

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**III Workshop nazionale
di virologia veterinaria**

Facoltà di Medicina Veterinaria
Università degli Studi di Bari
Valenzano (Bari)
11-12 giugno 2009

RIASSUNTI

A cura di

Emiliana Falcone (a), Susan Babsa (a),
Franco Maria Ruggeri (a) e Canio Buonavoglia (b)

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

(b) Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Bari

ISSN 0393-5620
ISTISAN Congressi
09/C4

Istituto Superiore di Sanità

III Workshop nazionale di virologia veterinaria. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari. Valenzano (Bari), 11-12 giugno 2009. Riassunti.

A cura di Emiliana Falcone, Susan Babsa, Franco Maria Ruggeri e Canio Buonavoglia
2009, v, 105 p. ISTISAN Congressi 09/C4

Il Workshop, svolto in collaborazione con la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bari e dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e Basilicata, 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

III national Workshop on veterinary virology. Faculty of Veterinary Medicine, University of Bari. Valenzano (Bari), June 11-12, 2009. Abstract book.

Edited by Emiliana Falcone, Susan Babsa, Franco Maria Ruggeri and Canio Buonavoglia
2009, v, 105 p. ISTISAN Congressi 09/C4 (in Italian)

The Workshop is organized in collaboration with the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Bari and the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e Basilicata. 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 viral pathogens of animals.

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: dsrnvir@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.

© 2009 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

INDICE

Programma	iii
Note per la consultazione	v
Relazioni	1
Comunicazioni orali e Poster	11
Indice degli autori	101

PROGRAMMA

Giovedì 11 giugno 2009

12.30 Registrazione dei partecipanti

13.30 Indirizzo di benvenuto e introduzione

Prima sessione

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEI VIRUS

Moderatori: Sergio Rosati, Paolo Cordioli

14.00 *Approccio di laboratorio alla diagnosi virale*
Paolo Cordioli

14.30 Comunicazioni orali

16.00 Intervallo

Seconda sessione

EVOLUZIONE E BIOLOGIA MOLECOLARE DEI VIRUS

Moderatori: Fulvio Marsilio, Mauro Pistello

16.30 *Evoluzione virale: basi molecolari e rilevanza biologica*
Mauro Pistello

17.00 Comunicazioni orali

Venerdì 12 giugno 2009

Terza sessione

AGENTI EMERGENTI E RIEMERGENTI

Moderatori: Giuseppe Iovane, Rossella Lelli

08.45 *Il bacino del Mediterraneo: la via d'accesso privilegiata
alle zoonosi trasmesse da vettori*
Rossella Lelli

- 09.15 Comunicazioni orali
- 10.45 Intervallo
- 11.15 Discussione dei Poster
- 12.30 Pausa pranzo

Quarta sessione

GENETICA ED EPIDEMIOLOGIA DI VIRUS E PRIONI

Moderatori: Nicola Decaro, Romolo Nonno

- 13.30 *Ceppi di prioni degli animali: strategie di controllo e rischio per l'uomo*
Romolo Nonno
- 14.00 Comunicazioni orali
- 16.00 Conclusioni e chiusura dei lavori

NOTE PER LA CONSULTAZIONE

Il presente libro raccoglie tutti i contributi presentati al Workshop. I lavori sono divisi in Relazioni, 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.

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

Relazioni

APPROCCIO DI LABORATORIO ALLA DIAGNOSI VIRALE

Paolo Cordioli, Antonio Lavazza

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

Introduzione. L'approccio metodologico in diagnostica virologica riconosce sostanzialmente due opzioni; infatti, fermo restando la necessità di conoscere l'anamnesi e i dati clinici-epidemiologici ed anatomopatologici di un focolaio di malattia, in funzione della tipologia di campionamento eseguito si può:

- 1) attuare una dimostrazione diretta del virus, dell'antigene virale e/o del suo genoma;
- 2) ricercare gli anticorpi specifici verso un determinato antigene virale.

1.1. Dimostrazione diretta del virus. I virus possono essere evidenziati in modo diretto:

a) senza ricorrere alla coltura dell'antigene; b) mediante rivelazione dell'attività patogena con coltura dell'antigene *in vitro* (colture cellulari o uova embrionate) o *in vivo* (riproduzione su specie sensibile). Tra i metodi di evidenziazione diretta di un virus vi sono quelli basati sul riconoscimento delle caratteristiche morfologiche (es. microscopia elettronica), quelli che si basano sulle caratteristiche antigeniche delle particelle virali (es. metodi immunoenzimatici come l'ELISA, l'immunofluorescenza, l'immunoperossidasi, l'immunodiffusione, ed altri basati sulle proprietà biologiche dei virus come la fissazione del complemento e l'emoagglutinazione) ed infine quelli che identificano le caratteristiche del genoma (es. PCR).

1.1.1. La Microscopia Elettronica. A partire dagli anni '60-'70 la Microscopia Elettronica ha contribuito a caratterizzare come nuovi virus un elevato numero d'isolati cresciuti *in vitro* (colture cellulari e uova embrionate). Da allora in poi la microscopia elettronica e soprattutto le tecniche di colorazione negativa sono state largamente utilizzate a scopo diagnostico, anche se non in indagini di *screening* su elevati numeri di campioni, per le quali meglio si adattano altri metodi diagnostici. Le tecniche di ME in colorazione negativa sono di facile e rapida esecuzione dando la possibilità di ottenere indicazioni diagnostiche anche quando manca un sospetto e pertanto si ritiene che non potranno mai essere sostituite completamente da altre tecniche ad ampio spettro quali ad esempio la multiplex PCR. L'osservazione non condizionata "*open view* - a largo spettro" del ME permette di identificare qualsiasi agente in un campione diagnostico, compresi quelli inizialmente non sospettati dal clinico. Questo vantaggio rende il ME un sistema diagnostico di tipo *catch-all*, in grado di svelare anche ciò che non è inizialmente ipotizzato. L'altro vantaggio della ME diagnostica è che si tratta di una tecnica rapida e diretta, che è indipendente dall'uso di reagenti antigene-specifici. Oltre alla rapidità d'esecuzione, la ME permette di evidenziare virus che non possono essere isolati per impossibilità ad adattarli a sistemi *in vitro*, o identificati tramite altri metodi diagnostici per carenza di reagenti diagnostici; è, inoltre, in grado di svelare infezioni miste ed evidenziare particelle che non sono in grado di replicare in quanto si sono già formati degli immunocomplessi.

1.1.2. Metodi immunoenzimatici. Come ricordato in precedenza, l'*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) è una tecnica immunoenzimatica di evidenziazione diretta

di virus, al pari di altri metodi quali Immunofluorescenza, Immuno-perossidasi, Immunodiffusione, che sfruttano le proprietà antigeniche dei virus. Sono tecniche basate sulla rivelazione antigene-anticorpo mediante l'uso di anticorpi coniugati con fluorocromi o enzimi. La differenza tra loro risiede principalmente nella facilità di esecuzione, e nella capacità di processare numerosi campioni simultaneamente. Sono metodi facili, poco costosi, che possono essere usati anche in campo. La sensibilità dei kit immunodiagnostici è relativamente bassa: sono necessarie $10^4/10^5$ DIE₅₀ di virus per avere un risultato positivo. La specificità è generalmente buona.

1.1.3. Rilevazione del genoma virale. Il test della *Polimerase Chain Reaction* è stato descritto in tempi relativamente recenti nel 1987/1988 ed in brevissimo tempo, con diverse varianti, è divenuto il metodo più utilizzato nei vari laboratori di diagnosi virologica sia in campo umano che veterinario. Il classico test PCR convenzionale basato sulla evidenziazione del prodotto dell'amplificazione in gel di agar attraverso elettroforesi è stato sostituito da PCR *Real-Time* nelle sue molteplici varianti: *Taq-Man*, *molecular beacon*, *Dye-labelled Oligonucleotide Ligation* (DOL), *Primer-Probe Energy Transfer System* (PriProET). Attraverso questi metodi e a seconda delle porzioni di genoma che vengono amplificate si possono evidenziare famiglie virali, specie e/o varianti.

1.2. Evidenziazione del virus mediante isolamento su colture cellulari o uova embrionate. L'isolamento virale può essere fatto su uova embrionate inoculate per varie vie (sacco vitellino, membrana amniotica, allantoidea o corion-allantoidea), oppure su colture cellulari primarie o linee continue. Se da un lato tali metodi permettono di isolare agenti presenti a basso titolo e quindi di poter disporre di elevate quantità di antigene per successive applicazioni (es. produzione di reagenti, caratterizzazione antigenica e molecolare ecc.) dall'altro si rivelano spesso di non facile esecuzione, per le difficoltà di crescita o assoluta impossibilità di crescita *in vitro* degli agenti virali, oltre che dispendiosi in termini di tempo di esecuzione e costi vivi connessi.

2. Dimostrazione indiretta di virus: test sierologici. In questo caso si tratta principalmente dell'esecuzione di esami sierologici che mirano ad evidenziare gli anticorpi indotti dall'eventuale agente di infezione/malattia e le finalità sono pertanto la verifica della sieroprevalenza in una popolazione e/o la definizione di caratteri epidemiologici (es. vettore, serbatoio). Le prove sierologiche permettono di evidenziare nel siero di sangue la presenza di anticorpi specifici nei confronti dei diversi virus, ovvero di provare indirettamente l'avvenuto contatto dell'ospite con un determinato agente virale. Le metodiche sierologiche classiche di Agar-Gel-Immunodiffusione (AGID) e inibizione dell'Emoagglutinazione (HI) sono state sostituite da metodiche più rapide e standardizzabili quali l'ELISA.

3. Considerazioni e Conclusioni. In relazione alla scelta e prelievo dei campioni, va rilevato che il prelievo andrebbe sempre eseguito ad inizio sintomatologia in quanto in tale fase la concentrazione virale negli organi, secreti ed escreti è massima e vi è scarsa presenza di anticorpi sia locali che circolanti.

Il campione deve essere corredato da notizie anamnestiche, conferito al laboratorio nel più breve tempo possibile o conservato correttamente.

IL BACINO DEL MEDITERRANEO: LA VIA D'ACCESSO PRIVILEGIATA ALLE ZONOSI TRASMESSE DA VETTORI

Rossella Lelli, Federica Monaco, Ilaria Pascucci
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise G. Caporale, Teramo

Il termine "zoonosi" si riferisce a quelle infezioni in grado di trasmettersi dall'uomo agli animali e viceversa. Il termine è stato utilizzato per la prima volta da Rudolf Virchow nel 1855 durante i suoi studi sulla trichinellosi. Egli fu il primo ad enfatizzare l'importanza di una stretta correlazione tra la medicina umana e quella veterinaria. Da quel momento un interesse crescente è stato dedicato alle zoonosi siano esse di origine animale che umana. Basti pensare che il 75% delle malattie umane cosiddette "emergenti" dell'ultimo ventennio sono il risultato di un passaggio di specie da parte di patogeni abitualmente di interesse veterinario e pertanto classificate come "zoonosi" (OIE). Le ragioni di un tale aumento, in particolare dell'espansione delle aree geografiche tradizionalmente colpite, sono molteplici, ma l'influenza che fattori quali l'aumento della popolazione umana, la globalizzazione degli scambi commerciali o le alterazioni ambientali indotte dall'intervento dell'uomo hanno avuto sull'aumento del rischio di incidenza, sono innegabili.

Tre i possibili scenari che fanno riferimento ad altrettante situazioni epidemiologiche: il riemergere di patologie "neglette", la comparsa di patogeni in aree storicamente *free* e la loro possibile endemizzazione. Se nelle aree endemiche i cambiamenti ecologici indotti dall'intervento umano hanno spesso influenzato l'insorgenza di nuove epidemie (*Crimean Congo Hemorrhagic Fever*, CCHF), la disseminazione attraverso lo spostamento di animali infetti (*Rift Valley Fever*, RVF) ed il passaggio/nidificazione di uccelli migratori (*Influenza Aviare*, IA e *West Nile Disease*, WND) sono le cause principali cui ascrivere l'aumento dell'estensione geografica degli areali tradizionali di infezione.

Alla luce di quanto affermato la situazione dell'Italia è particolarmente pericolosa per la presenza concomitante di fattori quali l'elevata diversità ecologica che caratterizza il suo territorio, la peculiare posizione, un ponte ideale proteso nel bacino mediterraneo, e l'innalzamento delle temperature medie stagionali che la accomuna con i Paesi del Sud Europa e ne rende possibile la colonizzazione da parte di popolazioni di vettori fino ad ora assenti sul nostro territorio. Da quanto recentemente osservato per il virus della *Bluetongue*, un virus trasmesso da vettori ed entrato in Europa dai Paesi Nord africani o del Medio Oriente che si affacciano sul bacino del Mediterraneo, è evidente che una puntuale conoscenza della circolazione di patogeni nei territori confinanti con l'Europa possa essere un efficace fattore predittivo di possibili incursioni future da parte degli stessi patogeni nel continente europeo. Oggetto della presentazione sarà fornire dati epidemiologici relativi a zoonosi virali quali la CCHF, la RVF e la WND nei Paesi geograficamente e commercialmente vicini a quelli comunitari ed ipotizzare i possibili scenari alla luce delle caratteristiche ecologiche di ciascuna infezione.

CEPPI DI PRIONI DEGLI ANIMALI: STRATEGIE DI CONTROLLO E RISCHIO PER L'UOMO

Romolo Nonno

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione. Le malattie da prioni sono un gruppo di malattie neurodegenerative invariabilmente fatali che colpiscono sia gli animali che l'uomo. Rientrano in questa categoria la scrapie degli ovi-caprini, l'Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE), nonché la *Creutzfeldt-Jacob Disease* (CJD) nell'uomo. Le malattie da prioni possono originare dal contatto diretto o indiretto con individui infetti, come è il caso della scrapie, ma possono anche riscontrarsi come patologie familiari, legate a mutazioni genetiche, o come forme sporadiche, ad origine putativamente spontanea. L'evento patogenetico principale è la conversione post-translazionale della Proteina Prionica Cellulare (PrPC) in una isoforma patologica denominata PrPSc, che forma aggregati insolubili e resistenti alle proteasi. In condizioni sperimentali tutte le malattie da prioni sono trasmissibili, motivo per cui esse sono generalmente raggruppate sotto il nome di *Transmissible Spongiform Encephalopathies* (TSE). Tale proprietà non sembra però legata all'esistenza di un microrganismo convenzionale, quanto piuttosto a particelle di natura prevalentemente proteica e prive di acidi nucleici. La teoria del prione, che permette di conciliare la natura spontanea e trasmissibile delle TSE, postula che la PrPSc sia il principale, se non l'unico, componente dell'agente infettante. Ceppi di prioni. È nota da tempo l'esistenza di varianti fenotipiche di malattia, in grado di perpetuarsi stabilmente in successive trasmissioni nello stesso ospite. L'esistenza dei ceppi ha fatto a lungo ipotizzare la presenza nei prioni di molecole in grado di codificare le informazioni ceppo-specifiche, nonostante numerose ricerche in tal senso non abbiano permesso di individuare acidi nucleici. L'ipotesi oggi prevalente postula che le informazioni ceppo-specifiche siano in qualche modo codificate dalla conformazione della PrPSc, e che l'esistenza dei ceppi di prioni rifletta la variabilità conformazionale della PrPSc. Il fenomeno dei ceppi è stato a lungo studiato in laboratorio grazie all'ausilio di ceppi sperimentali stabilmente adattati in linee di topi *inbred*. Lo sviluppo di modelli murini transgenici privi di PrP murina ed overesprimenti la PrP della specie di interesse, nonché di nuovi modelli di roditori selvatici molto suscettibili, quali l'arvicola rossastra, hanno dato impulso agli studi di tipizzazione biologica degli isolati naturali di TSE. I risultati di questi studi dipingono un quadro in cui la presenza di ceppi sembra rappresentare la regola sia negli animali che nell'uomo. Nell'uomo, tali studi confermano che diversi sottotipi di sCJD posseggono proprietà biologiche distinte, in accordo con la classificazione clinico-patologica. Nella scrapie, la tipizzazione biologica in arvicole di più di 40 isolati di scrapie classica provenienti da diversi Paesi europei, mostra che in Europa circolano almeno 4 ceppi diversi. Inoltre è significativa l'associazione tra ceppo e provenienza geografica, laddove gli isolati italiani analizzati fino ad ora risultano tutti appartenenti allo stesso ceppo, diverso dai ceppi isolati dalla maggior parte dei casi

provenienti dal Regno Unito o dalla Francia. Impatto dei ceppi sulle strategie di controllo. È utile quindi domandarsi quale possa essere l'impatto di questa variabilità biologica sulle strategie di controllo della scrapie. È noto che alcuni polimorfismi del gene della PrP ovina hanno un profondo impatto sulla suscettibilità alla scrapie, tanto che la principale strategia di eradicazione è oggi rappresentata dalla selezione degli ovini portatori degli alleli di resistenza. L'allele ARR (indicando con questa denominazione gli aminoacidi codificati ai codoni 136, 154 e 171) è associato ad una forte resistenza alla scrapie, mentre l'allele VRQ è considerato ad elevata suscettibilità. Oggi questo quadro sta cambiando, alla luce dei dati di sorveglianza che mostrano profonde differenze negli alleli *target* in Paesi diversi, e questo sembra essere associato alla presenza di ceppi diversi nei Paesi in esame. È quindi probabile che i ceppi abbiano specifiche preferenze alleliche, per cui diventa necessario conoscere sia la genetica della popolazione che il tipo di ceppi circolanti al fine di sviluppare validi piani di selezione. Fortunatamente il genotipo ARR/ARR risulta essere associato ad una elevatissima resistenza in tutti i Paesi europei, il che permette di modulare i piani di selezione genetica avendo questa come base conoscitiva. Grazie all'incremento della sorveglianza delle TSE e all'introduzione della sorveglianza attiva in Europa, sono state recentemente descritte nuove TSE dei ruminanti. Negli ovi-caprini il Nor98, isolato per la prima volta in Norvegia, è caratterizzato dall'accumulo di una PrPSc con caratteristiche biochimiche del tutto diverse da quelle della scrapie classica. Nei bovini sono state descritte due nuove forme di BSE, denominate BSE-H e BASE (o BSE-L), caratterizzate da tipi di PrPSc diversi dalla BSE classica, l'una ad alto peso molecolare e l'altra a basso peso molecolare. Queste forme di TSE pongono nuovi problemi alla sorveglianza, legati in parte alle diverse caratteristiche della PrPSc e quindi alla sensibilità dei test diagnostici che, messi a punto sulle forme classiche, non sono sempre adeguati a riconoscerle, ed in parte al fatto che la distribuzione della PrPSc nel SNC è diversa dalle forme classiche, per cui l'area cerebrale oggi campionata per la diagnosi (*l'obex*) non risulta ugualmente valida ed affidabile. TSE sporadiche negli animali e rischi per l'uomo. L'origine delle nuove forme di TSE non è ancora del tutto chiara, ma queste presentano caratteristiche epidemiologiche del tutto diverse dalla scrapie e dalla BSE. Il Nor98 è trasmissibile sperimentalmente sia alle pecore che in modelli murini, ma numerosi studi convergono nel suggerire che la sua contagiosità sia bassissima o assente, tanto che l'ipotesi prevalente è che si tratti di una forma sporadica. In particolare, il Nor98 viene diagnosticato in pecore anziane, non è linfotropico, sembra avere una prevalenza simile in tutti i Paesi europei e di solito non è accompagnato da casi secondari. Studi di genetica, infine, hanno mostrato una forte associazione dei casi di Nor98 ad alcuni rari alleli di PrP. Per quanto riguarda la BSE-H e la BASE, la loro distribuzione non sembra suggerire alcun legame con l'epidemia di BSE. Entrambe sono forme sperimentalmente trasmissibili e, inoculate in bovini o in modelli transgenici, danno ceppi diversi dalla BSE. Anche queste forme colpiscono animali anziani, non sono linfotropiche, e sono molto rare (le prime stime suggeriscono una prevalenza inferiore a 0,5 casi per milione di bovini testati). Per quanto l'origine di queste forme sia ancora del tutto ipotetica, i dati disponibili suggeriscono che si possa trattare di forme sporadiche di TSE. Alla luce del potenziale zoonotico delle TSE, evidenziato per la prima volta dall'emergenza di una nuova variante di CJD umana (vCJD) legata all'esposizione all'agente della BSE, opportuno chiedersi che rischio pongano per l'uomo queste nuove forme di TSE animali. Mentre da un lato il numero di casi di vCJD sembra in continua diminuzione, l'origine dei casi umani di sCJD resta tutt'oggi ignota. La

scrapie è stata a lungo sospettata come possibile origine dei casi di sCJD, ma numerosi studi epidemiologici non sono stati in grado di dimostrare alcun possibile legame tra le due malattie. In particolare, sarebbe ragionevole aspettarsi *clusters* di casi umani nelle regioni a più alta prevalenza di scrapie, cosa che non è mai stata riscontrata. Al contrario la CJD sembra manifestarsi con una prevalenza apparentemente costante nel tempo e simile in tutto il mondo, essendo presente anche in regioni in cui la scrapie è assente. In questo quadro assume un interesse particolare la recente descrizione nei ruminanti di possibili forme "sporadiche". Benché non sia possibile concludere con certezza che malattie come il Nor98 o la BASE siano presenti in tutto il mondo, i dati disponibili convergono nel suggerirlo. Un possibile legame tra queste forme atipiche dei ruminanti e le TSE umane è suggerito da alcune somiglianze molecolari della PrP^{Sc}, non osservate in precedenza se non nel caso della BSE e della vCJD. Le caratteristiche molecolari della PrP^{Sc} sono però una base troppo fragile per trarre conclusioni significative, in assenza di una caratterizzazione biologica dei ceppi e di studi epidemiologici che tengano conto della varietà delle forme umane. Gli studi di caratterizzazione biologica stanno però fornendo alcune evidenze a supporto della potenziale trasmissibilità della BASE all'uomo. Da un lato, la suscettibilità alla BASE dei primati o di topi transgenici esperimenti PrP umana suggerisce che questa possa essere trasmissibile all'uomo, dall'altro studi di trasmissione in arvicola mostrano una possibile identità di ceppo tra la BASE ed alcune varianti clinico-patologiche di sCJD.

Conclusioni. I dati oggi disponibili mostrano la presenza di diversi ceppi di TSE nei ruminanti domestici, che rappresentano una nuova sfida per le strategie di controllo di queste malattie. Sebbene siano necessari ulteriori studi, di trasmissione ed epidemiologici, al fine di acquisire un quadro realistico del reale rischio per l'uomo posto dalle TSE animali, i risultati fino ad ora disponibili sono compatibili con una possibile origine zoonotica di alcuni sottotipi di sCJD. Questo, lungi dal dover rappresentare un ingiustificato allarme, invita però a individuare le strategie di sorveglianza economicamente sostenibili che permettano di coniugare le necessità di raccogliere informazioni circa la prevalenza e l'identità dei prioni presenti nei ruminanti domestici e la protezione della salute pubblica.

EVOLUZIONE VIRALE: BASI MOLECOLARI E RILEVANZA BIOLOGICA

Mauro Pistello

Centro Retrovirus e Sezione Virologia, Dipartimento di Patologia Sperimentale, Università degli Studi, Pisa

Introduzione. Le tecnologie biomolecolari oggi disponibili consentono lo studio delle interazioni virus-cellula e virus-ospite con livelli di dettaglio e complessità impensabili fino a pochi anni fa. È noto che i virus variano e che questo cambiamento è uno dei meccanismi alla base della persistenza ma non sono ancora del tutto comprese le implicazioni a livello cellulare e dell'ospite parassitato. Le recenti conoscenze e, soprattutto le nuove tecnologie, hanno permesso di individuare alcuni meccanismi dell'evoluzione molecolare dei virus con impatti sorprendenti e talvolta inattesi.

Metodi. Oltre ai consueti metodi di sequenziamento, anche questi in grande evoluzione, molte delle recenti informazioni su meccanismi di persistenza e latenza sono state acquisite grazie a nuove tecnologie che hanno permesso di associare a variazioni di sequenza cambiamenti fenotipici importanti per quanto riguarda tropismo, sedi di latenza e persistenza, resistenza a chemioterapici, salto di specie e colonizzazione di nuovi habitat.

Risultati. La variabilità virale è in genere conseguenza di mutazioni casuali che insorgono durante la replicazione del genoma virale. Queste possono essere silenti o neutre se non portano ad alterazioni significative, essere eliminate se deleterie, o diventare predominanti se conferiscono un vantaggio evolutivo (migliora la *fitness*) della popolazione progenie. È stato recentemente osservato che in alcuni virus e a parità di mutazioni silenti, vi è un più elevato numero di mutazioni che modificano la *fitness* e che la frequenza con cui queste mutazioni appaiono dipende in gran parte dalla pressione selettiva dell'ospite. È evidente quindi che a valle dell'inserimento di mutazioni durante la replicazione virale entrano in gioco meccanismi di selezione virali, cellulari e dell'ospite che forgianno il virus a resistere e spesso a trarre vantaggio delle mutevoli condizioni dell'ospite.

Conclusioni. Verranno illustrati i principali meccanismi alla base dell'evoluzione dei virus e della loro rilevanza biologica per quanto attiene l'interazione dell'ospite. Verrà infine discusso l'impatto delle recenti conoscenze sullo sviluppo di strategie innovative per migliorare e potenziare i sistemi di difesa dell'ospite.

Comunicazioni orali e Poster

ANALISI DELLE SEQUENZE DEGLI ORF 7A E 7B DI CEPPI DI CORONAVIRUS FELINI (FCoVs)

Andrea Balboni, Alessandra Scagliarini, Santino Prosperi, Mara Battilani
*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università degli Studi,
Bologna*

I Coronavirus Felini (FCoVs) sono ssRNA virus dotati di envelope estremamente comuni nei felidi domestici e selvatici. Gli FCoV sono responsabili di un'infezione lieve, o subclinica, a livello enterico ma possono anche causare una malattia letale a meccanismo immuno-mediato, la Peritonite Infettiva Felina (FIP). La forma subclinica è la più diffusa in natura e solo il 5% degli infetti sviluppano la FIP che può manifestarsi con una forma granulomatosa, o secca, a lento decorso ed una forma essudativa, o umida, a rapido decorso.

La FIP è causata da FCoV virulenti, conosciuti come biotipi FIPV, che rappresentano varianti virulente, sviluppatasi all'interno dell'ospite, dei più comuni FCoV enterici, biotipi FECV. Lo sviluppo della malattia è però strettamente legato a fattori relativi all'ospite.

Il genoma virale codifica per tre principali proteine strutturali la S, M, ed N e un gruppo di proteine accessorie quali l'ORF 3a,b,c e l'ORF 7a,b.

Gli ORF 7a e 7b, situati all'estremità 3' del genoma virale, codificano per 2 proteine glicosilate non strutturali, gp7a-7b, la cui funzione è ancora in gran parte sconosciuta. Si sospetta che tali proteine agiscano come virochine, modulando la risposta immunitaria e/o infiammatoria, e che in seguito a mutazioni e/o delezioni di tali ORF si determinino variazioni nella virulenza del virus.

Nel presente lavoro si è proceduto al sequenziamento del tratto 3' terminale del genoma virale, comprendente i due ORF 7a e 7b, del ceppo vaccinale DF-2Primucell e di ceppi virali raccolti da gatti portatori sani e da gatti affetti da FIP provenienti da diverse oasi feline o allevamenti distribuiti nel territorio italiano.

Le sequenze nucleotidiche ottenute, di 1236 bp, sono state dapprima allineate mediante metodo ClustalW ed è stata condotta un'analisi filogenetica ed evolutiva sull'allineamento ottenuto. I risultati preliminari mostrano una prevalenza delle mutazioni sinonime rispetto alle non sinonime in entrambi gli ORF e la delezione di un tratto di 406 bp nell'ORF 7b del ceppo vaccinale DF-2 a conferma del suo coinvolgimento nel determinare la virulenza del virus.

PR CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DELLA PrPSc ASSOCIATA A BSE E BASE MEDIANTE DENATURAZIONE

Ilaria Barbieri, Debora Campagna, Emiliana Brocchi, Lorenzo Capucci
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

Introduzione. Diversamente da quanto ritenuto per lungo tempo l'agente della Encefalopatia Spongiforme Bovina esiste in almeno tre forme distinte sulla base della mobilità elettroforetica e del profilo di glicosilazione della PrPSc denominate (Tipi C, L e H). Le differenze nel tempo di incubazione e nel profilo istolesivo riscontrate in seguito sia al passaggio in topi che all'inoculazione in bovini delle tre forme suggerisce che, come per le TSE umane, ciascun conformero possa essere portatore di informazioni specifiche che ne caratterizzano le proprietà biologiche e patogeniche. Al fine di comprenderne proprietà biochimiche ed eventuali differenze strutturali la PrPSc associata alla BSE (Tipo C) e quella associata alla BASE (Tipo L) sono state saggiate mediante trattamenti denaturanti in combinazione con l'uso di anticorpi monoclonali.

Metodi. Aliquote di omogenati di tessuto cerebrale da animali affetti da BSE e BASE ad uno stadio terminale sono stati incubati con concentrazioni crescenti (1-6 M) di Guanidina (GdN-HCl) e a diversi valori di pH (3,5-7,5) per 2h a temperatura ambiente. I campioni trattati, dopo precipitazione con metanolo e proteolisi mediante proteinasi K, sono stati sottoposti a *Western Blot* con l'uso di anticorpi monoclonali prodotti verso epitopi diversi della proteina prionica.

Risultati. Il trattamento con soluzioni di GdN-HCl, pH 7,5 a diverse concentrazioni ha portato ad una diminuzione del segnale sia della PrPSc di Tipo L che di Tipo C rispetto ai campioni di controllo non trattati indice di un aumentata sensibilità alla digestione da PK. In particolare la PrPSc di Tipo L è risultata maggiormente sensibile alla PK dopo trattamento con GdN-HCl 3,5 M, mentre la PrPSc di Tipo C è risultata resistente all'azione proteolitica a concentrazioni maggiori di GdN-HCl (4,5 M). Il trattamento con GdN-HCl 4M a pH crescenti da 3,5 a 7,5 ha, poi, mostrato che la stabilità alla PK di entrambe le forme di PrPSc è maggiore a pH acidi e diminuisce a pH nel *range* di neutralità.

Conclusioni. I dati indicano che in condizioni denaturanti la struttura accociata alla PrPSc di Tipo C ha una stabilità maggiore di quella del tipo L. Pertanto il trattamento denaturante può essere usato quale ulteriore metodo per la differenziazione fra tipi diversi della PrPSc bovina. Inoltre le proprietà strutturali della PrPSc di entrambe le forme possono essere alterate anche da variazioni di pH. L'insieme dei dati supporta l'ipotesi che BSE e BASE siano patologie distinte perchè associate a molecole di PrPSc diverse per struttura e conformazione.

■ MALATTIA VESCICOLARE DEL SUINO: CONSIDERAZIONI SUI FOCOLAI IN REGIONE CAMPANIA NEGLI ANNI 2007-2008

Lorella Barca (a), Angelo Ferraro (b), Silvia Salzano (a), Achille Guarino (a), Loredana Baldi (a), Alessandra Di Sarno (a), Donatella Nava (a)

(a) Osservatorio Epidemiologico Veterinario Regione Campania, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Napoli

(b) Servizio Sanità Animale, Settore Veterinario della Regione Campania, Napoli

Introduzione. La Malattia Vescicolare del Suino (MVS) è una malattia virale, infettiva e contagiosa, osservata per la prima volta in Lombardia nel 1966 e successivamente diffusa in altri Paesi. L'Italia è l'unico Paese dell'UE in cui la malattia persiste, nonostante siano stati implementati Piani di eradicazione e sorveglianza dal 1995. Alcune regioni dell'Italia meridionale, e la Campania tra queste, non hanno mai raggiunto l'accreditamento.

Metodi. Sono state presi in considerazione gli 8 focolai registrati in Campania nel corso del 2007 ed i 3 del 2008 con le indagini epidemiologiche effettuate dai Servizi Veterinari delle AASSLL in collaborazione con l'Osservatorio Epidemiologico Veterinario della Regione Campania.

Risultati. I focolai sono stati localizzati nel 2007 in tre province: Salerno (3), Napoli (3) e Caserta (2); nel 2008 ad Avellino (1), Napoli (1) e Salerno (1). Le tipologie produttive coinvolte sono state ingrasso (4), riproduzione a ciclo aperto (3) e stalla di sosta (1) nel 2007; nel 2008 riproduzione a ciclo aperto (1) ed ingrasso (2). Nel 2007 quattro focolai sono stati evidenziati a seguito di controlli effettuati nell'ambito del Piano nazionale per l'eradicazione e la sorveglianza della malattia; due sono stati individuati a seguito di controlli al macello eseguiti nell'ambito del Piano straordinario regionale. L'unico focolaio con assenza di positività virologica è emerso in un'azienda controllata poiché in correlazione epidemiologica diretta con altro focolaio. Nel 2008, il primo focolaio si è evidenziato nel corso di un controllo in zona di protezione; nel secondo e terzo caso si trattava di controlli routinari previsti dal Piano.

Conclusioni. Il lavoro svolto ha evidenziato, come punti critici della situazione sanitaria della Campania, movimentazioni illegali di animali con stato sanitario sconosciuto e scarsa applicazione delle misure di biosicurezza negli allevamenti e sui mezzi di trasporto. Al mancato raggiungimento dello *status* di accreditamento della Regione contribuiscono in larga parte carenze nell'alimentazione e aggiornamento dell'anagrafe suina ed incompletezza dei controlli effettuati rispetto a quanto previsto dal Piano nazionale. Con questo lavoro si è inteso focalizzare le problematiche relative alla gestione del piano di monitoraggio e dei focolai al fine di programmare meglio l'attività di sorveglianza e le eventuali misure preventive, con l'obiettivo finale di raggiungere l'eradicazione della malattia nel territorio regionale.

P INFLUENZA SUINA E INIBIZIONE DELL'EMOAGGLUTINAZIONE: COMPARAZIONE DEI RISULTATI OTTENUTI UTILIZZANDO DIVERSE VARIANTI VIRALI

Giuseppe Barigazzi, Chiara Chiapponi, Emanuela Foni
*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Sezione
Diagnostica, Parma*

Introduzione. L'influenza suina è una patologia sostenuta da virus RNA appartenenti alla famiglia *Orthomyxoviridae* che provoca gravi danni economici sia per le dirette conseguenze della malattia polmonare che per la mancata produttività dell'allevamento. Il suino è infettato, nella quasi totalità dei casi, dai sottotipi H1N1, H3N2 e H1N2. La diagnosi sierologica di malattia, è teoricamente possibile utilizzando un doppio campione di siero, acuto e convalescente, tramite la tecnica di Inibizione dell'emoagglutinazione (HI), ma, a causa della variabilità antigenica dei ceppi circolanti, non sempre i risultati forniscono interpretazioni univoche. Scopo del presente lavoro è quello di valutare i titoli HI post infezione, utilizzando, in qualità di antigene per le prove, il sottotipo isolato dal focolaio rappresentato, sia dall'antigene standard di laboratorio utilizzato nella routine, che dal ceppo virale medesimo isolato nel focolaio d'infezione.

Metodi. Fra il 2002 e il 2008, nell'ambito di progetti di sorveglianza epidemiologica per influenza suina, sono stati estrapolati 34 casi di infezione da virus influenza nei quali si era ottenuto l'isolamento virale e nei quali era stato possibile eseguire un campionamento di sieri convalescenti. Sono stati raccolti ed esaminati tramite HI 447 sieri.

Risultati. Tutti i virus si sono dimostrati in grado di mettere in evidenza anticorpi, a diverse diluizioni ed in diverse prevalenze in ognuno dei casi esaminati. Sui 447 emosieri sui quali sono state eseguite le prove HI la variante "antigene di referenza" ha messo in evidenza il 53% di positività ($\geq 1:20$) contro l'85% ottenuto con la variante virale "causale dell'infezione". Con test χ^2 la differenza tra i due tipi di prove è risultata altamente significativa ($p < 0,001$). Valutando poi le risposte verso i singoli sottotipi, si è osservato rispettivamente per H1N1, H1N2, H3N2 una positività del 83%, 82% e 86% utilizzando il virus omologo e del 50%, 45% e 68% utilizzando il virus di referenza. Le differenze fra i test sono risultate significative ($p < 0,001$ per H1N1, $p < 0,001$ per H1N2 e $p < 0,05$ per H3N2).

Conclusioni. I risultati ottenuti nel presente lavoro, dimostrano le diverse capacità delle singole varianti a mettere in evidenza gli anticorpi inibenti l'emoagglutinazione. Questa capacità è significativamente più elevata per l'antigene isolato nel focolaio di infezione rispetto a quello routinariamente utilizzato e va tenuta nel dovuto conto nel momento in cui si devono valutare prove HI ad esito incerto o con basse prevalenze di positività.

□ METODO RAPIDO PER LA RILEVAZIONE DEL VIRUS CHIKUNGUNYA IN ZANZARE TIGRE (Aedes albopictus) CATTURATE CON TRAPPOLE BG-SENTINEL®

Simone Barocci (a), Stefano Gavaudan (a), Eleonora Micci (a), Chiara Bartolini (a), Elisa Antognini (a), Francesca Barchiesi (a), Laura Velletri (b), Anna Duranti (a), Dino Donati (a), Diego Sola (a), Paolo Mancini (a), Marco Storaci (a), Erica Calandri (a), Sara Briscolini (a)
(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia
(b) Libero Professionista, Pesaro

Introduzione. Negli ultimi anni la zanzara tigre (*Aedes albopictus*) si è diffusa ampiamente in tutto il territorio italiano. Questo insetto rappresenta un vettore ideale per vari arbovirus, in particolare *Virus Dengue* (DenV) e *Virus Chikungunya* (ChikV), che causano nel mondo milioni di malati ogni anno. Il *virus Chikungunya* è apparso per la prima volta in Italia nel 2007, nelle Province di Ravenna, Rimini, Forlì e Bologna, causando più di 300 casi clinici. Questa situazione ha stimolato le autorità di sanità pubblica locali e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche ad iniziare un Piano di Sorveglianza per questo virus ed un Programma di Monitoraggio del Vettore nella Regione Marche. Lo scopo di questo piano era di ridurre la densità del vettore e l'individuazione rapida di *Chikungunya* direttamente dai vettori catturati con la trappola BG-Sentinel®.

Metodi. Le zanzare adulte sono state catturate con trappole BG-Sentinel®. Dopo identificazione al microscopio ottico, sono state congelate a -80°C, prima dell'estrazione dell'RNA. Il *primer design* è stato effettuato considerando 117 sequenze del gene E1 di ChikV, dopo allineamento multiplo. I *primer* sono stati studiati in modo da poterli porre in *multiplex* PCR con quelli per il gene rpL17 di *A. albopictus*.

Risultati. Il disegno dei *primer* ha prodotto gli oligonucleotidi ChikBaro1 5'-TCC gAA TCA TgC AAA ACA gA-3' e ChiKBaro2 5'-AAg CCA gAT ggT gCC TgA-3'), che permettono di amplificare un frammento di 389 bp, rispetto a quello di 123 bp, caratteristico di *A. albopictus* (*Accession number* AY826144). La PCR *multiplex* è stata ottimizzata per mezzo di un gradiente di temperatura di *annealing* e della determinazione delle migliori concentrazioni di *primer* e magnesio cloruro.

Conclusioni. Il lavoro ha permesso di mettere a punto una metodica molecolare in *multiplex* RT-PCR per la rilevazione ed identificazione contemporaneamente di ChikV ed *A. albopictus*, direttamente dagli insetti vettori, previa estrazione di RNA totale. I nuovi *primer* studiati per ChikV, ottenuti dopo allineamento di 177 sequenze conservate, permettono di avere un protocollo di identificazione più robusto, rispetto a quelli ottenuti da studi di singole sequenze. L'amplificazione contemporanea di E1 e rpL17 dimostra: 1) la corretta esecuzione della PCR; 2) le appropriate condizioni di mantenimento dell'RNA e, di conseguenza, della sua avvenuta estrazione. L'unica strategia efficace per limitare eventuali trasmissioni del virus è di mettere a punto misure di controllo del vettore, tramite trappolaggio entomologico, e di conoscere la diffusione virale grazie all'utilizzo di metodiche biomolecolari.

INFERENZE SULL'EVOLUZIONE DEL GENOTIPO E DEI LENTIVIRUS DEI PICCOLI RUMINANTI IN PIEMONTE E SARDEGNA

Luigi Bertolotti (a,b), Elena Grego (a), Ramses Reina (a), Silvia Dei Giudici (c), Anna Pina Murtino (c), Giantonella Puggioni (c), Sergio Rosati (a)

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

(b) *Unità di Biologia Computazionale, Centro di Biotecnologie Molecolari, Università degli Studi, Torino*

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

Introduzione. La classificazione dei lentivirus dei piccoli ruminanti (SRLV) è stata rivista sulla base delle differenze nucleotidiche del gene *gag* e comprende 5 genotipi (A-E). Lo stipo Roccaverano, prototipo del genotipo E, presenta bassa patogenicità, è naturalmente delevato per dUTPase, VPR-like e una ripetizione di 71pb in U3 e possiede caratteristiche evolutive simili agli altri genotipi, pur essendo largamente divergente. A seguito di queste indagini, analisi sierologiche in Sardegna hanno evidenziato un secondo *cluster* d'infezione riconducibile allo stesso genotipo: la caratterizzazione dei campioni ha confermato l'appartenenza al genotipo E, evidenziando però un *cluster* differente da Roccaverano. Questo studio presenta i risultati preliminari delle analisi condotte sulle sequenze dei campioni sardi al fine di valutarne le caratteristiche evolutive.

Metodi. Per descrivere le relazioni filogenetiche tra i campioni in esame, alberi filogenetici sono stati disegnati sulla base di modelli evolutivi e approcci bayesiani. La struttura delle popolazioni virali sono state analizzate mediante l'analisi della varianza molecolare (AMOVA). Particolare attenzione si è prestata al possibile accumulo di transizioni G↔A, che potrebbe essere causata dalla delezione del gene dUTPasi. Il software BEAST è stato utilizzato per valutare i tassi e i *pattern* evolutivi dei due stipi.

Risultati. I risultati ottenuti sul gene *gag* dei virus identificati in Sardegna, evidenziano una similarità media dell'84,34% con lo stipo Roccaverano. L'AMOVA mostra segregazione spaziale significativa all'interno della popolazione virale, che non sembra essere determinata da un numero medio di transizioni G↔A (25,39% delle mutazioni totali) simile allo stipo Roccaverano (27,16%). Questo dato è confermato dalla topologia degli alberi filogenetici, che raggruppano le sequenze come monofiletiche. Le analisi evolutive condotte evidenziano che la popolazione virale è da considerarsi costante e che la velocità di evoluzione sembra essere maggiore di quelle calcolate per gli altri genotipi.

Conclusioni. Analisi preliminari condotte sulle sequenze sarde ne descrivono un'elevata eterogeneità. In particolare la segregazione spaziale è estesa all'area geografica, allargandosi all'esterno dei confini dell'allevamento. Inoltre, le prime analisi suggeriscono un'elevata velocità di evoluzione: tuttavia, questo risultato potrebbe rappresentare una sovrastima causata dal ridotto numero di campioni disponibile. La mancata evidenza di un accumulo di transizioni G↔A sembra escludere il ruolo della dUTPasi virale nella regolazione di questo evento; i modelli evolutivi definiscono come costante la dimensione

della popolazione virale, suggerendo che le caratteristiche di patogenicità evidenziate su campo e la normale gestione degli animali sintomatici possano essere responsabili di una mancata crescita ed espansione della popolazione virale.

VALUTAZIONE DEI FATTORI DI RISCHIO DI INTRODUZIONE DI VIRUS DELL'INFLUENZA AVIARIA NELL'AREA INTERESSATA DALL'EPIDEMIA LPAI (H5N2) DEL 2005

Lebana Bonfanti (a), Mattia Cecchinato (a,b), Tommaso Patregnani (a), Mara Scremin (a),
Katia Capello (a), Elisa Russo (b), Monica Lorenzetto (c), Stefano Marangon (a)

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

(b) Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università
degli Studi, Legnaro, Padova

(c) Centro Regionale di Epidemiologia Veterinaria, Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Venezie, Legnaro, Padova

Introduzione. In Italia negli ultimi nove anni si sono manifestate sei epidemie di influenza aviaria sia a bassa che alta patogenicità. Per prevenire l'introduzione di virus influenzali negli allevamenti avicoli risulta di primaria importanza una corretta valutazione del rischio di trasmissione della malattia dalle popolazioni a vita libera agli allevamenti avicoli intensivi. Lo studio, effettuato in un'area interessata nel corso del 2005 da un'epidemia influenzale sostenuta da un virus LPAI (H5N2), è stato finalizzato alla ricerca e identificazione dei fattori di rischio di introduzione e diffusione connessi alle caratteristiche strutturali e gestionali delle realtà produttive presenti sia rurali sia industriali.

Metodi. L'area oggetto di studio è stata quella coinvolta nell'epidemia di influenza aviaria LPAI H5N2 che ha colpito nel 2005 allevamenti di tacchini da carne della provincia di Brescia e Cremona. È stato predisposto un questionario strutturato in modo tale da valutare le caratteristiche degli allevamenti di tacchini da carne dell'area oggetto di studio con particolare attenzione alla presenza/assenza di misure igieniche e protettive e alle varie possibilità di contatto con altri allevamenti avicoli e/o con volatili selvatici. In totale sono stati somministrati 41 questionari. È stata condotta un'analisi statistica bivariata volta a valutare l'associazione fra la positività dell'allevamento e la presenza o meno di potenziali fattori di rischio. Inoltre è stato predisposto un questionario semplificato che è stato somministrato a 18 allevamenti rurali della zona.

Risultati. Il 75% degli allevamenti industriali positivi nel 2005 è risultato essere situato nelle vicinanze di fonti d'acqua rispetto al 24% degli allevamenti negativi (p -value=0,004). Altre caratteristiche che sono risultate statisticamente significative per la positività o meno sono associate alla tipologia e modalità di raccolta delle carcasse e della lettiera/pollina e la condivisione di attrezzature tra allevamenti. Per il settore rurale l'allevamento multispecie (in particolare la presenza di anatidi) e la quasi assenza di misure di biosicurezza costituiscono un ulteriore incremento al rischio di introduzione di virus influenzali aviari. Lo stretto contatto tra i due settori è confermato dalla presenza di lavoratori presso gli allevamenti intensivi che nel contempo allevano polli/anatre presso le proprie abitazioni.

Conclusioni. La presente ricerca oltre a confermare ulteriormente il ruolo epidemiologico di base degli uccelli selvatici quale principale serbatoio dei virus

influenzali nell'ambiente, tende ad avvalorare il ruolo dei rurali di ponte epidemiologico in grado di mantenere e trasferire i virus influenzali dall'ambiente naturale a quello dell'allevamento industriale.

INFEZIONE DA PCV2 NEGLI ALLEVAMENTI PIEMONTESI: PRIME VALUTAZIONI DIAGNOSTICHE E CARATTERIZZAZIONE DEI FENOTIPI ISTOLOGICI

Elena Bozzetta (a), Katia Varello (a), Chiara Musella (a), Maria Elena Careddu (a), Giuliano Pisoni (b), Fabio Zuccon (a), Riccardo Madonna (c), Marco Montesano (c), Marco Faccenda (c), Franco Kobal (c), Vittorio Sala (b)

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

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

(c) *Medico Veterinario Libero Professionista, Cuneo*

Introduzione. Le infezioni da PCV2 sono responsabili di un gruppo di sindromi, le *Porcine Circovirus Diseases* (PCVDs), e tra queste la *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome* (PMWS) può essere considerata quella clinicamente più importante per il danno economico agli allevamenti. L'associazione della sintomatologia e delle lesioni caratteristiche macroscopiche (linfoadenopatia inguinale, enterite, polmonite e ittero) e istopatologiche (deplezione linfocitaria e infiltrazione istiocitaria del tessuto linfoide, corpi inclusi e cellule giganti) con l'evidenziazione immunostochimica o biomolecolare di PCV2 conferma la diagnosi. L'obiettivo del progetto è quello di accertare l'effettivo impatto delle infezioni da PCV2 nell'allevamento dei suini in Piemonte e di valutare le caratteristiche della patologia dal punto di vista delle lesioni istopatologiche.

Metodi. Nei sei allevamenti finora analizzati sono state eseguite l'indagine clinico-anamnestica e necroscopica di 3-5 soggetti svezzati, morti nelle ultime 24 ore, con il campionamento di polmoni, tonsille, linfonodi tracheo-bronchiali, milza e linfonodi inguinali in parte destinati agli esami istopatologico (EE) ed immunostochimico (IHC) per PCV2 ed in parte ad indagini di biologia molecolare (PCR) nei confronti di PCV2 e di PRRS. La presenza e gravità delle lesioni indicative di PCV2 nelle sezioni colorate con EE sono state valutate attribuendo un punteggio, secondo lo schema proposto da Opriessnig nel 2007, da 0 a 3 per la presenza di flogosi istiocitaria e/o granulomatosa nel tessuto linfoide e la deplezione del tessuto linfatico e da 0 a 6 per la flogosi interstiziale granulomatosa, l'iperplasia del tessuto linfoide peribronchiolare e la presenza di essudato alveolare nel polmone.

Risultati. Dei sei allevamenti 3 sono risultati positivi per PCV2 con lesioni classificate tra 1-3 per la deplezione e tra 1-2 per l'infiltrazione istiocitaria e positività a IHC e PCR. I restanti sono risultati negativi con *grading* tra 0-1 per la deplezione e flogosi e negatività a IHC e PCR. Il *grading* sulle lesioni polmonari è risultato molto variabile (0-6) in tutti gli allevamenti analizzati. Non si sono riscontrate positività IHC in assenza di lesioni caratteristiche. Inoltre in tutti gli allevamenti è stata rilevata positività alla PRRS in PCR.

Conclusioni. I dati ottenuti, anche se ancora insufficienti a correlare l'infezione a problemi di management, evidenziano come le infezioni da PCV2 rappresentino un elemento da approfondire e da controllare nella regione considerata. Inoltre l'applicazione del *grading* ha permesso di rilevare come la deplezione linfoide costituisca il reperto più frequente e come la correlazione positiva con l'IHC sia presente soprattutto in lesioni classificate con grado 2-3.

STUDIO *IN VITRO* DELLA SUSCETTIBILITÀ GENETICA DEGLI OVINI ALLA SCRAPIE

Cecilia Bucalossi (a), Gian Mario Cosseddu (a), Claudia D'Agostino (a), Michele Angelo Di Bari (a), Barbara Chiappini (a), Michela Conte (a), Joaquín Castilla (b), Romolo Nonno (a), Umberto Agrimi (a), Gabriele Vaccari (a).

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

(b) *The Scripps Research Institute, Palm Beach County, Florida, USA*

La Scrapie fa parte del gruppo di malattie conosciute come Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST). Evento patogenetico fondamentale di queste malattie è l'accumulo a livello del sistema nervoso centrale di un'isoforma patologica (PrP^{Sc}) della Proteina Prionica Cellulare (PrP^C). La suscettibilità degli ovini alla scrapie è influenzata dai polimorfismi del gene della PrP ai codoni A136V, R154H e Q171R. Tali polimorfismi generano cinque principali alleli ARR, ARH, AHQ, ARQ e VRQ, associati a differenti livelli di suscettibilità/resistenza alla malattia. In particolare, inoculando con un isolato italiano di scrapie classica pecore con genotipo ARQ/ARQ, ARQ/ARR e ARR/ARR, è stata dimostrata la completa suscettibilità dei soggetti ARQ/ARQ ed un effetto protettivo degli altri genotipi. In questo studio abbiamo verificato l'efficienza di conversione della PrP^C di ovini recanti i tre genotipi sopra menzionati tramite l'utilizzo del *Protein Misfolding Cyclic Amplification* (PMCA). Tale tecnica, attraverso cicli ripetuti di sonicazione/incubazione, permette la conversione *in vitro* della PrP^C presente in un omogenato cerebrale (substrato), da parte di una quantità minima di PrP^{Sc} (inoculo) che funge da "innesco" della reazione. Omogenati cerebrali di ovini sani con genotipo ARQ/ARQ, ARQ/ARR e ARR/ARR sono stati utilizzati come substrato, mentre l'omogenato di una pecora ARQ/ARQ affetta da scrapie classica è stato impiegato come inoculo. Diluizioni seriali (da 10⁻¹ a 10⁻⁶) dell'inoculo nei substrati portatori dei tre genotipi sono stati sottoposti a PMCA. Utilizzando come substrato l'omogenato ARQ/ARQ, la PrP^{Sc} è stata amplificata con successo, fino alla diluizione pari a 10⁻⁵. Utilizzando come substrati gli omogenati con i genotipi ARQ/ARR o ARR/ARR si è osservato invece un livello di amplificazione minimo. La PrP^{Sc} prodotta dalla reazione ha mantenuto lo stesso profilo di *Western Blot* di quella presente nell'inoculo, segno di una fedele amplificazione delle sue caratteristiche molecolari. Per ottenere una stima quantitativa dell'efficienza di amplificazione è stato calcolato, con l'ausilio di una curva standard, un fattore di amplificazione per ciascun genotipo, confrontando, tramite *Western Blot*, la quantità di PrP^{Sc} prima e dopo la reazione di PMCA. Dai risultati preliminari ottenuti il fattore di amplificazione è risultato essere pari ad 11,3 per il substrato con genotipo ARQ/ARQ, e ad 1,12 per entrambi i substrati con i genotipi ARQ/ARR e ARR/ARR. I risultati ottenuti mostrano una chiara corrispondenza fra la suscettibilità/resistenza genetica alla scrapie osservata *in vivo* e *in vitro*. Il PMCA potrebbe quindi rappresentare un valido sistema per stimare la trasmissibilità dei vari ceppi di scrapie ai diversi genotipi ovini, ed essere utilizzato per predire *in vitro* la suscettibilità di genotipi rari per i quali mancano evidenze di tipo sperimentale o epidemiologico.

ANALISI DEI SITI DI LATENZA DI CAPRINE HERPESVIRUS NELLA CAPRA

Michele Camero (a), Anna Lucia Bellacicco (a), Elvira Tarsitano (a), Mariarosaria Marinaro (b), Carlo Armenise (a), Donato Narcisi (a), Canio Buonavoglia (a), Maria Tempesta (a)

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

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

Introduzione. *Caprine Herpesvirus 1* (CpHV.1) è responsabile, nei capretti di 1-2 settimane di vita, di infezioni generalizzate spesso letali. Negli adulti causa infezioni a decorso subclinico con manifestazioni a carico dell'apparato genitale, aborto, ritorni in calore e mortalità neonatale. CpHV.1 dopo l'infezione primaria determina un'infezione latente. I siti di latenza di CpHV.1 sono sia i gangli sacrali che quelli del trigemino in funzione, probabilmente, della via di penetrazione del virus in fase di infezione primaria. Infatti se l'infezione avviene per via vaginale il virus replica e senza dare viremia resta localizzato in tale sede. I siti di latenza, in questo caso, sono rappresentati dai gangli sacrali. Se l'infezione avviene per via nasale il virus, dopo un'iniziale replicazione locale, diffonde nell'organismo veicolato dai leucociti ed infetta anche l'apparato genitale. Mediante tecnica PCR sono stati individuati come siti di latenza del virus il ganglio del trigemino e il 3° e 4° paio dei gangli sacrali. Lo scopo del lavoro è stato quello di individuare i siti di latenza di CpHV.1 utilizzando una metodica più specifica e sensibile rispetto alla PCR.

Metodi. Sono state utilizzate 7 capre adulte di cui 6 sieropositive perché precedentemente infettate per via vaginale (A-F) e una capra sieronegativa mantenuta come controllo (G). Agli animali, al momento della macellazione, sono stati prelevati i gangli sacrali per la ricerca del DNA di CpHV.1 tramite la *Real-Time* PCR.

Risultati. I gangli della capra di controllo (G), hanno dato esito negativo. Nella capra A è stata svelata la presenza del virus nel 2° e 4° paio di gangli sacrali; nella capra B nel 1°, 2°, 3°, 4° e 5° paio di gangli sacrali; Nella capra C nel 2° e 3° paio di gangli sacrali; nella capra D nel 3° e 4° e 5° paio di gangli sacrali; nella capra E nel 2°, 3°, 4° e 5°; nella capra F nel 3° e 4° paio di gangli sacrali.

Conclusioni. Il test *Real-Time* PCR ha permesso di svelare la presenza del virus in gangli sacrali (1°, 2° e 5° paio) che erano sempre risultati negativi ai test di isolamento su cellule e PCR. I risultati forniscono ulteriori informazioni sui siti di latenza di CpHV.1 nella capra e accrescono le possibilità interpretative sui meccanismi patogenetici dell'infezione di CpHV.1.

STUDIO MOLECOLARE ED EVOLUTIVO DI VIRUS INFLUENZALI H1N1 DI LINEAGGIO EUROASIATICO, ISOLATI IN ITALIA (1995-2006) DA UCCELLI ACQUATICI SELVATICI E DOMESTICI, E CONFRONTO CON VIRUS DELLO STESSO SOTTOTIPO CIRCOLANTI IN SUINI IN ITALIA

Laura Campitelli (a), Domenico Spagnolo (a), Marzia Facchini (a), Maria Alessandra De Marco (a), Mauro Delogu (b), Emanuela Foni (c), Chiara Chiapponi (c), Ana Moreno (d), Calogero Terregino (e), Ilaria Capua (e), Isabella Donatelli (a)

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

(b) *Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Ozzano Emilia, Bologna*

(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Parma*

(d) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia*

(e) *Laboratorio di Referenza OIE/FAO per l'Influenza Aviaria e la Malattia di Newcastle, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

Introduzione. Nel periodo 1995-2006, nel corso di programmi di sorveglianza virologica in Italia centrale e del Nord, sono stati isolati ceppi di influenza aviaria di sottotipo H1N1 da uccelli acquatici selvatici e domestici. 13 di questi ceppi sono stati caratterizzati geneticamente, e confrontati con ceppi dello stesso sottotipo isolati da suini di allevamenti italiani.

Obiettivi. a) definire le caratteristiche molecolari ed evolutive della popolazione di virus H1N1 aviari del lineaggio Eurasiatico; b) valutare le relazioni filogenetiche di questi ceppi con quelli di ceppi suini che circolano regolarmente negli allevamenti suini, e con virus umani; c) valutare le dinamiche di persistenza/variazione di virus aviari H1N1 nel serbatoio naturale in stagioni successive.

Metodi. Tamponi cloacali sono stati raccolti da uccelli selvatici e domestici, inoculati in uova embrionate di pollo e i liquidi allantoidei positivi per influenza sono stati tipizzati sierologicamente. L'RNA di 13 isolati aviari H1N1 e di 7 ceppi suini è stato estratto, sottoposto a trascrizione inversa, PCR e sequenziamento. Le sequenze degli 8 segmenti di ciascun virus sono state utilizzate per l'analisi filogenetica.

Risultati. L'analisi filogenetica del gene HA mostra che tutti i ceppi aviari italiani sono più simili ad alcuni ceppi del Giappone, formando due *subclades* minori, nettamente distinti dal lineaggio dei virus suini italiani. Quest'ultima evidenza si conferma anche nel resto del genoma. Inoltre, in ognuno dei geni interni, i virus si dividono in 3 o più *clusters* distinti e diversi tra loro.

Conclusioni. Questo lavoro rappresenta la prima caratterizzazione estensiva di virus H1N1 aviari eurasiatici, importante anche perché permette di definire meglio i rapporti di derivazione del virus H1N1 umano di origine aviaria responsabile della pandemia del 1918. I dati dimostrano che l'HA dell'H1 aviaria forma un gruppo filogeneticamente molto ben

distinto sia dai ceppi aviari americani che dai ceppi suini e umani. Relativamente ai restanti geni, per effetto dello scambio di virus legato alle migrazioni degli uccelli selvatici, le costellazioni geniche di questi virus differiscono tra di loro sia da un anno all'altro, sia nello stesso anno. Infine, nessuna trasmissione interspecie sembra essersi verificata tra ceppi aviari e suini italiani.

COVID-19 CORONAVIRUS DEL BUFALO ASSOCIATO A PATOLOGIA GASTROENTERICA

Marco Campolo (a), Viviana Mari (a), Maria Stella Lucente (a), Costantina Desario (a), Maria Loredana Colaianni (a), M. Ozkan Timurkan (b), Francesco Cirone (a), Donatella Nava (c), Alessandra Di Sarno (c), Canio Buonavoglia (a), Nicola Decaro (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Bari*

(b) *Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey*

(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Napoli*

Introduzione. Recentemente un coronavirus di gruppo 2 (BuCoV), geneticamente correlato al Coronavirus Bovino (BCoV), è stato isolato da un allevamento di bufali con gastroenterite. L'analisi molecolare del virus ha evidenziato un assetto genetico identico a BCoV, mentre le caratteristiche biologiche sono risultate differenti per quanto riguarda lo spettro d'ospite *in vitro* e la attività emagglutinante. Nel presente lavoro si riporta la caratterizzazione molecolare e biologica di quattro stipiti BuCoV associati a gastroenterite in allevamenti bufalini.

Metodi. I focolai sono stati osservati negli anni 2007-2008 in vitelli bufalini di quattro allevamenti dell'Italia centro-meridionale. In tutti i casi si osservava una tipica sintomatologia gastroenterica, con tassi di mortalità variabili con punte del 30%. La ricerca di BuCoV è stata condotta sui campioni fecali mediante test molecolari in grado di riconoscere tutti i coronavirus BCoV-like. Gli stipiti identificati sono stati caratterizzati a livello molecolare mediante amplificazione ed analisi di sequenza della estremità 5' del gene S. Dai campioni biologici è stato tentato l'isolamento virale su colture cellulari e gli stipiti BuCoV isolati sono stati caratterizzati per quanto riguarda la crescita su cellule HRT-18 e MDBK e lo spettro di emagglutinazione.

Risultati. Mediante l'impiego dei test molecolari, stipiti BuCoV sono stati identificati in tutti i focolai di malattia gastroenterica. L'analisi della estremità 5' del gene S ha dimostrato che tre stipiti BuCoV erano strettamente correlati tra di loro e con il virus prototipo 179/07-11. Il quarto stipite ha dimostrato una identità genetica più elevata con classici stipiti BCoV. Tre dei quattro stipiti sono stati adattati alla crescita *in vitro* su cellule HRT-18, mentre solo lo stipite maggiormente correlato a BCoV ha dimostrato una buona attitudine a crescere su cellule MDBK. Per quanto riguarda lo spettro emagglutinante, due dei tre isolati virali sono stati in grado di agglutinare solo le emazie di topo, mentre uno solo ha mostrato una bassa attività agglutinante per i globuli rossi di pollo.

Conclusioni. Alla luce dei risultati ottenuti, BuCoV dovrebbe essere considerato quale agente causale di enterite nella specie bufalina e compreso nel *panel* diagnostico che è effettuato di routine su vitelli bufalini con diarrea. Rispetto al prototipo 179/07-11, gli stipiti BuCoV identificati nel presente studio hanno mostrato caratteristiche biologiche e genetiche non omogenee, per cui sarebbe utile identificare e caratterizzare ulteriori stipiti.

Il presente studio è stato finanziato dal Ministero della Salute (Ricerca corrente 2007 "Studio della epidemiologia e delle caratteristiche genetiche del coronavirus del bufalo").

PREVALENZA DEL SOTTOTIPO BHV-1.1 TRA I CEPPI DI BHV-1 ISOLATI DAL 2002 IN NORD ITALIA

Elena Canelli (a), Ilaria Barbieri (a), Ana Moreno (a), Enrica Sozzi (a), Davide Lelli (a), Annalisa Guercio (b), Paolo Cordioli (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo

L'Herpesvirus Bovino tipo 1 (BHV-1) è un DNA-virus che ha come ospite primario il bovino, nel quale è responsabile di patologie respiratorie e genitali e di forme meno frequenti, come cheratoconjuntiviti ed aborti. Il BHV-1 comprende due sottotipi: 1.1 (*IBR-like*), responsabile soprattutto della forma respiratoria; 1.2 (*IPV/IPB-like*), associato più frequentemente a quella genitale e ulteriormente suddiviso in 1.2a e b.

Per valutare la prevalenza dei due sottotipi, sono stati analizzati cinquanta ceppi isolati dal 2002. Di questi, quarantatre provenivano da campioni del Nord Italia e sette dalla provincia di Palermo; quarantasette sono stati isolati dall'apparato respiratorio, uno da tamponi congiuntivali e due da tamponi vaginali.

La tipizzazione è stata condotta utilizzando una reazione di Immunoperossidasi (IPMA) con due differenti pannelli di Anticorpi Monoclonali (MAbs), precedentemente prodotti e identificati come specifici per il solo tipo 1 del BHV. Il primo pannello (1C11;4G8) è risultato specifico per il sottotipo 1.1, mentre l'altro (1D6;2B10) è in grado di riconoscere entrambi i sottotipi. Tutti i ceppi analizzati in IPMA sono risultati BHV-1.1 (46/50), tranne quattro 1.2 (4/50), isolati da tre campioni respiratori e da un tampone genitale provenienti dalla provincia di Palermo. Contemporaneamente è stata eseguita la caratterizzazione genomica dei ceppi. Per la PCR sono stati utilizzati *primer* per le regioni genomiche codificanti per la gI e per la gD. Gli amplificati sono stati sequenziati e le sequenze ottenute confrontate con quelle di ceppi di riferimento o disponibili in GenBank. In entrambe le analisi genomiche gli isolati si sono raggruppati principalmente con il ceppo Colorado, di riferimento per il BHV-1.1, con alte percentuali di omologia (98,8-100%), mentre quattro si sono clusterizzati come 1.2, confermando i dati ottenuti in IPMA. Questi risultati indicano il BHV-1.1 come prevalente nel Nord Italia e sono in accordo con quelli di precedenti studi condotti nella stessa area geografica su ceppi isolati nel periodo 1980-2001 e con altre pubblicazioni che individuano il BHV-1.1 come preponderante dagli anni '80 in numerosi Paesi, con poche eccezioni, come Australia e Nuova Zelanda. Inoltre, l'analisi genetica rimarca l'alto grado di omologia per le glicoproteine analizzate tra i ceppi appartenenti allo stesso sottotipo.

In conclusione, i risultati ottenuti, che indicano la prevalenza del BHV-1.1 e la presenza di ceppi BHV-1.2 associati a patologia respiratoria, rafforzano l'ipotesi secondo la quale il sottotipo non sarebbe strettamente legato alla sintomatologia clinica, ma rifletterebbe l'epidemiologia virale. Dimostrano inoltre la specificità dei MAbs testati per i sottotipi del BHV-1 e potrebbero quindi costituire una base per identificare *target* più specifici e strumenti efficienti per la diagnosi delle malattie BHV-1-associate.

P RICERCA DI AGENTI VIRALI IN ALIMENTI DI ORIGINE ITTICA E VEGETALE, NELLE ACQUE E NEGLI AMBIENTI DI PRODUZIONE

Vincenza Cannella, Giuseppa Purpari, Francesco Mira, Patrizia Di Marco, Annalisa Guercio
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo

Introduzione. La presenza di virus negli alimenti destinati al consumo umano, come i Molluschi Eduli Lamellibranchi (MEL), i vegetali freschi e *Ready To Eat-IV gamma* e le acque, costituisce un problema di sanità pubblica. Dati epidemiologici recenti evidenziano, nei Paesi industrializzati, un incremento delle infezioni gastroenteriche da agenti come il virus dell'epatite A (HAV), i norovirus e gli adenovirus. La contaminazione ambientale da virus rappresenta un problema sia per le loro caratteristiche di resistenza, elevata infettività e variabilità genetica, che per l'abbondante quantità di particelle virali escrete dai soggetti infetti. A queste si aggiungono problematiche legate ai cambiamenti delle abitudini alimentari e dello stile di vita, che portano spesso al consumo di pasti fuori casa e al ricorso ai *Fast food*. Al fine di garantire elevati livelli di sicurezza alimentare, la Commissione Europea ha introdotto con il Regolamento CE 178/2002 e con il Decreto Legislativo 155/97, i concetti di "controllo di filiera" e di "autocontrollo", prevedendo analisi batteriologiche e relativi limiti. L'aspetto legato alle contaminazioni virali è invece oggetto di approfondimento, anche se l'*Environmental Protection Agency* ha incluso gli adenovirus nella *Contamination Candidate List* tra i microrganismi da monitorare, per garantire la salubrità degli alimenti e dell'ambiente. Nel presente lavoro, gli A.A. riportano i dati preliminari di uno studio mirato ad acquisire conoscenze sulla diffusione di adenovirus, norovirus ed HAV nei MEL, nei vegetali, nelle acque e negli impianti di produzione degli alimenti.

Metodi. I campionamenti sono stati eseguiti dal 2008 al marzo 2009, in mense scolastiche, centri di preparazione pasti, ospedali, caserme. Sui tamponi ambientali, acque, vegetali e mitili, sono state eseguite prove biomolecolari (RT-PCR, PCR e sequenziamento) e test di isolamento virale su cellule A549 ed FrhK4.

Risultati. Su 258 campioni analizzati, 14 sono risultati positivi in PCR per adenovirus e 4 di questi anche all'isolamento virale. L'analisi di sequenza ha confermato la presenza di adenovirus 2 per 13 campioni e di un solo adenovirus 41 per un campione di cozze. Inoltre un campione di cozze è risultato positivo per HAV in RT-PCR e sequenziamento, ma non all'isolamento virale.

Conclusioni. I risultati del lavoro supportano l'ipotesi che gli adenovirus siano tra i più frequenti contaminanti ambientali, con particolare riferimento ai sierotipi 41 e 2, responsabili di forme gastroenteriche e respiratorie nell'uomo. Pertanto in accordo con l'*Environmental Protection Agency* si suggerisce la loro ricerca in alimenti e ambiente quali indicatori di contaminazione virale.

VALUTAZIONE DI TRE-TEST RAPIDI IMPIEGATI NELLA SORVEGLIANZA ATTIVA DELL'ENCEFALOPATIA SPONGIFORME BOVINA SU TRE MILIONI D'ANIMALI

Elena Carra, Roberta Taddei, Ilaria Barbieri, Giuliana Botti, Vito Tranquillo, Alessandra Iori, Lucia Gibelli, Monica Cerioli, Patrizia Cavadini, Daniela Gelmetti, Stefano Pongolini, Lorenzo Capucci

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

Introduzione. L'Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE) appartiene alla categoria delle malattie da prioni ed è causa di degenerazione neurologica a decorso fatale nei bovini domestici. A partire dal 2001 in Italia come nel resto dell'Unione Europea (UE) è stato avviato un Sistema di Sorveglianza Attiva della BSE basato sull'impiego di test rapidi al fine di stimare la prevalenza della malattia nella popolazione bovina adulta. Nel corso di 8 anni di monitoraggio nei tre laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna sono stati impiegati tre test rapidi validati ed autorizzati dalla UE.

Obiettivi. Analizzare e valutare: 1) le *performance* di laboratorio (frequenza di campioni da ripetere e proporzione di campioni falsi positivi); 2) i principali aspetti pratici (risorse impiegate e adattabilità alla routine) dei tre test rapidi utilizzati.

Metodi. Dal 2001 al 2008, 2.802.866 campioni provenienti da bovini macellati e 202.453 campioni provenienti da bovini morti sono stati sottoposti ad analisi con uno dei tre test: *Check Western* (WB), *Check LIA* (ELISA) e *Check PrioSTRIP* (ICA) della ditta Prionics AG, basati su differenti metodiche rispettivamente: *Western Blot*, ELISA in chemiluminescenza e immunocromatografia. I campioni risultati positivi ai test rapidi venivano inviati al Centro di Referenza Nazionale per le TSE per la conferma diagnostica mediante le metodiche ufficiali.

Risultati. Nell'analisi dei campioni provenienti da animali macellati la proporzione di falsi positivi risultava nulla per il WB e l'ICA, mentre era inferiore a 1 caso su 100.000 campioni negativi per l'ELISA. La frequenza di campioni da sottoporre a ripetizione variava da 0,02% a 0,26% rispettivamente per l'ICA e l'ELISA. Nell'analisi dei campioni provenienti da animali morti con il WB nessun caso di falsa positività era emerso, mentre l'ELISA e l'ICA mostravano 84,30 e 8,48 casi su 100.000 campioni negativi. Inoltre l'ELISA mostrava la maggior frequenza di campioni da ripetere e l'ICA la minore. Dal punto di vista pratico sia il test ELISA che, soprattutto l'ICA, rispetto al WB, hanno richiesto un minor impegno di risorse, sono risultati più facili nell'impiego consentendo l'emissione dei risultati in tempi minori e rivelandosi facilmente adattabili all'utilizzo nella routine di laboratorio.

Conclusioni. Dai nostri risultati è emerso che la qualità del campione è un fattore che può influenzare notevolmente le *performance* dei test rapidi. Nell'esperienza dell'IZSLER, il test immunocromatografico (ICA) ha mostrato di essere il giusto compromesso tra buone prestazioni di laboratorio e convenienza economica e di tempo.

ELUSIONE DELL'IMMUNITÀ VACCINALE DA PARTE DI CEPPI DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE DI RECENTE ISOLAMENTO

Mattia Cecchinato (a), Caterina Lupini (b), Enrico Ricchizzi (b), Paul Brown (c), Dario Spada (b), Clive J. Naylor (c), Elena Catelli (b)

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

(b) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università degli Studi, Bologna*

(c) *Department of Veterinary Pathology, University of Liverpool, Neston, United Kingdom*

Introduzione. Metapneumovirus Aviare (AMPV) è responsabile della Rinotracheite del Tacchino (TRT). Dalla fine degli anni '80 vaccini vivi attenuati sono largamente impiegati nel nostro Paese per il controllo di questa infezione. Tuttavia dati epidemiologici recenti hanno mostrato come numerosi siano ancora i focolai di malattia osservati nei gruppi vaccinati, specie nelle fasi avanzate del ciclo produttivo. Ciò può essere imputato a diverse cause tra cui vaccinazione mal praticata, scarsa durata dell'immunità, incompleta protezione crociata fra sottotipi o riacquisizione di patogenicità del vaccino stesso. Tali cause però non spiegano esaurientemente il verificarsi di focolai in animali vaccinati correttamente e con vaccino del medesimo sottotipo virale causa del focolaio. Il sequenziamento completo del gene di adesione di alcuni recenti isolati AMPV, responsabili di focolai in gruppi vaccinati, ha permesso di distinguerli nettamente dal ceppo vaccinale e da tutti i ceppi italiani isolati prima del 2001, che mostrano invece un elevato grado di omologia fra loro e con il vaccino. Allo scopo di determinare se le mutazioni osservate nei ceppi recenti siano state sufficienti al virus per eludere l'immunità vaccinale è stata eseguita un'infezione sperimentale in tacchini vaccinati, inoculandoli con un ceppo isolato nel 2004 o con un ceppo del 1987, e valutando la protezione mediante misurazione della sintomatologia clinica e dell'eliminazione virale.

Metodi. Tacchini vaccinati ad un giorno di vita e gruppi di controllo, sono stati sottoposti ad infezione di prova con un ceppo AMPV del 2004, o con un ceppo del 1987. Nei giorni successivi, sino al 12° giorno post-infezione (p.i.) è stata valutata la sintomatologia clinica, assegnando ad ogni animale un punteggio secondo la gravità: 0, 1, 2 e 3. I soggetti che hanno mostrato punteggi ≥ 2 sono stati considerati affetti da sintomatologia grave. Dal 3° all'11° giorno p.i. è stata valutata l'eliminazione virale mediante RT-PCR.

Risultati. Sei soggetti su 10 del gruppo vaccinato ed inoculato con AMPV del 2004 hanno mostrato sintomatologia clinica grave, contrariamente a quanto osservato nel gruppo vaccinato ed inoculato con AMPV del 1987, dove in nessun soggetto sono stati registrati punteggi ≥ 2 . Nei giorni 3 e 4 p.c. hanno eliminato virus il 70% dei tacchini inoculati con ceppo del 2004 e solo il 30% di quelli inoculati con AMPV del 1987.

Conclusioni. Un ceppo di AMPV Italiano isolato nel 2004 ha acquisito la capacità di eludere l'immunità indotta dalla vaccinazione. È probabile che AMPV sia evoluto in regioni antigeniche fondamentali tali da permettergli la circolazione anche in gruppi correttamente vaccinati.

■ TARGET GENETICO DELLA SCRAPIE ATIPICA NOR98 IN ITALIA

Giovanna Ciaravino (a), Francesca Scolamacchia (a), Michela Conte (a), Barbara Chiappini (a), Elena Esposito (a), Stefano Marcon (a), Giuseppe Ru (b), Michele Blasi (c), Romolo Nonno (a), Gabriele Vaccari (a), Gaia Scavia (a), Umberto Agrimi (a)

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

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

(c) *LGS Laboratorio di Genetica e Servizi, Cremona*

Introduzione. La scrapie è una malattia da prioni che colpisce i piccoli ruminanti. La suscettibilità degli ovini alla scrapie è influenzata dai polimorfismi della PrP. Il Nor98 rappresenta il prototipo dei ceppi di scrapie "atipica". In Italia, il primo caso di Nor98 negli ovini è stato notificato nel 2005. Il presente lavoro descrive il *target* genetico del Nor98 nella popolazione ovina italiana, valutandone il significato alla luce delle attuali strategie di selezione genetica.

Metodi. Comparando le frequenze genotipiche, relativamente ai codoni 136, 141, 154, 171 della PrP, dei 56 casi di Nor98, notificati tra il 2004 e il 2008 nell'ambito della sorveglianza ufficiale, con quelle di 17.078 soggetti di controllo (ASSONAPA), è stato stimato il rischio (*Odds Ratio*, OR) associato ai diversi genotipi.

Risultati. Il 98% dei casi di Nor98 è risultato portatore degli alleli AF141RQ, AHQ o ARR. In particolare, il genotipo AF141RQ/AF141RQ, scelto come riferimento (OR=1), è risultato quello a maggior rischio, seguito dall'AF141RQ in eterozigosi (OR=0,0451; $p<0,001$) e dai genotipi portatori dell'allele AHQ (OR=0,023; $p<0,001$), dell'ARR (OR=0,0052; $p<0,001$) e dell'ARQ (OR=0,0038; $p<0,001$). Nessun caso presentava il genotipo ARQ/ARQ, *target* della scrapie classica in Italia, che è risultato, invece, il genotipo a minor rischio per il Nor98.

Discussione. Il genotipo AF141RQ/AF141RQ appare il principale *target* del Nor98. L'elevato rischio associato agli alleli AF141RQ e AHQ, documentato nel presente studio, concorda con quanto osservato in altri Paesi europei. Gli alleli ARR e ARQ mostrano nel Nor98 un ruolo alternativo rispetto alla scrapie classica. Infatti, il genotipo ARR/ARR, fortemente protettivo per la scrapie classica, risulta parzialmente suscettibile al Nor98, mentre il genotipo ARQ/ARQ, il più a rischio in Italia per la forma classica, è protettivo per il Nor98.

Conclusioni. Sebbene siano necessari ulteriori approfondimenti sulla variabilità del *target* genotipico del ceppo Nor98, questi risultati sollevano alcuni interrogativi sull'efficacia dei piani di selezione genetica, mirati - *in primis* - all'incremento della frequenza dell'allele ARR. Tuttavia, è opportuno sottolineare che tali strategie di controllo sono state disegnate sulla scrapie classica, per la quale mantengono inalterata tutta la loro validità. Rispetto al Nor98, la loro applicazione secondo l'attuale disegno, determinerebbe, da una parte, la riduzione della frequenza degli alleli a maggior rischio (AF141RQ, AHQ), dall'altra, l'incremento dell'ARR che, tuttavia, risulta associato ad un rischio notevolmente inferiore a quello dell'AF141RQ. È ipotizzabile, pertanto, in accordo con quanto espresso dall'EFSA, che i piani di selezione possano comunque esercitare un effetto favorevole anche nel controllo del Nor98.

INCREMENTO DELLA PATOGENICITÀ DI UN VIRUS INFLUENZALE LPAI APPARTENENTE AL SOTTOTIPO H7N3 ISOLATO DA UN VOLATILE SELVATICO IN SEGUITO A PASSAGGI MULTIPLI *IN VIVO* IN DIFFERENTI SPECIE DI VOLATILI DOMESTICI

Filippo Cilloni (a), Anna Toffan (a), Simone Giannecchini (b), Valeria Clausi (b), Alberta Azzi (b), Ilaria Capua (a), Calogero Terregino (a)

(a) *Laboratorio di Referenza OIE/FAO per l'Influenza Aviaria e la Malattia di Newcastle, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

(b) *Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi, Firenze*

Introduzione. I virus influenzali aviari riconoscono come serbatoio naturale i volatili selvatici ed in particolare alcune specie di uccelli acquatici. Con essi convivono in un equilibrio naturale in una sorta di stasi evolutiva. Quando abbandonano i loro ospiti naturali per infettare specie domestiche vanno incontro ad un processo di adattamento che ne può modificare in modo significativo alcune caratteristiche patogenetiche. Al fine di studiare le modificazioni, in termini di infettività e patogenicità, conseguenti al progressivo adattamento a differenti specie di pollame, un virus influenzale a bassa patogenicità, A/mallard/Italy/33/01 (H7N3), isolato da un germano selvatico, è stato utilizzato per condurre una serie di test *in vivo* in tre diverse specie avicole domestiche: pollo, tacchino e quaglia.

Metodi. Polli, tacchini e quaglie sono stati inizialmente infettati per via oro-nasale con 10^6 EID₅₀/0,1 ml del virus H7N3 d'origine (*wild type*). Passaggi multipli *in vivo* di tale virus sono stati effettuati attraverso infezioni seriali di gruppi di 5 soggetti utilizzando escreti infetti ottenuti dal gruppo della stessa specie precedentemente infettato. Ad ogni passaggio è stato condotto un esame clinico ed una valutazione dello *shedding* virale mediante *Real-Time* RT-PCR per virus influenzali tipo A. Materiale organico contenente il virus adattato alla quaglia e al tacchino (10° passaggio) è stato utilizzato per infettare altri gruppi di polli e/o tacchini.

Risultati. Quaglie e tacchini si sono dimostrati molto suscettibili all'infezione con il virus *wild type* ed è stato possibile effettuare dieci passaggi seriali in gruppi di animali appartenenti a queste due specie. Nei polli è stato possibile effettuare solo due cicli di infezione, in quanto la carica virale presente negli escreti non era sufficiente a generare l'infezione in gruppi successivi. L'infezione di polli e tacchini con il virus adattato alla quaglia ha dato prova di un aumento della patogenicità, causando manifestazioni cliniche marcatamente più gravi e maggiori livelli di eliminazione virale paragonata all'infezione con il ceppo *wild type*. L'infezione di polli con il virus adattato al tacchino, pur non provocando manifestazioni cliniche più gravi, ha evidenziato un evidente incremento dell'eliminazione del virus attraverso le vie naturali.

Conclusioni. I dati ottenuti nel presente lavoro dimostrano che alcune specie avicole domestiche come la quaglia, possono giocare un ruolo chiave nell'adattamento dei virus influenzali circolanti negli uccelli selvatici alle specie avicole domestiche, incrementandone la patogenicità e la capacità di diffusione nel pollame.

INDAGINE VIROLOGICA E ISTOLOGICA PER BETANODAVIRUS IN TRIGLIA DI FANGO (*MULLUS BARBATUS* L. 1758)

Sara Ciulli, Marco Grodzki, Rubina Sirri, Giorgia Bignami, Enrico Volpe, Luciana Mandrioli, Santino Prosperi

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Bologna

I betanodavirus sono la causa della encefalo retinopatia virale responsabile di sintomi nervosi, mortalità e notevoli perdite economiche nel settore dell'acquacoltura in tutto il mondo. Questi virus sono stati individuati in un numero crescente di specie ittiche, allevate e selvatiche, nelle quali tuttavia non erano presenti sintomi neurologici. Nell'epidemiologia dell'infezione, per alcune specie quali l'orata, è stato stabilito un ruolo specifico come vettore asintomatico. In altri casi, la trasmissione interspecifica da pesci asintomatici è fortemente sospettata. I pesci a vita libera potrebbero, quindi, essere responsabili della trasmissione del virus fra aree marine distanti attraverso la migrazione e/o la persistenza invernale del virus. Nel Mar Mediterraneo, la triglia di fango (*Mullus barbatus*) è stata ripetutamente segnalata fra le specie recettive per il betanodavirus.

Triglie provenienti dal mercato ittico di Cesenatico sono state campionate nel corso di un anno (ottobre 2006-settembre 2007) e testate mediante RT-PCR e *nested*/PCR per betanodavirus. 55 casi di triglia, di cui 28 provenienti da soggetti positivi alla *nested*/PCR, sono stati anche sottoposti ad esame istologico. Le principali aree del SNC (cervello, cervelletto, midollo spinale) e gli occhi sono stati esaminati per la presenza di lesioni degenerativo-necrotiche indotte dal virus e che caratterizzano fortemente questa malattia.

Tramite analisi statistica (One-way ANOVA e Tukey test; GraphPad Software) la taglia dei pesci analizzati è stata correlata alla positività/negatività verso betanodavirus.

In totale sono stati campionati 105 animali: il 34,3% e il 64,4% di essi hanno rispettivamente dato esito positivo a RT-PCR e *nested*/PCR, mostrando la frequente infezione da betanodavirus nelle triglie durante tutto l'arco dell'anno. Nonostante l'utilizzo di una PCR qualitativa, la positività alla *nested*/PCR di campioni negativi per la RT-PCR, mostra una bassa carica virale nella metà dei pesci infetti.

L'esame istologico non ha evidenziato vacuolizzazioni citoplasmatiche nè necrosi neuronale o microgliale delle aree cerebrali campionate, del midollo spinale e della retina.

L'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative tra le dimensioni dei soggetti positivi/negativi al betanodavirus, né è stata evidenziata alcuna differenza tra le dimensioni dei soggetti positivi a RT-PCR o a *nested*/PCR.

In conclusione, la triglia di fango è risultata ampiamente infetta da betanodavirus, anche durante il periodo invernale. I soggetti adulti esaminati hanno mostrato frequentemente una bassa carica virale e non hanno presentato danni istomorfologici del SNC. Questi risultati possono essere coerenti con il ruolo di questi animali quali possibili portatori asintomatici e/o ospiti idonei allo svernamento per betanodavirus.

STUDIO SIEROEPIDEMIOLOGICO SULLA PRESENZA DI HERPESVIRUS CAPRINO 1 (CPHV-1) IN ALLEVAMENTI DELLA CAMPANIA

Nicola D'Alessio, Francesca Di Prisco, Serena Astarita, Ugo Mariani, Giuseppe Aprea, Roberto Iannone, Sergio Brandi, Alessandra Di Sarno, Giuseppe Iovane, Giorgio Galiero
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Napoli

Introduzione. CpHV-1 è causa d'infezioni sistemiche nei soggetti giovani e danni genitali negli adulti. Nei capretti la sintomatologia è prevalentemente di tipo enterico o respiratorio, con esito frequentemente fatale nei soggetti di 1-2 settimane. CpHV-1, che presenta strette correlazioni genetiche ed antigeniche con altri *alphaherpesvirus* incluso BoHV-1, ha diffusione mondiale, con picchi di prevalenza nelle popolazioni di capre allevate nel bacino del Mediterraneo. Studi condotti nel nostro Paese hanno evidenziato una positività sierologica oscillante tra il 30% e il 60%. L'assenza di dati circa la presenza di questo virus in allevamenti caprini della Campania, Regione nella quale tale comparto rappresenta una realtà zootecnica di tutto rilievo, ci ha indotto ad effettuare un'indagine sierologica per definire la prevalenza dell'infezione al fine di valutare quali possibili interventi suggerire per il controllo della diffusione virale.

Metodi. La numerosità del campione è stata determinata considerando una prevalenza attesa del 30%, precisione del 4%, confidenza del 99% su una popolazione teoricamente infinita. È stato controllato un numero totale di capi di 885, provenienti da 74 diverse aziende delle seguenti province: Avellino (193 campioni/12 aziende), Benevento (189/11) Salerno (503/51). I soggetti prescelti, tutti di età superiore ai 6 mesi, sono stati sottoposti a test ELISA (IDEXX) per la ricerca degli anticorpi verso le glicoproteine Gb e Ge. I campioni positivi al test immunoenzimatico sono stati sottoposti a sieroneutralizzazione con BoHV-1 e CpHV-1.

Risultati. Su 885 capi controllati, 183 (20,7%) sono risultati positivi al test ELISA Gb, di questi, 12 lo erano anche verso Ge. La prevalenza nelle popolazioni delle tre province è risultata la seguente: Salerno 14,1%; Avellino 26,4%; Benevento 32,2%. Delle 74 aziende, 18 (24,3%) sono risultate positive, con *range* di prevalenza intra-aziendale oscillante tra il 68,3% ed il 5,8%. La sieroneutralizzazione, effettuata esclusivamente sui 183 campioni ELISA positivi, non ha confermato la positività al test immunoenzimatico per 7 di essi, mentre anche per i 12 Ge positivi ha orientato la diagnosi verso l'infezione da CpHV-1 e non da altri *alphaherpesvirus*.

Conclusioni. Questa indagine evidenzia una prevalenza dell'infezione da CpHV-1 inferiore a quella attesa. La cros-reattività con virus correlati è stata modesta e svelabile mediante sieroneutralizzazione. L'elevato numero di allevamenti negativi (75,7%) mette in risalto una sostanziale ridotta diffusione del virus all'interno della popolazione indagata, ma dove presente, interessa percentuali consistenti di capi. Sembra quindi che interventi di risanamento o almeno di contenimento dell'infezione, basati sul controllo dei capi di nuova immissione ed eventuale eliminazione di capre sierologicamente positive, possano essere intrapresi con successo.

STUDIO DEGLI ISOLATI DI RABBIA CIRCOLANTI NELLA FAUNA SELVATICA ITALIANA

Paola De Benedictis, Sabrina Marciano, Angela Salomoni, Crispina Veggiato, Franco Mutinelli, Iaria Capua

*Centro di Referenza Nazionale per la Rabbia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle
Venezie, Legnaro, Padova*

Introduzione. Nell'ottobre 2008, la rabbia silvestre è ricomparsa in Italia, in Friuli-Venezia Giulia al confine con la Slovenia. Ad oggi sono 14 i casi di rabbia diagnosticati in 6 comuni della provincia di Udine. L'Italia era stata classificata come Paese indenne da rabbia dal 1997, dopo che l'ultimo caso era stato confermato in una volpe in provincia di Trieste nel 1995. In questo studio sono stati selezionati isolati di rabbia contemporanei e storici e comparati con quelli disponibili nelle banche dati pubbliche.

Materiali e metodi. Sono stati analizzati 14 campioni di cervello ricevuti nel 2008-2009 e 6 appartenenti alla trascorse epidemie italiane. Tutti i campioni sono risultati positivi al test di immunofluorescenza diretta per la rabbia e all'isolamento virale su coltura cellulare di neuroblastoma murino. Da tutti i campioni è stata ottenuta la sequenza completa del gene codificante la nucleoproteina (N) del virus della rabbia e comparata con quelle disponibili nelle banche dati pubbliche. L'analisi filogenetica è stata ottenuta utilizzando il metodo *neighbour-joining* come descritto nel programma Mega 4.

Risultati. L'analisi filogenetica delle sequenze rivela che tutti i virus italiani analizzati appartengono al genotipo 1 (rabbia classica) ed al gruppo dei virus dell'Europa Occidentale (clade WE). Come atteso, i virus responsabili dell'attuale e della trascorsa epidemia in Friuli-Venezia Giulia si sono raggruppati con i virus circolanti nei Paesi limitrofi, in particolare Slovenia, Bosnia Erzegovina ed ex-Yugoslavia.

Conclusioni. Alla luce delle caratteristiche degli isolati analizzati, l'emergenza della rabbia silvestre nell'Italia nord orientale è riconducibile alla diffusione dell'infezione dalla Slovenia, dove, infatti, nonostante numerose campagne vaccinali la rabbia silvestre non è stata a tutt'oggi eradicata. Le misure di controllo messe in atto a livello regionale per confinare/limitare la diffusione dell'infezione comprendono: la vaccinazione obbligatoria dei cani e degli erbivori domestici a rischio di infezione, il divieto di caccia con il cane, il rafforzamento della sorveglianza sulla fauna selvatica, oltre ad una campagna di sensibilizzazione della popolazione. Una prima campagna di vaccinazione orale delle volpi, mediante l'utilizzo di esche vaccinali SAG2, è stata realizzata nel gennaio-febbraio 2009, con risultati soddisfacenti ma non definitivi. Ulteriori campagne vaccinali sono già state programmate fino a maggio 2010 per controllare definitivamente l'epidemia, secondo le raccomandazioni OMS/OIE.

ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DEL VIRUS DELL'ENCEFALITE VIRALE DA ZECCHIE (TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS) IN IXODES RICINUS NELL'ITALIA NORD ORIENTALE

Paola De Benedictis, Fabrizio Montarsi, Patrizia Danesi, Elena Mazzolini, Alessandra Drago, Giovanni Cattoli, Gioia Capelli, Stefano Marangon, Ilaria Capua
Centro di Referenza Nazionale per la Ricerca sulle Malattie Infettive all'Interfaccia Uomo-Animale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

Introduzione. L'encefalite virale da zecche (TBE) è la patologia da vettori più importante riportata in Italia nord orientale. Il virus TBE causa nell'uomo una meningoencefalite che decorre nella maggior parte dei casi asintomatica, ma possono presentarsi anche casi gravi, raramente fatali o *sequelae* neurologiche permanenti. Nel periodo 2005-2008 sono state monitorate cinque province dell'Italia nord orientale al fine di individuare la presenza del virus TBE in *Ixodes ricinus*, sia in aree riconosciute come infette sia in siti mai monitorati in passato.

Materiali e metodi. Il campionamento delle zecche è stato effettuato mediante dragging in siti fissi monitorati mensilmente ed in siti itineranti, visitati una o massimo due volte. Le zecche adulte sono state analizzate singolarmente, mentre le ninfe e le larve sono state analizzate in *pool* da 5/10 o 10/20 rispettivamente. Il monitoraggio è stato eseguito mediante l'applicazione di metodica *Real-Time* RT-PCR per l'identificazione dell'RNA virale. I campioni positivi sono stati successivamente confermati mediante *nested* RT-PCR e sequenziamento dei prodotti amplificati. L'isolamento virale è stato eseguito mediante inoculazione intracerebrale in topini neonati, osservati fino ad una settimana dopo l'inoculazione, e sacrificati all'inizio dello sviluppo della sintomatologia nervosa. A partire dall'isolato virale, il gene codificante per la glicoproteina dell'envelope è stato amplificato mediante RT-PCR, sequenziato e analizzato filogeneticamente.

Risultati. Un totale di 5.831 zecche *Ixodes ricinus* (3.185 larve, 2.428 ninfe e 218 adulti) è stato raccolto e testato per la ricerca del virus TBE. La circolazione del virus TBE nella zecca *Ixodes ricinus* è stata confermata in tre delle cinque province in esame nel 2006, 2007 e 2008. L'analisi della sequenza del gene codificante per la glicoproteina dell'envelope ha dimostrato che il virus circolante in Italia nord orientale appartiene al gruppo dei virus TBE occidentali (*Western TBEV group*) ed in particolare si raggruppa con isolati provenienti dalla vicina Slovenia.

Conclusioni. Questo studio ha confermato la presenza dell'infezione da virus TBE nella zecca *Ixodes ricinus* in tre foci distinti nell'Italia nord orientale. Il virus è stato individuato in zecche adulte e in ninfe, mai in larve, benchè sia riportato in letteratura che l'infezione si trasmetta verticalmente. L'isolamento del virus ha permesso di procedere alla comparazione con isolati circolanti nel resto del continente europeo e di individuare l'origine di nuovi focolai d'infezione di questa zoonosi emergente nell'Europa centrale. Una strategia congiunta a livello extra-regionale, tra operatori del settore medico e veterinario, risulta necessaria per il controllo, la prevenzione e la diagnosi precoce della malattia nell'uomo.

ANALISI DESCRITTIVA DEI FATTORI DI RISCHIO EVIDENZIATI NEI FOCOLAI DI MVS IN UMBRIA

Mariangela De Curtis, Eleonora Scoccia, Laura Faccenda, Silva Costarelli, Carmen Maresca
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Introduzione. La Malattia Vescicolare del Suino (MVS), causata da un enterovirus appartenente alla famiglia *Picornaviridae*, è presente esclusivamente in Europa, soprattutto in Italia. Nel 2006 e 2007 una grossa epidemia ha colpito regioni del Nord Italia causando gravi danni economici. Negli ultimi mesi del 2008 in Umbria, nella provincia di Perugia, si è verificata un'epidemia di MVS. Questo lavoro ha valutato ed analizzato i dati dei focolai umbri.

Metodi. Sono state prese in considerazione la durata, l'estensione geografica, la prevalenza, il tasso d'attacco dell'epidemia ed alcuni fattori di rischio (consistenza di capi, indirizzo produttivo, densità di allevamenti e capi ogni 10 chilometri quadrati). I dati sono stati analizzati tramite l'analisi bivariata; sono state considerate significative le variabili con valore di $p < 0,05$. Per le elaborazioni sono stati utilizzati i software *free*, Epi Info3.4.3 e WinEpiScope 2.0.

Risultati. I comuni interessati dalla malattia sono stati 9 per un'area totale di 1.124,137 chilometri quadrati. L'epidemia ha avuto una durata di 7 settimane (10/10/2008-21/11/2008) e sono stati aperti 30 focolai. Il picco epidemico, 8 focolai, si è verificato nella 5a settimana, tra il 7 novembre ed il 13 novembre. Il tasso d'attacco è risultato di 287/80.070 animali, cioè 0,35% in 7 settimane. La prevalenza di allevamenti positivi è risultata pari al 5,2% (IC95% 3,98-6,74). Le indagini epidemiologiche hanno messo in evidenza che 7 (23,3%) dei 30 focolai erano primari e 23 secondari (76,6%). Le correlazioni sono risultate significative per la classe di consistenza di animali presente in allevamento superiore a 500 capi (OR=1,4<3,5<8,6); per la densità di allevamenti superiore a 5/10 Km² (OR=2,3<5,9<15,7); per la densità di capi superiore a 1.000/10 Km² (OR=1,6<13,3<104,3); per le stalle di sosta (OR=12,8<122,7<1.172).

Conclusioni. Tra le malattie vescicolari del suino, la MVS, pur essendo inserita nella ex lista A dell'OIE, viene generalmente considerata di secondaria importanza a ciò si aggiunge il fatto che la maggior parte delle regioni italiane sono accreditate per MVS e che la malattia è stata relegata per anni in alcune regioni del Sud. L'epidemia di MVS in Umbria come le precedenti in Lombardia e Veneto, in ragione dell'elevato numero di focolai, hanno però evidenziato la presenza di lacune nel sistema di sorveglianza. I fattori di rischio evidenziati mostrano la pericolosità della eccessiva presenza di capi ed allevamenti in territori ristretti che, in associazione alla totale mancanza di norme di biosicurezza evidenziata nel corso delle indagini epidemiologiche, ha purtroppo permesso l'esplosione dell'epidemia.

RICERCA DI ANTICORPI VERSO VIRUS INFLUENZALI AVIARI H5 E H7 IN LAVORATORI POTENZIALMENTE ESPOSTI ALL'INFEZIONE

Maria Alessandra De Marco (a), Elisabetta Raffini (c), Simona Puzelli (a), Livia Di Trani (b), Mauro Delogu (d), Claudia Cotti (d), Matteo Frasnelli (c), Luciano Venturi (e), Emanuela Fiumana (f), Lebana Bonfanti (g), Ilaria Capua (g), Isabella Donatelli (a)

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

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

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

(d) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Bologna*

(e) *Dipartimento di Sanità Pubblica, Servizio Veterinario, AUSL, Ravenna*

(f) *Dipartimento di Sanità Pubblica, AUSL, Forlì*

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

Introduzione. Il riassortimento genetico umano/aviario nei virus responsabili delle pandemie influenzali umane del 1957 (H2N2) e 1968 (H3N2), ha evidenziato l'importante ruolo degli uccelli nell'emergenza e diffusione nella popolazione umana di virus influenzali di tipo A. La via di trasmissione indiretta dell'infezione, attraverso specie *mixing vessel* quali il suino, è stata inizialmente ritenuta fondamentale per il salto di specie dai volatili all'uomo. Tuttavia, a partire dall'emergenza del virus A/H5N1 nel 1997, le evidenze virologiche e sierologiche di trasmissione diretta di virus influenzali dal pollame all'uomo, precedentemente sporadiche, sono aumentate risultando talora associate a infezioni letali (H5N1, H7N7). Tali eventi sottolineano, inoltre, il rischio pandemico legato a un eventuale riassortimento genetico tra Virus Influenzali Aviari (AIVs) ed umani. Al fine di valutare la possibile trasmissione di AIVs di sottotipo H5/H7 in operatori del settore avicolo italiano, è stata effettuata un'indagine sierologica per la ricerca di anticorpi specifici.

Metodi. Un totale di 81 sieri umani è stato incluso nello studio. Di questi, 50 sono stati raccolti nel 2005-2006 da lavoratori operanti in allevamenti avicoli *free range* nella provincia di Ravenna, precedentemente interessata dalla circolazione di sottotipi H5N9 e H7N1 di AIVs. Gli altri 31 sieri sono stati prelevati da lavoratori esposti al contagio, in seguito ad alcuni focolai di influenza aviaria verificatisi in allevamenti dell'Italia settentrionale e causati dai seguenti sottotipi virali a bassa patogenicità (LP): A/H7N3, Veneto, 2007; A/H5N2, Emilia-Romagna, 2007; A/H5N1, Veneto, 2008. Per la ricerca di anticorpi, è stato impiegato un test di inibizione della emoagglutinazione (HI) modificato, con emazie di equino. I 50 sieri raccolti nel 2005-2006, sono stati saggiati nei confronti di 8 diversi ceppi antigenici LP H5 e H7 (1 H5N1, 3 H5N2, 1 H5N3, 1 H5N9, 1 H7N1, 1 H7N3), isolati negli ultimi 15 anni in Italia. Nelle analisi effettuate sui campioni di siero

raccolti nell'ambito di specifici focolai nel pollame, gli stessi stipiti virali isolati durante il focolaio, ove possibile, sono stati impiegati come antigeni.

Risultati e conclusioni. Tutti i sieri esaminati sono risultati negativi. L'elevata sensibilità del metodo HI impiegato, dovuta all'utilizzo delle emazie di cavallo, caratterizzate da una maggiore capacità di legarsi ai virus influenzali aviari rispetto a quelle di tacchino/pollo, unita ad una scelta mirata degli antigeni virali impiegati nelle prove, indicano l'assenza di anticorpi specifici anti-H5/H7 nei sieri dei soggetti esaminati. Ciò potrebbe essere dovuto a vari fattori quali la non-trasmissibilità all'uomo dei virus circolanti nei volatili o la limitata esposizione dei lavoratori dovuta alla rapida estinzione dei focolai nel pollame.

P FOCOLAIO DI WEST NILE DISEASE IN EMILIA-ROMAGNA, 2008: INDAGINE SULLA SIEROPREVALENZA NEGLI EQUIDI

Silvia Dell'Anna (a), Gianluca Rugna (a), Giorgio Galletti (a), Massimo Tassinari (b), Marco Tamba (a)

(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia*

(b) *Azienda Servizio Veterinario, USL, Ferrara*

Introduzione. La *West Nile Disease* (WND) è una zoonosi trasmessa da zanzare causata da un flavivirus (WNV), endemica nel Bacino del Mediterraneo. Gli uccelli sono i principali ospiti del WNV, mentre l'uomo e il cavallo possono infettarsi e talvolta manifestare sintomatologia clinica, ma vengono considerati ospiti a fondo cieco. Dal 2002 in Italia, in seguito al primo focolaio di WND verificatosi nel 1998, è stato attivato uno specifico piano nazionale di sorveglianza. Nell'estate del 2008 il WNV si è nuovamente manifestato determinando casi clinici nei cavalli e nell'uomo. Per valutare l'estensione del fenomeno sono state organizzate attività straordinarie di sorveglianza nell'area coinvolta dalla circolazione virale. In questo lavoro vengono presentati i risultati della sorveglianza sierologica svolta sugli Equidi in Emilia-Romagna.

Metodi. Nell'area a rischio, comprendente i comuni delle province di Modena, Bologna, Ferrara e Ravenna a Nord della Via Emilia (SS9), nel periodo settembre-dicembre 2008 i campioni prelevati per il piano di sorveglianza dell'Anemia Infettiva Equina sono stati testati anche per WND con metodica ELISA. I campioni non negativi sono stati inviati per la conferma al CESME di Teramo. Nelle aziende con almeno una positività sierologica confermata (titolo $SN \geq 1:10$), è stata effettuata l'indagine epidemiologica con censimento e prelievo di tutti gli equidi presenti. Di ogni animale esaminato sono state raccolte le principali informazioni anagrafiche. Sono stati calcolati i livelli di prevalenza in base alla provincia, alla specie, al sesso e all'età (sono state individuate 4 classi in base all'anno di nascita: 2008, 2007, 2006 e prima del 2006) degli equidi presenti. È stato usato il test chi-quadro per valutare eventuali differenze di prevalenza tra i gruppi.

Risultati. Sono stati esaminati complessivamente 2.045 Equidi (1.910 cavalli, 123 asini, 11 bardotti, 1 mulo). Sono risultati positivi 499 Equidi (484 cavalli, 15 asini) con una prevalenza complessiva del 24,4% (CI95%: 22,6-26,3). La prevalenza nell'asino (12,2%; CI95%: 7,0-19,3) è risultata significativamente inferiore rispetto alla prevalenza nel cavallo (25,3%; CI95%: 23,4-27,4) ($X^2=10,78$, $p<0,01$). La prevalenza nelle province è risultata rispettivamente: 47,2% a Ferrara (CI95%: 43,5-51,0), 16,4% a Bologna (CI95%: 13,9-19,2), 10,7% a Modena (CI95%: 7,5-14,6), 4% a Ravenna (CI95%: 1,9-7,2). Le differenze riscontrate tra le province sono risultate statisticamente significative ($X^2=14,72$, $p<0,01$). Nella provincia di Ferrara, che ha presentato il livello di prevalenza più elevato, sono state valutate le prevalenze tra le classi d'età considerate. Non sono state osservate differenze significative.

Conclusioni. I livelli di prevalenza osservati nell'area a rischio differiscono tra le province. In provincia di Ferrara la prevalenza rilevata risulta più elevata e confrontabile

con quella registrata nel 1998 nel Padule di Fucecchio (38%). Nelle altre Province invece la prevalenza risulta più bassa, confrontabile con quella rilevata nel 2000 in Camargue (8,9%). Sebbene alcune sieropositività siano state riscontrate nell'autunno 2007 e primavera 2008 in cavalli della provincia di Ferrara, i valori di sieroprevalenza e i risultati delle indagini epidemiologiche fanno supporre una introduzione recente del virus WN.

P IDENTIFICAZIONE DEL VIRUS DELL'HEV IN SUINI AL MACELLO

Ilaria Di Bartolo (a), Laura Castellini (b), Eleonora Ponterio (a), Fabio Ostanello (c), Franco Maria Ruggeri (a)

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

(b) *Dipartimento di Medicina Interna, Policlinico Universitario A. Gemelli, Roma*

(c) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università degli Studi, Ozzano Emilia, Bologna*

L'epatite E costituisce un grave problema di Sanità Pubblica in molti Paesi in via di sviluppo e una possibile emergenza nei Paesi industrializzati, dove vengono descritti un numero crescente di casi sporadici. L'agente eziologico (*Hepatitis E Virus*, HEV) è un RNA virus privo di envelope, e classificato nel genere hepevirus. Il virus causa vaste epidemie nei Paesi in via di sviluppo, dove la trasmissione è legata alle scarse condizioni igieniche ed è veicolato dal consumo di acqua contaminata. Nei Paesi industrializzati, i casi clinici di epatite E sono prevalentemente sporadici e sono in crescita i casi autoctoni in soggetti senza anamnesi di viaggio all'estero. Alcuni di questi risultano in relazione con il contatto diretto o indiretto con suini, cinghiali o cervi infetti. Attualmente, infatti, HEV è considerato un agente di zoonosi emergente e il suino è ritenuto un possibile serbatoio del virus. In Giappone, casi di epatite E sono stati associati all'ingestione di carne o organi crudi di suino, cinghiale e cervo. Recentemente la presenza del virus è stata rilevata anche in fegati al commercio. In Europa è stata dimostrata la presenza e la diffusione dell'infezione in allevamenti suini in numerosi Paesi, compresa l'Italia.

Il presente lavoro ha avuto come obiettivo la valutazione della presenza di HEV in suini adulti al momento della macellazione.

A tale scopo, sono stati raccolti campioni di feci, bile e sangue da 48 animali macellati in uno stabilimento del Nord Italia, e giudicati sani sia *pre-mortem* sia all'esame ispettivo.

La presenza di RNA virale di HEV nei diversi campioni è stata valutata mediante un saggio di Reverse-Transcription-PCR (RT-PCR) utilizzando i *primer* A1-S1 che amplificano una regione conservata all'interno della regione capsidica. Il 47% degli animali è risultato positivo al test molecolare, e per 18 animali sono risultati positivi i campioni fecali e in sei casi i campioni di bile. Per confermare i risultati ottenuti, i campioni positivi sono stati sottoposti a sequenziamento nucleotidico e l'analisi delle sequenze ottenute ha confermato la presenza di genoma di HEV, in particolare corrispondente a ceppi appartenenti al genotipo G3, già identificato nel suino e nell'uomo nei Paesi sviluppati.

ESPRESSIONE DELLA PROTEINA CAPSIDICA DI UN CEPPO ITALIANO SUINO DI EPATITE E

Ilaria Di Bartolo (a), Eleonora Ponterio (a), Nadia Inglese (b), Francesca Martelli (b),
Andrea Caprioli (c), Fabio Ostanello (d), Franco Maria Ruggeri (a)

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

(b) *Virology Department, Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Weybridge, Surrey,
KT15 3NB, United Kingdom*

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

(d) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università degli
Studi, Bologna, Ozzano Emilia, Bologna*

L'Epatite E è una malattia infettiva con caratteristiche cliniche di epatite acuta. L'agente eziologico responsabile è il virus dell'epatite E (*Hepatitis E Virus*, HEV), attualmente classificato nel genere hepevirus. L'HEV è un virus a RNA monocatenario, e il genoma codifica per le proteine non strutturali (ORF1), la proteina capsidica maggiore (ORF2) e per una proteina con funzioni non note (ORF3). La malattia è considerata endemica nei Paesi in via di sviluppo, dove causa epidemie generalmente associate al consumo di acqua contaminata. Inizialmente i casi di HEV in adulti nei Paesi industrializzati erano associati a pazienti con una storia recente di viaggi all'estero. Di recente, casi sporadici di origine autoctona sono stati descritti in diversi Paesi industrializzati, compresa l'Italia. Il virus è stato identificato in diversi animali domestici (suino) e selvatici (cervidi, cinghiale). Una possibile origine zoonotica con trasmissione del virus dal suino all'uomo è suggerita da evidenze epidemiologiche e virologiche.

Ad oggi non esiste un sistema cellulare per la crescita del virus *in vitro*, limitando conseguentemente gli studi sulla patogenesi e immunologia di HEV.

La proteina del capsido virale di un ceppo di HEV suino, identificato in Italia, è stata clonata ed espressa nel sistema ricombinante di baculovirus. L'RNA totale è stato estratto da un campione di bile di un suino clinicamente sano (positivo per HEV) e utilizzato per sintetizzare il cDNA mediante trascrizione inversa a partire dalla regione poliA del genoma virale. Il cDNA è stato utilizzato in una reazione di PCR con i *primer* FΔ111ORF2-RORF2 disegnati al fine di amplificare un frammento corrispondente a una delezione dei primi 111 aa, della regione capsidica (ORF2) di HEV. Questo è stato successivamente clonato nel vettore pfastBAC per l'espressione con il sistema di baculovirus in cellule di insetto Sf9.

La presenza della ORF2 all'interno del bacmide e il suo corretto frame di lettura sono stati confermati mediante analisi di sequenza. La proteina è stata inoltre utilizzata per produrre sieri policlonali e anticorpi monoclonali murini.

IDENTIFICAZIONE DI CEPPI DI SAPOVIRUS E NOROVIRUS IN SUINI ASINTOMATICI IN ALLEVAMENTI DELL'EMILIA-ROMAGNA

Ilaria Di Bartolo (a), Eleonora Ponterio (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, Università degli Studi, Bologna*

Norovirus e sapovirus sono due membri della famiglia *Caliciviridae*. Essi presentano un genoma a RNA monocatenario e sebbene l'organizzazione genomica vari tra i due generi, entrambi codificano per le proteine non strutturali (inclusa la RNA polimerasi RNA dipendente), per la proteina capsidica principale e per una proteina le cui funzioni restano sconosciute. I NoV e SaV sono la seconda causa di ricovero ospedaliero per gastroenterite (GE) pediatrica e i NoV da soli sono responsabili di oltre il 50% delle epidemie di GE nell'adulto. NoV e SaV infettano anche animali domestici e da reddito, e in particolare suini e bovini sono potenziali serbatoi di infezione per l'uomo. Durante il primo semestre del 2006 e del 2008, 201 campioni fecali sono stati prelevati da altrettanti suini sani provenienti da 23 allevamenti localizzati nella regione Emilia-Romagna.

I campioni fecali sono stati analizzati per la ricerca di norovirus e sapovirus mediante un saggio di trascrizione inversa e PCR utilizzando la coppia di *primer* p289-p290, amplificando una regione conservata all'interno dell'RNA polimerasi RNA dipendente (RdRP)). Il metodo permette di individuare sia ceppi di sapovirus (PEC) che di norovirus suini. L'RNA proveniente da tredici campioni fecali suini è risultato positivo al test di RT-PCR, mostrando una banda di DNA delle dimensioni attese (≈ 319 bp per norovirus e 319bp per PEC). Per confermare i risultati ottenuti e caratterizzare i ceppi coinvolti, sei campioni positivi sono stati sequenziati. L'analisi delle sequenze ottenute ha confermato che cinque ceppi appartenevano al genere sapovirus e hanno mostrato un'identità di sequenza nucleotidica tra il 79% e l'85% con altri ceppi suini descritti in Europa. Uno dei ceppi sequenziati è invece risultato appartenere ai norovirus, in particolare al tipo GI.18 che sebbene appartenente allo stesso genogruppo dei ceppi umani di norovirus è un genotipo comune, ad oggi, per i soli ceppi suini. Lo studio condotto, se pur preliminare, ha mostrato una prevalenza del 13% (tra NoV e SaV) in suini sani. Nel suino sembra più comune la presenza di sapovirus. L'analisi di sequenza ha mostrato che i ceppi di PEC e NoV individuati sono correlati e vicini geneticamente ai ceppi umani. Sebbene non dimostrata, la possibile origine zoonotica non può essere esclusa. Ulteriori studi saranno condotti per caratterizzare i ceppi identificati, consentendo di avere un quadro filogenetico più completo.

P DIAGNOSI DI LABORATORIO DELLA PARVOVIROSI CANINA E INDAGINE SULLA DIFFUSIONE DELLE VARIANTI DI CPV-2 IN ABRUZZO

Cristina Esmeralda Di Francesco (a), Barbara Di Martino (a), Gabriella Andrenacci (a),
Ivano Massirio (b), Costantina Desario (c), Nicola Decaro (c), Fulvio Marsilio (a)

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

(b) *Asl, Reggio Emilia*

(c) *Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Facoltà di Medicina Veterinaria,
Università degli Studi, Bari*

Canine Parvovirus (CPV-2) è l'agente eziologico della gastroenterite emorragica del cane, patologia infettiva clinicamente caratterizzata da febbre, vomito, diarrea emorragica e leucopenia. Segnalato per la prima volta alla fine degli anni '70 in Europa e Nord America, CPV-2 ha subito notevoli modificazioni genetiche con la comparsa in pochi anni delle varianti CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c, quest'ultima segnalata per la prima volta in Italia, che hanno completamente sostituito il ceppo originale, oggi presente solo nelle formulazioni vaccinali. Negli ultimi anni l'avvento della biologia molecolare ha permesso l'allestimento di nuove tecniche per la diagnosi di parvovirosi basate sia sull'impiego di protocolli convenzionali di PCR, in grado di amplificare frammenti specifici del DNA di CPV-2, sia sull'applicazione di tecniche quantitative di PCR che permettono di: i) determinare esattamente la quantità di genoma virale contenuto nei campioni; ii) caratterizzare le diverse varianti antigeniche di CPV-2 associate all'infezione; iii) differenziare i ceppi di campo da quelli di origine vaccinale. Scopo del presente lavoro è stato quello di comparare l'impiego delle tecniche di Emoagglutinazione (HA) e PCR nella diagnosi di laboratorio di parvovirosi su n. 104 campioni di feci prelevati durante gli anni compresi tra il 2004 e il 2008 da cani con sintomatologia gastroenterica, nonché di tipizzare le varianti antigeniche di CPV-2 associate all'infezione. Rispetto alla prova di *Real-Time* PCR, impiegata come *golden standard*, i test impiegati sono risultati significativamente differenti tra loro confermando come le tecniche biomolecolari forniscano prestazioni migliori rispetto alla prova di EA. La tipizzazione dei ceppi di CPV-2 identificati ha evidenziato come la variante CPV-2a sia quella più rappresentata (60%) rispetto alla variante CPV-2c (38%), mentre CPV-2b è stato identificato in un solo caso, confermando come anche in Abruzzo questo ceppo stia progressivamente scomparendo. Rispetto agli anni di campionamento, tuttavia, è stato possibile osservare come la diffusione della variante CPV-2a, identificata nella totalità dei campioni positivi prelevati nel 2004, si riduca negli anni successivi a favore della variante CPV-2c suggerendo come la circolazione di questa nuova variante stia gradualmente aumentando. In conclusione, le prove di laboratorio sono indispensabili per confermare il sospetto clinico di parvovirosi e il monitoraggio delle varianti di CPV-2 circolanti è importante per il controllo e la prevenzione dell'infezione, nonché per verificare l'opportunità di allestire nuovi vaccini con i ceppi realmente presenti nel territorio.

CARATTERIZZAZIONE DEI CEPPI DI CAMPO DI CDV CIRCOLANTI NELLA REGIONE ABRUZZO MEDIANTE RT-PCR *RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM*

Cristina Esmeralda Di Francesco (a), Barbara Di Martino (a), Daniela Di Francesco (a),
Giovanni Aste (b), Andrea Boari (b), Fulvio Marsilio (a)

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

(b) *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi, Teramo*

Il cimurro del cane rappresenta una delle patologie infettive più comuni nella popolazione canina, caratterizzata da sintomi respiratori, enterici e nervosi ad esito letale soprattutto nei cuccioli e nei soggetti privi di immunità. L'agente eziologico è *Canine Distemper Virus* (CDV), virus a RNA monocatenario, appartenente alla famiglia *Paramyxoviridae*, genere morbillivirus. CDV è considerato un virus monotipico dal momento che le prove con sieri policlonali dimostrano l'esistenza di un solo sierotipo. Tuttavia, le tecniche di biologia molecolare hanno permesso recentemente di evidenziare la presenza di diversi stipiti virali sulla base delle differenze nella sequenza nucleotidica del gene che codifica per la proteina H di CDV. In particolare, sono stati identificati sei principali gruppi genetici di CDV indicati come America-1 e 2, Asia-1 e 2, Europeo e Artico. I ceppi vaccinali attualmente utilizzati per l'allestimento dei vaccini attenuati appartengono al gruppo America-1, mentre in Italia le indagini condotte finora hanno evidenziato la circolazione nella popolazione di cani di ceppi di campo appartenenti ai gruppi Europeo e Artico.

Scopo di questo lavoro è stato quello di allestire e impiegare una prova di *Emi-nested* RT-PCR per la diagnosi di laboratorio di cimurro in n. 53 cani con sintomatologia sospetta provenienti da canili e ambulatori privati presenti in Abruzzo, nonché di evidenziare eventuali differenze nella sequenza nucleotidica del gene che codifica per la proteina H dei ceppi di campo di CDV identificati mediante l'applicazione di una metodica di RT-PCR *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Complessivamente su n. 86 campioni (tamponi mucosali, sangue intero e organi) prelevati dai soggetti in esame sono risultati positivi all'indagine molecolare n. 38 campioni (44%) provenienti da n. 30 cani (57%). Dai campioni positivi sono stati selezionati n. 10 ceppi di CDV dei quali è stata amplificata mediante RT-PCR una porzione di 986 bp del gene che codifica per la proteina H del virus.

Il frammento così ottenuto è stato sottoposto a digestione enzimatica impiegando due diversi enzimi di restrizione, PstI e AluI. L'analisi dei profili di digestione ha permesso di evidenziare come entrambi gli enzimi impiegati mostrino una diversa attività di clivaggio tra i ceppi di campo e il ceppo vaccinale *Onderstepoort* di CDV impiegato come controllo, riuscendo in questo modo a fornire un metodo rapido e relativamente semplice per identificare gli stipiti di campo responsabili di infezione. Inoltre, tutti i ceppi di CDV oggetto di studio hanno mostrato di avere lo stesso profilo di restrizione impiegando l'enzima AluI, suggerendo come gli stipiti di CDV circolanti nel territorio abruzzese abbiano una elevata omologia nella sequenza del gene H e possano appartenere, quindi, ad

uno stesso gruppo. Ulteriori indagini sono in corso per conoscere le sequenze nucleotidiche del frammento del gene H dei ceppi analizzati in questo studio, al fine di comparare tali sequenze con quelle di riferimento finora identificate in Italia e in altre aree geografiche e individuare eventuali correlazioni esistenti.

P LE EPIDEMIE DA MORBILLIVIRUS NEI MAMMIFERI ACQUATICI, CON PARTICOLARE RIFERIMENTO A QUELLE DEL 1990-1992 E DEL 2006-2007 NEL MAR MEDITERRANEO

Giovanni Di Guardo (a), Umberto Proietto (a), Cristina Esmeralda Di Francesco (a), Fulvio Marsilio (a), Giuseppe Marruchella (a), Paolo Zucca (a), Cristina Casalone (b), Walter Mignone (c), Maria Cristina Fossi (d), Letizia Marsili (d), Sandro Mazzariol (e), Bruno Cozzi (e), Umberto Agrimi (f), Fiona Forster (g), Seamus Kennedy (g)

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

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

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

(d) *Dipartimento di Scienze Ambientali, Università degli Studi, Siena*

(e) *Banca Tessuti per i Mammiferi Marini del Mediterraneo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Legnaro, Padova*

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

(g) *Agri-Food and Biosciences Institute for Northern Ireland, Belfast, Irlanda del Nord, United Kingdom*

Dalla seconda metà degli anni '80 ad oggi una decina di distinte epidemie morbillivirali sono state segnalate in più specie di mammiferi marini in varie aree del Pianeta. Alcune di queste - come le epidemie del 1988 e del 2002 nelle foche comuni (*Phoca vitulina*), o quelle del 1987-1988 nei tursiopi (*Tursiops truncatus*) lungo la costa atlantica degli Stati Uniti e del 1990-1992 nelle stenelle striate (*Stenella coeruleoalba*) del Mediterraneo - hanno avuto caratteri di particolare drammaticità, provocando la morte di centinaia o migliaia di individui, e a volte inferendo un duro colpo alla già precaria sopravvivenza di specie ad altissimo rischio di estinzione, come nel caso della foca monaca (*Monachus monachus*), la cui colonia numericamente più consistente, residente in Africa lungo le coste della Mauritania, è stata vittima nel 1997 di un evento epidemico che ne ha dimezzato la popolazione. Per quanto più specificamente concerne il bacino del Mediterraneo, un ulteriore evento epidemico sostenuto da un ceppo di *Dolphin Morbillivirus* (DMV) con spiccate similitudini genomiche ed antigeniche rispetto a quello responsabile della drammatica epidemia del 1990-1992 è stato accertato verso la fine del 2006 nella popolazione di globicefali (*Globicephala melas*) dell'area dello Stretto di Gibilterra e, nell'anno successivo, nella popolazione di stenelle striate residente lungo le coste spagnole.

Per quanto riguarda le popolazioni di Cetacei residenti nei mari italiani, le accurate indagini immunoistochimiche, di immunofluorescenza indiretta e biomolecolari (RT-PCR) per morbillivirus, eseguite su numerose stenelle e su più tursiopi rinvenuti spiaggiati sulle coste liguri, toscane e sarde nel 2007-2008, nonché su un esemplare di balenottera comune (*Balaenoptera physalus*) spiaggiato sulle coste toscane nel 2008, hanno fornito esito negativo, mentre in stenelle spiaggiate in provincia Imperia è stata rilevata la presenza di anticorpi neutralizzanti anti-morbillivirus, ad un titolo variabile da 1:10 a 1:64.

Lavoro eseguito nell'ambito del Progetto di Ricerca "Cause di Mortalità e Studi Patogenetici in Cetacei Spiaggiati sulle Coste Italiane", finanziato dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare.

P VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DELLA CLORAMINA SU DIVERSI ISOLATI DI CALICIVIRUS FELINO (FCV) MEDIANTE *REAL-TIME* PCR

Barbara Di Martino, Chiara Ceci, Roberto Varano, Cristina Esmeralda Di Francesco, Fulvio Marsilio

Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete, Università degli Studi, Teramo

I Norovirus (NoVs) attualmente vengono riconosciuti come una delle più importanti cause di gastroenterite acute di origine non batterica nell'uomo coinvolgendo tutte le classi di età e soprattutto contesti comunitari. La trasmissione avviene attraverso il contatto diretto, per via oro-fecale o via aerosol, oppure tramite acqua o cibo. Nella maggior parte dei casi finora documentati le epidemie associate al consumo di cibi, hanno visto coinvolti molluschi eduli lamellibranchi, prodotti a base di carne, verdure e frutta. Resta comunque la possibilità che qualsiasi alimento che subisca manipolazioni e non venga sottoposto ad adeguato trattamento termico, sia fonte di infezione. È quindi evidente che solo misure molto stringenti, a partire da un'accurata igiene personale degli addetti alla manipolazione e distribuzione dei cibi, associata ad una corretta detersione e disinfezione degli ambienti di lavoro, possono prevenirne la diffusione. In letteratura, gli studi di efficacia di sostanze disinfettanti nei confronti dei NoVs umani risultano piuttosto limitati a causa dell'assenza di un substrato cellulare che ne permetta la replicazione *in vitro*. Per ovviare a tale limitazione, la maggior parte delle sperimentazioni condotte in proposito ha sfruttato come surrogato il ceppo vaccinale FCV-F9. Tuttavia, vi sono opinioni discordanti relativamente all'impiego di quest'ultimo come prototipo dei NoVs, poiché non sempre è stata evidenziata una corrispondenza di efficacia da parte dei vari disinfettanti. Obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare l'azione della cloramina nei confronti di FCV-F9 e di diversi ceppi di campo isolati presso il nostro laboratorio e associati a quadri sintomatologici eterogenei. A tale scopo, ciascun ceppo in esame, dopo opportuna purificazione, è stato messo a contatto con cloramina diluita in PBS ad una concentrazione di 250g/ml per un 1, 3 e 10 minuti. L'azione della cloramina è stata valutata mediante titolazione virale e *Real-Time* PCR dopo estrazione dell'RNA virale e retrotrascrizione. Per la maggior parte dei ceppi entrambe le metodiche hanno evidenziato una netta diminuzione della carica virale, mentre per alcuni non c'è stata corrispondenza tra la riduzione del titolo virale e la riduzione del numero di copie di RNA. Sulla base dei risultati ottenuti è ipotizzabile che la valutazione dell'efficacia di un disinfettante nei confronti dei calicivirus ed in particolare dei NoVs, non possa basarsi solo sull'impiego dello stipite vaccinale FCV-F9, bensì è necessaria almeno un'analisi che prenda in considerazione numerosi ceppi di diversa origine.

CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DI DIVERSI ISOLATI DI FCV

Barbara Di Martino, Cristina Esmeralda Di Francesco, Federica Di Profio, Chiara Ceci,
Monica Miglionico, Fulvio Marsilio

Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Università degli Studi, Teramo

Il Calicivirus Felino (FCV) rappresenta uno dei patogeni più comunemente associati al complesso delle infezioni respiratorie del gatto. Tuttavia nel corso degli ultimi anni, ceppi FCV altamente virulenti sono stati associati a quadri clinici più complessi. I diversi ceppi FCV non possono essere classificati o distinti gli uni dagli altri, né genotipicamente né sierologicamente, perché non sono ancora stati identificati markers genetici o sequenze aminoacidiche comuni a più isolati associati alla medesima manifestazione clinica. Obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare *in vitro* le caratteristiche fenotipiche di n. 8 isolati di FCV, al fine di identificare eventuali differenze per distinguere ceppi associati a diversi quadri clinici.

Ciascun isolato è stato analizzato mediante metodo delle placche valutando la curva di crescita [a 4, 8, 12, 24 ore Post-Infezione (PI) secondo gli indici di molteplicità (MOI) di 10 (singolo ciclo) e 0,02 (ciclo multiplo)] e la resistenza termica (a 41,8, 46,2 e 52,2°C, per 30 min). È stato osservato che i ceppi associati a quadri clinici gravi, quali enterite emorragica del cane (FCV-10/Te/06) e del gatto (FCV-306), adenoma labiale (FCV-G/2000) e stomatite ulcerativa (FCV-6/S), hanno determinato la comparsa di placche di grandi dimensioni, mentre i ceppi vaccinali (FCV-F9 e FCV-2280) e i ceppi associati a forme respiratorie (FCV-F1 e FCV-F39) hanno dato origine a placche più piccole.

Nelle prove di resistenza termica è stato rilevato che i ceppi FCV in esame possiedono un'elevata resistenza alle alte temperature. L'unica eccezione è rappresentata dal ceppo G/2000, inattivato completamente a 41,8°C. Nello studio della cinetica replicativa a singolo ciclo, la maggior parte dei ceppi in esame raggiunge il massimo picco di crescita tra T3 (12h PI) e T4 (24h PI). Al contrario il ceppo FCV-10/Te/06 ha mostrato il massimo picco di crescita tra T1 (4h PI) e T2 (8h PI). Mediante lo studio della cinetica replicativa a ciclo multiplo, la maggior parte dei ceppi in esame ha raggiunto un titolo virale non superiore a 10^6 UFP/ml tra T3 e T4 (F1, F39, 306) e fra T2 e T3 (G/2000, 6/S). Al contrario il ceppo 10/Te/06 ha raggiunto un titolo virale di 10^8 UFP/ml dopo 4 ore PI. Sulla base dei risultati ottenuti, lo studio delle dimensioni delle placche potrebbe essere una metodica utile per differenziare ceppi FCV associati a quadri clinici di diversa gravità. Al contrario, lo stress termico e lo studio della cinetica replicativa non hanno fornito indicazioni in tal senso.

R RILEVAMENTO DEL VIRUS APATOGENO **RABBIT CALICIVIRUS** TRAMITE RT-PCR IN ALLEVAMENTI ITALIANI

Chiara Donati (a), Cristiana Tittarelli (a), Maria Beatrice Boniotti (a), Gianni Perugini (b), Lorenzo Capucci (a), Antonio Lavazza (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e Marche, Macerata

Introduzione. La presenza di popolazioni di conigli sieropositivi per RHDV (*Rabbit Haemorrhagic Disease Virus*) ma senza sintomi clinici o mortalità, ha portato nel 1996 all'identificazione del virus apatogeno RCV (*Rabbit Calicivirus*) appartenente alla famiglia *Caliciviridae*, genere *lagovirus*. RCV è un virus ad RNA con filamento singolo, polarità positiva e caratterizzato da un'unica proteina capsidica (VP60). Il virus si localizza prevalentemente a livello intestinale a differenza della variante patogena RHDV che replica nel fegato, da cui diffonde nei diversi organi (milza, polmone, rene ecc). La risposta immunitaria indotta da RCV, conferisce protezione nei confronti di RHDV ed interferisce nella diagnosi sierologica. Recentemente, in Inghilterra, Irlanda e Australia sono stati identificati virus apatogeni con diversi livelli di omologia con l'isolato italiano dimostrando un notevole grado di evoluzione e diffusione di questi virus.

Scopo del lavoro. 1) sviluppare metodi molecolari che permettono di rilevare in modo specifico il virus; 2) valutare il livello di evoluzione che questi virus sviluppano nel tempo.

Metodi. Sono stati valutati un pannello di reazioni RT-PCR con *primer* degenerati e *primer* specifici e una reazione RT-PCR *Real-Time* quantitativa. Sono stati analizzati sieri e feci di conigli sierologicamente positivi a 35, 42 e 50 giorni di vita. Infine sono stati testati 30 campioni di feci provenienti da 18 allevamenti di Lombardia, Veneto e Marche, selezionati nel corso di una concomitante indagine sieropidemiologica.

Risultati. RCV è rilevabile nelle feci a partire dal 42° giorno di vita tramite RT-PCR, mentre i campioni di siero raramente risultano positivi con questa tecnica. Dei 30 campioni analizzati tramite RT-PCR, 16 sono risultati positivi. Per ogni allevamento positivo è stato sequenziato un frammento di 112 bp e di 5 campioni è stato sequenziato un frammento di 530 bp appartenenti alla VP60. È stata valutata la variabilità genetica dei ceppi e confrontata con le sequenze dei virus correlati (RHDV, EBHS).

Conclusioni. Tramite RT-PCR e RT-PCR *Real-Time* è possibile rilevare la presenza del virus apatogeno RCV nonostante il basso titolo virale. L'analisi di sequenza indica una forte variabilità di sequenza tra i vari ceppi circolanti tale da rendere difficile la standardizzazione di una PCR che utilizzi *primer* specifici. Il confronto delle sequenze ottenute con quelle in banca dati indica la coesistenza sul nostro territorio di ceppi evolutivamente distanti.

ANALISI MOLECOLARI DEI GENI INTERNI PA, PB1, PB2 DOPO PASSAGGI IN SPECIE DOMESTICHE DI UN VIRUS A/H7N3 ISOLATO DA ANATRA SELVATICA

Emiliana Falcone (a), Simone Giannecchini (c), Valeria Clausi (c), Calogero Terregino (d), Anna Toffan (d), Filippo Cilloni (d), Maria Alessandra De Marco (b), Marcella Nenci (a), Mauro Delogu (e), Alberta Azzi (c), Ilaria Capua (d), Livia Di Trani (a)

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

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

(c) *Sezione di Virologia, Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi, Firenze*

(d) *Laboratorio di Referenza OIE/FAO per l'Influenza Aviaria e la Malattia di Newcastle, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

(e) *Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Ozzano Emilia, Bologna*

Introduzione. Il passaggio del Virus dell'Influenza Aviaria (AIV) dal serbatoio naturale rappresentato dalle specie aviarie selvatiche alle specie aviarie domestiche, può indurre cambiamenti aminoacidici a livello delle glicoproteine di superficie e delle proteine interne strutturali. Lo studio, di cui si presentano alcuni dati preliminari, ha l'obiettivo di identificare le modificazioni nucleotidiche a livello dei geni virali interni PA, PB1 e PB2 a seguito di trasmissione sperimentale di un virus isolato da anatra selvatica in due diverse specie aviarie domestiche, tacchino e quaglia. A tale scopo è stato utilizzato il virus A/Mall/It/33/01 (A/H7N3), identificato quale precursore diretto dei virus A/H7N3 a bassa patogenicità circolati negli allevamenti italiani dal 2002 al 2004. Le principali modificazioni amminoacidiche tra virus A/H7N3 isolati nel corso dell'epizoozia nel pollame ed il virus isolato dall'anatra, sono state identificate come sostituzioni di due amminoacidi nell'emoagglutinina, delezione di 23 amminoacidi nello *stalk* della neuraminidasi ed un numero limitato di cambiamenti a carico delle proteine strutturali interne.

Metodi. Per lo studio molecolare sono stati selezionati 4 isolati virali da 10 passaggi (ps.) seriali del virus A/H7N3 effettuati rispettivamente in tacchino e quaglia ed indicati Tk-p.4 (4° ps. in tacchino), Tk-p.10 (10° ps. in tacchino), Qu-p.6 (6° ps. in quaglia), Qu-p.10 (10° ps. in quaglia). Per ciascuno dei passaggi indicati sono state ottenute le sequenze dei geni interni PA (bp.1-2233), PB1 (bp.1-2341) e PB2 (bp.1-2341). L'assemblaggio e l'allineamento con sequenze di virus aviari, sono stati effettuati col software DNASTAR-Lasergene.

Risultati e conclusioni. L'analisi molecolare dei geni interni PA, PB1 e PB2, relativi ad alcuni passaggi *in vivo* del virus A/Mall/It/33/01 ed il confronto di analoghe sequenze ottenute dal precursore selvatico, hanno evidenziato mutazioni sinonime e non sinonime nei geni in studio rispetto al ceppo originale; inoltre alcune sostituzioni amminoacidiche distinguono gli isolati ottenuti in quaglia rispetto a quelli replicati in tacchino. I risultati

dello studio contribuiscono alla identificazione dei cambiamenti molecolari che possono avere un ruolo importante nella trasmissione interspecie degli AIV dalle specie aviarie selvatiche a quelle domestiche.

LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA: STUDIO DELLA DINAMICA DI INFEZIONE ATTRAVERSO UN MODELLO SPERIMENTALE

Francesco Feliziani, Silvana Farneti, Cristina Casciari, Antonio De Giuseppe, Francesco Vitelli, Moira Bazzucchi, Carla Marini, Domenico Rutili

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Introduzione. La Leucosi Bovina Enzootica (LEB) è una malattia contagiosa che colpisce i bovini il cui agente eziologico appartiene alla famiglia delle *Retroviridae*. Il virus della LEB (BLV) determina una risposta anticorpale umorale che non blocca la replicazione nell'ospite e quindi dà luogo ad un'infezione cronica. Per approfondire le conoscenze riguardanti i meccanismi che regolano la risposta immunitaria indotta dal BLV, è stata allestita un'infezione sperimentale su un gruppo di ovini dai quali sono stati raccolti campioni per esami virologici e sierologici.

Metodi. Cinque ovini di razza sarda e di circa un anno di età sono stati selezionati per lo studio: quattro di essi sono stati inoculati con 1 ml di sangue prelevato da una bovina infetta da BLV, un ovino ha svolto funzione di controllo. Da questi animali sono stati prelevati campioni di siero e sangue con cadenza quotidiana per i primi trenta giorni post infezione ed in seguito su base settimanale. Infine sono state eseguite alcune prove di laboratorio: Immunodiffusione in Gel di Agar (AGID) secondo quanto descritto nel *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008 dell'Office International des Epizooties* impiegando un antigene ricombinante prodotto dall'IZS Umbria e Marche. È stata inoltre utilizzata una tecnica immunoenzimatica commerciale di tipo competitivo (*POURQUIER® ELISA Leukosis Blocking*). Per le ricerche virologiche è stato applicato un test PCR che prevede l'impiego di *primer* in grado di amplificare un frammento di 120bp del gene ENV che codifica per una regione altamente conservata della glicoproteina gp51. La reazione di *Real-Time PCR* è stata eseguita con sistema *TaqMan® su ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System*. I *primer* di amplificazione e la sonda *TaqMan* sono stati sviluppati con il supporto del software *Primer Express Version 3.0 Applied Biosystem* sulla base della sequenza del gene per la gp51. La reazione di amplificazione è stata ottimizzata con il *kit TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem)*.

Risultati La validità del modello sperimentale fornito dagli ovini per studiare l'infezione da BLV è stata confermata dallo studio effettuato. I metodi diagnostici utilizzati sono stati in grado di svelare in via diretta o indiretta la presenza del BLV negli animali infettati mentre nell'animale posto a controllo non è stato evidenziato nessun segno dell'infezione. La *Real-Time PCR* si è rivelato il sistema più precoce di evidenziazione dell'infezione, mentre il metodo AGID ha manifestato una sorprendente sensibilità che comunque non è opportuno aspettarsi in condizioni routine.

WEST NILE DISEASE: UN'ESPERIENZA DI EMERGENZA IN SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA (EMILIA-ROMAGNA, VENETO, LOMBARDIA - 2008)

Gaetana Ferri (a), Ugo Santucci (a), Rossella Lelli (b), Paolo Cordioli (c), Lebona Bonfanti (d), Paolo Calistri (b), Olivia Bessi (a), Pasquale Simonetti (a)

(a) Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, Roma

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise G. Caporale, Teramo

(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

(d) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova

Introduzione. Nel settembre 2008, un cavallo con sintomatologia neurologica, in provincia di Ferrara, veniva riscontrato positivo al virus responsabile della zoonosi *West Nile Disease* (WND). La WND è una zoonosi ed è una malattia esotica, pertanto è stato subito informato il Centro nazionale di lotta ed emergenza contro le malattie animali presso il Ministero della Salute ed organizzato il Piano di intervento per la gestione del focolaio. Il coordinamento nazionale svolto dal Centro si è avvalso della collaborazione del Centro studi per le malattie esotiche e delle Regioni interessate ed ha portato all'attuazione delle attività di sorveglianza straordinaria e alla relativa registrazione nel Sistema Informativo.

Obiettivi del Piano. 1) definire la diffusione del virus; 2) valutare la situazione sanitaria negli allevamenti equini; 3) fornire informazioni epidemiologiche utili ad attuare misure di sanità pubblica.

Risultati. Sono stati confermati 563 casi su 1.939 equidi presenti nell'arco del periodo epidemico nelle 273 aziende del territorio. Trentadue i casi clinici in 18 aziende, nelle regioni: Emilia-Romagna (Ferrara, Bologna, Ravenna e Modena), Veneto (Rovigo, Padova e Venezia) e Lombardia (Mantova). Campioni di uccelli selvatici (gazze, cornacchie, piccioni e ghiandaie) raccolti in provincia di Ferrara e di Padova hanno dato esito positivo alla RT-PCR. Da campioni di gazze, colombo e asino, provenienti dalla provincia di Ferrara, è stato isolato il virus.

Conclusioni. Il Piano straordinario è stato attivato nelle aree geografiche ritenute a rischio, le attività relative sono state registrate nel Sistema Informativo per la gestione del Piano di sorveglianza nazionale ed i risultati, opportunamente elaborati, hanno permesso di definire l'area geografica coinvolta nella circolazione virale e di fornire le informazioni necessarie per l'applicazione delle misure di sanità pubblica.

IDENTIFICAZIONE DI UN NUOVO EPITOPO SEQUENZIALE (E') SULLA GLICOPROTEINA DELL'ENVELOPE DEL VIRUS DELLA LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA

Katia Forti, Carla Marini, Monica Cagiola, Francesco Feliziani, Piera Mazzone, Beatrice Paternesi, Giovanni Curina, Antonio De Giuseppe

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

La Leucosi Bovina Enzoistica (LEB) è una malattia linfoproliferativa a diffusione mondiale il cui agente eziologico è un retrovirus (BLV) che interessa prevalentemente la specie bovina ed è strettamente correlato ai virus umani HTLV 1-2, con spiccata predilezione per i linfociti T. La gp51 è la glicoproteina immunodominante dell'envelope del BLV. Studi effettuati sulla struttura di tale proteina (gp51), mediante l'impiego di peptidi sintetici e di anticorpi monoclonali (PABs), hanno identificato l'esistenza di otto distinti siti antigenici (da A a H) e di due siti *overlapping* (B', D'). Gli epitopi A, B, B', D, D' si trovano nella parte C-terminale altamente glicosilata della proteina e sono di tipo sequenziale perché individuati dai PABs sulla gp51 denaturata. L'epitopo E, anch'esso sequenziale, è considerato essere un ponte tra la regione N e C-terminale della proteina.

In questo lavoro viene descritta l'individuazione di un nuovo epitopo sequenziale presente nella coda C-terminale della gp51, mediante l'impiego del PAb 2G7 prodotto nel nostro Istituto. Per una definitiva mappatura dell'epitopo, una serie di proteine ricombinanti delete all'estremità C e N-terminale della gp51, sono state costruite e sintetizzate in sistema d'espressione eterologo baculovirus. Le diverse proteine delete prodotte, sono state quindi analizzate e caratterizzate in *Western Blotting* ed in ELISA, impiegando sia il PAb 2G7 che i PABs commerciali diretti contro l'epitopo lineare D-D' e l'epitopo conformazionale G.

I risultati ottenuti evidenziano che l'anticorpo 2G7 è in grado di riconoscere una sequenza di 15 aminoacidi, definita epitopo E', corrispondenti ai residui 156SDWVPSVRSWALLLN170 della gp51, con l'esclusione della *signal sequence*, in parte sovrapposta all'epitopo E.

STUDIO DELL'ATTIVITÀ ANTIVIRALE DI PIANTE MEDICINALI E AROMATICHE NEI CONFRONTI DI VIRUS DI INTERESSE VETERINARIO

Viola Galligioni (a), Elena Galletti (a), Fabiana Dal Pozzo (b), Francesca Vaccari (a), Laura Gallina (a), Sara Ciulli (a), Gabriele Fontana (c), Ezio Bombardelli (c), Alessandra Scagliarini (a)
(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università degli Studi, Ozzano Emilia, Bologna*
(b) *Virologie et Pathologie des Maladie Virales Animales, Faculté de Médecine Vétérinaire Liège, Belgique*
(c) *Indena S.p.A., Milano*

La medicina tradizionale è oggetto di un rinnovato interesse e in veterinaria ciò si è tradotto nello sviluppo dell'etnoveterinaria, un nuovo campo che pone attenzione anche al recupero dell'etnobotanica. L'UNESCO con la *Convention Safeguarding of the intangible cultural heritage* (2003) ha riconosciuto la medicina tradizionale, l'etnobotanica e l'etnoveterinaria, come un aspetto della nostra cultura che deve essere protetto. Le piante medicinali ed aromatiche (MAPs) sono la forma più antica di medicazione usata sia dagli animali che dall'uomo. Le MAPs sono usate da sempre nelle pratiche veterinarie tradizionali e attualmente esistono numerosi database che raccolgono liste di piante medicinali e le loro rispettive attività, in molti casi però viene a mancare un'evidenza scientifica del loro meccanismo d'azione. Le piante producono sostanze chimiche attive nei confronti di diversi patogeni, in particolare polifenoli, flavonoidi ed olii essenziali, hanno già dimostrato la loro capacità di inibire la replicazione di virus a DNA e RNA.

In questo studio è stata valutata l'attività antivirale *in vitro* di diverse MAPs nei confronti di virus a RNA che a DNA. A questo scopo, diversi estratti vegetali sono stati testati, su substrati cellulari idonei, per la loro citotossicità e l'attività antivirale intra ed extracellulare, confrontando i risultati con quelli di molecole di sintesi la cui attività è stata già dimostrata. Nei confronti del Virus del Cimurro (CDV), ssRNA a polarità negativa, si sono dimostrati attivi estratti di *Hippophae ramnoides*, *Myrtus communis* ed *Aesculus hippocastanum*. Verso il betanodavirus, ssRNA a polarità positiva responsabile della retinopatia ed encefalite virale (VER) di specie ittiche marine, hanno dimostrato attività antivirale estratti di *Myrtus communis*, *Harungana madagascariensis*, *Combretum micranthum*, *Cinnamosma macrocarpa* e *Cinnamosma madagascariensis*. Il *Vaccinium myrtillus* ha invece dimostrato attività antivirale nei confronti del virus ORF, dsDNA responsabile dell'ectima contagioso. Questi primi risultati confermano che le MAPs possono rappresentare una fonte ottimale per il reperimento di nuove molecole antivirali, che potrebbe portare ad un futuro sviluppo di terapie innovative.

SVILUPPO ED APPLICAZIONE DI UN NUOVO TEST DIAGNOSTICO PER L'IDENTIFICAZIONE DI SRLV GENOTIPO E

Elena Grego (a), Ramses Reina (a), Nicoletta Ponti (b), Margherita Profiti (a), Silvia Dei Giudici (b), Giuseppe Piazza (b), Giantonella Puggioni (b), Sergio Rosati (a)

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

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

Introduzione. Un nuovo *cluster* di lentivirus dei piccoli ruminanti è stato recentemente descritto in allevamenti di razza Roccaverano. Analisi delle sequenze aminoacidiche corrispondenti ai principali epitopi immunodominanti rivelano una certa eterogeneità rispetto agli antigeni tradizionalmente impiegati nello sviluppo dei test diagnostici. In questo studio sono stati prodotti antigeni ricombinanti basati sulla sequenza *gag* dei genotipi B ed E ed impiegati per testare sieri caprini provenienti da allevamenti classificati sulla base delle caratteristiche genetiche degli stipti circolanti.

Metodi. Allevamenti di razza Roccaverano sono stati selezionati e caratterizzati mediante sequenziamento di una porzione del gene *gag*. Sulla base dei genotipi circolanti in questi allevamenti è stato messo a punto un test ELISA indiretto basato sulle proteine di fusione P16-25 e sulla subunità ricombinante della proteina capsidica B3. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti impiegando tre test commerciali (A: antigene a virus intero purificato; B: antigeni ricombinanti P25 e TM, C: antigene ricombinante P25 e sintetico TM).

Risultati. Sulla base delle sequenze ottenute gli allevamenti sono stati classificati come infetti da genotipo B, infetti da genotipo E ed infetti con entrambi i genotipi (B+E). I risultati sierologici mostrano che gli antigeni ricombinanti identificano in modo specifico solo l'infezione omologa e che la *cross*-reattività è evidente solo in caso di co-infezione. Solo il test commerciale a virus intero ha mostrato una sensibilità paragonabile a quella dell'antigene omologo nel rilevare l'infezione da genotipo E.

Conclusioni. I risultati mostrano chiaramente come, l'uso di Ag ricombinanti basati sui genotipi circolanti, siano utili come test di *screening* per determinare i sierotipi presenti negli allevamenti. La prevalenza del genotipo E in altre popolazioni caprine può essere convenientemente valutata con l'impiego di un test comparativo basato sull'utilizzo di peptidi genotipo specifici. Un'analisi preliminare eseguita con questa metodica su alcuni allevamenti sardi ha già consentito di confermare la presenza del genotipo E in un'area geografica differente da quella della sua prima identificazione.

I SITI TANDEM AP4 SONO NECESSARI E SUFFICIENTI PER L'ATTIVITÀ TRASCRIZIONALE DEL LENTIVIRUS CAPRINO, GENOTIPO E

Magda Juganaru, Ramses Reina, Sergio Rosati
Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Università degli Studi, Torino

Introduzione. Nei lentivirus dei piccoli ruminanti (SRLV) l'attività trascrizionale avviene sotto il controllo della regione U3 del LTR. Il genotipo E, identificato in Piemonte come *cluster* a bassa patogenicità, risulta naturalmente delecto per dUTPase, VPR-like e per una ripetizione di 71pb nella regione U3. Lo stipite Roccaverano, prototipo del genotipo E, mostra *in vitro* un titolo elevato in macrofagi di derivazione sanguigna (BDM) e basso in colture di Membrana Sinoviale (SM) e Plesso Corioideo (PC). La ripetizione di 71 pb include una serie di siti per fattori trascrizionali cellulari (GAS, TAS, CAAAT, AML, AP-4, AP-1). Alcuni siti sono stati caratterizzati in differenti genotipi associando il loro ruolo ad aumento della attività replicativa e al tropismo. Nel presente studio abbiamo caratterizzato *in vitro* l'attività del promotore LTR dello stipite Roccaverano e studiato il ruolo relativo dei singoli fattori trascrizionali identificati nella regione U3.

Metodi. Sono state allestite colture cellulari diploidi di SM, PC, polmone (LC), milza (SP) e BDM. La regione U3 degli stipiti Roccaverano e CAEV TO/89 (genotipo B, sottotipo B1) è stata amplificata e clonata nel vettore pCAT-basic. Sono stati sviluppati altri 10 costrutti eliminando successivamente tutti i siti identificati. La transfezione è stata effettuata usando microparticelle di Polyethilenimina (PEI) coniugata con mannosio (BDM) o lipofectamina 2000 (linee fibroblastiche). L'attività del promotore è stata quantificata come espressione di CAT mediante un kit ELISA.

Risultati. Non è stata osservata una differenza significativa fra le attività dei promotori dei ceppi Roccaverano, CAEV-TO/89 e SV 40 (controllo positivo) in tutti i tipi cellulari utilizzati. L'attività trascrizionale diminuisce in presenza di un singolo sito AP4 e si annulla se entrambi i siti vengono eliminati dal costrutto.

Discussione. LTR dello stipite Roccaverano presenta un'attività trascrizionale paragonabile a quella del SV40, indicando che la bassa produzione virale descritta per il genotipo E in precedenti lavori non è dovuta all'assenza dei siti di unione a fattori di trascrizione cellulari. Questa attività è addirittura simile usando SM, CP e BDM escludendo la presenza di diversi fattori di trascrizione in funzione del tipo cellulare. I dati ottenuti dimostrano che: i) la ripetizione tandem del sito AP4, è necessaria e sufficiente per l'attività trascrizionale basale; ii) nei lentivirus dei piccoli ruminanti, esiste una bassa associazione fra proprietà patogena e l'attività del proprio promotore; iii) la ripetizione di 71 pb non è essenziale per una adeguata attività trascrizionale.

SIEROEPIDEMIOLOGIA DI RABBIT CALICIVIRUS (RCV) IN ALLEVAMENTI CUNICOLI IN ITALIA

Antonio Lavazza (a), Maria Beatrice Boniotti (a), Cristiana Tittarelli (a), Monica Cerioli (a), Gianni Perugini (b), Sara Rota Nodari (a), Ruggero Brivio (c), Lorenzo Capucci (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e Marche, Macerata

(c) Servizio di Assistenza Tecnica Allevamenti, Sezione Conigli, Regione Lombardia, Crema

Introduzione. La sieropositività in conigli per *Rabbit Haemorrhagic Disease Virus* (RHDV) 10 anni prima della comparsa della malattia in Europa, suggerì l'esistenza di ceppi "apatogeni" correlati a RHDV. *Rabbit calicivirus* (RCV), il primo di tali virus, identificato in Italia nel 1996, replica nell'intestino e induce anticorpi protettivi verso RHD, rivestendo così un possibile ruolo nel ridurre l'impatto di questa malattia. Virus apatogeni con diversi livelli di omologia con RCV sono stati poi identificati in Inghilterra, Irlanda e Australia.

Scopo del lavoro. Controllare la diffusione temporale e spaziale di RCV negli allevamenti cunicoli industriali in Italia.

Materiali e metodi. Sono state eseguite 5 indagini sierologiche consecutive nell'arco di un decennio (1999-2008), eseguendo prelievi di sangue alla macellazione da conigli di 75-85gg, non vaccinati, da allevamenti RHDV-free. Sono stati determinati sia gli anticorpi specifici totali con ELISA competizione, sia le sottoclassi (IgG, IgA e IgM) con ELISA anti-isotipo. Durante le ultime due indagini sono state campionate le feci per la ricerca virale in RT-PCR.

Risultati. Nella 1^a indagine (1999, Lombardia, 1 macello, 39 gruppi da altrettante aziende di Lombardia e Triveneto) 13 allevamenti (33,3%) presentavano più del 75% degli animali sieropositivi. Nella 2^a indagine (2002-2003, Centro-Sud Italia, 5 macelli, 45 gruppi da 21 aziende di Campania, Basilicata e Lazio) erano positivi 516 sieri su 1786 (28,9%) e 5 aziende su 21 (23,8%), di cui 2 positive a 3 campionamenti successivi in 5 mesi ed in 1 sieroconversione nell'arco di 6 mesi. Nella 3^a indagine (2004, Marche, 1 macello, 23 aziende) 474 sieri su 831 (57,04%) e 12 allevamenti su 23 (52,2%) erano positivi. Nella 4^a indagine (2006-07, Marche, 1 macello, 23 gruppi da 21 aziende) 11 allevamenti positivi su 21 (52,3%). Nel corso della 5^a indagine (2007-08, Brescia, 1 macello, 13 aziende di Lombardia e Veneto, da 1 a 6 gruppi per azienda) positive 7 aziende su 13 (53,9%), di cui 2 con sieroconversione. I titoli erano sempre mediamente compresi tra 1/20-1/640. Diffusa la presenza di IgA, anche ad elevato titolo, e di IgM, ad indicare l'avvenuta immunizzazione da agente infettivo. L'identificazione in RT-PCR di virus RCV-like dalle feci è avvenuta rispettivamente in 3 e in tutte le aziende positive durante la 4^a e 5^a indagine.

Conclusioni. Il virus apatogeno RCV è presente in popolazioni di conigli provenienti da diverse regioni italiane e la sua distribuzione è radicata e costante sin dal 1999. Negli allevamenti controllati e sieropositivi il verificarsi di un'infezione è provato dal rilievo di anticorpi IgA e IgM e dalla frequente identificazione dei ceppi virali dalle feci in RT-PCR.

VIRUS WEST NILE: CARATTERIZZAZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI E POTENZIALE APPLICAZIONE NELLA DIAGNOSI DI LABORATORIO

Davide Lelli (a), Ana Moreno (a), Emiliana Brocchi (a), Enrica Sozzi (a), Elena Canelli (a), Gian Luca Autorino (b), Miguel Angel Jimenez-Clavero (c), Paolo Cordioli (a)
(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia
(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma
(c) Centro de Investigación en Sanidad Animal, Madrid, Spain

Introduzione. Dopo dieci anni dalla sua prima segnalazione, il *Virus West Nile* (WNV) è riapparso nell'Italia settentrionale nel 2008 causando 32 casi clinici negli equini e per la prima volta casi umani di malattia. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di produrre Anticorpi Monoclonali (MAbs) nei confronti di WNV e caratterizzarli per il successivo utilizzo nella diagnosi di laboratorio.

Metodi. Per la produzione dei MAbs è stato utilizzato il ceppo WNV Egypt 101. Lo *screening* è stato eseguito mediante ELISA indiretta con antigene omologo e immunofluorescenza su cellule Vero infettate e non. La reattività dei MAbs è stata valutata in immunoperossidasi e in sieroneutralizzazione con diversi ceppi di WNV appartenenti ai *lineages* 1 e 2 e *Virus Usutu*. Alcuni MAbs sono stati testati in ELISA indiretta presso l'Istituto Pasteur per valutare l'eventuale *cross*-reazione con altri flavivirus quali DEN1, DEN2, DEN3, DEN4, YF, TBE e JE. Ogni MAb è stato esaminato inoltre in *Western Blotting* (WB) con il virus omologo ed ELISA indiretta verso la proteina ricombinante E (dominio III) prodotta in *E. coli*. Saggi ELISA competitivi sono stati allestiti per valutare sia la competizione reciproca tra MAbs che verso sieri di polli SPF infettati sperimentalmente con WNV e sieri di equini immunizzati con vaccino inattivato. Quattro MAbs (due neutralizzanti e due non) sono stati coniugati con perossidasi ed utilizzati in tutte le possibili combinazioni, adsorbiti come anticorpi di cattura e coniugati come anticorpi traccianti, per l'allestimento di reazioni ELISA *sandwich*.

Risultati. Durante la fase di *screening* sono stati selezionati 37 MAbs dei quali 29 specifici per WNV e reattivi con tutti i ceppi testati e 8 *cross*-reattivi con altri flavivirus. Tredici MAbs presentano attività neutralizzante e di questi, 12 reattivi con la proteina E ricombinante competono reciprocamente. Tutti i MAbs sono risultati negativi in WB suggerendo la natura conformazionale degli epitopi *target*. Il MAb 3B2 ha dimostrato le migliori *performance* nei test diagnostici finalizzati alla dimostrazione di antigeni e anticorpi.

Conclusioni. I MAbs anti-WNV prodotti trovano largo impiego in diagnostica. Il MAb 3B2 (neutralizzante e specifico per la proteina E dominio III), può essere impiegato in ELISA *sandwich* per l'identificazione diretta di WNV e in ELISA competitiva per svelare anticorpi neutralizzanti anti-WNV in sieri equini e aviari. Inoltre, coniugato con perossidasi, trova impiego come tracciante anche nel test IgM-*capture* ELISA per la diagnosi di infezioni recenti da WNV nel cavallo.

Lavoro svolto nell'ambito della Ricerca Finalizzata 2005 (PRF2005301).

■ CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI UN ROTAVIRUS FELINO G3P[9] CON GENOTIPO NSP4 KUN-LIKE

Eleonora Lorusso (a), Arianna Radogna (a), Paschalina Moschidou (a), Simona De Grazia (b), Abraham Christiaan Potgieter (c), Alessio Lorusso (a), Alessandra Cavalli (a), Vito Martella (a), Canio Buonavoglia (a)

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

(b) *Dipartimento di Igiene e Microbiologia, Università degli Studi, Palermo*

(c) *Onderstepoort Veterinary Institute, Onderstepoort, South Africa*

Introduzione. I Rotavirus di Gruppo A (GARV) sono associati a patologie gastroenteriche in molte specie animali e nell'uomo. Si conoscono, sulla base delle proteine del capsido VP7 e VP4, 23 G-tipi e 32 P-tipi, distribuiti in modo peculiare negli uomini e nelle varie specie animali. Sebbene i rotavirus infettino, di preferenza, la propria specie ospite (ceppi omologhi), infezioni con ceppi eterologhi avvengono sia in condizioni naturali che sperimentalmente. Indagini epidemiologiche hanno messo in evidenza interessanti analogie tra alcuni stipiti GARV umani ed animali. Un buon numero di ceppi con G e P tipo atipici, considerati di origine animale, sono stati identificati negli uomini in diverse parti del mondo. Sulla base dell'analisi di sequenza e di *cross*-ibridazione con sonde, i GARV umani sono distinti in tre genogruppi (*Wa-Kun-e AU-1-like*). I GARV di genogruppo AU-1 sono G3P[9] e sono geneticamente simili ai rotavirus felini G3P[9] (*FRV1-like*). Rotavirus umani G3P[9] con NSP4 *Kun-like* sono stati ritrovati in USA, Italia ed Ungheria e sembrano siano originati da riassortimento con GARV umani G2P[4], *Kun-like*. Nel presente studio si descrive la caratterizzazione molecolare di un ceppo felino G3P[9], con NSP4 *Kun-like*.

Metodi. Nel 2005 in un gattino europeo di tre mesi di età con enterite è stata diagnosticata infezione da rotavirus. Il ceppo in questione, BA42/05, è stato caratterizzato come G3P[9] tramite *Reverse, Transcriptase P-polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) usando *primer* tipo-specifici. Gli undici segmenti genomici sono stati sequenziati. L'allineamento delle sequenze è stato eseguito con il programma CLUSTAL W e l'analisi filogenetica è stata condotta utilizzando MEGA 3.0.

Risultati. Il ceppo BA42/05 è stato confermato come genotipo G3P[9]. Inoltre sono state rivelate analogie nella VP7, VP4 e VP6 con i rotavirus umani AU-1-like, mentre la proteina NSP4 è risultata simile a quella di *Virus Kun-like*.

Conclusioni. Rotavirus umani atipici G3P[9] con NSP4 *Kun-like* sono stati ritrovati in USA, Italia ed Ungheria e sembrano originati da riassortimento con i GARV umani G2P[4], *Kun-like*. L'isolamento di un ceppo felino G3P[9] *Kun-like* suggerisce l'ipotesi che ci sia stato un passaggio diretto dai gatti all'uomo di tali virus. Questo sarebbe compatibile con il carattere sporadico di tali virus nell'uomo. Da ciò emerge l'enorme diversità genetica dei rotavirus e sottolinea l'importanza dello studio dei virus animali per meglio comprendere l'ecologia dei virus umani.

VALUTAZIONE DELLA PERMISSIVITÀ *IN VITRO* DI PBMC DI BOVINI BVD *VIRUS-FREE* ED IMMUNI INFETTATI CON CEPPI DI BVDV 1 E 2

Barbara Lucchini, Wilma Ponti, Lauretta Turin, Valerio Bronzo, Michela Frigerio, Camilla Luzzago

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi, Milano

Introduzione. Il Virus della Diarrea Virale Bovina (BVDV) è suddiviso in due genotipi, BVDV 1 e 2, e numerosi sottogruppi appartenenti ad entrambi i genotipi. Il BVDV ha tropismo per popolazioni cellulari del sistema immunitario, di cui riduce la funzionalità e causa deplezione da moderata a grave dei linfociti T e diminuzione o leggero aumento dei linfociti B. Lo studio dell'interazione fra ospite e patogeno è di estrema importanza per l'identificazione di indicatori di virulenza, attraverso modelli sperimentali *in vivo* ed *in vitro*. Lo scopo della presente ricerca è di valutare la capacità infettante *in vitro* di ceppi di BVDV 1 e 2 nei confronti di cellule mononucleate di sangue periferico bovino proveniente da animali a stato immunitario noto.

Materiali e metodi. Le infezioni sperimentali sono state eseguite su PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) isolati dal sangue prelevato da 16 manze di razza Frisona, di cui 8 BVDV-free provenienti da un allevamento indenne per BVDV e 8 immuni provenienti da un allevamento con presenza di soggetti Persistentemente Infetti (IP), dai quali è stato isolato un ceppo virale appartenente al sottogruppo 1b. Le cellule isolate sono state risospese in RPMI e seminate in piastre a 24 pozzetti, alla concentrazione di 4×10^6 cell/ml. Sono state eseguite infezioni con ceppi di riferimento di BVDV 1 citopatici (cp) (NADL) e non citopatici (ncp) (NY-1) e di BVDV 2 cp (125) e ncp (890). Le infezioni sono state effettuate con una dose infettante pari a 1 MOI (*Multiplicity Of Infection*); dopo 18 ore di incubazione le piastre sono state congelate a -80°C . Tutte le infezioni sono state condotte in doppio: ogni campione è stato sottoposto a due metodiche di quantificazione virale (RT-PCR quantitativa e titolazione su tessuto-coltura). La quantificazione virale post-infezione è stata espressa in TCID₅₀/assay per il saggio di RT-PCR e in TCID₅₀/μl per la titolazione su MDBK. Le medie dei titoli virali dei due gruppi di animali sono state confrontate con il Test U di Mann-Whitney.

Risultati e discussione. I titoli post-infezione negli animali immuni sono inferiori rispetto ai sani per tutti i ceppi virali. Inoltre i ceppi cp presentano una maggiore quantità virale post-infezione in entrambi i gruppi rispetto ai ncp, dimostrando una maggiore e/o più rapida capacità replicativa. Nei soggetti immuni in seguito ad infezione con il ceppo NY1 appartenente al sottogruppo BVDV-1b, uguale a quello di campo circolante nell'allevamento, sono stati riscontrati titoli virali assimilabili a quelli dei soggetti BVDV-free.

ASPETTI GENETICI DELL'ACCUMULO DI PrPSc NELLE PLACENTE DI PECORE AFFETTE DA SCRAPIE NATURALE E SPERIMENTALE

Caterina Maestrale (a), Laura Madau (a), Cinzia Santucciu (a), Maria Giovanna Tilocca (a), Maria Giovanna Cancedda (a), Sonia Attene (a), Mariangela Saba (a), Antonello Carta (b), Antonio Satta (c), Ciriaco Ligios (a)

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

(b) *Agenzia per la Ricerca in Agricoltura della Regione Autonoma della Sardegna, AGRIS, Sassari*

(c) *Azienda Us11, Sassari*

Introduzione. Nelle pecore la resistenza o la suscettibilità alla scrapie è regolata dai polimorfismi ai codoni 136 (A o V), 154 (R o H), e 171 (Q, R o H) del gene che codifica per la proteina prionica (PRNP). Al codone 171 la presenza di Q si associa alla suscettibilità, mentre la presenza di R alla resistenza. Nella scrapie l'accumulo di proteina prionica patologica (PrPSc) è dimostrato, mediante tecniche immunostochimiche ed immunobiologiche, anche in distretti extra-nervosi ed extra-linfatici quali rene, muscolo, ghiandole salivari e placenta. Nella placenta l'accumulo di PrPSc è strettamente regolato dal genotipo del feto. La PrPSc replica e si deposita nelle placente con genotipo suscettibile (ARQ/ARQ), ma non in quelle che portano il dimorfismo Q171R in eterozigosi (ARQ/ARR) o in omozigosi (ARR/ARR). Lo scopo di questo studio è quello di determinare il ruolo di altri polimorfismi del gene PRNP nel regolare la deposizione di PrPSc nelle placente.

Metodi. In questa ricerca, con metodiche immunostochimiche e di *Western Blotting*, sono state esaminate per la presenza di PrPSc, le placente di 25 pecore affette da scrapie in forma sintomatica o asintomatica e di 11 pecore con scrapie sperimentale clinicamente manifesta. Di tutte le placente esaminate è stata determinata la sequenza intera del gene PRNP.

Risultati. L'accumulo di PrPSc, nel caso di gravidanze singole, è stato evidenziato nelle placente dei feti con genotipo ARQ/ARQ*wildtype* ma non in quelle dei feti con il dimorfismo Q171R (ARQ/ARR). Inoltre la deposizione di PrPSc era assente nelle placente dei feti ARQ/ARQ con i dimorfismi L141F (AL141RQ/AF141RQ) e N176K (ARQN176/ARQK176). Nei capi ARQ/ARQ*wildtype* la presenza di PrPSc era associata sia alle cellule trofoblastiche fetali che a quelle epiteliali dell'endometrio materno. In una gravidanza gemellare dizigote che presentava un feto ARQ/ARQ*wildtype*, un modesto accumulo di PrPSc era osservato anche nella placenta con dimorfismo L141F. Tuttavia, in questo caso il livello di accumulo di PrPSc nella placenta L141F era, quando comparato con quello del gemello dizigote ARQ/ARQ, significativamente inferiore.

Conclusioni. Con questo studio si dimostra per la prima volta che, oltre al dimorfismo Q171R anche quelli L141F e N176K, qualora presenti nel gene PRNP dei feti, impediscono l'accumulo placentare di PrPSc.

L'assenza di PrPSc nelle placenti per la presenza dei dimorfismi F141L e N176K rafforza l'importanza e la praticabilità della selezione genetica come strumento per il controllo della scrapie.

P ASPETTI ISTOLESIVI IN CORSO DI PESTE SUINA AFRICANA

Elisabetta Manuali, Carmen Iscaro, Sonia Salamida, Francesco Feliziani, Gian Mario De Mia
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Introduzione. La Peste Suina Africana (PSA) è un'importante malattia virale dei suini domestici e selvatici attualmente presente in Africa, in Sardegna e nel Caucaso. Lo scopo del nostro studio è la caratterizzazione biologica di un virus PSA isolato in Sardegna. Nel presente lavoro viene descritto il quadro istolesivo riscontrato a seguito di infezione sperimentale.

Metodi. Un gruppo di 10 suini ibridi di 25-30 kg ciascuno, è stato inoculato per via oronasale con un isolato sardo del 2008 (10 UHAD₅₀). Quotidianamente sono stati eseguiti rilievi termometrici e monitoraggio dei sintomi clinici. In seguito a morte o abbattimento, gli animali sono stati sottoposti ad esame anatomico-patologico. Per l'esame istologico campioni di tonsilla, linfonodo, milza e rene sono stati fissati in formaldeide al 4% ed inclusi in paraffina secondo procedure standard. Sezioni seriali di tessuto di 4 µm di spessore sono state colorate con ematossilina-eosina per valutarne le caratteristiche morfologiche.

Risultati. Gli animali hanno mostrato rialzo termico a partire dal 7° giorno p.i., mentre dall'8° giorno p.i., è comparsa una sintomatologia caratterizzata da abbattimento, anoressia e disturbi locomotori. Otto soggetti sono venuti a morte tra 9 e 15 giorni p.i., mentre 2 sono sopravvissuti. All'esame anatomico-patologico, si sono riscontrate lesioni emorragiche, di entità variabile, a carico di linfonodi, milza, intestino, reni, cuore e tonsille; versamenti erano presenti nelle cavità. I quadri lesivi riscontrati erano caratterizzati da intenso coinvolgimento delle strutture linfoidi, nelle quali si evidenziavano fenomeni di picnosi e carioressi a carico dei noduli linfatici della polpa bianca, associati ad emorragie diffuse. Con il progredire dell'infezione tali alterazioni tissutali subivano modificazioni in senso necrotico, particolarmente evidenti nei linfonodi e nella milza, coinvolgendo anche la polpa rossa. Nel parenchima renale si osservavano inizialmente depositi intraglomerulari di sostanza amorfa acidofila che poi esitavano in glomerulonefrite proliferativa delle cellule del mesangio, ispessimento delle membrane basali dei capillari glomerulari, e *foci* diffusi di nefrite interstiziale non purulenta in un quadro emorragico.

Conclusioni. Dal punto di vista della patogenicità, allo stipite in questione può essere attribuito un grado di virulenza da alto a moderato ed il quadro clinico corrispondente può essere definito acuto/sub-acuto. Dal punto di vista istologico, nel quadro istolesivo descritto si sono evidenziati aspetti morfologici ascrivibili alla fase acuta della malattia, contraddistinti principalmente da alterazioni degenerative a carico degli organi linfoidi e da fenomeni emorragici diffusi non associati alla presenza di lesioni vascolari, probabilmente causati da aumento della permeabilità vasale a seguito di piastrinopenia.

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI STIPITI CORONAVIRUS DEL CANE STRETTAMENTE CORRELATI AL VIRUS DELLA GASTROENTERITE TRASMISSIBILE DEL SUINO

Viviana Mari (a), Alessio Lorusso (a), Marco Campolo (a), Antonio Lavazza (b), Antonio Parisi (c), Paolo Cordioli (b), Canio Buonavoglia (a), Nicola Decaro (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Bari*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia*

(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, Putignano, Bari*

Introduzione. Il Coronavirus del Cane (CCoV) è responsabile di enteriti di lieve entità nei cuccioli. Attualmente si conoscono due distinti genotipi di CCoV, CCoV-I e CCoV-II, entrambi associati ad infezioni autolimitanti dell'apparato gastroenterico, dalle quali sono frequentemente isolati entrambi i genotipi. Nel presente lavoro, si riportano l'isolamento e la caratterizzazione molecolare di quattro stipiti CCoV-II ricombinanti con il virus della gastroenterite trasmissibile del suino (TGEV).

Metodi. I quattro stipiti CCoV-II sono stati identificati nell'intestino e negli organi interni di cuccioli morti con sintomatologia gastroenterica, risultati positivi anche al parvovirus del cane. L'identificazione e la tipizzazione dei ceppi CCoV-II è stata realizzata mediante test *Real-Time* RT-PCR su campioni di organi prelevati in sede autoptica. Da tutti gli stipiti è stata amplificata e sequenziata la parte 3' del genoma virale, mentre di due stipiti è stato determinato quasi l'intero genoma. Per l'analisi di sequenza e filogenetica sono stati utilizzati rispettivamente i software BioEdit e Mega3. L'isolamento è stato condotto su cellule di derivazione canina A-72 e su colture primarie di cellule di suino. L'infezione sperimentale con uno stipite TGEV-like è stata condotta su quattro cuccioli di Beagle. Per i test di virus-neutralizzazione sono stati utilizzati i sieri dei cani infettati sperimentalmente ed anticorpi monoclonali per TGEV.

Risultati. L'analisi di sequenza della parte 3' del genoma dei quattro stipiti ha evidenziato, nell'estremità amino-terminale della proteina S, un'elevata identità aminoacidica con TGEV, mentre una maggiore correlazione genetica con i classici stipiti CCoV-II è stata osservata nella estremità carbossi-terminale. Il resto del genoma è risultato maggiormente correlato ai classici stipiti CCoV-II. L'isolamento virale ha avuto successo per tre dei quattro ceppi ma solo utilizzando cellule di derivazione canina. L'infezione sperimentale dei cani ha riprodotto la classica forma clinica di coronavirus enterica senza alcun segno di coinvolgimento sistemico. Le prove di virus-neutralizzazione hanno evidenziato importanti differenze tra gli stipiti TGEV-like ed i classici stipiti CCoV-II.

Conclusioni. La stretta correlazione genetica con TGEV degli stipiti identificati, a livello dell'estremità 5' del gene S, supporta l'ipotesi di un evento ricombinativo tra CCoV-II e TGEV. I risultati delle prove sierologiche hanno evidenziato una reale differenza

antigenica tra questi nuovi ceppi ed i classici CCoV-II, sollevando un importante quesito circa la validità dell'immunità acquisita in seguito alla classica vaccinazione per CCoV.

Il presente studio è stato finanziato dal Ministero della Salute (Ricerca finalizzata 2007 "Mammalian coronaviruses: molecular epidemiology, vaccine development and implications for animal and human health").

P DISTRIBUZIONE DELLE SOTTOCLASSI IgG E PRODUZIONE DI IFN-GAMMA NELL'INFEZIONE ERPETICA DELLA CAPRA

Mariarosaria Marinaro (a), Anna Lucia Bellacicco (b), Michele Camero (b), Elvira Tarsitano (b), Arturo Gentile (b), Antonio Cassone (a), Canio Buonavoglia (b), Maria Tempesta (b)

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

(b) *Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Bari*

Introduzione. *Caprine Herpesvirus 1* (CpHV-1) è un *alphaherpesvirus* responsabile nei capretti di 1-2 settimane di vita di infezioni generalizzate, spesso letali, con grave sintomatologia enterica e di infezioni prevalentemente subcliniche negli adulti. Talvolta l'infezione si manifesta clinicamente con sintomi respiratori e lesioni a carico dell'apparato genitale. *Caprine herpesvirus 1* presenta notevoli similarità biologiche con l'infezione da herpesvirus genitale tipo 2 (HHV-2) dell'uomo, sia per la tipologia sia per la localizzazione delle lesioni a livello dell'apparato genitale. La capra può quindi rappresentare un ottimo modello animale per lo studio dell'efficacia di farmaci antivirali e di vaccini da impiegare rispettivamente nella terapia e nella profilassi dell'infezione da HHV-2 dell'uomo. Poiché in letteratura non ci sono molte informazioni sulle risposte immunitarie nell'infezione erpetica della capra, lo scopo dello studio è stato quello di analizzare le risposte anticorpali e cellulo-mediate nell'infezione erpetica naturale e sperimentale.

Metodi. Sono state analizzate 67 capre di razza incrociata Maltese, provenienti da allevamenti diversi e di entrambi i sessi. Le risposte anticorpali IgG1 e IgG2 sono state valutate nel siero mediante un test ELISA specifico per CpHV-1. Un test di neutralizzazione è stato impiegato per l'analisi dell'attività neutralizzante dei sieri *in vitro*. La risposta cellulo-mediata è stata studiata valutando la secrezione di IFN-gamma da parte dei linfociti circolanti CpHV-1-specifici. L'analisi statistica è stata condotta mediante il test *t di Student* e ANOVA.

Risultati. Nell'infezione naturale, in 36 animali (su 43 animali sieropositivi; 84%) sono stati osservati livelli di IgG2 significativamente superiori rispetto a quelli delle IgG1. Nell'infezione sperimentale, è stata osservata la produzione di entrambe le sottoclassi con una netta prevalenza di IgG2 nella fase convalescente. È stata inoltre osservata un'associazione tra l'attività neutralizzante del siero ed i livelli di IgG1. Tali risposte anticorpali sono sostenute da una significativa produzione di IFN-gamma.

Conclusioni. I risultati suggeriscono che gli alti livelli di IgG2 (ad attività opsonizzante), i livelli minori di IgG1 ad attività neutralizzante e la produzione di IFN-gamma contribuiscono al controllo dell'infezione erpetica della capra. Lo studio indica inoltre che le risposte umorali e cellulo-mediate nei confronti di CpHV-1 risultano molto simili alle risposte immunitarie anti-HHV-2 e confermano l'impiego del modello CpHV-1/capra per lo studio di HHV-2 nell'uomo.

▣ SISTEMA NERVOSO ENTERICO E PLACCHE DEL PEYER NELLA PATOGENESI DELLA SCRAPIE NATURALE E SPERIMENTALE IN OVINI DI RAZZA SARDA

Giuseppe Marruchella (a), Ciriaco Ligios (b), Maria Giovanna Cancedda (b), Franca Demontis (b), Roberto Chiocchetti (c), Paolo Clavenzani (c), Giovanna Lalatta-Costerbosa (c), Luisa Gioia (a), Giovanni Di Guardo (a)

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

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

(c) *Dipartimento di Morfologia Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi, Bologna*

Le placche del Peyer (*Peyer's Patches*, PP) ed il sistema nervoso enterico (*Enteric Nervous System*, ENS), con particolare riferimento ai plessi mienterici (*Myenteric Plexuses*, MP) ed ai plessi sottomucosi (*Submucosal Plexuses*, SMP) residenti lungo la parete ileale, costituiscono due distretti precocemente colonizzati ad opera dell'agente della scrapie ovina. Si riportano qui di seguito le esperienze condotte nel corso di svariati anni al fine di contribuire alla comprensione di alcuni cruciali eventi patogenetici che si realizzano nelle fasi precoci dell'infezione. All'uopo accurate indagini morfologiche sono state effettuate sugli MP e sugli SMP, nonché sulle PP ileali di ovini di razza sarda con diverso genotipo (*PrP genotype*). Ciò nel tentativo di caratterizzare, in un primo tempo, le popolazioni cellulari dei plessi dell'ENS in grado di accumulare PrPSc (unitamente alla loro numerosità) e, in una seconda fase, l'innervazione delle PP ileali ed i suoi rapporti con le cellule follicolari dendritiche (*Follicular Dendritic Cells*, FDC). Accurate indagini immunostochimiche, in immunofluorescenza indiretta ed in microscopia laser confocale sono state condotte su 9 ovini ARQ/ARQ con scrapie naturale e su 4 ovini ARQ/ARQ con scrapie sperimentalmente indotta per *os* in fase clinica, nonché su 24 animali di controllo (12 agnelli e 12 adulti) con diverso genotipo (ARQ/ARQ, ARRA/ARQ, ARR/ARR). In tutti gli ovini scrapie-affetti oggetto di studio l'accumulo di PrPSc ha coinvolto le cellule enterogliai nonché i neuroni NOS-Immunoreattivi (IR) e Calbindina (CALB)-IR degli MP e dei SMP, in assenza di un'apparente perdita neuronale. Inoltre, non sono state riscontrate significative differenze nell'innervazione delle PP ileali in rapporto ad età, genotipo dell'ospite e presenza/assenza di PrPSc a livello dei follicoli, ove la presenza di fibre nervose è risultata del tutto occasionale.

Concludendo, particolare interesse suscitano sia l'apparente assenza di perdita neuronale nei plessi dell'ENS di ovini infetti sia la rarissima presenza di fibre nervose all'interno dei follicoli delle PP, ove numerose FDC albergavano depositi di PrPSc.

Lavoro eseguito con fondi gentilmente concessi dal MIUR (PRIN 2006).

P COMPARSA DI MUTAZIONI MOLECOLARI CON POSSIBILE IMPATTO SULLA SALUTE PUBBLICA NEI VIRUS INFLUENZALI H5N1 ISOLATI IN AFRICA E MEDIO ORIENTE NEL PERIODO 2006-2008

Isabella Monne, Alice Fusaro, Annalisa Salviato, Giovanni Cattoli, Ilaria Capua
*Laboratorio di Referenza OIE/FAO per l'Influenza Aviaria e la Malattia di Newcastle,
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

Introduzione. Dalla sua prima comparsa nel 2006, il virus influenzale aviario ad alta patogenicità, sottotipo H5N1 è stato responsabile di un importante numero di focolai di infezione in Africa e Medio Oriente che hanno in più casi coinvolto non solo i volatili ma anche l'uomo. In queste aree geografiche la continua circolazione del virus rende necessario un attento monitoraggio per identificare prontamente la comparsa di mutazioni che possano conferire nuove proprietà al virus, quali un ampliamento dello spettro d'ospite o una maggiore resistenza ai farmaci antivirali comunemente utilizzati nella terapia dell'infezione. In questo studio si presentano informazioni sulle caratteristiche molecolari dei virus H5N1 identificati in Africa e Medio Oriente con particolare riferimento alle mutazioni che possano avere un impatto sulla salute pubblica.

Metodi. Le sequenze del genoma completo di 54 H5N1 africani e 13 H5N1 isolati in Medio Oriente tra il 2006 e il 2008 sono state ottenute e analizzate per il presente studio. Nell'analisi sono state inoltre incluse le sequenze nucleotidiche e proteiche dei virus H5N1 africani e medio orientali disponibili nelle banche dati pubbliche di NCBI e GISAID. Tutte le sequenze sono state allineate e tradotte utilizzando il programma MEGA 4.

Risultati. Numerose mutazioni descritte come tipiche di virus influenzali umani sono state identificate nelle sequenze dei virus H5N1 africani e medio orientali. Di particolare importanza è stata l'identificazione di 2 mutazioni (A199S; E627K) nelle sequenze del gene PB2 di alcuni dei ceppi analizzati. Queste mutazioni sono state osservate in precedenza nel PB2 di virus influenzali responsabili delle importanti pandemie influenzali del 1918, 1957 e 1968. Una rara mutazione del gene NS1 (E227K), tipica del virus influenzale coinvolto nella pandemia della "Spagnola" (1918), è stata osservata per la prima volta in sequenze di H5N1 del lineaggio 2.2. Mutazioni associate con una modificata sensibilità ai farmaci antivirali sono state riscontrate nelle sequenze di 10 ceppi africani e di 7 virus medio orientali.

Conclusioni. Le analisi effettuate hanno permesso di riconoscere importanti sostituzioni aminoacidiche con possibile impatto sulla salute pubblica. I risultati di questa indagine evidenziano ancora una volta il ruolo strategico dell'analisi del genoma completo dei virus influenzali e sottolineano l'assoluta necessità di continuare i programmi di monitoraggio nei Paesi coinvolti dall'infezione per seguire l'evoluzione molecolare del virus.

CARATTERIZZAZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI ANTI-H5 TRAMITE SELEZIONE DI *ESCAPE MUTANTS*

Ana Moreno (a), Davide Lelli (a), Enrica Sozzi (a), Elena Canelli (a), Nuria Verdaguer (b), Emiliana Brocchi (a), Paolo Cordioli (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

(b) Instituto de Biologia Molecular de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Parc Cientific de Barcelona, Barcelona, Spagna

Introduzione. A partire dal 1997 sono stati isolati anche in Italia diversi ceppi di Virus Influenzali Aviari (AIV) H5 ad alta (HPAI) e bassa patogenicità (LPAI). Numerose sono, inoltre, le segnalazioni nel mondo di infezione nell'uomo con AIV H5N1. In questo contesto è essenziale la tempestiva identificazione dei ceppi H5. Lo scopo del presente lavoro è la caratterizzazione di Anticorpi Monoclonali (MAb) specifici H5 per lo sviluppo di test diagnostici finalizzati all'identificazione dei virus e degli anticorpi H5-specifici.

Materiali. I MAb sono stati prodotti verso il ceppo di referenza A/Tk/En/28/73 H5N2 LPAI. Le caratteristiche reattive dei MAb sono state valutate tramite inibizione dell'emoagglutinazione (HI), ELISA indiretta con ceppi omologhi ed eterologhi, *Western Blotting*, virus-neutralizzazione e saggi ELISA competitiva per valutare sia la competizione reciproca tra MAb che verso sieri di pollo SPF infettati con diversi sottotipi di AIV. Infine, la caratterizzazione dei MAb H5-specifici è stata approfondita tramite la produzione di *Escape Mutants* (EM) ed il sequenziamento dei rispettivi geni H. La specificità del MAb scelto è stata valutata nei confronti di 13 ceppi AIV H5 e 93 ceppi di altri sottotipi.

Risultati. Sono stati individuati 25 MAb specifici H5 che, sulla base delle prove di competizione reciproca, sono stati ulteriormente divisi in tre gruppi che riconoscono rispettivamente tre epitopi conformazionali diversi sulla emoagglutinina. Tra i MAb del primo gruppo, neutralizzanti ed HI positivi, è stato individuato il MAb 5D8 come candidato per lo sviluppo di test diagnostici e per la produzione di EM. Il sequenziamento completo del gene H del ceppo *wild type* e dei diversi EM-5D8 generati ha evidenziato la presenza di tre mutazioni aminoacidiche in tutti gli EM in posizioni 170, 235, 240. Lo studio cristallografico della H5 attraverso il *modelling* per omologia con la medesima proteina del ceppo VN1194 e la localizzazione delle mutazioni sulla struttura tridimensionale hanno evidenziato che l'epitopo *target* del MAb 5D8, mai descritto precedentemente, si localizza nella parte globulare della sub-unità HA1. La specificità del 5D8 è risultata del 100%, evidenziando reattività solo nei confronti dei AIV H5.

Conclusioni. La caratterizzazione dei MAb H5-specifici ha permesso di distinguere diversi siti antigenici; l'epitopo identificato dal MAb 5D8, mappato nella parte globulare della sub-unità HA1, è descritto per la prima volta. Il MAb 5D8 è stato utilizzato per lo sviluppo di test diagnostici per la ricerca di antigeni e anticorpi H5-specifici con ottimi risultati.

P PREVALENZA DI ENTEROVIRUS E TESCHOVIRUS IN SUINETTI CON ENTERITE IN ITALIA

Paschalina Moschidou (a), Eleonora Lorusso (a), Arianna Radogna (a), Marco Campolo (a), Antonio Lavazza (b), Giovanni Pezzotti (c), Francesca Amorisco (a), Antonio Parisi (d), Vito Martella (a), Canio Buonavoglia (a)

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

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia*

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

(d) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Putignano, Bari*

Introduzione. *Porcine Enterovirus* (PEV) e *Teschovirus* (PTV) sono considerati ubiquitari e sono associati per lo più ad infezioni asintomatiche nei suini. In alcuni casi possono determinare manifestazioni cliniche di rilievo, quali turbe riproduttive, disordini neurologici, dermatite, miocardite, polmonite e diarrea. PEV e PTV sono inclusi nella grande, eterogenea, famiglia delle *Picornaviridae*. Con il termine PEV si intende *Porcine Enterovirus A* (PEV-A) e *Porcine Enterovirus B* (PEV-B), nel genere *enterovirus*. PTV è stato invece assegnato al nuovo genere *teschovirus*. Nel presente lavoro è stata valutata la prevalenza di picornavirus in campioni di feci di suinetti con enterite.

Metodi. Sono stati presi in esame 207 campioni di feci di suini con enterite, di età compresa tra 1 e 3 mesi, provenienti da 116 allevamenti ubicati nel Nord e Centro Italia (Lombardia, Emilia-Romagna, Umbria e Marche), raccolti nel periodo 2003-2005. I campioni sono stati raccolti in collaborazione con l'IZS di Lombardia ed Emilia-Romagna (Brescia) e l'IZS di Umbria e Marche (Perugia). I campioni sono stati sottoposti a RT-PCR utilizzando diversi set di *primer* disegnati su regioni altamente conservate (5'UTR, VP1) del genoma dei picornavirus. L'algoritmo prevedeva la ricerca dell'RNA dei picornavirus usando *primer* ad ampio spettro e la successiva caratterizzazione dei campioni positivi per identificare PEV-A, PEV-B e PTV. I medesimi campioni sono stati anche testati per valutare la prevalenza dei calicivirus enterici e dei rotavirus di tipo A e C.

Risultati. PEV e PTV sono stati identificati nel 55,17% degli allevamenti esaminati per lo più in co-infezione con altri virus enterici. In 113 su 207 campioni (54,58%) è stato trovato l'RNA di picornavirus. In 51 campioni (24,63%) è stato identificato PEV-A, in 57 (27,53%) PEV-B ed in 42 (20,28%) PTV. Nella maggior parte dei casi si trattava di infezioni di tipo misto, sostenuta da PEV-A, PEV-B e PTV in varie combinazioni. Soltanto in 11/207 campioni (5,3%) è stata identificata l'infezione da picornavirus suini in assenza di altri enteropatogeni (rotavirus e calicivirus).

Conclusioni. PEV e PTV sono stati identificati con elevata prevalenza in suinetti con enterite e risultano ampiamente diffusi negli allevamenti suini in Italia. Nella maggior parte dei casi si realizzano infezioni miste tra diversi picornavirus suini, con calicivirus enterici e rotavirus di tipo A e C. La presenza di una moltitudine di agenti virali nelle feci di suinetti con enterite da svezzamento e post-svezzamento può suggerire eventuali sinergismi in grado di esacerbare la sintomatologia enterica dei suinetti.

INFEZIONE DA ASTROVIRUS IN UN GATTO CON DIARREA

Paschalina Moschidou, Eleonora Lorusso, Arianna Radogna, Maria Stella Lucente, Nicola Decaro, Francesco Cirone, Domenico Buonavoglia, Gabriella Elia, Grazia Greco, Vito Martella, Canio Buonavoglia

Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Bari

Introduzione. La famiglia *Astroviridae* comprende i generi mamastrovirus ed avastrovirus, ossia astrovirus dei mammiferi e delle specie aviari. Gli astrovirus sono associati a forme enteriche più o meno gravi nell'uomo ed in diverse specie animali. In alcune specie aviari sono anche associati a nefrite ed epatite. L'Astrovirus Felino (FAstV) è stato identificato al microscopio elettronico in campioni di feci di gatti domestici e l'infezione sperimentale di gattini determina sintomi enterici. FAstV è geneticamente correlato agli astrovirus umani e un virus FAstV-simile è stato identificato nelle feci di un bambino, suggerendo un potenziale ruolo zoonosico. Recentemente negli USA è stato descritto un focolaio di enterite in ghepardi in cattività di età compresa tra uno e due anni, associato ad infezione da astrovirus (*cheetah astrovirus*), geneticamente correlato a FAstV.

Metodi. Nei nostri laboratori è pervenuto un campione di feci raccolto da un gattino randagio di quattro mesi di età che presentava febbre, sintomatologia gastroenterica, abbattimento e disidratazione. Il campione di feci è stato sottoposto a *screening* diagnostico per diversi patogeni enterici del gatto, come parvovirus, coronavirus, enterovirus, rotavirus ed astrovirus. Ai fini dell'identificazione di FAstV è stata eseguita una RT-PCR usando un set di *primer* degenerati sulla regione genomica ORF1b, codificante per la RNA-polimerasi RNA-dipendente (RdRp).

Risultati. Il gatto è risultato positivo per astrovirus ed il frammento della RdRp (400 bp) è stato sequenziato per confermare la diagnosi. Il virus ha mostrato 93,4% di identità nucleotidica (nt) con astrovirus del ghepardo e <74,9% nt con astrovirus umani.

Conclusioni. Ad oggi, pochi sono i dati disponibili riguardo FAstV e non è chiaro quale sia il suo ruolo entero-patogeno nel gatto. In letteratura è presente solo una sequenza parziale della regione del capsido (ORF2), mentre non esistono dati sulla RdRp (ORF1b). L'elevata omologia (93,4% nt) tra le sequenze RdRp di astrovirus di gatto e ghepardo suggerisce che l'astrovirus identificato nei ghepardi in realtà sia un ceppo felino e che FAstV sia in grado di oltrepassare la barriera di specie. I felidi selvatici sono suscettibili a diversi patogeni virali di cane e gatto e quindi questo dato è abbastanza plausibile. I risultati di questo lavoro sono la prima segnalazione di FAstV in Italia. La possibilità di impiegare ed ottimizzare metodiche diagnostiche dirette permetterà di capire e definire meglio il ruolo di FAstV nelle forme enteriche del gatto domestico.

INDAGINI VIROLOGICHE NEI CONFRONTI DEL CIRCOVIRUS SUINO TIPO 2 (PCV2) E DEL VIRUS DELLA SINDROME RESPIRATORIA E RIPRODUTTIVA DEL SUINO (PRRSV) NEL CENTRO ITALIA

Stefano Petrini, Matteo Sabbatini, Sara Briscolini, Valentina Silenzi, Manfredo Fortunati, Marta Paniccià

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Introduzione. Diversi autori negli ultimi anni, hanno evidenziato come i ruoli svolti dal Circovirus Suino tipo 2 (PCV2) e dal Virus della Sindrome Respiratoria e Riproduttiva del Suino (PRRSV) siano determinanti nel Complesso delle Malattie Respiratorie del Suino (PRDC). Scopo del presente lavoro è stato quello di riportare i risultati delle indagini virologiche nei confronti di PCV2 e PRRSV, negli allevamenti suini del territorio umbro-marchigiano.

Metodi. Sono stati raccolti 246 campioni d'organo (polmone, rene, fegato, milza, tonsilla palatina, linfonodi, intestino, utero, ovaie, feti abortiti) da animali sottoposti ad esami necroscopici. I soggetti provenivano da 47 aziende suine che non effettuavano la vaccinazione nei confronti di PCV2 e PRRSV, di cui 26 situate nella Regione Marche e 21 nella Regione Umbria. I campioni omogenati, centrifugati e decontaminati sono stati inoculati su piastre contenenti colture cellulari di rene neonatale di suino (NSK) e fatti adsorbire per 1 h a 22°C. Le piastre sono state poi incubate a 37°C con il 5% di CO₂ e controllate giornalmente per la presenza di effetto citopatico (ECP). Dopo 10 giorni, sono stati effettuati 3 passaggi seriali. Al fine di rilevare la presenza del genoma virale, dal surnatante delle NSK sono state eseguite le indagini di biologia molecolare (PCR) secondo i protocolli descritti da Ellis nel 1999 e da Suarez nel 1994 rispettivamente per il PCV2 e il PRRSV.

Risultati. Dalle colture cellulari inoculate con gli organi sopramenzionati è stato evidenziato ECP riferibile ad infezione da PRRS in 52 (21,13%) campioni d'organo con una positività variabile dal 6,66% nel rene al 25,49% nella milza. Le positività riscontrate sono state tutte confermate dalle PCR nei confronti dello stipite europeo di PRRSV. Le stesse provenivano da 13 (27,65%) aziende, di cui 5 (18,51%) situate nelle Marche e 8 (38,09%) in Umbria. Per quanto concerne PCV2 nessun ECP è stato osservato, mentre le PCR hanno rilevato il genoma virale in 85 (34,55%) campioni d'organo con una positività variabile dal 11,10% negli aborti al 46,15% nei linfonodi. Questi provenivano da 17 (36,17%) allevamenti, di cui 8 (30,76%) situati nelle Marche e 9 (42,85%) in Umbria.

Conclusioni. I risultati ottenuti in questa indagine, suggeriscono che il PCV2 e il PRRSV svolgono un ruolo attivo nel PRDC e depongono per una diffusione delle stesse infezioni negli allevamenti suini del territorio umbro-marchigiano, con una maggiore percentuale di positività riscontrata nella Regione Umbria. I risultati sono concordi con quelli ottenuti da altri autori.

P TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DEI CEPPI DI ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI TRASMISSIBILI ANIMALI ED UMANE

Laura Pirisinu, Paola Fazzi, Stefano Marcon, Michele Angelo Di Bari, Claudia D'Agostino, Shimon Simson, Paolo Frassanito, Gabriele Vaccari, Umberto Agrimi, Romolo Nonno
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST), o malattie da prioni, sono malattie neurodegenerative ad esito fatale che colpiscono animali ed uomo. L'evento patogenetico fondamentale consiste nell'accumulo a livello del SNC della PrPSc, isoforma patologica della PrPC, glicoproteina cellulare codificata dall'ospite. Nonostante la PrPSc mantenga la medesima sequenza aminoacidica della PrPC, la modificazione della sua struttura terziaria conferisce proprietà biochimiche diverse, come insolubilità in detergenti, resistenza alle proteasi, tendenza a formare aggregati. Nella maggior parte delle specie sono stati riscontrati diversi ceppi di prioni, ovvero varianti fenotipiche, con specifiche proprietà biochimiche e biologiche. In accordo con l'ipotesi dell'esclusiva natura proteica dei prioni, la variabilità osservata dei ceppi consisterebbe in variazioni conformazionali della PrPSc.

Lo studio comparativo dei ceppi di diverse specie è tutt'oggi legato alla trasmissione in modelli animali. Abbiamo recentemente mostrato che l'arvicola rossastra (*Myodes glareolus*) è suscettibile ad un ampio pannello di malattie da prioni. L'obiettivo di questo studio è analizzare le proprietà biochimiche della PrPSc associata a ceppi di EST animali (scrapie, BSE e BASE) e umane (*Creutzfeldt-Jakob Disease* sporadica o sCJD) dopo trasmissione in arvicola.

A tale scopo è stata studiata la PrPSc accumulata nel SNC di arvicole infettate con diversi ceppi di EST. In particolare è stata effettuata: i) l'analisi biochimica dei frammenti di PrPSc resistenti alla proteinasi K (PrPres); ii) l'analisi della stabilità conformazionale della PrPSc. I frammenti di PrPres sono stati individuati utilizzando anticorpi monoclonali diretti verso differenti epitopi (*epitope mapping*); ciò ha consentito di determinare i siti di taglio della proteinasi K lungo la PrPSc, le dimensioni dei frammenti e, grazie anche all'ausilio della deglicosilazione, è stato possibile differenziare i frammenti non glicosilati da quelli glicosilati. L'analisi della stabilità conformazionale della PrPSc è stata effettuata misurando il grado di solubilizzazione della PrPSc in seguito a trattamento con concentrazioni crescenti di guanidina-HCl.

I risultati mostrano che tutti gli isolati di scrapie ovina possiedono un simile *pattern* molecolare in arvicola, ben distinguibile da quelli osservati nelle diverse forme di sCJD, BSE e BASE. Le forme di sCJD si differenziano tra loro e dalla BSE per numero di frammenti, glicotipo e peso molecolare. Un solo tipo di sCJD, denominato VV2 sCJD, mostra convergenze con la BASE, ed entrambi sono caratterizzati dalla presenza di tre diversi frammenti di PrPres.

Tali risultati mettono le basi per ulteriori indagini sulla natura delle forme sporadiche di EST e su quale sia il possibile rapporto tra quelle umane e animali.

INDAGINI SIEROLOGICHE E VIROLOGICHE PER BVDV IN ALLEVAMENTI BOVINI AD ALTA PRODUZIONE IN PIEMONTE

Monica Pitti (a), Chiara Guglielmetti (a), Michela Conterbia (b), Sandra Angiolillo (a), Teresa Biosa (a), Simone Peletto (a), Fabio Zuccon (a), Pierluigi Acutis (a), Loretta Masoero (a)
(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, Torino
(b) ASL, Novara

Introduzione. La Diarrea Virale Bovina (BVD) è una patologia diffusa in tutto il mondo, l'infezione tende ad essere endemica nelle aree dove la densità di allevamenti bovini è maggiore. La principale fonte di infezione in allevamento è rappresentata dagli animali Persistentemente Infetti (PI). Nel 2006 è stato attivato in Piemonte un progetto avente come finalità la definizione di criteri di controllo della malattia nelle aziende bovine ad elevata produzione. Il presente studio si propone di eseguire un'analisi preliminare dei dati sinora acquisiti.

Materiali e metodi. Sono stati selezionati 117 allevamenti, nei quali è stato eseguito uno *screening* sierologico con metodica ELISAAb-NS3 su 25 campioni, ripartiti tra cinque categorie di età. In caso di positività superiore a tre capi su cinque nella categoria 9-15 mesi, essendo questa situazione indice di recente circolazione virale, si è proceduto all'esame virologico su tutti i capi (ELISA-AgErns). Nelle aziende con sieropositività inferiore in tale categoria sono stati eseguiti ulteriori controlli sierologici a distanza di sei mesi. Sui campioni positivi all'ELISA-AgErns, l'esame virologico e sierologico sono stati ripetuti due volte a distanza di 21 giorni. Sugli animali eventualmente abbattuti sono stati eseguiti isolamento virale, ELISA-AgTOT su milza e ELISA-AgErns su cute auricolare. Dal 2009 è stata messa a punto una metodica PCR su sangue e tessuti con l'obiettivo di procedere all'analisi genetica dei ceppi isolati. È stata eseguita l'analisi filogenetica sequenziando un frammento di 287bp della regione 5'UTR.

Risultati. Durante il primo *screening* sierologico si è riscontrata circolazione virale in 18 aziende, al secondo *screening* in sette aziende e al terzo *screening* in altre quattro, per un totale di 27 allevamenti. All'esame virologico, i capi di 13 aziende sono risultati tutti negativi, in 14 aziende si sono riscontrate positività per un totale di 52 capi, 50 dei quali sono risultati essere PI. La prevalenza intrallevamento media di capi PI è risultata essere pari al 2,23% (IC95% 1,60%-3,94%). È stata eseguita l'analisi filogenetica su tre isolati da tre diverse aziende, che sono risultati tutti di tipo 1, ma appartenenti a tre diversi sottotipi: 1e, 1f e 1h.

Conclusioni. Una prevalenza media di capi PI pari al 2,23% è coerente con i dati riportati in letteratura, vari studi in altri Paesi europei riportano prevalenze intorno all'1-2% in situazioni di malattia endemica. La tipizzazione genetica ha rilevato, già con una esigua numerosità campionaria, la presenza di diversi sottotipi, indicando l'importanza di questa analisi a fini epidemiologici.

NOROVIRUS IN CANI CON ENTERITE

Arianna Radogna (a), Eleonora Lorusso (a), Maria D'Abramo (a), Maria Fiorella Greco (a), Viviana Mari (a), Costantina Desario (a), Antonio Parisi (b), Vito Martella (a), Canio Buonavoglia (a)

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

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Putignano, Bari*

Introduzione. La famiglia *Caliciviridae* comprende i generi vesivirus, lagovirus, norovirus, sapovirus, e dei calicivirus identificati nei bovini e nella scimmia ma non classificati. I Norovirus (NoV) ed i sapovirus sono importanti enteropatogeni nell'uomo. Recentemente stipiti NoV simili a quelli umani di genogruppo GIV (*Alphatron-like*), sono stati identificati in campioni fecali di leone (Pistoia/387/06/ITA) e di cane (Bari/170/07-4/ITA), dimostrando per la prima volta la possibile circolazione dei NoV anche nei carnivori. L'individuazione di NoV nei carnivori solleva diverse domande inerenti la diffusione, l'attitudine patogena e, in virtù della stretta interazione tra uomo e carnivori domestici, il potenziale zoonosico e le possibili intersezioni con l'evoluzione dei NoV umani.

Metodi. Sono stati esaminati 183 campioni fecali prelevati da soggetti che presentavano forme enteriche da lievi a gravi, raccolti durante il 2007. I campioni sono stati testati per la ricerca di comuni agenti patogeni virali del cane, inclusi parvovirus e coronavirus. Tutti i campioni sono stati testati per calicivirus, utilizzando una coppia di *primer* generici, diretta verso la regione RdRp del complesso polimerasico. La presenza di NoV è stata confermata utilizzando *primer* specifici per NoV.

Risultati. La maggior parte dei 183 campioni conteneva parvovirus (39,3%) e coronavirus (19,1%), da soli o in infezioni miste, mentre altri agenti patogeni sono stati individuati solo sporadicamente. Insieme con il ceppo Bari/170/07-4/ITA, altri 3 campioni sono risultati positivi per NoV (2,2%). Tutti i campioni, tranne uno (Bari/91/07/ITA) contenevano anche CPV-2.

Conclusioni. Lo stipite Bari/170/07-4/ITA è il primo stipite di NoV identificato nei cani, ed è risultato simile (90,1% aa nella VP1) al NoV di leone, risultando una variante del genotipo GIV.2. Il virus Bari/91/07/ITA è risultato simile nella polimerasi ai virus del leone e del cane, tuttavia l'analisi della ORF2 (VP1) ha mostrato scarsa correlazione genetica rispetto ai virus GGIV.2 (54,0-54,4% aa), suggerendo un fenomeno di ricombinazione genetica, con il sito di *cross-over* tra la ORF1 e ORF2. È inoltre molto curioso notare come nella parte iniziale della VP1 il virus Bari/91/07/ITA risulti molto simile (89,1% nt e 98,1% aa) a sequenze brevi di NoV ritrovati in ostriche in Giappone. I risultati di questo studio dimostrano che: i) i NoV circolano nei cani; ii) i NoV sono geneticamente eterogenei; iii) che l'uomo può essere esposto a infezioni da virus analoghi al virus Bari/91/07/ITA mediante consumo di molluschi bivalvi crudi.

□ CARATTERIZZAZIONE DI UN CEPPO DI SRLV APPARTENENTE AL GENOTIPO E ISOLATO IN SARDEGNA

Ramses Reina (a), Silvia Dei Giudici (b), Magda Juganaru (a), Anna Pina Murtino (b), Gaintonella Puggioni (b), Sergio Rosati (a)

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

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

Introduzione. Il genotipo E di SRLV è stato identificato come *cluster* a bassa patogenicità, non essendo associato ad alcun segno clinico caratteristico; l'analisi del genoma dello stipite Roccaverano, prototipo del genotipo E, ha rivelato delezioni naturali per dUTPase, VPR-*like* e per una ripetizione di 71pb nella regione U3 dell'LTR. Tale stipite mostra *in vitro* un titolo elevato in Macrofagi di Derivazione Sanguigna (BDM) e basso in colture di Membrana Sinoviale (SM) e Plesso Corioideo (PC). In questa nota, abbiamo isolato e caratterizzato un nuovo stipite appartenente allo stesso genotipo, ma isolato in Sardegna da animali sintomatici.

Metodi. Colture cellulari permissive SM, PC, e BDM sono state allestite usando idonei mezzi colturali. L'isolamento virale, eseguito tramite co-coltura di PBMC e SM, è stato monitorato per la comparsa dell'effetto citopatico. La replicazione *in vitro* in differenti substrati cellulari è stata verificata quantificando l'attività RT nel sovranatante e colorazione immunocitochimica impiegando un siero policlonale specifico per la proteina capsidica. Infine, mediante amplificazione di frammenti parzialmente sovrapposti, è stata determinata la sequenza di gran parte del genoma.

Risultati. Il nuovo isolato (SardE) ha dimostrato di appartenere al genotipo E in tutte le regioni analizzate (*gag*, *pol*, *env* e LTR) con omologie variabili nei diversi geni. Tutte le delezioni evidenziate nello stipite Roccaverano sono state identificate nel ceppo sardo, confermando che la peculiare struttura genomica è un marker specifico nell'ambito del genotipo. L'unica caratteristica biologica che differenzia i due stipiti è la capacità del ceppo sardo di replicare a titoli elevati su cellule sinoviali, producendo il tipico effetto sinciziogeno.

Conclusioni. La disponibilità di una nuova sequenza genomica di un lentivirus appartenente al genotipo E ed identificato nelle capre sarde offre un'ulteriore conferma della presenza di un *cluster* virale tipico delle razze caprine italiane, evolutosi con modalità differenti in due diverse popolazioni caprine. La capacità o meno di replicare su membrana sinoviale sembra l'unico marker biologico che differenzia il *cluster* sardo da quello piemontese, mentre l'assenza di dUTPase e VPR-*like* in entrambi gli stipiti suggerisce che tali geni si siano persi nel corso dell'evoluzione e non sono di per sé sufficienti a caratterizzare il nuovo genotipo come scarsamente patogeno. L'analisi del genoma del ceppo sardo non ha evidenziato eventi di ricombinazione con altri genotipi; tuttavia le sequenze aminoacidiche corrispondenti alle regioni ipervariabili HV1-HV2 sembrano

spiegare il tropismo del *cluster* sardo verso la sinovia, condividendo con i ceppi artritici i motivi conservati GNXT (HV1) e XXGK (HV2).

Lavoro eseguito con il contributo del Ministero della Salute nell'ambito della ricerca corrente IZSSA/03.

P SITUAZIONE EPIDEMIOLOGICA DELLA MALATTIA VESCICOLARE DEL SUINO NELLA REGIONE CALABRIA NELL'ULTIMO QUINQUENNIO (2004-2008)

Eugenia Riccelli, Lucia Ciabrone, Antonio Cacia, Saverio Cortese
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Catanzaro

Introduzione. Malattia a decorso benigno, la Malattia Vescicolare dei Suini (MVS), è clinicamente caratterizzata da vescicole sul grugno, sulla lingua e sulla cute dello spazio interungueale che la rende praticamente indistinguibile dall'Afta epizootica. Per tali motivi e per la diffusione rapida ed elevata, è stata inserita nella lista "A" dell'OIE e, dal 1973 (OM del 13/02/1973), è soggetta a denuncia in base all'art. 1 del Regolamento di Polizia Veterinaria (DPR 08/02/1954, n. 320). La Calabria, nonostante il protrarsi delle attività di eradicazione e controllo contenute nel DPR n. 362 del 17/05/1996, l'OM del 26 luglio 2001 e successive modifiche ed il piano straordinario della Regione Calabria è una delle Regioni non ancora accreditate nei confronti della Malattia Vescicolare dei Suini. Lo scopo del presente lavoro è quello di esaminare la situazione epidemiologica nel quinquennio che va dal 2004-2008, evidenziando eventuali disfunzioni operative.

Materiali e metodi. Allo scopo di potenziare e rendere più efficaci le misure di controllo della malattia, finalizzate alla sua eradicazione dal territorio regionale, grazie ad un proficuo rapporto di collaborazione del Dipartimento della Calabria con il Centro di Referenza delle MVS di Brescia e la Regione Calabria, dal 1° di luglio 2002 i controlli sierologici di *screening* vengono effettuati presso la Sezione di Catanzaro. A partire da questa data le AASSLL conferiscono quindi i campioni di sangue, secondo le modalità contenute nel piano straordinario Regionale. I campioni ematici conferiti vengono analizzati, presso il laboratorio di sierologia, utilizzando un kit ELISA competitiva, fornito direttamente dal Centro Nazionale di Referenza per l'MVS (CERVES). I soggetti risultati positivi o dubbi al test ELISA vengono inviati al CERVES per la conferma tramite Siero-Neutralizzazione e dosaggio IgM/IgG.

Risultati e discussione. Nel periodo preso in considerazione sono stati effettuati controlli su 5.512 allevamenti: da ciò scaturisce che una sorveglianza continua e costante negli anni ha determinato un sensibile aumento degli allevamenti accreditati (da 849 nel 2004 a 1.048 nel 2008) e di conseguenza un calo dei focolai (da 18 nel 2004 a 5 nel 2008). Dalle indagini epidemiologiche si evidenzia che i fattori di rischio responsabili della diffusione della malattia vanno ricercati nelle movimentazioni di suini infetti e nei contatti indiretti fra allevamenti.

P DIFFUSIONE E CONTROLLO DELL'INFEZIONE DA METAPNEUMOVIRUS AVIARE NELL'ALLEVAMENTO DELLA GALLINA OVAIOLA

Enrico Ricchizzi (a), Marco Falchieri (b), Caterina Lupini (a), Mattia Cecchinato (c), Amelio Meini (d), Ezio Bianchi (e), Elena Catelli (a)

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

(b) *Department of Veterinary Pathology, University of Liverpool, Neston, United Kingdom*

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

(d) *Intervet Shering Plough Animal Health, Segrate, Milano*

(e) *Agricola Tre Valli, Gruppo Veronesi, S. Martino, Verona*

Introduzione. Il Metapneumovirus Aviare (AMPV) è responsabile nel pollo, oltre che d'infezioni respiratorie, anche di cali dell'ovodeposizione nei riproduttori e nelle ovaiole. In Italia l'infezione è endemica nelle Regioni a maggior vocazione avicola, ma scarsi sono i dati sull'impatto di AMPV sul settore della produzione di uova da consumo. Per delineare un quadro della situazione in questa tipologia di allevamento è stata svolta in Lombardia, Veneto ed Emilia-Romagna, nel periodo ottobre 2006-dicembre 2007, un'indagine epidemiologica sulla diffusione di AMPV. Sono stati previsti due studi longitudinali e numerosi campionamenti singoli in 14 gruppi sia in fase pollastra che ovaiole. I risultati sono stati integrati, dove possibile, con i dati produttivi dell'allevamento e gli eventuali piani vaccinali applicati.

Metodi. Da ciascun gruppo sono stati raccolti 10 campioni per RT-PCR e/o 10 per ELISA. Nello studio longitudinale n. 1, i campionamenti sono stati eseguiti 2 volte alla settimana, dall'età di 20 sino a 42 settimane. Nello studio longitudinale n. 2 sono stati eseguiti campionamenti pre-vaccinazione (11 settimane), post-vaccinazione (14 settimane) e all'inizio della deposizione (20 settimane e, solo in un gruppo, a 24 settimane). I restanti gruppi sono stati campionati una volta sola.

Risultati e conclusioni. I risultati dimostrano un'elevata diffusione dell'infezione da metapneumovirus aviare sottotipo B. In sole due evenienze è stato possibile correlare la presenza dell'infezione da AMPV a cali dell'ovodeposizione. Nello studio longitudinale n. 1 solo il piano vaccinale che prevedeva tre interventi, fra cui uno con vaccino inattivato, ha protetto dall'infezione. Nello studio longitudinale n. 2, pollastre negative, vaccinate con vaccino vivo attenuato, hanno tutte mostrato l'infezione da AMPV entro la 20^a settimana di vita, in coincidenza con l'evento stressante dell'accasamento e dell'entrata in deposizione. La vaccinazione singola con vaccino vivo si è confermata inefficace a proteggere oltre che dall'infezione anche dal calo dell'ovodeposizione. I campionamenti singoli hanno evidenziato come molti gruppi si infettino in fase pollastra, senza sintomi clinici evidenti, arrivando sieropositivi alla deposizione. Interessante sarà indagare se il contatto con il virus in tale fase protegga dall'infezioni nella futura vita produttiva. Questo studio fornisce dati preliminari ma unici disponibili in Italia sulla diffusione e dinamica delle infezioni da AMPV nel settore produttivo dell'uovo da consumo.

P CIRCOLAZIONE DI CAMPO DI UN CEPPO PATOGENO DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE ORIGINATO DA VIRUS VACCINALE

Enrico Ricchizzi (a), Caterina Lupini (a), Mattia Cecchinato (b), Paul Brown (c), Clive J. Naylor (c), Elena Catelli (a)

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

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

(c) *Department of Veterinary Pathology, University of Liverpool, Neston, United Kingdom*

Introduzione. Il Metapneumovirus Aviare (AMPV) è un virus a RNA appartenente alla famiglia *Paramyxoviridae*, genere metapneumovirus, in grado di determinare infezioni delle prime vie respiratorie nel tacchino e nel pollo. Per il controllo di AMPV, nel nostro Paese, a partire dagli anni '90, è stata introdotta la vaccinazione, eseguita prevalentemente col sottotipo B ed in misura minore col sottotipo A. I vaccini vivi attenuati conferiscono una buona protezione ma la loro instabilità può portarli a riacquisire virulenza anche dopo un limitato numero di retropassaggi. Sperimentalmente è stato dimostrato che sono sufficienti 4-10 retropassaggi su animali sensibili ed uno studio successivo ha dimostrato come ciò può avvenire anche in allevamento. In questo lavoro è riportato un focolaio di malattia verificatosi nel 2003, dovuto ad AMPV sottotipo A di origine vaccinale che ha interessato tacchini di sette settimane vaccinati con un sottotipo B.

Metodi. Il focolaio si è verificato in un allevamento di tacchini da carne vaccinati ad una settimana con un vaccino vivo attenuato del sottotipo B. A sette settimane di età è stata osservata sintomatologia respiratoria ed è stato isolato un AMPV sottotipo A. Il genoma di tale virus è stato amplificato e sequenziato in regioni contenenti i marker vaccinali, quindi è stato inoculato in tacchinotti di un giorno di vita per valutarne la patogenicità.

Risultati. Il ceppo di AMPV isolato presentava sequenza nucleotidica identica al vaccino in otto delle nove posizioni marker del vaccino, mentre nella posizione nucleotidica 3.553 era uguale al ceppo progenitore. All'infezione sperimentale tale ceppo si è mostrato patogeno.

Conclusioni. In questo studio è stato isolato un AMPV sottotipo A di origine vaccinale in grado di causare in campo sintomatologia respiratoria e patogeno all'infezione sperimentale. Il virus è stato isolato in un allevamento nel quale non era stata effettuata vaccinazione con AMPV del sottotipo omologo. Esso quindi, verosimilmente, è stato introdotto dall'ambiente esterno o, ipotesi meno probabile, ha persistito nell'ambiente da una precedente vaccinazione con sottotipo A. La presenza di otto marker vaccinali su nove dimostra incontrovertibilmente che il ceppo isolato è di origine vaccinale, e l'infezione sperimentale ne conferma la patogenicità. La mutazione in posizione nucleotidica 3.553 potrebbe essere legata al processo di riacquisizione di patogenicità e richiede ulteriori approfondimenti. Poiché il gruppo era stato vaccinato con AMPV sottotipo B, un altro dato emerge dallo studio, relativo al fatto che la *cross*-protezione fra sottotipi è limitata.

SVILUPPO E APPLICAZIONE DI METODICHE MOLECOLARI NELLA DIAGNOSI DELL'ANEMIA INFETTIVA EQUINA

Ida Ricci (a), Enrica Ricci (b), Mauro Pistello (b), Riccardo Forletta (a)

(a) *Centro di Referenza per l'Anemia Infettiva Equina, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana, Pisa*

(b) *Centro Retrovirus e Sezione Virologia, Facoltà di Medicina, Università degli Studi, Pisa*

Introduzione. L'Anemia Infettiva Equina (AIE) è una malattia virale contagiosa degli equidi presente in numerosi Paesi europei ed extraeuropei, sostenuta da un lentivirus della famiglia *Retroviridae* (*Equine Infectious Anemia Virus* - EIAV). La diagnosi di AIE si basa ancora oggi principalmente sull'impiego di metodi sierologici (Immunodiffusione in gel di agar e saggio ELISA); tuttavia i protocolli molecolari di più recente sviluppo costituiscono un valido elemento di ausilio diagnostico da affiancare alle tradizionali tecniche sierologiche. Scopo del lavoro è pertanto quello di allestire metodiche molecolari per la diagnosi diretta di EIAV e valutarne l'applicabilità attraverso l'esame di campioni biologici.

Metodi. Sono stati complessivamente esaminati 46 campioni di plasma equino suddivisi in due gruppi di diversa provenienza. L'RNA virale è stato estratto, retroscritto e poi quantificato mediante *TaqMan Real-Time* PCR (TM-PCR). La regione del genoma virale scelta come bersaglio nel protocollo di amplificazione è localizzata nell'*open reading frame gag*, altamente conservata tra i diversi isolati di EIAV disponibili in banca dati. Le condizioni di amplificazione sono state messe a punto utilizzando un plasmide contenente la stessa regione bersaglio di DNA del virus. Come controllo positivo è stato usato l'RNA estratto da supernatante ottenuto da una linea cellulare di Derma Equino (ED) infettata con EIAV, ceppo Wyoming.

Risultati. La presenza di RNA virale è stata rilevata in 7 dei 46 campioni esaminati appartenenti allo stesso gruppo ma riconducibili a differenti lotti di produzione. La quantità di RNA presente nei campioni positivi è compresa in un *range* di 3.000-200.000 copie/ml di plasma. Ciascun campione è stato esaminato in triplicato da due diversi operatori per verificare la ripetibilità e la riproducibilità del metodo. La sensibilità della metodica allestita per EIAV è di 100 copie di RNA per ml di plasma.

Conclusioni. Le prove effettuate forniscono un utile esempio applicativo del saggio allestito. L'immediata disponibilità di test molecolari per la diagnosi di AIE è particolarmente importante in quanto consente di affiancare ai tradizionali test sierologici metodiche rapide ed altamente sensibili per condurre utili indagini e/o approfondimenti diagnostici. Il lavoro proseguirà con la messa a punto di un protocollo di amplificazione e sequenziamento di regioni env ipervariabili del genoma del virus per valutare la diffusione dei ceppi virali circolanti e per studi di tipo filogenetico ed epidemiologico.

DIAGNOSI DI VIRUS INFLUENZALI H5 E H7: ALLESTIMENTO DI METODICHE RT *REAL-TIME* PCR

Francesca Rizzo (a), Rosalia Centorbi (a), Francesca Sidoti (b), Cristina Costa (b),
Massimiliano Bergallo (b), Rossana Cavallo (b), Maria Lucia Mandola (a)

(a) *Laboratorio Specialistico Diagnostica Molecolare, Virologia e Ovocoltura, Istituto
Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

(b) *Struttura Complessa a Direzione Universitaria Virologia, Azienda Ospedaliera
Universitaria San Giovanni Battista, Torino*

Introduzione. I virus influenzali di tipo A sono classificabili in differenti sottotipi in base alle caratteristiche antigeniche delle principali proteine di superficie, l'Emoagglutinina (H) e la Neuraminidasi (N). In natura sono stati identificati, ad oggi, 16 sottotipi di H e 9 di N. L'alta patogenicità (HPAI), caratteristica biologica correlata al grado di virulenza del virus nel pollo, è stata finora associata ai sottotipi H5 e H7; la maggior parte dei ceppi virali circolanti appartenenti a questi sottotipi rientrano nella gran parte dei casi nel patotipo bassa virulenza LPAI. Le metodiche molecolari, per la loro alta sensibilità e specificità, si stanno rivelando sempre più utili nella rapida individuazione e caratterizzazione di ceppi influenzali da matrici di volatili selvatici e domestici. Lo scopo di questo studio è stato di allestire protocolli rRT-PCR capaci di riconoscere il maggior numero di ceppi influenzali H5 e H7 registrati dal 2000 ad oggi. Si sono inoltre confrontati, in termini di sensibilità, i metodi sviluppati rispetto la metodica *gold standard* di Isolamento Virale (VI) su uova.

Metodi. Data la numerosità di ceppi aviari isolati negli anni a livello mondiale registrati in banche dati e l'eterogeneità delle sequenze del gene dell'emoagglutinina si è reso necessario un disegno manuale di *primer* e sonda. I *primer* sono stati confermati utilizzando il software OligoPerfect. Per la produzione dei plasmidi e le prove di sensibilità delle due metodiche (VI e rRT-PCR) sono stati utilizzati isolati di campo di virus influenzali aviari dei sottotipi LPAI H5N2 e H7N3 titolati su embrioni di pollo per la valutazione della *Embryo Infectious Dose*₅₀ con il metodo di Reed e Muench.

Risultati. La rRT-PCR si è rivelata sensibile, specifica e in grado di identificare 134 ceppi H5 e 204 ceppi H7 (controllo effettuato con BLAST). Il *range* dinamico plasmidico è risultato di 10-10¹⁰ copie/reazione per H5N1 ($R^2=0,991$ e $slope=3,033$), 10-10¹⁰ copie/reazione per H5NX ($R^2=0,991$ e $slope=3,006$) e di 10-10¹⁰ copie/reazione per H7NX ($R^2=0,994$ e $slope=3,3$). Le metodiche sono state sottoposte a prove di variabilità intra ed *inter-test*. La rRT-PCR si è rivelata sensibile, specifica e in grado di identificare 134 ceppi H5 e 204 ceppi H7 (controllo effettuato con BLAST). Il *range* dinamico plasmidico è risultato di 10-10¹⁰ copie/reazione per H5N1 ($R^2=0,991$ e $slope=3,033$), 10-10¹⁰ copie/reazione per H5NX ($R^2=0,991$ e $slope=3,006$) e di 10-10¹⁰ copie/reazione per H7NX ($R^2=0,994$ e $slope=3,3$). Le metodiche sono state sottoposte a prove di variabilità *intra* ed *inter-test*.

Conclusioni. Entrambe le tecniche si sono rivelate utili per la diagnosi dei ceppi aviari. In particolare i saggi rRT-PCR hanno mostrato più alta sensibilità rispetto

all'isolamento. In conclusione, i metodi biomolecolari sviluppati potrebbero rappresentare un innovativo strumento per la rapida individuazione di focolai causati da virus aviari dei sottotipi H5 e H7 a bassa ed alta patogenicità, consentendo pertanto l'attuazione tempestiva delle misure di controllo adeguate.

ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI UN CEPPLO DI *CAPRINE HERPESVIRUS 1* IN SARDEGNA

Angela Maria Rocchigiani, Giontonella Puggioni, Anna Pina Murtino, Maria Teresa Sechi, Annalisa Oggiano, Cecilia Penna, Pierangela Cabras, Cristiana Patta
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

Introduzione. *Caprine Herpesvirus type 1* (CpHV-1) è stato isolato per la prima volta in Sardegna da una capra naturalmente infetta che presentava frequenti ritorni in calore. L'allevamento di provenienza del soggetto, faceva parte di un gruppo di 7 aziende, con problemi della sfera riproduttiva, incluse nel piano di monitoraggio regionale sugli effetti indesiderati da vaccino vivo attenuato nei confronti della *Bluetongue*. Il DNA virale dello stipite isolato confrontato attraverso il metodo di Restrizione Enzimatica (REA) con quello di altri ceppi isolati nel bacino del Mediterraneo ha dimostrato di possedere un profilo caratteristico.

Metodi. Sono stati prelevati 200 campioni di sangue e 61 tamponi vaginali da capre adulte e organi da feti e soggetti nati morti. Su tutti i campioni è stata eseguita la PCR e l'isolamento su cellule MDBK. Su tutti i capi adulti è stata verificata la presenza di anticorpi verso CpHV-1 mediante test di sieroneutralizzazione. Il ceppo di CpHV-1 isolato (Sard1) è stato confrontato, mediante Analisi di Restrizione (REA), con il ceppo italiano Ba-1 e due ceppi spagnoli SP1 e SP2, isolati da capre sieropositive a seguito di riattivazione sperimentale. Sono stati utilizzati gli enzimi di restrizione HindIII, PstI, BamHI, BstEII, NotI, KpnI.

Risultati. La sieroprevalenza nei confronti del CpHV-1 negli allevamenti testati è stata del 52%. La PCR è risultata positiva in 9 campioni di sangue e in 7 tamponi vaginali prelevati da 8 animali sieropositivi e da 1 sieronegativo. Il virus è stato isolato da un tampone vaginale di una capra naturalmente infetta, sierologicamente negativa, la quale ha sieroconvertito a distanza di 20 giorni. Il virus, identificato mediante PCR, è stato confermato come CpHV-1 attraverso sequenziamento dell'amplicone. L'analisi dei profili di restrizione degli isolati con l'enzima BamHI ha evidenziato che i ceppi SP1, SP2 e Sard1 presentano *pattern* simili, e differenti da Ba-1; l'analisi con HindIII non ha evidenziato restrizione per nessun ceppo esaminato. L'analisi con BstEII sembra accomunare Sard1 a SP2 mentre con gli enzimi PstI, NotI e KpnI il ceppo sardo presenta un profilo caratteristico.

Conclusioni. La conferma della presenza del CpHV-1 anche in Sardegna e le caratteristiche del ceppo isolato, simile ma distinto dai restanti ceppi messi a confronto mettono in luce la necessità di proseguire nelle indagini ampliando il confronto tra più isolati. L'impatto economico derivante dai disturbi della sfera riproduttiva indotti dal virus necessita di un miglioramento delle conoscenze relative alla situazione epidemiologica esistente negli allevamenti caprini dell'Isola.

PRESENZA DI TORQUE TENO VIRUS (TTV) UMANO IN LATTE DI BUFALO (*BUBALUS BUBALIS*)

Sante Roperto (a), Orlando Paciello (a), Francesca Paolini (b), Ugo Pagnini (a), Valeria Russo (a), Franco Roperto (a), Aldo Venuti (b)

(a) *Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi Federico II, Napoli*

(b) *Laboratorio di Virologia, Istituto Nazionale Tumori Regina Elena, IRCCS, Roma*

Introduzione. Il *Torque Teno virus* è un virus a DNA isolato nel 1997 in Giappone da un paziente con epatite post-trasfusionale ad eziologia sconosciuta. I TTV sono composti da almeno 39 genotipi che indagini filogenetiche individuano in 5 gruppi principali (gruppi 1-5), oggi classificati nel genere *anellovirus*. DNA di TTV, oltre che nell'uomo, è stato amplificato in suini, bovini, cammelli, polli, pecore, cani e gatti. L'obiettivo del nostro lavoro è riportare l'alta incidenza di genotipi umani di TTV riscontrati nel latte di bufali (*Bubalus Bubalis*) e dare giusto rilievo al rischio dell'infezione virale attraverso la catena alimentare.

Metodi. 38 campioni di latte crudo e 15 di siero sono stati raccolti in 38 bufali sani scelti da 3 allevamenti di bufali della provincia di Caserta. Inoltre, 8 campioni di un *pool* di latte pastorizzato sono stati ottenuti da 4 allevamenti bufalini. Sono stati testati anche 5 campioni di mozzarella di cui 4 di provenienza commerciale ed uno preparato con latte contenente TTV.

Risultati. Tutti i campioni sono stati testati per la presenza di DNA di TTV attraverso PCR con set di *primer* dalla regione UTR del virus. I TTV sono stati individuati in 6 dei 38 campioni di latte (circa 16%), negativi sono risultati i campioni di siero, di mozzarelle e del *pool* di latte pastorizzato. La presenza di amplificati di 132-bp è stata poi confermata dal sequenziamento. Le sequenze hanno mostrato alta omologia (>95%) con i seguenti isolati umani: tth31 (2 casi), sle 1981, sle 2031, e NLC030 (2 casi).

Conclusioni. È la prima segnalazione della presenza di TTV nella catena alimentare, ciò fa supporre che gli alimenti possano svolgere un ruolo importante nella epidemiologia del *Torque Teno virus*, la cui modalità di trasmissione non è ancora chiara. Vi sono, tuttavia, opinioni contrastanti circa il ruolo del TTV come agente eziologico di malattia. Recentemente la potenziale pericolosità dei TTV ha destato particolare attenzione poiché i TTV sembrano essere coinvolti, anche se indirettamente, in eventi tumorali soprattutto attraverso una alterazione del sistema immunitario. Si ritiene, inoltre, che i TTV possano potenziare la patogenicità di altri agenti biologici. Il fatto che TTV siano stati trovati solo nel latte e non nel siero fa pensare che la presenza di questi virus sia conseguenza di una contaminazione umana degli alimenti piuttosto che il risultato di una vera infezione. Inoltre, la negatività dei campioni di mozzarella, e principalmente del campione preparato con latte contenente TTV, dimostra che le normali metodologie operative per la preparazione di questo prodotto appaiono sufficienti a rendere tale alimento sicuro, relativamente a questi virus, per il consumo umano.

VALIDAZIONE DI METODI *REAL-TIME* PCR PER LA DIAGNOSI SIMULTANEA DI ALCUNE ENCEFALOMIELITI VIRALI DEGLI EQUIDI

Marcello Sala (a), Antonella Cersini (a), Armando Damiani (b), Maria Teresa Scicluna (a), Giuseppe Manna (a), Valentina Spallucci (a), Andrea Caprioli (a), Maria Ilaria Ciabatti (a), Gian Luca Autorino (a)

(a) *Centro di Referenza per le Malattie degli Equini, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma*

(b) *Department of Veterinary Microbiology and Immunology, Cornell University, Ithaca, NY, USA*

Introduzione. Nell'ambito del progetto di ricerca finalizzata 2005 (art. 12 DLvo 502/92) sono stati messi a punto tre saggi metodi di *Real-Time* PCR, per la diagnosi virologica di encefalomieliti virali a rischio di diffusione negli equidi in Italia, selezionando nuovi *target* molecolari altamente conservati del Herpesvirus Equino tipo 1 (EHV-1, gene gE), del *Virus West Nile* (WNV, gene NS1 e NS2a) e del Bornavirus (BDV, gene M). Obiettivo del presente lavoro è stato la validazione di tali metodi per la ricerca simultanea e la diagnosi differenziale da impiegare nei laboratori nazionali nell'ambito delle attività di sorveglianza.

Metodi. È stato condotto un circuito di prova con 17 laboratori nazionali ed europei: sono state distribuite tre serie di 20 campioni di tessuto nervoso di cavallo, codificati in maniera univoca, che sono stati analizzati in cieco, in tre sedute indipendenti, mediante *Real-Time* PCR. Il *panel* era costituito da 10 campioni di riferimento negativi, 3 positivi per WNV, 4 positivi per EHV-1 e 3 positivi per BDV. Per ogni laboratorio è stata valutata l'accuratezza dei risultati. Sono state inoltre valutate la ripetibilità (*intra-laboratorio*) e la riproducibilità (*inter-laboratorio*) dei risultati forniti per singola diagnosi, (separatamente per WNV, EHV1, BDV) e complessiva per i tre virus, mediante calcolo della statistica Kappa. Sono stati considerati soddisfacenti valori di accuratezza pari al 100% e valori di Kappa >0,8, secondo il criterio di valutazione di Landis e Kock.

Risultati. 15 laboratori su 17 hanno mostrato accuratezza e ripetibilità pari al 100%, con un grado di accordo completo (Kappa=1) rispetto al valore di riferimento per singola diagnosi e per positività complessiva ad uno nei confronti dei 3 virus. 2 laboratori hanno invece mostrato problemi di minore accuratezza (<100%) per una o più diagnosi e valori di Kappa di ripetibilità <0,8 a causa di risultati falsamente positivi o falsamente negatividiscordanti. Nel complesso, i 17 laboratori inclusi nell'analisi di riproducibilità hanno fornito un elevato livello di accordo rispetto all'atteso (Kappa multiplo >0,96), sia per le singole diagnosi considerate separatamente sia per la positività complessiva ad uno dei 3 virus.

Conclusioni. I risultati ottenuti hanno evidenziato elevate sensibilità e specificità diagnostiche dei metodi *Real-Time* PCR impiegatissimi a punto per la ricerca simultanea del genoma dei genomi di WNV, EHV-1 e BDV. I risultati in termini di accuratezza, ripetibilità e riproducibilità ne hanno consentito la validazione secondo i criteri definiti dall'OIE. La precisione di tali metodi costituisce una caratteristica prefigurandone pertanto un possibile impiego fondamentale ai fini del loro impiego nell'ambito dell'attività di sorveglianza.

VALIDAZIONE KIT DIAGNOSTICO ID SCREEN, WEST NILE COMPETITION, ID-VET INNOVATIVE DIAGNOSTICS

Giovanni Savini, Liana Deodori, Alessandra Leone, Rossella Lelli
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise G. Caporale, Teramo

Introduzione. A seguito del focolaio di *West Nile* (WN) verificatosi in Italia lo scorso anno, i laboratori nazionali autorizzati all'esecuzione della prova sierologica hanno impiegato diversi kit ELISA, tra cui ID SCREEN della ID-VET come prova di *screening* per delimitare l'area di infezione. Per armonizzare i risultati e comprendere il significato di un esito positivo o negativo, sono stati comparati i risultati dell'ID SCREEN con quelli della Sieroneutralizzazione (SN), test ufficiale dell'OIE e quindi considerato come *gold standard*.

Metodi. L'ID SCREEN è un ELISA competitivo disegnato per rilevare anticorpi nei confronti del virus della WN. Il kit è stato testato su un totale di 477 sieri equini (n=410) e bovini (n=67) originari delle aree interessate dal focolaio di WN. I risultati sono stati comparati con quelli ottenuti con saggio di SN in micrometodo. Sono stati calcolati la specificità, la sensibilità, la concordanza, i valori predittivi negativo e positivo ed il coefficiente Kappa di Cohen. Per avere ulteriori dati sulla specificità, il kit è stato saggiato su diluizioni scalari dei due sieri positivi di controllo per il virus WN e per il virus dell'*Usutu*. Per entrambi il titolo neutralizzante era di 1:80.

Risultati. Il kit ID SCREEN ha ottenuto risultati concordanti con quelli della SN in 395 campioni (277 positivi e 118 negativi) mentre ha differito in 52 occasioni (concordanza osservata =88,4%, IC95%: 85,1-91,0%). La sensibilità rilevata è stata pari al 100% (IC95%: 98,9-100%) mentre la specificità è stata di 69,4% (IC95%: 62,1-75,8%). Il valore predittivo positivo riscontrato per il kit ID-VET è stato di 84,2% (IC95%: 79,8-87,7%) mentre quello negativo rilevato è stato di 100% (IC95%: 97,5-100%). L'indice Kappa che determina il livello di concordanza dei due test è risultato essere di 73,8%. Le diluizioni scalari di entrambi i sieri di controllo hanno dato valori positivi fino alla diluizione 1:40 (WN) e 1:160 (*Usutu*).

Conclusioni. Nonostante i due test abbiano dimostrato un livello di concordanza "sostanziale", ad un'elevata sensibilità ha fatto riscontro una bassa specificità del kit in studio. La SN è stata infatti in grado di confermare solo 277 dei 352 campioni risultati positivi all'ID SCREEN mentre tutti i campioni negativi sono stati confermati come negativi. Il valore basso di specificità è con ogni probabilità dovuto alla capacità del monoclonale usato per la competizione di legarsi ad un epitopo comune ai virus del gruppo encefalite giapponese che include il virus dell'*Usutu*, virus che ha circolato in quella zona non è da escludere inoltre che provenendo i sieri da una zona dove il focolaio è attivo, alcuni di questi potrebbero essere stati in corso di sierconversione e quindi già positivi in ELISA e non ancora in SN. Considerando l'elevata sensibilità ed il valore predittivo negativo rilevati è possibile concludere che l'ID SCREEN è un ottimo kit specie se usato come test di *screening*.

INFEZIONE TRANSPLOCENTARE DI ALCUNI CEPPI DEL VIRUS DELLA *BLUETONGUE*

Giovanni Savini, Cosimo Paladini, Alessandra Leone, Liana Teodori, Paolo Migliaccio, Rossella Lelli, Federica Monaco

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise G. Caporale, Teramo

Introduzione. Uno dei problemi che maggiormente affligge il mercato bovino europeo è quello della trasmissione transplacentare del Virus della *Bluetongue* (BTV). Questo è un fenomeno che oltre a limitare il commercio di animali vivi può essere importante nel processo di endemizzazione della *Bluetongue* nei Paesi europei permettendo al virus di passare incolume l'inverno all'interno del feto. È un evento dimostrato per il ceppo Nord europeo del sierotipo 8 (BTV8) che è stato più volte isolato da vitelli appena nati. Sebbene siano stati osservati diversi casi tuttavia non si riesce ancora a capire l'importanza epidemiologica dell'evento né se è un fenomeno limitato al sierotipo 8 o coinvolge altri sierotipi circolanti in Europa. Questo studio retrospettivo sulla presenza di ceppi di *Bluetongue* in organi fetali aggiunge un altro tassello per la comprensione dell'infezione transplacentare del BTV.

Materiali e metodi. Durante le campagne vaccinali per *Bluetongue* degli anni 2002-2004 sono stati analizzati, per l'isolamento di BTV, 1264 aborti ovini, bovini, caprini e bufalini nati da madri vaccinate con i ceppi vivi attenuati BTV2 e BTV9. Sono stati in tutto esaminati milza e/o cervello di 663 feti ovini, 429 bovini, 155 caprini e 17 bufalini. Sono state analizzate variabili quali il periodo di gestazione al momento della vaccinazione, la specie, il sierotipo vaccinale isolato, gli organi fetali esaminati, il tempo intercorso tra la vaccinazione e l'aborto. È stato anche considerato dopo quanto tempo dalla vaccinazione si è riusciti ad isolare il BTV dal feto.

Risultati. Ceppi vaccinali di BTV sono stati isolati da 31 dei 1.264 (2,4%; IC95%: 1,7-3,4%) feti esaminati. Di questi 24 (3,6%; IC95%: 2,4-5,3%) sono stati isolati da organi fetali ovini, 6 (1,4%; IC95%: 0,6-3,0%) da quelli bovini e uno (0,6%; IC95%: 0,2-3,5%) dalla milza di un aborto di capra. Sebbene il cervello sia stato l'organo (n=14) da dove è stato più frequentemente isolato BTV, non è stata riscontrata alcuna differenza significativa ($P>0,05$) tra gli isolamenti realizzati da quest'organo e quelli dalla milza (n=6) di uno stesso aborto. Dei 31 ceppi isolati, il sierotipo 9 (n=28) è stato quello più frequentemente ($P<0,05$) isolato rispetto al sierotipo 2 (n=3). Tre ceppi vaccinali sono stati isolati da organi fetali ovini dopo oltre 2 mesi dalla vaccinazione.

Conclusioni. In questa indagine ceppi attenuati di BTV2 e BTV9 sono stati in grado di oltrepassare la barriera placentare. Dei due, BTV9 è stato quello più frequentemente rilevato. Similmente a quanto riportato per il BTV8, il fenomeno, che ha interessato bovini, ovini e caprini, sembra influenzare, quanto meno negli ovini, i normali periodi infettivi conosciuti per questa specie. I ceppi vaccinali sono stati infatti isolati dopo ben 72 giorni dalla vaccinazione.

IL BUFALO DOMESTICO (*BUBALUS BUBALIS*) HA UN RUOLO EPIDEMIOLOGICO NELL'INFEZIONE DA BOVINE HERPESVIRUS 1 (BOHV-1)?

Maria Teresa Scicluna, Andrea Caprioli, Giuseppe Manna, Giorgio Saralli, Giampaolo Bruni, Antonino Barone, Elena Letizia, Renato Condoleo, Gian Luca Autorino
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

Attualmente il bovino è considerato l'unico serbatoio del BoHV-1, virus responsabile della Rinotracheite Infettiva (IBR). Anche per tale motivo, la maggior parte dei piani di controllo per il virus sono diretti verso questa specie. Le informazioni sulla recettività del bufalo domestico nei confronti di questo virus sono invece limitate, mentre non vi sono descrizioni circa la patogenicità del virus e riguardanti il ruolo epidemiologico di tale specie. Questo studio descrive i risultati di un'infezione sperimentale condotta inoculando per via intranasale 6 bufali sieronegativi di 5 mesi di età con una dose di 10^6 TCID₅₀ di un ceppo di BoHV-1.1, isolato in un allevamento di bovini da carne affetta da IBR. Per verificare l'eventuale stato di latenza virale, 69 giorni Post-Infezione (PI), è stata indotta un'immunosoppressione farmacologica. Tutti i soggetti sono stati valutati clinicamente durante i periodi PI e Post-Immunosoppressione (PIS) e sottoposti a tamponi nasali e rettali, prelievi di siero, plasma e leucociti e, al termine della sperimentazione, dei gangli del trigemino e delle tonsille.

In nessun animale sono stati osservati sintomi riferibili ad infezione da BoHV-1. Come test sierologici sono stati impiegati tecniche ELISA *blocking* gB e gE (Idexx) e la virusneutralizzazione. Tutti gli animali hanno sierconvertito tra il giorno 9 e 20 PI. Per le indagini virologiche, eseguite su tamponi, leucociti e gangli, è stata impiegata una *Real-Time* PCR diretta ad identificare una regione del genoma, altamente conservata in tutti gli *alphaherpesvirus* dei ruminanti, codificante la glicoproteina B. Tutti gli animali sono risultati PCR positivi almeno una volta tra il giorno 3 e 14 PI ai tamponi nasali e, in alcuni casi, ai tamponi rettali. I leucociti, i campioni prelevati PIS e le tonsille sono risultati invece negativi, nonostante che, 137 giorni PIS, in tre animali sia stata rilevata presenza del genoma virale nei gangli del trigemino.

Il bufalo si dimostra quindi suscettibile all'infezione da BoHV-1, anche se in forma apparentemente subclinica ed in grado di eliminare il virus attraverso le secrezioni nasali e fecali. Nonostante non sia stata osservata una riattivazione virale in seguito ai tentativi di indurre immunosoppressione, la presenza del genoma virale accertata nei gangli del trigemino confermerebbe l'instaurarsi, anche nel bufalo, dello stato di latenza virale.

Sulla base di tali risultati e anche in considerazione di precedenti evidenze sierologiche, i piani di controllo nei confronti delle infezioni da BoHV-1, dovrebbero considerare il bufalo tra i possibili fattori di rischio.

IDENTIFICAZIONE DI NOROVIRUS IN MOLLUSCHI BIVALVI VENDUTI AL DETTAGLIO

Valentina Terio, Vito Martella, Paschalina Moschidou, Pietro Di Pinto, Canio Buonavoglia, Giuseppina Tantillo

Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Bari

Introduzione. I Norovirus (NoV), famiglia *Caliciviridae*, sono piccoli virus privi di envelope, a singolo filamento di RNA. I NoV sono importanti enteropatogeni umani, trasmessi per contatto diretto o mediante alimenti contaminati. I NoV sono molto variabili geneticamente e la loro classificazione è controversa. Nell'uomo sono stati identificati molti genotipi e innumerevoli varianti appartenenti ai genogruppi GI, GII e GIV. La maggior parte (90%) dei ceppi identificati fanno parte del genogruppo GII. I molluschi bivalvi, essendo organismi filtratori, costituiscono un'importante fonte di trasmissione di patogeni enterici, soprattutto quando allevati o pescati in acque contaminate da reflui urbani. L'obiettivo del nostro lavoro è stato quello di ricercare i NoV nei molluschi bivalvi venduti al dettaglio, raccolti in diverse tipologie di punti vendita, quali ipermercati, pescherie e mercati ittici.

Metodi. Sono stati raccolti 116 campioni di molluschi bivalvi: 95 esemplari di *Mytilus galloprovincialis*, 11 di *Venerupis decussata* e 10 di *Ostrea edulis*. L'estrazione dell'RNA virale è stata ottenuta mediante l'utilizzo del metodo GPTT. La retrotrascrizione dell'RNA virale e la successiva amplificazione del cDNA è stata condotta in unico *step* utilizzando la coppia di *primer* specifici per GII NoV, NVp110 e NV-4611, mentre la *nested* PCR è stata effettuata usando i *primer* NVp110 and NI. I prodotti della *eminested*-PCR sono stati sequenziati.

Risultati. Un totale di 14/116 campioni (12,06%) sono risultati positivi. La percentuale di positività è risultata pari a 8,1% (5/62) per i campioni raccolti dagli ipermercati, per quelli raccolti dalle pescherie 16,2% (6/37) e 17,6% (3/17) per quelli raccolti dai mercati ittici. Dodici campioni sono stati sequenziali. Di questi 8 sono risultati analoghi (identità 100% nt) al ceppo GII.b/Hilversum e 4 sono risultati analoghi al virus GII.4/2004.

Discussione. I dati ottenuti in questo studio dimostrano che i NoV sono presenti in molluschi bivalvi sottoposti a depurazione a norma di legge pronti per la vendita al dettaglio. La positività riscontrata nelle diverse tipologie di punti vendita sembra rivelare una maggiore efficienza dei sistemi di controllo e di garanzia della sicurezza alimentare per i molluschi bivalvi nella grande distribuzione. Nei molluschi sono stati identificati stipiti NoV analoghi a quelli epidemici, nello stesso periodo, in Italia ed Europa. I ceppi GII.b/Hilversum e GII.4/2004 sono infatti tuttora circolanti in Italia, come evidenziato da studi in popolazioni pediatriche. La presenza di NoV nei molluschi bivalvi può condizionare l'epidemiologia di tali enteropatogeni in funzione delle abitudini alimentari, specie nelle popolazioni che consumano molluschi crudi o poco cotti.

INASPETTATA ALTA RESISTENZA DI VIRUS INFLUENZALI AVIARI SOTTOTIPO H7 AD ALTA A E BASSA PATOGENICITÀ A SEGUITO DI ESPOSIZIONE A 37°C

Calogero Terregino (a), Maria Serena Beato (a), Elena Bertoli (a), Marzia Mancin (b), Ilaria Capua (a)

(a) *Laboratorio di Referenza OIE/FAO per l'Influenza Aviaria e la Malattia di Newcastle, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

(b) *Struttura Complessa Analisi del Rischio e Sistemi di Sorveglianza in Sanità Pubblica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

Introduzione. I numerosi focolai di influenza aviaria registrati nel mondo hanno sottolineato l'assenza di diversi dati scientifici per questa malattia. Tra questi la resistenza ambientale ed in particolare alla temperatura è stata studiata nell'ambito del progetto Europeo "FLURESIST" per i virus di sottotipo H7. La diffusione dell'infezione nel pollame domestico di virus influenzali aviari classificati come notificabili dall'OIE (NAI) è legata a fattori quali lo spostamento di animali, materiali, personale e veicoli contaminati. Tra i parametri in grado di influenzare la diffusione di un virus epidemico si deve quindi considerare la sua resistenza ambientale. La conoscenza di tale caratteristica è utile per adattare le strategie di controllo e profilassi delle infezioni da virus influenzali. Scopo di tale lavoro è studiare la resistenza alla temperatura di 37°C di alcuni virus sottotipo H7 isolati durante le diverse epidemie italiane dal 1999 al 2004.

Metodi. I virus: A/Turkey/Italy/4580/99 (H7N1, HPAI); A/Turkey/Italy/1387/00 (H7N1, HPAI); A/Turkey/Italy/3675/99 (H7N1, LPAI); A/Turkey/Italy/4608/03 (H7N3, LPAI) sono stato esposti a 37°C in termoblocco per 15 giorni e ad intervalli di tempo di 6, 12, 24, 48 ore post esposizione e successivamente ogni 24 è stata valutata la residua vitalità del virus e calcolata la dose infettante 50 (EID₅₀) in uova embrionate di pollo SPF. A ogni intervallo di tempo sono state analizzate tre aliquote da 1 ml ciascuna, di ogni virus. Dall'analisi statistica dei dati generati è stato possibile disegnare delle curve di sopravvivenza di ogni ceppo virale.

Risultati. Dopo 15 giorni post esposizione l'inattivazione virale non è stata raggiunta per entrambi i virus HPAI e per il virus H7N1, LPAI. Solo per il virus LPAI H7N3 è stato completamente inattivato dopo 11 giorni. La comparazione delle curve di sopravvivenza mostra che il virus H7N3 LPAI è il meno resistente quando esposto a 37°C seguito rispettivamente dai virus H7N1 HPAI 1387/00 e 4580/99, il virus H7N1 LPAI è risultato il più resistente. L'analisi statistica ha mostrato che la resistenza di ogni virus è dipendente dal periodo di incubazione e dalle caratteristiche tipiche del ceppo virale in esame.

Conclusioni. L'alta resistenza di alcuni virus responsabili delle passate epidemie italiane potrebbe aver giocato un ruolo determinante nell'alta diffusione dell'infezione in alcune aree avicole. L'aggiornamento dei dati sulla resistenza dei virus NAI può essere utile per stabilire appropriate linee guida di biosicurezza.

P CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI UN NUOVO ASTROVIRUS ASSOCIATO A DIARREA NEL CANE

Anna Toffan (a), Cristian De Battisti (a), Christine Monceyron Jonassen (b), Eliana Schiavon (a), Alice Fusaro (a), Ilaria Capua (a), Giovanni Cattoli (a)

(a) *Laboratorio di Referenza OIE/FAO per l'Influenza Aviaria e la Malattia di Newcastle, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

(b) *Center for Laboratory Medicine, Akershus University Hospital, N-1478 Lørenskog, Norway*

Introduzione. Gli astrovirus sono piccoli virus (28-30 nm) a RNA appartenenti alla famiglia *Astroviridae*. Questi virus sono stati descritti in numerose specie animali e associati frequentemente ad episodi di diarrea, specialmente in animali giovani. Nel cane, particelle virali assimilabili morfologicamente ad astrovirus sono state descritte sporadicamente, ma la loro identificazione non è mai stata confermata e nulla si sa circa l'epidemiologia e la patogenesi di questa infezione nella specie canina. Nel presente studio, si conferma per la prima volta la presenza di astrovirus in feci di cani con sintomatologia enterica e si descrivono alcune importanti caratteristiche genetiche.

Metodi. Campioni di feci provenienti da 11 cuccioli di cane manifestanti segni di diarrea acuta sono stati sottoposti ad indagini microbiologiche e di Microscopia Elettronica (ME). Quattro campioni sono risultati positivi in ME per particelle virali riferibili ad astrovirus. Su questi campioni si sono eseguite ulteriori indagini molecolari mediante RT-PCR e sequenziamento genetico.

Risultati. La sequenza genetica totale di ORF2 (2443 nt), codificante per la proteina del capsido, e la sequenza parziale di ORF1b (346 nt), codificante per la polimerasi virale, hanno permesso di identificare le particelle virale presente nei campioni come virus appartenenti al genere mamastrovirus, famiglia *Astroviridae*. Filogeneticamente, le sequenze formano un gruppo distinto dalle altre sequenze di astrovirus descritte in mammiferi, con una similarità a livello nucleotidico del 22% con HAstV-1 (ORF2). Particolarità genetiche distintive caratterizzavano le sequenze virali oggetto dello studio.

Conclusioni. Sulla base dei dati ottenuti nel presente lavoro e sulla definizione di specie assegnata alla tassonomia degli astrovirus, si suggerisce l'inclusione nel genere mamastrovirus di una nuova specie virale, *Canine Astrovirus* (CAstV).

VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'ATTIVITÀ ANTIVIRALE DELL'EICAR NEI CONFRONTI DEL VIRUS DEL CIMURRO CANINO

Francesca Vaccari (a), Fabiana Dal Pozzo (b), Viola Galligioni (a), Laura Gallina (a), Mara Battilani (a), Alessandra Scagliarini (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università degli Studi, Ozzano Emilia, Bologna*

(b) *Virologie et Pathologie des Maladie Virales Animales, Faculté de Médecine Vétérinaire, Liège, Belgique*

Il cimurro canino è un'infezione altamente contagiosa che colpisce i canidi domestici e selvatici. La malattia è caratterizzata da un'infezione sistemica con elevati tassi di letalità nei soggetti che non presentano un'adeguata risposta immunitaria protettiva. Sebbene la malattia sia controllata con vaccino vivo attenuato, focolai di cimurro vengono ancora riportati in tutto il mondo. Al momento non sono disponibili farmaci per la terapia antivirale nonostante ci sia una domanda crescente da parte dei veterinari e dei proprietari. Un pre-requisito per l'identificazione e il disegno razionale di molecole antivirali, è la conoscenza del ciclo biologico del virus. Le molecole antivirali possono inibire l'entrata del virus nelle cellule o interferire con il ciclo virale. Il complesso replicativo del *paramyxovirus* rappresenta un *target* ideale per lo sviluppo di molecole antivirali visto che, nei mammiferi, non è noto, alcun omologo della RNA polimerasi-RNA dipendente (RdRp) virale. Nonostante l'importante ruolo svolto dal complesso RdRp nella replicazione virale del *paramyxovirus*, le conoscenze sul suo funzionamento in tutte le specie virali, appartenenti alla famiglia, sono ancora scarse. Diversi composti sono stati sintetizzati per interferire con la RdRp, ma non è stato ancora condotto nessun *trial* clinico. L'analogo nucleosidico 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Ribavirin, RBV) è l'unica molecola disponibile in commercio con una ben nota attività antivirale nei confronti di diversi membri della Famiglia *Paramyxoviridae*. Tale molecola ha già dimostrato la propria efficacia *in vitro* nei confronti del CDV e studi sul meccanismo di azione indicano che la RBV è attiva nelle fasi precoci di infezione andando ad interagire con la formazione del complesso replicativo del virus. Nonostante la sua attività, l'indice di selettività della molecola è risultato basso facendo ipotizzare altri meccanismi di azione in grado di interferire con i meccanismi replicativi delle cellule. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'efficacia antivirale *in vitro* di 5-etinil-1- β -D ribofuranosilimidazole-4-carboxamide (EICAR) e comparare la sua attività con quella della RBV. L'EICAR ha dimostrato un elevato effetto inibente sulla replicazione del virus del cimurro su cellule Vero, con una IC_{50} di $4,6 \pm 0,3$ μ g/mL contro la IC_{50} $25,5 \pm 2,1$ μ g/mL della RBV. Analogamente alla RBV, l'EICAR ha esibito un'attività antivirale tempo e concentrazione dipendente rilevabile nelle prime 10 ore post-infezione. Anche l'EICAR ha dimostrato un'inversione dell'attività antivirale dopo l'aggiunta di guanosina, suggerendo un meccanismo di azione simile a quello della RBV che si esplica, tra gli altri, con l'inibizione dell'enzima Inosina Monofosfato Deidrogenasi (IMPDH).

VALIDAZIONE DI UN TEST ELISA DI TIPO COMPETITIVO PER LA DIAGNOSI RAPIDA DI INFLUENZA AVIARIA BASATO SULL'UTILIZZO DI ANTICORPI MONOCLONALI DIRETTI CONTRO LA NUCLEOPROTEINA (NP) DEL VIRUS INFLUENZALE AVIARE

Elisabetta Viale (a), Michela Rigoni (a), Marzia Mancin (b), William Dundon (a), Valeria Brasola (a), Calogero Terregino (a), Ilaria Capua (a)

(a) *Laboratorio di Referenza OIE/FAO per l'Influenza Aviaria e la Malattia di Newcastle, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

(b) *Struttura Complessa Analisi del Rischio e Sistemi di Sorveglianza in Sanità Pubblica Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

Introduzione. Diffusa in molte parti del mondo, l'Influenza Aviaria (IA) rappresenta attualmente una seria minaccia per gli allevamenti avicoli dal notevole impatto sanitario ed economico. L'utilizzo di metodiche sierologiche rapide e di facile applicazione, quali l'ELISA, si dimostrano di estrema utilità per potere processare un elevato numero di campioni in tempi brevi. Nel presente lavoro è stato sviluppato e validato un test ELISA di tipo competitivo (c-ELISA), per la ricerca di anticorpi contro il virus dell'IA nel siero di differenti specie avicole.

Materiali e metodi. L'anticorpo monoclonale, diretto contro la NP, è stato prodotto in seguito ad immunizzazione di topi Balb-c con il virus A/chicken/Yamaguchi/07/05 (H5N1 HPAI). L'ibridoma ottenuto dalla fusione tra cellule di mieloma (SpO2/Ag14) e i linfociti dei topi immunizzati è stato clonato attraverso una serie di passaggi in diluizione limite e caratterizzato mediante ELISA indiretta, immunofluorescenza e *Western Blot*. L'anticorpo prodotto è stato quindi purificato e coniugato con l'enzima perossidasi (HRP) per essere poi impiegato nella messa a punto dell'ELISA. La validazione del test è stata condotta analizzando un totale di 1.354 sieri (662 positivi e 692 negativi) appartenenti a 5 differenti specie aviarie: anatra, pollo, tacchino, struzzo e quaglia. I sieri utilizzati sono stati analizzati mediante HI e, ad eccezione dei sieri di anatra, mediante AGID, quali metodiche standard di riferimento, secondo le linee guida dell'OIE e dell'UE.

Risultati. Il test c-ELISA ha presentato un grado di concordanza con il *gold standard* (HI) del 99,3%, con valori di Sensibilità (Se) e Specificità (Sp) per quattro delle cinque specie analizzate (pollo, tacchino, anatra, struzzo) compresi tra 95,21% e 100% e tra 93,59% e 100% rispettivamente. Per i sieri di quaglia il test ha presentato inaspettatamente una sensibilità estremamente bassa per cui non è stato giudicato utilizzabile per questa specie.

Discussione e conclusioni. Il test ELISA sviluppato nel presente lavoro può rappresentare un valido e rapido strumento per lo *screening* dell'influenza nelle principali specie avicole. Questo studio ha inoltre evidenziato l'importanza di una validazione ad ampio spettro dei test utilizzati per la diagnosi di laboratorio di malattie infettive altamente diffuse in quanto l'efficienza può variare notevolmente a seconda della specie analizzata.

P PARVOVIROSI CANINA COME MODELLO DI STUDIO PER LA VALUTAZIONE DELLA PROCALCITONINA QUALE MARKER DI FLOGOSI

Paolo Vigo (a), Silvia Zacchini (b), Mara Battilani (a), Massimo Giunti (b), Angelo Peli (b)
(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università degli Studi, Bologna*
(b) *Dipartimento Clinico Veterinario, Università degli Studi, Bologna*

La parvovirosi canina è una malattia infettiva virale sostenuta dal Parvovirus Canino di tipo 2 (CPV-2) che colpisce generalmente i cuccioli tra le 6 settimane ed i 6 mesi di età. Tipicamente si manifesta con gravi sintomi gastro-enterici accompagnati da uno stato di immunodepressione e, in molti soggetti, si realizza una Sindrome da Risposta Infiammatoria Sistemica (SIRS), meno evidente dal punto di vista clinico. Tale acronimo si riferisce alla manifestazione clinica dell'attivazione sistemica della risposta immunitaria innata e, in particolare, viene definita Sepsis se prende origine da un insulto di natura infettiva. Data la notevole predisposizione a complicazioni settiche secondarie all'alterazione della mucosa intestinale indotta dal virus, la parvovirosi canina può essere considerata un modello di studio di Sepsis ad insorgenza spontanea.

Ad oggi manca una reale *gold standard* per la diagnosi di Sepsis; vista la parziale conoscenza dei meccanismi patogenetici di tale condizione, i parametri clinici proposti per la diagnosi risultano spesso inaccurati e aspecifici. Per questo motivo si è deciso di valutare altri elementi che meglio riflettono la risposta dell'ospite, quali variabili infiammatorie ed emodinamiche. In questo contesto ha trovato una crescente applicazione l'utilizzo di *biomarker*, ossia fattori misurabili nel sangue o in campioni biologici, in grado di identificare la patologia in oggetto.

Tra i *biomarker* di maggior interesse vi è indubbiamente la Procalcitonina (PCT), che rappresenta un marker circolante di Sepsis ampiamente riconosciuto in Medicina Umana. La PCT viene normalmente sintetizzata dalle cellule C della tiroide, come proormone della calcitonina, in seguito alla trascrizione del gene CALC-I. L'espressione di quest'ultimo è stata riscontrata, a livello extratiroideo, in alcuni modelli animali di Sepsis. L'obiettivo principale del nostro lavoro è stato quello di verificare, in via preliminare, se tale gene venga espresso in tessuti diversi dalla tiroide anche nella specie canina, data la mancanza di studi al riguardo. A tale proposito si è deciso di valutare l'espressione genica del suddetto marker in tessuti di cani affetti da parvovirosi, attraverso la messa a punto di una metodica di *Real-Time* PCR.

Inoltre, grazie alla collaborazione con l'università della Pennsylvania, sono stati analizzati tessuti provenienti da soggetti sani. I risultati ottenuti mostrano che CALC-I viene espresso in sede extra-tiroidea e in più organi. Nei soggetti sani la positività per l'espressione genica è stata riscontrata solo nella tiroide. Questo riscontro potrebbe suggerire l'utilizzo della procalcitonina come valido marker per la diagnosi di SIRS/Sepsis.

INDICE DEGLI AUTORI

Acutis P.; 79
Agrimi U.; 23; 32; 49; 78
Amorisco F.; 75
Andrenacci G.; 46
Angiolillo S.; 79
Antognini E.; 17
Aprea G.; 35
Armenise C.; 24
Astarita S.; 35
Aste G.; 47
Attene S.; 66
Autorino G.L.; 63; 91; 94
Azzi A.; 33; 54
Balboni A.; 13
Baldi L.; 15
Barbieri I.; 14; 28; 30
Barca L.; 15
Barchiesi F.; 17
Barigazzi G.; 16
Barocci S.; 17
Barone A.; 94
Bartolini C.; 17
Battilani M.; 13; 98; 100
Bazzucchi M.; 56
Beato M.S.; 96
Bellacicco A.L.; 24; 71
Bergallo M.; 87
Bertoli E.; 96
Bertolotti L.; 18
Bessi O.; 57
Bianchi E.; 84
Bignami G.; 34
Biosa T.; 79
Blasi M.; 32
Boari A.; 47
Bombardelli E.; 59
Bonfanti L.; 20; 39; 57
Boniotti M.B.; 53; 62
Botti G.; 30
Bozzetta E.; 22
Brandi S.; 35
Brasola V.; 99
Briscolini S.; 17; 77
Brivio R.; 62
Brocchi E.; 14; 63; 74
Bronzo V.; 65
Brown P.; 31; 85
Bruni G.; 94
Bucalossi C.; 23
Buonavoglia C.; 24; 27; 64; 69; 71; 75;
76; 80; 95
Buonavoglia D.; 76
Cabras P.; 89
Cacia A.; 83
Cagiola M.; 58
Calandri E.; 17
Calistri P.; 57
Camero M.; 24; 71
Campagna D.; 14
Campitelli L.; 25
Campolo M.; 27; 69; 75
Cancedda M.G.; 66; 72
Canelli E.; 28; 63; 74
Cannella V.; 29
Capelli G.; 37
Capello K.; 20
Caprioli A.; 44; 91; 94
Capua I.; 25; 33; 36; 37; 39; 54; 73; 96;
97; 99
Capucci L.; 14; 30; 53; 62
Careddu M.E.; 22
Carra E.; 30
Carta A.; 66
Casalone C.; 49
Casciari C.; 56
Cassone A.; 71
Castellini L.; 43
Castilla J.; 23
Catelli E.; 31; 84; 85
Cattoli G.; 37; 73; 97
Cavadini P.; 30
Cavalli A.; 64
Cavallo R.; 87
Cecchinato M.; 20; 31; 84; 85

Ceci C.; 51; 52
 Centorbi R.; 87
 Cerioli M.; 30; 62
 Cersini, A.; 91
 Chiappini B.; 23; 32
 Chiapponi C.; 16; 25
 Chiocchetti R.; 72
 Ciabatti, M.I.; 91
 Ciabrone L.; 83
 Ciaravino G.; 32
 Cilloni F.; 33; 54
 Cirone F.; 27; 76
 Ciulli S.; 34; 59
 Clausi V.; 33; 54
 Clavenzani P.; 72
 Colaianni M.L.; 27
 Condoleo R.; 94
 Conte M.; 23; 32
 Conterbia M.; 79
 Cordioli P.; 3; 28; 57; 63; 69; 74
 Cortese S.; 83
 Cosseddu G.M.; 23
 Costa C.; 87
 Costarelli S.; 38
 Cotti C.; 39
 Cozzi B.; 49
 Curina G.; 58
 D'Abramo M.; 80
 D'Agostino C.; 23; 78
 Dal Pozzo F.; 59; 98
 D'Alessio N.; 35
 Damiani, A.; 91
 Danesi P.; 37
 De Battisti C.; 97
 De Benedictis P.; 36; 37
 De Curtis M.; 38
 De Giuseppe A.; 56; 58
 De Grazia S.; 64
 De Marco M.A.; 25; 39; 54
 De Mia G.M.; 68
 Decaro N.; 27; 46; 69; 76
 Dei Giudici S.; 18; 60; 81
 Dell'Anna S.; 41
 Delogu M.; 25; 39; 54
 Demontis F.; 72
 Deodori L.; 92
 Desario C.; 27; 46; 80
 Di Bari M.A.; 23; 78
 Di Bartolo I.; 43; 44; 45
 Di Francesco C.E.; 46; 47; 49; 51; 52
 Di Francesco D.; 47
 Di Guardo G.; 49; 72
 Di Marco P.; 29
 Di Martino B.; 46; 47; 51; 52
 Di Pinto P.; 95
 Di Prisco F.; 35
 Di Profio F.; 52
 Di Sarno A.; 15; 27; 35
 Di Trani L.; 39; 54
 Donatelli I.; 25; 39
 Donati C.; 53
 Donati D.; 17
 Drago A.; 37
 Dundon W.; 99
 Duranti A.; 17
 Elia G.; 76
 Esposito E.; 32
 Faccenda L.; 38
 Faccenda M.; 22
 Facchini M.; 25
 Falchieri M.; 84
 Falcone E.; 54
 Farneti S.; 56
 Fazzi P.; 78
 Feliziani F.; 56; 58; 68
 Ferraro A.; 15
 Ferri G.; 57
 Fiumana E.; 39
 Foni E.; 16; 25
 Fontana G.; 59
 Forletta R.; 86
 Forster F.; 49
 Forti K.; 58
 Fortunati, M.; 77
 Fossi M.C.; 49
 Frasnelli M.; 39
 Frassanito P.; 78
 Frigerio M.; 65
 Fusaro A.; 73; 97
 Galiero G.; 35
 Galletti E.; 59
 Galletti G.; 41

Galligioni V.; 59; 98
 Gallina L.; 59; 98
 Gavaudan S.; 17
 Gelmetti D.; 30
 Gentile A.; 71
 Giannecchini S.; 33; 54
 Gibelli L.; 30
 Gioia L.; 72
 Giunti M.; 100
 Greco G.; 76
 Greco M.F.; 80
 Grego E.; 18; 60
 Grodzki M.; 34
 Guarino A.; 15
 Guercio A.; 28; 29
 Guglielmetti C.; 79
 Iannone R.; 35
 Inglese N.; 44
 Iori A.; 30
 Iovane G.; 35
 Iscaro C.; 68
 Jimenez-Clavero M.A.; 63
 Juganaru M.; 61; 81
 Kennedy S.; 49
 Kobal F.; 22
 Lalatta-Costerbosa G.; 72
 Lavazza A.; 3; 53; 62; 69; 75
 Lelli D.; 28; 63; 74
 Lelli R.; 5; 57; 92; 93
 Leone A.; 92; 93
 Letizia E.; 94
 Ligios C.; 66; 72
 Lorenzetto M.; 20
 Lorusso A.; 64; 69
 Lorusso E.; 64; 75; 76; 80
 Lucchini B.; 65
 Lucente M.S.; 27; 76
 Lupini C.; 31; 84; 85
 Luzzago C.; 65
 Madau L.; 66
 Madonna R.; 22
 Maestrale C.; 66
 Mancin M.; 96; 99
 Mancini P.; 17
 Mandola M.L.; 87
 Mandrioli L.; 34
 Manna G.; 91; 94
 Manuali E.; 68
 Marangon S.; 20; 37
 Marciano S.; 36
 Marcon S.; 32; 78
 Maresca C.; 38
 Mari V.; 27; 69; 80
 Mariani U.; 35
 Marinaro M.; 24; 71
 Marini C.; 56; 58
 Marruchella G.; 49; 72
 Marsili L.; 49
 Marsilio F.; 46; 47; 49; 51; 52
 Martella V.; 64; 75; 76; 80; 95
 Martelli F.; 44
 Masoero L.; 79
 Massirio I.; 46
 Mazzariol S.; 49
 Mazzolini E.; 37
 Mazzone P.; 58
 Meini A.; 84
 Micci E.; 17
 Migliaccio P.; 93
 Miglionico M.; 52
 Mignone W.; 49
 Mira F.; 29
 Monaco F.; 5; 93
 Monceyron Jonassen C.; 97
 Monne I.; 73
 Montarsi F.; 37
 Montesano M.; 22
 Moreno A.; 25; 28; 63; 74
 Moschidou P.; 64; 75; 76; 95
 Murtino A.P.; 18; 81; 89
 Musella C.; 22
 Mutinelli F.; 36
 Narcisi D.; 24
 Nava D.; 15; 27
 Naylor C.J.; 31; 85
 Nenci M.; 54
 Nonno R.; 6; 23; 32; 78
 Oggiano A.; 89
 Ostanello F.; 43; 44; 45
 Paciello O.; 90
 Pagnini U.; 90
 Paladini C.; 93

Paniccià M.; 77
 Paolini F.; 90
 Parisi A.; 69; 75; 80
 Pascucci I.; 5
 Paternesi B.; 58
 Patregnani T.; 20
 Patta C.; 89
 Peletto S.; 79
 Peli A.; 100
 Penna C.; 89
 Perugini G.; 53; 62
 Petrini S.; 77
 Pezzotti G.; 75
 Piazza G.; 60
 Pirisinu L.; 78
 Pisoni G.; 22
 Pistello M.; 9; 86
 Pitti M.; 79
 Pongolini S.; 30
 Ponterio E.; 43; 44; 45
 Ponti N.; 60
 Ponti W.; 65
 Potgieter A.C.; 64
 Profiti M.; 60
 Proietto U.; 49
 Prospero S.; 13; 34
 Puggioni G.; 18; 60; 81; 89
 Purpari G.; 29
 Puzelli S.; 39
 Radogna A.; 64; 75; 76; 80
 Raffini E.; 39
 Reina R.; 18; 60; 61; 81
 Riccelli E.; 83
 Ricchizzi E.; 31; 84; 85
 Ricci E.; 86
 Ricci I.; 86
 Rigoni M.; 99
 Rizzo F.; 87
 Rocchigiani A.M.; 89
 Roperto F.; 90
 Roperto S.; 90
 Rosati S.; 18; 60; 61; 81
 Rota Nodari S.; 62
 Ru G.; 32
 Ruggeri F.M.; 43; 44; 45
 Rugna G.; 41
 Russo E.; 20
 Russo V.; 90
 Rutili D.; 56
 Saba M.; 66
 Sabbatini M.; 77
 Sala M.; 91
 Sala V.; 22
 Salamida S.; 68
 Salomoni A.; 36
 Salviato A.; 73
 Salzano S.; 15
 Santucci U.; 57
 Santucci C.; 66
 Saralli G.; 94
 Satta A.; 66
 Savini G.; 92; 93
 Scagliarini A.; 13; 59; 98
 Scavia G.; 32
 Schiavon E.; 97
 Scicluna, M.T.; 91; 94
 Scozzia E.; 38
 Scolamacchia F.; 32
 Scremin M.; 20
 Sechi M.T.; 89
 Sidoti F.; 87
 Silenzi V.; 77
 Simonetti P.; 57
 Simson S.; 78
 Sirri R.; 34
 Sola D.; 17
 Sozzi E.; 28; 63; 74
 Spada D.; 31
 Spagnolo D.; 25
 Spallucci, V.; 91
 Storaci M.; 17
 Taddei R.; 30
 Tamba M.; 41
 Tantillo G.; 95
 Tarsitano E.; 24; 71
 Tassinari M.; 41
 Tempesta M.; 24; 71
 Teodori L.; 93
 Terio V.; 95
 Terregino C.; 25; 33; 54; 96; 99
 Tilocca M.G.; 66
 Timurkan M.O.; 27

Tittarelli C.; 53; 62
Toffan A.; 33; 54; 97
Tranquillo V.; 30
Turin L.; 65
Vaccari F.; 59; 98
Vaccari G.; 23; 32; 78
Varano R.; 51
Varello K.; 22
Veggiato C.; 36
Velletri L.; 17

Venturi L.; 39
Venuti A.; 90
Verdaguer N.; 74
Viale E.; 99
Vigo P.; 100
Vitelli F.; 56
Volpe E.; 34
Zacchini S.; 100
Zucca P.; 49
Zuccon F.; 22; 79

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
a stampa o online deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

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

Roma, aprile-giugno 2009 (n.2) 4° Suppl.