUMINANTI, SOTTOTIPO B3, SUGGERISCE LA DIFFUSIONE DI SRLV NEL BACINO DEL MEDITERRANEO IN EPOCHE REMOTE

Luigi Bertolotti (a,b), Maurizio Mazzei (c), Giontonella Puggioni (d), Maria Luisa Carrozza (e), Silvia Dei Giudici (d), Dilek Muz (f), Magdalena Juganaru (a), Cristiana Patta (d), Francesco Tolari (c), Sergio Rosati (a)

(a) Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia, Ecologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Torino

(b) Molecular Biotechnology Center, Università degli Studi, Torino

(c) Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Pisa

(d) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

(e) Scuola Normale Superiore, Pisa

(f) Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey

I Lentivirus dei Piccoli Ruminanti rappresentano un eterogeneo gruppo di virus capaci di infettare capre e pecore. Al contrario del genotipo A, il quale presenta un'elevata eterogeneità genetica, con 10 sottotipi finora riconosciuti, il genotipo B, è stato fino ad oggi suddiviso in due soli sottotipi. In questo studio sono descritti due nuovi genomi provirali completi isolati da pecora di razza sarda e provenienti da due diverse regioni Italiane. Le sequenze del genoma e dei principali epitopi immunodominanti rivelano come questo nuovo sottotipo appartenga al genotipo B. Tuttavia, probabilmente a causa della segregazione del virus nell'allevamento ovino, la divergenza genetica rispetto ai sottotipi B1 e B2 è chiaramente maggiore del 15%, suggerendo la designazione del nuovo sottotipo B3. Inoltre lo stesso sottotipo è stato identificato e caratterizzato in Turchia: questo risultato, supportato dalla mancanza di recenti legami epidemiologici e commerciali tra la Sardegna e il Medio Oriente, pone in evidenza il rapporto storico tra le due aree geografiche, suggerendo che, durante l'esplorazione e la colonizzazione del Mediterraneo, la disseminazione di specie antropocore come la capra sia stata accompagnata dalla disseminazione di ceppi virali ad essa associata. Successivamente, con la domesticazione della pecora in Sardegna, alcuni ceppi virali si sono ben adattati a questo nuovo ospite perdendo allo stesso tempo affinità verso l'ospite originario. Questo studio apre a nuove indagini volte alla caratterizzazione di SRLV in aree geografiche dove l'infezione da lentivirus in capre e pecore è poco conosciuta.

P.4 CARATTERIZZAZIONE DEI VIRUS DELLA MALATTIA DI NEWCASTLE ISOLATI DA COLUMBIFORMI SELVATICI IN ITALIA NEL 2008-2011

Francesco Bonfante (a), Alireza Heidari (a), Annalisa Salviato (a), Isabella Monne (a), Maria Serena Beato (a), Elisabetta Raffini (b), Roberta Taddei (b), Gina Biasini (c), Calogero Terregino (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Lugo di Romagna, Ravenna

(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Il virus della malattia di Newcastle, detto anche paramyxovirus aviario di tipo 1 (APMV-1), è l'agente eziologico di una delle più gravi malattie infettive delle specie avicole. Nella prima metà degli anni Ottanta una variante dell'APMV-1, denominata variante piccione (PPMV1), ha dato inizio ad una estesa epidemia ed è tuttora molto diffusa tra i columbiformi selvatici di molti paesi europei.

Il PPMV-1 presenta caratteristiche antigeniche e genetiche distinte dagli altri APMV-1. Questa variante viene identificata sulla base della reattività verso specifici anticorpi monoclonali e della clusterizzazione all'interno di un sublineaggio ben definito ottenuta dall'analisi filogenetica del gene codificante per la proteina di fusione (F).

In Italia il ceppo PPMV-1 è endemico nella popolazione di piccioni (*Columba livia*) e tortore dal collare (*Streptopelia decaocto*) selvatiche ed è sporadicamente responsabile di fenomeni di *spill over* nei volatili domestici.

In questo studio si riportano i risultati della caratterizzazione degli APMV-1 identificati nella popolazione di columbiformi sinantropici delle Marche, Emilia Romagna e Veneto negli anni 2008-2011. Durante questo periodo sono stati caratterizzati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie mediante metodiche molecolari e di virologia classica 102 APMV-1 isolati da tortore e piccioni ritrovati agonizzanti o morti in aree urbane e suburbane.

Il sequenziamento di un frammento di 300 nucleotidi del gene F e la successiva analisi filogenetica di APMV-1 isolati negli ultimi anni in vaste aree del centro e Nord Italia, ha consentito di rilevare più *cluster* virali presenti in queste popolazioni.

Nonostante un profilo genetico tipico di ceppi virulenti riscontrato in tutti i virus analizzati, il test ufficiale di patogenicità *in vivo* (ICPI) per gli APMV-1 ha evidenziato un differente potere patogeno per le specie domestiche tra i diversi isolati.

2.5 APPLICAZIONE DIAGNOSTICA DELLA REAL-TIME PCR PER L'IDENTIFICAZIONE DEL VIRUS DELLE API DEFORMI (DWV) IN *APIS MELLIFERA* L.

Beatrice Boniotti, Roberto Ferrari, Giuliana Botti, Claudia Nassuato, Antonio Lavazza
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia

Il DWV (*Deformed Wing Virus*) è una possibile concausa dello spopolamento degli alveari (*Colony Collapse Disorder*, CCD), una sindrome dall'eziologia incerta, ma riconducibile a molteplici fattori. Come la maggior parte dei virus delle api, DWV è estremamente diffuso negli apiari come infezione latente e, in particolari condizioni debilitanti, quali un'elevata infestazione da *Varroa* che funge da vettore e attivatore virale, moltiplica ad elevato titolo causando deformazione delle ali, addome accorciato, incapacità al volo, aspettativa di vita dimezzata e un indebolimento generale fino all'estinzione della colonia. Per comprendere il ruolo eziopatogenetico di DWV sono necessarie metodiche diagnostiche sensibili ed accurate. In questo lavoro è descritto lo sviluppo di un metodo d'indagine molecolare quantitativa di *Real-Time* RT-PCR.

Le sequenze relative a diversi ceppi del virus disponibili in banca dati sono state allineate per individuare quelle regioni con una sequenza nucleotidica fortemente conservata; una volta individuata una sequenza idonea, è stata usata come stampo per il disegno dei *primer* e del *probe* necessari alla reazione di polimerasi. Data l'importanza del "titolo" virale nel determinare o meno i quadri clinici, è stata sviluppata una metodica di tipo quantitativo creando degli standard di reazione per tradurre il risultato della metodica molecolare in quantità di copie virali per ape: il frammento genico contenente la regione di DWV amplificata nella reazione PCR è stato clonato in un plasmide e trascritto *in vitro*.

I risultati ottenuti con la *Real-Time* RT-PCR per DWV sono stati confrontati con quelli ottenuti sui medesimi campioni con metodi diagnostici tradizionali, sandwich MAb-ELISA e ImmunoElettronMicroscopia (IEM). La metodica molecolare evidenziava la presenza del virus in 62 su 64 campioni testati (96,87%), seppure in alcuni campioni le concentrazioni risultassero molto basse. Risultarono positivi anche campioni negativi con le altre due metodiche, a testimonianza dell'elevata sensibilità del metodo.

Queste sue caratteristiche, ne fanno un ottimo strumento diagnostico per identificare la presenza del DWV in campioni di *A. mellifera*. In particolare la capacità d'individuare infezioni latenti (presumibilmente associate a concentrazioni virali inferiori a 10⁶ copie virali/individuo) le conferisce anche un significato prognostico al fine di monitorare l'evoluzione dell'infezione virale in una colonia durante l'anno (approccio utile per poter comprendere i meccanismi di associazione della virosi con lo scatenamento della CCD), sia che resti latente o che causi sintomatologia evidente, associare l'evoluzione del titolo virale in una colonia soggetta ad infestazione di *Varroa destructor*, per comprendere il ruolo di questa come attivatore della replicazione virale e, ancora, comprendere i meccanismi di replicazione del virus nell'acaro vettore.

P.6 INDAGINI SIEROLOGICHE E VIROLOGICHE IN UN ALLEVAMENTO INDENNE DA MALATTIA DI AUJESZKY CON SPORADICHE POSITIVITÀ PER LA GLICOPROTEINA E

Marcello Bresaola, Alessia Catella, Nicola Martinelli, Loris Alborali, Guerino Lombardi,
Paolo Cordioli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia

La malattia di Aujeszky, il cui agente eziologico è il Swine herpesvirus-1 (SHV-1), è una delle principali malattie dell'allevamento suinicolo per la quale è prevista la vaccinazione obbligatoria di tutti i suini presenti in azienda con vaccini deleti della glicoproteina E (gE) (DM 1 aprile 1997 e successive modifiche).

L'importanza della malattia è legata alla sua elevata contagiosità: l'introduzione di SHV-1 all'interno di un allevamento indenne e vaccinato determina una rapida diffusione dell'infezione, in assenza di una sintomatologia clinica manifesta, ed una sieroconversione per la gE della quasi totalità della popolazione suscettibile

L'azienda a cui si riferisce questo "caso" è un allevamento a ciclo chiuso situato nella provincia di Brescia e classificato dal 2004 come indenne da malattia di Aujeszky. Nel giugno del 2010 nel corso del controllo sierologico quadrimestrale per il mantenimento della qualifica, è stata riscontrata la sieropositività verso la glicoproteina gE di un singolo capo. Ulteriori indagini sierologiche hanno evidenziato un totale di 8 animali sieropositivi su un numero complessivo di 911 riproduttori, mentre i suini all'ingrasso (campione di 100 capi) sono risultati negativi.

Quattro degli 8 soggetti gE positivi sono stati trasferiti presso le stalle di isolamento dell'IZSLER e sottoposti ad un trattamento immunosoppressivo (desametasone 4mg/Kg/die) per 5 giorni al fine di valutare la possibile latenza e l'eventuale riattivazione del virus herpetico. Inoltre per verificare la trasmissione dell'infezione è stata inserita nel gruppo una scrofa controllo *Specific Pathogen Free* (SPF). Durante il trattamento ogni 48 ore sono stati eseguiti tamponi nasali da sottoporre ad analisi mediante *Real-Time* PCR e ogni settimana sono stati prelevati campioni di sangue da sottoporre a test ELISA per valutare variazioni del titolo anticorpale.

Trascorsi 30 giorni gli animali sono stati sacrificati e per ciascun soggetto sono stati prelevati i gangli del trigemino, i bulbi olfattori ed il ponte per la ricerca del genoma virale.

I tamponi nasali e il tessuto nervoso sono risultati negativi; i campioni di siero hanno presentato un titolo anticorpale uguale a quello pre-trattamento farmacologico per i quattro animali già sierologicamente positivi, mentre la scrofa SPF non ha mostrato sieroconversione.

Tenuto conto che l'allevamento era indenne da diversi anni e considerando il carattere diffusivo della malattia rimane da chiarire la sieropositività di solo 8 scrofe, di età compresa fra i 2 e 3 anni, introdotte in tempi diversi in azienda e dunque non appartenenti ad uno stesso gruppo.

CARATTERIZZAZIONE DI DETERMINANTI ANTIGENICI IMMUNODOMINANTI NELLA STRUTTURA DEI VIRUS AFTOSI DI SIEROTIPO SAT 1 E SAT 2

Emiliana Brocchi, Santina Grazioli, Maria Luisa Crosatti, Marcella Moretti, Ilaria Barbieri
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia

I virus aftosi sono picornavirus classificati in sette sierotipi (A, O, C, Asia 1, *South African Territories* [SAT] 1, 2 e 3) con elevata variabilità all'interno di ciascun sierotipo. La struttura antigenica dei sierotipi SAT è poco nota; tuttavia, a causa della loro presenza endemica in Africa, della globalizzazione del commercio e dei massicci trasferimenti di persone e materiali, che rappresentano fattori di rischio per i Paesi indenni, è fondamentale approfondire la conoscenza di questi ceppi per mantenere aggiornati ed affinare i mezzi di controllo epidemiologico della malattia. L'obiettivo di questo lavoro è stato lo studio dei siti antigenici immunodominanti nei sierotipi SAT più diffusi in Africa (SAT 1 e SAT 2) utilizzando Anticorpi Monoclonali (AcM) sierotipo-specifici e neutralizzanti l'infettività virale. L'approccio adottato, che ha permesso la mappatura dei rispettivi siti antigenici, è stato la selezione *in vitro* e caratterizzazione di mutanti virali resistenti alla neutralizzazione operata dagli AcM, seguito dalla identificazione delle sostituzioni aminoacidiche responsabili delle mutazioni.

Per il sierotipo SAT1 i risultati hanno portato all'individuazione di quattro determinanti antigenici. La regione *target* di nove AcM corrisponde ad un sito dominante, già noto negli altri sierotipi, identificato come *loop* G-H della VP1; in particolare questi AcM riconoscono due epitopi lineari separati che fiancheggiano la tripletta RGD, rappresentante il sito di legame al principale recettore cellulare e comune a tutti i sierotipi aftosi. Altri cinque AcM hanno evidenziato un nuovo sito, composto da epitopi che possono coinvolgere due posizioni aminoacidiche distanti, una sulla VP3 (posizione 135 o 71 o 76) e una seconda sulla VP1 (posizione 179 o 181). Un altro gruppo di quattro AcM ha identificato un sito conformazionale che coinvolge la posizione VP2 72 sempre associata con la posizione VP1 181; infine un ulteriore nuovo sito che mappa alla posizione 111 della VP1 è stato identificato da due AcM.

Nel sierotipo SAT 2, i tre AcM neutralizzanti disponibili hanno individuato due siti lineari indipendenti sulla VP1, entrambi noti in altri sierotipi e localizzati rispettivamente in posizione C-terminale (residuo aminoacidico 210) e nel *loop* G-H (posizione 154).

In conclusione, il *loop* G-H della VP1 rappresenta un sito dominante in tutti i sierotipi aftosi e la regione C-terminale della stessa proteina è confermata contenere un sito lineare indipendente nel sierotipo SAT2. Tre nuovi siti conformazionali descritti per la prima volta sono stati individuati nel virus SAT 1: questi siti potrebbero rappresentare ulteriori, rilevanti determinanti antigenici nella struttura del virus aftoso oppure denotare una peculiare e diversificata struttura antigenica nei sierotipi SAT.

P.7 DISTRIBUZIONE ECTOPICA DI PRPSC IN ORGANI DI OVINI AFFETTI DA SCRAPIE E DA INFIAMMAZIONI CRONICHE

Giovanna Maria Cancedda (a), Giuseppe Marruchella (b), Giovanni Di Guardo (b), Caterina Maestrale (a), Cinzia Santucci (a), Simona Macciocu (a), Stefano Denti (a), Mariangela Saba (a), Ciriaco Ligios (a)

(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari*

(b) *Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Università degli Studi, Teramo*

Nella scrapie ovina la proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) si accumula nel Sistema Linfo-Reticolare (SLR) e nel Sistema Nervoso Centrale (SNC). Tuttavia, come dimostrato in modelli murini e nell'ospite naturale, uno stato infiammatorio cronico può estendere il tropismo dei prioni anche ad altri organi, comunemente ritenuti poco coinvolti nella patogenesi della scrapie. Questo fenomeno ha inizio attraverso l'induzione della maturazione delle Cellule Follicolari Dendritiche (FDC), le quali stanno alla base della formazione e del mantenimento dei follicoli linfatici secondari. Le FDC sono anche coinvolte nella genesi ectopica dei follicoli linfatici terziari, che si formano nei siti d'infiammazione cronica di natura sia infettiva sia autoimmune.

Diverse patologie degli ovini danno origine a quadri infiammatori ad evoluzione cronica, cosicché in molti casi si potrebbe assistere ad una distribuzione "ectopica" della PrP^{Sc} in un animale contestualmente affetto da scrapie, con rilevanti implicazioni pratiche. In questo lavoro abbiamo valutato la distribuzione della PrP^{Sc} in pecore con scrapie e concomitanti infiammazioni croniche di tipo granulomatoso e linfoproliferativo, a diversa eziologia ed a carico di differenti organi. Mediante tecniche Immunoistochimiche (IHC) e *Western Blotting* (WB) è stata determinata la distribuzione della PrP^{Sc} ed effettuata la caratterizzazione dell'immunofenotipo cellulare nelle lesioni infiammatorie in pecore clinicamente o preclinicamente affette da scrapie naturale e sperimentale.

I risultati ottenuti dimostrano che negli organi con infiammazioni croniche la PrP^{Sc} si accumula solo in presenza di follicoli ectopici terziari contenenti le FDC ed organizzati secondo una microarchitettura simile a quella dei follicoli secondari. Al contrario, la PrP^{Sc} risulta assente a livello di tutti i granulomi esaminati, anche in quelli adiacenti ai follicoli terziari con abbondanti depositi di PrP^{Sc}.

Sulla base di questi risultati si può affermare che la PrP^{Sc} non si accumulerebbe in assenza di FDC, confermando così il ruolo cruciale che tali cellule avrebbero nella patogenesi dell'infezione e, più nello specifico, nella replicazione dell'agente causale e nella deposizione di PrP^{Sc} nel SLR prima della neuroinvasione. Negli ovini affetti da scrapie, la concomitante presenza di foci d'infiammazione cronica potrebbe pertanto costituire un importante fattore di colonizzazione prionica a livello di organi "non sospetti" solo nel caso di lesioni infiammatorie che decorrano con lo sviluppo di follicoli linfatici terziari. Per questa ragione i lentivirus dei piccoli ruminanti si qualificherebbero come gli agenti più efficienti nel determinare le lesioni infiammatorie croniche più "adatte" ai fini di una distribuzione ectopica della PrP^{Sc}.

P.8 ANALISI FILOGENETICA CONDOTTA SU CEPPI DI BOVINE DIARRHEA VIRUS (BVDV) ISOLATI IN SICILIA

Vincenza Cannella, Annalisa Guercio, Samanta Partanna, Giusi Macaluso, Giuseppa Purpari, Patrizia Di Marco, Santina Di Bella, Vincenzo Di Marco Lo Presti
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia A. Mirri, Palermo

La Diarrea Virale del Bovino-Malattia delle Mucose, è una malattia infettiva che colpisce i bovini, ampiamente diffusa a livello mondiale. L'agente infettivo responsabile è un virus provvisto di envelope e con un genoma ad RNA a singolo filamento e a polarità positiva, appartenente al genere *Pestivirus*, famiglia *Flaviviridae*. A causa dell'elevata capacità di andare in contro a mutazioni genetiche, esistono numerose varianti di BVDV con diverso assetto antigenico e differente patogenicità. Ad oggi sono noti due genotipi: il BVDV-I e il BVDV-II. Il BVDV-I comprende almeno 13 sottotipi, mentre ne sono stati descritti solo 2 per il BVDV-II. Quest'ultimo, poco diffuso nel nostro territorio, è responsabile di una sindrome emorragica altamente letale. In Italia è stato isolato da bovini che erano stati trattati con vaccini anti-IBR contaminati. Recentemente è stata anche ipotizzata la presenza in Italia di una terza variante, il BVDV-III. L'infezione da BVDV spesso è associata con disordini a livello riproduttivo e nelle bovine gravide può esitare in aborto, malformazioni fetali o nascita di vitelli Persistentemente Infetti (PI). Scopo del presente lavoro è stato quello di genotipizzare i ceppi di BVDV isolati, al fine di approfondire la conoscenza circa la diffusione delle diverse varianti virali in Sicilia. Sono stati sequenziati ed analizzati filogeneticamente 18 ceppi, isolati su linee cellulari MDBK, da campioni di animali che erano risultati positivi in RT-PCR specifica per una porzione della regione 5'UTR e in ELISA per la ricerca dell'antigene virale. Per il sequenziamento, i ceppi virali sono stati sottoposti ad estrazione dell'RNA ed amplificazione di una porzione della regione 5'UTR, secondo quanto descritto da Vilcek nel 1994. Le sequenze ottenute sono state successivamente allineate e comparate con altre sequenze di riferimento disponibili in GeneBank. L'analisi filogenetica condotta attraverso il metodo *Neighbour-Joining*, ha permesso di evidenziare la presenza di due sottotipi virali appartenenti al genotipo BVDV-I: BVDV-Ib e BVDV-Ie. Nessun ceppo virale è risultato appartenere al genotipo BVDV-II. Una successiva analisi di restrizione condotta sugli amplificati utilizzando l'enzima di restrizione *AvaI*, ha confermato infine l'origine bovina di ciascun isolato. L'analisi filogenetica dei ceppi virali isolati in un determinato territorio, rappresenta un valido strumento per il monitoraggio di una malattia infettiva, permettendo l'evidenziazione di nuove eventuali varianti causa di emergenze sanitarie, la realizzazione di test diagnostici specifici e la realizzazione di una profilassi vaccinale mirata.

P.9 ESPRESSIONE IN FORMA SECRETA DELLA VP₂ DI BTV-8 IN CELLULE DI MAMMIFERO

Antonio Capocefalo, Valentina Franceschi, Gaetano Donofrio
Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Parma

La proteina VP₂ è la più esterna delle proteine del virus della *Bluetongue* ed insieme alla proteina VP₅ ne costituisce il capsido esterno. La sua sierotipizzazione ci consente di distinguere i differenti tipi virali in sierotipi ed inoltre l'organismo ospite elabora nei suoi confronti anticorpi neutralizzanti e quindi associati ad una immunità protettiva. Da qui il notevole interesse per questa proteina.

Poiché ad oggi non esiste ancora un valido sistema di espressione in cellule di mammifero che consenta di ottenere alti livelli della VP₂ in forma secreta nel medium delle cellule transfettate, abbiamo messo a punto differenti strategie di clonaggio finalizzate a questo. Per poter monitorare l'espressione/secrezione di forme ricombinanti di VP₂ e mancando di MAb diretti verso la BTV-8 VP₂, abbiamo anzitutto inserito a valle dell'ORF di VP₂ una sequenza di soli 106 nt della glicoproteina gD di BoHV-1 che veicola un epitopo specifico per un MAb anti gD. Abbiamo quindi escluso la possibilità che l'inserimento a monte dell'ORF di VP₂ di una sequenza codificante per un peptide segnale (*Igk signal peptide*) fosse da solo in grado di indurre la secrezione della VP₂ o di suoi frammenti. Inoltre, poiché la VP₂ interagisce con una proteina del citoscheletro della cellula ospite, la Vimentina, e tale interazione è stata mappata tra gli amminoacidi 64-112 di VP₂, abbiamo escluso la possibilità che a seguito di tale interazione la Vimentina potesse da sola sequestrare la VP₂ all'interno delle cellule transfettate. Infine abbiamo inserito a valle della *Igk* e a monte della VP₂ un frammento di 1029 nt corrispondenti all'ectodominio della glicoproteina E2 di BVDV, che sappiamo essere oltre che espressa anche ben secreta da differenti cellule di mammifero. Abbiamo quindi trovato che, benché l'intera proteina non risulti ancora secreta seppur espressa, i due frammenti di VP₂ corrispondenti a VP₂⁷²⁰⁻¹⁴²⁵ e VP₂²⁰⁷⁰⁻²⁸⁸³ risultano essere anche ben secreti. Abbiamo quindi concluso che la strategia di utilizzare una sequenza che sappiamo essere secreta a guisa di peptide guida è una strategia di successo.

La cassetta di espressione CMV-IgkE2 VP₂²⁰⁷⁰⁻²⁸⁸³gD106-pA è stata quindi inserita mediante ricombinazione omologa nel gene IE2, dopo inserzione di questo, del genoma di BoHV-4 clonato come Cromosoma Artificiale Batterico, in un ceppo di BoHV-4 dove il gene IE2 risulta duplicato. Abbiamo quindi messo a punto un sistema di espressione basato sul virus vettore BoHV-4 che ci consente in modo rapido di ottenere grandi quantità di VP₂²⁰⁷⁰⁻²⁸⁸³ nel sovrantante di cellule di mammifero precedentemente infettate.

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE PRELIMINARE DI NUOVE VARIANTI DEL RABBIT HAEMORRHAGIC DISEASE VIRUS

Lorenzo Capucci (a), Ghislaine Le Gall-Reculé (b), Maria Teresa Scicluna (c), Patrizia Cavadini (a), Iliaria Barbieri (a), Emiliana Brocchi (a), Giuliana Botti (a), Antonio Lavazza (a)
(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia*
(b) *ANSES, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, Avian and Rabbit Virology, Immunology and Parasitology Unit, Ploufragan, France*
(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma*

La malattia emorragica del coniglio (*Rabbit Haemorrhagic Disease - RHD*) è una epatite acuta fulminante causata da un calicivirus, genere lagovirus. Gli elevati tassi di mortalità e morbilità e la significativa resistenza del virus nell'ambiente fanno dell'RHD uno dei maggiori problemi sanitari per gli allevamenti cunicoli. La presenza sul territorio di allevamenti rurali e di popolazioni di conigli selvatici rende impossibile l'eradicazione dell'RHDV; pertanto, un attento uso della profilassi vaccinale ed una continua sorveglianza epidemiologica sono le chiavi per il controllo della malattia. Infatti, l'RHDV quale virus ad RNA con polarità positiva ha un'elevata capacità di variazione genetica. A questa consegue una significativa variazione antigenica connessa alla struttura peculiare del capsidico dei calicivirus, ove l'unica proteina strutturale (VP60) va a costituire, nella sua metà C-terminale, strutture esterne con elevati gradi di libertà strutturale e quindi disponibili a frequenti variazioni nella sequenza aminoacidica. Già nel 1996 è stata identificata una prima variante antigenica, denominata RHDVa, classificata come sottotipo dell'RHDVwt. Il lavoro presentato descrive l'identificazione di 3 nuove varianti da aree geograficamente distanti fra loro e la loro caratterizzazione preliminare.

La variante che più si distanzia da quelle note è stata identificata in Francia alla fine del 2010 e possiede un'omologia media attorno all'85%, la più bassa mai trovata per un RHDV patogeno. L'analisi antigenica mediante un pannello di AcM anti RHDV ed RHDVa mostra come tutti gli epitopi variante-specifici siano mutati e non più presenti sul ceppo francese. In aggiunta risultano negativi anche tutti gli AcM cross-reattivi RHDV ed RHDVa prodotti verso quest'ultimo.

Una seconda variante, identificata di recente in centro Italia (RHDVRoma11), mostra un'omologia aminoacidica media intorno al 92%. Come per il ceppo Francese gli epitopi variante specifici sono modificati, ma sono conservati alcuni degli epitopi cross-reattivi.

Una terza variante è stata identificata nella provincia di Brescia, RHDVFraCo10 e presenta un'omologia aminoacidica media intorno al 95%. Antigenicamente la variante è maggiormente correlata all'RHDVa ma presenta un epitopo specifico dell'RHDVwt.

I dati preliminari ribadiscono la necessità, soprattutto per il ceppo Francese che potrebbe classificarsi come nuovo sierotipo, di approfonditi studi sulla patogenicità delle varianti e soprattutto sul grado di efficacia protettiva degli attuali ceppi vaccinali.

P.10 ISOLAMENTO DI UN COWPOXVIRUS IN LAMA ALLEVATI IN ITALIA

Giusy Cardeti (a), Alberto Brozzi (b), Claudia Eleni (a), Marina Cittadini (a), Annalisa Altigeri (a), Massimiliano Simula, Alessia Altigeri (a), Fabrizio Carletti (c), Maria Capobianchi (c), Maria Teresa Scicluna (a), Concetta Castilletti (c), Antonino Di Caro (c), Gian Luca Autorino (a), Demetrio Amaddeo (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Viterbo

(c) Istituto Nazionale Malattie Infettive INMI L. Spallanzani, Roma

A luglio 2009, in un'azienda di Calcata in provincia di Viterbo, 4 lama adulti su un totale di 7 hanno evidenziato lesioni cutanee tipiche da poxvirus (noduli, lesioni crateriformi, croste) localizzate su congiuntiva palpebrale, orecchie, capezzoli e attorno a bocca ed ano. In azienda, convivono molte specie di uccelli (locali ed esotici) e mammiferi (capre, bovini, suini, asini, cavalli), nessuno dei quali ha manifestato i suddetti sintomi.

Sospettando un poxvirus, le lesioni cutanee prelevate ad uno dei 3 soggetti morti e a 3 dei 4 lama ancora in vita, sono state processate per l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione e per l'inoculo su due linee cellulari di mammifero. Due lotti di topini (in totale 31 soggetti) utilizzati come alimento per gli uccelli rapaci e prodotti da una grande ditta tedesca, sono stati sottoposti ad indagini di laboratorio assieme a 44 ratti grigi (*Rattus rattus*) catturati in azienda.

Campioni di lesioni cutanee sono stati fissati, inclusi, tagliati e colorati per l'esame istologico. Indagini sierologiche per la ricerca di anticorpi sono state condotte su sieri di bovini, cavalli, asini, capre e lama prelevati circa 3,5 mesi dopo la prima segnalazione del focolaio. DNA virale totale è stato estratto sia da croste omogenizzate che dal surnatante cellulare e analizzato mediante *real-time* PCR specifica per una regione del gene *crmB*. Per l'analisi filogenetica, sono state eseguite due PCR classiche specifiche per il gene completo dell'emoagglutinina (*HA*) e per il *crmB*.

L'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione ha evidenziato particelle tipiche riferibili a *Orthopoxvirus*. Le colture cellulari hanno sviluppato un effetto citopatico caratterizzato da lisi del monostrato. Istologicamente, le lesioni cutanee hanno evidenziato corpi inclusi intracitoplasmatici ed eosinofili negli strati basale e spinoso dell'epidermide. Un *Cowpoxvirus*, omologo ai ceppi CPXV-MonKre08/1-2-3 isolati in Germania nel 2009, è stato identificato mediante PCR e sequenziamento. Anticorpi anti-*Cowpoxvirus* (CPXV) sono stati evidenziati in sieri umani e di lama.

Lesioni da CPXV sono state osservate nei lama, ma non nel personale e nelle altre specie animali presenti, a contatto con i ruminanti. Attualmente il *Cowpoxvirus* è diffuso in Europa con un numero crescente di segnalazioni. In quanto responsabile di malattia sia nell'uomo che in molte specie animali domestiche e selvatiche, il CPXV è considerato un patogeno di rilievo per la salute pubblica.

P.11 APPROCCIO BIOMOLECOLARE ALLA DIAGNOSI DI IMMUNODEFICIENZA BOVINA

Cristina Casciari (a), Claudia Torresi (a), Simone Taddei (b), Sandro Cavarani (b), Francesco Feliziani (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

(b) Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Parma

Il virus della Immunodeficienza Bovina (BIV) è stato isolato alla fine degli anni sessanta, nel corso di studi finalizzati alla diagnosi del Virus della Leucosi Bovina Enzootica. Se in passato lo studio del BIV è stato affrontato in modo poco approfondito, recentemente si è risvegliato un certo interesse nella comunità scientifica internazionale non solo per la sua stretta relazione con il virus dell'immunodeficienza umana (HIV), ma anche perché alcuni ricercatori australiani e neozelandesi hanno messo in rilievo i danni che può provocare la presenza di questo virus nelle popolazioni bovine domestiche.

La presenza di questo virus è ampiamente documentata nella popolazione bovina dell'emisfero australe, mentre solo studi isolati sono stati condotti nel resto del mondo e più in particolare in Europa. Tuttavia, poco si conosce riguardo all'epidemiologia dell'infezione da BIV ed alla capacità del virus di determinare una maggiore predisposizione degli animali infetti all'insorgenza di altre condizioni patologiche.

Pertanto, si è ritenuto opportuno porre le basi per una più approfondita analisi delle conoscenze epidemiologiche legate all'infezione da BIV nella popolazione bovina e bufalina italiana attraverso l'impiego di tecniche diagnostiche all'avanguardia.

Al fine di elaborare un metodo di indagine molecolare, si è messa a punto una RT-PCR impiegando l'RNA virale (ceppo R29) come stampo. In questa prima fase si è scelto di utilizzare *primer* desunti dalla letteratura e specifici per la regione *gag*. Pur avendo ottenuto risultati positivi in termini di specificità e sensibilità, si è scelto di sviluppare anche una *real-time* PCR al fine di migliorare le *performances* del test da utilizzare nella ricerca. In questo secondo caso si è impiegata la regione *pol* di tutti gli isolati disponibili in banca dati per il disegno di *primer* degenerati e sonde.

L'applicabilità dei metodi è stata provata attraverso l'esame di campioni estratti da colture cellulari infette da BIV, prevedendo anche gli opportuni controlli negativi. Il metodo di *real-time* PCR ha dimostrato elevate sensibilità e specificità, ma anche le *performances* del test PCR tradizionale sono apparse soddisfacenti.

Visti i risultati incoraggianti si intende proseguire la ricerca validando i metodi diagnostici attraverso l'impiego di campioni bovini di campo. Inoltre, a causa della difficoltà a reperire campioni sicuramente positivi e negativi per la mancanza di un adeguato *gold standard* diagnostico, si intendono affiancare i metodi di ricerca diretta del virus con altri di tipo indiretto.

P.12 PROFILASSI VACCINALE DELLA MALATTIA DI NEWCASTLE E DELLA RINOTRACHEITE DEL TACCHINO: SOMMINISTRAZIONE SIMULTANEA DI VACCINI VIVI AD UN GIORNO DI VITA

Mattia Cecchinato (a), Caterina Lupini (b), Valeria Listorti (b), Olga Muñoz (b), Calogero Terregino (c), Krizia Cecchettin (c), Elena Catelli (b)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Legnaro, Padova*

(b) *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi, Ozzano dell'Emilia, Bologna*

(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

Per la Malattia di Newcastle (ND) e la Rinotracheite del tacchino (TRT), vaccini vivi attenuati vengono comunemente somministrati nei primi giorni di vita ad almeno una settimana di distanza l'uno dall'altro per il timore che si verifichino interferenze tra virus vaccinali. La possibilità di associare in incubatoio tali interventi avrebbe numerosi vantaggi sia di ordine pratico, che economico e sanitario. In quest'ottica diventa fondamentale assicurarsi che non ci siano interferenze negative tali da compromettere l'efficacia delle vaccinazioni o addirittura causare effetti patologici indesiderati.

L'obiettivo del presente lavoro è stato valutare, in condizioni sperimentali, l'interferenza fra due diversi ceppi vaccinali di NDV e uno di Metapneumovirus aviare (AMPV), agente della TRT, somministrati nel tacchino in associazione ad un giorno di vita, secondo un possibile schema vaccinale praticabile in incubatoio.

La prova è stata eseguita in condizioni di isolamento biologico in isolatori per pollame. Ottanta tacchinotti commerciali sono stati suddivisi in gruppi e vaccinati al primo giorno di vita per AMPV col ceppo VCO3, e per NDV con i ceppi B1 o VG/GA, somministrati singolarmente o in associazione (VCO3 + B1 o VCO3+VG/GA).

Nei 30 giorni successivi, ad intervalli stabiliti, è stata valutata l'eliminazione respiratoria dei virus vaccinali mediante *Real-Time* RT-PCR, e la risposta anticorpale umorale per NDV ed AMPV, mediante inibizione dell'emoagglutinazione ed ELISA, rispettivamente. Infine, parte dei soggetti vaccinati per AMPV, singolarmente o in associazione, sono stati infettati sperimentalmente con AMPV allo scopo di valutare la protezione immunitaria mediante misurazione della sintomatologia clinica.

I risultati ottenuti permettono di concludere che la somministrazione al tacchino di un giorno di vita di vaccino vivo attenuato AMPV ceppo VC03, in associazione con i vaccini vivi NDV sia ceppo B1 sia ceppo VG/GA, conferisce protezione al *challenge* con AMPV sovrapponibile a quella evocata dal vaccino somministrato singolarmente, e non determina interferenze negative sulla replicazione dei virus vaccinali a livello respiratorio e sulla risposta immunitaria umorale.

Resta da verificare se la protezione nei riguardi di NDV a seguito di vaccinazione combinata sia sovrapponibile a quella ottenibile con la vaccinazione singola.

IDENTIFICAZIONE DI NEBOVIRUS IN VITELLI CON DIARREA

Chiara Ceci (a), Barbara Di Martino (a), Vito Martella (b), Federica Di Profio (a), Fulvio Marsilio (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete, Università degli Studi, Teramo*

(b) *Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università degli Studi Aldo Moro, Bari*

I Nebovirus (NeV) sono piccoli virus privi di *envelope* del diametro di circa 35 nm, appartenenti alla famiglia *Caliciviridae*. Segnalati per la prima volta in vitelli diarroici in Inghilterra (Bo/Newbury1/76/UK) e negli Stati Uniti (Bo/Nebraska/80/US), sono stati recentemente classificati all'interno di un nuovo genere designato *Nebovirus*. Il ruolo enteropatogeno dei NeV è stato dimostrato sperimentalmente in vitelli gnotobiotici di 17-30 giorni. Inoltre, indagini condotte in UK, USA e Asia hanno rivelato che i NeV sono coinvolti nel 10-40% dei casi di diarrea neonatale dei vitelli. Tuttavia, dal momento che questi virus non sono inclusi nell'algoritmo diagnostico delle malattie enteriche dei vitelli, le informazioni sulla loro diffusione risultano piuttosto limitate. Nel presente lavoro vengono riportati i risultati di un'indagine molecolare per la ricerca di NeV condotta presso 16 allevamenti ubicati in Abruzzo. Sono stati analizzati 100 campioni fecali collezionati da vitelli con diarrea (n. 38) e da vitelli asintomatici (n. 62) di età compresa tra 1 e 45 giorni. I campioni sono stati testati per NeV mediante nRT-PCR impiegando due *set* di *primer* in grado di amplificare un frammento di 194 bp della regione conservata RdRp. L'RNA di NeV è stato identificato nel 5,0% degli animali testati. Tutti i campioni risultati positivi provenivano da vitelli che al momento del prelievo presentavano diarrea (5/32), mentre nessuno degli animali asintomatici è risultato infetto. L'analisi della regione RdRp ha evidenziato in tutti i campioni un'elevata identità nucleotidica (92-95%) con i ceppi Nebraska-like identificati nel Regno Unito. Per due ceppi (Bo/32Te/ITA e Bo/16Te/ITA) è stata ottenuta una sequenza di 2.4 kb. Sulla base dell'analisi dell'intero gene capsidico, il ceppo italiano Bo/32Te/ITA è risultato strettamente correlato ai ceppi Newbury1 e Nebraska (lineaggio 1), mentre il virus Bo/16Te/ITA ha mostrato maggiore identità nei confronti di ceppi identificati nel Regno Unito di lineage 4. Poiché i virus Bo/16Te/ITA e Bo/32Te/ITA sono simili nella polimerasi, questo *pattern* suggerisce un fenomeno di ricombinazione avvenuto nella regione amino-terminale del capsido. L'esistenza di tale fenomeno nei NeV, analogamente a quanto osservato in altri calicivirus, suggerisce di usare come *target* per studi epidemiologici non solo la regione RdRp, ma anche l'intero gene capsidico. I dati ottenuti nel presente studio dimostrano per la prima volta la circolazione di NeV negli allevamenti bovini in Italia in episodi di enterite neonatale.

P.13 IDENTIFICAZIONE DI KASHMIR BEE VIRUS (KBV) IN ITALIA

Antonella Cersini (a), Giusy Cardeti (a), Ugo Marchesi (a), Valeria Antognetti (a), Maurizio Zini (a), Silvia Puccica (a), Roberta Barcaioli (a), Anna Granato (b), Franco Mutinelli (b), Giovanni Formato (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

Il *Kashmir Bee Virus* (KBV) appartiene alla superfamiglia *Picornavirus-like*, famiglia *Dicistroviridae*, genere *Cripavirus*, ed è caratterizzato da genoma a RNA a singolo filamento con polarità positiva. KBV è stato rilevato in *Apis cerana* per la prima volta nel 1977 nel Kashmir e successivamente negli anni '90 nel resto dell'India ed in Papua Nuova Guinea. Alla fine degli anni '90, KBV è stato evidenziato in *Apis mellifera* in Australia, Canada, Nuova Zelanda e Nordamerica. A partire dal 2000, KBV è stato segnalato anche in Europa, sempre in *Apis mellifera*, in Germania, Francia e Spagna. In Italia è stato riscontrato nel 2010 sia in Toscana che nel Lazio nell'ambito del progetto "Indagine tecnico-conoscitiva sul fenomeno della moria delle api all'interno delle aree naturali protette", finanziata dal Ministero dell'Ambiente e realizzata in 5 aree naturali protette di quattro Regioni (Veneto, Emilia Romagna, Toscana, Lazio). In Toscana, KBV è stato segnalato nel Parco Regionale Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli (fascia costiera, province di Pisa e Lucca), mentre nel Lazio, KBV è stato rilevato ad Est di Roma, nel Parco Naturale Regionale Monti Simbruini e ad Ovest di Roma nella Riserva Naturale Litorale Romano. Inoltre, nell'ambito del progetto Apenet nazionale nel 2009, è stata rilevata la presenza di KBV anche in un apiario della regione Umbria (Spoleto, Perugia), in corso di identificazione. Il protocollo analitico ha comportato l'estrazione dell'RNA totale dagli omogenati di api bottinatrici mediante kit commerciale (QIAamp® Viral RNA kit, Qiagen). Il cDNA è stato sintetizzato a partire dall'RNA estratto impiegando l'*High Capacity cDNA Reverse Transcription* kit (Applied Biosystems) ed è stato poi utilizzato come template per la reazione di amplificazione. I primer selezionati amplificano una sequenza di 395bp relativa alla *RNA-dependent-RNA polymerase* (RdRp) virale, localizzata nella ORF codificante per le proteine non strutturali. Gli amplificati sono stati sequenziati su piattaforma *Applied Biosystems* utilizzando il *BigDye Terminator kit* (*Applied Biosystems*). Sulla base dei confronti effettuati tra le diverse sequenze, è stata evidenziata la circolazione di due diversi ceppi di KBV: a) il primo, rilevato nel Parco Regionale Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli e nella Riserva Naturale Litorale Romano, presenta un'identità di sequenza del 97% con la RdRp del ceppo di riferimento isolato nel 2004 ad Hesse in Germania (GenBank AY787143); b) il secondo, rilevato nel Parco Naturale Regionale Monti Simbruini, presenta un'identità di sequenza del 97% con la RdRp di un ceppo KBV isolato nel 1997 in Australia (GenBank AF034541.2), considerato il capostipite degli isolati australiani. Negli USA, insieme a IAPV, KBV sembra essere collegato alla CCD.

P.14 IDENTIFICAZIONE DEI FLAVIVIRUS IN PIEMONTE: CARATTERIZZAZIONE DI USUTU VIRUS E MOSQUITO FLAVIVIRUS

Francesco Cerutti (a,b), Mario Giacobini (a,b), Andrea Mosca (c), Luisa Rambozzi (a), Luca Rossi (a), Luigi Bertolotti (a,b)

(a) *Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Università degli Studi, Torino*

(b) *Unità di Biologia Computazionale, Molecular Biotechnology Center, Università degli Studi, Torino*

(c) *IPLA, Istituto per le Piante da Legno e Ambiente, Torino*

I Flavivirus sono virus appartenenti alla famiglia *Flaviviridae* trasmessi da artropodi. Il genere *Flavivirus* include più di 70 virus il cui genoma è composto da una singola catena di RNA a polarità positiva. Tra questi sono presenti virus responsabili di diverse patologie, anche di carattere neurologico o emorragico. Come esempio, sono inclusi in questo gruppo i virus della Febbre Gialla, *Dengue*, dell'Encefalite da Morso da Zecca, di *West Nile* e Usutu. Recentemente sono state messe a punto metodiche in grado di identificare il genere *Flavivirus*, sfruttando le porzioni più conservate tra i genomi conosciuti: queste metodiche hanno reso possibile l'identificazione di nuovi virus appartenenti allo stesso genere. In particolare alcuni Flavivirus sono stati recentemente caratterizzati esclusivamente nelle zanzare dei generi *Culex* e *Aedes*. Al fine di monitorare la presenza di Flavivirus potenzialmente zoonotici sul territorio piemontese, questo studio è stato condotto parallelamente all'attività di monitoraggio e controllo entomologico presente nella Regione. Sono state considerate le sessioni di cattura di zanzare in settembre negli anni 2009 e 2010. Tutti i campioni sono stati identificati, divisi in pool e conservati a -80°C. L'RNA totale è stato estratto da ogni pool e testato per la presenza di Flavivirus, mediante PCR generica per il *genus*. In totale sono state identificate e analizzate 3552 zanzare nel 2009 (1912 *Culex pipiens*, 1009 *Ochlerotatus caspius*, 631 *Cx. modestus*) e 676 nel 2010 (223 *Cx. pipiens*, 453 *Oc. caspius*). Le analisi molecolari hanno identificato 4 pool positivi nel 2009 (2 pool di *Cx. pipiens*, 2 di *Oc. caspius*) e 4 nel 2010 (1 pool di *Cx. pipiens*, 3 di *Oc. caspius*). L'analisi delle sequenze ha permesso di identificare Mosquito Flavivirus in *Oc. caspius* e Usutu virus in *Cx. pipiens*. La sequenza parziale del gene NS5 ha mostrato due *strain* distinti e divergenti di Mosquito Flavivirus, mentre la sequenza parziale dell'envelope di Usutu ha rilevato un'elevata similarità degli con le sequenze disponibili in rete. Questo studio ha evidenziato come la sorveglianza entomologica e le analisi molecolari siano strumenti necessari al monitoraggio dei patogeni a trasmissione vettoriale; inoltre la conferma della circolazione di Usutu suggerisce che l'infezione sia ormai endemica nell'area di studio; infine, la caratterizzazione di Mosquito Flavivirus lascia aperti nuovi interrogativi sul ruolo ecologico di questi virus e su loro possibile impatto sull'avifauna.

DESCRIZIONE DELL'EPIDEMIA IN CORSO NEI CARNIVORI SELVATICI DELL'ARCO ALPINO ITALIANO CAUSATA DA UNA NUOVA VARIANTE DEL VIRUS DEL CIMURRO

Carlo V. Citterio, Isabella Monne, Federica Obber, Alice Fusaro, Viviana Valastro, Marco Bregoli, Deborah Dellamaria, Karin Trevisiol, Manuela Dalla Pozza, Marica Toson, Monica Lorenzetto, Marco De Nardi, Paola De Benedictis, Ilaria Capua, Giovanni Cattoli
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

Il cimurro, malattia virale a potenziale impatto sulla conservazione della fauna selvatica, sta interessando dal 2006 le popolazioni di carnivori selvatici (prevalentemente volpi e, in minor misura, tassi ed altri mustelidi) dell'Arco Alpino italiano. Dall'inizio dell'epidemia al 30 ottobre 2010, la presenza del cimurro (*canine distemper virus* – CDV) è stata accertata tramite esami di laboratorio in 319 (262 volpi, 52 tassi e 5 faine) campioni, su un totale di 2967 campioni di carnivori selvatici esaminati nel Triveneto. L'osservazione della malattia non è stata simultanea nel territorio: i primi casi infatti sono stati osservati in Friuli Venezia Giulia (Carnia) ed in Alto Adige (Val Pusteria), rispettivamente nei mesi di maggio e agosto 2006. Nell'aprile 2007, la malattia è stata osservata in Trentino (Predazzo) e in provincia di Belluno (Comelico Superiore). Il fronte dell'epidemia si sposta da est verso ovest e ha ormai raggiunto diverse aree alpine della Lombardia e della Svizzera.

Il virus del cimurro è stato individuato in campioni di tessuto cerebrale o polmonare esaminati tramite RT-PCR. Le analisi filogenetiche delle sequenze virali del gene H di 96 campioni CDV positivi (66 volpi, 29 tassi e una faina), hanno raggruppato tutti i campioni esaminati in un unico sottogruppo virale monofiletico all'interno del clade Europe-1, nel quale si raggruppano anche 4 isolati rinvenuti nel 2008 in carnivori selvatici in Germania (Baviera). L'analisi delle sequenze aminoacidiche degli stessi campioni ha inoltre evidenziato, in tutti i casi, una mutazione (Y549H) della proteina H, associata da alcuni Autori ad un ampliamento dello spettro d'ospite del CDV e ad un possibile incremento della sua virulenza. A fronte dell'ampia circolazione descritta nei carnivori selvatici, nel nostro territorio non sono stati fino ad oggi individuati, in cani domestici, casi di cimurro i cui isolati siano riconducibili al nuovo genogruppo descritto, la cui diffusione appare quindi principalmente legata alle popolazioni a vita libera.

L'evidenza di questa recente e distinta variante del CDV comporta possibili implicazioni soprattutto:

- i) per la conservazione di specie a rischio;
- ii) per la dinamica delle popolazioni di carnivori selvatici dei nostri territori e, in relazione al punto precedente;
- iii) per la dinamica di altre patologie nei carnivori selvatici, prima tra le quali la rabbia silvestre.

P.15 RICERCA DI NOROVIRUS IN MOLLUSCHI BIVALVI IMMESSI IN COMMERCIO IN EMILIA ROMAGNA, ITALIA

Sara Ciulli (a), Giorgia Bignami (a), Enrico Volpe (a), Michele Muscillo (b), Patrizia Serratore (a), Marco Grodzki (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università degli Studi, Cesenatico, Forlì-Cesena*

(b) *Dipartimento di Prevenzione Ambientale Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

I *Norovirus* (NoV) sono piccoli virus a RNA della famiglia *Caliciviridae* responsabili di gastroenteriti nell'uomo. L'infezione può trasmettersi per via alimentare tramite il consumo di molluschi bivalvi. Questi animali, infatti, in quanto filtratori, possono accumulare diversi contaminanti, compresi i virus enterici umani come i NoV. Sulla base dell'analisi genetica, i NoV possono essere suddivisi in 5 genogruppi (GI-GV), di questi, nell'uomo sono stati evidenziati prevalentemente i genogruppi GI e GII. Recentemente è stata evidenziata anche la presenza di NoV GIV.

Lo scopo di questo lavoro è quello di ricercare la presenza di NoV in molluschi bivalvi immessi in commercio in Emilia Romagna prelevandoli direttamente dai banchi di vendita, al fine di valutare il possibile rischio per i consumatori finali.

Sono stati raccolti e analizzati 95 lotti di molluschi di cui 41 di vongola filippina (*Venerupis philippinarum*), 29 di mitilo (*Mytilus galloprovincialis*), 20 di ostrica concava (*Crassostrea gigas*), 2 di fasolare (*Callista chione*), 2 di vongola comune (*Chamelea gallina*) e 1 di ostrica comune (*Ostrea edulis*). Pool di epatopaneas sono stati trattati con la Proteinasi K al fine di digerire il tessuto analizzato e liberare in tal modo la componente virale, quindi l'RNA è stato estratto con un kit commerciale. La ricerca del virus è stata condotta con tecnica RT-PCR *one-step* utilizzando i *primers* JV12-JV13, specifici per la regione dell'RNA-polimerasi, che amplificano un frammento di 326 bp di NoV sia GI che GII. Successivamente, è stata condotta una caratterizzazione utilizzando due *seminested-PCR* specifiche per i due genogruppi. Alcuni prodotti di PCR sono stati sottoposti a sequenziamento ed analisi filogenetica.

NoV è stato evidenziato in campioni di vongole filippine, mitili e ostriche concave per un totale di 14 lotti (14,7%). I campioni più contaminati sono risultati quelli di vongola filippina (22%) rispetto a mitili e ostrica concava (10%). Entrambi i Genogruppi erano presenti in vongola filippina e mitilo, mentre in ostrica concava è stato evidenziato solo NoV GI. Quattro lotti sono risultati contaminati sia da GI che da GII. Il sequenziamento e l'analisi filogenetica hanno evidenziato la presenza dei genotipi GII.4, GII.g e GII.b nell'ambito del genogruppo II.

L'evidenziazione di una alta diffusione di NoV in molluschi bivalvi immessi in commercio sottolinea l'inadeguatezza dei sistemi di controllo attualmente in atto. Ulteriori *screening* sui molluschi bivalvi e l'implementazione dei sistemi di controllo sono da perseguire, al fine di prevenire le infezioni umane su base alimentare.

IDENTIFICAZIONE DELLA PROTEINA PRIONICA PATOLOGICA (PRPSC) IN TESSUTI E SALIVA DI PECORE AFFETTE DA SCRAPIE: UNO STUDIO COMPARATIVO TRA PMCA, WESTERN BLOT E PROVA BIOLOGICA

Gian Mario Cosseddu (a), Michele Di Bari (a), Philip Steele (b), Francesca Chianini (b), Luigi De Grossi (c), Marta Vascellari (d), Irini Fragkiadaki (d), Franco Mutinelli (d), Umberto Agrimi (a), Gabriele Vaccari (a), Romolo Nonno (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Bush Loan, Penicuik, Midlothian, United Kingdom*

(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma*

(d) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

L'innovativa tecnica denominata *Protein Mysfolding Cyclic Amplification* (PMCA) consente di "amplificare", *in vitro* la proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) presente in un campione biologico infetto (inoculo). In modo concettualmente analogo alla PCR, alternando ciclicamente fasi di incubazione e sonicazione, il PMCA favorisce la transformazione della proteina prionica cellulare (PrP^C), presente nel substrato di reazione (omogenato cerebrale sano), nella sua forma patologica, da parte della stessa PrP^{Sc} contenuta nell'inoculo. Quantità di PrP^{Sc} estremamente ridotte e non svelabili con le comuni tecniche, possono in questo modo essere "amplificate" e rese rilevabili.

Il PMCA apre nuove prospettive alla diagnosi delle malattie da prioni. Nel presente studio è stata confrontata la sensibilità del PMCA rispetto a quella di tecniche largamente utilizzate, come il *Western blot* e la prova biologica, nell'identificazione di prioni in tessuti e fluidi biologici di pecore affette da scrapie.

Lo studio è stato realizzato analizzando in parallelo, con le tre tecniche, campioni di rene, muscolo semitendinoso, nervo sciatico, linfonodo prescapolare, muscolo oculomotore, cuore, lingua, saliva e ghiandole salivari. Analogamente, è stata sottoposta alle stesse analisi una curva di diluizione di cervello di una pecora clinicamente malata di scrapie.

Il PMCA ha mostrato una sensibilità nettamente superiore a quella del *Western blot*. Sono risultati positivi al PMCA i campioni di ghiandola salivare, linfonodo prescapolare, nervo sciatico, rene e muscolo oculo-motore. Inoltre la PrP^{Sc} è stata messa in evidenza in 3 su 5 campioni di saliva di pecore infette. La lingua, il cuore e il muscolo semitendinoso sono risultati negativi. Il *Western blot* ha invece identificato come positivi solo i campioni di linfonodo prescapolare e ghiandole salivari e nervo sciatico, nonché le diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻³ della curva di diluizione.

Il confronto tra PMCA e prova biologica ha mostrato che gli stessi campioni risultati positivi con il PMCA hanno provocato malattia nei roditori inoculati, eccezion fatta per la saliva, i cui studi *in vivo* sono stati avviati da poco e non sono ancora conclusi. Tuttavia,

l'ultima diluizione di cervello ad avere prodotto malattia negli animali è stata la 10-4 a fronte della capacità del PMCA di rilevare la presenza di PrP^{Sc} fino alla diluizione 10-5.

In conclusione, il PMCA ha dimostrato di essere una tecnica molto più sensibile di quelle correntemente in uso nella diagnostica delle malattie da prioni e, sebbene in misura inferiore, anche della prova biologica, rispetto alla quale il PMCA presenta l'indubbio vantaggio della maggiore rapidità di conseguimento del risultato.

UN APPROCCIO DIAGNOSTICO INNOVATIVO PER L'IDENTIFICAZIONE E LA TIPIZZAZIONE DEI LYSSAVIRUS

Cristian De Battisti (a), Paola De Benedictis (a), Laurent Dacheux (b), Sabrina Marciano (a), Silvia Ormelli (a), Angela Salomoni (a), Silvia Tiozzo Caenazzo (a), Anthony Lepelletier (b), Hervé Bourhy (b), Ilaria Capua (a) Giovanni Cattoli (a)

(a) *Office International des Épizooties and National Collaborating Centre for Diseases at the Animal-Human Interface, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

(b) *Institut Pasteur, Lyssavirus Dynamics and Host Adaptation Unit, National Reference Centre for Rabies, World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Rabies, Paris, France*

La rabbia è un'encefalomielite acuta causata da virus a RNA, non segmentato a polarità negativa appartenente al genere *Lyssavirus*. Questo genere comprende 11 specie ufficialmente riconosciute tra cui, il virus della rabbia classica (RABV) e ulteriori 10 specie generalmente definite come *Rabies-Related lyssaviruses* (RRVs). Una nuova specie virale è stata inoltre recentemente identificata in Kenia in pipistrelli appartenenti alla sottofamiglia *Hipposiderinae*. A oggi, il test di referenza per la diagnosi della rabbia è l'immunofluorescenza diretta seguita dall'isolamento virale. Queste metodiche tuttavia, sono applicabili soltanto per la diagnosi *post-mortem* su materiale cerebrale e presentano numerosi limiti di sensibilità, in particolare in caso di infezione determinata da RRVs. Nonostante l'applicazione delle metodiche molecolari ha consentito di superare alcuni limiti dell'immunofluorescenza diretta dell'isolamento virale, attualmente nessun metodo molecolare sviluppato per la diagnosi della rabbia è in grado di identificare rapidamente un'infezione causata da RRVs.

In questo studio è stata validata una *One-Step* RT-PCR seguita da *pyrosequencing* per una rapida caratterizzazione di tutti i *Lyssavirus* ad oggi noti. Il *target* della RT-PCR è la regione terminale 3' del gene codificante la Nucleoproteina (N), una delle regioni maggiormente studiate per la classificazione del genere *Lyssavirus*. La sensibilità analitica della metodica è stata valutata utilizzando una curva *standard* di diluizioni seriali di RNA trascritto *in vitro* e diluizioni seriali di *Lyssavirus* titolati su colture cellulari. La specificità analitica è stata valutata analizzando un pannello di patogeni comunemente responsabili di encefalite negli animali e nell'uomo. La sensibilità diagnostica è stata valutata su un totale di 897 campioni (sistema nervoso centrale, saliva, ghiandole salivari, sangue, biopsie cutanee e colture cellulari), comprendenti 379 campioni positivi per RABV e RRVs. Tutti i campioni analizzati, sono stati correttamente identificati mediante il protocollo di *pyrosequencing*, come confermato dal sequenziamento classico (metodo Sanger) applicato sugli stessi campioni. Il protocollo *One-Step* RT-PCR è stato inoltre comparato a un protocollo hnRT-PCR precedentemente validato.

Il *pyrosequencing* rappresenta un approccio diagnostico innovativo, relativamente economico che permette di analizzare un elevato numero di campioni in tempi ridotti

rispetto alle metodiche attualmente in uso. I risultati di questo studio indicano che la *One-Step* RT-PCR seguita da *pyrosequencing* è utilizzabile per l'identificazione di Lyssavirus per la diagnosi della rabbia negli animali e nell'uomo.

P.16 RICERCA DEL GENOMA DI PRRS, AD, PPV, PCV2, PESTIVIRUS NEI CINGHIALI IN SARDEGNA

Silvia Dei Giudici, Pierpaolo Angioi, Mariella Canu, Edi Fiori, Antonio Tola, Susanna Zinellu, Maria Vittoria Carboni, Paola Chironi, Giantonella Puggioni, Annalisa Oggiano
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

In molte aree della Sardegna il suino domestico viene allevato in modo estensivo al pascolo brado e ha frequenti contatti con il cinghiale. Tale promiscuità può agevolare la circolazione dei virus fra le due specie. La conoscenza della diffusione delle malattie virali nel cinghiale può chiarire il possibile ruolo di questa specie come *reservoir* per il suino. A completamento di nostri precedenti studi sierologici che hanno evidenziato la circolazione tra i cinghiali di virus di grande impatto sull'allevamento suinicolo, è stata condotta una ricerca virologica volta ad evidenziare il genoma di: Malattia di Aujeszky (AD), Parvovirus Suino (PPV), Circovirus Suino di tipo II (PCV2), Sindrome respiratoria e riproduttiva del suino (PRRS), Pestivirus (PSC, BVDV1-2, BDV). Relativamente ai pestivirus, dal 2003 la regione Sardegna è indenne da Peste Suina Classica (PSC), ma analisi sierologiche hanno evidenziato la circolazione di BVDV e BDV nei suini domestici.

Sono stati analizzati organi di 87 cinghiali abbattuti durante le campagne venatorie 2008-2009 e 2009-2010 nel Nord Sardegna. Per ogni soggetto sono stati raccolti dati riguardanti l'età, il sesso e l'eventuale stato di gravidanza. L'età è stata determinata in base alla presenza dei molari della mascella inferiore e divisa in 4 classi: 0-6 mesi, 6-18 mesi, 18-30 mesi, >30 mesi. Sono stati esaminati organi quali: cervello (bulbo olfattivo e ganglio del trigemino), milza, feto, placenta, cordone ombelicale e polmone. I campioni sono stati omogenati in PBS ed il sovrantante è stato utilizzato per l'estrazione degli acidi nucleici.

L'RNA è stato estratto con Trizol (Invitrogen) ed il DNA con il Kit *High Pure PCR Template Purification* (Roche) secondo le indicazioni delle ditte produttrici. Gli acidi nucleici sono stati ricercati con metodica RT-PCR e PCR o *Real-Time* PCR a seconda del patogeno esaminato. Il test del chi-quadrato è stato utilizzato per valutare le differenze in relazione all'età ed al sesso fissando il livello di significatività a 0.05.

I risultati hanno evidenziato la presenza del genoma di PCV2 e PPV in percentuali di 45 e 45,07% rispettivamente. La suddivisione per età e sesso non ha mostrato differenze significative. Tutti i campioni esaminati sono risultati negativi per AD, PRRS e Pestivirus. Sono in corso studi filogenetici per evidenziare eventuali differenze fra i ceppi di PCV2 e PPV isolati dai cinghiali selvatici e dai suini domestici.

P.17 STABILITÀ ANTICORPALE IN SIERI DI ESEMPLARI DI STENELLA STRIATA (STENELLA COERULEOALBA) POSITIVI PER MORBILLIVIRUS

Cristina Esmeralda Di Francesco (a), Umberto Proietto (a), Roberto Speranza (a), Walter Mignone (b), Cristina Casalone (c), Barbara Iulini (c), Fulvio Marsilio (a), Giovanni Di Guardo (a)

(a) *Università degli Studi, Teramo*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Imperia*

(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

Il ritrovamento di animali spiaggiati rappresenta un evento particolarmente utile per ottenere informazioni sullo stato sanitario delle diverse specie e popolazioni di cetacei in natura, la cui conservazione appare più o meno seriamente minacciata.

Tra i virus che negli ultimi due decenni hanno maggiormente inficiato lo stato di salute dei mammiferi acquatici, particolare rilevanza rivestono i membri del genere *Morbillivirus*, responsabili di diverse epidemie che hanno interessato più specie di cetacei e in varie zone geografiche, con conseguenze a volte anche drammatiche sulla loro conservazione. Risulta pertanto fondamentale monitorare la diffusione delle infezioni da *Morbillivirus* sia attraverso tecniche dirette (immunoistochimica, RT-PCR), sia mediante la ricerca di specifici anticorpi nei campioni di siero raccolti durante le indagini necroscopiche. Tuttavia, lo stato di conservazione degli animali appare spesso gravemente compromesso, rendendo impossibile l'esecuzione di molte indagini laboratoristiche.

Scopo del lavoro è stato valutare, in campioni di siero ottenuti da esemplari di stenella striata (*Stenella coeruleoalba*), la variazione dei titoli anticorpali nei confronti di *Morbillivirus* in seguito all'esposizione a diversi intervalli di tempo e temperatura. Ciò al fine di determinare l'effetto delle suddette variabili sulla stabilità degli anticorpi in seguito allo spiaggiamento degli animali.

Tre campioni di emosiero, precedentemente risultati positivi per *Morbillivirus* alla Sieroneutralizzazione (SN) impiegando come antigene *Canine Distemper Virus*, sono stati suddivisi in aliquote e successivamente incubati alle temperature di 10°C, 20°C, 28°C e 37°C per intervalli di tempo di 24, 48 ore e di 7, 14 e 21 giorni. Il titolo anticorpale è stato quindi rideterminato mediante SN per ciascun intervallo di tempo e temperatura.

La flessione dei titoli anticorpali è risultata contenuta e graduale nei campioni esposti alle temperature di 10° e 20°C rispetto alle aliquote esposte alle temperature più alte, per le quali già dopo 24 h si è verificata la perdita completa degli anticorpi presenti.

I risultati del presente studio costituiscono una base scientifica preliminare in grado di orientare la scelta delle indagini di laboratorio più appropriate in rapporto al grado di preservazione degli animali rinvenuti spiaggiati.

P.18 ENCEFALITE DA MORBILLIVIRUS IN UN GIOVANE ESEMPLARE DI STENELLA STRIATA (STENELLA COERULEOALBA)

Cristina Esmeralda Di Francesco (a), Claudia Eleni (b), Cristiano Cocumelli (b), Roberto Speranza (a), Francesco Scholl (b), Massimiliano Pennelli (a), Giovanni Di Guardo (a)

(a) *Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Teramo*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma*

Nel novembre 2009 un giovane esemplare maschio di stenella striata (*Stenella coeruleoalba*) è stato rinvenuto spiaggiato lungo il litorale romano, in località Ostia Lido. Nel corso della necropsia, eseguita poco dopo l'*exitus*, sono stati prelevati campioni dai principali organi e tessuti dell'economia animale, sui quali sono state effettuate indagini parassitologiche, microbiologiche, istopatologiche, nonché immunoistochimiche ed in RT-PCR per *Morbillivirus*, unitamente a indagini sierologiche nei confronti di *Morbillivirus*, *Brucella* spp. e *Toxoplasma gondii*. Le alterazioni più significative evidenziate dalle indagini anatomo-istopatologiche apparivano localizzate a livello cerebrale, ove era possibile apprezzare chiare espressioni di meningoencefalite subacuto-cronica non purulenta. Le suddette lesioni risultavano caratterizzate da più o meno spessi manicotti perivasali di cellule infiammatorie mononucleate, con contestuali aspetti di microgliosi, degenerazione neuronale, astrogliosi/astrocitosi e presenza di elementi sinciziali. I distretti cerebrali interessati dai quadri lesivi sopra specificati comprendevano il prosencefalo (*diencephalon*), il mesencefalo ed il tronco encefalico (*pons e medulla oblongata*), senza apparente coinvolgimento del tessuto cerebellare. Le indagini immunoistochimiche ed in RT-PCR per la ricerca di *Morbillivirus* hanno fornito esito positivo esclusivamente a livello del parenchima cerebrale, mentre non è stato possibile dimostrare la presenza del virus né in sede cerebellare, né in corrispondenza di tutti gli altri tessuti esaminati. Nel campione di siero è stata altresì rilevata la presenza di anticorpi anti-*Morbillivirus* con un titolo di 1:10, mentre le prove sierologiche per *Brucella* spp. e *T. gondii* hanno fornito esito negativo. Gli esami colturali, infine, non hanno evidenziato la presenza di microrganismi patogeni. La presente segnalazione risulta di particolare interesse poiché rappresenta il secondo caso di encefalite morbillivirale descritto in Italia nella specie in oggetto, dopo quello accertato nel giugno 2007 lungo le coste Nord-occidentali della Sardegna. Inoltre, la positività - sia immunoistochimica che biomolecolare - nei confronti di *Morbillivirus*, confinata al solo distretto cerebrale in un esemplare di giovane età, unitamente all'evoluzione in senso cronico delle lesioni encefaliche, permettono di formulare alcune ipotesi circa la possibilità che l'agente responsabile dell'infezione possa essere un nuovo "ceppo" di *Morbillivirus* ad esclusivo neurotropismo, unitamente all'eventualità che l'animale abbia potuto acquisire l'infezione per via transplacentare, oppure mediante l'ingestione di colostro e/o latte materni infetti.

P.19 PREVALENZA DI NOROVIRUS GI E GII IN MOLLUSCHI BIVALVI E VEGETALI COMMERCIALIZZATI IN ITALIA

Simona Di Pasquale (a), Enrico Pavoni (b), Dario De Medici (a), Marina Nadia Losio (b), Elisabetta Suffredini (a), Barbara Bertasi (b), Luciana Croci (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia*

I Norovirus (NoV) rappresentano una delle maggiori cause di gastroenteriti non batteriche riscontrate negli ultimi anni nei Paesi industrializzati, sebbene ci sia ancora ragione di credere che il loro numero sia sottostimato. In base alla sequenza nucleotidica della regione capsidica i NoV sono divisi in 5 genogruppi (GI, GII, GIII, GIV e GV), a loro volta suddivisi in diversi *cluster* o genotipi. Al genogruppo I, con 14 genotipi e al genogruppo II, con 17 genotipi, appartiene la maggior parte dei ceppi che infettano l'uomo. La trasmissione può avvenire per contatto "persona-persona" o attraverso il consumo di acqua o alimenti, tra cui particolare importanza rivestono i molluschi bivalvi e i vegetali. Nonostante le evidenze epidemiologiche, la vigente legislazione europea (Reg CE 1441/2007) non riporta criteri microbiologici per il controllo della contaminazione virale in tali prodotti alimentari. La disponibilità di metodi molecolari basati sia sulla PCR convenzionale (es. RT-*booster*-PCR) che sulla *real-time* PCR, ha però consentito di effettuare studi al fine di valutare la prevalenza di NoV GI e GII in tali tipi di alimenti. Vengono riportati i dati ottenuti da indagini effettuate su molluschi bivalvi prelevati all'importazione e al commercio. Inoltre, sono state effettuate due indagini per verificare le contaminazioni da NoV in vegetali. Di queste ultime, la prima è stata effettuata in Lombardia su campioni prelevati dal mercato, mentre la seconda nel Lazio su campioni provenienti da due Aziende dell'area Pontina distinte per tecnologia di stabilizzazione microbica (abbattimento criogenico e disinfezione con alogeni). Su un totale di 872 molluschi bivalvi prelevati al commercio il 6,4% è risultato contaminato, mentre all'importazione è stata riscontrata presenza di NoV nel 29,3% dei molluschi esaminati. Per quanto riguarda i prodotti vegetali, sono stati analizzati in Lombardia 297 campioni di cui 6 (2,02%) sono risultati positivi per NoV: su tre campioni è stata confermata la presenza di NoV GII/4. Nell'indagine effettuata nel Lazio sono stati analizzati 124 campioni suddivisi in 46 materie prime e 78 prodotti finiti ed analizzati entro la data di massima conservabilità. Tutti i campioni sono risultati negativi per la ricerca di Norovirus. I risultati ottenuti evidenziano la necessità di integrare la normativa comunitaria con criteri microbiologici relativi alla possibile contaminazione da virus in tali alimenti. Inoltre, è importante che il produttore, sia in caso di importazione che di produzione propria, tenga conto della possibilità di una contaminazione virale e migliori i propri programmi di autocontrollo al fine di commercializzare un prodotto sicuro.

INDAGINE SIEROLOGICA NEI CONFRONTI DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA CALICIVIRUS ST-VALERIEN-LIKE NEI SUINI

Federica Di Profio (a), Barbara Di Martino (a), Chiara Ceci (a), Antonio Lavazza (b), Ivano Massirio (c), Vito Martella (d), Fulvio Marsilio (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete, Università degli Studi, Teramo*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia*

(c) *Servizio Sanitario Regionale Emilia-Romagna, Azienda Unità Sanitaria Locale, Reggio Emilia*

(d) *Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università degli Studi Aldo Moro, Bari*

Nell'agosto 2009 un nuovo calicivirus, designato St-Valerien-like, è stato identificato in Canada, nelle feci di suini adulti asintomatici. L'analisi del genoma ha dimostrato che i calicivirus *St-Valerien-like* rappresentano un nuovo genere della famiglia *Caliciviridae*, con analogie sia con i virus del genere *Norovirus*, sia con i virus *Tulan-like* recentemente identificati nei primati. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la presenza di anticorpi specifici per virus *St-Valerien-like* nei suini in diverse fasi del ciclo produttivo (magroni, ingrasso e riproduttori) e in fase di macellazione, mediante l'impiego di una metodica ELISA ricombinante. L'antigene per l'ELISA è stato generato esprimendo nel sistema baculovirus la proteina capsidica, usando il virus *St-Valerien-like* 25A/ITA. A tal fine l'intero gene codificante per la proteina capsidica è stato inserito nel sito *Bam*H1 del vettore del baculovirus PrN16. Il vettore ingegnerizzato è stato co-transfettato con il DNA linearizzato del baculovirus AcNPV. La corretta espressione della proteina ricombinante e l'assemblaggio in VLP (*virus-like particles*) della proteina capsidica sono stati valutati mediante corsa elettroforetica in gel di acrilamide e visualizzazione delle frazioni purificate al microscopio elettronico a trasmissione. Le VLP sono state impiegate per l'allestimento di un sistema ELISA per valutare la presenza di anticorpi specifici per virus *St-Valerien-like* in 614 sieri di suino provenienti da allevamenti e stabilimenti di macellazione del centro e Nord Italia. Dei 614 sieri testati il 10,1% (62/614) è risultato positivo per la presenza di anticorpi specifici per virus *St-Valerien-like*. Esaminando la prevalenza anticorpale sulla base delle diverse classi di età, è stata evidenziata una significativa positività sierologica (12%, 42/340) nei soggetti di età superiore ai 10 mesi, dimostrata statisticamente con *Fisher's exact test* per $P < 0,05$, con titoli anticorpali compresi tra 1:50 e 1:800. I dati ottenuti dimostrano che le infezioni da calicivirus *St-Valerien-like* sono comuni nei suini. L'ELISA sviluppata in questo studio, oltre che permettere di raccogliere in modo veloce dati epidemiologici su questi nuovi calicivirus nei suini ed eventualmente in altre specie animali, potrebbe essere utilizzata come test sierologico in prove di infezione sperimentale.

TRANS-ATTIVAZIONE SITO SPECIFICA DEL PROMOTORE DELL'IL8 DA PARTE DEL PRODOTTO GENICO ORF50/RTA DI BOHV-4 NELLO STROMA ENDOMETRIALE BOVINO: UN PASSO AVANTI VERSO LA COMPrensIONE DEL RUOLO ENDOMETRITICO DI BOHV-4

Gaetano Donofrio, Antonio Capocéfalo, Valentina Franceschi, Sandro Cavarani, Simone Taddei, Clotilde Silvia Cabassi

Sezione di Malattie Infettive degli Animali, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Parma

Le infezioni post-parto dell'endometrio e le metriti rappresentano le più comuni cause di ritardo di concepimento ed infertilità che si riflettono in ingenti perdite economiche nella specie bovina. Queste patologie sono caratterizzate da un intenso stato flogistico dell'endometrio ed accompagnate dalla secrezione di diverse citochine e chemochine, fra le quali spicca l'Interleuchina 8 (IL8) che funziona da chemo-attrattore di granulociti nella sede endometriale. Infatti, l'infusione di IL8 nell'endometrio ricapitola in tutto e per tutto una endometrite. Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) è stato dimostrato possedere un tropismo estremamente spiccato nei confronti delle cellule endometriali bovine oltre ad essere un virus costantemente isolato in caso di endometrite post-parto. Nel presente lavoro è stata investigata la possibile correlazione fra presenza di BoHV-4, prodotti dell'espressione genica virale e produzione di IL8 nelle cellule infette.

Inizialmente è stato osservato che le cellule stromali dell'endometrio sono in grado di secernere IL8 in seguito all'infezione di BoHV-4 e che la produzione di IL8 da parte delle cellule infette da BoHV-4 era dipendente dalla trascrizione dei geni virali, in quanto il *crosslinking* tramite UV del genoma virale abrogava l'effetto.

Siccome il gene *Immediate Early 2 (IE2)* di BoHV-4, rappresenta il primo gene ad essere trascritto dai fattori di trascrizione della cellula ospite al momento dell'infezione e il prodotto di *IE2*, ORF50/Rta, è stato visto essere in grado di trans-attivare i geni della cellula ospite, tramite saggi di trascrizione utilizzando una serie di costrutti genici muniti di un gene reporter guidato dal promotore del gene dell'IL8, abbiamo evidenziato una regione di questo promotore sensibile alla trans-attivazione da parte di ORF50/Rta. La specificità di questa regione di ~135 bp è stata poi caratterizzata in termini di specificità ponendola a monte di un promotore non trans-attivabile da parte di ORF50/Rta, il risultato ottenuto è stato quello di ottenere la trans-attivabilità di detto promotore oltre che ad una dose dipendenza quando multimerizzato.

Questo lavoro rappresenta una prova diretta anche se *ex-vivo* sul coinvolgimento di BoHV-4 nell'eziopatogenesi della metrite post-parto del bovino.

IMMUNIZZAZIONE VERSO BTV-8 IN TOPI KNOCKOUT PER L'INTERFERONE α/β TRAMITE VP2 INGEGNERIZZATA IN BOHV-4- BASED VECTOR

Valentina Franceschi, Antonio Capocéfalo, Gaetano Donofrio
*Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi,
Parma*

In questi ultimi anni è emerso fortemente il problema di generare nuovi vaccini ricombinanti contro il virus della *Bluetongue* (BTV), un Orbivirus, appartenente alla famiglia dei *Reoviridae*, che causa patologie anche gravi negli ovini e che generalmente utilizza come serbatoio i ruminanti, domestici e selvaggi, nei quali causa spesso infezione asintomatica. In Europa hanno trovato ampia diffusione almeno 6 sierotipi virali, ma dal 2008 è emerso un fenotipo particolarmente aggressivo, in grado di generare patologia anche nei bovini, il sierotipo 8. In questo studio un vettore basato sul virus *Bovine Herpesvirus 4* (BoHV-4), clonato come cromosoma artificiale batterico (BAC), è stato ingegnerizzato per esprimere la glicoproteina immuno-dominante VP2 del virus della *Bluetongue* sierotipo 8 (BTV-8). La proteina VP2, che compone il capsido esterno del virus, insieme a VP5, è responsabile della sierotipicità ed è in grado di evocare nell'ospite la formazione di anticorpi neutralizzanti. L'intera ORF della proteina VP2 è stata da noi sub-clonata e al suo aminoterminale è stata provvista di un peptide segnale eterologo e a quello carbossilico del dominio trans membrana della proteina gD di BoHV-1 (IgK-VP2gDtm), al fine di permettere l'indirizzamento della proteina nella frazione legata alla membrana cellulare. Il virus ricombinante così ottenuto, BoHV-4-A-IgK-VP2gDtm, è stato utilizzato per immunizzare dei topi *knockout* per il recettore dell'interferone α/β , IFNAR $\alpha/\beta(-/-)$, per verificare se la proteina VP2 è in grado di conferire protezione nei riguardi di un *challenge* con BTV-8. Questi topi *knockout* rappresentano infatti un modello perfetto per lo studio di una patologia come la *Bluetongue*, come dimostrato in letteratura. In una prima fase è stata valutata la suscettibilità dei topi al virus BoHV-4, sia per via intraperitoneale che intracranica, verificando che gli animali si infettavano ma senza alcun tipo di segno clinico; ciò ha permesso di utilizzare il virus ricombinante che esprime la VP2 per immunizzare un gruppo di topi al fine di verificare se l'immunizzazione era in grado di garantire protezione nei confronti di un *challenge* con una dose letale di BTV-8. Gli animali vaccinati hanno sviluppato anticorpi siero neutralizzanti contro BTV-8 e, dopo il *challenge* hanno mostrato una viremia fortemente ridotta e un maggior tempo di sopravvivenza al virus stesso. Questi primi risultati ci hanno permesso quindi di affermare che BoHV-4 può essere utilizzato come veicolo efficiente e sicuro per il *delivery* di proteine ricombinanti di BTV.

P.20 INDAGINI SU UN EPISODIO DI ELEVATA MORTALITÀ IN TORTORA DAL COLLARE ORIENTALE (*STREPTOPELIA DECAOCTO*)

Matteo Frasnelli (a), Roberta Taddei (b) Elisabetta Raffini (a), Valentina Corazzari (a), Laura Fiorentini (b), Giovanni Tosi (b), Giorgio Fedrizzi (c), Roberto Piro (d), Antonio Lavazza (d), Daniela Gelmetti (d), Francesco Bonfante (e), Claudia Cotti (f), Luca Gelmini (g), Calogero Terregino (e), Maria Alessandra De Marco (h,i), Mauro Delogu (f)

(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Lugo di Romagna, Ravenna*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Forlì*

(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Bologna*

(d) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia*

(e) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

(f) *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università degli Studi, Ozzano dell'Emilia, Bologna*

(g) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Modena*

(h) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(i) *Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Ozzano dell'Emilia, Bologna*

Nelle prime due settimane di gennaio 2011, circa 3.000 carcasse di tortore dal collare (*Streptopelia decaocto*) a vita libera sono state rinvenute nei pressi di un sito industriale, in provincia di Ravenna, dedito alla lavorazione di partite di semi o loro residui.

L'esame autoptico di 322 soggetti evidenziava prevalentemente un grave danno renale, epatomegalia e ipoplasia splenica. Gli esami istologici a livello del rene mostravano nefrosi associata a necrosi tubulari e una nefrite interstiziale linfoplasmacellulare. Inoltre, si osservavano deplezione linfocitaria nella milza unitamente ad emosiderosi splenica ed epatica.

La stima dell'età su 46 soggetti identificava il 78% di adulti e il 22% di giovani (entro il primo anno di vita).

Le analisi chimiche sulle ingesta e su *pool* di fegati non evidenziavano tossicità da pesticidi clorurati e fosforati, carbammati, triazine, piretroidi, stricnina, neonicotinoidi, Pb, Cd, Cr, Hg, Zn, Cu, micotossine, perossidi.

Indagini molecolari (RT-PCR *Real-Time*) escludevano la presenza di virus influenzali, mentre veniva evidenziato RNA di Paramyxovirus aviario tipo 1 (APMV-1) tramite RT-PCR in 176 su 193 animali analizzati. L'isolamento di 27 ceppi di APMV-1 è stato ottenuto inoculando *pool* di organi su uova embrionate di pollo SPF. Tali ceppi risultavano patogeni in base alla sequenza aminoacidica del sito di clivaggio della proteina di fusione. Il sequenziamento parziale del gene F ha permesso di identificare 2 differenti genotipi co-circolanti: il lineaggio 4b (APMV-1 ceppo piccione) e un distinto *cluster* genetico del lineaggio 4.

L'immuno-elettromicroscopia eseguita, con un *pool* di 20 sieri prelevati a 40 giorni dall'insorgenza dell'episodio da tortore catturate nello stesso sito, su cervello, milza, fegato, rene e intestino di 15 soggetti deceduti all'inizio del focolaio è risultata negativa. Al contrario l'indagine ultramicroscopica ha evidenziato la presenza di particelle virali circovirus-like in 2 su 3 *pool* di tonsille ciecali degli stessi soggetti deceduti.

I titoli sierologici HI verso i seguenti tre ceppi di APMV-1: i) Ulster 2c; ii) 992/2011 (lineaggio 4b); iii) 1030/2011 (*cluster* distinto del lineaggio 4) -ceppi ii) e iii) isolati nel focolaio- sono stati ricercati in 8 tortore catturate all'inizio dell'episodio in fase preagonica (APMV-1 positive in RT-PCR) e in 20 soggetti catturati 40 giorni dall'insorgenza del focolaio, clinicamente sani e virologicamente negativi (tampone cloacale) per APMV-1. Le medie geometriche rilevate rispettivamente a inizio focolaio e dopo 40 giorni risultavano essere, verso i tre ceppi: i) 98,7 vs 46,9; ii) 1248,3 vs 93,7; iii) 445,7 vs 59,7.

Al momento, vari elementi quali l'elevata prevalenza di adulti colpiti, i titoli anticorpali più elevati nei soggetti malati rispetto ai clinicamente sani, l'assenza di sintomatologia nervosa classica riferibile a Malattia di Newcastle nelle tortore colpite, fanno supporre la presenza di un agente immuno-depressivo favorente l'infezione da APMV-1. Ulteriori indagini saranno finalizzate a stabilire se concause infettive (circovirus) o alimentari possano aver contribuito alla comparsa del quadro clinico osservato.

P.21 EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DELLA PESTE SUINA CLASSICA IN ITALIA: ANALISI RETROSPETTIVA

Monica Giammarioli, Elisabetta Rossi, Moira Bazzucchi, Giulio Severi, Gian Mario De Mia
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

La Peste Suina Classica (PSC) è ancora considerata una delle più importanti patologie del suino sebbene in Unione Europea, nel triennio 2008-2010, si siano verificati appena quattro focolai di malattia nei domestici. In Italia, l'ultimo focolaio di malattia è stato registrato nel 2003 in Sardegna. Scopo del presente studio è stato approfondire l'epidemiologia molecolare della PSC in Italia attraverso la caratterizzazione genetica di un numero rappresentativo di stipiti virali, opportunamente scelti sulla base delle loro caratteristiche spazio/temporali. Sono stati sottoposti ad analisi di sequenza 23 isolati virali PSC. Una porzione di 190 bp del gene che codifica per la glicoproteina E2 del genoma virale è stata amplificata mediante *nested* RT-PCR. Gli amplificati sono stati purificati e sequenziati direttamente su un ABI PRISM 3130, analizzando tre cloni indipendenti. L'allineamento del data set di sequenze è stato effettuato con ClustalX 2.0.11 e validate con Bioedit v.7.0.5.2. Ulteriori 43 sequenze di isolati PSC sono state ottenute dalla GenBank. L'analisi filogenetica è stata condotta complessivamente su 66 stipiti virali PSC, isolati lungo un arco temporale di 40 anni (1960-2000), includendo sequenze di riferimento rappresentative di tutti i genotipi, mediante il software PhyML v.2.4.4, secondo il criterio della massima verosimiglianza (ML). Il virus PSC è, nell'ambito del genere *Pestivirus*, il membro più stabile comprendendo solo tre gruppi genetici (genotipo 1, genotipo 2, genotipo 3) ciascuno dei quali suddiviso a sua volta in subgenotipi. In base ai nostri risultati, i virus circolati in Italia a partire dagli anni '60 appartengono ai subgenotipi 1.1 (n=15), 1.2 (n=1), 2.1 (n=4), 2.2 (n=21), e 2.3 (n=25). Il subgenotipo 1.1 comprende quasi esclusivamente isolati degli anni '60 e '70. Il subgenotipo 1.2 comprende lo storico stipite di riferimento Brescia che è circolato fino agli anni '60. Al genotipo 1, in linea di massima, appartengono virus circolati in Europa tra il 1920 e il 1970 oltre ai più noti vaccini vivi modificati che risalgono per lo più a quegli anni. Dopo il 1970, virus di questo genotipo sono stati isolati in Europa molto raramente. L'Italia rappresenta da questo punto di vista un'eccezione, poiché i virus circolati nel periodo 1977-1980 appartengono tutti al tipo 1.

La maggior parte dei virus isolati negli anni '80 e '90 sono del genotipo 2. In particolare, stipiti del tipo 2.3 sono circolati più precocemente a partire dagli anni '80. In Italia sono rappresentati in larga parte da virus provenienti dall'Italia centrale e dalla Sardegna. Stipiti dei tipi 2.1 e 2.2 sono prevalenti negli anni '90. Il 2.1 in particolare, è il tipo virale responsabile della devastante epizoozia olandese del 1997. Virus appartenenti a questo tipo sono stati isolati da focolai in Umbria, Campania e nella provincia autonoma di Bolzano. Per i primi due fu accertato un collegamento epidemiologico con l'Olanda. In conclusione, i risultati del presente studio hanno mostrato che in Italia, a partire dal 1960, si sono verificati ripetuti ed indipendenti eventi epidemiologici di PSC.

P.22 PRESENZA E DIFFUSIONE DEI VIRUS DELLE API NELLA REGIONE VENETO E IN ITALIA

Anna Granato (a), Lynn Laurenson (b), Franco Mutinelli (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

(b) The Food and Environment Research Agency, Sand Hutton, York, United Kingdom

Fino ad oggi poco si sapeva sulla presenza e diffusione dei virus delle api nella regione Veneto e, più in generale, nelle diverse Regioni italiane. Infatti, l'attenzione a questi possibili patogeni è stata limitata nel tempo. Questa carenza è stata colmata grazie al progetto Apenet, promosso e finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali, che ha permesso la creazione di una rete di monitoraggio nazionale la cui funzione è raccogliere informazioni sullo stato di salute delle famiglie di api che compongono i moduli di rilevamento (in linea di massima uno per ciascuna Regione e Provincia Autonoma e formati da 5 apiari di 10 alveari ciascuno), disposti nelle diverse realtà territoriali, attraverso periodici campionamenti di diverse matrici (api morte, api vive, covata, cera, polline) sottoposte successivamente ad analisi di laboratorio (chimiche, microscopiche, microbiologiche, biomolecolari). Per quanto riguarda i virus è stata indagata la presenza del virus delle ali deformi (DWV), della cella reale nera (BQCV), della covata a sacco (SBV), della paralisi acuta (APBV), della paralisi cronica (CBPV), del virus Kashmir (KBV), del virus israeliano della paralisi acuta (IAPV) e del virus iridescente (AIV). Per rilevare la presenza dei virus sopracitati nelle api raccolte nei diversi campionamenti è stata utilizzata, dopo estrazione del RNA, una *one-step Real-Time* RT-PCR con *primer* e sonda specifici per ciascuno dei virus da rilevare. I dati relativi al 2009 e, seppur ancora parziali, al 2010 evidenziano nella Regione Veneto, la presenza di BQCV, DWV, singolarmente o in combinazioni tra loro e/o con SBV, APBV, CBPV. BQCV è stato rilevato nell'80% dei campioni analizzati, DWV nel 63%, SBV nel 30%, APBV nel 3,3% come pure CBPV. Non è stata riscontrata la presenza di KBV, IAPV e AIV. Nel resto d'Italia, la situazione non è risultata molto diversa: BQCV, DWV, SBV sono diffusi in tutte le altre Regioni e, anche in questo caso, singolarmente o in diverse combinazioni tra loro e con APBV e/o con CBPV. Inoltre, in combinazione con altri virus, è stata rilevata la presenza di KBV solo in un apiario dell'Umbria e di IAPV soltanto in un modulo della Sardegna. Tutti i campioni analizzati sono risultati negativi ad AIV. Nei campioni analizzati la prevalenza dei singoli virus è del 70% per BQCV, 61% per DWV, 30% per SBV, 13% per APBV, 7% CBPV, 0,17% per KBV e IAPV. Questi risultati per la prima volta forniscono evidenza della presenza dei virus negli apiari italiani e della loro distribuzione geografica.

P.23 MAPPING DEI SITI ANTIGENICI DEL VIRUS AFTOSO TIPO ASIA 1 IN RELAZIONE AI SITI DESCRITTI IN ALTRI SIEROTIPI

Santina Grazioli, Francesca Fallacara, Emiliana Brocchi
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia

L'afta epizootica continua ad essere la malattia del bestiame più temuta nei Paesi indenni, a causa delle ingenti perdite economiche dirette e indirette che potrebbero essere subite in caso di introduzione. L'afta è endemica in gran parte dell'Africa, dell'Asia, del Medio Oriente e in alcuni Paesi dell'America Latina, mentre Nord e Centro America, Nuova Zelanda, Australia, Islanda e la maggior parte dell'Europa sono esenti.

I virus aftosi sono *picornavirus* classificati in sette sierotipi, ciascuno caratterizzato da grande variabilità intra-tipo; tra sierotipi diversi non si instaura cross-protezione. Le frequenti variazioni antigeniche causano continue difficoltà nel controllo della malattia, quindi la conoscenza della struttura antigenica dei virus aftosi ha, oltre ad un valore puramente scientifico, rilevanti ricadute pratiche.

Lo studio dei siti antigenici è stato sino ad ora applicato solo per i sierotipi O, A e C, ma è strategico estenderlo anche agli altri sierotipi Asia 1 e SAT 1-3. Il presente studio descrive la caratterizzazione e la mappatura di siti neutralizzanti nel sierotipo Asia 1, identificati con un pannello di anticorpi monoclonali (AcM), e le analogie con i siti descritti in altri sierotipi.

Gli AcM prodotti verso il sierotipo aftoso Asia 1 sono stati inizialmente caratterizzati utilizzando differenti saggi immuni, quindi gli AcM neutralizzanti sono stati utilizzati per la selezione e successiva sequenziatura di mutanti virali resistenti alla neutralizzazione (*escape mutants*): le sostituzioni aminoacidiche individuate nelle proteine strutturali hanno permesso di localizzare i siti antigenici.

Di 24 AcM prodotti, dieci hanno dimostrato attività neutralizzante l'infettività virale. Il profilo di reattività degli *escape mutants* selezionati con i dieci AcM neutralizzanti ha evidenziato quattro siti antigenici indipendenti. Paragonando le sequenze aminoacidiche degli *escape mutants* e del virus parentale sono stati mappati gli aminoacidi cruciali per i rispettivi quattro siti antigenici nelle seguenti posizioni: VP1 142 (corrispondente al *loop* superficiale della VP1, noto come sito 1), VP2 67-79 (sito 2), VP3 58/59 (sito 3), VP3 218 (sito 4). I siti denominati 1, 2 e 3 sono stati descritti anche nei sierotipi O, A and C, rafforzando l'evidenza che queste sono regioni antigeniche dominanti nella struttura del virus. Il sito localizzato nella parte C-terminale della VP3 è un nuovo sito indipendente, descritto per la prima volta nei virus aftosi.

Gli AcM hanno confermato la straordinaria potenzialità per far luce nella struttura e nella antigenicità dei virus. Una approfondita conoscenza della struttura antigenica e la disponibilità di AcM ben caratterizzati trova utili applicazioni anche nel disegno di test diagnostici funzionali, nello studio della evoluzione antigenica dei virus aftosi e nella selezione di appropriati ceppi vaccinali.

P.24 ANALISI BIOMOLECOLARE DI CEPPI DI CANINE DISTEMPER VIRUS (CDV) IN FURETTI DOMESTICI (MUSTELA PUTORIUS FURO)

Annalisa Guercio, Giuseppa Purpari, Francesco Mira, Patrizia Di Marco, Vincenza Cannella, Michele Chetta, Vincenzo Aronica, Vincenzo Di Marco Lo Presti
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia A. Mirri, Palermo

L'agente eziologico del cimurro (CDV) appartiene alla famiglia *Paramyxoviridae*, genere *Morbillivirus* ed è causa di una patologia infettiva e contagiosa in canidi, mustelidi e procionidi. Gli autori, descrivono un caso clinico di cimurro in due furetti domestici vaccinati con un ceppo Onderstepoort avianizzato e la caratterizzazione biomolecolare del CDV isolato. I furetti presentavano un quadro clinico caratterizzato da dermatite pruriginosa e squamo-purulenta, alla regione del mento, peri-labiale, peri-vulvare ed al condotto uditivo esterno. I soggetti venivano a morte tre settimane dopo l'esordio dei sintomi. I campioni di croste prelevati sono stati sottoposti ad estrazione degli acidi nucleici ed analizzati mediante RT-PCR per CDV. È stata effettuata l'analisi con enzimi di restrizione (RFLP-PCR) di conferma, per discriminare i ceppi vaccinali dai ceppi di campo. I prodotti di amplificazione sono stati purificati e sottoposti a sequenziamento. Le sequenze di 1823 nt del gene H del CDV sono state comparate mediante *Clustal X* con analoghe sequenze di ceppi di campo e ceppi vaccinali disponibili su *GeneBank*. Sulla base dei dati ottenuti le sequenze sono risultate appartenenti al *lineage* Europa, ben segregato dal *lineage* America-1, che raccoglie i principali ceppi vaccinali avianizzati, e differente dal *cluster* dei ceppi *Rockborn-like*. Il sequenziamento ha confermato il risultato ottenuto con la RFLP-PCR e la mancanza di relazione con il ceppo vaccinale inoculato. Le due sequenze ottenute, presentando un'omologia nucleotidica elevata per ceppi isolati da cani in Italia, sono risultate differenti dal *lineage* *Wildlife*. Nel furetto l'infezione da cimurro ha un esito fatale quasi nel 100% dei casi e viene controllata attraverso l'uso di vaccini. Questo lavoro rappresenta un contributo alla esigua disponibilità bibliografica in merito alle infezioni da CDV nei mustelidi ed implementa i dati disponibili sui ceppi virali circolanti. Il metodo diagnostico descritto rappresenta un sistema rapido e sensibile per la diagnosi dell'infezione da cimurro.

P.25 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI NOROVIRUS GENOGRUPPI I, II, E IV IDENTIFICATI IN REFLUI URBANI IN ITALIA

Giuseppina La Rosa, Marcello Iaconelli, Marta Fratini, Valentina Spuri Vennarucci,
Michele Muscillo

*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità,
Roma*

I Norovirus (NoV) sono importanti patogeni gastroenterici nell'uomo, responsabili sia di casi sporadici che di episodi epidemici, soprattutto in contesti comunitari. Sono suddivisi in 5 genogruppi (GI-GV); GI, GII e GIV comprendono i NoV umani mentre GIII e GV comprendono i norovirus bovini e murini.

In tutto il mondo i NoV sono responsabili di circa la metà dei casi di gastroenterite e di oltre il 90% delle epidemie di gastroenterite non batterica. In questi ultimi anni si è registrato un notevole incremento delle epidemie da NoV in Europa e negli USA, accompagnato dalla emergenza di nuove varianti. Considerata la rilevanza assunta in questi ultimi anni, in ambito internazionale sono stati avviati sistemi di sorveglianza per le infezioni da NoV allo scopo raccogliere informazioni sugli agenti patogeni e sul loro grado di diffusione tra la popolazione umana. Per quanto riguarda l'Italia, le informazioni epidemiologiche sono scarse e di conseguenza il fenomeno delle gastroenteriti da norovirus è molto probabilmente sottostimato.

Nel biennio 2008-2009 è stato condotto uno studio epidemiologico-molecolare sulle acque reflue di 11 città italiane per monitorare la circolazione ambientale dei norovirus nell'ambito del progetto "Diagnostica virale rapida in liquami. Sorveglianza sanitaria di virus enterici attraverso campionature codificate di liquami urbani", finanziato dal Centro Nazionale per la prevenzione e il controllo delle malattie. Per ciascun sito sono stati prelevati mensilmente 250 ml di liquame e 250 ml di acqua depurata in uscita dell'impianto di trattamento, per un totale di 230 campionamenti. Un calicivirus felino a concentrazione nota è stato utilizzato come controllo interno. Sono state utilizzate due diverse PCR di tipo *nested* per l'identificazione dei due principali genogruppi di NoV (GI e GII): una a largo spettro, nella regione codificante per la polimerasi, in grado di amplificare contemporaneamente GI e GII e una genogruppo-specifica nella regione codificante per il capsido. È stata inoltre effettuata la ricerca per il genogruppo IV, mediante due PCR specifiche di tipo *nested*, nell'ORF1 e nell'ORF2. I risultati hanno evidenziato l'ampia circolazione dei NoV e la loro elevata variabilità genetica. In totale il 75% dei campioni è risultato positivo, con una prevalenza di NoV GI. Tutti i prodotti PCR dei campioni positivi sono stati sequenziati per la caratterizzazione del genotipo virale. Sono stati identificati 3 genotipi nel genogruppo I (GI/4, GI/2, GI/5), e 4 nel genogruppo II (GII/b, GII/4, GII/6 e GII/7). È stato inoltre identificato un NoV GII/11, genotipo tipico dei suini. Ceppi di GIV.1 sono stati identificati nell'8% dei reflui urbani.

La sorveglianza ambientale rappresenta un importante strumento complementare alle indagini epidemiologiche classiche per lo studio della circolazione dei virus nella popolazione.

P.26 BUHV-1 E BOHV-1: UTILIZZO DI ANTICORPI MONOCLONALI NELLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE

Davide Lelli (a), Roberta Fontana (a), Ana Moreno Martin (a), Daniela Gamba (a), Elena Canelli (a), Emiliana Brocchi (a), Stefano Nardelli (b), Paolo Cordioli (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

Il virus erpetico del bufalo, *Bubaline herpes virus-1 (BuHV-1)* è strettamente correlato al virus della Rinotracheite infettiva del bovino, *Bovine herpes virus-1 (BoHV-1)*.

Diversi studi basati su indagini sierologiche e virologiche descrivono la circolazione di entrambe le infezioni nel bufalo mentre la sensibilità del bovino per BuHV-1 è stata dimostrata solo sperimentalmente. Nelle aree ad allevamento misto bovino e bufalino, con co-circolazione dei due α -herpesvirus, l'attribuzione eziologica delle infezioni può essere difficoltosa a causa della cross-reattività antigenica tra i due virus. Quanto detto assume particolare importanza nell'ambito di programmi di eradicazione per BoHV-1. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di produrre e caratterizzare anticorpi monoclonali (MAbs) nei confronti di BuHV-1 e di verificarne il possibile utilizzo nella diagnosi differenziale con BoHV-1.

Per la produzione dei MAbs anti-BuHV-1 è stato utilizzato il ceppo di campo 1684 isolato in Veneto da un allevamento bufalino. Lo *screening* è stato eseguito mediante immunofluorescenza su cellule MDBK infettate con il virus omologo e con BoHV-1 selezionando in questa fase i MAbs specifici per BuHV-1 ed escludendo quelli cross-reattivi. La reattività dei MAbs e la loro specificità è stata successivamente confermata tramite immunoperossidasi testando in parallelo ogni MAbs su monostrati cellulari infettati con differenti herpesvirus: BuHV-1, BoHV-1.1, BoHV1.2, BoHV-1 gE deleto (ceppo vaccinale), BoHV-5, CpHV-1, BoHV-2 e BoHV-4.

La reattività dei MAbs BuHV-1 specifici selezionati durante la fase di *screening*, si sono confermati negativi nei confronti di BoHV1.1 e BoHv1.2, ma la maggior parte ha evidenziato reattività crociata con 3 ceppi di riferimento di BoHV-5, descritto come strettamente correlato al BuHV-1, ma mai isolato in Italia. Nessuna reattività è stata evidenziata verso gli altri herpesvirus testati. I MAbs selezionati, unitamente a quelli precedentemente prodotti nei confronti di BoHV-1, possono essere utilizzati in laboratorio per identificare e differenziare rapidamente gli isolati di virus erpetici dei ruminanti. Sono in corso saggi ELISA competitiva con sieri sperimentali bufalini e bovini per valutare il possibile utilizzo degli stessi MAbs nella diagnosi sierologica di BuHV-1 e BoHV-1 discriminando tra le due infezioni.

PROPAGAZIONE DEL VIRUS DELL'INFLUENZA AVIARE IN DIFFERENTI SUBSTRATI BIOLOGICI E ACCERTAMENTO DELLE CARATTERISTICHE GENETICHE

Tina Lombardo, Leonardo James Vinco, Riccardo Villa, Silvia Dotti, Guerino Lombardi,
Maura Ferrari

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia

Il sistema biologico d'elezione impiegato per l'isolamento e la coltivazione del virus dell'Influenza è rappresentato dall'embrione di pollo. Tuttavia, nonostante l'elevata sensibilità, il ricorso a tale substrato oltre che indaginoso e costoso è strettamente correlato alla disponibilità di uova embrionate che, nel caso di eventi epidemici o pandemici, potrebbe non essere prontamente disponibile. Al fine di ovviare a tale inconveniente, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) auspica il ricorso a sistemi alternativi, quali le colture cellulari. Obiettivo del presente studio è stato quello di valutare le caratteristiche biologiche e genetiche di differenti biotipi del virus dell'Influenza aviare, amplificati serialmente utilizzando quali substrati sia embrioni di pollo SPF (*Specific Pathogen Free*) che tre tipi di colture cellulari: NSK (*Newborn Swine Kidney*), MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*), UMNSAH/DF1 (*Chicken embryo fibroblasts*). I sottotipi di virus selezionati erano rappresentati da: H5N1 LPAI A/mallard/Italy/3401/05, H5N2 HPAI A/chicken/Italy/8/A98, H7N1 HPAI A/turkey/Italy/4580/99, H7N3 LPAI A/turkey/Italy/2962/V03, H9N2 LPAI A/turkey/Wisconsin/66, forniti dall'Istituto Zooprofilattico delle Venezie. La maggior parte dei biotipi è risultata in grado di replicare, già dal primo passaggio, sui tre tipi di colture cellulari con induzione di effetto citopatico (ECP), tranne il biotipo H9N2 LPAI A/turkey/Wisconsin/66 che non ha presentato alcuna replicazione nella linea cellulare UMNSAH/DF. I primi ed ultimi passaggi eseguiti sui sistemi biologici selezionati (embrioni di pollo e colture cellulari), sono stati sottoposti a sequenziamento per le regioni genomiche codificanti l'emoagglutinina, la neuraminidasi e la proteina non strutturale NS1, al fine di rilevare mutazioni conseguenti all'amplificazione seriale. L'eventuale variazione di patogenicità, invece, è stata valutata mediante prove *in vivo* condotte su polli SPF di 10 settimane di vita inoculati per via endovenosa, al fine di valutare l'indice di patogenicità. Tale parametro non ha rilevato differenze significative fra gli animali inoculati con i biotipi virali coltivati sia sulle colture cellulari che nell'embrione di pollo. Le indagini perseguite hanno rilevato come le colture cellulari possano rappresentare un valido sistema alternativo all'embrione di pollo, per l'amplificazione del virus dell'Influenza aviare. Tali sistemi non inducono alterazioni delle caratteristiche genetiche e biologiche dei virus e rappresentano un sistema biologico prontamente disponibile in caso di emergenza sanitaria.

P.27 IDENTIFICAZIONE DI ORTHOREOVIRUS IN POLMONI DI CAMOSCI

Camilla Luzzago (a), Antonio Lavazza (b), Giuliano Pisoni (a), Roberto Viganò (a),
Martina Besozzi (a), Paolo Cordioli (b), Giuseppe Sironi (a), Paolo Lanfranchi (a)

(a) *Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università
degli Studi, Milano*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia*

Gli orthoreovirus sono RNA virus della famiglia *Reoviridae* che infettano numerose specie di vertebrati. Nei mammiferi, l'ampio spettro d'ospite comprende l'uomo e potenzialmente tutte le specie, in cui la maggior parte delle infezioni evolve in modo asintomatico, ovvero con una lieve sintomatologia respiratoria o enterica. La presente indagine è stata condotta in camosci (*Rupicapra r. rupicapra*) abbattuti nell'autunno del 2009 nel Comprensorio Alpino di Caccia VCO2 (VB). Nel corso degli accertamenti biometrici, effettuati entro la stessa giornata di abbattimento, sono stati prelevati tamponi per isolamento virale da polmoni di 22 soggetti giovani, di cui 19 al secondo anno di vita (*yearling*) e 3 di 2 anni. Il prelievo è stato effettuato a livello di lobo apicale o, se presenti, a margine di lesioni macroscopiche di polmonite. I campioni sono stati conservati presso il centro di controllo a -20°C per un periodo di 15-20 gg. e quindi stoccati a -80°C fino alla processazione, avvenuta entro 6 mesi dal prelievo. I tamponi sono stati inoculati in coltura cellulare di rene bovino (MDBK ATCC CCL-22), per 3 passaggi successivi di 6 gg ciascuno, per evidenziare l'eventuale presenza di virus con effetto citopatico (CPE). A 4 gg. dal 2° passaggio il tappeto cellulare presentava CPE in 2 campioni ed in un altro campione al 3° giorno del 3° passaggio. Il criolisato delle colture cellulari infette è stato sottoposto ad esame in microscopia elettronica, evidenziando la presenza di particelle virali caratterizzate da morfologia sovrapponibile e riconducibile a reovirus. I campioni, sottoposti a RT-PCR specifica per un tratto genomico conservato negli orthoreovirus dei mammiferi (MRV), sono risultati positivi. Il successivo sequenziamento ha confermato la presenza di MRV con sequenze identiche. I soggetti positivi, 2 femmine ed un maschio *yearling* abbattuti nel mese di settembre, non presentavano lesioni polmonari a livello macroscopico. Nel complesso fra tutti i soggetti sottoposti a prelievo, 5 presentavano lesioni riconducibili a bronco-polmonite verminosa ed uno a bronco-polmonite e pleurite fibrinosa sub-acuta.

Ad oggi non risultano segnalazioni di MRV nel genere *Rupicapra*. Il camoscio e altre specie di bovidi selvatici sono soggette a focolai di forme respiratorie con pesanti ripercussioni a livello demografico. Nell'area di studio, non sono stati segnalati episodi clinici nell'anno di prelievo e nei precedenti, d'altra parte la multifattorialità che caratterizza le forme respiratorie nei bovidi sottolinea l'opportunità di approfondimenti diagnostici ed epidemiologici.

RUOLO DELLE VARIANTI V37, H154, D145, Q211, Q168, K222 E P240 DEL GENE *PRNP* IN CAPRE INOCULATE SPERIMENTALMENTE CON ISOLATI DI SCRAPIE OVINA CLASSICA

Caterina Maestrale (a), Giovanna Maria Cancedda (a), Franca Demontis (a), Antonello Carta (b), Stefania Sechi (b), Cinzia Santucciu (a), Mariangela Saba (a), Maria Pina Vargiu (a), Paola Melis (a), Maria Bernadetta Ibba (a), Ciriaco Ligios (a)

(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari*

(b) *Research Uni, Genetics and Biotechnology, DIRPA-AGRI, Olmedo, Sassari*

Numerose osservazioni di campo e studi caso-controllo indicano che, anche nella capra, il gene della proteina prionica (*Prnp*) gioca un ruolo importante nella patogenesi della scrapie. Tuttavia, in questa specie, la completa conoscenza delle associazioni tra varianti geniche di *Prnp* e la resistenza/suscettibilità alla malattia necessita di ulteriori approfondimenti. Rimane infatti ancora da verificare se alcuni codoni polimorfici del gene caprino, a cui è stato correlato il carattere di suscettibilità/resistenza alla scrapie, modulino nella identica maniera la comparsa della malattia qualora questa sia determinata da ceppi eterologhi, quali quelli ovini, verso i quali le capre risultano sensibili.

Per questo scopo, 32 capretti di 4 o 5 mesi sono stati inoculati oralmente con omogenato di cervello proveniente da pecore ARQ/ARQ_{wildtype} clinicamente affette da scrapie. I capretti avevano alcuni genotipo *wildtype*, mentre altri presentavano 1 o 2 mutazioni. Come controllo, 11 agnelli ARQ/ARQ_{wildtype} e 3 con la mutazione N176K sono stati oralmente infettati con lo stesso omogenato. A 15 mesi di età le capre e le pecore sono state inseminate mediante monta naturale rispettivamente con un becco *wildtype* ed un ariete con le mutazioni L141F e N176K. Al momento del parto, da entrambi i gruppi, sono state raccolte le placente, che sono state successivamente esaminate mediante *Western blotting* per la ricerca di proteina prionica patologica (PrP^{Sc}). Tutti i caprini *wildtype* e quelli con una o due delle seguenti mutazioni: G37V, Q168Q e S240P, hanno manifestato clinicamente la scrapie dopo un periodo di incubazione medio rispettivamente di 712 (DS±80) e 725 (DS±36) giorni. Le capre con le mutazioni R154H e Q211R si sono ammalate dopo un periodo di incubazione più lungo (989 giorni, DS±72). A 1.062 giorni *post inoculum* tutti i capi che presentavano i dimorfismi D145D, H154H, P168Q, Q222K risultano ancora clinicamente sani. Tutti gli agnelli con genotipo ARQ/ARQ_{wildtype} si sono infettati con un tempo di incubazione di 600 (DS±20) giorni.

Delle placente caprine esaminate, solo una con genotipo *wildtype* è risultata positiva per PrP^{Sc}. Al contrario, in tutte le placente ovine *wildtype* è stata rilevata PrP^{Sc}.

I risultati ottenuti sembrano dimostrare che la comparsa della scrapie nelle capre esposte ad isolati ovini è regolata dalle stesse varianti geniche che modulano la malattia determinata da isolati caprini. Inoltre, come negli ovini, anche nei caprini *Prnp* regola la deposizione di PrP^{Sc} nella placenta, anche se quest'organo sembra giocare un ruolo minore nella trasmissione della scrapie in questa specie.

RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE E IN ALLEVAMENTI SUINICOLI DEL SUD ITALIA

Ester Maione (a), Ilaria Di Bartolo (b), Eleonora Ponterio (b), Nicole Pavio (c), Franco Maria Ruggeri (b)

(a) *Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi Federico II, Napoli*

(b) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *ANSES, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Paris, France*

Il virus HEV (Hepatitis E, ssRNA) è l'agente eziologico dell'epatite E, una forma acuta di epatite infettiva, diffusa nei Paesi in via di sviluppo. Negli ultimi anni, un certo numero di casi sporadici è stato descritto anche nei paesi industrializzati, Europa inclusa. In Italia, HEV umano è stato isolato per la prima volta nel 1999, mentre l'infezione nel suino è stata riportata nel 2006. Dei casi umani di epatite E, in Giappone e in Corsica, sono stati attribuiti al consumo di carne cruda o inadeguatamente cotta proveniente da animali HEV positivi. Ad oggi la malattia è considerata una zoonosi emergente e il suino il serbatoio asintomatico del virus. In questo studio è stata investigata la presenza dell'infezione di HEV in 11 allevamenti suinicoli del Sud Italia dislocati nelle aree di Napoli, Benevento, Foggia e Potenza. Sono stati raccolti 101 campioni fecali, sotto forma di *pool*, da animali di età compresa tra 2 ed 8 mesi. Inoltre, dieci campioni di fegato e 13 campioni di siero sono stati raccolti da animali in fase di macellazione, provenienti da uno degli allevamenti studiati. L'analisi è stata effettuata mediante sintesi di cDNA e PCR per i campioni fecali e di fegato e mediante *Western Blotting* per i campioni di siero. I risultati hanno mostrato una prevalenza del 79,2% per i campioni fecali, del 30% per i campioni di fegato. Inoltre, la ricerca di anticorpi contro HEV, ha dato una positività del 69,2%, confermando la diffusa circolazione del virus. Per alcuni amplificati virali, è stata condotta analisi di sequenza, che ha mostrato un elevato grado di omologia dei ceppi di HEV identificati negli allevamenti del Sud Italia con ceppi suini ed umani di origine europea. Infine, la positività elevata riscontrata negli allevamenti analizzati è in linea con quanto descritto in altre parti di Italia, confermano inoltre che la fascia di età analizzata, è quella maggiormente colpita dall'infezione.

P.28 ANEMIA INFETTIVA EQUINA IN UMBRIA: SITUAZIONE EPIDEMIOLOGICA 2007-2009

Carmen Maresca, Eleonora Scoccia, Gina Biasini, Laura Faccenda, Jacopo Zema, Silva Costarelli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

L'Anemia Infettiva Equina (AIE) è una malattia sostenuta da un lentivirus che colpisce tutti gli equidi; gli animali infetti possono rimanere portatori sani per tutta la durata della loro vita. Alcune specie di Ditteri Tabanidi e Muscidi sono vettori meccanici del virus.

Dal 2007 è attivo in Italia un piano di sorveglianza che prevede il controllo, tramite esame sierologico, di tutti gli equidi di età superiore a tre mesi nel 2007, superiore a sei mesi negli anni seguenti.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare i risultati del piano (dal 2007 al 2009) in Umbria e gli eventuali fattori di rischio associati all'infezione rilevati tramite la scheda di accompagnamento dei campioni.

È stata stimata la prevalenza annuale di sieropositività di capi e di allevamenti con un livello di confidenza del 95% (L.C.95%); tramite l'analisi univariata sono stati valutati alcuni fattori di rischio considerando significativi quelli con un $p\text{-value} \leq 0,05\%$ calcolato con il test Chi-quadrato di Pearson e il test esatto di Fischer; le variabili sono state inserite in tre modelli logistici con il metodo *backward* (uno per ogni anno di attività del piano).

Nel 2007 la sieroprevalenza dei capi è stata dello 0,27% (18/6773), nel 2008 è stata dello 0,38% (30/7940) e nel 2009 è stata dello 0,18% (21/11666). La sieroprevalenza di allevamento è stata dell'1,1% nel 2007 (13/1.197), nel 2008 è stata dell'1,2% (18/1.451) e nel 2009 dello 0,7% (17/2.392).

È stata evidenziata un'associazione statisticamente significativa per i muli (2007:OR=23 L.C.95%8-67, 2008:OR=21 L.C.95%10-44, 2009:OR=19 L.C.95%8-45), per alcune fasce di età degli animali: oltre 13 anni nel 2007 (OR=7 L.C.95%1-67); da 6 a 13 anni nel 2008 (OR=9 L.C.95%2-39) e per il periodo di prelievo nel 2007: luglio-settembre (OR=25 L.C.95%3-194). I modelli logistici confermano, nel 2007, le variabili significative mentre nei modelli riferiti ai dati del 2008 e del 2009 rimane statisticamente significativa solo la categoria "mulo".

I dati umbri di sieroprevalenza pur evidenziando un *trend* in diminuzione rimangono sopra la media nazionale, per cui, nel 2010, l'attività di controllo prevista dal piano in Umbria, nel Lazio, in Abruzzo e nel Molise, rimane annuale diventando, invece, biennale nelle restanti Regioni. Un fattore di rischio evidenziato dalle indagini epidemiologiche e che potrebbe spiegare il tasso di sieroprevalenza umbro è l'uso di pascoli comuni. L'associazione significativa tra il mulo e l'infezione è un dato confermato a livello nazionale probabilmente legato al tipo di attività lavorativa degli animali.

P.29 INDAGINE QUALI-QUANTITATIVA SULLE CELLULE FOLLICOLARI DENDRITICHE RESIDENTI NELLE PLACCHE DEL PEYER ILEALI IN OVINI DI RAZZA SARDA

Giuseppe Marruchella (a), Ciriaco Ligios (b), Giovanni Di Guardo (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Università degli Studi, Teramo*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari*

Le Placche del Peyer (PP) svolgono un ruolo chiave nella patogenesi della scrapie ovina. La proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) si accumula precocemente nelle PP, in corrispondenza di macrofagi e cellule follicolari dendritiche (FDC). Nei ruminanti, le PP ileali fungono da organi linfatici primari e vanno incontro ad involuzione al raggiungimento della maturità sessuale.

Nel presente lavoro sono state valutate quali-quantitativamente le FDC residenti nelle PP ileali in relazione all'età, al genotipo ed all'infezione sostenuta dall'agente della scrapie in ovini di razza Sarda.

Sono stati studiati 30 animali: 12 agnelli, 12 adulti e 6 ovini affetti da scrapie naturale. Le FDC sono state messe in evidenza in immunistochemica ed immunofluorescenza indiretta. La quantificazione delle FDC è stata eseguita mediante analisi di immagine e i dati ottenuti sono stati sottoposti ad elaborazione statistica. Il numero medio di follicoli linfatici per sezione tessutale è stato pari a 15 negli adulti e a 65 negli agnelli. La trama delle FDC è risultata più fitta e significativamente più estesa negli agnelli, i cui follicoli mostravano costantemente una rete di FDC che giungeva a ridosso dei vasi linfatici e della *dome area*. Negli adulti circa 1/3 dei follicoli mancava di una trama di FDC chiaramente visibile, mentre nei restanti casi le FDC disegnavano una rete meno estesa e dall'aspetto più "grossolano".

Il genotipo e la presenza di depositi di PrP^{Sc} non influenzavano significativamente la distribuzione delle FDC. Non era altresì possibile rilevare la presenza di FDC nel contesto dei numerosi microgranulomi osservati in sede intra-follicolare. Da notare che le FDC condividono alcuni antigeni con le cellule enterogliali e con le fibre nervose che decorrono nei villi e a ridosso dell'epitelio follicolo-associato, pure colonizzati dall'agente della scrapie. L'involuzione età-dipendente delle PP ileali e le contestuali modificazioni a carico delle FDC potrebbero giustificare, infine, la ridotta suscettibilità degli ovini adulti nei confronti della scrapie a seguito d'infezione *per os*.

P.30 NUOVO CALICIVIRUS (VESIVIRUS) NEI CANI

Vito Martella (a), Eleonora Lorusso (a), Arianna Radogna (a), Anna L. Bellacicco (a), Barbara Di Martino (b), Vittorio Larocca (a), Pierfrancesco Pinto (a), Cristiana Catella (a), Nicola Decaro (a), Canio Buonavoglia (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università degli Studi Aldo Moro, Bari*

(b) *Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Università degli Studi, Teramo*

I vesivirus, famiglia *Caliciviridae*, sono importanti patogeni in diverse specie di mammiferi terrestri e acquatici. Come prototipi di questo genere sono annoverati il calicivirus felino, il virus dell'esantema vescicolare del suino ed il virus del leone marino di San Miguel. Il vesivirus del cane, ceppo 48, fu identificato per la prima volta in Giappone nel 1990, analizzando le feci di un cucciolo di due mesi con diarrea acquosa intermittente. Anticorpi per questo virus sono stati identificati nei sieri di cani in Giappone e Korea. Tuttavia, le informazioni epidemiologiche sono tuttora limitate. In questo studio, utilizzando diversi set di *primer*, l'RNA dei vesivirus è stato rilevato con elevata frequenza (57/88, 64,8%) in tamponi rettali di cani ospitati in quattro canili. All'opposto, vesivirus sono stati identificati solo nell'1% (2/183) dei cani ricoverati con sintomatologia gastroenterica e nel 3,5% (4/114) dei cani asintomatici. L'intero genoma di un vesivirus del cane, lo stipite Bari/212/07/ITA, è stato sequenziato. Il virus possiede tre distinte *open reading frame* (ORF), che codificano per una poliproteina di 1931 aminoacidi (aa) (ORF1), per la proteina del *capside* di 631 aa (ORF2) e per una piccola proteina capsidica, di 134 aa (ORF3). L'omologia tra il virus Bari/212/07/ITA ed il virus prototipo 48 è pari al 71,0% a livello nucleotidico (nt) nell'intero genoma. Curiosamente, il virus Bari/212/07/ITA presenta più elevata omologia (89-90% nt) nei confronti di alcuni vesivirus identificati ripetutamente come contaminanti di cellule CHO (cellule ovariche di criceto) in casi distinti verificatisi in USA ed Europa fra il 2003 e il 2009. Tali cellule sono largamente impiegate dalle industrie farmaceutiche per produrre peptidi ricombinanti e la loro contaminazione accidentale con vesivirus ha suscitato preoccupazioni per gli eventuali riflessi sulla salute dei consumatori. L'epidemiologia ed il potenziale patogeno dei vesivirus nel cane e in altre specie animali meritano attenzione in quanto, come visto in questo studio, essi possono contaminare in modo massivo alcuni ambienti, quali i canili.

P.31 IDENTIFICAZIONE DI ASTROVIRUS NELLE FECI DI CONIGLI

Vito Martella (a), Paschalina Moschidou (a), Pierfrancesco Pinto (a), Eleonora Lorusso (a), Costantina Desario (a), Vittorio Larocca (a), Antonio Lavazza (b), Canio Buonavoglia (a)
(a) Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università degli Studi Aldo Moro, Bari
(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia

Gli Astrovirus (AstV) (famiglia *Astroviridae*) sono piccoli virus di forma sferica privi di envelope comunemente identificati nelle feci di diverse specie animali (mammiferi e specie aviari) e solitamente associati a forme enteriche. Mediante *screening* in RT-PCR con *primer* universali per AstV, una nuova specie AstV è stata identificata nelle feci e in tamponi rettali di conigli con patologie enteriche ed in conigli asintomatici. La porzione 3' del genoma di un ceppo AstV (3.5 kb) è stata sequenziata in un tratto comprendente la parte terminale della *Open Reading Frame* (ORF) 1b, l'intera ORF2 e la regione non codificante 3' fino alla coda poliadenilica. A livello del precursore del *capside* (ORF2), il virus è risultato correlato (19,3-23,7% di identità amminoacidica) ad altri AstV dei mammiferi nel genere *Mamastrovirus*. Utilizzando *primer* e sonde specifiche, disegnati in un tratto molto conservato della regione ORF1b, in *Real-Time* RT-PCR l'AstV del coniglio è stato rilevato nel 43,49% dei conigli in focolai di malattia enterica e nel 17,98% dei soggetti asintomatici. Inoltre, il valore medio e mediano dei titoli GE (Genoma Equivalenti) riscontrato negli animali positivi è risultato 102 e 103 volte maggiore, rispettivamente, negli animali sintomatici rispetto a quelli asintomatici, suggerendo che negli animali con sintomi enterici AstV può essere eliminato a titoli molto più elevati. L'osservazione al microscopio elettronico dei campioni AstV-positivi non è tuttavia riuscito a rivelare particelle virali riconducibili ad AstV dal punto di vista morfologico, anche nel caso di titoli GE molto elevati. Questi risultati indicano che gli AstV sono comuni nei conigli e che possono facilmente rimanere occulti in indagini di microscopia elettronica. L'inclusione di AstV negli algoritmi diagnostici delle malattie enteriche del coniglio sarà utile al fine di ottenere maggiori informazioni sull'epidemiologia e il potenziale ruolo patogeno di questi nuovi virus enterici.

EPATITE E NEI CINGHIALI, RISULTATI DI DUE ANNI DI SORVEGLIANZA SIEROLOGICA E VIROLOGICA

Nicola Martinelli, Giulia Pezzoni, Mario Chiari, Lidia Stercoli, Roberta Fontana, Enrico Pavoni, Guerino Lombardi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia

Il virus dell'epatite E (HEV) è responsabile di epatite acuta autolimitante nell'uomo, ad andamento sporadico nei Paesi industrializzati. HEV è stato identificato in diversi animali, fra i quali il suino ed il cinghiale. In Giappone, è stata accertata ed ampiamente documentata la trasmissione dell'infezione all'uomo, attraverso il consumo di carne di cinghiale cruda o poco cotta. In Italia, sono stati pubblicati studi che segnalano la presenza del virus in cinghiali abbattuti e il possibile passaggio dell'infezione ad un cacciatore tramite la macellazione o il consumo di carne di cinghiale. In questo studio sono stati esaminati per la ricerca di IgG anti-HEV 764 sieri di cinghiale provenienti dalla zona pre-Alpina della provincia di Brescia ed altri 850 provenienti da diverse province della zona Appenninica del Centro-Nord Italia. I campioni sono stati analizzati mediante ELISA indiretta utilizzando piastre con antigene adsorbito fornite in un kit umano (HEVab, DIA-Pro Milano). Tramite RT-nPCR sono stati testati 16 campioni individuali di fegato, di cui 4 corrispondenti ad individui con positività sierologica, e 18 pool comprendenti un totale di 412 campioni, tutti provenienti dalla provincia di Brescia.

In totale, i campioni di siero risultati positivi sono stati 133 su 1.614 (8,2%); nei campioni provenienti dalla provincia di Brescia i positivi sono stati 30 su 764 (3,9%) con una differenza significativa da quelli provenienti dalle altre province dove i campioni sopra la soglia di *cut-off* sono stati 103 su 850 (12,1%). Questa differenza è stata confermata dalla ripetizione del test ELISA di 970 campioni su piastre con adsorbito un antigene ricombinante espresso su baculovirus prodotto nei nostri laboratori. La ricerca del genoma virale ha dato esito negativo.

I risultati confermano la circolazione del virus dell'epatite E nei cinghiali in Italia, ma con una più attiva presenza del virus nella popolazione Appenninica di cinghiali rispetto a quella pre-Alpina della provincia di Brescia. Le condizioni epidemiologiche che possono spiegare questa diffusione di HEV nella zona Appenninica considerata sono la maggior densità di cinghiali e la possibilità di contatti con suini, nei quali l'infezione è ampiamente diffusa.

P.32 EFFETTO DEL GENOTIPO DELLA PRP SULLE CARATTERISTICHE BIOCHIMICHE DELLA PRPSC IN OVINI INFETTATI CON SCRAPIE, BSE E BASE

Sergio Migliore (a), Claudia D'Agostino (a), Stefano Marcon (a), Michele Di Bari (a), Gabriele Vaccari (a), Elena Esposito (a), Erminia Sezzi (b), Barbara Chiappini (a), Michela Conte (a), Luigi De Grossi (b), Cristina Casalone (c), Umberto Agrimi (a), Romolo Nonno (a)
(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma*

(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

La “crisi BSE” ha rappresentato un evento catastrofico per la zootecnia e un problema di sanità pubblica veterinaria senza precedenti. Purtroppo, molti interrogativi restano aperti e l'atteggiamento di cautela delle Autorità Sanitarie dell'UE comprende oggi anche le Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST) dei piccoli ruminanti. La caratterizzazione dei ceppi di EST circolanti nel patrimonio ovi-caprino europeo ha rimarcato la variabilità di questi agenti e identificato ceppi con caratteristiche vicine a quelle della BSE. Per queste ragioni, la verifica di metodi di *strain typing*, utilizzabili direttamente sull'ovino, come la glicotipizzazione della PrP^{Sc}, appaiono di estremo interesse.

In questo studio, 50 ovini di razza sarda, sono stati infettati sperimentalmente con Scrapie (n=20), BSE bovina (n=14) e BASE bovina (n=16). Le caratteristiche molecolari della PrP^{Sc} estratta dal SNC degli ovini infetti sono state analizzate tramite il ISS *discriminatory WB*, un test che ha lo scopo di discriminare la Scrapie dalla BSE attraverso l'analisi di tre diversi parametri molecolari: peso molecolare apparente, rapporto tra anticorpi C-terminali e N-terminali e glicoprofilo. I genotipi del campione in esame rappresentavano sia alleli ritenuti resistenti che alleli suscettibili alle EST; in questo modo, si è potuto valutare l'impatto del genotipo dell'ospite rispetto ai differenti ceppi.

La caratterizzazione della PrP^{Sc}, ha permesso di discriminare chiaramente i campioni di Scrapie, BSE e BASE, mettendo in evidenza differenze biochimiche sia nel glicotipo che nel peso molecolare. Tuttavia tra gli ovini affetti da BSE o da BASE sono emerse variazioni molecolari della PrP^{Sc} dipendenti dal genotipo della PrP dell'ospite. In particolare, tra gli ovini infettati con BSE, le pecore con genotipo resistente ARR/ARR hanno mostrato caratteristiche molecolari significativamente diverse rispetto alle pecore con genotipo sensibile (ARQ/ARQ, ARQ/AHQ), non tanto da impedire la discriminazione nei confronti di campioni di scrapie. Nella BASE al contrario, le pecore ARQ/ARR hanno mostrato caratteristiche molecolari molto diverse rispetto ai soggetti ARQ/ARQ, con la compresenza di più frammenti di PrP^{Sc}, presenti in diverse misure relative sia in aree cerebrali diverse che in soggetti diversi.

Il nostro studio suggerisce che la variazione di un singolo amminoacido sulla PrP dell'ospite può influenzare le caratteristiche biochimiche della PrP^{Sc} e di conseguenza anche l'abilità dei test discriminatori di identificare diversi ceppi di EST in ovini con

differenti genotipi della PrP. Tuttavia il *discriminatory* WB in uso nella sorveglianza italiana si è dimostrato capace di discriminare tra i campioni di scrapie e quelli di BSE, indipendentemente dal genotipo dell'ospite e dalla via di inoculo.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI ROTAVIRUS SUINI CIRCOLANTI NEL NORD ITALIA

Marina Monini (a), Gabriele Vaccari (a), Giovanni Ianiro (a), Antonio Lavazza (b), Franco Maria Ruggeri (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia*

I rotavirus di gruppo A sono riconosciuti come una delle maggiori cause di gastroenterite acuta negli individui giovani di molte specie animali. Negli allevamenti, la diarrea da rotavirus rappresenta un ingente danno economico dovuto all'elevata morbosità e mortalità della patologia nei suini neonati.

La classificazione dei rotavirus si basa su un sistema binario in cui si riconoscono distinti sierotipi e genotipi delle proteine capsidiche VP7 e VP4. La genotipizzazione tramite *Reverse-Transcription* (RT) dei frammenti genici codificanti per queste due proteine e successiva semi *nested-PCR*, utilizzando *primers* genotipo-specifici, è ampiamente impiegata negli studi di epidemiologia. Ad oggi, tramite caratterizzazione molecolare, sono stati identificati 25 genotipi per la VP7 (G) e 32 genotipi per la VP4 (P), alcuni dei quali sono condivisi tra animali e uomo.

Nei suini, rotavirus con genotipo G3, G4, G5 e G11 in associazione con i tipi P[6] e P[7], sono comuni, sono stati anche riscontrati ceppi appartenenti ai tipi P[13], P[19], P[23], P[26] e P[27]. Più raramente sono stati anche identificati tipici genotipi umani (G1, G2, G9, P[6] e P[8]) e bovini (G6, G8, G10, P[1], P[5] e P[11]).

Il campionamento è stato effettuato nel 2009 in allevamenti della Lombardia e dell'Emilia Romagna. Dopo conferma diagnostica di rotavirus tramite saggio ELISA e microscopia elettronica, si è proceduto all'estrazione dell'RNA virale utilizzando un kit commerciale (QIAamp RNA Mini kit, Qiagen). L'RNA totale è stato retro trascritto tramite *random hexamers* (*SuperScript III 1st Strand Synthesis System*, Invitrogen) ed è stata eseguita una reazione di PCR (*Platinum Taq DNA Polymerase*, Invitrogen) utilizzando *primers* specifici per i diversi geni in analisi (gene 4 codificante per la proteina VP4, gene 9 per la VP7, gene 6 per la VP6, e gene 10 per la NSP4). I prodotti di PCR positivi ad analisi su gel sono stati sottoposti a sequenziamento nucleotidico per entrambi i filamenti (sequenziatore a capillare ABI3130; Applied Biosystems).

L'analisi di sequenza ha mostrato la presenza di isolati con genotipo G9 e genotipi P[6], P[23]. Considerata l'ampia diffusione del genotipo G9 in Italia anche nella popolazione umana, per valutare una possibile relazione evolutiva, i geni codificanti per VP4, VP6, VP7 e NSP4 sono stati sequenziati e confrontati con ceppi di rotavirus suini presenti in GenBank e con ceppi umani circolanti in Italia. Per questi campioni è stata anche effettuata un'analisi filogenetica per valutare una possibile origine comune con i G9 umani e quindi una eventuale trasmissione zoonotica.

PB1-F2 E MUTAZIONE N66S NEI CEPPI INFLUENZALI SUINI H1 IN ITALIA

Ana Moreno Martin, Beatrice Boniotti, Enrica Sozzi, Davide Lelli, Paolo Cordioli
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia

Il segmento 2 dei virus influenzali tipo A codifica per due proteine PB1 e PB1-F2. La proteina PB1-F2 è considerata uno dei principali fattori di virulenza dei virus influenzali perché agisce sui mitocondri inducendo l'apoptosi della cellula infetta, in particolare dei macrofagi, e determina quindi il rallentamento e la riduzione della risposta immunitaria specifica. L'induzione dell'apoptosi cellulare dipende principalmente dalla localizzazione mitocondriale della PB1-F2, la quale è legata sia alla presenza della MTS (*Mitochondrial Targeting Sequence*) a livello C terminale che all'espressione di almeno 57-62 aa della proteina. La maggior parte dei virus influenzali possiede una proteina PB1-F2 completa di 87-90 aa (virus pandemici del 1918, 1957 e 1968), tuttavia in alcuni ceppi si esprime troncata a diversi livelli nell'estremità C terminale (virus H1N1/09 pandemici con 11 aa) o addirittura manca totalmente.

Lavori sperimentali realizzati su modelli murini, hanno rilevato che l'aminoacido presente in posizione 66 riveste notevole importanza per la virulenza. La singola mutazione da asparagina a serina (N66S) è stata correlata ad un aumento di virulenza ed, in particolare, a più alti livelli di replicazione virale nei polmoni. Questa mutazione è stata riscontrata nei virus pandemici H1N1 (1918), H2N2 (1957) e H3N2 (1968) ed anche nel virus aviario H5N1 di alta patogenicità (1997). Allo scopo di approfondire le caratteristiche della PB1-F2 nei virus influenzali suini (SIV), sono state analizzate le sequenze proteiche della PB1-F2 di 15 ceppi SIV H1N2 e 4 H1N1 isolati in Italia dal 1998 al 2010 e confrontate con quelle di virus influenzali suini, umani e aviari depositate in genBank. L'analisi proteica ha rilevato che 16 su 19 ceppi possiedono una PB1-F2 completa di 90 aa. I restanti tre ceppi riguardano un ceppo H1N1 ed un ceppo H1N2, entrambi isolati nel 98, che esprimono una proteina di 63 aa ed un ceppo H1N2 del 2006 che ne esprime una di 57 aa. In quest'ultimo caso, la riduzione della dimensione della proteina potrebbe compromettere la localizzazione mitocondriale e la conseguente induzione dell'apoptosi cellulare. Dal confronto delle sequenze proteiche si rileva inoltre la presenza della mutazione N66S in 6 dei 15 ceppi H1N2 italiani. Questa mutazione è stata evidenziata molto raramente nei virus influenzali suini, infatti risulta presente in solo tre (A/sw/England/WVL7/92 H1N1, A/sw/Spain/39139/02 H3N2, A/sw/Sweden/9706/10 H1N2) delle oltre 100 sequenze di ceppi, sia europei che americani, confrontate in questo studio. Al contrario, la presenza della Serina in posizione 66 sembra essere particolarmente frequente negli H1N2 italiani recenti, essendo rilevata in tutti i ceppi isolati nel 2009-2010 tranne uno. A differenza della sporadicità osservata fino ad oggi per i SIV, la mutazione N66S sembrerebbe essersi stabilizzata nei ceppi H1N2 italiani recenti, tuttavia sono in corso ulteriori studi per valutarne la diffusione negli isolati del 2011.

P.33 VALUTAZIONE DELLA CONCORDANZA TRA KIT ELISA DISPONIBILI IN ITALIA PER LA SIERODIAGNOSI DI ANEMIA INFETTIVA EQUINA

Roberto Nardini, Ida Ricci, Maria Teresa Scicluna, Laura Gasperetti, Alessia D'Alonzo, Chiara Giusti, Samanta Sabatini, Riccardo Forletta

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

Lo scopo del presente lavoro è la discussione dei dati preliminari relativi alla valutazione della concordanza tra kit ELISA disponibili in Italia per la sierodiagnosi di Anemia Infettiva Equina (AIE) e della loro ripetibilità e riproducibilità. I dati sono stati raccolti durante lo svolgimento della ricerca corrente IZSLT 07/08 (art.12 DL.vo 502/1992).

Nell'ambito delle attività diagnostiche del Piano di Sorveglianza Nazionale (O.M. 14.11.2006 e seguenti) non vi è uniformità delle tecniche e dei metodi utilizzati per lo *screening* dei sieri tra gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali. Il metodo ufficiale è l'Immunodiffusione in Gel di Agar (AGID) secondo Coggins. Spesso a questo metodo viene affiancato l'AGID secondo OIE o la tecnica ELISA. Per quest'ultima, sono disponibili in Italia quattro kit commerciali ed uno *in-house* dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana.

Per la valutazione della concordanza sono stati utilizzati sieri equini raccolti al Macello di Pistoia e risultati negativi all'AGID ed all'*Immunoblotting* e sieri positivi di riferimento secondario, validati con sieri di riferimento del Laboratorio di Referenza OIE per l'AIE. Al fine di costruire un *panel* di sieri a diversa positività per la valutazione della concordanza, i sieri sono stati esaminati con ciascun kit, in diluizioni scalari in base 2 (da 1:10 a 1:1280) e in base 3 (da 1:3 a 1:6561). I sieri del *panel* sono stati esaminati in 14 ripetizioni, con ciascun kit, da tre operatori. La ripetibilità è stata valutata mediante il test Kappa. Il Kappa multiplo è stato utilizzato per la valutazione della riproducibilità.

Ciascun kit si è dimostrato ripetibile, riproducibile e concorde con tutti gli altri dato che le concordanze sono risultate essere pari ad 1.

A completamento dei dati ottenuti, si ritiene di dover stimare anche il limite di rilevabilità utilizzando dei sieri di riferimento internazionale a diluizioni scalari. La sensibilità e la specificità diagnostica relativa si dovrebbero utilizzare sieri di campo e in parallelo sieri di animali sperimentalmente infetti prelevati a diversi giorni dopo l'infezione, confrontando i risultati ottenuti con l'AGID, considerato ad oggi metodo di riferimento. Ottenuti questi dati si potrebbe considerare di utilizzare per lo *screening*, a livello nazionale, la tecnica ELISA, come già avviene per la maggioranza dei piani di sorveglianza.

DIFFERENZE DI PATOGENESI TRA SCRAPIE E BSE POSSONO SPIEGARE PERCHÈ L'AGENTE DELLA BSE NON CIRCOLI NELLA POPOLAZIONE OVINA EUROPEA

Romolo Nonno (a), Michele Di Bari (a), Claudia D'Agostino (a), Francesca Rosone (b), Stefano Marcon (a), Elena Esposito (a), Michela Conte (a), Barbara Chiappini (a), Nadia Palazzini (a), Geraldina Riccardi (a), Gian Mario Cosseddu (a), Luigi De Grossi (a), Gabriele Vaccari (a), Umberto Agrimi (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma*

È noto che le pecore sono suscettibili alla BSE e che, almeno in Europa, sono state esposte a farine di carne contaminate fino al 2001. Ciononostante, ad oggi non sono stati identificati casi di BSE naturale in pecore. In questo studio abbiamo confrontato l'efficienza di trasmissione e la patogenesi della scrapie e della BSE nelle pecore, in seguito ad infezione sperimentale. È stato scelto un isolato italiano di scrapie perché, come la BSE, questa ha come alleli *target* l'ARQ e l'AHQ. Pecore di 8-10 mesi (n=210) sono state infettate per via orale o intracerebrale. In seguito ad infezione intracerebrale, le pecore ARQ/ARQ hanno mostrato un tasso di trasmissione del 100% e tempi di sopravvivenza simili sia in seguito ad infezione con scrapie che con BSE (~460 e ~480 dpi, rispettivamente). Le pecore con genotipo ARR/ARR hanno mostrato suscettibilità alla BSE (5/7, ~1.600 dpi), ma non alla scrapie (0/5, >2.800 dpi). Nella BSE, la trasmissione primaria ed il secondo passaggio hanno mostrato tempi di sopravvivenza molto simili. Nonostante l'alta efficienza di trasmissione osservata per via intracerebrale, le pecore hanno mostrato una bassa suscettibilità alla BSE in seguito ad infezione per via orale. Dopo >2.200 dpi, solo 4/6 pecore ARQ/ARQ (~700 dpi) e 2/4 pecore ARQ/AHQ (~800 dpi) hanno sviluppato la BSE, mentre l'infezione per via orale con scrapie ha mostrato un tasso di trasmissione del 100%. Lo studio patogenetico, effettuato su pecore sacrificate a diversi stati del periodo preclinico, ha inoltre mostrato che la scrapie ha indotto l'accumulo di PrPSc a partire da 2 mesi post-infezione (mpi) negli organi del sistema linforeticolare (LRS) ed a partire da 12 mpi nel Sistema Nervoso Centrale (SNC), mentre nella BSE, LRS e SNC sono diventati positivi contemporaneamente e solo a partire da 13 mpi, con due pecore ancora negative a 17 e 20 mpi. Complessivamente questi dati indicano che le pecore adulte possano essere relativamente resistenti all'infezione per via orale con BSE, probabilmente a causa di una replicazione inefficiente negli organi linfatici. Studi precedenti, al contrario, avevano mostrato un'alta suscettibilità alla BSE per via orale in pecore infettate in età più precoci (<6 mesi). Considerando che l'utilizzo delle farine di carne nell'allevamento ovino coinvolge principalmente gli animali adulti, è possibile quindi ipotizzare che l'esposizione delle pecore alle farine contaminate con BSE possa essere stata insufficiente ad indurre un'infezione capace di sostenersi in condizioni naturali.

ANALISI FILOGENETICA ED EVOLUZIONISTICA DI CEPPI DI BETANODAVIRUS ISOLATI NEL SUD EUROPA

Valentina Panzarin, Alice Fusaro, Isabella Monne, Elisabetta Cappelozza, Giuseppe Bovo,
Giovanni Cattoli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

L'Encefaloretinopatia Virale (ERV) è considerata una delle patologie più gravi per l'acquacoltura marina, e rappresenta un rischio anche per le popolazioni selvatiche data la sua elevata infettività e il cospicuo numero di specie ittiche suscettibili. L'agente causale di ERV appartiene alla famiglia *Nodaviridae*, genere *Betanodavirus*, e consiste in una particella virale priva di *envelope* costituita da un genoma a RNA bisegmentato. Il segmento RNA1 codifica per la replicasi virale, mentre il segmento RNA2 codifica per la proteina del *capside*. I *Betanodavirus* sono stati storicamente suddivisi in quattro genotipi (RGNNV, SJNNV, TPNNV e BFNNV) sulla base dell'analisi filogenetica della regione variabile T4 localizzata nel segmento RNA2. Tuttavia, recenti studi hanno evidenziato che il sequenziamento di entrambi i geni appare fondamentale per rilevare possibili fenomeni di riassortimento tra ceppi appartenenti a diversi genotipi.

Nel presente lavoro, sono stati parzialmente sequenziati i segmenti RNA1 e RNA2 di 120 ceppi isolati tra il 2000 e il 2009 in Croazia, Cipro, Grecia, Italia, Portogallo e Spagna. Gli alberi filogenetici, dedotti tramite il metodo di massima verosimiglianza (ML), hanno dimostrato la presenza nel Sud Europa dei genotipi RGNNV ($n=96$) e SJNNV ($n=1$) e di ceppi riassortanti RGNNV/SJNNV ($n=23$). L'analisi filogenetica ha inoltre evidenziato che, nella maggior parte dei casi, ceppi che condividono lo stesso paese d'origine tendono a clusterizzare all'interno dello stesso gruppo, suggerendo una distribuzione geografica definita dei diversi *clades* di *Betanodavirus*. Tuttavia in alcuni casi è stato possibile riconoscere l'esistenza di flussi genici virali tra aree geografiche distinte. I tassi di sostituzione nucleotidica/sito/anno sono stati stimati tramite il programma BEAST, e i risultati ottenuti hanno rivelato che il gene della proteina capsidica possiede una velocità evolutiva inferiore rispetto al gene della polimerasi virale. Infine, sono stati identificati alcuni codoni in RNA1 e in RNA2 soggetti a pressione selettiva positiva, che potrebbero influenzare le proprietà biologiche di questi virus, quali ad esempio la sensibilità alle diverse temperature, o la specificità nel tropismo d'ospite.

Questo studio ha consentito di ottenere importanti informazioni sulla diffusione dei diversi genotipi di betanodavirus nel Sud Europa, e ha permesso di comprenderne meglio le dinamiche evolutive. I dati ottenuti sottolineano il ruolo fondamentale di strumenti bioinformatici al fine di tracciare il flusso genico virale, e i nostri risultati suggeriscono che tali indagini sono essenziali per sviluppare strategie di sorveglianza adeguate per questa malattia.

P.34 ASSOCIAZIONE DI UN POLIMORFISMO INDEL NELLA 3'UTR DEL GENE *SPRN* CON LA SUSCETTIBILITÀ ALLA SCRAPIE NELLA CAPRA

Simone Peletto, Silvia Colussi, Maria Grazia Maniaci, Silvia Bertolini, Marianna Pagano, Simone Bertuzzi, Tiziana Giovannini, Cristiana Maurella, Pier Luigi Acutis
CEA, Centro di Referenza Nazionale per le Encefalopatie Animali, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Il gene *Shadow of the Prion Protein (SPRN)* è un gene che codifica per una proteina facente parte della famiglia dei prioni (Shadoo) e candidata ad un ruolo nella patogenesi delle encefalopatie spongiformi trasmissibili. Nell'uomo, un'associazione tra mutazioni di questo gene e incidenza della malattia di Creutzfeldt-Jakob, nella sue forme sporadica e nuova variante, è già stata dimostrata. Nella capra, le informazioni sulla variabilità del gene *SPRN* sono limitate e la possibile esistenza di una correlazione tra mutazioni di questo gene e la scrapie è attualmente del tutto sconosciuta. Nel presente studio è stata indagata l'influenza dei polimorfismi del gene *SPRN* sulla resistenza/suscettibilità alla scrapie caprina. Al fine di rilevare la presenza di mutazioni, una regione del gene *SPRN* comprendente l'intera *Open Reading Frame* (ORF) ed un frammento della 3'UTR è stata amplificata e sottoposta a sequenziamento diretto. Successivamente, l'associazione dei polimorfismi rilevati con la malattia è stata indagata mediante uno studio caso-controllo condotto su un pannello di casi di scrapie (n=20) e controlli (n=311) provenienti da focolai italiani. L'analisi genetica ha permesso di identificare dieci mutazioni: sei nella ORF e quattro nella 3'UTR. Nessuna mutazione è stata identificata nella regione codificante il peptide idrofobico ricco in alanina della proteina. Una nuova mutazione non sinonima è stata rilevata nella ORF (R145W), con una frequenza molto bassa. Le frequenze alleliche di ogni polimorfismo sono state calcolate ed utilizzate per l'analisi statistica. Nella regione 3'UTR un polimorfismo che provoca l'inserzione di cinque nucleotidi è risultato associato con la suscettibilità alla scrapie nella capra (Chi-quadro=10,03; p=0,002). L'analisi bioinformatica per la ricerca di siti *target* di microRNA, eseguita con il programma Patrocles (<http://www.patrocles.org>), ha predetto un effetto putativo di questo polimorfismo su siti multipli di legame per microRNA. Il nostro studio fornisce nuovi dati sulla variabilità del gene *SPRN* caprino e dimostra che tali differenze genetiche possono contribuire alla modulazione della suscettibilità alla scrapie classica nella capra.

P.35 STUDIO DESCRITTIVO DI DUE FOCOLAI DI BDV GENOTIPO 3 NELLA CAPRA

Simone Peletto (a), Pier Luigi Acutis (a), Elena Gobbi (a), Erika Messina (a), Sandra Angiolillo (a), Vanda Tarello (b), Piero Caroggio (c), Alessandro Dondo (a), Simona Zoppi (a), Leonardo Pinto (a), Daniela Mei (a), Walter Mignone (a), Carla Grattarola (a), Loretta Masoero (a)

(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

(b) *Azienda Sanitaria Locale Biella, Struttura Semplice Area A, Biella*

(c) *Azienda Sanitaria Locale Imperia, Struttura Semplice Area A, Imperia*

Il virus della *Border Disease* (BDV) è un membro del genere *Pestivirus* appartenente alla famiglia *Flaviviridae*, che comprende virus ad RNA a polarità positiva. Gli stipiti di BDV segregano in almeno sette gruppi filogenetici diffusi in diverse nazioni. In Italia, sindromi BD-like sono state osservate nelle regioni meridionali sin dagli anni '90 e pestivirus isolati da agnelli e capretti, inizialmente caratterizzati come BDV, sono stati successivamente riconosciuti come BVDV-2 attraverso la tipizzazione genetica. Recentemente, un BDV appartenente ad un nuovo gruppo filogenetico e denominato BDV-7 è stato isolato da ovi-caprini con problemi riproduttivi. Il presente studio descrive due focolai di BD in capre che presentavano problemi di aborto e mortalità neonatale. Le greggi erano costituite da 67 e 179 capre adulte presenti in due allevamenti situati, rispettivamente, in Piemonte (Biella) e Liguria (Imperia). Nessuna correlazione epidemiologica è stata evidenziata tra i due focolai. Tutti gli animali in vita sono stati sottoposti a ricerca anticorpale e a PCR da sangue per l'evidenziazione del genoma virale. Sui feti abortiti e sui capretti morti alla nascita è stata eseguita la necropsia e la ricerca del virus mediante PCR, ELISA ed isolamento virale da milza, rene e SNC; sui capretti è stata analizzata anche la cute. La sieroprevalenza è risultata del 92% e 23%, rispettivamente. Nel focolaio piemontese le indagini diagnostiche hanno permesso di identificare un animale PI (una femmina di un anno) e sono stati analizzati tre capretti morti ad un giorno dalla nascita, due dei quali risultati positivi. Nel focolaio ligure è stato possibile effettuare le analisi su cinque feti abortiti (un positivo) e 13 capretti morti alla nascita (quattro positivi). Analogamente all'infezione da BVDV nel bovino, campioni di cute auricolare sono risultati positivi: la presenza di BDV in questo tessuto non era riportata in letteratura e potrebbe costituire un dato utile per il controllo dell'infezione e l'identificazione degli animali PI. L'analisi filogenetica ha permesso di classificare entrambi gli stipiti come BDV genotipo 3. Le sequenze analizzate formano un cluster unico con sequenze di origine francese depositate in GenBank, suggerendo una correlazione epidemiologica, anche supportata dalla localizzazione geografica degli allevamenti. La BD è ritenuta rara nella capra e solo cinque focolai sono descritti in letteratura ad oggi. BDV-3 è diffuso in Francia, Svizzera e Austria; il presente studio costituisce la prima evidenza diretta della circolazione di questo genotipo in Italia e pone la questione del reale impatto di questo virus sull'allevamento caprino.

P.36 RILIEVO DEL VIRUS DELLA SINDROME RESPIRATORIA E RIPRODUTTIVA DEL SUINO (PRRSV) E DEL CIRCOVIRUS SUINO TIPO 2 (PCV2) NEL TERRITORIO UMBRO-MARCHIGIANO NEL PERIODO 2007-2010

Stefano Petrini, Marta Paniccià, Sara Briscolini, Elisabetta Manuali, Gianni Perugini, Manfredo Fortunati

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Ad oggi, nell'ambito del complesso delle malattie respiratorie del suino (PRDC) principalmente si rileva il virus della sindrome respiratoria e riproduttiva del suino (PRRSV) e il circovirus suino tipo 2 (PCV2). Scopo del presente lavoro è stato quello di accertare la presenza dei virus sopramenzionati nel Centro Italia (Regioni Umbria e Marche). Nel periodo 2007-2010, sono stati osservati 528 suini con PRDC, provenienti da 59 allevamenti non sottoposti a vaccinazione nei confronti di PCV2 e PRRSV. Da tutti gli animali sono stati eseguiti esami necroscopici, istopatologici, immunoistochimici e virologici. Molti degli animali osservati apparivano in condizioni generali scadenti. Le lesioni macroscopiche sono state essenzialmente evidenziate nei lobi apicali del polmone e sono state riscontrate: polmoniti, bronchiti, necrosi bronchiolare, broncopolmonite purulenta, polmonite emorragica, pleurite fibrosa. A livello di tonsilla palatina sono state rilevate petecchie emorragiche. Gli esami istologici, confermavano la presenza delle lesioni macroscopiche a livello del polmone e della tonsilla palatina dove sono state rilevate cellule multinucleate giganti, infiltrati mononucleari peribronchiali, bronchioliti fibrose, infiammazione granulomatosa, necrosi coagulativa ed emorragica. Non sono state osservate altre lesioni in differenti organi. Le indagini di immunoistochimica allestite nei confronti del PCV2, hanno confermato la presenza dell'antigene virale nelle lesioni istopatologiche sopramenzionate. Dalle prove di isolamento virale, 209 soggetti (39,65%) risultavano positivi a PRRSV, diversamente 295 suini (55,97%) erano positivi a PCV2 e solo 13 suinetti (2,46%) mostravano positività sia al PCV2 che al PRRSV. Nessuna altra positività virologica veniva accertata. PCV2 è stato il virus più rilevato, seguito dal PRRSV. Solo in alcuni casi è stata accertata una co-infezione tra entrambi i virus.

I risultati ottenuti in questo studio differiscono da quelli pubblicati in altre ricerche condotte al Nord Italia, dove è stata accertata una positività virologica del 80% nei confronti di PCV2 e 85 % nei confronti di PRRSV.

P.37 CARATTERIZZAZIONE DELLA GLICOPROTEINA GE DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI AUJESZKY ESPRESSA IN BACULOVIRUS ED IN VACCINIA VIRUS

Giulia Pezzoni (a), Maddalena Panigada (b) Lidia Stercoli (a), Emiliana Brocchi (a)
(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia
(b) Dipartimento di Biotecnologie, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

La Malattia di Aujeszky è una patologia infettiva sostenuta dall'Herpesvirus-1 suino. L'ospite naturale del virus è la specie suina, dove la malattia è responsabile di una notevole diminuzione delle performance riproduttive e produttive. Il "Piano nazionale di controllo della malattia di Aujeszky" prevede la vaccinazione pianificata di tutti i suini con vaccini gE-deleti inattivati o attenuati. La glicoproteina gE è una delle sei proteine strutturali presenti nell'*envelope* virale e, non essendo essenziale per la replicazione virale, la sua delezione nei vaccini *marker* permette la discriminazione sierologica tra animali infetti e vaccinati (DIVA), attraverso la determinazione di anticorpi nei confronti della gE.

La gE (577aa) è codificata dal frammento US8 del genoma virale, è una glicoproteina di membrana di tipo I con una porzione extracellulare ed un piccolo dominio intracellulare. La componente glicoproteica di gE è fondamentale per l'espressione delle caratteristiche antigeniche che risiedono prevalentemente nel dominio extracellulare. Questo studio descrive la produzione della gE nel sistema Baculovirus e nel sistema *Modified Vaccinia Virus Ankara* (MVA), finalizzata all'ottenimento di un antigene il più possibile simile a quello nativo e quindi idoneo per l'utilizzo in saggi ELISA-DIVA. MVA è un ceppo attenuato di *Vaccinia virus* che consente l'espressione di geni eterologhi, cresce ad alti titoli su fibroblasti di embrione di pollo e sulla linea cellulare BHK21. L'intero gene che codifica per la gE è stato clonato nel vettore di espressione per Baculovirus pFast Bac e nel vettore per l'espressione in MVA; inoltre la porzione di gE (33-421 aa), privata della parte transmembrana e senza peptide segnale, è stata clonata nel vettore di espressione per Baculovirus pFastBac/HBM-TOPO, dove la sequenza HBM (*HoneyBee Melittin*) serve come peptide segnale per la compartimentazione ed il processamento post-traduzionale dell'antigene prodotto. I tre antigeni ricombinanti sono stati analizzati e confrontati attraverso l'utilizzo di un pannello di 11 anticorpi monoclonali (AcM) anti-gE, prodotti e caratterizzati in precedenza: i tre antigeni sono stati riconosciuti in test di immunofluorescenza solo da tre AcM, due verso siti conformazionali (1F9 e 2E1) e uno verso un epitopo lineare (3D5). In *Western Blotting* l'AcM 3D5 ha reagito con tutti e tre gli antigeni evidenziando una banda di peso molecolare superiore rispetto al peso molecolare valutato considerando solo la sequenza degli amminoacidi, il che indica la presenza di glicosilazioni e quindi il giusto processamento dei prodotti ricombinanti. Tuttavia, in prove preliminari di ELISA indiretta, solo la porzione gE tronca espressa in baculovirus è efficientemente immuno-catturata dai tre AcM adsorbiti alla fase solida e correttamente esposta per il riconoscimento da parte di sieri positivi.

P.38 ESPRESSIONE DELLA GLICOPROTEINA E2 DEL VIRUS DELLA DIARREA VIRALE BOVINA (BVDV) NEL SISTEMA BACULOVIRUS

Giulia Pezzoni, Lidia Stercoli, Emiliana Brocchi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia

Il virus della Diarrea Virale Bovina (BVDV) appartiene al genere *Pestivirus*, famiglia *Flaviviridae*, composta da virus a RNA a singolo filamento positivo. La glicoproteina dell'*envelope* E2 e la proteina non strutturale NS3 sono tra le proteine maggiormente immunogene di BVDV. Contrariamente alla NS3, che è comune a tutti i *Pestivirus*, la E2 è specifica rispetto al virus di provenienza e induce anticorpi neutralizzanti l'infettività virale. Una NS3 ricombinante, prodotta nel nostro laboratorio con il sistema Baculovirus, è attualmente utilizzata con successo come sorgente di antigene in saggi sierologici di *screening* per *Pestivirus*. Obiettivo del presente lavoro è la produzione dell'antigene E2 di BVDV da utilizzare in saggi ELISA in associazione al test di *screening* NS3. Al fine di ottenere un prodotto ricombinante con caratteristiche antigeniche sovrapponibili a quelle della proteina virale nativa ed essendo E2 una glicoproteina, è stato scelto il sistema di espressione Baculovirus in grado di effettuare le modificazioni post-traduzionali necessarie. La E2 è una proteina trans-membrana con una porzione extracellulare fortemente immunogena. La sequenza genica di E2 corrispondente al dominio extracellulare, derivata dal ceppo di riferimento NADL, è stata amplificata e clonata nel vettore di espressione pFastBac/HBM-TOPO, dove la presenza della sequenza HBM (*HoneyBee Melittin*) permette la compartimentazione della proteina nello spazio extracellulare e la realizzazione delle modificazioni post-traduzionali. Il Baculovirus ricombinante, ottenuto con il sistema Bac-to-Bac (Invitrogen), è stato amplificato e utilizzato per esperimenti di espressione ed il prodotto ricombinante è stato caratterizzato con un pannello di quattro anticorpi monoclonali (AcM) anti-E2, prodotti in precedenza verso un ceppo di campo di BVDV. Dei quattro AcM, tutti dotati di capacità neutralizzante, due (6G5 e 3H1) riconoscevano l'80% dei ceppi di BVDV testati, mentre altri due (3G9 e 3B4) erano reattivi solo con il 15% e l'8% dei ceppi rispettivamente. In saggi preliminari di immunofluorescenza su cellule infettate con il Baculovirus ricombinante solo gli AcM 6G5 e 3H1, diretti verso epitopi conservati, reagivano con la proteina ricombinante rE2, coerentemente con il profilo di reazione del ceppo di BVDV utilizzato per la produzione dell'antigene ricombinante. In prove ELISA-*trapping*, entrambi gli AcM, adsorbiti alla fase solida, catturavano la r-E2 con efficienza, favorendo l'esposizione di epitopi immunogeni e rendendoli accessibili alla reazione con gli anticorpi presenti in sieri positivi. La rE2 è stata identificata sia nel terreno di crescita delle colture cellulari infettate con Baculovirus ricombinante, sia nei lisati cellulari, indicando il corretto processamento della proteina nelle cellule infettate. Questi risultati preliminari sono un presupposto favorevole all'allestimento di saggi ELISA con l'antigene rE2 per analisi sierologiche specifiche per BVDV e, in associazione al rilievo di anticorpi verso altre proteine virali, per caratterizzare il profilo della risposta umorale.

P.39 MESSA A PUNTO DI UN TEST ELISA PER LA RICERCA DI ANTICORPI ANTI EPATITE E NEL SUINO

Eleonora Ponterio (a), Ilaria Di Bartolo (a), Ginevra Orrù (b), Manuele Liciardi (b), Fabio Ostanello (c), Franco Maria Ruggeri (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Cagliari*

(c) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi, Ozzano dell'Emilia, Bologna*

L'epatite E è una patologia virale con caratteristiche di epatite acuta. L'agente eziologico (*Hepatitis E virus*, HEV) è un ssRNA virus, classificato nel genere *Hepevirus*. Sulla base della sequenza nucleotidica della ORF2, il virus dell'HEV viene classificato in 4 genotipi, di cui i genotipi 1 e 2 identificati solo nell'uomo, mentre i genotipi 3 e 4 sono stati identificati sia nell'uomo sia in diverse specie animali (suino, cinghiale, cervo). Negli ultimi anni, nei paesi industrializzati, sono stati descritti un numero crescente di casi autoctoni alcuni legati al contatto diretto o indiretto con suini, cinghiali o cervi infetti. Attualmente HEV è considerato un agente di zoonosi e il suino un possibile serbatoio asintomatico. In questo lavoro sono stati analizzati sieri di suini sani prelevati da allevamenti della Sardegna e sieri provenienti da suini al macello, per valutare la presenza di anticorpi contro HEV. A tale scopo, è stata utilizzata la proteina del capsido (ORF2) virale di un ceppo di HEV suino (g3), identificato in Italia, dopo clonaggio ed espressione nel sistema ricombinante di *Baculovirus*. Lo studio ha coinvolto 64 sieri suini, 24 sieri di cinghiali provenienti dalla Sardegna e 48 sieri provenienti da suini in fase di macellazione, rilevando un'elevata sieroprevalenza (130/134; 97%). I sieri sono stati testati mediante tre test sierologici: un *in-house* ELISA e un *Western blotting*, utilizzando come antigene la proteina ricombinante di HEV suino. Un test ELISA commerciale per la diagnosi nell'uomo è stato impiegato come *gold standard*, previo adattamento per l'utilizzo con sieri suini sostituendo l'anticorpo secondario. Il test commerciale "adattato" ha evidenziato positività in 110/134 sieri (82%), tutti confermati positivi anche nell'*in-house* ELISA. Tuttavia solo 85 sieri sono stati confermati positivi in WB. I sieri di cinghiale hanno mostrato con il test ELISA commerciale una sieroprevalenza del 27% (6/22), ma solo per due sieri la positività è stata riconfermata anche con gli altri due test. Presumibilmente i test per la ricerca degli anticorpi anti-HEV nel cinghiale necessitano di ulteriore messa a punto, conseguentemente i presenti dati sui cinghiali restano da confermare. In conclusione, il lavoro svolto supportato dall'analisi statistica, ha mostrato la validità del test *in-house* ELISA per la ricerca di anticorpi specifici di suino. Inoltre, i dati ottenuti mostrano un'elevata sieroprevalenza nei suini confermando la diffusa circolazione del virus dell'HEV negli allevamenti italiani.

P.40 EVIDENZA DI UN CASO DI EPATITE INFETTIVA DEL CANE IN SICILIA

Giuseppa Purpari, Francesco Mira, Patrizia Di Marco, Vincenza Cannella, Vincenzo Randazzo, Alessandro Coniglio, Annalisa Guercio, Santo Caracappa
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia A. Mirri, Palermo.

L'Adenovirus Canino di tipo 1 (CAV-1), appartenente al genere *Mastadenovirus*, famiglia *Adenoviridae*, è l'agente causale dell'epatite infettiva del cane (ICH). Il virus replica negli endoteli vascolari e negli epatociti, causando epatite necrotico emorragica acuta. I sintomi neurologici sono rari e sono causati da una vasculite del SNC. Negli ultimi anni, la diffusa vaccinazione ha ridotto la circolazione di CAV-1 ed i casi clinici segnalati sono diventati rari ed isolati. In questo lavoro, gli Autori descrivono un caso clinico in un cucciolo di 2 mesi, non vaccinato, con febbre, prostrazione, convulsioni, vomito, diarrea ed esito infausto in una settimana. A seguito dell'esame autoptico, sono stati prelevati campioni di vari organi (cuore, milza, polmone, rene, encefalo, fegato, intestino). Questi sono stati analizzati mediante PCR ed isolamento su colture cellulari sensibili, per la ricerca dei principali agenti virali causa di malattia nel cane: parvovirus, cimurro, CAV-1 e CAV-2, coronavirus, rotavirus. Tutti gli organi esaminati sono risultati positivi sia in PCR che all'isolamento su MDCK solo per CAV-1. Il genoma estratto è stato amplificato secondo la metodica descritta da Hu nel 2001, in grado di discriminare CAV-1 da CAV-2. L'isolamento su MDCK ha prodotto effetto citopatico al secondo passaggio ed il virus isolato è stato identificato mediante immunofluorescenza diretta e PCR. Il presente lavoro costituisce un contributo alla esigua disponibilità bibliografica sulle infezioni da CAV-1. La vaccinazione sistematica condotta nell'ultimo decennio ha sensibilmente ridotto i casi di malattia. Infatti, gli ultimi casi risalgono al 2001 in Basilicata e Puglia dove sono stati descritti rispettivamente un caso di CAV-1 con sintomatologia classica ed un altro caratterizzato anche da sintomi neurologici. La presente indagine dimostra l'attuale circolazione di CAV-1 e la sporadica comparsa di casi clinici. La vaccinazione sistematica con CAV-2 rimane il mezzo più efficace di protezione della popolazione canina e costituisce l'unico metodo di controllo della malattia.

COMPARTIMENTALIZZAZIONE VIRALE DURANTE L'INFEZIONE DA LENTIVIRUS DEI PICCOLI RUMINANTI IN PECORE CON SINTOMI NEUROLOGICI

Hugo Ramírez (a,d), Ramsés Reina (a), Luigi Bertolotti (c), Amaia Cenoz (a), Mirna-Margarita Hernández (a), Beatriz San Román (a), Idoia Glaria (a), Ximena de Andrés (a), Helena Crespo (a), Paula Jáuregui (a), Julio Benavides (b), Laura Polledo (b), Valentín Pérez (b), Juan F. García-Marín (b), Sergio Rosati (c), Beatriz Amorena (a), Damián de Andrés (a)

(a) *Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-UPNA-Gobierno de Navarra, Mutilva, Navarra, Spain*

(b) *Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana, León, Spain*

(c) *Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia, Ecologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Grugliasco, Torino*

(d) *Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular, FESC-UNAM, Estado de México, México*

La comparsa in Spagna di un focolaio di Visna, malattia che colpisce il sistema nervoso (CNS) dei piccoli ruminanti causata da virus appartenenti al gruppo dei *Small Ruminant Lentivirus* (SRLV), ha aumentato l'attenzione verso quest'infezione a causa della rapida comparsa di sintomi e alle ingenti perdite economiche. Al fine di chiarire il ruolo del genoma virale nel tropismo verso i tessuti del CNS, DNA genomico da 8 animali è stato esaminato tramite PCR al fine di amplificare una regione del gene dell'*envelope* (dominio di trans-membrana e SU V4, C4 e V5). In totale sono stati ottenuti 350 ampliconi provirali da CNS (midollo spinale e plesso corioideo), ghiandola mammaria, polmone, milza, sangue e cellule di lavaggio broncoalveolare (BAL). L'analisi delle sequenze ha presentato una divergenza media tra animali compresa tra l'11,1% e il 16,1%, mentre, all'interno di ogni animale, tra il 3,7 % e l'11,6%. Solo un animale ha presentato una divergenza superiore (30%), a causa di una coinfezione da parte di due diversi ceppi virali. Le analisi filogenetiche hanno mostrato una netta clusterizzazione delle sequenze per animale e per tessuto; in particolare, approcci Bayesiani hanno evidenziato l'origine dei cloni sequenziati, identificando BAL come sede del possibile progenitore infettante. Infatti, le sequenze di ogni animale sono state utilizzate per identificare lo stato dei progenitori di ogni singolo *clade*, impiegando un approccio normalmente utilizzato in studi di filo-geografia. I risultati tuttavia hanno evidenziato come le regioni analizzate non siano l'unico responsabile delle forme cliniche, considerato che non si è identificato il virus presente nel CNS come il progenitore e che non si sono identificati *pattern* aminoacidici caratteristici nelle sequenze provenienti dal CNS. In conclusione, questo studio ha dimostrato l'esistenza di compartimentalizzazione nella quasispecie di SRLV in animali infetti da Visna virus, e suggerisce l'evoluzione di ceppi neurotropi all'interno dell'ospite dopo la entrata del virus.

P.41 VALUTAZIONE COMPARATIVA DELLA RISPOSTA ANTICORPALE *IN VITRO* VERSO IL VIRUS AFTOSO E DELLA PRRS

Elisabetta Razzuoli (a), Silvia Dotti (a), Marco Bugnetti (b), Riccardo Villa (a), Maura Ferrari (a), Massimo Amadori (a)

(a) *Reparto Substrati Cellulari ed Immunologia Cellulare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia*

(b) *Reparto Agenti Alta Diffusione, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia*

La PRRS è una malattia infettiva che determina gravi perdite negli allevamenti suini di tutto il mondo. Nell'ambito di tale infezione, non sono ben noti i meccanismi di alterazione della risposta immunitaria e l'eventuale ruolo protettivo dell'immunità mucosale. Abbiamo pertanto deciso di valutare un possibile profilo immunosoppressivo di PRRSV, in un modello di risposta anticorpale (Ab) della memoria *in vitro*, in soggetti sieropositivi in seguito ad infezione sperimentale con ceppo BS/114/2000/S (tipo I). Le prove sono state eseguite con il medesimo approccio impiegato per la determinazione della risposta Ab *in vitro* verso il virus aftoso (FMDV) in soggetti vaccinati con ceppo O1 Manisa inattivato. Cellule mononucleate di sangue periferico e linfociti di tonsille palatine sono state seminate su piastre a 12 pozzetti ad una concentrazione di 2×10^6 cellule/ml e sottoposte ai seguenti trattamenti:

- 1) solo terreno (controllo negativo);
- 2) criolisato cellulare (controllo di risposta Ab aspecifica);
- 3) virus omologo a concentrazione pre-determinata per saggi immunologici *in vitro*;
- 4) virus omologo + IFN- α umano linfoblastoide a 1 UI/ml;
- 5) virus omologo + lo stesso IFN- α a 100 UI/ml.

Le cellule così trattate sono state incubate a 37°C con 5% di CO₂ per 12 giorni; si è quindi provveduto alla raccolta dei supernatanti cellulari per la determinazione della concentrazione di immunoglobuline (Ig) totali e degli Ab specifici. Inoltre, sono state determinate le Ab-producing Cells (APC, saggio ELISPOT). Nel modello PRRSV, il numero di cellule secernenti e la quantità di IgA totali spontaneamente secrete non differivano significativamente tra suini infetti e di controllo (test *t* $P > 0,05$). Si evidenziava inoltre una tendenza (non significativa) all'aumento della secrezione di IgA nei pozzetti trattati con il criolisato e con il virus. Risultava significativa invece la modulazione da parte di IFN- α a 100 e 1 UI/ml (ANOVA, $P < 0,05$) nei soggetti esposti al virus *in vivo*, ma non nei soggetti di controllo. Non è stata evidenziata in alcuna condizione sperimentale la produzione di Ab PRRSV-specifici, contrariamente a quanto evidenziato nel modello FMDV dove, nelle medesime condizioni sperimentali, era presente una forte risposta in anticorpi sieroneutralizzanti, modulata positivamente da IFN- α . A tale dato corrispondeva inoltre la presenza di APC specifiche per virus O¹ Manisa. I risultati ottenuti delineano un'ulteriore profilo immunosoppressivo di PRRSV da approfondire in studi successivi. In particolare, rimane da chiarire il meccanismo soppressivo della risposta Ab *in vitro* PRRSV-specifica, in presenza di produzione anticorpale complessiva non alterata dalla presenza del virus.

P.42 VAIOLO AVIARE: CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE DI CEPPI ISOLATI DA SPECIE DIVERSE DI VOLATILI DAL 2006 AL 2010 IN NORD ITALIA

Francesca Rizzo (a), Ana Moreno Martin (b), Antonio Lavazza (b), Dania Ameri (a), Ilaria Barbieri (b), Simona Zoppi (a), Maria Lucia Mandola (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia

Il vaiolo aviare (genere *Avipoxvirus*, famiglia *Poxviridae*) rappresenta una patologia virale emergente di diverse specie di uccelli domestici e selvatici, ospiti naturali dell'agente virale. La malattia può presentarsi in forma cutanea o difterica; la prima presuppone una via di contagio per contatto o morso di artropodi vettori, la seconda per ingestione o inalazione. Le due forme si possono osservare nello stesso soggetto con segni clinici variabili in relazione a virulenza del ceppo, suscettibilità d'ospite e altri fattori complicanti il quadro clinico. Le infezioni da *Avipoxvirus* (APV), causa di ingenti perdite economiche per l'industria del pollame e riscontrate in un sempre maggior numero di specie aviarie, diffondono verosimilmente mediante trasmissione interspecie, in base a quanto evidenziato da analisi filogenetiche. All'interno del genere sono riconosciute, ad oggi, 10 specie e risultano sequenziati interamente solo i genomi di un ceppo di *Fowlpox virus* e di un *Canarypox virus*.

In questo studio è stata realizzata la caratterizzazione genomica di 24 ceppi circolanti nelle Regioni Piemonte, Val d'Aosta, Liguria, Lombardia ed Emilia-Romagna, provenienti da diverse specie di volatili selvatici e domestici. I campioni, costituiti da materiale patologico positivo per poxvirus in microscopia elettronica o dai ceppi isolati tramite inoculazione sulla membrana corion-allantoidea di uova embrionate di pollo SPF, sono stati analizzati tramite PCR e successivo sequenziamento parziale del gene codificante la proteina P4b del core. L'albero filogenetico è stato costruito con il metodo *Neighbour-Joining* (500 replicati di *bootstrap*, modello di Jukes Cantor). L'analisi filogenetica ha rilevato che tutti i ceppi sequenziati appartengono al *clade* A, diviso a sua volta in 2 sottogruppi A1 e A2. Nello specifico 11 ceppi da pollo, 3 da cornacchia grigia, 1 da starna, 1 da cardellino e 1 da canarino sono compresi nel subclade A1, mentre 6 da colombo e 1 da tortora nel subclade A2. Da sottolineare la presenza di un ceppo isolato da canarino posizionato all'interno del *clade* A2 e non nel *clade* B, tipico dei *Canarypox virus*.

La caratterizzazione filogenetica di isolati storici di APV è importante per tracciare lo sfondo epidemiologico di una determinata area; tuttavia il gene codificante la proteina P4b del core, ampiamente utilizzato, sembrerebbe non rappresentare un marcatore genetico sufficientemente adeguato a definire la tassonomia evolutiva di un gruppo virale tanto eterogeneo e con genomi di tali dimensioni. Risulta pertanto indispensabile la ricerca di altri loci da impiegare come *markers* genetici di genere, obiettivo che presuppone una maggiore disponibilità di sequenze relative a più ampi tratti di genoma virale.

P.43 PCR-RFLP COME STRUMENTO DI DIAGNOSI E IDENTIFICAZIONE DI *MORBILLIVIRUS*

Angelo Romano, Serena Sant, Carla Grattarola, Barbara Iulini, Cristina Casalone, Stefania Bergagna, Simona Zoppi, Maria Goria
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

I *Morbillivirus* rappresentano un genere di virus a RNA appartenente all'ordine *Mononegavirales* e alla famiglia *Paramyxoviridae*. Le specie ad oggi descritte causano infezioni in mammiferi terrestri (uomo, cane) e marini (foche, cetacei).

Per identificare e differenziare due specie di *Morbillivirus*, il *Morbillivirus* dei Cetacei e il *Canine Distemper Virus* (Virus del cimurro del cane), è stata messa a punto una RT-PCR seguita da un'analisi RFLP, in grado di distinguere in modo univoco le due specie di virus. Dopo la retrotrascrizione del RNA genomico, viene amplificato mediante PCR un frammento della lunghezza di 287 bp interno al gene codificante per la Nucleoproteina (N gene) del virus. La sequenza di tale segmento, attraverso l'analisi *in silico* del modello è stata sottoposta ad analisi di restrizione teorica mediante l'utilizzo di *tool* disponibili in rete per l'identificazione dei siti di restrizione (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). In tal modo è stata evidenziata all'interno del segmento *target* la presenza di siti di restrizione riconosciuti dall'enzima *MseI* che possono conseguentemente essere utilizzati per distinguere le due specie di *Morbillivirus*. Infatti, lo studio del modello ha evidenziato per *CetaceanVirus* due siti di restrizione su N gene in posizione 796 e 969, mentre per CDV un sito in posizione 970, in entrambi i casi interni al segmento *target*. La digestione degli ampliconi specifici, prodotti dalla RT-PCR, utilizzando l'enzima di restrizione *MseI*, genera quindi nella sequenza di *Cetacean Morbillivirus* 3 frammenti (di 171, 71, 45 pb), mentre per CDV genera 2 frammenti (di 216 e 71 pb).

La PCR-RFLP è stata testata su campioni di organi di cani pervenuti presso il nostro laboratorio per la diagnosi di cimurro e di organi di cetacei spiaggiati lungo le coste tirreniche settentrionali.

Le positività riscontrate all'analisi con RT-PCR nei campioni, sia di cetacei che di cani, sono state sottoposte a conferma mediante sequenziamento degli ampliconi, i quali, attraverso il confronto con le sequenze depositate in GenBank, hanno dimostrato rispettivamente l'identità con *Dolphin Morbillivirus* (*accession nr.* EF469546.1) e *Distemper virus* (*accession nr.* AF014953).

Il metodo PCR-RFLP descritto si è dimostrato uno strumento diagnostico utile per la diagnosi e l'identificazione di virus appartenenti a specie diverse di *Morbillivirus* di interesse veterinario; tale approccio analitico mostra il vantaggio di non richiedere un metodo formulato *ad hoc* per ogni specie di *Morbillivirus* da rilevare, ma in tal modo con un unico strumento è possibile procedere a diagnosi specifica, oltre che a conferma di specificità per l'analisi di RT-PCR stessa.

P.44 IDENTIFICAZIONE DI UN *PESTIVIRUS* ATIPICO IN SIERO FETALE BOVINO DI ORIGINE AUSTRALIANA

Elisabetta Rossi (a), Giusy Cardeti (b), Katia Barbaro (b), Alessia Zepparoni (b), Monica Giammarioli (a), Gian Mario De Mia (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

Recentemente è stato proposto di aggiungere al genere *Pestivirus* una nuova specie denominata BVDV-3, in quanto *Pestivirus* atipici sono stati identificati in lotti di siero fetale bovino (SFB) in Brasile (D32/00_Hobi), Svezia (SVA/cont-08) e Italia (IZSPLV_To); in colture cellulari in Svizzera (Ch-Kaho/cont); in bovini infetti in Thailandia (Th/04_KhonKaen) e in un bufalo in Brasile (Brz buf 9). Al momento non si conoscono né l'impatto sulla salute animale né sulle produzioni zootecniche, ma l'identificazione di nuovi virus appartenenti a questo *cluster* indica che questa nuova specie virale circola più di quanto si pensasse con ripercussioni non solo per i piani di controllo della malattia, ma anche nei riguardi della biosicurezza di prodotti ad uso diagnostico e profilattico.

Nel presente lavoro viene riportata la segnalazione di due *Pestivirus* atipici ascrivibili a BVDV-3, in lotti di siero fetale bovino (FBS) di origine australiana. Lo studio è stato condotto mediante analisi delle regioni 5'UTR, Npro ed E2 del genoma virale. Il DNA purificato dopo amplificazione, è stato sottoposto a sequenziamento diretto su ABI PRISM 3130, analizzando tre cloni indipendenti. L'allineamento delle sequenze consenso ottenute è stato effettuato con Bioedit v.7.0.5.2. L'analisi filogenetica è stata condotta sugli allineamenti delle tre regioni includendo stipiti di riferimento rappresentativi di tutte le specie nell'ambito del genere *Pestivirus*, mediante il software PHYML v.2.4.4, secondo il criterio della massima verosimiglianza (ML).

La topologia dell'albero ha mostrato *cluster* ben separati riconducibili a PSC, BDV, BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3. I virus identificati nei due lotti di SFB di provenienza australiana, hanno mostrato una correlazione stretta con gli isolati IZSPLV-To e Ch-KaHo/cont con un *range* di similarità rispettivamente del 98,4%- 99,1 % e 97,2%- 97,6 %, mentre sono risultati più distanti dall'isolato thailandese Th/04_KhonKaen (91,6%-91,4%).

Il presente studio costituisce la prima segnalazione di lotti di SFB di origine australiana contaminato con BVDV-3 e fornisce una ulteriore evidenza che i *Pestivirus* atipici costituiscono una problematica emergente per i laboratori di colture cellulari. Le continue segnalazioni di virus ascrivibili a questa nuova specie, introducono inoltre una ulteriore criticità legata al fatto che una possibile introduzione accidentale di BVDV-3 nella popolazione bovina possa avere ripercussioni negative sui programmi di eradicazione nei confronti di questa malattia.

P.45 SIRNAS DIRETTI VERSO IL GENE PB1 INIBISCONO LA REPLICAZIONE DI VIRUS INFLUENZALE A/H3N2 IN LINEE CELLULARI A-549 E MDCK

Anna Ruggieri (a), Emiliana Falcone (b), Arianna Boni (b), Gabriele Vaccari (b), Livia Di Trani (b)

(a) *Dipartimento di Malattie Infettive Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimenare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

La comparsa di ceppi virali influenzali resistenti ai farmaci antivirali attualmente disponibili, rende necessario lo sviluppo di nuovi farmaci contro virus con potenziale pandemico. L'interferenza indotta da siRNA (*short interfering RNA*), rappresenta un'applicazione promettente nel campo delle strategie terapeutiche contro diverse infezioni virali, compresa l'influenza. La proteina PB1 è la subunità centrale del complesso della polimerasi nei virus influenzali di gruppo A (IAV); alcuni virus influenzali umani e la maggior parte di quelli aviari e suini, inoltre, hanno un ORF alternativo nel gene PB1 che codifica la proteina PB1-F2 funzionale; tale proteina rappresenta un *marker* di virulenza dei virus influenzali, in grado di favorire l'apoptosi cellulare *in vitro* e di aumentare la frequenza di infezioni batteriche secondarie nei pazienti. Scopo del lavoro è stato disegnare ed identificare siRNA diretti verso PB1 di virus A/H3N2 e saggiarne l'efficacia nell'inibire la replicazione virale *in vitro*. Mediante analisi di virus influenzali appartenenti a diversi sottotipi, sono state identificate sequenze geniche altamente conservate in tre diverse regioni del gene PB1, sulle quali sono stati disegnati e selezionati sei diversi siRNA, tre dei quali chimicamente modificati per aumentarne la stabilità e ridurre l'induzione di risposte cellulari aspecifiche. L'efficacia dei siRNA selezionati è stata valutata con qRRT *ad hoc* ottimizzata, in colture cellulari trasfettate con siRNA a diverse concentrazioni ed infettate con IAV. La riduzione del titolo virale è stata espressa dalla riduzione percentuale di mRNA/PB1 rispetto ai controlli. L'attività inibente dei siRNA nei riguardi della proteina PB1 è stata inoltre valutata in linee cellulari trasfettate con il plasmide pcDNA3-PB1, mediante *Immunoblotting* con antisieri specifici per PB1 e per NP di virus influenzali. Due dei sei siRNA studiati hanno mostrato maggiore attività inibente la replicazione virale, in funzione del titolo di virus infettante e della durata dell'infezione. In particolare, la trasfezione con siRNA1 ha indotto una riduzione di almeno il 60% del livello di mRNA PB1, rispetto alle colture controllo, sia nelle A549 che nelle MDCK, accompagnata anche da ridotta espressione delle proteine virali. I risultati ottenuti suggeriscono che il gene PB1 rappresenta un *target* appropriato per inibire la replicazione di IAV e forniscono utili informazioni per lo sviluppo di terapie anti-influenzali che utilizzano siRNA, una nuova classe di farmaci il cui impiego viene considerato promettente sia in campo infettivo che oncologico.

APPROCCIO DI AMPLIFICAZIONE SEQUENZA-INDIPENDENTE IN SUPPORTO ALLA VIROLOGIA CONVENZIONALE PER L'IDENTIFICAZIONE DI UN ROTAVIRUS GRUPPO A NELLA VOLPE

Cristiano Sabelli, Davide Lelli, Ana Moreno Martin, Antonio Lavazza, Mario Chiari, Daniela Gelmetti, Chiara Garbarino, Paolo Cordioli, Maria Beatrice Boniotti
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia

La tecnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) viene sempre più spesso utilizzata nella diagnosi delle malattie virali, in alternativa alle metodiche virologiche "classiche", per la sua sensibilità, specificità e rapidità. Ciò soprattutto in presenza di una diagnosi presuntiva mentre, nel caso di virus sconosciuti o divergenti, si tende ad applicare ancora un approccio "multipotente" (colture cellulari, uova embrionate, microscopia elettronica etc.), non essendo la PCR applicabile per la mancanza di informazione sulla sequenza genomica per il disegno dei *primers*. Alla necessità di conoscere a priori la sequenza genomica è possibile ovviare attraverso un'amplificazione sequenza-indipendente. In questo studio si descrive l'applicazione di tale approccio sperimentale, a conclusione di un *iter* diagnostico virologico, che ha permesso di identificare un rotavirus di gruppo A in una volpe. Nell'ambito della attività di sorveglianza per la rabbia silvestre, il cervello di una volpe che mostrava sintomi nervosi è stato dapprima esaminato, con esito negativo, per rabbia con immunofluorescenza diretta e per cimurro e malattia di Aujeszky con PCR. La semina su colture cellulari permetteva l'isolamento di un agente citopatico in 3-5 giornata sulla linea Marc 145. Inoltre, l'omogenato di cervello della volpe inoculato per via intracerebrale in topi svezzati, provocava il decesso entro il quinto giorno. L'analisi al microscopio elettronico del surnatante cellulare e dei cervelli dei topini ha evidenziato la presenza di virioni morfologicamente riconducibili alla famiglia *Reoviridae* che comprende virus a dsRNA con genoma segmentato. L'omogenato dei cervelli di topo è stato chiarificato su cuscino di saccarosio e l'RNA virale estratto è stato processato utilizzando il protocollo descritto da Victoria JG. La retrotrascrizione del genoma è stata condotta utilizzando una miscela di oligonucleotidi (K8N) costituiti da una porzione costante (K), utilizzata come innesco per la successiva reazione di PCR, e una porzione variabile, posta al 3', di 8 nucleotidi in ordine casuale, utilizzata per condurre una reazione sequenza-indipendente. Gli ampliconi sono stati caricati su gel d'agarosio e i frammenti con dimensione superiore a 500bp sono stati isolati e clonati in plasmidi pCR2.1 per il loro sequenziamento. Sono stati così sequenziati parzialmente 5 segmenti costituenti il genoma virale, da cui è stata dedotta la sequenza amminoacidica delle relative proteine codificate. L'analisi delle sequenze amminoacidiche ha permesso di identificare il virus analizzato come Rotavirus del gruppo A, con una omologia media del 95,5% con il virus aviario PO-13. L'ELISA per rotavirus gruppo A da cervello di volpe e topini e colture cellulari e l'esame immunistoichimico del cervello della volpe con siero di cavia anti-rotavirus A hanno poi confermato tale identificazione.

P.46 NOROVIRUS IN MOLLUSCHI BIVALVI: MONITORAGGIO CONDOTTO NEGLI ALLEVAMENTI DEL GOLFO DELLA SPEZIA

Laura Serracca (a), Roberta Battistini (a), Irene Rossini (a), Mariella Gorla (b), Serena Sant (b),
Alessandra Terarolli (a), Laura Tomei (a), Carlo Ercolini (a)

(a) *Laboratorio di Microbiologia Marina, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, La Spezia*

(b) *Laboratorio di Microbiologia Molecolare e Analisi Genomiche, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

Tra i prodotti ittici, i Molluschi Eduli Lamellibranchi (MEL), data la loro caratteristica di essere animali filtratori, sono senza dubbio l'alimento più a rischio per il potenziale accumulo di microrganismi patogeni per l'uomo. In questi ultimi anni le infezioni d'origine virale sono aumentate in tutto il mondo, soprattutto quelle sostenute da Norovirus (NoV) a seguito di consumo di MEL crudi. Gli studi di monitoraggio assumono quindi un'importanza strategica per conoscere la reale prevalenza della contaminazione virale nei molluschi, per capire la circolazione dei diversi ceppi e la loro diffusione, al fine di migliorare la sicurezza di questi prodotti. Nel corso del triennio 2008-2011, è stato condotto un monitoraggio atto a valutare la presenza di NoV in molluschi bivalvi della specie *Mytilus galloprovincialis* sia depurati che non, provenienti da 6 aree di allevamento site nel golfo di La Spezia. Da ogni campione sono stati prelevati 25 g di epatopancreas, il materiale ottenuto, dopo omogeneizzazione, è stato sottoposto a trattamento con tampone glicina 0,05 M pH 9,2, concentrazione dei virus mediante doppia precipitazione in PEG8000 e successive centrifugazioni ad alta velocità (10.000 x g). Il *pellet* finale è stato risospeso in acqua ultrapura e sottoposto ad estrazione degli acidi nucleici mediante kit commerciali che sfruttano il legame selettivo dell'RNA a membrane di silice. L'acido nucleico è stato infine analizzato mediante RT *booster*-PCR ed i campioni risultati positivi sono stati sottoposti sia a quantificazione mediante *Real-Time* RT-PCR che a sequenziamento genico. Il genoma di NoV è stato rilevato nell'8,6% (31/360) dei campioni analizzati, tra questi 16 provenivano direttamente dalle aree di allevamento mentre gli altri 15 erano mitili sottoposti a trattamenti di depurazione. Ventitre campioni positivi sono stati confermati con sequenziamento genico come appartenenti al genogruppo II e 4 di questi anche al genogruppo I. Inoltre tra i campioni appartenenti al genogruppo II, il 21,7% (5/23) è stato identificato come appartenente al genotipo G-II.4, che risulta essere il maggior responsabile delle infezioni da NoV in tutto il mondo. In accordo con altri studi i campioni contaminati da NoV sono risultati distribuiti soprattutto nei mesi invernali, autunnali e primaverili quando la temperatura delle acque risultava più bassa. A seguito dei dati ottenuti è stato intrapreso un monitoraggio delle aree a rischio per l'individuazione degli scarichi inquinanti al fine di incrementare le strategie preventive e ridurre il rischio di contaminazione virale dei MEL.

P.47 INDAGINE SULLA PRESENZA DI VIRUS ENTERICI IN ALIMENTI VEGETALI “READY TO EAT”

Laura Serracca, Mariella Goria, Irene Rossini, Roberta Battistini, Gabriella De Montis, Marco Imberciadori, Carlo Ercolini

Laboratorio di Microbiologia Marina, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, La Spezia

Gli alimenti possono essere veicolo di vari agenti patogeni di natura batterica, protozoaria e virale che provocano l'insorgenza nell'uomo di diverse patologie e, nonostante i progressi fatti nel settore della prevenzione, rappresentano ancora un serio problema di sanità pubblica. Tra gli agenti virali, particolare interesse rivestono i virus enterici quali Norovirus, il virus dell'epatite A, Adenovirus e virus dell'epatite E. Negli ultimi anni sono stati riportati diversi episodi epidemici causati da virus enterici umani legati al consumo di alimenti. La contaminazione degli alimenti può avvenire in diversi momenti della filiera alimentare: si parla di contaminazione primaria quando sono le materie prime stesse ad essere contaminate; al contrario si parla di contaminazione secondaria quando la contaminazione avviene durante le fasi di preparazione o di distribuzione. Tra gli alimenti che possono essere contaminati all'origine vi sono naturalmente i prodotti ortofrutticoli, in quanto possono venire in contatto con acque reflue o indirettamente da suoli contaminati da queste. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di verificare la presenza dei virus citati precedentemente in campioni di frutta essiccata e insalata di IV gamma pronta al consumo.

Sono stati analizzati con test bio-molecolari 80 campioni di alimenti di origine vegetale italiani e di importazione così suddivisi: 25 campioni di frutta secca (15 pomodori secchi e 10 datteri) e 55 campioni di insalata IV gamma. Per ciascun campione sono stati prelevati venticinque grammi, tagliati in piccoli pezzi ed eluiti con un *buffer* costituito da glicina ed estratto di carne a pH 9,5. L'eluato è stato concentrato con glicole polietilenico (PEG 8.000), e l'RNA virale è stato estratto e purificato utilizzando un kit commerciale (Roche). Gli acidi nucleici sono stati poi amplificati per rilevare l'RNA di HAV, Norovirus genogruppo GI e GII, HEV e Adenovirus; la positività è stata confermata da sequenziamento. I risultati di questo studio evidenziano su sei campioni di pomodori secchi presenza di Norovirus GII (AN: EU872461 e AN: AB447463). Tutti i campioni sono risultati inoltre negativi per HAV, HEV e Adenovirus I dati ottenuti hanno dimostrato che i virus enterici possono ritrovarsi e persistere su pomodori secchi e suggeriscono un possibile rischio per i consumatori di trasmissione di Norovirus attraverso il consumo di questi alimenti, pertanto il miglioramento delle pratiche agricole sul campo e l'utilizzo di buone prassi igieniche lungo tutta la catena alimentare sono necessarie per ottenere prodotti *virus-safe* e per ridurre il rischio per la salute pubblica.

P.48 ANALISI MEDIANTE FACS DELLE SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE IN RISPOSTA ALL'INFEZIONE SPERIMENTALE CON VIRUS DELLA PESTE SUINA AFRICANA

Giulio Severi, Carmen Iscaro, Claudia Pellegrini, Giovanni Curina, Beatrice Paternesì,
Gian Mario De Mia

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

La Peste Suina Africana (PSA) riveste ancora oggi un ruolo cruciale e condizionante rispetto alla zootecnia di moltissimi Paesi del mondo. Inoltre rappresenta un rischio costante per i cosiddetti Paesi a “zootecnia avanzata” dotati di sistemi di controllo e sorveglianza evoluti che ne hanno consentito l’eradicazione ma che non escludono definitivamente la possibilità di una eventuale reintroduzione. Per i motivi sopra esposti risulta quanto mai importante indagare in maniera approfondita i meccanismi che sono alla base della regolazione e della modulazione della risposta immunitaria del suino in corso di infezione da virus PSA.

In particolare nel corso di questo studio sono stati raccolti e analizzati campioni provenienti da un gruppo di 10 animali sottoposti a infezione sperimentale con virus PSA stipite Kenia 05. Gli animali sono stati stabulati presso l’unità di massima sicurezza dell’IZSUM e dopo un periodo di ambientamento di circa 10 giorni sono stati sottoposti a prelievo ematico a tempo 0 e, dopo l’infezione sperimentale, a prelievi ogni 72 ore per tutta la durata dell’esperimento. I campioni ematici prelevati sono stati sottoposti ad analisi citofluorimetriche e a saggi di PCR, ELISA Ab, ELISA citochine. Inoltre sono stati eseguiti tamponi nasali per valutare l’escrezione virale mediante PCR. Utilizzando un analizzatore laser FACS (*fluorescence activated cell scanning*) sui *buffy coat* di ciascun animale, sono state eseguite indagini citofluorimetriche basate sulla coniugazione di anticorpi legati a specifici fluorocromi in grado di evidenziare le diverse sottopopolazioni linfocitarie. In dettaglio sono state analizzate 4 sottopopolazioni linfocitarie (CD3, CD4, CD8, CD21) al fine di valutare la risposta immunitaria.

I risultati ottenuti mostrano come 5 suini rispondano “energicamente” all’infezione e come la capacità di risposta del sistema immunitario di questi soggetti, espressa come attivazione e proliferazione delle varie sottopopolazioni linfocitarie, consenta loro di superare l’infezione. Negli altri 5 soggetti invece, possiamo osservare come vi sia un progressivo “cedimento” del sistema immunitario tale da consentire a questi animali una sopravvivenza non superiore ai 15 giorni mostrando in particolare una forte riduzione soprattutto a carico della sottopopolazione dei linfociti CD8+. Infine è stato possibile osservare una moderata virulenza dello stipite Kenia 05 confermata peraltro dai segni clinici, dalla viremia e dall’andamento delle sottopopolazioni linfocitarie.

P.49 ANALISI SPAZIALE DEI FOCOLAI DI SCRAPIE NELL'AMBITO DELLA SORVEGLIANZA NELLA ASL DI SASSARI (SARDEGNA) NEGLI ANNI 1995-2010

Francesco Sgarangella, Giuseppe Bitti, Gavino Bennati, Sebastiana Mossa, Daniela Marongiu, Antonio Satta, Sergio Masala
Servizio Sanità Animale, ASL, Sassari

Dall'agosto 1995, data in cui venne registrato il primo caso di Scrapie, al dicembre 2010, nella ASL di Sassari sono stati individuati complessivamente 88 focolai di malattia. Durante i 15 anni oggetto dell'osservazione, a seguito delle modifiche delle disposizioni normative, si è passati dalla sorveglianza passiva, che prevedeva soltanto i controlli sugli animali sospetti, alla sorveglianza attiva, con campionamenti minimi da eseguire negli animali morti in allevamento o inviati al macello. Sono stati eseguiti complessivamente 4.792 test diagnostici, con una intensità dei controlli che può considerarsi non omogenea su tutto il territorio. Questo lavoro si propone di offrire alcuni spunti di riflessione a seguito della visualizzazione grafica della localizzazione delle aziende sede di focolaio e dell'entità dei campionamenti eseguiti.

I dati riguardanti le aziende sottoposte a vigilanza per Scrapie sono stati registrati nella Banca Dati Locale (BDL) del Servizio di Sanità Animale, un sistema informativo che ha integrato quelli inseriti nella Banca Dati Nazionale (BDN) degli ovi-caprini. È stata così possibile la realizzazione di mappe tematiche con la metodica GIS, attraverso la sovrapposizione di strati che rappresentano le aziende sottoposte a vigilanza e quelle sede di focolaio, con *layers*, messi a disposizione dal Servizio Cartografico della Regione Sardegna, che riproducono il contesto geografico e orografico del territorio.

Sono state realizzate mappe tematiche relative alla distribuzione, sul territorio della ASL di Sassari, delle aziende controllate per scrapie e dei focolai di malattia rilevati negli anni 1995-2010.

Le mappe hanno evidenziato una maggiore concentrazione di focolai in un'area piuttosto definita della Asl di Sassari, ai confini tra il Mejjolu e il Monte Acuto, comprendente principalmente i Comuni di Bonorva, Nughedu S. Nicolò, Ittireddu e Ozieri, in una fascia altimetrica compresa tra i 300 e i 600 m/slm. Queste porzioni di territorio non sembrerebbero sempre corrispondere con quelle zone dove più assiduo è stato il campionamento. In prima analisi è stato calcolato il rischio di malattia, nel *cluster* individuato, facendo riferimento agli allevamenti presenti rispetto a quelli situati negli altri comuni della ASL (*Odds Ratio* 11,15). Una successiva valutazione, da cui emergerebbe una sostanziale conferma del dato precedente, ha riguardato i risultati della sorveglianza attiva, con il raffronto tra il numero di focolai e la percentuale di test eseguiti, in aree caratterizzate da differente percentuale di campionamento.

CARATTERIZZAZIONE ANTIGENICA DELLA PROTEINA CAPSIDICA ORF2 DEL VIRUS DELL'EPATITE E (HEV)

Lidia Stercoli, Giulia Pezzoni, Emiliana Brocchi
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia

Il virus dell'epatite E (HEV) è l'agente eziologico di un'infezione acuta nell'uomo a trasmissione oro-fecale. La possibilità che il suino rappresenti un serbatoio naturale della malattia ed un veicolo della trasmissione zoonosica suggerisce maggior attenzione verso gli strumenti di studio e diagnosi dell'infezione da HEV nei suini. Il genoma di HEV comprende tre *Open Reading Frame* (ORF); la proteina capsidica ORF2 è l'antigene maggiormente immunogeno durante l'infezione nell'uomo e nel suino. Obiettivo di questo lavoro è stato lo studio delle caratteristiche antigeniche della proteina ORF2, utilizzando Anticorpi Monoclonali (AcM) e antigeni ricombinanti corrispondenti alla proteina intera e a segmenti clonati da un HEV di origine suina, prodotti in diversi sistemi di espressione.

A tal fine sono stati prodotti AcM verso l'antigene ricombinante ORF2 intero (1-660 aa) espresso in *E. coli*. Sulla base delle combinazioni di reattività con gli antigeni ricombinanti che riproducono porzioni diverse della ORF2 è stato possibile mappare i siti riconosciuti dagli AcM, in particolare: due anticorpi riconoscono siti localizzati nella regione N-terminale 1-111 aa, 25 AcM hanno siti bersaglio nella regione 112-393 aa e di questi sei riconoscono il frammento 112-232 aa; altri 14 anticorpi mappano nella regione 394-608 aa, mentre nessuno si è dimostrato reattivo verso la porzione C-terminale (609-660 aa). Successivamente sono state approfondite le potenzialità di sfruttamento diagnostico di un AcM (4E12) che mappa nella regione 394-608: in test ELISA, sieri suini positivi competono con questo AcM indicando che l'epitopo bersaglio è immunodominante e l'AcM un candidato ottimale per l'allestimento di test sierologici competitivi; inoltre lo stesso 4E12, adsorbito a fase solida, lega efficacemente la ORF2 espressa in *E. coli* e in Baculovirus esponendola correttamente al riconoscimento di sieri positivi. Infine, l'epitopo 4E12 è presente in più copie sull'antigene ricombinante ORF2 prodotto in Baculovirus indicando la formazione di strutture polimeriche della proteina in questo sistema di espressione. Una preliminare caratterizzazione dell'immunogenicità della ORF2 nei suini è stata effettuata esaminando 414 sieri suini di campo, in ELISA indiretta, verso la proteina ricombinante intera e tronca. Il 50% (205/414) dei sieri è risultato reattivo verso l'antigene ORF2 (112-608) espresso in Baculovirus, mentre il 48% ed il 45% hanno reagito rispettivamente con la ORF2 intera e tronca (394-660 aa) espresse in *E. coli*, con una concordanza di risultati con i tre antigeni pari al 90,6%. L'alta reattività dei sieri suini positivi verso la ORF2 tronca (394-660 aa), paragonabile a quella con la ORF2 intera, suggerisce che questa regione è fortemente immunogena, mentre l'espressione di epitopi conformazionali nell'antigene prodotto in baculovirus potrebbe giustificare il maggior numero di sieri positivi rilevati. Ulteriori indagini devono essere condotte per valutare le proprietà antigeniche delle altre porzioni della ORF2.

P.50 RISCONTRO DI LINFOSARCOMA BOVINO: IMPLICAZIONI EPIDEMIOLOGICHE E FORENSI

Gianni Tumino (a), Giorgio Blandino (b), Elisabetta Manuali (c), Moira Bazzucchi (c), Giuseppe Cascone (a), Francesco Feliziani (c)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Ragusa

(b) Azienda Sanitaria Provinciale, Ragusa

(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Il riscontro di linfosarcoma nel bovino non è frequente nel nostro Paese ed è stato occasionalmente descritto solo come reperto di macellazione. La forma sporadica si riscontra in giovani soggetti mentre la forma enzootica colpisce prevalentemente i bovini adulti ed è di origine virale. L'agente eziologico, il virus della Leucosi Bovina Enzootica (BLV), è un Retrovirus: il riscontro di lesioni sarcomatose è comunque difficile sia perché l'evoluzione sarcomatosa non è riscontrabile in tutti gli animali infetti sia perché l'esame sierologico evidenzia l'infezione in stadi precoci della malattia mentre le lesioni sarcomatose appaiono dopo un lungo periodo di incubazione. L'esame istologico, infine, non consente di differenziare la forma sporadica da quella enzootica e per questo motivo, in sede di conferma, è indispensabile prevedere l'utilizzo in associazione di test diversi.

La Leucosi Bovina Enzootica (LEB) è una malattia soggetta a piano di eradicazione dal 1997 e la prevalenza di allevamenti infetti è ormai estremamente ridotta. Questa situazione rende ancor più raro il riscontro di linfosarcoma di origine virale.

Nel corso del 2009, in un'azienda situata in provincia di Ragusa precedentemente classificata come ufficialmente indenne da LEB, è stata riscontrata un'elevata incidenza di infezione. La ASL di competenza, di concerto con la locale sezione dell'IZS, ha collezionato campioni biologici in sede di abbattimento degli animali infetti e li ha inviati al centro di referenza nazionale per gli esami di approfondimento.

Su questi campioni sono stati effettuati sia test istologici che biomolecolari che hanno permesso di evidenziare lesioni linfosarcomatose associabili al BLV.

Il risultato di questi esami ha permesso di integrare l'indagine epidemiologica effettuata anche in collaborazione con degli agenti del NAS, avendo come obiettivo la conoscenza della dinamica dell'infezione all'interno dell'allevamento.

Pur dovendo rimanere nell'ambito delle ipotesi, non avendo riscontri documentali incontrovertibili, l'eventualità che l'infezione da BLV fosse presente in azienda da lungo tempo sembra essere la più probabile. A sostegno di questa ipotesi si possono portare elementi di tipo epidemiologico: l'elevata incidenza sierologica riscontrata non è compatibile con la normale morbilità dell'infezione ed inoltre il riscontro di lesioni sarcomatose, che si possono evidenziare solo dopo periodi di incubazione misurabili in anni, dimostra che i soggetti infetti siano venuti in contatto con il virus in un periodo lontano nel tempo.

I motivi per i quali l'eventuale presenza dell'infezione possa essere rimasta nascosta in allevamento sono attualmente oggetto di indagine della magistratura che tiene comunque in debito conto le evidenze diagnostiche sopra evidenziate.

INFEZIONI CUTANEE DA VIRUS EPITELIOTROPI IN RUMINANTI SELVATICI DELL'ARCO ALPINO: DIAGNOSI E CARATTERIZZAZIONE GENETICA

Filippo Turrini (a), Laura Gallina (a), Alessandro Bianchi (b), Paolo Cordioli (b), Mario Chiari (b), Antonio Lavazza (b), Alessandra Scagliarini (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi, Bologna*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia*

Le famiglie *Papillomaviridae* e *Poxviridae* comprendono numerose specie di virus a DNA che presentano uno spiccato epiteliotropismo e uno spettro d'ospite ristretto che coinvolge numerose specie di mammiferi. La cute dei mammiferi rappresenta quindi la nicchia ecologica di Parapoxvirus e Papillomavirus e ne costituisce il microambiente evolutivo. Dal 2008 nel Parco dello Stelvio sono stati rilevati casi d'infezione cutanea caratterizzati da lesioni proliferative, in ruminanti selvatici appartenenti alle famiglie *Cervidae* (*Cervus elaphus*) e *Bovidae* (*Capra ibex* e *Rupicapra rupicapra*). La microscopia elettronica ha rilevato virioni attribuibili al genere Parapoxvirus nel materiale patologico di sette animali. Nei campioni patologici, provenienti da sette cervi, due stambecchi e un camoscio, già esaminati in microscopia elettronica e indipendentemente dal risultato positivo o negativo, è stato possibile amplificare mediante PCR una porzione del gene B2L, specifico del genere Parapoxvirus. In un cervo è stata identificata una lesione di tipo papillomatoso risultata positiva per Papillomavirus sia in microscopia elettronica, sia in PCR con l'amplificazione di parte del gene strutturale L1. Il successivo sequenziamento ha permesso di caratterizzare i ceppi isolati, evidenziando un'identità aminoacidica pari al 100% e al 97,8% rispettivamente col ceppo RD86 di Parapoxvirus del cervo rosso della Nuova Zelanda (PVNZ) e col Papillomavirus del capriolo (CcPV). I risultati ottenuti hanno dimostrato la presenza di PVNZ in ruminanti selvatici per la prima volta al di fuori della Nuova Zelanda. Tutti i Parapoxvirus responsabili delle lesioni in stambecchi e camoscio hanno mostrato un'identità aminoacidica elevata e variabile dal 97,3 al 98,4% col ceppo di referenza di ORF Virus NZ2 (OV). Una caratterizzazione genica più approfondita è stata realizzata mediante PCR e sequenziamento dei geni codificanti il fattore di virulenza *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dei Parapoxvirus e la proteina trasformante E5 dei Papillomavirus. I parapoxvirus isolati dai cervi hanno mostrato un'identità aminoacidica variabile con RD86 e l'analisi filogenetica ha suggerito che il PVNZ potrebbe rappresentare il prodotto della ricombinazione di due specie distinte di Parapoxvirus (PCPV e BPSV). La sequenza aminoacidica della proteina E5 del Papillomavirus, identificato nelle lesioni del cervo è risultata identica del 100% all'ortologa del Papillomavirus bovino di tipo 1 (BPV-1) e solo del 40% alla E5 del CcPV. I nostri risultati dimostrano come l'analisi filogenetica, basata sul sequenziamento di un singolo gene, non sia in grado di collocare con esattezza un isolato all'interno di una specie virale. Inoltre, sembrano avvalorare il ruolo della ricombinazione interspecifica nell'evoluzione di questi DNA virus epiteliotropi mentre i cervidi si confermano ospiti permissivi per specie virali diverse e potenziali *mixing vessel* per gli eventi di ricombinazione.

VIRUS INFLUENZALI H1N1PDM E RIASSORTANTI ISOLATI DAL SUINO

Gabriele Vaccari (a), Ana Moreno Martin (b), Silvia Faccini (b), Loris Alborali (b), Daniele Nigrelli (b), Maria Beatrice Boniotti (b), Emiliana Falcone (a), Arianna Boni (a), Davide Lelli (b), Annalisa Guercio (c), Giuseppa Purpari (c), Paolo Cordioli (b), Livia Di Trani (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia*

(c) *Dipartimento di Virologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo*

Sin dai primi giorni della circolazione del virus pandemico H1N1-2009 nella popolazione umana, è stata segnalata la trasmissione del virus dall'uomo a diverse specie animali (suino, tacchino, cane, gatto).

La trasmissione di virus influenzali dall'uomo agli animali non rappresenta solo un problema limitato al settore zootecnico, ma un problema di sanità pubblica per il ruolo di "serbatoio" dei virus influenzali rappresentato soprattutto dalla specie suina. Il suino non ha sinora dimostrato un ruolo epidemiologico importante nella diffusione di (H1N1)pdm all'uomo; tuttavia ciò non esclude, che a seguito dell'evoluzione virale, o di fenomeni di riassortimento, da tale specie emergano e si trasmettano all'uomo virus con diversa e/o maggiore patogenicità.

L'identificazione, in tempi brevi, dei nuovi ceppi influenzali circolanti nel suino, rappresenta quindi il cardine dell'attività di sorveglianza per i virus influenzali; a tal fine è stato ottimizzato un sistema per il sequenziamento rapido dell'intero genoma di virus (H1N1)pdm, i cui risultati vengono riportati nel lavoro.

In Italia, il primo caso di infezione da (H1N1)pdm nel suino è stato individuato in un allevamento della Lombardia a dicembre 2009; sino ad agosto 2010 sono stati isolati n°8 virus H1N1pdm in suini allevati in Lombardia ed in Sicilia.

Dopo replicazione degli isolati sia su uova embrionate SPF e/o colture cellulari (MDCK e CACO-2), l'RNA_v è stato estratto utilizzando il kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit; sono state quindi allestite n. 46 RT-PCR *one-step* con *primers* specifici per amplificazione dell'intero genoma virale. Il sistema prevede che le fasi di amplificazione, caricamento in gel per elettroforesi, purificazione e marcatura, siano effettuate in piastre 96x, al fine di accelerare le operazioni di laboratorio.

L'analisi delle sequenze e di filogenesi del genoma completo degli 8 isolati virali ha consentito di caratterizzarli come virus H1N1pdm, con elevata percentuale di omologia (sino al 100%), per tutti i segmenti genici, con i virus H1N1pdm circolanti nella popolazione umana.

L'attivazione della sorveglianza virologica negli allevamenti suini ha inoltre consentito, per la prima volta in Europa, l'isolamento di un "nuovo" virus riassortante (A/H1N2), caratterizzato da 7 geni derivati da virus (H1N1)pdm e da gene della Neuraminidasi (N2) derivato da virus influenzali suini H1N2 isolati recentemente in Italia e Svezia.

I casi di *reverse zoonosis* riportati, evidenziano, ancora una volta, l'importanza della stretta collaborazione tra sanità pubblica veterinaria ed umana, partecipazione in grado di garantire il controllo tempestivo e coordinato delle infezioni zoonosiche nel nostro Paese.

DINAMICHE EVOLUTIVE DELL'INFLUENZA AVIARE SOTTOTIPO H9N2 IN MEDIO ORIENTE

Viviana Valastro (a), Isabella Monne (a), Alice Fusaro (a), Annalisa Salviato (a), Alessia Schivo (a), Nadim Mukhles Amarin (b), Carlos Gonzalez (c), Mahmoud Moussa Ismail (d,e), Abdu-Rahaman Al-ankari (d), Mohamed Hamad Al-Blowi (f), Owais Ahmed Khan (g), Ali Safar Maken Ali (h), Afshin Hedayati (i), Juan Garcia Garcia (j), Ghulam M. Zia (k), Abdolhamid Shoushtari (l,n), Kassem Nasser Al Qahtani (m,o), Ilaria Capua (a), Edward C. Holmes (l,m), Giovanni Cattoli (a)

(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

(b) *Boehringer Ingelheim, Regional Technical Manager, Dubai, United Arab Emirates*

(c) *Boehringer Ingelheim, S.A de C.V., Distrito Federal RFC, Mexico*

(d) *College of Veterinary Medicine and Animal Resources, King Faisal University, Al-Hasa, Saudi Arabia*

(e) *College of Veterinary Medicine, University, Kafrelsheik, Egypt*

(f) *Ministry of Agriculture, Riyadh, Saudi Arabia*

(g) *College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, College Station, Texas, USA*

(h) *Iran FAO Office Animal Health Consultant on AI & Other TADs, Tehran, Iran*

(i) *IVO, Iran Veterinary Organization, Tehran, Iran*

(j) *Food and Agricultural Organization, Emergency Centre for Transboundary Animal Disease, Chief Technical Advisor for Afghanistan & Pakistan*

(k) *Central Laboratory Director CVDRL, Afghanistan*

(l) *Center for Infectious Disease Dynamics, Department of Biology, The Pennsylvania State University, Mueller Laboratory, University Park, Pennsylvania*

(m) *Fogarty International Center, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland*

(n) *Department of Avian Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran*

(o) *Department of Animal Resources, Ministry of Environment, Doha, Qatar*

I virus influenzali di sottotipo H9N2 causano gravi danni all'avicoltura in Medio ed Estremo Oriente fin dalla metà degli anni '90 e, seppur sporadicamente, sono stati responsabili di casi di infezione nei mammiferi e nell'uomo generando una sempre maggiore preoccupazione circa le potenzialità pandemiche di questo sottotipo. Ad oggi, le caratteristiche genetiche dei virus H9N2 circolanti in Medio Oriente ed Asia Centrale sono scarsamente conosciute. Questo studio ha avuto l'obiettivo di fornire nuovi dati sulle dinamiche spaziali ed evolutive dei virus H9N2 isolati tra il 1998 e il 2010 in nove Paesi del Medio Oriente e Asia Centrale.

A tal fine, le sequenze dell'intero genoma di 105 H9N2 Medio Orientali sono state analizzate utilizzando una combinazione di approcci filogenetici e coalescenti. Lo studio filogenetico ha rivelato che molteplici fenomeni di riassortimento genico, sia intra-sottotipo che inter-sottotipo, hanno interessato i virus H9N2 Medio orientali. L'analisi delle sequenze aminoacidiche dell'emoagglutinina ha consentito di identificare mutazioni descritte in precedenza come responsabili dell'acquisizione, da parte del sottotipo H9N2, di una maggiore capacità di infettare i mammiferi e di trasmettersi nei furetti. Mutazioni

associate alla resistenza agli antivirali sono state identificate nella proteina M2 di 20 dei 105 virus analizzati. L'indagine filogeografica ha permesso di riconoscere una stretta correlazione tra *clusters* genetici e origine geografica dei virus analizzati testimoniando il verificarsi di un certo grado di segregazione geografica dell'H9N2 in Medio Oriente.

Le analisi epidemiologico-evolutive effettuate nel presente studio hanno evidenziato che gli H9N2 circolanti in Medio Oriente sono caratterizzati da una notevole instabilità genetica con conseguente emergenza di ceppi virali riassortanti e potenzialmente dotati di caratteristiche molecolari capaci di ampliare il naturale spettro d'ospite del virus. Questi dati sottolineano l'urgente necessità di intensificare i programmi di sorveglianza per il sottotipo H9N2 in Medio Oriente al fine di monitorare il suo evolversi e di riconoscere tempestivamente l'emergere di varianti virali potenzialmente patogene per l'uomo.

P.51 BRONCHITE INFETTIVA AVIARE: NUOVI SIEROTIPI DI VIRUS E LORO POTENZIALE USO COME VACCINO

Antonio Zanella

Istituto di Microbiologia Veterinaria, Università degli Studi, Milano

Viene riferito l'isolamento di nuovi sierotipi di virus della bronchite infettiva (IBV) in Italia. Le caratteristiche dei ceppi sono state investigate dal punto di vista molecolare e antigenico in confronto con alcuni dei più comuni sierotipi di IBV diffusi in questi ultimi 15 anni in Europa oltre al sierotipo Massachusetts e Arkansas. Due ceppi AZ 40/05 e FO 70856/05 sono correlati dal punto di vista molecolare (nucleotidi 98% aminoacidi 100% di omologia) al ceppo cinese Qx nel frammento S1 della proteina *spike*, ma differenti da altri sierotipi presi in considerazione (dal 77 al 86% per quanto riguarda gli aminoacidi). Anche dal punto di vista sierologico questi ed altri isolati sono risultati molto simili al sierotipo Qx. Un aspetto interessante è che i due isolati si sono adattati molto rapidamente (2 passaggi) all'uovo embrionato, raggiungendo titoli insolitamente elevati ($>10^8$ EID₅₀) in 6-7 passaggi, con chiare lesioni specifiche nell'embrione. I suddetti ceppi, unitamente al ceppo AZ 27/98 (It-02 simile) e il ceppo AZ 23/74, sono stati attenuati stabilmente attraverso 100 passaggi in ovo. Prove preliminari di vaccinazione hanno dimostrato che tali ceppi attenuati non inducono alcuna lesione in trachea. Il grado di attenuazione del virus sembrerebbe variare tra i differenti vaccini commerciali. Sia la stabilità dell'attenuazione del virus che la sua efficacia sarebbero un aspetto molto importante da prendere in considerazione quando il vaccino viene licenziato all'uso in campo.

INDICE DEGLI AUTORI

Acutis, P.L.; 71; 72
Agnello, S.; 11
Agrimi, U.; 35; 64; 69
Al Qahtani K.N.; 94
Al-ankari A.-R.; 94
Al-Blowi, M.H.; 94
Alborali, L.; 21; 92
Altigeri, A.; 27
Amaddeo, D.; 27
Amadori, M.; 79
Ameri, D.; 80
Amorena, B.; 78
Angeloni, G.; 12
Angioi, P.; 39
Angiolillo, S.; 72
Antognetti, V.; 31
Arcangeli, G.; 13
Aronica, V.; 51
Autorino, G.L.; 14; 27
Balboni, A.; 17
Bano, L.; 15
Barbaro, K.; 82
Barbieri, I.; 22; 26; 80
Barcaioli, R.; 31
Battilani, M.; 17
Battistini, R.; 85; 86
Bazzucchi, M.; 48; 90
Beato, S.; 19
Bellacicco, A.L.; 61
Benavides, J.; 78
Bennati, G.; 88
Bergagna, S.; 81
Bertasi, B.; 42
Bertolini, S.; 71
Bertolotti, L.; 18; 32; 78
Bertuzzi, S.; 71
Besozzi, M.; 56
Bianchi, A.; 91
Biasini, G.; 19; 59
Bignami, G.; 34
Bitti, G.; 88
Biz, R.; 15
Blandino, G.; 90
Bonfante, F.; 19; 46
Boni, A.; 83; 92
Boniotti, B.; 20; 67
Boniotti, M.B.; 84; 92
Botti, G.; 20; 26
Bourhy, H.; 37
Bovo, G.; 70
Bregoli, M.; 33
Bresaola, M.; 21
Briscolini, S.; 73
Brocchi, E.; 22; 26; 50; 54; 74; 75; 89
Brozzi, A.; 27
Brutti, A.; 13
Bugnetti, M.; 79
Buonavoglia, C.; 61; 62
Cabassi, C.S.; 44
Caciolo, D.; 14
Campo, F.; 11
Cancedda, G.M.; 23; 57
Canelli, E.; 54
Cannella, V.; 24; 51; 77
Canu, M.; 39
Capobianchi, M.; 4; 27
Capocefalo, A.; 25; 44; 45
Cappellozza, E.; 13; 70
Capua, I.; 33; 37; 94
Capucci, L.; 26
Caracappa, S.; 11; 77
Carboni, M.V.; 39
Cardeti, G.; 27; 31; 82
Carletti, F.; 27
Caroggio, P.; 72
Carrozza, M.L.; 18
Carta, A.; 57
Casalone, C.; 40; 64; 81
Casciari, C.; 28
Cascone, G.; 90
Castilletti, C.; 27
Catella, A.; 21
Catella, C.; 61
Catelli, E.; 29

Cattoli, G.; 33; 37; 70; 94
 Cavadini, P.; 26
 Cavirani, S.; 28; 44
 Cecchettin, K.; 29
 Cecchinato, M.; 29
 Ceci, C.; 30; 43
 Cenož, A.; 78
 Cersini, A.; 31
 Cerutti, F.; 32
 Chetta, M.; 51
 Chianini, F.; 35
 Chiappini, B.; 64; 69
 Chiari, M.; 63; 84; 91
 Chironi, P.; 39
 Ciabatti, I.; 14
 Cittadini, M.; 27
 Citterio, C.V.; 33
 Ciulli, S.; 34
 Cocumelli, C.; 41
 Colussi, S.; 71
 Coniglio, A.; 77
 Conte, M.; 64; 69
 Corazzari, V.; 46
 Cordioli, P.; 14; 21; 54; 56; 67; 84; 91;
 92
 Cosseddu, G.M.; 35; 69
 Costarelli, S.; 59
 Cotti, C.; 46
 Crespo, H.; 78
 Croci, L.; 42
 Crosatti, M.L.; 22
 Curina, G.; 87
 D'Agostino, C.; 64; 69
 Dacheux, L.; 37
 Dalla Pozza, M.; 33
 D'Alonzo, A.; 68
 de Andrés, D.; 78
 de Andrés, X.; 78
 De Battisti, C.; 37
 De Benedictis, P.; 33; 37
 De Grossi, L.; 35; 64; 69
 De Lucchi, D.; 15
 De Marco, M.A.; 46
 De Medici, D.; 42
 De Mia, G.M.; 48; 82; 87
 De Montis, G.; 86
 De Nardi, M.; 33
 De Rui, S.; 15
 Decaro, N.; 61
 Dei Giudici, S.; 18; 39
 Dellamaria, D.; 33
 Delogu, M.; 46
 Demontis, F.; 57
 Denti, S.; 23
 Desario, C.; 62
 Di Bari, M.; 35; 64; 69
 Di Bartolo, I.; 12; 58; 76
 Di Bella, S.; 24
 Di Caro, A.; 27
 Di Francesco, C.E.; 40; 41
 Di Guardo, G.; 23; 40; 41; 60
 Di Marco Lo Presti, V.; 24; 51
 Di Marco, P.; 24; 51; 77
 Di Martino, B.; 30; 43; 61
 Di Pasquale, S.; 42
 Di Profio, F.; 30; 43
 Di Trani, L.; 83; 92
 Dondo, A.; 72
 Donofrio, G.; 25; 44; 45
 Dotti, S.; 55; 79
 Eleni, C.; 27; 41
 Ercolini, C.; 85; 86
 Esposito, E.; 64; 69
 Faccenda, L.; 59
 Faccini, S.; 92
 Falcone, E.; 83; 92
 Fallacara, F.; 50
 Fedrizzi, G.; 46
 Feliziani, F.; 11; 28; 90
 Ferrari, M.; 55; 79
 Ferrari, R.; 20
 Fiorentini, L.; 46
 Fiori, E.; 39
 Fontana, R.; 15; 54; 63
 Forletta, R.; 68
 Formato, G.; 31
 Fortunati, M.; 73
 Fragkiadaki, I.; 35
 Franceschi, V.; 25; 44; 45
 Frasnelli, M.; 46
 Fratini, M.; 52
 Fusaro, A.; 33; 70; 94

Gallina, L.; 91
 Gamba, D.; 54
 Garbarino, C.; 84
 Garcia, J.G.; 94
 García-Marín, J.F.; 78
 Gasperetti, L.; 68
 Gelmetti, D.; 46; 84
 Gelmini L.; 46
 Giacobini, M.; 32
 Giammarioli, M.; 48; 82
 Giovannini, T.; 71
 Giunti, M.; 17
 Giusti, C.; 68
 Glaria, I.; 78
 Gobbi, E.; 72
 Gonzalez, C.; 94
 Goria, M.; 81; 85; 86
 Granato, A.; 31; 49
 Grattarola, C.; 72; 81
 Grazioli, S.; 22; 50
 Grodzki, M.; 34
 Guercio, A.; 11; 24; 51; 77; 92
 Hedayati, A.; 94
 Heidari, A.; 19
 Hernández, M.-M.; 78
 Holmes, E.C.; 94
 Iaconelli, M.; 52
 Ianiro, G.; 66
 Ibba, M.B.; 57
 Imberciadori, M.; 86
 Iscaro, C.; 87
 Ismail, M.M.; 94
 Iulini, B.; 40; 81
 Jáuregui, P.; 78
 Juganaru, M.; 18
 Khan, O.A.; 94
 La Rosa, G.; 52
 Lanfranchi, P.; 56
 Larocca, V.; 61; 62
 Laurenson, L.; 49
 Lavazza, A.; 20; 26; 43; 46; 56; 62; 66;
 80; 84; 91
 Le Gall-Reculé, G.; 26
 Lelli, D.; 54; 67; 84; 92
 Lepelletier, A.; 37
 Letizia, E.; 14
 Liciardi, M.; 76
 Ligios, C.; 23; 57; 60
 Listorti, V.; 29
 Lombardi, G.; 21; 55; 63
 Lombardo, T.; 55
 Lorenzetti, R.; 14
 Lorenzetto, M.; 33
 Lorusso, E.; 61; 62
 Losio, M.N.; 42
 Lupini, C.; 29
 Luzzago, C.; 56
 Macaluso, G.; 24
 Macciocu, S.; 23
 Maestrale, C.; 23; 57
 Magnabosco, C.; 13
 Maione, E.; 58
 Maken Ali, A.S.; 94
 Mandola, M.L.; 80
 Maniaci, M.G.; 71
 Manuali, E.; 73; 90
 Marchesi, U.; 31
 Marciano, S.; 37
 Marcon, B.; 15
 Marcon, S.; 64; 69
 Maresca, C.; 59
 Marongiu, D.; 88
 Marruchella, G.; 23; 60
 Marsilio, F.; 30; 40; 43
 Martella, V.; 30; 43; 61; 62
 Martinelli, N.; 21; 63
 Masala, S.; 88
 Masoero, L.; 72
 Massirio, I.; 43
 Maurella, C.; 71
 Mazzei, M.; 18
 McFadden, G.; 3
 Mei, D.; 72
 Melis, P.; 57
 Messana, E.; 72
 Migliore, S.; 64
 Mignone, W.; 40; 72
 Mion, M.; 15
 Mira, F.; 51; 77
 Monini, M.; 66
 Monne, I.; 19; 33; 70; 94
 Moreno Martin, A.; 54; 67; 80; 84; 92

Moretti, M.; 22
 Mosca, A.; 32
 Moschidou, P.; 62
 Mossa, S.; 88
 Mukhles Amarin, N.; 94
 Muñoz, O.; 29
 Muscillo, M.; 34; 52
 Mutinelli, F.; 35; 49
 Mutinelli, R.; 31
 Muz, D.; 18
 Nardelli, S.; 15; 54
 Nardini, R.; 14; 68
 Nassuato, C.; 20
 Nigrelli, D.; 92
 Nonno, R.; 35; 64; 69
 Obber, F.; 33
 Oggiano, A.; 39
 Ormelli, S.; 37
 Orrù, G.; 76
 Ostanello, F.; 12; 76
 Pagano, M.; 71
 Palazzini, N.; 69
 Palmarini, M.; 7
 Paniccià, M.; 73
 Panigada, M.; 74
 Panzarin, V.; 70
 Partanna, S.; 24
 Paternesi, B.; 87
 Patta, C.; 18
 Pavio, N.; 58
 Pavoni, E.; 42; 63
 Peletto, S.; 71; 72
 Pellegrini, C.; 87
 Pennelli, M.; 41
 Pérez, V.; 78
 Perugini, G.; 73
 Petrini, S.; 73
 Pezzoni, G.; 63; 74; 75; 89
 Pinto, L.; 72
 Pinto, P.; 61; 62
 Piro, R.; 46
 Pisoni, G.; 56
 Polledo, L.; 78
 Ponterio, E.; 58; 76
 Proietto, U.; 40
 Puccica, S.; 31
 Puggioni, G.; 18; 39
 Purpari, G.; 11; 24; 51; 77; 92
 Radogna, A.; 61
 Raffini, E.; 19; 46
 Rambozzi, L.; 32
 Ramírez, H.; 78
 Randazzo V.; 77
 Razuoli, E.; 79
 Reina, R.; 78
 Riccardi, G.; 69
 Ricci, I.; 68
 Rizzo, F.; 80
 Romano, A.; 81
 Rosati, S.; 18; 78
 Rosone, F.; 69
 Rossi, E.; 48; 82
 Rossi, L.; 32
 Rossini, I.; 85; 86
 Rozera, G.; 4
 Ruggeri, F.M.; 12; 58; 66; 76
 Ruggieri, A.; 83
 Saba, M.; 23; 57
 Sabatini, S.; 68
 Sabelli, C.; 84
 Salomoni, A.; 37
 Salviato, A.; 19; 94
 San Román, B.; 78
 Sant, S.; 81; 85
 Santucciu, C.; 23; 57
 Satta, A.; 88
 Scagliarini, A.; 91
 Schivo, A.; 94
 Scholl, F.; 41
 Scicluna, M.T.; 14; 26; 27; 68
 Scoccia, E.; 59
 Sechi, S.; 57
 Selli, L.; 15
 Serracca, L.; 85; 86
 Serratore, P.; 34
 Severi, G.; 48; 87
 Sezzi, E.; 64
 Sgarangella, F.; 88
 Shoushtari A.; 94
 Simula, M.; 27
 Sironi, G.; 56
 Sozzi, E.; 67

Speranza, R.; 40; 41
Spuri Vennarucci, V.; 52
Stancanelli, A.; 11
Steele, P.; 35
Stercoli, L.; 63; 74; 75; 89
Suffredini, E.; 42
Taddei, R.; 19; 46
Taddei, S.; 28; 44
Tarello, V.; 72
Terarolli, A.; 85
Terregino, C.; 13; 19; 29; 46
Tiozzo Caenazzo, S.; 37
Tola, A.; 39
Tolari, F.; 18
Tomei, L.; 85
Tonon, E.; 15
Torresi, C.; 28
Tosi, G.; 46
Toson, M.; 33
Trevisiol, K.; 33
Tumino, G.; 90
Turrini, F.; 91
Vaccari, G.; 35; 64; 66; 69; 83; 92
Valastro, V.; 33; 94
van der Poel, W.H.M.; 5
Vargiu, M.P.; 57
Vascellari, M.; 35
Viganò, R.; 56
Villa, R.; 55; 79
Vincò, L.J.; 55
Volpe, E.; 34
Zanella, A.; 96
Zema, J.; 59
Zepparoni, A.; 82
Ziay, G.M.; 94
Zinellu, S.; 39
Zini, M.; 31
Zoppi, S.; 72; 80; 81

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
a stampa o online deve essere preventivamente autorizzata.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, aprile-giugno 2011 (n. 2) 6° Suppl.