

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Il Workshop nazionale di virologia veterinaria

**Diagnostica ed epidemiologia
delle infezioni virali degli animali**

Facoltà di Medicina Veterinaria,
Università degli Studi di Bologna
Ozzano Emilia (Bologna)
7-8 giugno 2007

RIASSUNTI

A cura di
Susan Babsa (a), Emiliana Falcone (a), Franco Maria Ruggeri (a),
Santino Prospero (b) e Antonio Lavazza (c)

(a) Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

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

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

ISSN 0393-5620
ISTISAN Congressi
07/C3

Istituto Superiore di Sanità

II Workshop nazionale di virologia veterinaria. Diagnostica ed epidemiologia delle infezioni virali degli animali. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bologna, Ozzano Emilia (Bologna), 7-8 giugno 2007. Riassunti.

A cura di Susan Babsa, Emiliana Falcone, Franco Maria Ruggeri, Santino Prospero e Antonio Lavazza 2007, v, 82 p. ISTISAN Congressi 07/C3

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

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

Istituto Superiore di Sanità

II National Workshop on veterinary virology. Diagnosis and epidemiology of viral infections of animals. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bologna, Ozzano Emilia (Bologna), June 7-8, 2007. Abstract book.

Edited by Susan Babsa, Emiliana Falcone, Franco Maria Ruggeri, Santino Prospero and Antonio Lavazza 2007, v, 82 p. ISTISAN Congressi 07/C3 (in Italian)

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

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

Responsabile scientifico:

Franco Maria Ruggeri, Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Per informazioni su questo documento scrivere a: dsnavir@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.

© 2007 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

INDICE

Programma	iii
Note per la consultazione	v
Relazioni	1
Comunicazioni e Poster	13
Indice degli autori	79

PROGRAMMA

Giovedì 7 giugno 2007

- 10.00 Registrazione dei partecipanti
10.30 Indirizzo di benvenuto e introduzione

Prima sessione

Moderatori: Antonio Lavazza, Giorgio Palù

- 11.00 *Virus dell'influenza: recettori nell'uomo e negli animali*
Giorgio Palù
- 11.30 Comunicazioni orali
- 13.00 Pausa Pranzo

Seconda Sessione

Moderatori: Francesco Maria Cancellotti, Giovanni Savini

- 14.00 *Insegnamenti appresi in otto anni di Bluetongue in Italia*
Giovanni Savini
- 14.30 *BoHV-4: dalla dubbia patogenicità all'utile vettori*
Gaetano Donofrio
- 15.00 Comunicazioni orali

Terza Sessione

Moderatori: Franco Mutinelli, Sara Ciulli

- 16.30 *Infezioni da Betanodavirus nei pesci. Diffusione in Europa ed epidemiologia molecolare*
Sara Ciulli
- 17.00 Comunicazioni orali

Venerdì 8 giugno 2007

Quarta sessione

Moderatori: **Canio Buonavoglia, Nicola Decaro**

09.00 *Parvovirus del cane: evoluzione genetica ed antigenica*
Nicola Decaro

09.30 Comunicazioni orali

Quinta sessione

Moderatori: **Gianluca Autorino, Riccardo Forletta**

11.00 *Anemia infettiva del cavallo: una malattia riemergente*
Riccardo Forletta

11.30 Comunicazioni orali

12.30 Discussione dei Poster
Franco Maria Ruggeri, Santino Prospero

13.30 Pausa Pranzo

Sesta sessione

Moderatori: **Domenico Rutili, Silvia Bellini**

14.30 *Epidemiologia e controllo della malattia vescicolare del suino*
Silvia Bellini

15.00 Comunicazioni orali

17.00 Chiusura dei lavori

NOTE PER LA CONSULTAZIONE

Il presente lavoro raccoglie le relazioni, le comunicazioni e i poster presentati al Workshop.

I lavori sono divisi in due sezioni:

- *Relazioni*
Contiene le relazioni secondo l'ordine previsto nel programma.

- *Comunicazioni e Poster*
Le comunicazioni sono presentate in ordine alfabetico del primo autore; i poster sono contrassegnati con la lettera P.

Alla fine del volume è presente un indice degli autori di ogni singolo contributo.

Relazioni

VIRUS DELL'INFLUENZA: RECETTORI NELL'UOMO E NEGLI ANIMALI

Giorgio Palù

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Microbiche, Università degli Studi, Padova

Raramente un virus è in grado di passare dal suo ospite naturale ad un nuovo ospite, a dimostrazione che le barriere biologiche ed epidemiologiche da superare perché il salto di specie sia di successo sono numerose. Infatti, il virus deve essere in grado non solo di infettare le cellule del nuovo ospite (che quindi devono essere suscettibili), ma anche di potersi replicare in esse e fuoriuscirne per poter ulteriormente diffondere. Per quanto raro tale evento è comunque possibile con conseguenze generalmente drammatiche, in quanto nel nuovo ospite, *naïve* dal punto di vista immunologico, il virus può causare estese epidemie o pandemie, spesso caratterizzate da elevata letalità. Il virus dell'influenza di tipo A è un esempio di virus in grado di passare con successo dall'ospite naturale a nuovi ospiti, causando in questi ultimi pandemie. Tale virus ha il proprio serbatoio naturale negli uccelli selvatici d'acqua dolce. Occasionalmente il virus può essere trasmesso da questi ad uccelli domestici o a mammiferi, incluso l'uomo. La maggior parte di questi eventi di trasmissione inter-specifica sono caratterizzati da una diffusione del virus nella nuova specie molto limitata e si autoesauriscono. Tuttavia, occasionalmente un virus influenzale può acquisire la capacità di diffondere rapidamente e in grosse proporzioni nella nuova specie, causando pandemie. Progressivamente, il virus si adatta alla nuova specie e si ripresenta anno dopo anno in forma epidemica. Alla base di questo processo sono una serie di cambiamenti antigenici ai quali il virus dell'influenza di tipo A può andare incontro e che sono noti come *antigenic drift* e *antigenic shift*. Questi fenomeni sono stati evidenziati ed analizzati grazie allo studio delle caratteristiche biologiche e molecolari dei tre ceppi influenzali pandemici umani (H1N1, H2N2, H2N3) e dei ceppi di influenza umana e aviaria in circolazione. Tale studio, ha fornito importanti informazioni sugli specifici e coordinati cambiamenti che il virus deve subire affinché possa trasmettersi e replicare con successo in un nuovo ospite. Questi cambiamenti riguardano in particolare le proteine di superficie emoaagglutinina (HA) e neuroaminidasi (NA), che sono fondamentali nella fase di ingresso e fuoriuscita del virus dalla cellula bersaglio. In particolare, l'HA media il riconoscimento del recettore cellulare, rappresentato da glicoproteine o glicolipidi di superficie contenenti residui N-terminali di acido sialico. I virus dell'influenza aviaria si legano a recettori caratterizzati da un legame tra acido sialico e residuo glucidico di tipo alfa 2-3 (ad esempio Neu 5Ac(alfa 2-3)Gal), invece i virus umani, inclusi quelli delle pandemie fino ad ora verificatesi, riconoscono recettori nei quali tale legame è di tipo alfa 2-6 (ad esempio Neu5Ac(alfa 2-6)Gal). L'evoluzione molecolare dell'HA è pertanto essenziale affinché il virus possa effettuare il salto di specie, consentendo a virus aviari di riconoscere recettori umani e dar luogo a potenziali pandemie. Numerosi studi hanno permesso di identificare i residui amminoacidici chiave nell'interazione HA-recettore e coinvolti nell'evoluzione molecolare. Eventi di coinfezione di specie suscettibili d'infezione da parte di virus aviari ed umani, come il maiale, e la permanenza dei virus nella nuova specie, favoriscono gli eventi di

riassortimento e adattamento del virus in specie non precedentemente suscettibili. Inoltre, la presenza di recettori “aviari” anche nelle cellule di mammifero, ed in particolare in specifici distretti del sistema respiratorio umano, recentemente dimostrata, può spiegare la capacità di alcuni virus aviari (ad esempio H5N1) di saltare direttamente dagli uccelli all’uomo, così come la difficoltà degli stessi di trasmettersi da uomo a uomo. Conoscere gli eventi molecolari alla base dell’adattamento di un virus dell’influenza aviaria all’uomo, è indispensabile per valutare il rischio di insorgenza di ceppi potenzialmente pandemici e per intraprendere programmi di sorveglianza adeguati ed efficaci.

INSEGNAMENTI APPRESI IN OTTO ANNI DI BLUETONGUE IN ITALIA

Giovanni Savini

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

La febbre catarrale degli ovini, *Bluetongue* (BT), è una malattia virale infettiva non contagiosa dei ruminanti domestici e selvatici, trasmessa da insetti appartenenti al genere *Culicoides*. In Italia sette successive epidemie si sono susseguite dal 2000 ad oggi, con circa 15.500 focolai in nove regioni. Nel corso di queste epidemie sono stati isolati i sierotipi 1, 2, 4, 9 e 16 del virus. Il lavoro descrive 8 anni di esperienze nell'affrontare le varie epidemie e gli insegnamenti nonché le scoperte realizzate durante questo periodo. Sono state studiate le modalità di entrata del virus in Italia, le vie attraverso cui il virus si è diffuso, i fattori che ne hanno influenzato la diffusione, le problematiche relative alla diagnostica virale nonché quelle relative alle misure di controllo adottate. Il virus della *Bluetongue* (BTV) per diffondersi in Italia si è principalmente servito di due porte di entrata, una orientale (sierotipi 4, 9 e 16) e una meridionale (sierotipi 1, 2 e 4). Fattori come densità animale, abbondanza di vettori, caratteristiche del suolo, temperature e stato immunitario degli animali hanno condizionato la diffusione del virus sul territorio italiano. Diverse specie di vettori sono state responsabili della trasmissione virale: *Culicoides imicola*, *C. pulicaris* e *C. obsoletus/scoticus*. Per far fronte alla continua diffusione del virus e proteggere gli animali dall'infezione, le istituzioni sanitarie hanno deciso di vaccinare tutti i ruminanti domestici presenti nelle aree dove era stata dimostrata circolazione virale ed in quelle contigue. Nelle varie campagne vaccinali succedutesi dal 2002, gli animali, a seconda dell'area geografica di appartenenza, sono stati vaccinati con formulazioni vaccinali contenenti uno o più sierotipi virali. Nei primi anni di vaccinazione sono stati impiegati vaccini vivi attenuati, quindi dal 2005 si è iniziato ad usare, almeno per alcuni sierotipi, prodotti immunizzanti inattivati. Se effettuata nei tempi e modalità suggerite, la vaccinazione con vaccini vivi opportunamente attenuati si è mostrata uno strumento efficace nel ridurre le manifestazioni cliniche e la circolazione virale, tuttavia il virus vaccinale può diffondersi nell'ambiente ed essere trasmesso dai vettori ad animali non vaccinati, come è accaduto per i ceppi vaccinali di BTV-2 e BTV-16. Nuove tecniche diagnostiche bio-molecolari (*real-time* RT-PCR) sono state messe a punto per il rilevamento di materiale genetico appartenente al BTV. Metodi bio-molecolari sono stati proposti anche per la tipizzazione dei sierotipi di BTV, ricombinazioni a livello di alcuni segmenti genici virali rilevati in alcuni sierotipi isolati in Italia ne consigliano tuttavia cautela nell'impiego.

INFEZIONI DA *BETANODAVIRUS* NEI PESCI. DIFFUSIONE IN EUROPA ED EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE

Sara Ciulli

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Alma Mater Studiorum,
Università degli Studi, Bologna*

L'infezione da *Betanodavirus* ha una distribuzione cosmopolita e determina una patologia definita Necrosi Nervosa Virale o Encefalo Retinopatia Virale (ERV) responsabile di elevata mortalità in larve e stadi giovanili di varie specie ittiche marine d'allevamento con conseguenti elevate perdite economiche. Dal 1995 l'ERV è stata segnalata anche in Italia dove la specie maggiormente colpita è costituita dal branzino (*Dicentrarchus labrax*). Recenti studi evidenziano che l'infezione è diffusa anche fra i selvatici, dove generalmente non si osservano le forme cliniche. La trasmissione interspecifica è stata dimostrata e la presenza di portatori asintomatici fra le specie selvatiche è fortemente sospettata. Il rischio di trasmissione orizzontale fra selvatici e domestici è particolarmente alto nell'allevamento da ingrasso dei pesci marini spesso condotto in gabbie in mare o in sistemi vallivi a diretto contatto con l'ambiente esterno.

Sulla base dell'analisi del gene della proteina del capsido i *Betanodavirus* sono stati suddivisi in 4 specie: *Striped Jack Nervous Necrosis Virus* (SJNNV), *Tigger Puffer Nervous Necrosis Virus* (TPNNV), *Redspotted Grouper Nervous Necrosis Virus* (RGNNV) e *Barfin Flounder Nervous Necrosis Virus* (BFNNV). Fino a poco tempo fa questa suddivisione su base genetica trovava piena corrispondenza nella distribuzione geografica dando un valido aiuto alle indagini sull'origine dei focolai. In Europa, infatti, erano stati evidenziati solamente i genotipi RGNNV e BFNNV rispettivamente nelle specie di acqua calda (Mar Mediterraneo) e di acqua fredda (Mar del Nord), mentre i genotipi SJNNV e TPNNV erano caratteristici del sud est asiatico dove, comunque, erano presenti anche i genotipi europei. Recentemente, invece, è stata segnalata la presenza in Norvegia di un nuovo genotipo (TNV), inoltre sono stati evidenziati ceppi SJNNV in Spagna prima in una sogliola e successivamente in branzino ed orata. Infine è stato evidenziato un ceppo BFNNV nel branzino europeo allevato in Francia dal quale, prima di questa segnalazione, era stato evidenziato solo il RGNNV. Al momento non sono ancora disponibili efficaci metodi di controllo per questa malattia e la conoscenza della distribuzione dell'infezione sul territorio, ai fini della profilassi diretta, resta uno dei pochi strumenti che si hanno a disposizione per il controllo della malattia. La presenza del virus negli allevamenti è ampia come dimostrato dai ricorrenti focolai estivi che si verificano negli allevamenti da ingrasso. Indagini svolte dal nostro gruppo di ricerca ed in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico della Sicilia hanno inoltre evidenziato l'ampia diffusione di *Betanodavirus* anche in molteplici specie selvatiche del Mar Mediterraneo. In particolare sono state analizzate 17 e 22 specie ittiche rispettivamente pescate nel Canale di Sicilia e nel Medio Adriatico dalle quali sono stati isolati *Betanodavirus* rispettivamente in 5 e 10 specie ittiche nelle quali non era mai stata segnalata la presenza di infezione da *Betanodavirus*. Le specie

più frequentemente riscontrate positive sono *Gobius niger*, *Mullus barbatus* e Trigla lucerna: tutte specie bentoniche molto diffuse nei nostri mari. Grande interesse, inoltre, hanno destato gli isolamenti da specie pelagiche anche in rapporto ad una minore rappresentatività numerica di queste specie nel campione. I soggetti appartenenti a specie pelagiche, inoltre, potrebbero rivestire un più pericoloso ruolo epidemiologico essendo capaci di spostarsi anche ad ampie distanze. Nuove indagini stanno evidenziando, grazie all'uso di tecniche biomolecolari, un *range* ancora più ampio di specie sensibili in analogia a quanto già osservato fra le specie allevate. Una così ampia diffusione del patogeno, anche in ambiente naturale rende indispensabile un approfondimento sulle correlazioni epidemiologiche esistenti fra infezione nelle specie allevate ed in quelle selvatiche, sia per gli stretti contatti fra i due ambienti, sia per la frequente necessità di attingere al "serbatoio dei selvatici" da parte dell'allevamento ittico. Al fine di meglio comprendere la natura dei ceppi infettanti i pesci selvatici e quelli allevati tutti gli isolati virali sono stati caratterizzati geneticamente e comparati fra loro e con sequenze di ceppi isolati nel Mediterraneo e in altri mari da diverse specie ittiche. Tutti i ceppi isolati sono risultati appartenere, sulla base della caratterizzazione genetica, alla specie RGNNV, non evidenziando fra questi animali la circolazione delle nuove specie (SJNNV e BFNNV) segnalate in soggetti di branzino, sogliola e orata allevati in Francia e Spagna. I virus caratterizzati possono essere suddivisi sulla base dell'analisi filogenetica in più *cluster* evidenziando sia la circolazione di ceppi diversi all'interno della stessa specie ittica sia la circolazione dello stesso ceppo in specie ittiche diverse. Inoltre, il confronto con i ceppi isolati da pesci allevati in corso di gravi focolai di Encefalo Retinopatia Virale ha evidenziato un'elevatissima percentuale di identità nucleotidica e spesso una completa identità fra ceppi isolati da soggetti selvatici ed allevati. Questo reperto conferma che nelle due popolazioni circolano gli stessi virus. Il ruolo epidemiologico dei selvatici resta, in ogni modo, ancora da definire anche se la possibilità che essi possano fungere da *carrier* oppure da serbatoio non è da escludere. Le migrazioni da parte delle specie pelagiche potrebbero, infatti, costituire un facile mezzo di spostamento del virus fra allevamenti anche ad ampie distanze, mentre le popolazioni bentoniche più stanziali potrebbero costituire un serbatoio nel quale il virus può sopravvivere per lunghi periodi. In queste specie, infatti, anche a seguito delle diverse condizioni di vita rispetto ai pesci allevati la malattia non si manifesta e gli animali sopravvivono all'infezione. Di fondamentale importanza sarà verificare se soggetti di queste specie infetti siano in grado di trasmettere l'infezione alle specie più comunemente allevate. L'evidenziazione delle nuove specie in soggetti di allevamento evidenzia come l'intensa attività di commercializzazione di pesci vivi ai fini dell'acquacoltura comporti un elevato rischio di diffusione di agenti eziologici di malattia in nuovi ambienti. Resta incoraggiante il mancato ritrovamento nei pesci selvatici delle nuove specie virali evidenziate nei pesci allevati, anche se, a causa della tipologia di allevamento sopra riportata, il rischio di diffusione di questi virus nell'ambiente naturale è molto elevato. Di fondamentale importanza sarà il continuo monitoraggio dei ceppi circolanti nelle popolazioni allevate e selvatiche e ulteriori indagini per definire le correlazioni epidemiologiche dell'infezione nelle due popolazioni ittiche al fine del controllo della malattia e anche della salvaguardia dell'ambiente naturale.

PARVOVIRUS DEL CANE: EVOLUZIONE GENETICA ED ANTIGENICA

Nicola Decaro

*Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria,
Università degli Studi, Bari*

Il *Parvovirus* del cane tipo 2 (CPV-2) è stato identificato per la prima volta negli anni 70 nel corso di una grave epidemia di gastroenterite diffusasi su scala mondiale. A pochi anni dalla sua prima comparsa, CPV-2 ha dato origine a due varianti antigeniche, CPV-2a e CPV-2b, le quali hanno progressivamente soppiantato il tipo originale, attualmente presente solo in alcune formulazioni vaccinali. Confrontando le sequenze della proteina capsidica VP2 sono state osservate cinque-sei sostituzioni aminoacidiche tra il tipo originale e le varianti antigeniche, le quali sono state associate sia ad un incremento di patogenicità che ad un cambiamento dello spettro d'ospite. Infatti, le varianti CPV-2a e CPV-2b sono maggiormente patogene e, differentemente da CPV-2, sono in grado di infettare e causare malattia anche nel gatto. Le varianti 2a e 2b si differenziano solo a livello del residuo 426 della VP2, dove si evidenzia Asn per CPV-2a e Asp per CPV-2b. Tuttavia, tale unica differenza è stata sufficiente per mettere a punto anticorpi monoclonali specifici. Una nuova variante, denominata CPV-2c e caratterizzata dalla sostituzione Asp→Glu a livello di residuo 426 della VP2, è stata descritta da Buonavoglia nel 2000. Tale mutazione, a differenza di molte altre precedentemente descritte (Pro-265, Ser-297, Asp-300, Val-555), è localizzata in un sito antigenicamente dominante (epitopo A) della proteina VP2, per cui è stato possibile mettere a punto anticorpi monoclonali in grado di differenziare la variante 2c da CPV-2a e CPV-2b. La variante 2c sta progressivamente rimpiazzando le vecchie varianti antigeniche in Italia ed è stata descritta recentemente anche in altri paesi europei (Spagna, Germania, Regno Unito), nonché nei continenti asiatico (Vietnam) ed americano (Uruguay, Stati Uniti). L'evoluzione genetica ed antigenica delle varianti CPV-2 apre nuovi orizzonti sulla profilassi vaccinale, tenendo presente che sono ancora in uso vaccini allestiti con il virus originale non più circolante.

ANEMIA INFETTIVA DEL CAVALLO: UNA MALATTIA RIEMERGENTE

Riccardo Forletta

Centro Referenza Nazionale AIE, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Pisa

In Italia la profilassi dell'Anemia Infettiva Equina è stata regolamentata fino al 1994 dal Regolamento di Polizia Veterinaria (artt. 99 e 100 del D.P.R. 320/54) e dal D.M. 04/12/1976 ("Profilassi dell'anemia infettiva degli equini"); quest'ultimo garantiva il controllo mediante test di *Coggins* dei soggetti destinati ad impianti con concentrazione di equini e consentiva a tali strutture di acquisire lo stato di indennità da malattia, assicurando in questo modo il controllo sanitario di buona parte del patrimonio equino nazionale. Con la Direttiva 90/426/CEE, recepita con il DPR 11 febbraio 1994 n. 243, Regolamento recante attuazione della direttiva 90/426/CEE relativa alle condizioni di polizia sanitaria che disciplinano i movimenti e le importazioni di equini provenienti da paesi terzi con le modifiche apportate dalla Direttiva 92/36/CEE, per gli scambi intracomunitari viene tolta l'obbligatorietà del test di *Coggins* ed è prevista solo l'assenza di malattia nell'azienda di origine con conseguente superamento di quanto previsto dall'art. 9 del DM 04/12/1976. Il DPR 243/94 prevede inoltre che in caso di focolaio di AIE, dopo allontanamento degli infetti, gli animali possano essere movimentati solo dopo due test negativi effettuati a distanza di tre mesi e non più di 40 gg come previsto dal D.M. 04/12/1976, art. 4. Con l'emanazione del DPR 243/94 è stato in pratica annullato l'obbligo del test di *Coggins* e della relativa attestazione sanitaria per AIE (Anemia Infettiva Equina). Nonostante il Ministero della Salute, con Circolare n. 3 del 31/01/1995, abbia raccomandato di proseguire l'attività di sorveglianza sulla malattia, negli anni successivi soltanto in alcune regioni sono stati adottati regolari piani di sorveglianza per l'AIE, mentre nel resto del territorio nazionale i controlli sono stati limitati a soggetti di importazione, riproduttori maschi per l'autorizzazione sanitaria alla monta, raramente a soggetti con sintomatologia clinica evidente riferibile alla malattia, nonché ad allevamenti sede di focolai per estensione dei controlli in azienda in seguito a riscontro di singole positività sierologiche. L'obbligo del test di *Coggins* di fatto rimaneva solo per i riproduttori maschi ai sensi di quanto previsto dal Decreto 13 gennaio 1994 n. 172, Regolamento di esecuzione della legge 15 gennaio 1991 n. 30 recante disciplina della riproduzione animale ("Requisiti sanitari per l'approvazione alla monta degli stalloni"), e Decreto 403 del 19 luglio 2000 recante Approvazione del nuovo regolamento di esecuzione della legge 15 gennaio 1991 n. 30, concernente la disciplina della riproduzione animale. Dal 1994 e negli anni successivi, i controlli sulle movimentazioni sono stati progressivamente abbandonati; tuttavia, gli spostamenti continui verso gli ippodromi, le fiere, le manifestazioni ippico-sportive, le aste e tutti i concentramenti di equidi, che caratterizzano il mondo del cavallo, in assenza di controlli regolari costituiscono un fattore di rischio importante per la diffusione della malattia, legato soprattutto alla possibilità di incontro con soggetti di provenienza ignota e stato sanitario incerto. La mancanza di un piano di controllo regolare per la malattia, correlata all'assenza di una anagrafe equina e quindi di una identificazione certa degli

equidi, non può consentire di conoscere la reale prevalenza dell'AIE nel territorio nazionale. È possibile inoltre che attraverso circuiti spesso sconosciuti, entrino a far parte del patrimonio equino nazionale, come animali da diporto e senza essere sottoposti ad alcun accertamento diagnostico, soggetti importati per macello, provenienti soprattutto da alcuni paesi dell'est Europa, in cui la malattia è presente. L'entrata in vigore della Decisione 2004/825/CE (Decisione della Commissione del 29 novembre 2004 recante misure di protezione relative alle importazioni di equidi provenienti dalla Romania), partendo dal presupposto che ispezioni comunitarie in quel Paese hanno evidenziato carenze sanitarie, al fine di adottare provvedimenti per la tutela della popolazione equina della comunità, ha previsto una ripetizione a campione dei test di laboratorio, compreso il test di *Coggins*, su animali introdotti per vita e su equidi destinati alla macellazione. Con l'emanazione dell'Ordinanza 14 novembre 2006 in G.U. n. 285 del 07/12/2006 "Disposizioni urgenti in materia di sorveglianza dell'anemia infettiva degli equidi", le autorità sanitarie, preoccupate per una serie di focolai caratterizzati da sintomatologia clinica, si sono poste l'obiettivo di verificare la prevalenza della malattia in Italia. Vengono presentati i dati relativi ai controlli e confrontati con le positività riscontrate nel periodo 1998-2006. Nella relazione saranno inoltre rappresentati i risultati preliminari relativi alla definizione dei protocolli di PCR (*Polymerase Chain Reaction*) per la diagnosi qualitativa e quantitativa di AIE mediante ricerca diretta del genoma virale sia in soggetti con infezione in fase cronica che acuta, molto importante per una precoce diagnosi *in vivo* della malattia.

EPIDEMIOLOGIA E CONTROLLO DELLA MALATTIA VESCICOLARE DEL SUINO

Silvia Bellini

Centro Nazionale di referenza per le Malattie Vescicolari (CERVES), Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

La Malattia Vescicolare del Suino (MVS) è stata individuata per la prima volta in Italia nel 1966, clinicamente la malattia era stata diagnosticata come afta epizootica ma la diagnosi di laboratorio evidenziò un nuovo patogeno a cui erano sensibili solo i suidi, l'agente eziologico era ancora della famiglia dei *Picornaviridae* ma apparteneva al genere degli *Enterovirus*. La malattia nel suino era clinicamente indistinguibile dall'afta epizootica, e questo è il motivo principale per cui questa malattia a decorso benigno era stata collocata fra quelle della lista A dell'OIE. Il virus della MVS è estremamente resistente e l'epidemiologia della malattia con le relative modalità di controllo, risultano fortemente condizionate dalle caratteristiche fisico-chimiche di resistenza del virus nell'ambiente. La MVS nell'ambito di una stessa azienda diffonde quando gli animali suscettibili entrano in contatto con animali infetti o con l'ambiente contaminato. La diffusione tra aziende invece è da ricondursi all'introduzione in azienda di suini infetti, veicoli o attrezzature contaminati o di personale contaminato. In letteratura è riportata anche la possibilità che gli animali si possano infettare attraverso l'alimentazione dei suini con rifiuti di ristorazioni o avanzi casalinghi contenenti alimenti di origine suina infetti. La MVS a differenza dell'afta epizootica ha comunque, una tendenza limitata a diffondere, anche nell'ambito dell'azienda infetta, la diffusione da un reparto ad un altro, può anche non verificarsi in assenza di spostamento di suini infetti o di materiali contaminati. Questo è il motivo per cui la MVS può essere considerata una malattia di reparto più che una malattia dell'azienda. Ad eccezione dell'Italia, la MVS è stata eradicata in Europa all'inizio degli anni '80, anche se dal 1992 si sono verificati focolai in Olanda, Spagna, Portogallo e sono state evidenziate positività sierologiche in Belgio. In Italia dal 1973 (OM del 13 febbraio 1973) la MVS è inserita nell'elenco delle malattie soggette a notifica obbligatoria, art. 1, Regolamento di Polizia Veterinaria (DPR 08/02/1954, n. 320) e dal 1995 viene eseguito un piano di sorveglianza per la MVS che ha come fine ultimo l'eradicazione della malattia, da raggiungere attraverso l'accreditamento delle aziende e delle Regioni. Le regioni del centro nord hanno acquisito l'accreditamento a partire dal 1997, mentre alcune regioni dell'Italia meridionale non lo hanno mai raggiunto, negli anni però, focolai di malattia sono stati segnalati anche nelle regioni accreditate per MVS. Nel 2006 in Italia è stata registrata una recrudescenza della MVS e il picco epidemico è stato evidenziato negli ultimi mesi dell'anno, quando la malattia è stata individuata ed è diffusa nelle regioni settentrionali. La presenza della MVS in regioni del nord, dove è presente una realtà zootecnica di tipo intensivo, ha provocato gravi danni economici nell'intera filiera suinicola. Le attività di sorveglianza nei confronti della MVS continuano ad essere mantenute per giungere all'eradicazione della malattia, ma anche per dimostrare che c'è una parte del territorio nazionale che è "libero da infezione" e poter così garantire l'esportazione dei prodotti. Infatti, la presenza di una malattia come la MVS in un territorio

comporta gravi restrizioni commerciali sull'esportazione di animali vivi e di prodotti derivati e le conseguenti ripercussioni economiche che questo comporta. Quanto accaduto nel corso del 2006 rende indispensabile una revisione del piano di eradicazione della malattia, che, oltre a quanto già previsto nei precedenti piani dovrà tenere conto delle criticità riscontrate nella recente epidemia e proporre gli opportuni correttivi.

Comunicazioni e Poster

P1. MESSA A PUNTO DI UNA RT-PCR MULTIPLEX PER LA RICERCA E TIPIZZAZIONE DEL VIRUS DELLA PRRS

Simone Barocci (a), Marta Paniccià (a), Manfredo Fortunati (a), Barbara Palombo (a), Matteo Sabbatini (a), Sara Nardi (a), Emanuele Simoni (a), Rossella Berluti (b), Sara Briscolini (a)

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

(b) Università Politecnica delle Marche, Ancona

Il virus della PRRS (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*, Ordine *Nidovirales*, famiglia *Arteriviridae*, Genere *Arterivirus*) è una causa molto diffusa ed importante di problemi principalmente di tipo riproduttivo nelle scrofe e di tipo respiratorio nei suini, per lo più in fase di crescita. Nel presente lavoro è stata studiata e messa a punto una RT-PCR *multiplex* per la ricerca e tipizzazione del PRRSV, basata sull'amplificazione di una sequenza compresa fra l'ORF4 e l'ORF5. Per effettuare il *primer design* degli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione è stato necessario allineare (software BioEdit 7.0.5.3), separatamente, le sequenze appartenenti ai due principali ceppi di PRRSV di interesse epidemiologico (ceppo europeo e ceppo americano), depositate in *GenBank*, sia dell'ORF4 che dell'ORF5. Una volta ottenuta la sequenza *consensus* di entrambi gli ORF di interesse, per ogni ceppo, sono stati creati un *primer forward* comune sull'ORF4 e due *primer reverse*, sull'ORF5, che permettono la differenziazione dei ceppi europeo ed americano (PRRSVcom: 5'-TGC TBC ATT TCM TGA CAC C-3', PRRSVeu: 5'-GCC CCA ATT TGT RAG AAC ATC-3', PRRSVam: 5'-TGG CGY TGS CGA GCA CA-3'). I prodotti di amplificazione, rispettivamente di 105 bp e 174 bp, permettono una netta differenziazione dei ceppi di interesse. Per quanto riguarda la tecnica estrattiva dell'RNA genomico di PRRSV da organo, è stato utilizzato un protocollo con Trizol® *Reagent* (*Invitrogen*). Il protocollo di amplificazione, dopo ottimizzazione, è stato eseguito su 24 cDNA (ottenuti con *random* esameri), presenti presso la ceppoteca della Sezione di Fermo, ottenendo buoni risultati di ripetibilità e riproducibilità. Sono in corso i sequenziamenti dell'ORF5 di tutti i ceppi saggiati per avere una conferma del dato ottenuto con il presente protocollo.

ANALISI STRUTTURALE ED ANTIGENICA DELLA PROTEINA N DI CEPPI DI CORONAVIRUS FELINI (FCOVs)

Milena Bassani (a), Saverio Paltrinieri (b), Maria Elena Gelain (b), Andrea Balboni (a), Mara Battilani (a)

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

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

I *Coronavirus* felini (FCoVs) sono virus a RNA che colpiscono i felidi domestici e selvatici determinando una grave patologia la Peritonite Infettiva Felina (FIP). I virioni contengono 3 principali proteine strutturali: la proteina dello spike S, la proteina di membrana M e la proteina del nucleocapside N. Per altre specie di *Coronavirus*, si è dimostrato il coinvolgimento della proteina N nella stimolazione di un'immunità protettiva. Considerato che nel caso dei FCoV solo l'immunità cellulo-mediata previene lo sviluppo della malattia, nel presente lavoro è stata valutata la presenza di domini immuno-stimolanti in ceppi di FCoV identificati in soggetti portatori sani e malati. Si è pertanto proceduto al sequenziamento dell'intero gene strutturale N, di circa 1.130 bp, di 71 ceppi virali, in parte raccolti nell'ambito di *screening* effettuati presso oasi feline ed allevamenti ed in parte afferenti al dipartimento a scopo diagnostico. Le sequenze ottenute sono state sottoposte ad analisi bio-informatiche ai fini di identificare nel profilo antigenico differenze di rilievo tra ceppi virulenti ed avirulenti e di aumentare le conoscenze relative alla struttura ed organizzazione della proteina N. Le sequenze sono state allineate mediante il metodo *ClustalW* ed è stata effettuata la predizione dei siti antigenici mediante algoritmi specifici, implementati in diversi software, che utilizzano metodi diretti, quali l'algoritmo AMPHI, in grado di identificare sulla base della sequenza aminoacidica primaria la presenza di epitopi stimolanti i linfociti T *helper* ed indiretti quali gli algoritmi SETTE e ANN (*Artificial Neural Network*) che predicono i peptidi che vengono riconosciuti dai complessi maggiori di istocompatibilità. Sulle sequenze proteiche, inoltre, è stata effettuata la predizione delle regioni ordinate/disordinate mediante il predittore DISOPRED e la predizione dei siti di fosforilazione utilizzando i *tools* DISPHOS e NetPhos. Le sequenze proteiche analizzate mostrano una organizzazione in due domini strutturali indipendenti con la presenza di due principali regioni disordinate. Sono inoltre stati evidenziati diversi siti di fosforilazione. Nonostante la presenza di numerose mutazioni e delezioni che coinvolgono intere triplette del gene N, non si sono riscontrate mutazioni costanti in grado di differenziare ceppi virulenti ed avirulenti. L'analisi filogenetica condotta sulle sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche del gene N evidenzia una netta separazione dei ceppi virali sulla base dell'origine geografica piuttosto che sulle caratteristiche di virulenza.

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEI VIRUS DELLA MALATTIA VESCICOLARE DEL SUINO NEGLI ULTIMI 15 ANNI

Emiliana Brocchi (a), Santina Grazioli (a), Ilaria Barbieri (a), Marco Bagnetti (a), David Paton (b), Nick J. Knowles (b)

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

(b) Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Pirbright, UK

La Malattia Vescicolare del Suino (MVS) è una malattia virale molto contagiosa, che può causare lesioni indistinguibili da quelle dall'afta, ma anche decorrere in modo asintomatico. Epidemie di MVS sono state riportate in Europa e in Asia durante gli anni '70 e '80; la malattia è poi riapparsa sporadicamente in Europa dal 1992 e persiste ufficialmente solo in Italia. Sebbene i virus responsabili della MVS appartengono ad un unico sierotipo, sono distinguibili quattro gruppi su base antigenica e genetica. Il gruppo più recente è costituito da virus isolati in Europa dal luglio 1992. L'obiettivo di questo studio è l'analisi filogenetica di ceppi isolati nell'arco di 15 anni (1992-2006) per valutarne l'epidemiologia e la variabilità in campo. Più di 100 ceppi, prevalentemente italiani, sono stati sottoposti ad amplificazione con RT-PCR, sequenziamento della regione VP1 e analisi filogenetica. Tutti i virus esaminati appartengono al gruppo genetico più recente, ma sono differenziabili in due sotto-gruppi. Il primo comprende i virus cronologicamente più lontani, isolati in diversi paesi europei tra il 1992 ed il 1995, oltre ad un *cluster* di isolati strettamente correlati, identificati in Portogallo nel 2003-2004 e successivamente nelle regioni del sud Italia nel 2004 e 2006. Il secondo sotto-gruppo comprende ceppi isolati solo in Italia dal 1998 al 2006. Dal 2004 entrambi i sottogruppi sono presenti in Italia: l'epidemia di MVS che ha colpito regioni dell'Italia settentrionale nel 2006-2007 è stata causata da virus tipicamente evoluti in Italia, appartenenti al sotto-gruppo più recente e correlati con quelli già presenti in Italia in anni precedenti; contemporaneamente, virus correlati al ceppo portoghese (primo sotto-gruppo), isolati per la prima volta in Abruzzo nel novembre 2004, si sono diffusi nelle regioni endemiche meridionali. L'analisi ha evidenziato la stabilità genetica dei virus MVS isolati nell'arco di 15 anni: tutti gli isolati appartengono ad un unico gruppo genetico, identificato per la prima volta in Europa nel 1992 e tuttora presente. Tuttavia, anche cambiamenti minori possono aiutare nella comprensione dell'epidemiologia virale; infatti lo studio suggerisce che due sotto-gruppi genetici hanno circolato recentemente in Italia, di cui uno composto da ceppi strettamente correlati al sotto-gruppo "portoghese". Una ipotesi probabile è che il virus isolato in Portogallo nel 1995 sia persistito quasi immutato, per ricomparire clinicamente nel 2003 ed essere successivamente introdotto in Italia. In alternativa il virus potrebbe essere stato reintrodotto da Paesi non UE in cui l'infezione subclinica non è stata diagnosticata per l'assenza di sorveglianza attiva.

INFLUENZA AVIARE DA SOTTOTIPO H5N1 IN CIGNI REALI (*CYGNUS OLOR*) IN PUGLIA

Antonio Camarda (a), Maria Stella Lucente (a), Elena Circella (a), Nicola Cavaliere (b), Michele Camero (a), Riccardo Orusa (c), Livia Di Trani (d), Ilaria Capua (e), Giovanni Cattoli (e), Canio Buonavoglia (a), Nicola Decaro (a)

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

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

(c) *Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Animali Selvatici (CERMAS), Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

(d) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(e) *Centro di Referenza Nazionale per l'Influenza Aviaria, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

Al fine di valutare il ruolo epidemiologico del cigno reale (*Cygnus olor*) nella diffusione del virus influenzale ad elevata patogenicità H5N1, sono state eseguite prove di *real-time* RT-PCR per il gene M su campioni prelevati da esemplari coinvolti negli episodi verificatisi nella Regione Puglia nel febbraio 2006. In particolare, sono stati analizzati campioni prelevati da 6 esemplari rinvenuti morti, risultati positivi per H5N1 presso l'IZS di Puglia e Basilicata e confermati dal Centro di Referenza Nazionale per l'Influenza Aviaria e da 1 cigno ricoverato presso il centro di prima accoglienza per la fauna selvatica della provincia di Lecce. Inoltre, sono stati sottoposti ad indagini virologiche e sierologiche 13 esemplari catturati nell'ambito del piano di monitoraggio finanziato dalla Regione Puglia per l'individuazione dei virus influenzali nell'avifauna migratoria svernante sul territorio regionale. Infine, sono stati analizzati 88 campioni fecali ambientali raccolti nelle aree di stazionamento dei gruppi di cigni coinvolti dai focolai influenzali. Nei 6 soggetti deceduti, la quantità di RNA virale (espressa in numero di copie per μl di estratto) è risultata più elevata a livello del polmone (da $2,62 \times 10^5$ a $1,18 \times 10^8$) rispetto all'intestino (da $5,78 \times 10^1$ a $1,02 \times 10^6$), dimostrando lo sviluppo di una patologia respiratoria tipica delle forme cliniche dell'influenza aviare nelle specie sensibili. Il cigno ricoverato presentava una grave sintomatologia nervosa accompagnata da scolo oculare trasparente. Non era osservabile alcuna sintomatologia enterica. L'animale è risultato positivo al virus H5N1 mediante *real-time* RT-PCR solo per quanto riguarda il tampone oculare (titoli riferiti al gene M pari a $4,21 \times 10^2$ copie di RNA virale/ μl di estratto), mentre i tamponi cloacale e faringeo sono risultati costantemente negativi. Il sequenziamento del gene HA a livello del sito di clivaggio era indicativo di uno stipite ad elevata patogenicità per la presenza di un numero elevato di aminoacidi basici. Gli esami eseguiti su campioni d'organo prelevati dopo l'abbattimento dello stesso soggetto hanno dimostrato la presenza di bassi titoli virali in trachea e polmone (rispettivamente $3,95 \times 10^2$ e $5,13 \times 10^2$ copie di RNA virale/ μl di estratto), mentre non è stata evidenziata alcuna traccia di RNA virale a livello di intestino, contenuto intestinale e tamponi nasale, faringeo e cloacale. I cigni campionati nell'ambito del piano di monitoraggio regionale hanno fornito esiti negativi sia agli esami sierologici che virologici, come pure sono risultati costantemente negativi tutti i campioni fecali ambientali. I risultati del presente studio confermano che il cigno reale rappresenta una specie epifenomeno piuttosto che un serbatoio naturale del virus H5N1.

P2. VITALITÀ DI CEPPI VACCINALI DI NDV RINVENUTI DOPO OLTRE 20 ANNI DI INTERRAMENTO

Marta Canuti (a), Antonella Amendola (a), Silvia Bianchi (a), Alessandra Zappa (a), Raffaella Koncan (b), Elisabetta Tanzi (a)

(a) Dipartimento di Sanità Pubblica, Microbiologia, Virologia, Università degli Studi, Milano

(b) Dipartimento di Patologia, Università degli Studi, Verona

Nella discarica dell'ex-Istituto Sieroterapico Milanese (ISM), 12.000 m² nel centro urbano di Milano, sono rimasti sepolti per anni rifiuti industriali bio-farmacologici (vaccini, sieri, opoterapici, flaconi di sangue, chemioterapici, carcasse animali). La discarica è stata bonificata e sono state rimosse 35.764t di rifiuti bio-farmacologici. Rilevante è il ritrovamento di elevati quantitativi di fiale sigillate di vaccini contro la pseudopeste aviaria (*Newcastle-Disease*, ND) in forma liquida e liofilizzata. ND è una patologia degli uccelli, causata da un *Paramyxovirus* (APMV-1 o *Newcastle-Disease-Virus*, NDV). I ceppi di NDV sono classificabili in base al grado di virulenza: lento/mesogenici a bassa virulenza, velogenici ad alta virulenza. Gli obiettivi dello studio sono stati la valutazione della vitalità residua e la determinazione dello *strain* di appartenenza dei ceppi vaccinali rinvenuti. Sono stati analizzati 4 tipi di vaccini vivi e attenuati contro la ND, due liofilizzati (*Idropol*, *Isminasol*) e due liquidi (*Ovovaccino*, *Vaccino embrione pseudopeste polli*), in produzione dal 1975 al 1988. La vitalità è stata valutata mediante inoculo del contenuto delle fiale in monostrato di cellule Vero e rilevazione dell'effetto citopatico. La specificità dell'effetto è stata valutata mediante emoassorbimento. Il controllo positivo utilizzato è un vaccino contro la ND attualmente in commercio (Izovac, Brescia) contenente ceppi vivi di NDV (titolo >10⁶DIE₅₀). I ceppi dotati di vitalità in cellula sono stati propagati in uova embrionate di pollo (substrato elettivo per la coltivazione di NDV). Il liquido allantoideo, raccolto a 48h dall'infezione, è stato titolato mediante emoagglutinazione. I virus vaccinali sono quindi stati sottoposti a sequenziamento di un frammento (615pb) del gene F (proteina di fusione) comprendente la sequenza del sito di clivaggio, determinante la virulenza dei ceppi. Le sequenze ottenute sono state allineate con altre presenti in banca dati ed è stato analizzato il sito di clivaggio. I ceppi vaccinali liofilizzati di NDV hanno determinato effetto citopatico su cellule. I saggi su uovo hanno confermato la vitalità dei ceppi liofilizzati; sono stati infatti osservati una capacità infettante l'embrione e un rilevante incremento del titolo: da 4 (vaccino intero) a 2.048 (liquido allantoideo) unità emoagglutinanti. Dall'analisi molecolare si è evinto che i campioni liofilizzati contenevano ceppi lentogenici *Lasota-like*, mentre i campioni liquidi *strain* velogenici *Herts/33-like*. I nostri dati dimostrano che i ceppi vaccinali liofilizzati vivi e attenuati di NDV *LaSota-like* rinvenuti in fiale sigillate sono dotati di capacità replicativa e infettante in cellule permissive e in uovo, dopo oltre 20 anni d'interramento.

P3. SVILUPPO DI UN TEST D'IMMUNOBLOTTING CON ANTIGENE P24 RICOMBINANTE PER LA RICERCA DI ANTICORPI VERSO IL VIRUS DELLA LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA

Cristina Casciari, Silvana Farneti, Carla Marini
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Il virus responsabile della Leucosi Bovina Enzootica è un *Retrovirus* esogeno che insieme al virus della leucemia umana a cellule T ed al Simian *T-lymphotropic* virus appartiene al genere HTLV-BLV della famiglia *Retroviridae*, gruppo morfologico C. Questo virus causa una patologia cronica a carico delle strutture linfocitopoietiche che può esitare in forme neoplastiche. Negli animali infetti da BLV la diagnosi sierologica è volta essenzialmente ad individuare la presenza d'anticorpi diretti contro la gp51, principale glicoproteina dell'envelope virale, e la proteina p24 del capsido. I test ufficiali utilizzati sono l'Agar-Gel-Immunodiffusione (AGID) e la prova immunoenzimatica (ELISA). La situazione attuale nel nostro Paese è tale che permangono ancora, in alcune aree, delle code d'eradicazione la cui eliminazione appare più difficile del previsto. In questi casi non sono infrequenti situazioni in cui esiti di prove contrastanti renderebbero necessario il ricorso ad una terza prova che possa fungere da *Gold Standard*. Scopo del presente lavoro è di sviluppare una prova d'*immunoblotting*, basata sull'impiego della proteina virale capsidica p24, in grado di dirimere le diagnosi non risolutive. Il disegno sperimentale finalizzato alla produzione della proteina ricombinante p24, da utilizzare nell'*immunoblotting* prevede l'utilizzo del sistema *GST fusion protein expression system* (Amersham) che permette di ottenere la proteina d'interesse fusa in frame con il gene codificante la proteina Glutatione-S-transferasi (GST), nel vettore d'espressione batterico pGEX-4T3. Questo consente di purificare, in un singolo step cromatografico, la proteina di fusione. La proteina ricombinante GST-p24 è stata purificata mediante cromatografia d'affinità sfruttando il legame della GST al Glutatione Sefaroso 4B e la successiva eluizione è stata ottenuta utilizzando un competitore molecolare. La purezza della proteina di fusione è stata valutata mediante SDS-PAGE e colorazione di Coomassie. Nella messa a punto del test d'*immunoblotting*, con la proteina p24 ricombinante, sono stati utilizzati sieri bovini di referenza negativi, debolmente positivi e positivi appartenenti alla seroteca del Centro di Referenza Nazionale della LEB.

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DI *METAPNEUMOVIRUS* AVIARE IN ITALIA

Mattia Cecchinato (a), Elena Catelli (b), Caterina Lupini (b), Enrico Ricchizzi (b), Patrizia Pesente (c), Luigi Sperati Buffoni (c), Carlo Franciosi (b), Clive J. Naylor (d)

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

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

(c) *Laboratorio Tre Valli, San Martino Buon Albergo, Verona*

(d) *Department of Veterinary Pathology, University of Liverpool, Liverpool, UK*

I *Metapneumovirus* Aviari (AMPV) sono virus ad RNA appartenenti alla famiglia delle *Paramyxoviridae* ed al nuovo genere *Metapneumovirus*. Sono causa nel tacchino di un'infezione delle prime vie respiratorie nota come Rinotracheite del Tacchino (TRT), mentre nel pollo sono responsabili di forme respiratorie più o meno lievi, che possono sfociare nella Sindrome della Testa Gonfia (SHS). Sono stati sino ad ora individuati 4 sottotipi di AMPV (A, B, C e D). Le prime segnalazioni di TRT in Italia risalgono agli anni 1987-88. Da allora la malattia si diffonde ampiamente nell'allevamento del tacchino e compare anche nel pollo e nel fagiano. La diffusione del sottotipo B è prevalente anche se dal 2003 compare anche il sottotipo A. Allo scopo di studiare l'evoluzione negli anni dei virus che hanno circolato in Italia è stata eseguita l'analisi filogenetica dei geni che codificano per le proteine di superficie G (adsorbimento) ed F (fusione). Sono stati presi in considerazione 7 ceppi sottotipo A e B isolati in Italia dal 1987 al 2004. Dopo estrazione dell'RNA virale sono state eseguite 6 RT-PCR indipendenti, disegnate in modo da amplificare l'intera sequenza dei geni oggetto di studio. I prodotti di amplificazione sono stati successivamente sequenziati e paragonati con sequenze analoghe di ceppi AMPV isolati in altre parti del mondo o vaccinali, sia sottotipo A sia B o C, disponibili in *GenBank*. L'analisi filogenetica eseguita sul gene F ha evidenziato come i sottotipi B italiani formino un unico gruppo con i principali ceppi europei dell'omologo sottotipo, mostrando una identità >98%, ad indicare un'origine comune e l'occorrenza di mutazioni minime nell'arco dei circa 20 anni trascorsi dal primo isolamento. All'interno del gruppo è stato possibile evidenziare due sottogruppi. Gli isolati più recenti (2001-2004) sono chiaramente distinti dagli isolati del decennio precedente e questo risultato è avvalorato da un alto valore di *bootstrap*. Osservando più nel dettaglio le omologie fra i ceppi italiani è possibile vedere un andamento chiaramente legato al tempo poiché nel ventennio considerato il grado d'identità lentamente decresce dal 99,5% al 98%. Paragonando, poi, un ceppo tacchino con due ceppi pollo, isolati a pochi mesi di distanza, l'identità risulta del 99,6% e 99,8%, ad indicare l'assenza di differenze genetiche legate al tropismo d'ospite. AMPV-B in Italia sembra, dunque, evolvere lentamente negli anni. L'analisi filogenetica del gene G conferma tale andamento. Solo un ceppo sottotipo A è stato sequenziato ed ulteriori studi hanno dimostrato la sua origine vaccinale. Sarà necessario sequenziare altri AMPV-A per definire se autentici ceppi di campo appartenenti a questo sottotipo circolano in Italia. Questi risultati sono gli unici dati di epidemiologia molecolare di *Metapneumovirus* aviare in Italia attualmente disponibili.

PROTEOMICA IN VIROLOGIA: IDENTIFICAZIONE DELLA PROTEINA GP71L DEL VIRUS DELLA MIXOMATOSI USATO QUALE ANTIGENE NELLA SIEROLOGIA

Simone Cristoni (b), Giuliana Botti (a), Antonio Lavazza (a), Emiliana Brocchi (a), Lorenzo Cappucci (a)

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

(b) *Consulente Ion Source & Biotechnologies srl, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Milano*

Il *Myxoma virus* (MV), genere *Leporipoxvirus* della famiglia delle *Poxviridae*, è l'agente eziologico della mixomatosi del coniglio Europeo (*Oryctolagus cuniculus*), malattia endemica in Europa e causa di ingenti danni per la cunicoltura nazionale. Il DNA del virus codifica per oltre 100 proteine, parte delle quali interagiscono direttamente sul sistema immunitario dell'ospite, sia innato che acquisito, inficiandone le capacità di riconoscere ed eliminare il virus. Sebbene la protezione indotta dai vaccini attenuati in uso sia legata all'attivazione della parte cellulare della risposta immune, il conoscere lo stato della risposta umorale è di indubbia necessità anche per fini epidemiologici e di sorveglianza. Per questo è stata sviluppata e posta in uso un'ELISA per competizione basata sull'impiego di un anticorpo monoclonale (MAb) anti-MV specifico per una proteina virale immunodominante, di circa 35 kd. L'antigene è di facile preparazione a partire da cellule RK13 infette da MV, criolizzate e precipitate con ammonio solfato. La preparazione è conservata in glicerolo al 50% a -20°C, condizione in cui è stabile per oltre un anno. I titoli anticorpali medi in animali ad un mese dalla vaccinazione variano mediamente da 1/80 a 1/640, mentre quelli in animali convalescenti raggiungono 1/20.480. Al fine di approfondire le conoscenze antigeniche sul virus e validare la prova sierologica, è necessario individuare e caratterizzare la proteina *target* del MAb prescelto. Per questo la proteina è stata immunoprecipitata da RK13 infettate, separata tramite PAGE SDS ed evidenziata mediante colorazione con blu di comassie. Diversamente dai controlli negativi (RK13 non infettate e MAb non anti-MV), nel campione infetto da MV il MAb anti-MV evidenziava una banda di 50-100 ng del peso di circa 35 Kd. La banda è stata tagliata, il gel dializzato, disidratato e reidratato in una soluzione con tripsina e la digestione eseguita overnight a 37°C. Il campione è stato quindi analizzato con LCQ DECA XP Plus ThermoFinnigan - colonna di C-18). I peptidi originati dalla digestione enzimatica, una volta separati per via cromatografia sulla base della loro idrofobicità, sono stati analizzati nello spettrometro, attraverso ionizzazione e frammentazione e l'applicazione di potenziali elettrici, statici e variabili. La proteina è stata identificata per ricerca delle sequenze peptidiche, correlabili con gli spettri di frammentazione ottenuti, nelle banche dati utilizzando il programma Mascot (<http://www.matrixscience.com>). La proteina m71L è stata identificata con score statistici significativi (*Probability Based Mowse Score*: 102-200) e con recuperi di sequenza variabili (8-32%) in funzione della quantità analizzata.

SORVEGLIANZA SUGLI STIPITI VIRALI DI INFLUENZA EQUINA ISOLATI IN ITALIA IN RAPPORTO ALLA PROFILASSI IMMUNIZZANTE

Armando Damiani (a), Maria Teresa Scicluna (a), Ilaria Maria Ciabatti (a), Giusy Cardeti (a), Giuseppe Vulcano (a), Paolo Cordioli (b), Vito Martella (c), Marcello Sala (a), Demitrio Amaddeo (a), Gian Luca Autorino (a)

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

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

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

Vengono riportati i dati relativi alla caratterizzazione genetica dei virus H3N8 di influenza equina isolati in Italia nel periodo 1999-2005. Gli stipiti sono stati isolati in occasione di focolai accertati nel corso dell'attività di sorveglianza condotta dal Centro di Referenza per le Malattie degli Equini presso alcuni ippodromi italiani ed a seguito di diagnosi virologiche condotte da altri Laboratori in seguito a casi di sindromi respiratorie. L'allineamento e l'analisi filogenetica della sequenza degli aminoacidi della emoagglutinina (HA1) ha permesso di collocare gli isolati nel periodo 2003-2005 a Roma ed a Bari nel *lineage* americano, e di stabilire una correlazione con altri virus influenzali equini recentemente isolati in Europa e nel continente americano, nonché all'ultimo prototipo raccomandato nella composizione dei vaccini (A/eq/South Africa/4/2003). Questi isolati risultano comunque diversi dallo stipite di riferimento (A/eq/Newmarket/1/93) precedentemente raccomandato dall'*Expert Surveillance Panel on Equine Influenza Vaccines*. Il virus isolato nel 1999 in Lombardia risulta invece appartenere al *lineage* europeo. Considerato che gli stipiti *American-like* sono stati isolati in occasione di focolai di malattia verificatisi anche in soggetti vaccinati, vengono discussi i seguenti, possibili, fattori di rischio alla base del verificarsi di tali situazioni:

- inadeguatezza dei protocolli vaccinali, con particolare riferimento ai giovani soggetti;
- vaccini commercializzati nel nostro Paese nella cui composizione sono presenti stipiti eterologhi rispetto a quelli raccomandati dall'OIE;
- eccessivi ritardi nell'adeguamento dei vaccini rispetto all'evolvere della situazione epidemiologica;
- scarsa sensibilità da parte dei veterinari utilizzatori rispetto all'impiego di vaccini efficaci.

P4. ANALISI MOLECOLARE DEI VIRUS INFLUENZALI H5N1 ISOLATI IN AFRICA, 2006-2007

Paola De Benedictis (a), Isabella Monne (a), Alice Fusaro (a), Mona Mehrez Aly (b), Emmanuel Couacy-Hymann (c), Tony Manuel Joannis (d), Hiver Boussini (e), Steven L. Salzberg (f), Ilaria Capua (a), Giovanni Cattoli (a)

(a) OIE, FAO National Reference Laboratory for Avian Influenza and Newcastle Disease, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

(b) Central Laboratory for Quality Control on Poultry Production, Animal Health Research Institute, Dokki, Giza, Egypt

(c) Central Laboratory of Animal Pathology, Bingerville, Ivory Coast

(d) Viral Research Department, National Veterinary Research Institute, Vom. Plateau State 5, Nigeria

(e) Virology Department, Laboratoire National d'Elevage, Ouagadougou 03, Burkina Faso

(f) Center for Bioinformatics and Computational Biology, Institute for Advanced Computer Studies, University of Maryland, MD, USA

Nel gennaio 2006 è stato registrato in Africa il primo focolaio di influenza aviaria ad alta patogenicità, causato dal sottotipo H5N1. Da allora l'infezione si è diffusa rapidamente nel continente africano, infettando allevamenti industriali e rurali e uccelli selvatici in 8 differenti Stati (Burkina Faso, Camerun, Gibuti, Egitto, Costa D'Avorio, Niger, Nigeria e Sudan). 36 casi di infezione nell'uomo sono stati inoltre diagnosticati in Africa (11 aprile 2007). Nell'ultimo anno, il Laboratorio di Referenza OIE/FAO per l'influenza aviaria ha ricevuto ed analizzato oltre 1.000 campioni di origine aviaria provenienti da 13 Stati africani, confermando la presenza dell'infezione da A/H5N1 in 6 degli Stati assistiti. Al fine di studiare l'eventuale evoluzione del virus, l'intero genoma di alcuni isolati rappresentativi è stato sequenziato ed analizzato filogeneticamente. Tutti gli isolati africani analizzati si distinguono dai ceppi isolati presenti nel sud-est asiatico, mentre sono strettamente correlati ai ceppi circolanti dalla fine del 2005 in Europa, Russia e Medio Oriente e agli A/H5N1 umani isolati in Egitto e Gibuti. Distinti sottogruppi genetici, spesso correlati all'origine geografica degli isolati, possono essere inoltre identificati all'interno del gruppo euro-africano. Si sono inoltre evidenziati fenomeni di riassortimento genetico tra le diverse linee genetiche. L'analisi della sequenza aminoacidica dedotta ha inoltre rivelato, in alcuni isolati, mutazioni correlate ad un maggiore adattamento del virus aviario all'ospite mammifero; esempio la mutazione PB2 E627K e la HA M230I. In nessun ceppo fino ad ora analizzato sono state osservate mutazioni determinanti una resistenza del virus ai comuni antivirali. L'insieme dei dati che emergono dal presente lavoro dimostra l'importanza dell'attività di sorveglianza e monitoraggio dell'epidemia da virus influenzali al fine di seguirne e comprenderne l'evoluzione e contenere l'impatto sulla salute pubblica. La disponibilità di sequenze genomiche complete dei ceppi circolanti appare quindi come uno strumento fondamentale a disposizione della comunità scientifica internazionale per studiare l'evoluzione di questa infezione. Uno sforzo internazionale nel sostegno ai paesi africani è indispensabile per delimitare la diffusione dell'epidemia in questo continente.

ASPETTI PATOGENETICI DELL' INFEZIONE ORALE ED INTRACEREBRALE DI OVINI DI RAZZA SARDA CON L'AGENTE DELLA SCRAPIE

Luigi De Grossi (a), Romolo Nonno (b), Gabriele Vaccari (b), Claudia D'Agostino (b), Michele Angelo Di Bari (b), Stefano Marcon (b), Francesco Giordani (b), Francesca Rosone (b), Anna Rita Pifferi (b), Umberto Agrimi (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma

(b) Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La patogenesi della scrapie ovina naturale è influenzata da numerosi fattori tra cui appaiono particolarmente importanti il genotipo della PrP ed il ceppo di agente in causa. Nel presente studio è stata condotta una infezione sperimentale con un isolato italiano di scrapie, in pecore di razza Sarda portatrici di differenti genotipi della PrP. Sono state impiegate - alternativamente - la via di infezione intracerebrale, per valutare la suscettibilità genetica individuale in condizioni di infezione particolarmente "efficaci", e la via orale, al fine di indagare la patogenesi della malattia in condizioni più vicine a quelle naturali. L'inoculo era costituito da omogenato cerebrale di pecore di razza Sarda con genotipo ARQ/ARQ. Il ceppo di scrapie impiegato per l'infezione sperimentale è stato caratterizzato con metodiche di tipizzazione molecolare e biologica. Lo studio è stato effettuato su un totale di 162 soggetti. I principali risultati dello studio, a distanza di circa 5 anni dall'infezione, dimostrano che: i) i primi segni di accumulo di PrP^{Sc} nei soggetti maggiormente suscettibili (ARQ/ARQ) si osservano a livello tonsillare a soli 50 gg dal momento dell'infezione orale; ii) a circa 9 mesi dall'infezione, tutti i distretti del sistema linfo-reticolare appaiono coinvolti dall'accumulo di PrP^{Sc}; iii) a 12 mesi (ovvero circa un anno prima dello sviluppo dei segni clinici), si osserva la deposizione di PrP^{Sc} a livello del SNC; iv) la cinetica di accumulo della PrP^{Sc} nell'organismo appare rallentata nei soggetti ARQ/AHQ, suggerendo una minore suscettibilità di tale genotipo; v) l'infezione intracerebrale mostra l'esistenza di un chiaro gradiente di suscettibilità genetica dei vari alleli: ARQ>AHQ>ARH; vi) nessuno dei soggetti portatori dell'allele ARR, infettati per via orale o intracerebrale, ha sviluppato ad oggi segni clinici di malattia; vii) alcuni ovini, portatori di ulteriori variazioni del gene della PrP (M137T, I142K e N176K) su un background ARQ/ARQ mostrano anch'essi assenza di sintomi clinici a distanza di 1.200 gg dallo sviluppo della malattia da parte dei soggetti privi di tali variazioni. I risultati sinora ottenuti contribuiscono a chiarire la patogenesi della scrapie nella più importante razza ovina italiana, a perfezionare le conoscenze sulla distribuzione della PrP^{Sc} nell'organismo infetto e confermano la validità delle strategie di selezione genetica adottate nel controllo e nella prevenzione della scrapie, indicando ulteriori alleli - oltre all'ARR - in grado di conferire resistenza alla scrapie.

P5. INFEZIONE DA HEV IN BOLIVIA: ANALISI MOLECOLARE E SIEROLOGICA SU CAMPIONI UMANI E SUINI

Maria Chiara Dell'Amico (a), José Luis Gonzales (b), Sara Irene Bonelli (c), Ybar Valda (b), Angela Pieri (a), Annalisa Cavallo (c), Vladimir Bejarano (d), Maurizio Mazzei (a), Ramón Ibañez (b), Alessandro Bartoloni (c), Francesco Tolari (a)

(a) *Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Università degli Studi, Pisa*

(b) *Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Veterinario (LIDIVET), Santa Cruz, Bolivia*

(c) *Clinica Malattie Infettive, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi, Firenze*

(d) *Convenio de Salud de Bolivia, La Paz, Bolivia*

Uno studio multidisciplinare è stato condotto in due comunità rurali del sud-est della Bolivia, Bartolo e Casas Viejas, allo scopo di: verificare la presenza del virus dell'epatite E (HEV) su campioni fecali umani e suini mediante *Nested RT-PCR*; determinare sugli stessi campioni il genotipo degli isolati virali; ricercare anticorpi anti-HEV IgG e IgM su campioni di siero umano con metodica immunoenzimatica (ELISA). Sono stati esaminati 238 soggetti (65 a Casas Viejas e 173 a Bartolo) di età compresa fra 2 mesi e 87 anni (media 30,5 anni) di cui 112 femmine e 126 maschi. La quasi totalità dei soggetti esaminati viveva in ambienti dove erano presenti suini. Nessuno presentava segni clinici compatibili con epatite e solo tre riferivano un pregresso episodio itterico. I campioni di feci umane provenivano da 122 soggetti (90 di Bartolo e 32 di Casas Viejas). Le prove sono state eseguite su *pool* di campioni di 4-10 individui ciascuno, creati riunendo campioni individuali in base all'età del soggetto ed alla comunità di appartenenza. Le feci suine provenivano da 121 soggetti (67 di Bartolo e 54 di Casas Viejas), i *pool* erano creati unendo i campioni di 4-7 soggetti. La ricerca del genoma virale nelle feci umane e suine è stata eseguita mediante: chiarificazione delle feci; estrazione dell'RNA virale; esecuzione di *Nested RT-PCR* per amplificare un frammento di 348bp di una regione altamente conservata del gene ORF2; purificazione degli amplificati delle dimensioni attese; estrazione del DNA. Il sequenziamento è stato eseguito da BMR-Genomics, Padova. Per l'analisi delle sequenze sono stati utilizzati i programmi BioEdit e Blast disponibili *on line*. Il test ELISA sui sieri umani è stato eseguito utilizzando *kit* commerciali (DIA.PRO, Milano): uno specifico per IgG su 240 sieri (172 di Bartolo, 64 di Casas Viejas) ed uno specifico per IgM su 52 sieri (30 di Bartolo di cui 5 *Nested RT-PCR* positivi, 14 di Bartolo IgG positivi, 4 di Bartolo e 4 di Casas Viejas IgG dubbi). Il genoma di HEV è stato isolato in 1/22 *pool* di feci umane (4,55%), di Bartolo e in 7/22 *pool* di feci suine (31,8%), dei quali 6 di Bartolo ed 1 di Casas Viejas. L'analisi delle sequenze ha permesso includere nel genotipo III sia l'isolato virale umano che i 7 suini. Sono risultati positivi al test ELISA per IgG ed IgM rispettivamente 12/240 (5%) e 4/52 (8%) campioni di siero umano.

P6. CLONAGGIO, ESPRESSIONE E CARATTERIZZAZIONE ANTIGENICA DELLA PROTEINA DEL CAPSIDE DI UN CEPPLO DI NOROVIRUS

Ilaria Di Bartolo (a), Simone Magnino (c), Marina Monini (a), Maria Grazia Ammendolia (b), Franco Maria Ruggeri (a)

(a) Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(c) Sezione Diagnostica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna Bruno Ubertini, Pavia

I *Norovirus* (NoV) sono virus enterici con genoma a RNA a polarità positiva (7,2-7,7 kb) composto da tre *open reading frame* (ORF). La ORF1 codifica per una poli-proteina non strutturale, l'ORF2 codifica per la proteina strutturale principale che sotto forma di 90 dimeri costituisce il capsido virale e la ORF3, a cui non è stata ancora attribuita una chiara funzione, codifica per una proteina strutturale minore. Nell'uomo, i NoV causano sintomatologia gastroenterica (GE) spesso associata a focolai epidemici che coinvolgono un ampio numero di persone. Dall'analisi filogenetica delle sequenze della ORF2, i NoV vengono suddivisi in 5 genogruppi (GG): i virus appartenenti al GGI e al GGII sono stati individuati nell'uomo, mentre il GGIII è stato riscontrato solo nei bovini (*Bovine Enteric Calicivirus*, BECs). Il genogruppo III appare geneticamente correlato al GGI, e questa correlazione costituisce la base per una possibile trasmissione all'uomo. Non sono stati ancora sviluppati sistemi di coltura *in vitro* per i *Norovirus*, pertanto la diagnosi di infezione virale si basa sulla visualizzazione dei virioni nei campioni clinici o sull'identificazione dell'RNA virale mediante metodi di biologia molecolare. In un precedente studio di prevalenza dei *Norovirus* in bovini del nord Italia, è stata riscontrata la presenza di BEC anche negli allevamenti italiani, con una prevalenza del 23%. I ceppi appartenevano al GIII, in linea con quanto descritto nel resto dei paesi europei. Uno dei ceppi identificati è stato ulteriormente caratterizzato mediante il sequenziamento della ORF2 codificante per la proteina del capsido virale dimostrando che si trattava di un ceppo BEC CH131-like, già identificato in Olanda. Il gene ORF2 di questo ceppo è stato clonato nel vettore ricombinante di *Baculovirus* ed espresso in cellule di insetto Sf9. I lisati cellulari sono stati esaminati al microscopio elettronico con tecniche di colorazione negativa, ed è stato osservato che la proteina VP1 espressa, si autoassemblava efficientemente in particelle simil-virali prive di genoma, denominate VLPs (*Virus-Like Particles*). Le VLP prodotte sono state purificate e utilizzate come antigene per produrre un siero policlonale. I reattivi immunologici ottenuti in topi Balb/c ci hanno permesso di caratterizzare le VLPs prodotte mediante saggi ELISA e *Western blotting*. I risultati preliminari ottenuti indicano l'immunogenicità nel topo delle VLPs prodotte, che potranno quindi essere utilizzate in saggi immunodiagnostici.

EPIDEMIE DI GASTROENTERITE ACUTA CAUSATE DA NOROVIRUS TRASMESSI PER VIA ALIMENTARE

Ilaria Di Bartolo (a), Tolinda Gallo (b,c), Massimo Zuliani (d), Charmaine Gauci (e), Franco Maria Ruggeri (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Prevenzione, Azienda per i Servizi Sanitari 4 Medio Friuli, Udine*

(c) *Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(d) *Dipartimento di Prevenzione, Azienda per i Servizi Sanitari 5 Bassa Friulana Zuliani, Palmanova, Udine*

(e) *Department of Public Health, Ministry of Health, The Elderly and Community (MHEC), Malta*

I *Norovirus* appartengono alla famiglia *Caliciviridae* e sono una causa rilevante di gastroenterite acuta negli adulti e nei bambini. Sono inoltre noti ceppi infettanti i bovini e i suini, che potrebbero rappresentare un *reservoir* di NoV con potenziale zoonotico. Le analisi di sequenza del gene codificante per la proteina capsidica consentono di distinguere i NoV in più genogruppi: GGI, GGII sono tipici dell'uomo, mentre il GGIII include virus bovini (BEC). Nell'uomo, l'infezione da NoV ha un decorso acuto autolimitante. Tuttavia, la ridottissima carica infettante e la persistenza nell'ambiente favoriscono epidemie anche molto vaste, per passaggio persona-persona e/o esposizione ad alimenti (frutti di mare, vegetali e frutta), acque o ambienti contaminati con virus. In questo studio vengono descritti i risultati dell'indagine virologica ed epidemiologica condotta durante epidemie di GE negli anni 2005-2007 in Italia. Una prima epidemia di gastroenterite ha coinvolto 184 persone nel dicembre 2005. Una prima indagine, seguita all'allerta di tossinfezione, suggeriva una possibile fonte comune, legata al consumo di pasti in un unico ristorante. Ad una successiva indagine nei locali di ristorazione, veniva riscontrato che 6 dei 15 alimentaristi avevano presentato sintomi gastroenterici e che un bambino accudito da uno degli alimentaristi era stato oggetto di GE e probabilmente rappresentava il caso indice dell'epidemia. È stata condotta un'indagine di laboratorio su campioni di feci dei soggetti affetti, su tamponi ambientali e campioni alimentari. Quattordici campioni clinici di commensali o personale del ristorante sono risultati positivi per *Norovirus* mediante test diagnostici molecolari. Alcuni alimenti (antipasti di pesce) risultavano associati all'infezione su base epidemiologica, in assenza tuttavia di conferma di laboratorio. Un tampone ambientale della cucina risultava contaminato da *Norovirus*. Un secondo gruppo di epidemie con caratteristiche analoghe ha coinvolto nel gennaio 2007 almeno 65 individui in tre diversi ristoranti. L'indagine epidemiologica evidenziava un rischio relativo elevato associato al consumo di ostriche crude provenienti da un'unica partita nei tre diversi episodi di gastroenterite. L'indagine virologica effettuata su campioni di feci dei pazienti confermava il coinvolgimento di *Norovirus* in tutti i focolai epidemici. Il campione di ostriche consumato nei tre ristoranti risultava anch'esso contaminato da *Norovirus*. Per una caratterizzazione molecolare dei virus coinvolti, i campioni positivi provenienti dall'alimento e dalle feci sono stati sottoposti ad analisi di sequenza. La comparazione delle sequenze con le banche dati dell'NCBI e del FBVE evidenziava il coinvolgimento di più ceppi virali che risultavano tuttavia presenti sia nelle ostriche che nei campioni fecali.

P7. IMPIEGO DELLE TECNICHE DI IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA ED ELISA PER LA RICERCA DEGLI ANTICORPI IGM NELLA DIAGNOSI DI CIMURRO DEL CANE

Cristina Esmeralda Di Francesco (a), Barbara Di Martino (a), Ivana Massirio (b), Fulvio Marsilio (a)

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

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

La diagnosi di certezza di cimurro nel cane deve essere condotta attraverso l'impiego del laboratorio. In particolare, la diagnosi sierologica può essere effettuata mediante la determinazione nei campioni di siero degli anticorpi neutralizzanti il virus del cimurro (CDV). Tuttavia tale riscontro non è sempre di facile interpretazione sia perchè nelle prime fasi dell'infezione il titolo anticorpale può essere basso o del tutto assente sia perchè gli anticorpi conseguenti all'infezione non sono distinguibili da quelli derivanti dall'immunità di origine materna o vaccinale. La determinazione degli anticorpi della classe M (IgM) può essere una valida alternativa in grado di evidenziare fin dalle prime fasi l'infezione da CDV e di fornire in questo modo una diagnosi precoce utile anche ai fini clinici. Infatti gli anticorpi IgM anti-CDV compaiono molto precocemente nel corso dell'infezione e il titolo anticorpale persiste fino a qualche mese dopo. Presso il nostro laboratorio sono da tempo disponibili tecniche in immunofluorescenza indiretta (IFI) ed ELISA da noi sviluppate per la diagnosi di cimurro mediante la ricerca degli anticorpi IgM specifici. Obiettivo di questo studio è stato quello di applicare i test di IFI ed ELISA per la determinazione degli anticorpi IgM anti-CDV su un campione di 200 sieri di cani con sintomatologia riferibile a cimurro al fine di valutare le caratteristiche di sensibilità e specificità di entrambe le metodiche rispetto alla prova di *Western Blotting* (WB) utilizzata come *golden standard*. Su un totale di n. 120 campioni di siero positivi in WB, n. 72 (60%) sono risultati positivi e n. 48 (40%) sono risultati negativi in ELISA mentre alla prova di IFI n. 46 (38%) sieri sono risultati positivi e n. 74 (62%) negativi. Su un totale di n. 80 campioni negativi in WB, n. 21 (27%) sono risultati positivi e n. 59 (73%) sono risultati negativi in ELISA, mentre alla prova di IFI n. 23 (29%) sono risultati positivi e n. 57 (71%) negativi. L'indice di concordanza tra ELISA e WB è stato del 65% mentre tra IFI e WB tale valore è stato del 51%. I risultati ottenuti dimostrano come rispetto alla prova di WB, allestita come *golden standard*, entrambe le metodiche abbiano valori di sensibilità e specificità inferiori. Tuttavia, la facilità di allestimento e la rapidità di esecuzione rendono vantaggioso l'impiego della prova di IFI anche se il valore molto basso di sensibilità non ne rende possibile la scelta come unico test diagnostico. Infatti la tecnica ELISA ha mostrato valori di sensibilità e indice di concordanza con il *golden standard* superiori suggerendo come questa tecnica possa essere impiegata come prova alternativa a quella di IFI o in associazione con quest'ultima al fine di ridurre il numero di falsi negativi nella diagnosi di cimurro.

CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA E FENOTIPICA DI UN CEPPLO FCV ISOLATO NEL CANE

Barbara Di Martino, Cristina Esmeralda Di Francesco, Sergio Frangione, Fulvio Marsilio
Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Università degli Studi, Teramo

Il *Calicivirus felino* (FCV) è un virus appartenente alla famiglia *Caliciviridae*, genere *Vesivirus* e rappresenta uno dei patogeni più comunemente associati al complesso delle infezioni respiratorie del gatto. Sebbene FCV risulta in grado di infettare solo membri della famiglia *Felidae*, in alcune occasioni ceppi FCV-like sono stati isolati anche dal cane. Tuttavia le informazioni riguardanti l'epidemiologia di questo virus nel cane risultano ancora scarse. Scopo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare dal punto di vista genotipico e fenotipico un ceppo di FCV isolato dal cane. Un campione di feci diarroiche proveniente da un cucciolo di tre mesi di età è stato impiegato per inoculare cellule CrFK, MDCK e A72. La comparsa di effetto citopatico riferibile a FCV è stato osservato soltanto nelle cellule CrFK a partire dal primo passaggio. Il campione di feci e i surnatanti collezionati dalle cellule infette sono stati quindi sottoposti ad estrazione degli acidi nucleici e analizzati mediante nested RT-PCR per FCV. Il prodotto amplificato è stato sequenziato e sulla base delle sequenze ottenute sono state disegnate due coppie di *primers* in grado di amplificare un frammento di 1.550 bp del gene ORF1 e l'intero gene ORF2. I prodotti di amplificazione sono stati purificati e legati al plasmide pCR 2.1, inseriti in cellule *E. coli* DH5 alfa e i cloni ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento. Le sequenze sono state confrontate con analoghe sequenze disponibili sul database della *GenBank* e analizzate con i programmi DAMBE E MEGA. La caratterizzazione fenotipica del ceppo FCV isolato è stata eseguita mediante metodo delle placche comparando la curva di crescita [4, 8, 12, 24 ore post-infezione (PI) con indice di molteplicità di 00,5 e 10] e la resistenza termica (41,8, 46,2, 52,2, 56,9 e 62,0°C per 30 min) di quest'ultimo, con quelle del ceppo vaccinale F9. Il sequenziamento nucleotidico ha dimostrato che tra il ceppo isolato (10/Te/07) e le sequenze nucleotidiche FCV disponibili sul database della *GenBank* esiste un'omologia compresa tra il 72% e l'80%; a livello aminoacidico la massima identità è stata riscontrata con il ceppo F65 (circa 88%). Un aspetto interessante riguarda le caratteristiche replicative di quest'ultimo che sono risultate analoghe a quelle dei ceppi FCV associati a viremia sistemica (VS) nel gatto. In particolare, l'analisi mediante metodo delle placche ha evidenziato la formazione di placche più grandi da parte del ceppo 10/Te/07 rispetto a quelle ottenute durante la replicazione di F9, mentre lo studio della cinetica replicativa ha rilevato che il massimo picco di crescita del ceppo 10/Te/07 si realizza tra le 4 e le 8 ore PI, a differenza di F9 in cui il picco viene raggiunto tra le 12 e le 24 ore PI. Le prove di resistenza termica hanno evidenziato in analogia a quanto si osserva per F9, la progressiva riduzione del titolo virale quando esposto a temperature superiori a 41,8°C. In conclusione, l'isolamento del virus e le indagini da noi condotte confermano, come già riportato in precedenti studi, la circolazione interspecifica di FCV, un aspetto questo che meriterebbe ulteriori indagini finalizzate a valutare se la trasmissione di tale specie virale è limitata soltanto al cane e gatto o se coinvolge anche altri mammiferi, uomo compreso.

VALUTAZIONE *IN VITRO* DI ALCUNI DISINFETTANTI NEI CONFRONTI DI FCV, QUALE MODELLO PER LO STUDIO DELL'INATTIVAZIONE DEI *CALICIVIRUS* UMANI

Barbara Di Martino, Cristina Esmeralda Di Francesco, Ottavio Palucci, Fulvio Marsilio
Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Università degli Studi, Teramo

Il *Calicivirus* felino (FCV) appartenente alla famiglia *Caliciviridae*, genere *Vesivirus*, oltre a rappresentare un importante patogeno del gatto, viene riconosciuto come ottimo modello sperimentale per lo studio dei *Calicivirus* umani attualmente considerati tra le cause più comuni di gastroenterite epidemica di origine non batterica nell'uomo. Nonostante le recenti acquisizioni sulle caratteristiche morfologiche di questi virus, le indagini finalizzate ad individuare un corretto metodo di inattivazione mediante disinfezione, risultano limitate a causa della mancanza di un substrato cellulare che permetta la replicazione virale. Quindi, obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare l'azione *in vitro* di alcuni disinfettanti quali alcool etilico, alcool isopropilico e clorammina nei confronti di quattro ceppi FCV, da impiegare come modello sperimentale per i *Calicivirus* umani. Le indagini sono state eseguite sul ceppo vaccinale FCV F9 e su tre ceppi di campo isolati presso il nostro laboratorio; in particolare un ceppo FCV isolato dal faringe di un gatto con sintomatologia respiratoria (designato FCV/1), il ceppo FCV 10/Te/06 isolato dalle feci di un cane con gastroenterite ed infine un ceppo FCV isolato da un'adenoma labiale in un gatto (designato FCV G/2000). Tutti i ceppi sono stati preventivamente titolati con il metodo della diluizione limite. Per gli esperimenti di inattivazione sono stati utilizzati etanolo 70%, isopropanolo 70%, la miscela etanolo 70% ed isopropanolo 30% ed infine la clorammina alla concentrazione di 2,5 mg/ml. L'efficacia di ciascun disinfettante è stata valutata a temperatura ambiente e secondo i tempi di esposizione di 1 min, 3 min e 10 min. Trascorso ciascun tempo, le sospensioni virus-disinfettante sono state dapprima diluite 1:10 e poi sottoposte a titolazione in piastre da microtitolazione a 96 pozzetti secondo il metodo della diluizione limite. Inoltre, sono state condotte prove di citotossicità utilizzando le diluizioni dei disinfettanti descritte in precedenza, poste sui monostrati cellulari. La lettura delle piastre è stata eseguita dopo 72 ore. I risultati ottenuti hanno dimostrato che tutti i disinfettanti sono stati in grado di determinare una generale diminuzione del titolo virale dei ceppi oggetto dello studio. Tuttavia, sono state osservate differenze relativamente al disinfettante impiegato, al tempo di contatto e al ceppo in esame. In particolare, la clorammina ha mostrato una maggiore efficacia rispetto agli altri disinfettanti già dopo 1 minuto di esposizione. Inoltre, un altro aspetto interessante riguarda il 10/Te/06, nei confronti del quale l'azione di tutti i disinfettanti è risultata poco efficace soprattutto a tempi di esposizione inferiori a 3 minuti. Quest'ultimo dato, confermerebbe la maggiore resistenza dei virus enterici rispetto ai virus respiratori e potrebbe essere indicativa del fatto che i ceppi FCV a tropismo enterico si prestano come modelli dotati di maggiore attendibilità per lo studio delle caratteristiche di resistenza dei *Calicivirus* umani.

RIFT VALLEY FEVER: ANALISI COMPARATIVA DI SISTEMI DIAGNOSTICI

Antonello Di Nardo (a), Marco De Nardi (b), Reuben K. Soi (c), Santino Prosperi (a)
(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università degli Studi, Bologna*
(b) *COOPI-Cooperazione Internazionale, Nairobi Regional Office, Nairobi, Kenya*
(c) *Kenya Agricultural Research Institute, Biotechnology Center at NARL, Nairobi, Kenya*

La *Rift Valley Fever* (RVF) è una malattia virale acuta che colpisce i ruminanti domestici e selvatici, ed è trasmissibile all'uomo; presente in Africa e Penisola Araba, recentemente si è verificata una grave epidemia nel Corno d'Africa con diversi casi letali nell'uomo. La RVF è causata da un *Phlebovirus* trasmesso da diverse specie di zanzare ed è caratterizzata da necrosi epatica e da emorragie diffuse, sebbene la malattia si evidenzia in forma acuta negli animali domestici e risulta inapparente negli animali selvatici. Essa è una zoonosi e come tale l'uomo s'infetta tramite contatto con animali portatori, con alimenti e mediante puntura di vettori infetti. Alla luce dell'ultima epidemia che si è verificata nel Corno d'Africa tra il dicembre 2006 e marzo 2007, tale malattia è da considerare d'importanza rilevante non solo per i paesi del continente africano, ma anche per una sua potenziale diffusione fuori dai confini storici. In quest'ottica, la prontezza e la rapidità nella diagnosi è d'importanza primaria nei confronti di potenziali manifestazioni epidemiche e nel controllo di possibili serbatoi di virus. La ricerca prende in considerazione un aspetto fondamentale della sorveglianza e del controllo della RVF: la diagnostica sierologica nei paesi africani. Sono state poste in comparazione due tecniche, considerate come rapidi ed efficaci strumenti diagnostici: la SNT (Sieroneutralizzazione, metodica di referenza OIE per il commercio animale) messa a punto dal *Kenya Agricultural Research Institute* di Nairobi, Kenya e l'*inhibition-ELISA* (*Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*, metodica di referenza OIE per lo screening sierologico) messa a punto dal *Onderstepoort Veterinary Institute*, Sud Africa. L'obiettivo è stato quello di valutare l'attendibilità dei due test comparando i risultati ottenuti da 340 campioni di siero di ruminanti domestici (bovini, capre, dromedari), provenienti dall'azienda Marula Estate di Naivasha, Kenya. Dall'analisi si evince come le risposte ai due test diano risultati opposti, evidenziando un'elevata sieronegatività nell'ELISA (72% negativi, 13% positivi, 15% fortemente positivi) in contrapposizione ad un elevato livello di sieropositività nella SNT (43% negativi, 40% positivi, 17% fortemente negativi). Quindi, si è voluta valutare la mancanza di concordanza comparando, con l'analisi statistica, i risultati dei due test su base dicotomica (positivi-negativi), mediante utilizzo di tabelle di contingenza 2x2 e la κ di Choen e mediante l'analisi di regressione polinomiale. Dai risultati ottenuti si evidenzia un basso livello di concordanza ($\kappa=0.23$), che sta ad indicare come, la relazione tra i valori delle Percentuali di Inibizione dell'ELISA e le diluizioni della SNT, sia definita mediante un modello di tipo cubico (3° grado polinomiale) nella funzione di regressione. Poiché è stato imputato ad un basso valore di *cut-off* utilizzato nel protocollo della SNT, sono stati rielaborati i dati della SNT ponendo un *cut-off* pari ad 1/8: in questo senso viene ad evidenziarsi un

elevato livello di sieronegatività nella SNT (79% negativi, 4% positivi, 17% negativi), comparabile ai dati forniti dall'ELISA, ed un livello di concordanza maggiore tra i 2 test ($\kappa=0,288$). Pertanto la SNT evidenzia un più elevato livello di sensibilità nell'analisi della risposta anticorpale al virus della RVF.

P8. DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI VIRUS INFLUENZALI AVIARI VIVI ED INATTIVATI: CONFRONTO TRA METODICHE CLASSICHE E RT-PCR QUANTITATIVA

Livia Di Trani (a), Umberto Agrimi (a), Paolo Cordioli (b), Ana Moreno (b), Emiliana Falcone (a), Edoardo Vignolo (a), Barbara Bedini (a), Gabriele Vaccari (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

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

L'identificazione di virus influenzali aviari in campioni biologici è un obiettivo che vede affiancati metodi tradizionali, quali test di emoagglutinazione (HA) e isolamento del virus in idonei substrati (uova embrionate di pollo, linee cellulari sensibili), a metodiche diagnostiche molecolari che rappresentano un'evoluzione della reazione di *reverse* trascrittasi PCR (RT-PCR), come la *one step real-time* PCR (qRRT). La qRRT è una PCR quantitativa, con enormi potenzialità rispetto alla RT-PCR, per flessibilità diagnostica e rapidità di risultati e consente inoltre di controllare replicazione e concentrazione dell'agente patogeno *target* della reazione. Diversi formati di qRRT, per amplificazione di specifici geni dei virus influenzali aviari, sono stati sviluppati principalmente a fini diagnostici; l'inserimento di opportuni *standard* nel saggio consente di quantificare la concentrazione virale, espressa in vRNA *gene copies*, ampliando notevolmente le potenziali applicazioni del test ad esempio rivolte a studi di patogenesi, valutazione dell'attività antivirale di farmaci, controllo della concentrazione virale di idonei vaccini. Nel presente studio è stata valutata l'idoneità del saggio di qRRT come test alternativo e/o complementare rispetto ai metodi di titolazione tradizionali (HA e titolazione su uova embrionate) dei virus influenzali aviari. A tal fine sono stati determinati i titoli, in HA e in EID50, di virus influenzali aviari appartenenti a sottotipi diversi (A/H5N3-A/H5N1-A/H6N2-A/H7N3-A/H7N7-A/H10N7). Analoghe aliquote di ciascun virus sono state sottoposte a trattamento con beta-propiolattone, per confrontare la concentrazione di vRNA *gene copies* nei rispettivi campioni, in seguito ad inattivazione. Il protocollo di qRRT adottato prevedeva l'uso di *primers* e sonda MGB per il gene della Matrice (M), in grado di amplificare una regione nucleotidica altamente conservata nei virus influenzali di tipo A. Per calcolare la concentrazione di vRNA *gene copies*, è stata costruita un'ideale curva *standard* a concentrazione nota, ed espressa in numero di copie, con RNA virale trascritto *in vitro*. A tal fine è stata inserita l'intera sequenza codificante per il gene M in un opportuno vettore plasmidico, contenente una sequenza promotore; il DNA plasmidico linearizzato e purificato è stato infine utilizzato per la trascrizione *in vitro* di RNA. Il confronto tra concentrazione di vRNA *gene copies* del gene M ed i titoli virali espressi in EID50, evidenzia una chiara correlazione quantitativa, mentre nei campioni inattivati risulta disponibile una quantità inferiore di *target* genico, in misura diversa per i virus analizzati.

P9. RICERCA DI VIRUS INFLUENZALI IN AVIFAUNA ABBATTUTA NELL'AMBITO DI ATTIVITÀ VENATORIA E IMPORTATA ILLEGALMENTE IN ITALIA

Mauro Delogu (a), Maria Alessandra De Marco (a), Barbara Bedini (b), Emiliana Falcone (b), Isabella Donatelli (c), Laura Campitelli (c), Antonio Camarda (d), Nicola Decaro (d), Canio Buonavoglia (d), Livia Di Trani (b)

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

(b) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

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

(d) *Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali, Università degli Studi, Bari*

L'importazione illegale di animali o di loro prodotti rappresenta un importante fattore di rischio per l'ingresso di patogeni in una nazione. Per l'elevata trasmissibilità, le malattie della Lista A OIE meritano particolare attenzione e in tale ambito l'influenza aviaria assume un ruolo di primo piano, a causa anche delle implicazioni zoonotiche. Al fine di valutare la presenza di virus influenzali in avifauna cacciata e importata illegalmente in Italia, nel maggio 2003, sono stati campionati a Bari 1.132 uccelli selvatici, parte di un sequestro giudiziario destinato a distruzione. Il campione includeva cinque specie di anseriformi, principale serbatoio naturale dell'influenza (*Anas crecca*, n. 150; *A. querquedula*, n. 110; *Anser albifrons*, n. 33; *A. fabalis*, n. 9; *A. anser*, n. 4), gruiformi legati a zone umide (*Fulica atra*, n. 111) e tra i Caradriformi, altro importante *reservoir* dei virus influenzali, la Beccaccia (*Scolopax rusticola*, n. 300). Inoltre, data la suscettibilità della Quaglia giapponese (*Coturnix coturnix japonica*) a 14 diversi sottotipi virali H, 180 quaglie (*C. c. coturnix*) sono state incluse nel campione. Infine, tra i Colombiformi, sono state scelte la Tortora dal collare orientale (*Streptopelia decaocto*, n. 84) specie recettiva dalle abitudini sinantropiche e la Tortora selvatica (*S. turtur*, n. 151). Su tutti i volatili è stato effettuato un tampone cloacale, mentre dalle quaglie è stato raccolto anche un tampone tracheale, poiché in questa specie prevale la replicazione in sede respiratoria. I tamponi, conservati a -80°C, sono stati esaminati mediante una metodica *one-step reverse transcription real-time PCR* (RRT-PCR) basata sull'amplificazione di una regione altamente conservata del gene matrice (M) dei virus influenzali A. Sono risultati positivi per virus influenzali di tipo A 16 tamponi cloacali prelevati da tre specie di Anseriformi, comprendenti 13 (8,7%) alzavole (*A. crecca*), 1 (0,9%) marzaiola (*A. querquedula*) e 2 (6,1%) oche lombardelle (*A. albifrons*). È stato possibile caratterizzare solo due campioni ottenuti da alzavole, entrambi risultati H5N3 a bassa patogenicità. I risultati negativi ottenuti da un campione di 300 beccacce sono probabilmente dovuti alla biologia di questa specie, meno legata ad ambienti acquatici rispetto ad altri Caradriformi. I nostri risultati ribadiscono il ruolo centrale degli Anseriformi nell'ecologia dell'influenza ed enfatizzano l'importanza delle azioni di controllo volte a evidenziare e bloccare tempestivamente qualsiasi attività di commercio illegale di animali selvatici o di loro prodotti.

P10. DIAGNOSI SIEROLOGICA DI LENTIVIRUS DEI PICCOLI RUMINANTI: STUDIO PILOTA PER VALUTARE L'EFFICACIA DI TRE METODI ELISA SULLA POPOLAZIONE OVINA DELLA TURCHIA

Francesco Giulio Feliziani (a), Eman M. Or (b), Monica Giammarioli (a), Abdullah Kayar (b), Gonul Remzi (b), Silvana Farneti (a), Francesco Vitelli (a), Silvia Preziuso (c), Yaramis Cagia Parkan (b), Maria Luisa Marenzoni (d), Vincenzo Cuteri (c), Carlo Valente (d)

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

(b) *Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Istanbul University, Turkey*

(c) *Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi, Camerino*

(d) *Dipartimento di Patologia Diagnostica e Clinica Veterinaria, Università degli Studi, Perugia*

I *Lentivirus* dei piccoli ruminanti o *Small Ruminant Lentivirus* (SRLV) appartengono ad un gruppo non oncogenico della famiglia *Retroviridae*: essi sono responsabili della artrite-encefalite virale (CAE) nella capra e della Maedi-Visna (MV) nella pecora. I virus della CAE e MV sono geneticamente ed antigenicamente correlati ed entrambi inducono una infezione persistente. I *Lentivirus*, sono responsabili di significative perdite economiche che hanno condotto allo sviluppo di programmi di controllo in Europa e nel resto del mondo. L'immunità dovuta agli SRLV non è in grado di bloccare la replicazione virale e quindi i test sierologici possono essere utilizzati per stimare la prevalenza di infezione. Sebbene la validazione delle prove di laboratorio è complicata dall'assenza di un *gold standard* universalmente accettato, il successo di diversi programmi di controllo indica che i test sierologici disponibili sono efficaci per ridurre la prevalenza di infezione. L'analisi del genoma ha dimostrato che gli SRLV sono altamente eterogenei. Le singole proteine di differenti isolati di SRLV hanno epitopi immunodominanti lineari che possono essere *strain* specifici e quindi la reazione del sistema immunitario dell'ospite verso questi epitopi può avere un impatto significativo sui test sierologici condizionandone le *performance*. Per tali motivi è stato condotto uno studio pilota con l'obiettivo di valutare le *performance* di due *kit* del commercio e un *kit* sperimentale su un campione di sieri ovini collezionati in Turchia. 249 sieri raccolti in sede di macellazione da ovini allevati in diverse province turche, sono stati analizzati con i tre *kit* ELISA e i risultati ottenuti sono stati messi a confronto con quelli provenienti da un studio condotto su sieri ovini collezionati in Italia. Gli scambi commerciali tra l'Unione Europea e la Turchia sono sempre più intensi e, data la consistenza della zootecnia ovina e caprina in questo Paese, diventa strategico avere a disposizione opportuni strumenti di valutazione del suo stato sanitario. La valutazione statistica dei risultati ha fornito indicazioni estremamente interessanti dimostrando l'affidabilità dei *kit* ELISA impiegati nello studio e confermando che ulteriori indagini mirate debbano essere condotte per stimare l'effettiva prevalenza di infezione da SRLV in Turchia.

P11. PRODUZIONE E PURIFICAZIONE MEDIANTE CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ DELLA PROTEINA GP51 DEL VIRUS DELLA LEUCOSI BOVINA (BLV) RICOMBINANTE DELETA

Katia Forti, Monica Cagiola, Francesco Giulio Feliziani, Giulio Severi, Simone Marcaccio, Miriam Menichelli, Giovanna Ferrante, Antonio De Giuseppe
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Il virus della Leucosi Bovina (BLV) appartiene alla famiglia *Retroviridae* che include agenti in grado di causare forme tumorali nei mammiferi, negli uccelli e nei rettili. Questo virus determina una risposta anticorpale che non blocca la sua replicazione nell'ospite. Numerosi Paesi hanno da tempo intrapreso piani di eradicazione nei confronti della LEB, basati sull'evidenziazione di animali infetti attraverso diagnosi sierologiche. Le tecniche tradizionalmente usate sono l'immunodiffusione in gel di agar ed il test ELISA nelle quali viene utilizzata, come antigene, la glicoproteina dell'*envelope* gp51. Questa proteina riveste particolare importanza nei meccanismi di infezione ed è quella a carattere immunodominante, stimola, infatti, la produzione degli anticorpi neutralizzanti che rivestono un ruolo cruciale sia nel ciclo vitale del virus che nella patogenesi dell'ospite. Una prima proteina gp51 ricombinante è stata prodotta in cellule d'insetto SF21 attraverso un sistema d'espressione *Baculovirus* ed utilizzata in un test ELISA. La gp51 sintetica è risultata però di difficile utilità applicativa su larga scala, data la sua elevata tendenza a formare aggregati macromolecolari che ne limitano la capacità di interazione con gli anticorpi ed interferiscono nei processi di purificazione ed inattivazione chimica del virus. In questo lavoro viene descritta la produzione di una forma deleta e più stabile della gp51 rispetto a quella precedentemente menzionata. La proteina ricombinante deleta si trova in fusione nella parte carbossi-terminale con una coda di sei residui di istidina (*6xHis tag*) e con lo *Strep-tag II*. La fusione con lo *Strep-tag II* ne ha permesso la purificazione in un singolo step attraverso una cromatografia di affinità su resina di *Strep-tactina*. La proteina ricombinate così purificata, può inoltre subire un processo di concentrazione mediante l'impiego di una matrice cromatografica di acido Nickel-nitrilotriacetico che lega la proteina a livello della sua coda di poli-stidina (tecnologia IMAC). La strategia sopra descritta è risultata essere efficace per ottenere una proteina stabile, altamente purificata e lascia inoltre intravedere possibili applicazioni in test diagnostici per le quali sono però necessari studi di caratterizzazione e di valutazione dell'attività biologica della proteina.

VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'ATTIVITÀ ANTIVIRALE DI RIBAVIRINA ED EICAR NEI CONFRONTI DEL *BETANODAVIRUS*

Elena Galletti, Sara Ciulli, Alessandra Scagliarini, Santino Prospero
*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Alma Mater Studiorum,
Università degli Studi, Bologna*

L'attività antivirale di ribavirina (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3carboxamide) e l'attività del suo derivato eicar (5-ethynyl-1-β-D-ribofuranosylimidazole-carboxamide), due composti analoghi della guanosina con effetto antivirale ad ampio spettro, sono state valutate in un precedente lavoro nei confronti del *Betanodavirus*. Tale virus a RNA, è l'agente causale dell'EncefaloRetinopatia Virale, una malattia che causa mortalità e lesioni nervose in molte specie ittiche marine d'allevamento. L'attività antivirale di ribavirina e eicar è stata definita tramite la valutazione su cellule SSN-1 della IC₅₀, CC₅₀ e l'indice di selettività che è risultato >21,7 e >9,5 rispettivamente. L'attività dei due composti è stata inoltre confermata dalla inibizione della carica virale 24, 48 e 72 ore dopo l'infezione. Al fine di verificare se l'azione dei composti sia specifica nei confronti del *Betanodavirus* e/o anche nei confronti del *Retrovirus C-type* che co-infetta la linea cellulare SSN-1, è stata messa a punto una tecnica di *real-time* PCR per la quantificazione del *Retrovirus* in cellule trattate con ribavirina e eicar. Dal monostrato di cellule SSN-1 trattate con i due composti è stato estratto l'RNA virale che è stato quindi quantificato e comparato con l'RNA virale di cellule non trattate con i due composti. La quantificazione virale ha permesso di evidenziare una costante presenza del *Retrovirus* in cellule trattate e non trattate a 24, 48 e 72 ore dall'aggiunta dei composti dimostrando quindi una mancata attività nei confronti di questo virus e, quindi, un'azione specifica nei confronti del *Betanodavirus*. Per valutare inoltre la fase del ciclo replicativo del *Betanodavirus* nel quale i due composti agiscono e quindi, il loro meccanismo di azione, 0,3 mg/ml di eicar sono stati aggiunti al monostrato di SSN-1 2, 6, 8, 9, 18, 20, 24 ore dopo l'infezione con *Betanodavirus*. Le cellule infettate e trattate con eicar sono state raccolte al raggiungimento del 100% di effetto citopatico nei controlli virus. La quantificazione del *Betanodavirus* è stata effettuata tramite *real-time* PCR dopo estrazione dell'RNA virale e retrotrascrizione. La tecnica di *real-time* PCR ha permesso di evidenziare una netta diminuzione della carica virale 2, 6 e 8 ore post infezione mentre dopo 9 ore l'attività del composto è risultata ridotta. In conclusione questi composti hanno evidenziato una buona attività antivirale supportata dagli alti indici di selettività. Dalle prove eseguite è stato dimostrato che ribavirina e eicar svolgono un'attività antivirale specifica nei confronti del *Betanodavirus* e che il meccanismo d'azione è rivolto verso le prime fasi del ciclo replicativo del virus.

INATTIVAZIONE PER CONTATTO DI *PARAPOXVIRUS*: METODI PER IL CAMPIONAMENTO E LA VALUTAZIONE DELLA CARICA VIRALE

Laura Gallina, Viola Galligioni, Santino Prosperi, Alessandra Scagliarini
*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Alma Mater Studiorum,
Università degli Studi, Bologna*

Il virus ORF è l'agente responsabile dell'ectima contagioso degli ovicapri una malattia infettiva a diffusione mondiale che può colpire anche l'uomo. L'infezione rappresenta un tipico esempio di zoonosi professionale che interessa in particolar modo le categorie di lavoratori che vengono a diretto contatto con gli animali infetti o con i loro prodotti. L'ectima contagioso rappresenta, negli animali, una malattia con importanti ripercussioni economiche e la sua diffusione a livello mondiale è strettamente connessa alla presenza e all'entità del patrimonio ovi-caprino. La diffusione e l'endemizzazione dell'infezione nei greggi sono correlate all'elevata resistenza del virus ORF nell'ambiente e alla limitata durata dell'immunità negli animali. Il virus viene disperso tramite le croste degli animali infetti che contengono alti titoli virali e ne costituiscono il mezzo ideale di conservazione. Il *pool* virale ambientale non è solo costituito dal materiale patologico infetto disperso dagli animali ammalati, ma anche da quello che deriva dalle lesioni che fanno seguito agli interventi vaccinali. In condizioni ambientali favorevoli il virus protetto dal materiale crostoso, può mantenere la sua infettività per alcuni anni. La trasmissione del virus può avvenire sia per contatto diretto con animali infetti sia indiretto con i loro prodotti o con oggetti e ambienti contaminati. Una valutazione della carica virale ambientale risulta fondamentale per valutare il rischio di infezione negli animali e nell'uomo ed eventualmente per approntare sistemi di profilassi diretta basati sulla disinfezione. Diversi disinfettanti vengono utilizzati per inattivare i *Parapoxvirus*, ma la loro efficacia non è sempre dimostrabile, inoltre non tutti i disinfettanti possono essere ugualmente impiegati in laboratorio o in ambienti dove gli animali vengono stabulati. In questo studio è stata valutata l'efficacia di due diversi metodi di campionamento per la determinazione della carica virale ambientale, è stata inoltre valutata l'efficacia di diversi prodotti disinfettanti potenzialmente utilizzabili in laboratori di ricerca o negli ambienti di stabulazione degli animali.

INFEZIONE DA CIRCOVIRUS TIPO 2 (PCV2) NEL CINGHIALE: OSSERVAZIONI PRELIMINARI

Stefano Gavaudan (a), Stefano Petrini (a), Antonio Persimoni (b), Claudio Barboni (c), Sara Briscolini (a), Marta Paniccià (a), Simone Barocci (a), Maura Ferrari (d), Chiara Bartolini (a), Franco Tonucci (a), Angelo Foglini (a)

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

(b) *Azienda Sanitaria Unica Regionale (ASUR), Fano*

(c) *Azienda Sanitaria Unica Regionale (ASUR), Camerino*

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

Il *Circovirus* suino tipo 2 (PCV2) è responsabile di ingenti danni economici nell'allevamento del suino in tutto il mondo. Il virus appartiene alla famiglia *Circoviridae*, genere *Circovirus*. L'infezione è associata ad una malattia debilitante denominata sindrome multisistemica del deperimento post-svezzamento (PMWS). Ad oggi gli studi condotti su questo agente infettivo, si riferiscono in gran parte, alla infezione da PCV2 in suidi domestici, mentre sono scarse le informazioni riguardanti la capacità di questo virus di infettare i suidi selvatici. Sulla base di queste osservazioni, sono state condotte indagini atte a rilevare la presenza del virus in popolazioni di cinghiali cacciati nella Regione Marche. A tal fine sono stati effettuati esami necroscopici, istopatologici e biomolecolari su 48 campioni d'organi costituiti da linfonodi tacheo-bronchiali, polmoni e tonsille palatine provenienti da 16 cinghiali abbattuti in diverse aree della Regione Marche. I risultati preliminari ottenuti, hanno evidenziato la presenza di 7 soggetti con lesioni macroscopiche a livello dei linfonodi bronchiali; 4 soggetti a livello polmonare e 1 con emorragie puntiformi a livello della tonsilla palatina. Le indagini istopatologiche hanno mostrato lesioni a livello del polmone in 3 soggetti, mentre in 9 campioni sono state rilevate lesioni a livello dei linfonodi bronchiali e solo in 8 tonsille palatine si riscontravano alterazioni istologiche tipiche dell'infezione di PCV2 nel suino. I dati ottenuti dalle indagini di biologia molecolare hanno rilevato l'acido nucleico virale in 7 soggetti. I risultati ottenuti dimostrano che l'infezione da PCV2 è presente nella popolazione dei cinghiali selvatici cacciati nella Regione Marche. Studi successivi saranno indirizzati all'isolamento virale, al sequenziamento genomico e all'allestimento delle prove di immunistochimica.

P12. CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI UN VIRUS DELLA DIARREA VIRALE DEL BOVINO ISOLATO DA UN FETO BUFALINO (*BUBALIS BUBALIS*)

Monica Giammarioli (a), Serena Astarita (b), Cristina Casciari (a), Giorgio Galiero (b), Flavia Gargiulo (b), Alessandra Martucciello (b), Claudia Pellegrini (a), Gian Mario De Mia (a)
(a) Centro di Referenza Nazionale per lo Studio delle Malattie da Pestivirus e Asfivirus, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia
(b) Centro di Referenza Nazionale per l'Igiene e le Tecnologie dell'Allevamento e delle Produzioni Bufaline, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Salerno

Il genere *Pestivirus* comprende quattro specie, il virus della Peste Suina Classica (PSCV), il virus della *Border Disease* degli ovini (BDV) e il virus della Diarrea Virale del Bovino di tipo 1 (BVDV-1) e di tipo 2 (BVDV-2). Il BVDV è universalmente considerato il patogeno economicamente più importante del bovino. A tutt'oggi sono conosciuti solo due subgenotipi appartenenti al BVDV-2 e almeno 11 distinti subgenotipi appartenenti al BVDV-1 (il più diffuso in Europa), cinque dei quali descritti anche in Italia, in Lombardia e in Emilia-Romagna. Nel presente studio, vengono analizzate le caratteristiche molecolari di uno stipse di BVDV isolato di recente da un feto bufalino, abortito al settimo mese di gestazione in un'azienda in provincia di Salerno. La genotipizzazione è stata condotta analizzando la regione 5'-non traslata (5'-NTR) e il gene autoproteasi (N-pro) del genoma dei *Pestivirus*. L'RNA totale è stato estratto mediante TRizol. La sintesi del cDNA è stata effettuata utilizzando dei *random primers*. La regione 5'-NTR è stata amplificata utilizzando la coppia di *primers* V324/V326 che amplifica un frammento di 288 bp. La amplificazione del gene N-pro è stata condotta utilizzando i *primers* BD1 e BD3 che amplificano un frammento di 390 bp. Gli amplificati sono stati purificati e sequenziati mediante il kit *Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing*, basato sull'incorporazione di dideossinucleotidi marcati, utilizzando il sequenziatore ABI Prism 310. Le sequenze nucleotidiche, allestite da tre diversi amplificati, sono state allineate mediante il software *Clustal X* (versione 1,83) con sequenze di stipse di riferimento presenti in *GeneBank*. L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando l'algoritmo di *neighbour-joining* con il pacchetto *Phylip* (versione 3,66). L'elaborazione statistica è stata effettuata mediante l'analisi di *bootstrap* utilizzando il programma *Seqboot*. L'albero filogenetico è stato visualizzato mediante il software *Treeview* (versione 1.6.6). Sulla base dei risultati in nostro possesso, è stato possibile classificare l'isolato in questione come BVDV-1, subgenotipo 1b, confermando la presenza di questo tipo genetico anche nel sud del nostro Paese. Inoltre, l'evidenza della circolazione di questo virus all'interno della popolazione bufalina, associata ad interruzione di gravidanza, mette alla luce un nuovo problema sanitario, sino ad oggi sconosciuto per questa specie.

RICERCA DI ENTEROVIRUS IN SEDIMENTI MARINI DELLE COSTE SICILIANE

Annalisa Guercio (a), Vincenza Cannella (a), Viviana De Gregorio (a), Emanuela Leopardi (a), Patrizia Di Marco (a), Salvatrice Vizzini (b), Stefano Vullo (a), Vincenzo Ferrantelli (a), Giuseppa Purpari (a)

(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia A. Mirri, Palermo*

(b) *Dipartimento di Biologia Animale G. Reverberi, Università degli Studi, Palermo*

In considerazione della notevole importanza del mare per l'economia della regione siciliana, non possono non rientrare tra gli interessi dell'IZS della Sicilia i problemi di sanità pubblica collegati alla pesca e all'allevamento delle specie ittiche; è indispensabile, quindi, la messa a punto di metodiche diagnostiche efficaci ed applicabili su vasta scala che possano garantire la sanità dei prodotti della pesca ed il controllo della salubrità dell'ambiente in cui questi vivono (Qualità Totale). Gli A.A. nel presente lavoro hanno saggiato per la ricerca di *Enterovirus* n. 162 campioni di sedimenti marini prelevati in aree costiere della Sicilia occidentale ed orientale contigue ad allevamenti di Molluschi Eduli Lamellibranchi (MEL). I sedimenti sono stati prelevati mediante tecnica di carotaggio e sono stati analizzati diversi strati (superficiale, medio, profondo) del campione prelevato. Fase critica del processo è stata la messa a punto di un protocollo per la concentrazione ed il recupero delle particelle virali eventualmente presenti nel campione; non esiste, infatti, a tuttoggi una metodica standardizzata che consenta rese elevate di virus dalle matrici ambientali. Successivamente si è proceduto con gli accertamenti di laboratorio utilizzando tecniche di biologia molecolare qualitativa in associazione all'isolamento *in vitro* su colture cellulari. In particolare è stata effettuata una RT-PCR generica per la ricerca degli *Enterovirus* ed una RT-PCR specifica per il virus dell'epatite A (HAV). Tutti i campioni, inoltre, sono stati inoculati sulle due linee cellulari continue FrhK-4 (*Fetal Rhesus Monkey Kidney*) e BGM (*Buffalo Green Monkey*), rispettivamente per la ricerca dell'HAV e degli altri *Enterovirus*. I campioni sono risultati tutti negativi con entrambe le metodiche, avvalorando l'ipotesi che tali agenti virali siano verosimilmente scarsamente rappresentati nei sedimenti marini e vadano altresì ricercati nelle acque sovrastanti.

SVILUPPO DI UN CLONE INFETTANTE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE CODIFICANTE LA PROTEINA GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN)

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

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

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

(c) *Department of Veterinary Pathology, University of Liverpool, UK*

Metapneumovirus aviare (AMPV) è causa nel tacchino di una delle principali patologie di questa specie nota come Rinotracheite del Tacchino (TRT). Per la profilassi della TRT sono disponibili in commercio da oltre 15 anni vaccini vivi attenuati con metodi tradizionali, che hanno portato ad un netto miglioramento del controllo della malattia. Tuttavia ancora rimangono dubbi sulle performance di tali vaccini specie in condizioni di campo. Si è osservata ad esempio la tendenza a riacquisire patogenicità e tale fenomeno sembra essere la diretta conseguenza di mutazioni genetiche anche minime. Recentemente è stato messo a punto un sistema di *reverse genetics* per AMPV sottotipo A, che permette di introdurre in punti specifici del genoma mutazioni o delezioni, di ottenere cloni infettanti con i cambiamenti apportati e di valutarne le conseguenze fenotipiche. Tale sistema fornisce uno strumento fondamentale per indagare le basi molecolari della patogenicità, e più in generale per studiare la biologia del virus. Questo lavoro descrive l'utilizzo del sistema di *reverse genetics* per generare un AMPV-A ricombinante che esprima la proteina fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*). In cDNA circolarizzato derivato da AMPV-A è stato inserito un sito di restizione mediante mutagenesi sito-specifica. Dopo taglio enzimatico è stato inserito in tale plasmide il gene che codifica per GFP. L'avvenuta ligazione, dopo trasformazione batterica, è stata verificata mediante *screening* delle singole colonie con specifiche PCR e successivo sequenziamento. Copie del plasmide purificato sono state trasfettate in cellule VERO con l'aggiunta di plasmidi di supporto che codificano per il complesso delle proteine ribonucleari (RNP). L'espressione della GFP è stata confermata mediante osservazione di fluorescenza al microscopio UV. Inoltre i risultati ottenuti mostrano come AMPV-A può essere manipolato geneticamente, grazie al sistema di *reverse genetics*, per esprimere stabilmente proteine estranee, mostrando un grosso potenziale di utilizzo quale vaccino vettore di proteine virali appartenenti a virus patogeni per i volatili o i mammiferi. Inoltre la disponibilità di AMPV-A esprimente la proteina fluorescente GFP potrà essere utile per studi di tropismo e patogenesi.

ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI UN VIRUS INFLUENZALE SUINO H1N1 RIASSORTANTE

Andrea Luppi, Ilaria Barbieri, Ana Moreno, Davide Lelli, Enrica Sozzi, Maria Grazia Zandoni, Loris Alborali, Paolo Cordioli

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

I virus influenzali tipo A sono diffusi in un'ampia varietà di specie e sono una importante causa di malattia respiratoria nel suino, nel quale si osserva la circolazione dei tre sottotipi: H1N1, H3N2 e H1N2. I virus H1N1 circolanti fino agli anni '50 erano classificati come "classici" mentre a partire dal 1979, un virus H1N1 c.d. *Avian like*, antigenicamente distinguibile dai virus H1N1 classici fino ad allora isolati, iniziò a diffondersi rapidamente nella popolazione suina di diversi paesi europei, compresa l'Italia, dove oggi è endemico e costituisce una popolazione antigenicamente e geneticamente omogenea. Presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna è stato condotto uno studio sulle caratteristiche genetiche delle emoagglutinine e neuraminidasi di un campione di virus influenzali H1N1 ed H1N2 isolati tra il 1998 ed il 2006 nel nord Italia. Nel presente lavoro sono stati impiegati 21 virus H1N1 e 6 virus H1N2. Per l'amplificazione parziale dei geni HA ed NA sono state utilizzate tre differenti Rt-PCR e per il sequenziamento gli stessi *primers* impiegati per l'amplificazione e descritti da Chiapponi nel 2003. Il sequenziamento parziale del gene HA ha evidenziato la presenza di un ceppo virale H1N1 5433/01, isolato a Brescia, che ha mostrato elevata omologia con virus H1N2 isolati alla fine degli anni '90 (omologia del 97,6% con il ceppo virale francese sw/CA/790/97 e del 95-97% con quelli isolati in Italia). Una minor correlazione (omologia del 68%) è stata osservata con ceppi H1N1 italiani e francesi isolati nello stesso periodo. Il sequenziamento del gene NA del virus H1N1 5433/01, ha evidenziato un'omologia del 99,8% con un virus omologo al ceppo francese H1N1 sw/IV/1455/99, con il quale ha presentato una scarsa correlazione per quanto riguarda il gene HA (omologia del 68,5%). Il ceppo H1N1 5433/01 costituisce, con ogni probabilità, il risultato della ricombinazione genetica tra un virus H1N2 ed un ceppo omologo al virus H1N1 sw/IV/1455/99 circolante alla fine degli anni '90.

ENCEFALOMIOCARDIOVIRUS IN UN GIARDINO ZOOLOGICO ITALIANO

Andrea Luppi (a), Camillo Sandri (c), Davide Guadagnini (c), William Magnone (c), Ernesto Pascotto (b), Daniela Gelmetti (a), Paolo Cordioli (a)

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

(b) Sezione di Biologia e Patologia Animale, Dipartimento di Scienze Animali, Università degli Studi, Udine

(c) Veterinario Parco Natura Viva, Bussolengo, Verona

Il virus dell'encefalomiocardite (EMCV), classificato nella famiglia *Picornaviridae*, genere *Cardiovirus* è conosciuto come causa di malattia nel suino ed in un'ampia varietà di mammiferi. L'abilità di questo virus nel determinare infezioni in numerose specie animali, trova conferma nelle segnalazioni di diversi focolai descritti in zoo in Australia e negli Stati Uniti. I ratti ed i topi sono gli ospiti naturali del virus e *reservoir* dell'infezione. In questo lavoro si riporta un'epidemia da EMCV occorsa nel Parco Natura Viva di Bussolengo, Verona che ha coinvolto, in un periodo di circa 4 mesi, nove lemuri (3 *Varecia variegata rubra*, 3 *Lemur catta*, 1 *Eulemur macaco macaco* e 2 *Eulemur albifrons*), due bertucce (*Macaca sylvanus*) e due uistiti (*Callithrix jacchus*). L'epidemia è iniziata a metà del mese di ottobre 2006 con notizie anamnestiche che riportavano la comparsa di mortalità, generalmente senza sintomi premonitori (solo in due casi venivano osservati abbattimento e dispnea) negli animali precedentemente descritti. Questi erano stabulati in ampie gabbie o recinti in cui era stata osservata la presenza di ratti. L'esame necroscopico evidenziava costantemente quadri di congestione polmonare, di versamento pleurico di variabile entità ma sovente modesto, solo raramente pericardico. Si rilevava inoltre lieve cardiomegalia con presenza di necrosi focali più o meno estese. Le lesioni istologiche più caratteristiche si osservavano a livello del miocardio dove si evidenziavano quadri di miocardite multifocale, caratterizzati da focolai di necrosi e disgregazione delle fibre miocardiche, associati ad infiltrazione di linfociti, di granulociti neutrofili e di macrofagi. Il materiale patologico conferito presso il laboratorio di virologia dell'IZSLER (cuore, polmoni ed encefalo) è stato inoculato su monostrato cellulare di una linea di VERO (cellule renali di *African green monkey*). L'effetto citopatico è stato osservato tra 24 e 72 ore post-inoculo e l'agente eziologico è stato identificato come EMCV tramite una metodica ELISA *sandwich*. La colorazione immunostochimica verso *Cardiovirus* marcava intensamente il citoplasma delle fibre miocardiche e la distribuzione della positività era in accordo con l'intensità della lesione osservata. Nei mesi successivi all'identificazione dell'agente eziologico, i casi di encefalomiocardite hanno assunto sempre più carattere di sporadicità, fino a scomparire completamente. La scomparsa di mortalità imputabile ad EMCV tra gli animali del parco, potrebbe essere dovuta alla limitata escrezione virale da parte degli animali infetti, unitamente alla messa in opera di misure di biosicurezza e di un programma di derattizzazione da parte del personale del giardino zoologico.

P13. PROGRAMMA DI SORVEGLIANZA SU AVIFAUNA SELVATICA VOLTO ALLA RICERCA DI VIRUS INFLUENZALI NELLE REGIONI DEL PIEMONTE, LIGURIA E VALLE D'AOSTA

Maria Lucia Mandola (a), Stefania Ghiggia (b), Elisa Barcucci (a), Stefania Salvati (a), Riccardo Orusa (b)

(a) *Laboratorio di Virologia e Sierologia Virologica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

(b) *Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Animali Selvatici, Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Aosta*

Caratteristica dei virus influenzali è l'elevata variabilità antigenica dovuta a mutazioni puntiformi e/o a variazioni maggiori dovute a riassortimento tra i diversi virus. La continua circolazione di ceppi virali a bassa virulenza (LPAI) dei sottotipi H5 e H7 rappresenta un rischio reale d'insorgenza di nuove epidemie in considerazione del fatto che i virus LPAI, dei sottotipi citati, possono mutare se introdotti nelle popolazioni avicole domestiche in virus ad alta virulenza (HPAI). La possibilità che gli uccelli selvatici siano responsabili dell'introduzione dei virus influenzali in popolazioni di uccelli allevati sembra trovare conferma nell'elevata frequenza di focolai osservati lungo le rotte migratorie degli uccelli acquatici. La predisposizione di efficaci programmi di sorveglianza (sia attiva che passiva) per l'individuazione precoce dei virus influenzali di tipo A, e in via prioritaria, dei sottotipi H5 e H7 a bassa virulenza in popolazioni di volatili selvatici da areali a rischio (siti di sosta e migrazione di volatili selvatici di specie diverse), si è dimostrata essere una delle principali vie per prevenire epidemie da virus ad alta virulenza nelle popolazioni di volatili domestici e in questo modo ridurre la possibilità, seppur remota per i nostri territori, di una trasmissione all'uomo. Il Laboratorio di Virologia e Sierologia Virologica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta esegue i test diagnostici previsti dalla Decisione 2006/437/CE del 4 agosto 2006 e dal *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals-World Organization for Animal Health (OIE)*:

- reazione di inibizione dell'emoagglutinazione (IHA) per la ricerca di anticorpi anti-influenza aviaria (la disponibilità di antigeni da H1 a H 16 permette la tipizzazione del campione sieropositivo nei riguardi di tutti i sottotipi riscontrati ad oggi in natura);
- test ELISA per la ricerca di anticorpi anti-influenza A, tipo A;
- isolamento virologico su uova embrionate di gallina *Specific Pathogen Free* per ricerca virus influenzali con metodo molecolare (RT-PCR tipo A).

Ogni campione risultato positivo alle prove sierologiche o/e a quelle virologiche, viene inviato al Centro di Referenza Nazionale di Padova per le prove di conferma, di ulteriore tipizzazione e di approfondimento filogenetico. A partire dal 22 settembre 2005 (al 20/04/2007) il Laboratorio di Virologia e Sierologia virologica dell'IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (PLV) ha testato 1170 campioni per le tre Regioni di competenza territoriale. Tutti i campioni sono risultati negativi nei confronti di influenza aviaria tipo A, e quindi anche nei confronti del sottotipo virale H5N1 HPAI.

MALATTIA DI AUJESZKY: PREVALENZA SIEROLOGICA IN UNA POPOLAZIONE DI CINGHIALE (*SUS SCROFA*) SOTTOPOSTA A GESTIONE DENSITÀ-DIPENDENTE

Andrea Marata (a), Paolo Cordioli (b), Andrea Luppi (b), Martina Zengarini (c), Federica Obber (a), Roberta Macrì (c), Serena Finotti (d), Francesca Eufelia Bono (d), Caterina Fiegna (d), Fabio Ostanello (d), Maria Alessandra De Marco (d), Mauro Delogu (d)

(a) *Parco Storico Monte Sole, Bologna*

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

(c) *Parco dei Gessi Bolognesi e Calanchi dell'Abbadessa, Bologna*

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

All'interno di una sperimentazione gestionale densità-dipendente applicata ad una popolazione di cinghiale (*Sus scrofa*) in area protetta, si è investigata la presenza e la distribuzione di anticorpi per la malattia di *Aujeszky* al fine di valutare nel tempo il rapporto tra densità della specie ospite e prevalenza sierologica della malattia. Lo studio si è svolto all'interno dei 4.844 ettari del Parco regionale dei Gessi Bolognesi e Calanchi dell'Abbadessa. Durante il triennio 2002/2004 sono stati campionati settimanalmente, mediante catture o abbattimenti selettivi, 805 cinghiali. Il campione risultava costituito da: 444 animali di classe 1 (1-5 mesi), 180 di classe 2 (6-13 mesi), 104 di classe 3 (14-23 mesi) e 65 di classe 4 (>24 mesi) (12 soggetti indeterminati). La *sex-ratio* femmine:maschi era pari a 1:1,1. Gli emosieri stoccati a -20°C sono stati processati per la ricerca di anticorpi anti glicoproteine gB e gE del SHV-1 impiegando un test ELISA *blocking*. L'elaborazione statistica è stata effettuata mediante il test del Chi-quadrato di Pearson. Le prevalenze sierologiche totali sono state del 18% (gB) e del 16,6% (gE). Sieroprevalenze diverse sono state riscontrate sia tra le quattro classi d'età sia nella stessa classe nel tempo. Globalmente la sieroprevalenza anti gB in classe 1 è stata del 21,8%; in classe 2 del 3,3%; in classe 3 del 13,5% mentre in classe 4 del 40%. La diminuzione progressiva della stessa, nella classe 1 può essere correlata all'esaurimento dell'immunità materna. La minor prevalenza nella classe 2 trova probabili giustificazioni da un lato nella non riattivazione di infezioni latenti, dall'altro nella mancata esposizione all'agente eziologico. La cessazione di tali condizioni potrebbe invece aver incrementato la sieroprevalenza nelle classi 3 e 4. Dallo studio emerge come al diminuire della densità di popolazione corrisponda una incrementata circolazione virale. Il confronto statistico degli anni 2003/2004 dimostra un rapporto inversamente proporzionale tra densità di popolazione e prevalenza anticorpale. Tale dato deve far riflettere qualora si pensi di contenere questo agente eziologico mediante piani di controllo della specie serbatoio. Infine le diverse prevalenze per classi di età indicano come piani di sorveglianza che prevedono campionamenti non stratificati per età possano portare ad una erronea valutazione dello stato sanitario della popolazione.

L'IMMUNOISTOCHEMICA, L'IMMUNOFLUORESCENZA E LA MICROSCOPIA LASER CONFOCALE NELLO STUDIO DEL SISTEMA NERVOSO ENTERICO IN CORSO DI SCRAPIE OVINA

Giuseppe Marruchella (a), Ciriaco Ligios (b), Marina Baffoni (a), Giovanna Maria Cancedda (b), Simona Macciocu (b), Luisa Gioia (a), Giovanna Lalatta-Costerbosa (c), Roberto Chiocchetti (c), Paolo Clavenzani (c), Luigi De Grossi (d), Umberto Agrimi (e), Adriano Aguzzi (f), Giovanni Di Guardo (a)

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

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

(c) *Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria e Produzioni Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Ozzano Emilia, Bologna*

(d) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Viterbo*

(e) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(f) *Institute of Neuropathology, University Hospital, Zurigo*

Il sistema nervoso enterico (*Enteric Nervous System*, ENS) gioca con ogni probabilità un rilevante ruolo patogenetico nella scrapie ovina, sebbene assai poco si conosca in merito alle popolazioni cellulari ivi residenti che risultano coinvolte nel corso dell'infezione. Il presente studio è stato condotto sui plessi mienterici (*Myenteric Plex*", MPs) e sottomucosi (*Submucosal Plexi*, SMPs) ileali di 8 ovini di razza sarda con scrapie naturale (4 soggetti) e sperimentale (4 soggetti), tutti con genotipo "sensibile" ARQ/ARQ, nonché di ulteriori 12 animali di controllo della medesima razza, recanti diversi polimorfismi in corrispondenza del gene *PRNP*. In tutti i succitati ovini di controllo, nonché negli 8 ovini affetti da scrapie, che sono stati sottoposti ad eutanasia nella fase terminale della malattia, sono state eseguite accurate indagini morfologiche mediante immunostochimica, immunofluorescenza indiretta e microscopia laser confocale. In tutti gli ovini affetti da scrapie, le indagini immunostochimiche hanno consentito di osservare più o meno consistenti depositi di PrP^{Sc} a livello di entrambi i plessi, mentre le successive indagini in immunofluorescenza indiretta ed in microscopia laser confocale hanno permesso di identificare sia le cellule enterogliali, sia i neuroni nNOS-immunoreattivi (IR) e CALB-IR come i citotipi in grado di accumulare PrP^{Sc} e, pertanto, plausibilmente coinvolti nel processo di neuroinvasione. In conclusione, le suddette tecniche si sono dimostrate, anche nella nostra esperienza, di validissimo ausilio nello studio della patogenesi della scrapie ovina naturale e sperimentale.

Il presente studio è stato condotto usufruendo di appositi fondi dedicati (PRIN 2004, PRIN 2006) erogati dal Ministero per l'Istruzione, l'Università e la Ricerca (MIUR).

RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE E (HEV) IN UNA POPOLAZIONE DI CINGHIALI (*SUS SCROFA SCROFA*) IN ITALIA

Francesca Martelli (a), Andrea Caprioli (c), Martina Zengarini (a), Andrea Marata (a), Caterina Fiegna (a), Ilaria Di Bartolo (b), Franco Maria Ruggeri (b), Mauro Delogu (a), Fabio Ostanello (a)

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

(b) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Direzione Generale della Sicurezza degli Alimenti e della Nutrizione, Ministero della Salute, Roma*

Il virus dell'epatite E (HEV) è l'agente causale dell'epatite E dell'uomo ed è un RNA virus a singolo filamento positivo privo di envelope classificato nella famiglia *Hepeviridae* genere *Hepevirus*. Nel suino domestico HEV è responsabile di infezioni sub-cliniche tuttavia, ceppi di origine suina sono spesso risultati geneticamente simili a ceppi responsabili di episodi sporadici di malattia nell'uomo, suggerendo la possibilità di una trasmissione zoonotica. A conferma di ciò sono stati recentemente descritti in Giappone casi umani di epatite E conseguenti all'ingestione di carne e organi crudi o poco cotti di suino, cervo e cinghiale. La malattia è oggi considerata una zoonosi emergente. Nonostante HEV sia stato frequentemente rilevato in allevamenti suini di tutto il mondo, nessuna informazione sulla prevalenza e la circolazione del virus in popolazioni di cinghiali in Europa è al momento disponibile. In questo studio è stata valutata la prevalenza di HEV in una popolazione selvatica di Cinghiale (*Sus scrofa*) presente nel Parco regionale dei Gessi Bolognesi, Bologna. Sono stati inoltre esaminati possibili fattori di rischio associati all'infezione e le correlazioni genetiche esistenti tra i ceppi identificati e altri ceppi umani e suini. La ricerca del genoma virale è stata effettuata su campioni di bile provenienti da 88 animali abbattuti nel periodo marzo-settembre 2006 nell'ambito del piano di controllo demografico della popolazione insistente del parco, utilizzando una *nested-reverse-transcriptase* PCR. Informazioni riguardanti il sesso, l'età, il peso e le misure biometriche degli animali sono stati raccolti e valutati in relazione all'infezione da HEV. RNA virale è stato identificato in 22/88 animali esaminati (25%). Non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa della prevalenza nei due sessi e nelle diverse classi di età degli animali. Le misure biometriche ed il peso dei soggetti infetti non differivano in modo significativo da quello degli animali non infetti. Campioni PCR positivi sono stati purificati e sequenziati e l'analisi filogenetica delle sequenze ottenute ha permesso di evidenziare un'omologia nucleotidica del 100% nella regione genomica analizzata. Questa osservazione permette di ipotizzare la presenza di un unico ceppo virale circolante nella popolazione esaminata. Tale ceppo è risultato geneticamente più simile a ceppi umani e suini circolanti in Europa che a ceppi di cinghiale identificati in Giappone. Questi risultati suggeriscono la possibile presenza di un *clustering* geografico di ceppi di HEV. Considerando che, analogamente a quanto accade nei suini domestici anche nei cinghiali l'infezione sembra

essere subclinica e che il virus è presente anche in animali di interesse venatorio, questi risultati destano una certa preoccupazione relativamente alla possibile trasmissione zoonotica di HEV.

P14. PRIMA EPIDEMIOSORVEGLIANZA DELLA CWD NEL NORD-OVEST DELL' ITALIA

Daniela Meloni (a), Simone Peletto (a), Patrizia Davico (b), Danilo Muratore (b), Giampaolo Chiesa (b), Francesco Marucci (c), Pier Luigi Acutis (a), Elena Bozzetta (a)
(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, CEA, Torino
(b) Azienda Sanitaria Regionale n. 4, Presidio Multizonale, Torino
(c) Azienda Sanitaria Regionale n. 5, Collegno, Torino

La *Chronic Wasting Disease* (CWD) è una malattia neurodegenerativa appartenente al gruppo delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST) che colpisce alcuni ruminanti selvatici della famiglia *Cervidae*. Attualmente la malattia è stata diagnosticata solo nei cervi del nord America ed in due province del Canada. Molti aspetti inerenti le origini e le modalità di trasmissione della CWD, così pure come l'eventuale esistenza di ceppi diversi o le potenziali fonti di rischio per altri animali o per l'uomo rimangono ancora da chiarire. Proprio quest'ultimo aspetto riveste una particolare importanza anche in considerazione del fatto che una correlazione fra la CWD ed alcune forme di malattia di *Creutzfeldt Jakob* dell'uomo non è ancora stata esclusa. La suscettibilità dei cervidi alla CWD è influenzata da polimorfismi del gene codificante la proteina prionica (*Prnp*), in particolare del codone 225 (S/F) nel cervo mulo (*Odocoileus hemionus*) e del codone 132 (M/L) nel wapiti (*Cervus elaphus nelsoni*). Pur non esistendo, per ora, evidenza della circolazione delle EST (BSE, CWD, Scrapie) nella popolazione nazionale ed europea di ungulati selvatici, è da sottolineare che il numero di animali sottoposti fino ad oggi in Italia ad indagini diagnostiche mirate al rilevamento delle EST appare epidemiologicamente irrilevante. La definizione della prevalenza massima della malattia nelle specie di ruminanti selvatici più rappresentate nella zona di studio, nonché l'indagine delle relative caratteristiche genetiche, rappresenta l'obiettivo degli autori. I tronchi encefalici ed i linfonodi retrofaringei mediali delle specie più rappresentate in Italia quali il capriolo (*Capreolus capreolus*), lo stambecco (*Capra ibex*), il camoscio (*Rupicapra rupicapra*), il cervo (*Cervus elaphus elaphus*), il daino (*Cervus dama*) ed il muflone (*Ovis musuman*), di età superiore ai 12 mesi, cacciati, abbattuti o rinvenuti morti, sono stati sottoposti ad un test rapido approvato dall'USDA (IDEXX *Herd Check CWD Antigen Kit* EIA) ed ad un test rapido per TSE approvato dal Regolamento CE 260/2006 (Bio-Rad TeSeE). In caso di positività era prevista l'esecuzione delle prove di conferma con esame immunostochimico e *Western Blotting*. Al fine di caratterizzare la variabilità genetica delle specie in esame, l'intera *Open Reading Frame* (ORF) del gene *Prnp* è stata amplificata mediante PCR e sottoposta a sequenziamento nucleotidico per la ricerca di polimorfismi. I risultati preliminari su 300 campioni non evidenziano la presenza di EST nei ruminanti selvatici nella particolare zona di studio. Inoltre, le analisi genetiche non hanno identificato polimorfismi dei codoni influenzanti la suscettibilità alla CWD nei cervidi americani.

P15. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI ROTAVIRUS BOVINI CIRCOLANTI NEL NORD ITALIA, 2003-2005

Marina Monini (a), Federica Cappuccini (a), Patrizia Battista (a), Emiliana Falcone (a), Antonio Lavazza (b), Franco Maria Ruggeri (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

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

I *Rotavirus* di gruppo A sono riconosciuti come una delle maggiori cause di gastroenterite acuta negli individui giovani di molte specie animali. Negli allevamenti, la diarrea da *Rotavirus* rappresenta un ingente danno economico dovuto all'elevata morbosità e mortalità della patologia nei vitelli neonati. *Rotavirus* bovini con diversi genotipi G e P sono stati riscontrati diffusamente in molte regioni del mondo. In questo lavoro sono stati determinati i genotipi G e P di *Rotavirus* circolanti in allevamenti del nord Italia, dove è presente circa il 30% dell'intera popolazione bovina del Paese. Un totale di 232 campioni fecali è stato raccolto durante il periodo 2003-2005 e confermato positivo per la presenza di *Rotavirus* tramite saggio ELISA. Per la determinazione dei tipi G e P sono state usate due reazioni successive di RT-PCR e di *nested*-PCR. Il genotipo G6 è stato riscontrato nel 77,2% dei campioni analizzati risultando prevalente rispetto al genotipo G10 (9,9%) e ai tipi G8 e G11, ritrovati rispettivamente nelle percentuali del 4,7 e 1,3. Il 3% dei campioni ha presentato coinfezioni con virus appartenenti a diversi genotipi G, mentre per il 3,9% non è stata possibile alcuna tipizzazione. La caratterizzazione del genotipo P ha mostrato la presenza di due soli tipi: il P[11], il tipo prevalente, e il P[5] riscontrati rispettivamente nel 65,1% e nel 25% dei campioni. Il 2,6% dei campioni ha mostrato infezioni multiple, mentre il 7,3% è rimasto non tipizzato. La combinazione più diffusa durante tutto il periodo dello studio è stata la G6P[11] che rappresentava il 52,5% dei virus nel 2003, il 47,4% nel 2004 e il 40% nel 2005. L'incidenza dei virus G6P[5] è incrementata dal 13,1% nel 2003 al 27% nel 2004 rimanendo stabile nel 2005 (25,5%). La combinazione G10P[11] ha inizialmente subito un forte decremento passando dal 18% nel 2003 al 2,6% nel 2004, per poi riaumentare nel 2005 fino al 7,3%. I virus G8P[11] hanno mostrato una diffusione costante nel 2003 (5%) e nel 2004 (4,3%), diminuendo fino all'1,8% nel 2005. Da sottolineare la presenza nel 2004 di ceppi con combinazione G11P[11] (2,6% dei virus), non rilevata negli altri periodi presi in considerazione in questo studio. La caratterizzazione molecolare dei ceppi di *Rotavirus* bovini circolanti è essenziale per l'acquisizione di dati epidemiologici, e allo stesso tempo rappresenta un utile strumento che permette di monitorare i ceppi prevalenti, consentendo un aggiornamento costante dei programmi di vaccinazione.

P16. RISULTATI PRELIMINARI DELLA CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI APMV-1 ISOLATI IN AFRICA NEL 2006

Isabella Monne, Paola De Benedictis, Ilaria Capua, Giovanni Cattoli
Laboratorio di Referenza Nazionale, OIE e FAO per la Malattia di Newcastle e l'Influenza Aviaria, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

La malattia di *Newcastle* (ND) è un'infezione virale che colpisce i volatili causata da un *Paramyxovirus* aviare di sierotipo 1 (APMV-1). Sulla base delle caratteristiche di patogenicità del virus si distinguono ceppi lentogeni, mesogeni e velogeni. Questi ultimi rappresentano una grave minaccia per la salute dei volatili domestici perché possono determinare, nei soggetti sensibili, un'infezione sistemica associata a gravi segni clinici ed elevate percentuali di mortalità. Il virus della malattia di *Newcastle* è endemico in molti Paesi del mondo. In alcune regioni africane, la malattia è conosciuta come la più importante causa di mortalità nel pollame domestico con un grave impatto non solo sull'economia del Paese ma spesso anche sulla salute pubblica. Gran parte della popolazione africana vive in aree rurali ed il pollame domestico rappresenta spesso la sola fonte proteica disponibile per la sopravvivenza di alcune comunità. Nell'ambito dei programmi FAO di sorveglianza e di cooperazione con i paesi in via di sviluppo, sono stati identificati diversi ceppi di APMV-1 in campioni prelevati da volatili domestici in Niger, Mauritania e Nigeria. Attualmente non sono note le caratteristiche genetiche ed epidemiologiche degli APMV-1 che circolano in Africa Occidentale. Al fine di disporre di maggiori informazioni molecolari, nel presente lavoro è stata analizzata la sequenza nucleotidica parziale del gene che codifica per la proteina di fusione (gene F) degli APMV-1 africani. È stata quindi valutata la relazione filogenetica esistente tra le sequenze nucleotidiche del gene F degli APMV-1 provenienti dall'Africa e le rispettive sequenze geniche degli NDV disponibili in *GenBank*. L'analisi genetica dei virus africani ha evidenziato la presenza delle caratteristiche aminoacidiche tipiche dei ceppi ad elevata patogenicità. Dai risultati ottenuti attraverso l'analisi filogenetica è stato possibile comprendere che le caratteristiche genetiche del gene F dei virus analizzati nel presente studio sono distinte da quelle dei virus attualmente disponibili nella banca dati di *GenBank* (omologia inferiore al 91%). Inoltre, i ceppi della Mauritania si distribuiscono in un *cluster* distinto da quello rappresentato dai ceppi del Niger e della Nigeria. Questo studio ha confermato che gli ND velogeni continuano a circolare in Africa nonostante i programmi vaccinali e che tali ceppi sono filogeneticamente distinti dai virus presenti nel database pubblico. Ulteriori indagini saranno necessarie al fine di meglio comprendere l'epidemiologia dell'infezione nel continente africano e stabilire se i vaccini attualmente impiegati in quelle aree conferiscono un'adeguata immunità nei confronti dei ceppi attualmente circolanti.

P17. DINAMICA DELLA RISPOSTA ANTICORPALE IN ANATRE SPERIMENTALMENTE INFETTE CON VIRUS INFLUENZALI A BASSA PATOGENICITÀ

Ana Moreno, Paolo Cordioli, Davide Lelli, Enrica Sozzi, Elena Canelli, Mirco Grasselli,
Guerino Lombardi

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

Negli ultimi anni, numerose epidemie di virus influenzali H5 e H7 si sono manifestate in Italia e nel mondo con conseguenze fortemente negative sia dal punto di vista sanitario che economico. Particolare impatto anche per la salute pubblica ha avuto la recente epidemia a diffusione mondiale sostenuta da un virus H5N1 ad alta patogenicità (HPAI) anche perché ha coinvolto un elevato numero di specie aviarie diverse. Questo ha determinato la necessità di approfondire la conoscenza della dinamica dell'infezione e dell'andamento dei titoli anticorpali in specie meno studiate ma coinvolte come le anatre. Con il presente lavoro si intende analizzare sia il tempo di eliminazione virale sia la cinetica anticorpale in anatre mute di 45 gg di età infettate sperimentalmente con tre virus influenzali a bassa patogenicità (LPAIV). Il primo studio riguarda l'infezione sperimentale con un ceppo di campo H5N1 (Dose Infettante (DI) $2 \times 10^{6,50}$ DIE₅₀/capo) isolato da germani. Gli animali sono stati tenuti sotto osservazione per 1 mese e controllati con prelievi di sangue a cadenza settimanale. Per il secondo studio è stato utilizzato un ceppo H7N7 isolato da una alzavola somministrato alla DI $10^{6,7}$ DIE₅₀/capo. Sono stati eseguiti tamponi cloacali ogni due giorni per 3 settimane a partire da 24h PI e prelievi di sangue una volta alla settimana a partire da 10gg PI fino alla fine della sperimentazione (40 gg). Infine, nel terzo studio si è eseguita l'infezione sperimentale con un ceppo H9N2 (DI $10^{7,7}$ DIE₅₀/capo) isolato da pollo ed i controlli su tamponi cloacali e sangue hanno seguito il medesimo protocollo della precedente sperimentazione. L'eliminazione virale, valutata tramite RT-PCR, è risultata essere prolungata rispetto alla specie pollo, in quanto alcuni soggetti sono risultati positivi fino a 19 gg post-infezione. Sono stati valutati anche presenza e livello di anticorpi nei confronti di diverse proteine virali quali Nucleoproteina (NPA), Emoagglutinina (H) e Neuraminidasi (N). A questo scopo sono state utilizzate metodiche di ELISA competitiva, basate sull'utilizzo di anticorpi monoclonali per la ricerca rispettivamente di anticorpi anti-NPA, anti-H ed anti-N in confronto con altri test come la inibizione dell'emoagglutinazione per la ricerca di anticorpi anti-H e l'agar-gel precipitazione per anticorpi anti-NPA. Dai test sierologici è stato possibile evidenziare una risposta anticorpale nei confronti delle tre proteine virali precoce e duratura, con evidenza già a partire da 10 gg PI fino alla fine delle sperimentazioni.

P18. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE ISOLATI IN ITALIA TRA IL 2005-2007

Ana Moreno (a), Francesca Fallacara (a), Giovanni Tosi (b), Paola Massi (b)

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

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

La bronchite infettiva aviare, patologia a diffusione mondiale, causa ogni anno notevoli problemi sia sanitari sia economici per il settore avicolo italiano. Le perdite economiche sono in parte dovute alla notevole variabilità antigenica dei ceppi virali coinvolti che, malgrado l'uso diffuso negli allevamenti intensivi di presidi immunizzanti con il ceppo classico M41 e con il ceppo 4/91 (793B), continuano a determinare comparsa di forme cliniche. A tutt'oggi sono stati riportati oltre 60 sierotipi. L'elevata variabilità del virus sarebbe riconducibile fondamentalmente alle modificazioni che si verificano a carico di una sola proteina strutturale, la proteina S degli *spikes*, ed in particolare della S1, una delle due sub-unità che la compongono. La continua comparsa di nuove varianti antigeniche può però rendere problematica la realizzazione di adeguate profilassi immunizzanti e, per questo motivo, le indagini epidemiologiche indirizzate alla caratterizzazione dei ceppi IBV isolati in ogni territorio risultano di notevole importanza nella scelta di programmi vaccinali in grado di conferire una buona protezione. Lo scopo del presente lavoro riguarda, pertanto, la caratterizzazione molecolare di 95 ceppi di IBV isolati in Italia nel periodo 2005-2007 tramite amplificazione e successivo sequenziamento della regione ipervariabile (HVR) 1 della subunità S1. Nel corso dei due ultimi anni, sono stati isolati 95 ceppi di IBV a partire da animali con presenza di sintomatologia clinica specifica, 49 ceppi nell'anno 2005, 34 nel 2006 ed 12 nel primo trimestre del 2007. Tutti i campioni sono stati propagati su uova embrionate di pollo SPF per via allantoidea, successivamente amplificati e sequenziati utilizzando gli stessi *primers* dell'amplificazione. Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state allineate e confrontate con ceppi IBV di riferimento appartenenti a tipi diversi mediante Clustal W. L'analisi filogenetica è stata condotta utilizzando il metodo *Neighbor-Joining*. La caratterizzazione molecolare ha rilevato la presenza nel nostro Paese, di 4 tipi molecolari in percentuali variabili: 31,6% per il tipo 793B, 30,5% per i tipi IT-02 e QX ed infine solo il 7,4% per il tipo Massachusetts. Questi risultati farebbero supporre una diminuzione della circolazione del sierotipo Massachusetts, storicamente il più diffuso in tutto il mondo, ed un aumento di tipi molecolari caratterizzati recentemente come il IT-02 o il ceppo QX per la prima volta identificati in Europa a fine degli anni '90 e nel 2003 rispettivamente.

CARATTERIZZAZIONE DI VIRUS INFLUENZALI H10 CON ANTICORPI MONOCLONALI

Ana Moreno (a), Davide Lelli (a), Enrica Sozzi (a), Elena Canelli (a), Paola Massi (a), Maira Guidoni (b), Mauro Delogu (c), Massimo Fabbi (a), Daniela Gamba (a), Paolo Cordioli (a)

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

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Grosseto

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

Tra i virus influenzali, il sottotipo H10 è molto diffuso nell'avifauna selvatica ed è stato responsabile di numerose epidemie in quaglie e tacchini tra gli anni 65-70 nel nord Italia. Come per i virus H5/H7, anche per il sottotipo H10 sono segnalati ceppi ad alta patogenicità in base all'indice di patogenicità intravenosa, pur non presentando a livello del sito di clivaggio dell'emoagglutinina molteplici aminoacidi basici. L'obiettivo di questo lavoro è stata la caratterizzazione di virus influenzali aviari sottotipo H10 con l'impiego di anticorpi monoclonali (MAbs) prodotti nei confronti di un ceppo di recente isolamento (A/Dk/It/268302/04 H10N4). Attraverso un procedimento di fusione, sono stati ottenuti 21 MAbs specifici per H10, dei quali 7 inibenti l'emoagglutinazione. Tutti gli anticorpi monoclonali sono stati impiegati in una metodica ELISA *sandwich* per la caratterizzazione di 32 virus influenzali: il ceppo di riferimento A/Ck/Germany/N/49 H10N7; ventidue ceppi isolati dal Prof. Rinaldi tra il 1965 e il 1970 presso la sezione IZSLER di Pavia, dei quali diciassette H10N8 da quaglie domestiche, quattro H10N2 e un H10N8 da tacchino; cinque ceppi isolati durante i piani di monitoraggio per l'avifauna selvatica in Lombardia negli anni 2004-2007 e tipizzati come H10N7 (tre ceppi), H10N4 e H10N3; quattro H10N7 isolati da anatre selvatiche nel 2006 dall'IZS di Roma. Tutti i virus sono stati coltivati su uova embrionate di pollo SPF. La metodica prevede l'uso di un siero policlonale di pollo anti-H10 adsorbito alla piastra per la cattura dei virus oggetto dello studio, la successiva aggiunta dei MAbs e, da ultimo, dell'anti-IgG di topo coniugata con perossidasi. I risultati ottenuti in ELISA hanno messo in evidenza differenze antigeniche a livello di emoagglutinina fra i virus testati: i ceppi di recente isolamento hanno mostrato lo stesso profilo antigenico, mentre quelli isolati da quaglia e tacchino nel periodo 65-70 hanno manifestato un diverso pattern di reattività. In particolare quattro MAbs (2C11, inibente l'emoagglutinazione, e 1A4, 1B9, 1A7) si sono dimostrati reattivi nei confronti di tutti i ceppi analizzati. Tra gli altri MAbs impiegati, due (3C8 e 1G6) hanno mostrato reattività verso i soli virus isolati nel periodo 2004-2007, mentre i restanti quindici MAbs hanno fornito risultati variabili nei confronti dei virus isolati nel periodo 65-70. L'impiego degli anticorpi monoclonali presenta notevoli vantaggi nella pratica diagnostica sia per una rapida tipizzazione dei ceppi sia per lo studio della variabilità antigenica.

P19. RISULTATI DI UN MONITORAGGIO SIEROLOGICO PER INFLUENZA AVIARIA NEGLI ALLEVAMENTI RURALI DELLA REGIONE CAMPANIA

Donatella Nava (a), Lorella Barca (b), Onofrio Silvestre (a), Roberto Iannone (a), Angelo Ferraro (c)
(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Napoli
(b) Osservatorio Epidemiologico Veterinario Regione Campania, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Napoli
(c) Servizio Sanità Animale, Regione Campania, Napoli

Presso la Regione Campania è stato istituito, nel 2006 un tavolo tecnico operativo, costituito, tra gli altri, da rappresentanti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno e della Regione Campania, con il compito di focalizzare le problematiche relative all'influenza aviaria sul territorio e di rafforzare le attività di sorveglianza. Poiché nell'ambito del piano nazionale di monitoraggio dell'influenza aviaria, per la Regione Campania non è prevista alcuna sorveglianza attiva su volatili selvatici vivi, si è deciso di rafforzare questa attività estendendola agli allevamenti rurali presenti in zone particolarmente a rischio di contatto con selvatici. A tale scopo, sono state individuate le principali zone umide poste sul territorio regionale e, tra queste, sono state selezionate quelle che rispondevano a determinate caratteristiche: - distanza dalla costa; - disposizione lungo le rotte migratorie dei selvatici; - vicinanza con allevamenti avicoli industriali. Tra le 42 zone umide maggiori ne sono state individuate 5, 4 localizzate lungo la costa ed una all'interno; sono stati quindi individuati 6 allevamenti rurali che ricadevano nel raggio di 3 km dal centro di ogni zona, in cui effettuare un monitoraggio sierologico; per ogni allevamento sono stati testati dieci soggetti, dando la preferenza agli anatidi. Sono stati previsti ed effettuati, a partire dalla primavera 2006, due prelievi nel periodo aprile/giugno e due prelievi nel periodo settembre/dicembre. Alla fine del periodo di sorveglianza sono stati testati 31 allevamenti, di cui 18 di polli, 12 misti ed 1 di oche. Dalle analisi effettuate si evince che 2 allevamenti su 31 sono risultati positivi ed esclusivamente i prelievi del mese di novembre 2006.

P20. RILEVAZIONE E TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI BVDV MEDIANTE *REAL-TIME* PCR

Daniele Nigrelli Arrigo, Silvia Faccini, Giuliana Franzini, Carlo Rosignoli
Sezione Diagnostica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna Bruno Ubertini, Mantova

Da gennaio 2004 a settembre 2006 presso il nostro laboratorio, mediante la tecnica RT *Nested* PCR, sono stati individuati 136 focolai di infezione da BVDV, di cui 128 sostenuti dal genotipo 1 e 8 dal genotipo 2. Recentemente, sempre per la rilevazione e la tipizzazione molecolare di questo virus in campioni biologici, è stata introdotta nella routine diagnostica una metodica in *real-time* PCR. Il presente lavoro riporta i dati relativi ad una prima valutazione comparativa delle due tecniche. L'estrazione dell'RNA dai tessuti è stata ottenuta con Trizol LS (Invitrogen). Per l'estrazione di RNA da sieri, sangue, plasma, è stato utilizzato il kit d'estrazione *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche). Quattro μ l di RNA sono stati retrotrascritti con Superscript II (Invitrogen). I *primers* utilizzati per la *Nested* PCR sono quelli relativi al metodo pubblicato da Letellier nel 1999. Tale metodo era stato precedentemente valutato nell'ambito del progetto InterPCR (www.interpcr.org). *Primers* e sonde utilizzati per la *real-time* RT-PCR sono quelli pubblicati da Letellier nel 2003. Per adattare il metodo ai filtri in dotazione al sistema *iCycler* BioRad in uso, le sonde sono state marcate con Fam/BHQ1 e Texas Red/BHQ2. Per l'ottimizzazione del protocollo *real-time* sono stati confrontati diversi profili di temperatura. La sensibilità analitica dei due metodi è stata confrontata sottoponendo ad analisi una diluizione seriale di un siero positivo per BVDv1 in un siero negativo. Per calcolare l'indice di concordanza K di Choen sono stati confrontati gli esiti relativi a 120 campioni biologici rappresentativi dei diversi materiali abitualmente conferiti al laboratorio per questa ricerca: 36 positivi per BVD1, 4 positivi per BVD2, e 80 negativi al test tradizionale. Per una prima analisi della ripetibilità alcuni campioni sono stati sottoposti ad analisi in replica nella stessa sessione e in sessioni successive. L'introduzione di un profilo di amplificazione a 3 *steps*, anziché 2 *steps* come proposto da Letellier, ha permesso di migliorare l'efficienza dell'amplificazione nonché la sensibilità del metodo *real-time*, permettendo di raggiungere una concentrazione minima rilevabile 10 volte minore rispetto al metodo tradizionale. I campioni risultati positivi con metodo tradizionale sono stati confermati in *real-time* mentre un solo campione è stato rilevato positivo unicamente con la nuova metodica. Tutti i ceppi sono stati tipizzati in modo coerente dai due metodi. L'indice K di Cohen relativo ai due test è risultato 0,98, rilevando un alto livello di concordanza. I dati preliminari di ripetibilità sono risultati soddisfacenti: le curve relative a repliche all'interno di una stessa sessione sono risultate sovrapponibili e sessioni diverse hanno dato luogo a differenze minime di Ct. La *real-time* PCR utilizzata si è dimostrata altamente sensibile e con una ottima concordanza rispetto alla PCR tradizionale. Nel confronto, depongono a favore della nuova metodica alcune importanti caratteristiche quali la riduzione dei tempi di analisi e il minor rischio di cross-contaminazioni.

LE GHIANDOLE SALIVARI ACCUMULANO PROTEINA PRIONICA PATOLOGICA IN PECORE AFFETTE DA SCRAPIE

Romolo Nonno (a), Marta Vascellari (b), Franco Mutinelli (b), Michela Bigolaro (b), Michele Angelo Di Bari (a), Erica Melchiotti (b), Stefano Marcon (a), Claudia D'Agostino (a), Gabriele Vaccari (a), Michela Conte (a), Luigi De Grossi (c), Francesca Rosone (c), Anna Rita Pifferi (c), Umberto Agrimi (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Istopatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Viterbo*

La scrapie delle pecore e delle capre è una Encefalopatia Spongiforme Trasmissibile (EST) o malattia da prioni. La caratteristica principale di questo gruppo di malattie neurodegenerative fatali è rappresentata dalla modificazione post-traduzionale della proteina prionica, PrP^C, in una isoforma patologica, resistente alle proteasi, denominata PrP^{Sc}. L'eziologia di queste malattie non è stata ancora chiarita definitivamente; tuttavia la teoria eziologica maggiormente accreditata riconosce nella stessa PrP^{Sc} l'agente infettante. L'esatta modalità di trasmissione della scrapie è tutt'oggi ignota. Studi epidemiologici e sperimentali suggeriscono tuttavia che la diffusione della scrapie tra le pecore avvenga prevalentemente per via orizzontale, o per trasmissione diretta o attraverso la diffusione dei prioni nell'ambiente. La trasmissione laterale diretta è stata osservata in pecore adulte senza precedente esposizione alla scrapie tenute in stretto contatto con pecore affette da scrapie. Nel corso della malattia, la PrP^{Sc} si accumula principalmente a livello del sistema nervoso centrale e degli organi linfatici; tuttavia, affinché la trasmissione orizzontale sia possibile, è necessario postulare l'eliminazione dell'agente della scrapie dall'organismo infetto nell'ambiente esterno. Ad oggi, non è mai stata descritta la presenza di infettività nella saliva, secrezioni nasali, urine o feci di pecore con scrapie naturale o sperimentale. Le ghiandole salivari non sono state fino ad oggi oggetto di studi estensivi volti all'accertamento della presenza di prioni. Nel presente studio è stata investigata la presenza della proteina prionica patologica nelle ghiandole salivari di pecore sane o affette da scrapie, tramite *Western blot*, immunostochimica e PET *blot*. La PrP^{Sc} è stata identificata nelle ghiandole salivari maggiori (parotide e mandibolare) e minori (buccale, labiale e palatina) di pecore affette da scrapie naturale o sperimentale. Complessivamente, 16 su 18 pecore con scrapie hanno mostrato l'accumulo di PrP^{Sc} in almeno un distretto ghiandolare, mentre nessuna pecora sana (n=15) è risultata positiva. Tramite *Western blot*, la concentrazione della PrP^{Sc} nelle ghiandole salivari è stata stimata tra 0,02% e 0,005% rispetto al cervello. L'analisi immunostochimica ha rivelato depositi intracellulari nell'epitelio dei dotti e nelle cellule secernenti degli acini ghiandolari, ed ha evidenziato la presenza occasionale di segnale nel lume dei dotti salivari. I risultati ottenuti mostrano che una percentuale

significativa di pecore affette da scrapie accumula bassi livelli di PrP^{Sc} nelle ghiandole salivari. La presenza di PrP^{Sc} nell'epitelio secernente e nel secreto ghiandolare sottolinea il possibile ruolo della saliva nella trasmissione orizzontale della scrapie.

P21. MONITORAGGIO IBR 2006 IN VALLE D'AOSTA

Riccardo Orusa, Tatiana Lo Valvo, Samantha Volpi, Giuseppina Bisognano, Monica Ferraris
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, Aosta

La Rinotracheite Infettiva dei Bovini (IBR-IPV), può manifestarsi clinicamente in due forme principali, quella respiratoria e genitale. Il virus responsabile della patologia BoHV-1 è un *Herpesvirus* della sottofamiglia *Alphaherpesviridae*. L'infezione naturale avviene, per contatto diretto del virus con le mucose dell'ospite per via areogena o venerea; la trasmissione genitale si verifica per contatto diretto o attraverso il seme infetto. È stata accertata la trasmissione verticale per via transplacentare. Il perno della patogenesi è rappresentato dall'infezione latente poiché la guarigione clinica non coincide con la guarigione virologica. Il virus, dopo la prima fase di replicazione a livello mucosale, passa ad una fase viremica con adesione alla superficie linfocitaria ed infezione dei monociti, che comporta la diffusione sistemica del virus a vari distretti organici, che può esitare nell'aborto, conseguente ad infezione fetale. La fase di replicazione è caratterizzata dall'escrezione del virus infettante nell'ambiente circostante. L'infezione induce una risposta immunitaria che esita nella guarigione clinica dell'animale. Dopo la replicazione primaria a livello mucosale, BoHV-1 diffonde, per via intra-asonale, al sistema nervoso, raggiungendo, i gangli del trigemino e dei nervi sacrali. Si instaura in tale modo lo stato di latenza tipico dei virus erpetici: il Dna virale rimane nel nucleo della cellula non integrato nel genoma cellulare, senza evocare una stimolazione del sistema immunitario dell'ospite. Il virus può localizzarsi allo stato latente anche nei macrofagi e nelle cellule epiteliali. A fronte di turbativa dell'omeostasi immunitaria da infezioni o infestioni intercorrenti o somministrazione di farmaci immunodepressivi, il virus latente si può riattivare. Negli ultimi anni questa patologia è stata oggetto di una crescente attenzione, soprattutto dovuta all'importanza di natura commerciale che la malattia ha acquisito. Per contrastarla, dal 2003 ad oggi, la Regione Autonoma Valle D'Aosta ha deciso di attuare annualmente uno specifico piano di monitoraggio sierologico ed un'adeguata campagna vaccinale basata sull'impiego di vaccini *marker* che consentono la discriminazione tra capi infetti e capi vaccinati. I controlli sierologici sono stati condotti utilizzando varie tipologie di test ELISA (con anticorpi mono e policlonali) ed in misura minore la Sieroneutralizzazione. Le aziende testate sono state classificate come "positive" se in possesso di almeno un capo positivo, e "negative" se tutto l'effettivo è risultato tale, oppure "dubbe" se non si è riusciti ad arrivare ad una classificazione definitiva di alcuni capi. Confrontando i dati ottenuti lo scorso anno con quelli di quest'anno si osserva una diminuzione delle aziende positive, che passano dal 46% al 34%, poiché le aziende con pochi capi positivi hanno allontanato quegli animali, processo affiancato da una progressiva sostituzione dei capi positivi anche in aziende con un gran numero di positività, con una conseguente diminuzione degli stessi. Si osserva, inoltre, un aumento del numero dei capi vaccinati ed una diminuzione della sieroneutralizzazione degli animali negativi grazie all'adozione di misure di biosicurezza, nonostante la non obbligatorietà di questi strumenti di profilassi.

P22. PRESENZA DI EHV-2 IN PULEDRI CON SINTOMI RESPIRATORI

Fabrizio Passamonti (a), Paolo Cordioli (b), Katia Cappelli (c), Maria Luisa Marenzoni (a), Margherita Catanossi (a), Francesco Cittadini (a), Giacomo Coppola (a), Mauro Coletti (a)

(a) *Centro di Studio del Cavallo Sportivo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Perugia*

(b) *Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Sezione di Scienze Sperimentali e Biotecnologie Applicate, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Perugia*

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

Il cavallo è l'ospite naturale dei 5 *Herpesvirus* attualmente conosciuti: *Equid Herpesvirus* tipo 1 (EHV-1), tipo 3 e tipo 4 (EHV-4) della sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* e *Equid Herpesvirus* tipo 2 (EHV-2) e tipo 5 della sottofamiglia *Gammaherpesvirinae*. EHV-2 è considerato ubiquitario nella popolazione equina e causa infezioni persistenti, che possono ripetersi durante tutta la vita dell'animale. Il ruolo patogeno di questo virus è a tutt'oggi discusso: il fatto che gli anticorpi contro il virus siano presenti in oltre il 90% dei cavalli e che si isola tanto da animali sani che da malati, fanno ritenere che EHV-2 non sia rilevante ai fini dell'induzione di malattia; d'altra parte, l'evidenza che la vaccinazione nei confronti di EHV-2 protegga i puledri dall'insorgenza di polmoniti batteriche secondarie, in particolare da *Rhodococcus equi*, e le sempre più numerose osservazioni dell'associazione del virus con forme respiratorie del puledro danno valore all'ipotesi secondo cui tale virus agisca da elemento primario nelle infezioni polmonari del puledro. Sono state inoltre ipotizzate delle azioni patologiche indirette del virus, che favorirebbe la transattivazione delle infezioni latenti di EHV-1 ed EHV-4 e sarebbe in grado di svolgere un'attività immunodepressiva nell'ospite, facilitando in tal modo l'insorgenza di ulteriori infezioni. Il lavoro ha lo scopo di indagare, in 15 puledri, durante un periodo compreso dalla loro nascita a 6 mesi, la presenza di EHV-2, il comportamento dell'infezione e l'eventuale relazione tra il virus, normalmente non ricercato, e l'insorgenza di sintomi respiratori comparsi durante questo intervallo di tempo; tale indagine è stata svolta usando la PCR su sangue e tamponi nasofaringei e la sieroneutralizzazione, per evidenziare variazioni dei titoli anticorpali. Parallelamente a EHV-2 sono stati ricercati EHV-1 e 4, che sono riconosciuti fra i principali responsabili di forme respiratorie nel puledro. I risultati della PCR hanno mostrato un'elevata presenza di EHV-2, ma il dato interessante è che, su 11 soggetti con sintomi respiratori, 3 hanno manifestato sierconversione per EHV-2, senza che EHV-1 e/o 4 fossero contemporaneamente presenti. Ciò conferma che questo *Herpesvirus* può essere presente da solo in forme respiratorie dei puledri, le quali possono eventualmente essere complicate da altri agenti patogeni virali e batterici, favoriti dalla spiccata capacità immunodepressiva di EHV-2, causando gravi danni economici. Perciò questo virus dovrebbe essere tenuto seriamente in considerazione al momento della diagnosi differenziale delle infezioni polmonari, in particolare nei puledri.

LA PROTEINA NS3 DI BVDV (BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS) PRODOTTA IN BACULOVIRUS RIPRODUCE LE CARATTERISTICHE CONFORMAZIONALI DELLA PROTEINA NATIVA

Giulia Pezzoni, Emiliana Brocchi

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

Il virus della *Diarrea Virale Bovina* (BVDV) appartiene al genere *Pestivirus*, famiglia *Flaviviridae*, composta da virus ad RNA, singolo filamento positivo. Ai *Pestivirus* appartengono anche i virus della *Border Disease* e della Peste Suina Classica, antigenicamente correlati a BVDV. Una delle proteine maggiormente immunogene e conservata tra i *Pestivirus* è la proteina non strutturale NS3 o p80: enzima multifunzionale con attività serino-proteasica, elicastica e NTPasica essenziali per la replicazione virale. Il monitoraggio sierologico delle infezioni da *Pestivirus* è prevalentemente basato sulla dimostrazione di anticorpi verso la NS3. Le caratteristiche funzionali ed immunologiche della proteina virale risiedono in epitopi conformazionali, presenti nella proteina virale nativa ma difficilmente riproducibili in una proteina ricombinante. Il lavoro descrive la produzione della proteina NS3 nel sistema *Baculovirus*, con l'obiettivo di ottenere un antigene ricombinante strutturalmente ed antigenicamente simile all'antigene nativo, il cui uso nei test sierologici per *Pestivirus* comporti vantaggi in termini di biosicurezza, standardizzazione, nonché di rese produttive. Poiché l'attività proteasica della proteina stessa potrebbe danneggiare il sistema di espressione rendendo inefficace la produzione, è stata programmata sia l'espressione dell'enzima NS3 completo (rNS3tot) sia della subunità comprendente solo il dominio NTPasico ed elicastico (rNS3E). Le proteine ricombinanti, espresse nella porzione intracellulare delle cellule sf9 infettate dal *Baculovirus* ricombinante, sono state caratterizzate con un pannello di tre anticorpi monoclonali (MAbs 3A3, 3H4, 1F2) precedentemente prodotti verso BVDV e specifici per tre diversi epitopi conformazionali della NS3 nativa. Il profilo di reattività della proteina virale e di quelle ricombinanti sono risultati sovrapponibili, ma l'espressione della proteina nella forma completa è risultata quantitativamente molto più produttiva. Entrambe le proteine ricombinanti sono riconosciute e fortemente reattive in saggi ELISA *Sandwich*, allestiti con combinazioni dei tre MAbs utilizzati alternativamente come anticorpo di cattura adsorbito alle fase solida o come anticorpo tracciante marcato con perossidasi; solo le combinazioni di MAbs omologhe (stesso anticorpo di cattura e tracciante) non legano gli antigeni, dimostrando che i prodotti ricombinanti, parimenti alla proteina virale, non formano aggregati. In saggi ELISA *trapping*, gli antigeni ricombinanti, sia nella forma completa che parziale legate alla fase solida tramite un MAb, sono efficacemente riconosciuti anche da sieri BVDV-positivi. Seppur preliminari, questi risultati dimostrano che le proteine NS3 espresse in *Baculovirus* effettivamente riproducono le caratteristiche conformazionali della proteina nativa, fornendo il presupposto per il loro impiego come sorgente di antigene in test sierologici per la dimostrazione di anticorpi verso *Pestivirus* in sieri bovini, suini e ovini.

PRODUZIONE IN BACULOVIRUS DI VIRUS-LIKE PARTICLES DEL VIRUS VISNA MAEDI: CARATTERIZZAZIONE ATTRAVERSO ANTICORPI MONOCLONALI

Giulia Pezzoni, Luisa Crosatti, Antonio Lavazza, Emiliana Brocchi
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna Bruno Ubertini, Brescia

I *Lentivirus* della *Visna-Maedi* Ovina (VVM) e della Artrite Encefalite Caprina (CAEV) sono *Retrovirus* altamente correlati geneticamente che causano una malattia cronica infiammatoria. Il controllo dell'infezione è solitamente effettuato, sia negli ovini che nei caprini, mediante monitoraggio sierologico utilizzando nei test un singolo stipite virale per la ricerca di anticorpi verso le proteine strutturali immunogene. Con l'obiettivo di sviluppare antigeni ricombinanti per lo studio della risposta immunitaria nelle infezioni causate da questi virus è stato espresso, nel sistema *Baculovirus*, il gene *gag* codificante per tre unità capsidiche virali: p25 (proteina capsidica), p16 (*matrix protein*) e p14 (nucleoproteina), responsabili dell'assemblaggio e del *budding* virale. La proteina espressa (*r-gag*) risulta essere presente sia nel terreno di coltura delle cellule infette sia nei lisati cellulari; in *Western blotting* è riconosciuta dai tre anticorpi monoclonali (MAbs) 1A7, 5C4 e 5E9 in precedenza caratterizzati verso le proteine p25 e p16. Mediante tecniche di microscopia elettronica in colorazione negativa, in particolare con la tecnica di *Airfuge-immuno-gold* eseguita sul terreno di coltura delle cellule infette, gli anticorpi 1A7, 5C4 e 5E9 hanno mostrato di marcare in maniera specifica particelle elettropache, rotondeggianti e pleomorfe di circa 60-80nm di diametro, aggregate a formare gruppi compatti. In ELISA *Sandwich* il prodotto ricombinante espresso da *Baculovirus* reagisce efficacemente con i MAbs 5C4 e 1A7, utilizzati rispettivamente come anticorpo di cattura e marcato; inoltre, dopo immuno-purificazione su piastre ELISA tramite i MAbs 5C4 o 1A7, adsorbiti alla fase solida con funzione di cattura, l'antigene è riconosciuto da sieri ovini immuni. Il MAb 5C4 consistentemente lega ed orienta gli antigeni più efficacemente rispetto al MAb 1A7, esponendo probabilmente ai sieri gli epitopi più immunogeni. A differenza di un analogo prodotto ricombinante espresso in *E. coli*, la presenza di *Virus-Like Particles* (VLPs) nel terreno di crescita indica che le varie poliproteine ricombinanti *gag* si assemblano all'interno della cellula e successivamente effettuano il *budding*, come del resto confermato dall'osservazione al microscopio elettronico delle particelle prodotte. La ricostruzione di particelle simil-capsidiche, reattive con i vari MAbs permette di disporre di un antigene con profilo di reattività il più simile possibile a quello del virus VM ed è il presupposto per lo sviluppo di un test diagnostico che sarà oggetto di studio.

P23. IMMUNIZZAZIONE ANTI-EST NEL MODELLO CRICETO

Maria Puricelli, Francesco Servida, Elena Formentin, Paola Dall'Ara, Barbara Lucchini, Giorgio Poli, Wilma Ponti

Sezione di Microbiologia e Immunologia Veterinaria, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Milano

Negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi volti a valutare la possibilità di indurre una risposta immunitaria specifica in modelli murini di patologie neurodegenerative caratterizzate da *misfolding* proteico, come la malattia di Alzheimer e le Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST). Per queste ultime sono stati proposti diversi immunogeni e diverse strategie d'intervento basate sulla necessità, per la proteina prionica (PrP), di replicarsi nel tessuto linfoide prima della neuroinvasione. In questo lavoro, abbiamo sottoposto dei criceti (*Mesocricetus auratus*) a inoculazioni ripetute con l'oligopeptide PrP 119-146, corrispondente alla parte centrale della proteina prionica di criceto coinvolta nel processo di conversione della proteina, al fine di valutarne la capacità di indurre una risposta immunitaria specifica. Gli animali sono quindi stati infettati sperimentalmente con il ceppo scrapie 263K. Negli animali è stata valutata una sierconversione nei confronti del peptide mediante test ELISA, mentre per la valutazione della risposta cellulo-mediata abbiamo determinato la proliferazione degli splenociti stimolati con PrP 119-146 attraverso l'utilizzo di una reazione colorimetrica con la BrdU. Le lesioni cerebrali e la GFAP (*Glial Fibrillar Acid Protein*), che rappresenta il *marker* dell'astrocitosi, sono state valutate mediante analisi istopatologica e immunoistochimica. La quantità di PrP patologica (PrPres) è stata valutata sia nella milza sia nel cervello mediante *Western blot* e immunoistochimica. Inoltre, è stata analizzata l'espressione nel cervello della GFAP e di alcune citochine pro-infiammatorie (IL-1 β e TNF- α), mediante *real-time* RT-PCR al fine di caratterizzare dal punto di vista molecolare la risposta infiammatoria a livello di SNC. Gli animali immunizzati sono sopravvissuti più a lungo (+23 giorni) rispetto agli animali solo infettati e hanno mostrato sia una risposta immunitaria umorale specifica, benché con un basso titolo anticorpale, sia una buona risposta di tipo cellulo-mediata. Inoltre, l'aumento del tempo di sopravvivenza è risultato associato a una riduzione, valutata *in itinere* e a termine, delle lesioni cerebrali, della deposizione di PrP^{res} e di GFAP; quest'ultima è confermata anche da una sua minor espressione, inoltre vi è una ridotta espressione delle citochine, in particolare di IL-1 β che gioca un ruolo chiave nelle fasi precoci di astrocitosi. I nostri risultati indicano che l'aumento del tempo di sopravvivenza, associato a una risposta immunitaria specifica, determina un rallentamento della deposizione della proteina prionica patologica. L'approccio vaccinale con il peptide PrP 119-146 sembra quindi in grado di rallentare la progressione della malattia a livello periferico, oltre a rallentare i processi neurodegenerativi e i fenomeni di neuroinfiammazione tipici delle EST a livello centrale.

P24. COMPARAZIONE TRA VARIE RT- PCR E ISOLAMENTO VIRALE PER LA DIAGNOSI DI NODAVIROSI IN SPECIE ITTICHE SELVATICHE

Giuseppa Purpari, Vincenza Cannella, Santina Di Bella, Laura Russotto, Giuseppina Alimena, Salvatore Dara, Patrizia Di Marco, Annalisa Guercio
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia A. Mirri, Palermo

L'Encefalopatia e Retinopatia Virale (VER) o Nodavirosi, è una malattia molto diffusa in tutti i Paesi dove viene praticato l'allevamento di specie ittiche marine. Si tratta di una infezione causata da virus appartenenti alla famiglia *Betanodaviridae*, genere *Nodavirus*, molto diffusi nelle acque del Giappone, del sud-est Asiatico, in Australia, Europa e nel bacino del Mediterraneo e può interessare molte specie ittiche selvatiche e da allevamento. Il ruolo epidemiologico delle singole specie ittiche nel mantenimento della malattia rimane ancora poco chiaro. La suscettibilità e quindi la gravità della sintomatologia variano da specie a specie. In genere l'infezione si manifesta clinicamente con sintomi nervosi, difficoltà natatorie e mortalità, raramente osservati in soggetti selvatici, ma responsabili di perdite economiche negli allevamenti. Tuttavia la diagnosi di tale patologia in soggetti selvatici è significativa nell'evidenziare l'eventuale ruolo di *reservoir* che queste specie possono assumere e di conseguenza nella trasmissione della malattia ai soggetti di allevamenti marini. Per la diagnosi di nodavirosi, sono state ottimizzate numerose tecniche di laboratorio tra cui isolamento virale su colture cellulari, immunoistochimica, immunofluorescenza indiretta, ibridazione *in situ* e RT-PCR. Nel presente lavoro, gli A.A. hanno messo a confronto l'isolamento virale su colture cellulari SSN-1 con varie RT-PCR one step, tra cui anche una *Nested* RT-PCR, al fine di individuare la metodica più sensibile nel rilevare anche basse concentrazioni virali in cervelli di varie specie ittiche selvatiche pervenuti in laboratorio.

P25. RICERCA DI ROTAVIRUS DI GRUPPO A IN CAMPIONI FECALI BOVINI MEDIANTE RT-PCR

Stefano Reale, Fabrizio Vitale, Maria Vitale, Simona Agostana, Santo Caracappa
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo

I *Rotavirus* sono diffusi agenti di gastroenterite nell'uomo ed in varie specie animali. Mentre numerosi studi hanno ben definito il ruolo dei *Rotavirus* nelle infezioni umane, limitate informazioni sono disponibili relativamente agli animali. Una eterogenea popolazione di *Rotavirus* circola nel mondo, distinta in vari gruppi, sottogruppi e tipi. In particolare, nei vitelli i *Rotavirus* di gruppo A, e in misura minore quelli appartenenti ai gruppi B e C, possono causare una diarrea profusa e disidratazione e nell'ambito di questi gruppi, diversi tipi virali infettano i bovini inducendo un'immunità tipo-specifica. In questo studio, svolto al fine di indagare la circolazione di *Rotavirus* in allevamenti bovini in stalla nell'area palermitana, sono stati analizzati 50 campioni di feci (o di massa o raccolti da singoli soggetti che presentavano sintomatologia diarroica). L'analisi è stata condotta mediante RT-PCR amplificando la regione codificante per la proteina strutturale VP6 di *Rotavirus* di gruppo A. Dopo estrazione dell'RNA e retrotrascrizione, i prodotti di amplificazione sono stati analizzati su gel di agarosio per la valutazione dei positivi. Sono risultati positivi tutti i campioni fecali di massa raccolti dagli allevamenti ed il 70% dei campioni prelevati dai singoli vitelli. L'indagine svolta in ambito veterinario conferma la diffusa circolazione di *Rotavirus* e il loro ruolo quali agenti di gastroenterite nei vitelli. I nuovi nati possono, infatti, avere un ruolo fondamentale nella trasmissione dell'infezione nelle stalle e nel mantenimento della carica infettante nel territorio con eventuale possibilità di trasmissione all'uomo.

P26. PNEUMO-NEUROTROPISMO DI ISOLATI H7N1 DI INFLUENZA AVIARIA AD ALTA PATOGENICITÀ IN TOPI INFETTATI SPERIMENTALMENTE

- Michela Rigoni (a), Kyoko Shinya (b,c,d,e), Anna Toffan (a), Adelaide Milani (a), Francesca Bettini (a), Yoshihiro Kawaoka (d,e,f,g), Giovanni Cattoli (a), Iliaria Capua (a)
- (a) OIE, FAO and National Reference Laboratory for Newcastle Disease and Avian Influenza, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova
- (b) Graduate School of Medicine, Tohoku University, Sendai 980-8575, Japan
- (c) Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680-8553, Japan
- (d) Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology, and International Research Center for Infectious Diseases, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo, Japan
- (e) Department of Pathological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, USA
- (f) Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japan

Diversi studi hanno evidenziato come due modificazioni amminoacidiche in posizione 627 (E-K) e 701(D-N) del gene PB2 siano correlabili alla virulenza e all'adattamento del virus influenzale aviario all'ospite mammifero. Scopo del lavoro è stato confrontare la patogenicità in topi Balb-C di virus di influenza aviaria, sottotipo H7N1 ad alta patogenicità, in presenza o assenza di mutazioni nel gene PB2 correlate alla virulenza e all'adattamento del virus all'ospite mammifero; in particolare la E627K e la D701N.

Tre ceppi isolati nel corso dell'epidemia italiana del 1999/2000 sono stati selezionati: *A/ostrich/It/2332/00/H7N1(627K)*, *A/ostrich/It/984/00/H7N1 (627E)*; *A/chicken/It/5093/99/H7N1(627E)*. Tutti e tre gli isolati possedevano aspartato (D) in 701, tipico di ceppi di origine aviaria. I tre virus sono stati inoculati per via intranasale a tre gruppi di 10 topi Balb-C cadauno alla dose di 10^5 EID₅₀. Si è proceduto giornalmente al monitoraggio degli eventuali sintomi clinici e tutti i soggetti di ciascun gruppo sono stati pesati. Nei giorni 3, 5, 7 e 10 p.i. due soggetti per gruppo sono stati sacrificati per il prelievo di alcuni organi: cervello, trachea/polmone, milza, fegato, rene ed intestino. Gli organi prelevati sono stati processati attraverso *real-time* RT-PCR, isolamento virale, analisi istopatologica ed immunohistochimica. L'intero genoma virale dei ceppi originali e dei ceppi reisolati dagli organi infettati è stato sequenziato per evidenziare eventuali mutazioni post-infezione. Tutti e tre i ceppi si sono dimostrati pneumo e neuropatogeni per il topo. In particolare il ceppo con PB2 627K (OS/2332/00) era in grado di causare lesioni più gravi e mortalità più elevata rispetto agli altri due isolati. La patogenicità del secondo isolato (OS/984/00) era di livello intermedio rispetto agli altri due, mentre il terzo isolato (CK/5093/99) era solo lievemente patogeno. Tuttavia quest'ultimo è riuscito ad acquisire la mutazione in 627 del PB2 nel cervello di uno dei soggetti infettati. I nostri risultati hanno dimostrato come gli isolati di influenza aviaria italiani del sottotipo H7N1 possano possedere naturalmente o acquisire in un solo passaggio la mutazione in posizione 627 del

PB2, con un conseguente aumento della virulenza e della capacità infettante del virus. Nessuna mutazione in posizione 701 del PB2 è stata riscontrata. Tale mutazione non risulta pertanto cruciale per la replicazione dei ceppi H7N1 nel topo.

**P27. BOVINE PAPILLOMAVIRUS TYPE 2 (BPV-2) DNA
IN THE PERIPHERAL BLOOD OF CATTLE
WITH URINARY BLADDER TUMOURS:
POSSIBLE BIOLOGICAL ROLE**

Sante Roperto (a), Giuseppe Borzacchiello (a), Ugo Pagnini (a), Consuelo Rizzo (b),
Franco Roperto (a), Valeria Russo (a), Aldo Venuti (b)

*(a) Department of Pathology and Animal Health, I Faculty of Veterinary Medicine,
Laboratory of Virology, University Federico II, Naples*

(b) Regina Elena Cancer Institute, Rome

Bovine *Papillomavirus* type 2 (BPV-2) infection has been associated with urinary bladder tumours in adult cattle grazing on bracken fern-infested lands. In this study we investigated the simultaneous presence of BPV-2 in whole blood and urinary bladder tumours of adult cattle in an attempt to better understand the biological role of circulating BPV DNA. Peripheral blood samples were collected from 78 cattle with chronic enzootic hematuria caused by primary bladder tumors. Fifty of these animals were slaughtered at public slaughterhouses, allowing detection of neoplastic proliferations in the urinary bladder in all of them. BPV-2 DNA was amplified and sequenced in 78% of urinary bladder tumour samples and in 38.9% of normal samples as control. Circulating BPV-2 DNA was detected in 78.2% of the blood samples. Simultaneous presence of BPV-2 DNA in some bladders and blood samples may be indicative of viral infection of urinary bladder via blood-stream; alternatively BPV-2 DNA in circulating blood may originate in neoplastic bladders.

P28. SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA DEI CEPPI DI AGENTE E DELLA GENETICA DELLA SCRAPIE IN ITALIA

Francesca Scolamacchia (a), Romolo Nonno (a), Gabriele Vaccari (a), Elena Esposito (a), Barbara Chiappini (a), Michela Conte (a), Luisella Morelli (a), Paola Fazzi (a), Consiglia Parisi (a), Giuseppe Ru (b), Umberto Agrimi (a), Gaia Scavia (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Centro di Referenza per le Encefalopatie Animali, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

La scrapie è una malattia neurodegenerativa letale degli ovi-caprini legata all'accumulo nel SNC dell'isoforma patologica della proteina prionica cellulare (PrP) e appartenente al gruppo delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST). Negli ovini la manifestazione della malattia è influenzata dal ceppo di agente coinvolto. Il Nor98 rappresenta il prototipo dei ceppi atipici e differisce dal ceppo di scrapie classica per caratteristiche immunobiochimiche ed istopatologiche. È noto che i polimorfismi della PrP ovina ai codoni 136 A/V, 154 R/H e 171 Q/R/H influenzano la suscettibilità alla scrapie. L'allele ARR appare associato alla maggiore resistenza alla malattia. Obiettivo del presente lavoro è descrivere i risultati della sorveglianza epidemiologica dei ceppi di agente e della genetica della scrapie, nei focolai individuati in Italia nel periodo compreso tra luglio 2004 e dicembre 2006. Dei 133 focolai individuati, 109 sono stati attribuiti a scrapie classica (comprendenti 128 casi *index* e 323 casi secondari) e 23 a Nor98 (24 casi *index* e 2 casi secondari). In un solo focolaio è stata riscontrata infezione mista con un caso di Nor98 ed uno di scrapie classica. Negli ovini con scrapie classica il genotipo ARQ/ARQ risultava il più frequente (411 soggetti), seguito da ARQ/AHQ (34), ARQ/VRQ (5), AHQ/AHQ (1) ed ARR/ARQ (1). Complessivamente il 99,8% dei soggetti era portatore dell'allele ancestrale ARQ ed il 7,1% era portatore dell'allele AHQ. Tra gli altri polimorfismi, la mutazione più frequente era al codone 141 (L/F), che interessava il 4,9% dei soggetti portatori dell'allele ancestrale. Per contro, nei casi Nor98 solo l'81,5% era portatore dell'allele ARQ, mentre il 51,8% ed il 22,2% erano rispettivamente portatori degli alleli ARR ed AHQ. La mutazione al codone 141 (L/F) risultava nei casi Nor98 estremamente frequente, ed interessava il 72,7% dei soggetti portatori dell'allele ARQ. I genotipi riscontrati erano ARQ/ARR (9), ARQ/ARQ (8), ARQ/AHQ (5), ARR/ARR (3), ARR/AHQ (1) e ARR/ARH (1). Tra i soggetti con genotipo ARQ/ARQ e ARQ/ARR la quasi totalità (16/17) era portatore della mutazione L/F 141. Inoltre, tra i soggetti non portatori di tale mutazione, ben il 63,6% era portatore dell'allele AHQ. In conclusione, i dati raccolti evidenziano notevoli differenze del *target* genetico d'ospite, tra scrapie classica e Nor98. Nella scrapie classica risulta evidente l'associazione della malattia all'allele ARQ ed il ruolo protettivo svolto dall'allele ARR. Nei casi Nor98, l'elevata frequenza della mutazione L/F 141 e dell'allele AHQ, presenti in più dell'80% dei casi, suggeriscono un loro ruolo centrale nell'insorgenza della malattia, mentre non emerge un ruolo protettivo dell'allele ARR.

ANALISI DEL GENE DELLA PROTEINA DEL CAPSIDE DI ISOLATI ITALIANI DI FCV

Francesca Vaccari, Mara Battilani, Alessandra Scagliarini
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi, Bologna

Il *Calicivirus* felino (FCV) è un patogeno diffuso a livello mondiale che provoca malattie con diverso quadro sintomatologico. La forma clinica più frequente è quella respiratoria, ma vengono spesso riportati anche casi di gengivo-stomatite ulcerativa, artriti acute e, recentemente casi di infezioni emorragiche sistemiche ad alta letalità. A partire dagli anni '70, la malattia è stata controllata mediante vaccinazione con vaccini spenti o vivi attenuati contenenti il ceppo virale F9 o F9-like in grado di proteggere gli animali dalle infezioni provocate dalla maggior parte dei ceppi virali circolanti. Negli ultimi anni però sono sempre più frequenti i casi di malattia clinica anche in animali vaccinati. FCV è un virus privo di envelope che appartiene alla famiglia *Caliciviridae*, il genoma virale è costituito da un singolo filamento di RNA a polarità positiva che comprende 3 ORF. La ORF2 codifica per la proteina strutturale principale che costituisce il capsido virale e viene suddivisa in 6 regioni (A, B, C, D, E, F) sulla base della variabilità genetica. La proteina del capsido presenta i motivi antigenici responsabili della patogenicità e la sua sequenza viene frequentemente utilizzata per studi epidemiologici. Nell'ambito dei *Calicivirus* felini si riconoscono fino ad ora un unico sierogruppo all'interno di un singolo genogruppo, ma si ritiene che la difficoltà nell'identificazione di ulteriori genogruppi sia da imputarsi allo scarso numero di sequenze genomiche disponibili. Dati recenti indicano la possibilità di un *clustering* antigenico degli isolati responsabili di forme cliniche simili facendo ipotizzare che il fenotipo patologico possa avere una base genetica. Mutazioni aminoacidiche peculiari sono state, infatti, identificate nelle sequenze codificate dalla regione E della ORF2 di ceppi responsabili di forme emorragiche ad alta letalità, che non sono state rilevate nelle sequenze di ceppi virali isolati da forme classiche di infezione. In questo studio sono state analizzate e confrontate le sequenze nucleotidiche della ORF2 di ceppi di FCV isolati in Italia in animali con diverse forme cliniche di infezione. In seguito le sequenze aminoacidiche sono state caratterizzate allo scopo di identificare eventuali motivi associabili ai diversi quadri sintomatologici.

P29. NUOVI ALLELI DELLA PROTEINA PRIONICA IN GRADO DI CONFERIRE PROTEZIONE DA SCRAPIE E BSE NEGLI OVINI

Gabriele Vaccari (a), Claudia D'Agostino (a), Romolo Nonno (a), Francesca Rosone (b), Michela Conte (a), Michele Angelo Di Bari (a), Barbara Chiappini (a), Elena Esposito (a), Consiglia Parisi (a), Luigi De Grossi (b), Francesco Giordani (b), Stefano Marcon (a), Luisella Morelli (a), Umberto Agrimi (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma*

La suscettibilità delle pecore alla scrapie ed all'Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE) è condizionata dai polimorfismi ai codoni 136 (A/V), 154 (R/H) e 171 (Q/R/H) del gene della proteina prionica (PrP). I genotipi ovini VRQ/VRQ e ARQ/ARQ appaiono i più suscettibili alla scrapie. Al contrario, i soggetti portatori del genotipo ARR/ARR risultano pressoché resistenti alla scrapie. Sulla base di tali osservazioni e della inefficacia delle strategie di controllo classicamente impiegate nei confronti delle malattie infettive, sono stati realizzati in Europa e negli Stati Uniti piani di selezione genetica degli ovini con lo scopo di aumentare la frequenza dell'allele resistente. Allo scopo di indagare in condizioni controllate la suscettibilità dei diversi genotipi ovini abbiamo condotto uno studio di trasmissione sperimentale della scrapie (per via intracerebrale ed orale) e della BSE (per via intracerebrale) in ovini di razza sarda portatori dei genotipi più frequenti. Nel caso dell'inoculazione intracerebrale della scrapie, gli animali ARQ/ARQ, ARQ/AHQ, AHQ/AHQ, ARQ/ARH e AHQ/ARH hanno sviluppato malattia con tempi di sopravvivenza compresi fra i 462 (ARQ/ARQ) e i 1.252 (AHQ/ARH) gg evidenziando un chiaro gradiente di suscettibilità allelica: ARQ>AHQ>ARH. Sinora l'infezione per via orale ha determinato malattia solo negli animali con genotipo ARQ/ARQ e ARQ/AHQ con tempi di sopravvivenza, rispettivamente, di 860 e 1.115 gg. Nel caso della BSE, ad oggi hanno sviluppato malattia i soggetti ARQ/ARQ ed ARQ/ARH con tempi di sopravvivenza, rispettivamente, di 480 e 742 gg. Accanto ai genotipi più frequenti, sono stati inclusi nello studio alcuni ovini portatori di variazioni del gene della PrP sinora mai indagate: 137 (M/T), 142 (I/K) e 176 (N/K). Inaspettatamente, nessuno dei soggetti portatori di tali variazioni su un *background* genetico altrimenti considerato suscettibile (ARQ/ARQ, ARQ/AHQ o ARQ/ARH) è andato incontro a malattia. La mancanza di segni di malattia negli ovini portatori dell'allele ARR a distanza di oltre 1.600 (nel caso della scrapie) o 1.100 (nel caso della BSE) gg dall'infezione intracerebrale conferma l'elevata resistenza di tale allele anche a dosi e modalità di infezione estremamente "spinte". Inoltre l'osservazione di un simile effetto protettivo anche per gli alleli AT₁₃₇RQ, AK₁₄₂RQ e ARQK₁₇₆ li suggerisce come ulteriori candidati su cui rivolgere l'attenzione dei programmi di selezione genetica.

RICERCA E VALUTAZIONE DEL POSSIBILE RUOLO ZONOSICO DI *RETROVIRUS* ENDOGENI IN CAMPIONI DI LATTE DI DIFFERENTI SPECIE DOMESTICHE

Riccardo Villa, Elena Stoppani, Maura Ferrari
Centro Substrati Cellulari, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

In letteratura, numerosi sono i dati relativi ai *Retrovirus* Endogeni del Suino (PERVs) in quanto potenziali agenti zoonosici nel corso degli xenotrapianti; minori sono invece le informazioni relative alla presenza e alle caratteristiche di *Retrovirus* endogeni in specie domestiche connesse all'alimentazione. Al fine di acquisire maggiori conoscenze in questo settore, col presente lavoro ci si è proposti di mettere a punto un metodo di identificazione di sequenze retrovirali in campioni di latte di origine animale e, in caso di positività, di saggiare l'eventuale presenza di attività enzimatica retrotrascrittasi (Test Cavid). Le prove effettuate hanno permesso di mettere a punto una reazione in *real-time* PCR diretta ad una regione conservata della polimerasi. Con tale metodica abbiamo rilevato la costante presenza dei PERVs nei campioni di latte di suino, successivamente identificati tramite PCR tradizionale come appartenenti alle classi A e B. L'indagine è stata quindi estesa a campioni di latte bovino, di capra e di bufala provenienti da allevamenti convenzionali, rilevando anche in questi campioni la presenza dei *Retrovirus*. I risultati ottenuti hanno suggerito la necessità di valutare un ulteriore aspetto, estendendo l'analisi a varie tipologie di latte commerciale (liofilizzato, pastorizzato, fresco, a lunga conservazione). Anche in questo caso è stata evidenziata la presenza di retrovirus. Prove mirate alla ricerca di attività enzimatica hanno confermato la presenza di retrotrascrittasi attiva in tutti i tipi di latte saggiati, indice di completa espressione virale. È pertanto possibile che le tecniche approntate, oltre a risultare idonee per l'accertamento sistematico di retrovirus in campioni di latte di varie specie animali, possano essere estese alla ricerca di Retrovirus Endogeni in matrici di differente natura. Ulteriori accertamenti dovranno essere rivolti alla capacità di trasmissione di questi retrovirus nei confronti di tipi cellulari umani.

Il presente lavoro è supportato da finanziamento ministeriale (MIUR) su progetto FISR.

P30. ENCEFALOPATIA SPONGIFORME BOVINA: SEQUENZIAMENTO DELLA PORZIONE AMMINOACIDICA DELLA PROTEINA PRIONICA IN DIVERSE RAZZE BOVINE

Maria Vitale (a), Danila Polizzi (a), Stefano Reale (a), Daniela Nifosi (b), Damiano Di Iorio (c), Fabrizio Vitale (a)

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

(b) *Ispettorato Regionale Veterinario, Assessorato alla Sanità, Palermo*

(c) *USL 6, Palermo*

L'emergenza *mucca pazza* ha portato alla ribalta il problema delle cosiddette malattie da prioni caratterizzate da fenomeni di degenerazione neurologiche associate alla presenza di grossi processi di vacuolizzazione a livello delle tessuto cerebrale con aspetto spongiforme. Con il termine di TSE si considerano diverse malattie come: Creutzfeldt Jakobs nell'uomo, la BSE nei bovini e la scrapie negli ovini. La causa eziologica di queste malattie è stata identificata in una proteina normalmente presente in tutti i tessuti che va incontro a delle modifiche di tipo strutturali. La proteina, PrpC (C cellulare), formata da circa 250 aminoacidi, è codificata dall'esone 3 del gene *prnp* localizzato, nei bovini, sul cromosoma 13. La struttura secondaria è normalmente ricca di alfa eliche mentre la proteina anomala PrpSc assume una struttura secondaria ricca di foglietti beta e delle modifiche funzionali e biochimiche diverse come la capacità di resistere all'azione delle proteinasi. Dai programmi di sorveglianza attiva mediante test rapidi anche in Sicilia sono stati riscontrati 6 animali positivi alla BSE. Gli animali coinvolti sono state delle seguenti razze bovine: 2 pezzate rosse, 1 *charolais* 1 bruna alpina e 1 frisona. Non sono stati coinvolti finora animali delle due principale razze autoctone siciliane modicana e siciliana, ma la percentuale di bovini saggiati per i test rapidi appartenenti alle suddette razze è soltanto del 2% circa. Allo scopo di caratterizzare eventuali polimorfismi genetici presenti nelle razze bovine autoctone siciliane è stato attuato uno studio di sequenziamento per la porzione amminoacidica della modicana e della Cinisara. La regione codificante della proteina corrispondente all'esone 3 del gene è stata amplificata con una coppia di *primer*. Il sequenziamento del DNA di varie razze bovine incluse le autoctone siciliane ha permesso di evidenziare come mentre nella modicana la sequenza è perfettamente identica a quella presente in banca dati così come nella *charolais*, pezzata rossa, bruna alpina e frisona, interessanti la Cinisara presenta dei polimorfismi a livello amminoacidico con possibili implicazioni anche nelle caratteristiche biochimiche e funzionali della proteina. In particolare un aminoacido presente in un dominio di alfa elica che in tutte le sequenze analizzate da noi e in quelle presenti in banca dati internazionali è rappresentato dalla serina (aminoacido polare aromatico) nella Cinisara viene sostituito dalla asparagina (carica positiva non aromatico).

INFLUENZA A VIRUS ED ANATIDI SELVATICI: CORRELAZIONI TRA DATI DI ISOLAMENTO VIRALE, STAGIONALITÀ, SESSO ED ETÀ

Martina Zengarini (a), Andrea Marata (b), Maria Alessandra De Marco (c), Elisabetta Raffini (d), Francesca Eufelia Bono (c), Caterina Fiegna (c), Livia Di Trani (e), Laura Campitelli (f), Marzia Facchini (f) Isabella Donatelli (f), Mauro Delogu (c)

(a) *Parco dei Gessi Bolognesi e Calanchi dell'Abbadessa, Bologna*

(b) *Parco Storico Monte Sole, Bologna*

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

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

(e) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(f) *Dipartimento Malattia Infettive Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Tra gli uccelli acquatici gli Anseriformi rappresentano il principale serbatoio dei virus influenzali di tipo A e possono albergare la maggior parte dei sottotipi virali caratterizzati sino ad oggi da 16 emoagglutinine e 9 neuroaminidasi diverse. Occasionalmente virus influenzali aviari possono essere trasmessi ad altre specie, compresi i volatili domestici ed i mammiferi. Scopo del lavoro è stato quello di valutare sia la circolazione di virus influenzali tipo A in Anatidi selvatici sia i *patterns* di prevalenza correlati a stagionalità, sesso e classi di età degli animali campionati all'interno dell'Oasi WWF "Laguna di Orbetello", Grosseto nel periodo ottobre 2005-settembre 2006. L'RNA virale è stato estratto da 146 tamponi cloacali prelevati da anatre di superficie catturate con gabbie ad invito. Mediante *one-step* RT-PCR diretta ad amplificare un tratto specifico del gene M, sono stati identificati i campioni contenenti virus influenzali. Tali campioni sono stati quindi inoculati, per l'isolamento virale, nella cavità allantoidea di uova embrionate di pollo all'undicesimo giorno di incubazione. I liquidi allantoidei ottenuti sono stati analizzati in prove di emoagglutinazione ed ELISA diretta verso la nucleoproteina virale e sono stati considerati positivi i liquidi allantoidei emoagglutinanti positivi ad entrambe queste metodiche. I test del Chi-quadrato ed Esatto di *Fisher* sono stati utilizzati al fine di evidenziare differenze statisticamente significative in funzione dell'età e sesso dei soggetti campionati e di tre periodi di campionamento (sovrapponibili rispettivamente alla migrazione di discesa, allo svernamento ed al periodo post-riproduttivo). La prevalenza totale è risultata del 26% in RT-PCR e del 9,6% nelle prove di isolamento su uova embrionate. Durante l'intero anno di campionamento nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra le classi di età, di sesso e tra i diversi periodi di campionamento mentre dal confronto degli isolamenti ottenuti in adulti e giovani, durante la stagione di svernamento (gennaio-marzo 2006) emerge una differenza significativa ($P < 0,05$). Il dato di maggior circolazione virale nei giovani all'inizio di questo periodo contrasta con quanto riscontrato in letteratura, dove le prevalenze maggiori sono descritte all'inizio della migrazione autunnale. Una motivazione plausibile consta nelle basse temperature presenti

in Europa nord-orientale nei mesi di dicembre 2005-gennaio 2006, con conseguente erratismo dei soggetti svernanti, incrementando le opportunità di interazione tra sottopopolazioni di anatidi e diversi sottotipi virali. Considerando i risultati ottenuti, si può affermare che i soggetti giovani rivestono un ruolo fondamentale nella circolazione degli influenza virus tipo A; inoltre le variazioni climatiche possono indurre cambiamenti nel comportamento delle specie ospiti condizionando l'ecologia della popolazione virale.

P31. RICERCA DEL VIRUS HEV IN ALLEVAMENTI SUINI DELLA TOSCANA E DEL PIEMONTE

Roberto Zoccola (a), Maria Chiara Dell'Amico (a), Livio Del Chiaro (a), Nicola Martinelli (a), Maurizio Mazzei (a), Maria Luisa Carrozza (b), Fabrizio Rosso (c), Patrizia Bandecchi (a)

(a) *Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Università degli Studi, Pisa*

(b) *Scuola Normale Superiore, Pisa*

(c) *Settore Sanità Animale ed Igiene degli Allevamenti, Regione Piemonte, Torino*

Il virus dell'epatite E (HEV), RNA virus appartenente alla famiglia *Hepeviridae* genere *Hepevirus*, è un patogeno cosmopolita in grado di infettare diversi ospiti e responsabile nell'uomo di epatite acuta a trasmissione orofecale. Attualmente si conoscono quattro genotipi di HEV a diversa localizzazione geografica ed il virus è stato identificato nel suino in diverse parti del mondo. HEV non sembra avere alcuna importanza in patologia suina, ma il suino potrebbe costituire una fonte di infezione per l'uomo. La ricerca sulla presenza di HEV in campioni collettivi di feci provenienti da allevamenti suini toscani e piemontesi è stata svolta negli anni 2005-2006. Il campionamento è stato eseguito in 16 allevamenti suini da riproduzione e in 4 da ingrasso di cui 13 nella provincia di Cuneo e 7 in Toscana. Il campionamento interno a ciascun allevamento mirava a rilevare l'infezione, qualora presente, con una prevalenza del 40% o superiore. In ciascun allevamento sono stati prelevati 4 *pool* fecali provenienti da box estratti a caso tra quelli con suini in età a rischio (2-6 mesi). In totale sono stati eseguiti 80 prelievi fecali. Per la ricerca del genoma virale nei campioni di feci è stata utilizzata la tecnica di *Nested* RT-PCR secondo il protocollo descritto da Meng nel 1997. I *pool* fecali sono stati sospesi al 10% p/v in PBS e chiarificati, l'RNA totale è stato estratto, retrotrascritto ed il cDNA sottoposto a due successive amplificazioni. I *primers* utilizzati erano disegnati per amplificare una regione altamente conservata del gene ORF2 codificante per la proteina del capsido virale. Il sequenziamento degli amplificati virali delle dimensioni attese è stato commissionato alla BMR-Genomics di Padova e le sequenze ottenute sottoposte ad analisi filogenetica con i *software* BioEdit e Blast disponibili *on line*. Il genoma virale è stato identificato in 20 campioni provenienti da 9 allevamenti. In tutte le aree sottoposte a campionamento si sono riscontrati allevamenti positivi, con una prevalenza più elevata nei suini di età compresa fra i 3 ed i 5 mesi. I *pool* positivi provenivano principalmente da grandi allevamenti a ciclo chiuso (7 positivi su 9) caratterizzati dalla contemporanea presenza in allevamento di diverse generazioni di suini. L'analisi filogenetica degli amplificati virali ha permesso di classificare gli isolati virali come appartenenti al genotipo III.

INDICE DEGLI AUTORI

- Acutis, P.L.; 51
Agostana, S.; 67
Agrimi, U.; 25; 34; 48; 59; 71; 73
Aguzzi, A.; 48
Alborali, L.; 44
Alimena, G.; 66
Amaddeo, D.; 23
Amendola, A.; 19
Ammendolia, M.G.; 27
Astarita, S.; 41
Autorino, G.L.; 23
Baffoni, M.; 48
Bagnetti, M.; 17
Balboni, A.; 16
Bandecchi, P.; 78
Barbieri, I.; 17; 44
Barboni, C.; 40
Barca, L.; 57
Barcucci, E.; 46
Barocci, S.; 15; 40
Bartolini, C.; 40
Bartoloni, A.; 26
Bassani, M.; 16
Battilani, M.; 16; 72
Battista, P.; 52
Bedini, B.; 34; 35
Bejarano, V.; 26
Bellini, S.; 11
Berluti, R.; 15
Bettini, F.; 68
Bianchi, S.; 19
Bigolaro, M.; 59
Bisognano, G.; 61
Bonelli, S.I.; 26
Bono, F.E.; 47; 76
Borzacchiello, G.; 70
Botti, G.; 22
Boussini, H.; 24
Bozzetta, E.; 51
Briscolini, S.; 15; 40
Brocchi, E.; 17; 22; 63; 64
Buonavoglia, C.; 18; 35
Cagiola, M.; 37
Camarda, A.; 18; 35
Camero, M.; 18
Campitelli, L.; 35; 76
Cancedda, G.M.; 48
Canelli, E.; 54; 56
Cannella, V.; 42; 66
Canuti, M.; 19
Cappelli, K.; 62
Cappucci, L.; 22
Cappuccini, F.; 52
Caprioli, A.; 49
Capua, I.; 18; 24; 53; 68
Caracappa, S.; 67
Cardeti, G.; 23
Carrozza, M.L.; 78
Casciari, C.; 20; 41
Catanossi, M.; 62
Catelli, E.; 21; 43
Cattoli, G.; 18; 24; 53; 68
Cavaliere, N.; 18
Cavallo, A.; 26
Cecchinato, M.; 21; 43
Chiappini, B.; 71; 73
Chiesa, G.; 51
Chiocchetti, R.; 48
Ciabatti, I.M.; 23
Circella, E.; 18
Cittadini, F.; 62
Ciulli, S.; 6; 38
Clavenzani, P.; 48
Coletti, M.; 62
Conte, M.; 59; 71; 73
Coppola, G.; 62
Cordioli, P.; 23; 34; 44; 45; 47; 54; 56; 62
Couacy-Hymann, E.; 24
Cristoni, S.; 22
Crosatti, L.; 64
Cuteri, V.; 36
D'Agostino, C.; 25; 59; 73
Dall'Ara, P.; 65
Damiani, A.; 23

Dara, S.; 66
 Davico, P.; 51
 De Benedictis, P.; 24; 53
 De Giuseppe, A.; 37
 De Gregorio, V.; 42
 De Grossi, L.; 25; 48; 59; 73
 De Marco, M.A.; 35; 47; 76
 De Mia, G.M.; 41
 De Nardi, M.; 32
 Decaro, N.; 8; 18; 35
 Del Chiaro, L.; 78
 Dell'Amico, M.C.; 26; 78
 Delogu, M.; 35; 47; 49; 56; 76
 Di Bari, M.A.; 25; 59; 73
 Di Bartolo, I.; 27; 28; 49
 Di Bella, S.; 66
 Di Francesco, C.E.; 29; 30; 31
 Di Guardo, G.; 48
 Di Iorio, D.; 75
 Di Marco, P.; 42; 66
 Di Martino, B.; 29; 30; 31
 Di Nardo, A.; 32
 Di Trani, L.; 18; 34; 35; 76
 Donatelli, I.; 35; 76
 Esposito, E.; 71; 73
 Fabbi, M.; 56
 Facchini, M.; 76
 Faccini, S.; 58
 Falcone, E.; 34; 35; 52
 Fallacara, F.; 55
 Farneti, S.; 20; 36
 Fazzi, P.; 71
 Feliziani, F.G.; 36; 37
 Ferrante, G.; 37
 Ferrantelli, V.; 42
 Ferrari, M.; 40; 74
 Ferraris, M.; 61
 Ferraro, A.; 57
 Fiegna, C.; 47; 49; 76
 Finotti, S.; 47
 Foglini, A.; 40
 Forletta, R.; 9
 Formentin, E.; 65
 Forti, K.; 37
 Fortunati, M.; 15
 Franciosi, C.; 21
 Frangione, S.; 30
 Franzini, G.; 58
 Fusaro, A.; 24
 Galiero, G.; 41
 Galletti, E.; 38
 Galligioni, V.; 39
 Gallina, L.; 39
 Gallo, T.; 28
 Gamba, D.; 56
 Gargiulo, F.; 41
 Gauci, C.; 28
 Gavaudan, S.; 40
 Gelain, M.E.; 16
 Gelmetti, D.; 45
 Ghiggia, S.; 46
 Giammarioli, M.; 36; 41
 Gioia, L.; 48
 Giordani, F.; 25; 73
 Gonzales, J.L.; 26
 Grasselli, M.; 54
 Grazioli, S.; 17
 Guadagnini, D.; 45
 Guercio, A.; 42; 66
 Guidoni, M.; 56
 Iannone, R.; 57
 Ibañez, R.; 26
 Joannis, T.M.; 24
 Kawaoka, Y.; 68
 Kayar, A.; 36
 Knowles, N.J.; 17
 Koncan, R.; 19
 Lalatta-Costerbosa, G.; 48
 Lavazza, A.; 22; 52; 64
 Lelli, D.; 44; 54; 56
 Leopardi, E.; 42
 Ligios, C.; 48
 Lo Valvo, T.; 61
 Lombardi, G.; 54
 Lucchini, B.; 65
 Lucente, M.S.; 18
 Lupini, C.; 21; 43
 Luppi, A.; 44; 45; 47
 Macciocu, S.; 48
 Macri, R.; 47
 Magnino, S.; 27
 Magnone, W.; 45

Mandola, M.L.; 46
Marata, A.; 47; 49; 76
Marcaccio, S.; 37
Marcon, S.; 25; 59; 73
Marenzoni, M.L.; 36; 62
Marini, C.; 20
Marruchella, G.; 48
Marsilio, F.; 29; 30; 31
Martella, V.; 23
Martelli, F.; 49
Martinelli, N.; 78
Martucciello, A.; 41
Marucci, F.; 51
Massi, P.; 55; 56
Massirio, I.; 29
Mazzei, M.; 26; 78
Mehrez Aly, M.; 24
Melchiotti, E.; 59
Meloni, D.; 51
Menichelli, M.; 37
Milani, A.; 68
Monini, M.; 27; 52
Monne, I.; 24; 53
Morelli, L.; 71; 73
Moreno, A.; 34; 44; 54; 55; 56
Muratore, D.; 51
Mutinelli, F.; 59
Nardi, S.; 15
Nava, D.; 57
Naylor, C.J.; 21; 43
Nifosi, D.; 75
Nigrelli Arrigo, D.; 58
Nonno, R.; 25; 59; 71; 73
Obber, F.; 47
Or, E.M.; 36
Orusa, R.; 18; 46; 61
Ostanello, F.; 47; 49
Pagnini, U.; 70
Palombo, B.; 15
Paltrinieri, S.; 16
Palù, G.; 3
Palucci, O.; 31
Paniccià, M.; 15; 40
Parisi, C.; 71; 73
Parkan, Y.C.; 36
Pascotto, E.; 45
Passamonti, F.; 62
Paton, D.; 17
Peletto, S.; 51
Pellegrini, C.; 41
Persimoni, A.; 40
Pesente, P.; 21
Petrini, S.; 40
Pezzoni, G.; 63; 64
Pieri, A.; 26
Pifferi, A.R.; 25; 59
Poli, G.; 65
Polizzi, D.; 75
Ponti, W.; 65
Preziuso, S.; 36
Prosperi, S.; 32; 38; 39
Puricelli, M.; 65
Purpari, G.; 42; 66
Raffini, E.; 76
Reale, S.; 67; 75
Remzi, G.; 36
Ricchizzi, E.; 21
Rigoni, M.; 68
Rizzo, C.; 70
Roperto, F.; 70
Roperto, S.; 70
Rosignoli, C.; 58
Rosone, F.; 25; 59; 73
Rosso, F.; 78
Ru, G.; 71
Ruggeri, F.M.; 27; 28; 49; 52
Russo, V.; 70
Russotto, L.; 66
Sabbatini, M.; 15
Sala, M.; 23
Salvati, S.; 46
Salzberg, S.L.; 24
Sandri, C.; 45
Savini, G.; 5
Scagliarini, A.; 38; 39; 72
Scavia, G.; 71
Scicluna, M.T.; 23
Scolamacchia, F.; 71
Servida, F.; 65
Severi, G.; 37
Shinya, K.; 68
Silvestre, O.; 57

Simoni, E.; 15
Soi, R.K.; 32
Sozzi, E.; 44; 54; 56
Sperati Buffoni, L.; 21
Stoppani, E.; 74
Tanzi, E.; 19
Toffan, A.; 68
Tolari, F.; 26
Tonucci, F.; 40
Tosi, G.; 55
Vaccari, F.; 72
Vaccari, G.; 25; 34; 59; 71; 73
Valda, Y.; 26
Valente, C.; 36
Vascellari, M.; 59

Venuti, A.; 70
Vignolo, E.; 34
Villa, R.; 74
Vitale, F.; 67; 75
Vitale, M.; 67; 75
Vitelli, F.; 36
Vizzini, S.; 42
Volpi, S.; 61
Vulcano, G.; 23
Vullo, S.; 42
Zanoni, M.G.; 44
Zappa, A.; 19
Zengarini, M.; 47; 49; 76
Zoccola, R.; 78
Zuliani, M.; 28

*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 Litografia Chicca di Fausto Chicca
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

Roma, marzo 2007 (n. 1) 8° Suppl.