

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**V Workshop Nazionale
di Virologia Veterinaria**

Teramo, 26-27 giugno 2014

RIASSUNTI

A cura di

Roberto Delogu (a), Emiliana Falcone (a), Marina Monini (a),
Franco Maria Ruggeri (a), Barbara Di Martino (b),
Fulvio Marsilio (b), Federica Monaco (c), Giovanni Savini (c)

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

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

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

ISSN 0393-5620
ISTISAN Congressi
14/C3

Istituto Superiore di Sanità

V Workshop Nazionale di Virologia Veterinaria. Teramo, 26-27 giugno 2014. Riassunti.

A cura di Roberto Delogu, Emiliana Falcone, Marina Monini, Franco Maria Ruggeri, Barbara Di Martino, Fulvio Marsilio, Federica Monaco e Giovanni Savini
2014, v, 99 p. ISTISAN Congressi 14/C3

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

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

Istituto Superiore di Sanità

Fifth National Workshop on Veterinary Virology. Teramo, June 26-27, 2014. Abstract book.

Edited by Roberto Delogu, Emiliana Falcone, Marina Monini, Franco Maria Ruggeri, Barbara Di Martino, Fulvio Marsilio, Federica Monaco and Giovanni Savini
2014, v, 99 p. ISTISAN Congressi 14/C3 (in Italian and in English)

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

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

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

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

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

Citare questo documento come segue:

Delogu R, Falcone E, Monini M, Ruggeri FM, Di Martino B, Marsilio F, Monaco F, Savini G (Ed.). *V Workshop Nazionale di Virologia Veterinaria. Teramo, 26-27 giugno 2014. Riassunti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2014 (ISTISAN Congressi 14/C3).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Fabrizio Oleari*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma: n. 119 del 16/5/2014 (cartaceo); n. 120 del 16/5/2014 (online)

Redazione: *Paola De Castro, Egiziana Colletta e Patrizia Mochi*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.



INDICE

Programma	iii
Note per la consultazione	v
Relazioni	1
Comunicazioni orali e Poster	11
Indice degli autori	95

PROGRAMMA

Giovedì 26 giugno 2014

- 13.00 Registrazione dei partecipanti
13.30 Indirizzo di benvenuto e introduzione

Prima sessione

VECCHI E NUOVI VIRUS DI ATTUALITÀ IN SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

Moderatori: Canio Buonavoglia, Federica Monaco

- 14.00 *Progress in feline virology*
Marian C. Horzinek
14.30 Comunicazioni orali
15.45 Intervallo e visita ai poster

Seconda sessione

EVOLUZIONE E MECCANISMI DI TRASMISSIONE DI VIRUS E PRIONI, VETTORI E SERBATOI

Moderatori: Giovanni Savini, Gabriele Vaccari

- 16.30 *Emerging mosquito - borne flaviviruses in Europe*
Tamás Bakonyi
17.00 Comunicazioni orali

Terza sessione

INTEGRAZIONE MEDICO-VETERINARIA E COOPERAZIONE INTERNAZIONALE NELLA SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA DELLE INFEZIONI VIRALI

Moderatori: Maria Teresa Scicluna, Giuseppe Iovane

- 18.00 *Bats and lyssaviruses: a potential source of zoonosis?*
Hervé Bouhry
18.30 Comunicazioni orali

Venerdì 27 giugno 2014

Quarta sessione

VACCINI E FARMACI ANTIVIRALI

Moderatori: Calogero Terregino, Annalisa Guercio

08.45 *Antiviral immune response in chickens*

Bernd Kaspers

09.15 Comunicazioni orali

10.15 Intervallo e visita ai poster

Quinta sessione

**ANTIGENI E GENOMI VIRALI: DIAGNOSI, CARATTERIZZAZIONE
E RELAZIONI CON L'OSPITE**

Moderatori: Alessandra Scagliarini, Antonio Lavazza

11.00 *Stress, anti-viral immunity and bee colony collapse*

Francesco Pennacchio

11.30 Comunicazioni orali

13.00 Pausa pranzo

Sesta sessione

VIRUS E TRASMISSIONE ZOOTICA O ALIMENTARE

Moderatori: Franco Maria Ruggeri, Marina Nadia Losio

14.00 *Virus gastroenterici a potenziale zoonotico*

Fulvio Marsilio

14.30 Comunicazioni orali

15.30 Presentazione migliori poster

*Moderatori: Gaetano Donofrio, Vito Martella, Ciriaco Ligios, Sergio Rosati,
Barbara di Martino, Gian Mario De Mia*

16.00 Conclusioni e chiusura dei lavori

NOTE PER LA CONSULTAZIONE

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

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

Relazioni

PROGRESS IN FELINE VIROLOGY

Marian C. Horzinek
University of Utrecht, The Netherlands

The cat, in its feral ancestry a solitary, territorial predator, has become the most popular household pet and companion animal in the 21st century. Intensive breeding, sheltering, hoarding and crowding have made infectious diseases conspicuous, of which the viral ones have been mostly controlled by vaccination. An exception is Feline Infectious Peritonitis which is caused by a coronavirus mutant. On the other hand, Feline Leukemia has been controlled by test-and-removal programs and efficient vaccines, and Feline Viral Immunodeficiency by implementing management measures. The need for information about the natural history of feline diseases has led to a plethora of textbooks and advisory bodies worldwide, of which the European Advisory Board on Cat Diseases (ABCD) is a point in case. Still, feline virology constitutes a meager 1% of all publications in virology (PubMed: human: 50%). Viruses are masters at abusing cellular infrastructure for their own amplification. During the arms race with their host, viruses with an RNA genome can rely on a special property: a high mutation frequency. While copying the virus genome the enzyme complex that directs replication makes so many mistakes that the viral progeny can essentially be considered a “swarm of mutants”. This would appear to be a disadvantage, after all mutations can be lethal, but for RNA viruses it turns out to be a huge advantage since it facilitates escape from e.g. the host’s immune response. Interspecies transmission, with the encounter of an immunologically virgin population has led to catastrophes, like SARS and MERS outbreaks, and more must be expected. The popular image of viruses as obligatory intracellular parasites begs the question if there are also beneficial viruses. We are accustomed to “useful” bacteria, fungi, yeasts are viruses nothing but pathogens? A famous finding to the contrary is that of the syncytin gene, the envelope gene of a human endogenous retrovirus. The major sites of syncytin expression are placental syncytiotrophoblasts, giant syncytia. Syncytin may mediate placental cytotrophoblast fusion *in vivo*, and thus may be essential in pregnancy and placental morphogenesis. So viruses have co-evolved with their hosts and continue to do so they may have played a role in the emergence of life on this planet. The Darwinian tree of life representation has a recent competitor in the Web of Life (network) hypothesis, which accommodates horizontal transmission of genetic information, as it occurs in viruses.

EMERGING MOSQUITO - BORNE FLAVIVIRUSES IN EUROPE

Tamás Bakonyi

Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Science, Szent István University, Budapest, Hungary; Viral Zoonoses, Emerging and Vector-Borne Infections Group, Institute of Virology, University of Veterinary Medicine, Wien, Austria

Several arboviruses are classified into the *Flavivirus* genus of the *Flaviviridae* family. Many of them represent considerable veterinary and public health impact. These viruses are mainly transmitted by mosquito or tick vectors. Although most of the flaviviruses are present in tropical regions, within the last two decades at least three mosquito-borne flaviviruses emerged in Europe. The West Nile Virus (WNV) is the most widespread flavivirus on the Earth. The natural hosts of WNV are wild birds, which play a central role in the maintenance and long-term geographic spread of the strains. The virus is mainly vectored by *Culex* mosquitoes, but several other mosquito species and ticks are competent vectors. WNV can infect also mammals, particularly horses and humans; but reptiles and amphibians are also susceptible. In birds WNV usually causes subclinical infection, but WNV-associated bird mortality (i.e. wild birds, geese) has been reported too. Subclinical infections in mammals are also frequent, but febrile illness (West Nile fever) and central nervous illness (meningo-encephalo-myelitis) develops in several cases. Two main genetic lineages and several further lineages of WNV have been identified so far. Lineage 1 is the most widespread, while lineage 2 has previously been detected only in Africa. A lineage 1 strain was introduced into the United States of America in 1999, and within a few years spread through the continent, causing significant wild bird mortality, as well as several horse and human cases. In Europe certain regions in the Mediterranean basin, in central and eastern Europe are endemic with lineage 1 strains. A significant WNV activity has been recorded in northern Italy since 2008, involving lineage 1 strains and causing central nervous diseases mainly in horses. A lineage 2 WNV strain emerged in 2004 in Hungary, and caused mortality in birds of prey. Within the next few years the strain became endemic and caused sporadic bird and mammal cases. In 2008, however, a significant outbreak and considerable geographic spread have been observed, when the virus spread all around Hungary and reached the eastern regions of Austria. In 2010 a significant WNV outbreak was reported in north-eastern Greece with >190 human neurological illnesses and >30 fatal cases. Genetic comparisons revealed that the lineage 2 virus, which emerged in Hungary in 2004, has spread to Greece and caused the outbreak. The same virus was also detected in Italy, in Ancona in a human case in 2011. In the subsequent years several cases were detected in Italy in birds and in humans too. The strain also emerged in Serbia (2010), in Croatia (2012) and in the Czech Republic (2013). Another lineage 2 strain emerged in the Volgograd region in Russia in 2007. The strain caused a significant human outbreak in 2010, and also spread to the eastern regions of Romania, where it caused further human neurological cases. Additionally, representatives of other WNV lineages were also detected in Europe, mainly in mosquito vectors. The Usutu Virus (USUV) is closely related to WNV (Japanese encephalitis virus serocomplex). This virus was first isolated in South Africa in

1959, and was considered as a minor pathogen in the African continent. In 2001, however, the virus was identified as the causative agent of an episode of wild bird mortality in Vienna, Austria. Blackbirds (*Turdus merula*) and owls were the most affected host species, and many of them developed lethal encephalitis. Subsequently, the virus was detected in further central European countries: Hungary (2005), Italy and Switzerland (2006), Germany (2010) and Czech Republic (2011), with or without wild bird mortality. Retrospective studies revealed the nucleic acid of USUV in archived organ samples of birds died within a wild bird die-off episode in northern Italy, in 1996. Although USUV is principally an avian pathogen, clinical cases of human USUV infections were also reported in immunocompromised patients in Italy. Another two genotypes of USUV were detected in Spain, which indicates a more widespread distribution of the virus with diverse virulence. The Dengue Virus (DENV) is a significant human pathogen in the tropical regions. DENV strains are frequently introduced into Europe by travellers; however, previously the virus could not establish itself in the continent, due to the lack of competent vectors. One of the main vectors, the *Aedes albopictus* (Asian tiger mosquito) was introduced into Italy in 1990 and invaded several countries in the Mediterranean region. In 2012 the first autochthonous DENV cases were reported in Croatia, indicating the potential of establishment of this pathogen in Europe. Within the last decade increasing flavivirus activity has been observed in Europe, with significant public health, veterinary and nature conservation consequences. Considering the potential impact of global environmental changes, improved methods are necessary for the monitoring, diagnosis, prevention and control the spread of these viruses in the continent.

BATS AND LYSSAVIRUSES: A POTENTIAL SOURCE OF ZONOSIS ?

Hervé Bourhy

Unit Lyssavirus Dynamics And Host Adaptation, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Rabies, Institut Pasteur, Paris, France

The aetiological agents of rabies, eleven species of viruses belonging to the genus *Lyssavirus*, family *Rhabdoviridae*, are RNA viruses with a single-stranded genome of negative polarity. Rabies has been neglected across much of Asia and Africa, despite becoming an increasing problem in the recent decades. Every year approximately 55,000 people die from rabies. However, despite the importance of this disease for humans, little is known about the spatial and temporal dynamics of rabies in the different major reservoir species, or the processes responsible for its maintenance in specific geographic localities. Eleven of the twelve species of lyssavirus are circulating in bats and phylogenetic studies are in favour of a common lyssavirus ancestor circulating in bats. Bats have a worldwide distribution and account for approximately 20% of all known mammalian species. Lyssavirus are circulating in bats in Africa, Europe, Asia, Oceania and America. However, the impact of bat rabies on human health is so far limited except in latin America where bat rabies is now the principal cause of human death due to rabies.

THE ANTIVIRAL IMMUNE RESPONSE IN CHICKENS

Bernd Kaspers

Department of Veterinary Sciences, University of Munich, Germany

Like mammals, chickens have developed both innate and adaptive antiviral immune defense mechanisms during co-evolution with pathogens. In 1957 a soluble factor was found in influenza infected chicken embryos which interfered with virus replication, hence named interferon (IFN). With the availability of the chicken genome a detailed analysis of the avian IFN system became possible which led to the identification of several type I IFNs (more than 10), a single type II and a single type III IFN. Members of all IFN types have been cloned, expressed as recombinant proteins and applied for functional studies in birds. Likewise, a set of receptors for virus associated molecular patterns has been described in birds including TLR-3, TLR-7 and TLR-21 and members of the RIG-I-like family of cytosolic receptors. Interestingly, chickens lack RIG-I but have a gene for MDA5 while ducks express both molecules a feature that was associated with influenza susceptibility versus resistance in these two species. A second line of innate antiviral defense is provided by natural killer cells (NK-cells) a cell which is not well defined in birds. NK-like activity was been reported in several publications. However, a unique NK-cell marker has not been described, thus far. Phenotypically, chicken NK cells are defined as CD3⁻ surface Ig⁻ CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ lymphocytes which constitute between 0.5 and 3% of all lymphocytes in blood and lymphoid tissues. The only exception is the gut which contains a large population of NK-like cells. NK-like cytotoxic activity was described in the context of MDV and influenza infection and investigated *in vitro* using RP9 cells as the target cell lines. The avian adaptive immune system is characterized by several unique morphological and functional properties such as the lack of lymph nodes and a specialized organ for B-cell development, the bursa of Fabricius. Nevertheless, both the B-cell and the T-cell system are highly similar to their mammalian counterparts. Antibodies secreted by B-cells in response to infection or vaccination, play a critical role in the control of virus replication and spreading as documented in hundreds of publications. The role of CD8⁺ cytotoxic T-lymphocytes (CTL) is less well understood. A particular problem associated with cytotoxicity assays is the limited availability of syngeneic chicken lines which would permit detailed studies. Consequently, there are only few examples of CTL responses in birds and assays for CTL epitope mapping are not available to date.

STRESS, ANTI-VIRAL IMMUNITY AND BEE COLONY COLLAPSE

Francesco Pennacchio

Dipartimento di Agraria, Università degli Studi Federico II, Napoli

The decline of honeybee colonies and their eventual collapse is a widespread phenomenon in the northern hemisphere of the globe, which severely limits the beekeeping industry. This dramatic event is associated with an enhanced impact of parasites and pathogens on honeybees, which is indicative of reduced immunocompetence. The parasitic mite *Varroa destructor* and the vectored viral pathogens appear to play a key-role in the induction of this complex syndrome. In particular, the highly widespread Deformed Wing Virus (DWV) is now considered, along with *Varroa*, one of the major causes of bee colony losses. Several lines of evidence indicate that this mite/DWV association severely affects the immune system of honeybees. In particular, DWV down-regulates at transcriptional level NF- κ B and has a negative impact on antiviral barriers controlled by the Toll pathway, which is exacerbated by the mite feeding. Moreover, neonicotinoid insecticides, which are agonists of the acetylcholine receptors, by negatively modulating NF- κ B activation, further contribute to the reduction of antiviral immunity. The molecular mechanisms underpinning these complex interactions are currently being investigated and the emerging information has allowed the development of a new functional model, describing how different stress factors may synergistically concur in the induction of bee immune alteration and health decline. This provides a new logical framework in which to interpret the proposed multifactorial origin of bee colony losses and sets the stage for a more comprehensive and integrated analysis of the effect that multiple stress agents may have on honeybees.

VIRUS GASTROENTERICI A POTENZIALE ZOOTONICO

Fulvio Marsilio

Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Teramo

Le Gastroenteriti Virali (GEV) occupano un ruolo di rilievo in patologia umana ed animale, soprattutto se si considerano le problematiche di sanità pubblica evidenziate attraverso l'introduzione delle metodiche biomolecolari nella diagnostica di routine. È stato così possibile acquisire nuove informazioni, oltre che sulla diffusione anche sull'eterogeneità genetica di patogeni emergenti causa di GEV quali Norovirus (NoV), sapovirus, bocavirus, astrovirus, virus dell'Epatite E (HEV) e nuovi picornavirus come Aichi Virus (AiV). A tal proposito, ceppi NoV geneticamente correlati a NoV umani sono stati identificati in suini e bovini e ceppi NoV umani sono stati in grado d'infettare, replicare e indurre alterazioni intestinali in suinetti gnotobiotici. Inoltre, calicivirus enterici geneticamente correlati a NoV umani sono stati identificati nelle feci di carnivori. Metodiche ELISA allestite con la proteina capsidica VP1 espressa in baculovirus sono state impiegate per evidenziare anticorpi anti-NoV, dimostrando ulteriormente la possibile circolazione interspecie di tali patogeni. Numerose evidenze supportano l'ipotesi che anche l'epatite E sia una zoonosi emergente e che i suini possano rappresentare il principale serbatoio. In questi animali, oltre alla presenza di anticorpi anti-HEV, è stata dimostrata l'eliminazione del virus per via fecale. Infezioni sperimentali hanno inoltre evidenziato la possibilità di trasmissione interspecifica di ceppi umani al suino e di ceppi suini a primati non umani ed alcuni studi hanno riportato un'elevata prevalenza anticorpale anti-HEV in soggetti professionalmente esposti al contatto con suini come allevatori, personale addetto alla gestione degli animali e veterinari. Infine, un altro gruppo di virus per i quali si sospetta una possibile circolazione interspecifica, è rappresentato da nuovi picornavirus classificati nel genere *Kobuvirus*. Il prototipo di questo genere è il virus Aichi (AiV) dell'uomo, attualmente riconosciuto come uno dei principali patogeni virali associati a forme di gastroenterite ad eziologia sconosciuta. La recente identificazione in cani e gatti con diarrea di *Kobuvirus* correlati dal punto di vista genetico a ceppi AiV umani, ha suscitato numerosi interessi relativamente alla loro diffusione e ruolo patogeno, ma soprattutto, considerando la stretta interazione uomo-animale, ha sollevato ragionevoli dubbi circa il loro potenziale zoonotico.

Comunicazioni orali e Poster

P.1 INDAGINE SIEROLOGICA SULLA CIRCOLAZIONE DEL VIRUS DI SCHMALLEMBERG NEL LAZIO ED IN TOSCANA

Alessia Altigeri, Annalisa Altigeri, Martina Benedetti, Giuseppina Brocherel, Maira Guidoni, Ida Ricci, Giorgio Saralli, Erminia Sezzi, Giuliana Terracciano, Fabrizio Turi, Maria Rita Viola

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma

Infezioni da Schmallenberg Virus (SBV) risultano segnalate nelle specie di ruminanti allevate nella maggior parte dei Paesi europei. La trasmissione vettoriale dell' SBV sarebbe confermata dal fatto che gli episodi clinici sono stati prevalentemente osservati nel periodo tardo-estivo/autunnale. La presenza del virus è stata infatti ripetutamente segnalata in insetti del genere *Culicoides spp.* In Italia, sebbene la presenza del virus sia stata accertata nel 2011 in *pool* di *C. obsoletus complex* in Veneto e Friuli-Venezia Giulia, il primo caso clinico è da ricondurre al mese di febbraio 2012 in Provincia di Treviso. Sulla base delle definizioni di sospetto e di caso riportate nella nota del Ministero della Salute del 4 aprile 2012, sono stati confermati sporadicamente successivi focolai in Sardegna, Piemonte ed in Provincia di Bolzano (fonte SIMAN 9 settembre 2013). Nel corso delle attività di *routine* condotte presso il nostro Istituto abbiamo tuttavia evidenziato la presenza di anticorpi specifici in campioni sottoposti a controllo mediante l'impiego del test di sieroneutralizzazione. Per valutarne la diffusione è stata condotta un'indagine sierologica su allevamenti presenti nel territorio del Lazio e della Toscana. A tale scopo, considerata l'abbondanza di specie appartenenti al *C. obsoletus complex*, vettore anche del virus Bluetongue, per il quale è in atto il Piano di sorveglianza nazionale, il cui campionamento è definito per identificare un'incidenza superiore al 5% su base annua, con un IC del 95%, sono state sottoposte ad un singolo controllo le 240 aziende sentinella, sottoposte a sorveglianza nel periodo settembre/novembre 2013, per un totale di 2021 prelievi. I campioni di sangue sono stati saggiati mediante test sieroneutralizzazione, secondo le indicazioni e con i reagenti forniti dal Friedrich Löffler Institut (Reims). In oltre il 60% delle aziende era rilevabile almeno un campione positivo. Il presente contributo riporta nel dettaglio i dati distribuiti geograficamente per provincia e regione. Nonostante la diffusione osservata, non sono stati segnalati casi clinici riconducibili a SBV. In particolare, anche in corso di diagnostica per agenti abortigeni, pur in presenza di anticorpi nei gruppi di animali controllati, la ricerca diretta del virus è sempre risultata negativa.

P.2 PRIMO REPORT 2014 DI INFLUENZA EQUINA (IE) IN ITALIA

Gian Luca Autorino, Antonella Cersini, Raffaele Frontoso, Roberta Giordani, Silvia Gregnanini, Raniero Lorenzetti, Giuseppe Manna, Francesca Rosone, Maria Teresa Scicluna

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma

Nella popolazione equina europea, le Epidemie Influenzali (IE) dell'ultimo decennio sono riconducibili alla circolazione dell'American lineage del virus H3N8 e, ultimamente, del *clade 2* del *sublineage* Florida. In Italia, sebbene l'IE sia endemica, sono limitate le richieste diagnostiche in corso di sindromi respiratorie. Gli ultimi ceppi caratterizzati del 2005 (Roma e Bari) erano omologhi allo stipite A/eq/SouthAfrica/4/2003 (successivamente inquadrato fra i ceppi dell'American lineage, *sublineage* Florida *clade 1*). Nell'ambito di un focolaio che ha interessato da gennaio 2014 l'Ippodromo di Roma, sono stati condotti approfondimenti presso una scuderia che aveva richiesto l'intervento del Centro di referenza per le malattie degli equini a seguito dell'insorgenza di una sindrome respiratoria caratterizzata da febbre e tosse in 11 puledri vaccinati, introdotti a fine 2013. Fra le indagini preliminari effettuate sui tamponi nasali con il panel di saggi *real-time* PCR per la ricerca di virus respiratori degli equini, è risultato positiva la sola ricerca del gene della proteina M per virus influenzali di tipo A. Per la caratterizzazione dei ceppi il sopranatante dei tamponi positivi al test di *screening* (4/11) è stato inoculato in uova embrionate di pollo. Dal liquido allantoideo del terzo passaggio degli isolati è stato estratto l'RNA, successivamente impiegato per la reazione di RT-PCR, utilizzando una coppia di *primer* specifica per la regione HA1 del segmento IV del genoma virale. Per aumentare la resa del prodotto di PCR, ai fini del sequenziamento, l'amplificato di 1080 bp è stato utilizzato come stampo per una reazione di PCR mirata all'amplificazione di una sub-regione di 220 bp. Il frammento di 220 bp ha mostrato un'omologia di sequenza pari al 99,5% con i ceppi North Rhine Westphalia e Yokohama del *clade 2*, *sublineage* Florida (GenBank a.n. KJ538149 e AB761396.1), rispettivamente isolati nel 2014 e 2012 in Germania ed in Giappone. Il caso in studio conferma quanto riportato nel 2013 dal Panel di esperti OIE per la sorveglianza dell'IE e dei vaccini in merito alla esclusiva circolazione dal 2012 in Europa del *clade 2*, *sublineage* Florida. In particolare, trattandosi di puledri, non si può stabilire se l'insufficiente protezione sia conseguente al limitato numero di vaccinazioni ricevute o alla scarsa protezione conferita dai vaccini disponibili, alcuni dei quali aggiornati con i soli prototipi A/eq/SouthAfrica/2003 ed A/eq/Ohio/2003, appartenenti al solo *clade 1*. Si conferma la necessità e l'importanza di mantenere adeguati livelli di monitoraggio mirati al controllo dell'IE e, in particolare, alla verifica degli stipiti circolanti in funzione dell'appropriatezza dei prodotti immunizzanti.

P.3 GESTIONE DI UN FOCOLAIO NEUROLOGICO DA EQUINE HERPESVIRUS 1 (EHV-1)

Gian Luca Autorino (a), Vania Corradi (a), Raffaele Frontoso (a), Stefano Galletti (b), Giuseppe Manna (a), Angela Mascioni (b), Antonella Pallone (c), Ida Ricci (a), Francesca Rosone (a), Massimiliano Simula (a), Maria Teresa Scicluna (a)

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

(b) *Veterinario Libero Professionista, Roma*

(c) *Servizio Veterinario, ASL Roma C, Roma*

Come per altre infezioni da Alphaespesvirus, nella popolazione equina quelle da EHV-1 risultano endemiche e caratterizzate da ricorrenti fenomeni di riattivazione del virus latente anche in animali vaccinati. Oltre alle classiche forme di rinopneumonite, a partire dagli anni '90 sono sempre più frequenti le segnalazioni di casi di encefalomielite da EHV-1 (EHM). Dal 2003 è stato osservato che tali sindromi erano più frequentemente associate alla presenza di stipiti virali che presentano una sostituzione nucleotidica in posizione 2.254 dell'ORF30, a cui corrisponde la sostituzione di asparagina con acido aspartico in posizione aminoacidica 752. Nostri precedenti studi accertavano che tale mutazione era già presente in oltre il 60% degli stipiti isolati in Italia dalla fine degli anni 80, principalmente isolati da feti abortiti. L'aumento di attenzione nei confronti delle forme neurologiche da virus West Nile, ha favorito anche la frequenza di diagnosi di EHM da stipiti neuropatogeni. In particolare, il presente contributo descrive la gestione di un focolaio verificatosi in un circolo ippico che deteneva oltre cento soggetti adulti, prevalentemente adibiti ad attività equestre agonistica. La presenza di febbre nei primi due soggetti sindromici sottoposti a controllo e la stagione invernale, escludevano il sospetto di West Nile *disease*. Pertanto, il protocollo diagnostico adottato, che prevede l'impiego diretto di un saggio di RT-PCR che consente la discriminazione allelica dei ceppi classici da quelli neuropatogeni, ha immediatamente confermato la positività per EHV-1/G2254, da tamponi nasali e *buffy coat*. Per limitare la diffusione dell'infezione, sono state tempestivamente adottate misure di biosicurezza che consistevano nella formazione dei proprietari e del personale di scuderia sulle modalità di trasmissione dell'infezione e le azioni da adottare per la prevenzione (separazione degli animali malati e sospetti d'infezione, impiego di strumenti e mezzi di governo dedicati, limitazione delle movimentazioni e riduzione di possibili condizioni di stress). Parallelamente, per individuare precocemente altri casi, ogni soggetto scuderizzato veniva sottoposto quotidianamente a controllo termometrico per le tre settimane successive all'ultimo accertamento positivo, in considerazione del periodo massimo di incubazione dell'infezione. In caso di febbre, venivano prelevati ulteriori campioni per la diagnosi virologica. Tali esami hanno consentito di individuare nella settimana successiva alla prima diagnosi, due nuovi casi. L'integrazione fra colleghi nel rispettivo ruolo professionale e la responsabile risposta dei proprietari hanno consentito la rapida estinzione del focolaio, limitando la diffusione nel tempo tra i soggetti mantenuti nel circolo e ad altri insediamenti del circuito equestre, permettendo una pronta ripresa delle attività sportive.

EPATITE INFETTIVA DI RUBARTH: UNA PATOLOGIA RI-EMERGENTE?

Andrea Balboni (a), Francesco Dondi (a), Chiara Agnoli (a), Massimo Giunti (a), Giuliano Bettini (a), Ranieri Verin (b), Mara Battilani (a)

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

(b) *Diagnostic Pathology Service, School of Veterinary Science, University of Liverpool, United Kingdom*

L'epatite infettiva di Rubarth (*Infectious Canine Hepatitis - ICH*), sostenuta dall'Adenovirus canino di tipo 1 (CA_{AdV}-1), è una patologia canina per la quale la vaccinazione sistematica ha garantito un controllo della malattia fino all'ultimo decennio. Diversi focolai della malattia sono stati riportati in Italia, evidenziando come il CA_{AdV}-1 continui a circolare nella popolazione canina. Nel presente lavoro sono segnalati 7 casi di infezione da CA_{AdV}-1 in cani pervenuti all'Ospedale Didattico Veterinario (ODV) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) dell'Università di Bologna, nel periodo compreso tra maggio 2012 e dicembre 2013. I cani, di età compresa tra i 3 mesi e gli 8 anni, vivevano in casa o in ambiente rurale. Quattro dei sette cani erano correttamente vaccinati, mentre i rimanenti presentavano un protocollo vaccinale incompleto (3/7). Quattro cani sono risultati positivi al CA_{AdV}-1 nell'ambito di un'indagine epidemiologica effettuata presso l'ODV ed erano asintomatici (2/4), o presentavano un quadro clinico compatibile con ICH, quali nefropatia o enterite cronica (2/4). I tre soggetti rimanenti, mostravano sintomi riferibili a ICH, quali abbattimento, dimagrimento, lesioni cutanee, epatite, enterite ed uveite (occhio blu). La conferma diagnostica del sospetto clinico di ICH è stata effettuata utilizzando una metodica di PCR in grado di distinguere il CA_{AdV}-1 dal CA_{AdV}-2. Per due soggetti che presentavano sintomatologia acuta tipicamente riferibile a ICH, il CA_{AdV}-1 è stato isolato su cellule MDCK e le porzioni del genoma codificanti per le proteine della fibra e dell'esone, a maggior attività antigenica, sono state sequenziate ed analizzate. Uno dei soggetti con forma acuta è deceduto durante il ricovero ed è stato sottoposto ad esame autoptico, istopatologico ed immunostochimico. All'esame istopatologico è stato evidenziato un quadro multiorganico caratterizzato da grave epatite necrotizzante multifocale con sporadici corpi inclusi intranucleari, gastrite erosiva e glomerulonefrosi membranosa. L'esame immunostochimico ha confermato la positività al CA_{AdV}-1. La presente segnalazione conferma che il CA_{AdV}-1 costituisce tuttora un patogeno degno di nota per il cane e come tale dovrebbe essere riconsiderato nella pratica clinica veterinaria.

P.4 INDAGINE SULLA PRESENZA DELL'ADENOVIRUS CANINO DI TIPO 1 E 2 (CADV-1/CADV-2) IN CANI DI PROPRIETÀ

Andrea Balboni, Claudia Mollace, Massimo Giunti, Francesco Dondi, Santino Prosperi, Mara Battilani

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

L'adenovirus canino (CAAdV) presenta due tipi virali, il CAAdV-1 responsabile dell'epatite infettiva canina (ICH) ed il CAAdV-2 responsabile della laringotracheite infettiva del cane. Il CAAdV-1 è, ad oggi, scarsamente considerato come agente di malattia nel cane, poiché la diffusa pratica vaccinale ha permesso un efficace controllo dell'ICH. Recentemente, sono stati però riportati casi di infezione da CAAdV-1 e CAAdV-2 in cani e volpi ed è perciò probabile che, nonostante la vaccinazione, il virus continui a circolare. Allo scopo di ottenere informazioni riguardanti la diffusione del CAAdV-1 e del CAAdV-2 nella popolazione canina, sono stati campionati 51 cani pervenuti presso l'Ospedale Didattico Veterinario (ODV) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET), nel periodo compreso tra il 07/05/2012 ed il 08/06/2012. La ricerca del CAAdV è stata effettuata su tamponi rettali ed urina, utilizzando una metodica di PCR in grado di distinguere il CAAdV-1 dal CAAdV-2. I prodotti di PCR ottenuti sono stati sequenziati ed analizzati. Trenta dei 51 cani testati (58,8%) sono risultati positivi al CAAdV-2 e di questi, 4 (7,8%) erano coinfectati con il CAAdV-1. L'analisi statistica (chi-quadrato) dei dati raccolti non ha evidenziato nessuna significatività statistica ($P < 0,05$) riguardante la distribuzione preferenziale dei soggetti positivi all'interno delle diverse categorie di popolazione (razza, sesso, età e stato vaccinale). In particolare, non sono emersi valori di prevalenza significativamente diversi tra soggetti giovani ed adulti e tra soggetti vaccinati e non vaccinati. I quattro cani positivi al CAAdV-1 avevano tutti ricevuto l'ultimo richiamo vaccinale da meno di 1 anno. Lo studio delle sequenze nucleotidiche ottenute ha permesso di distinguere 2 diversi ceppi di CAAdV-2, mentre, le sequenze di CAAdV-1 sono risultate uguali tra loro e a ceppi virali identificati in Italia nel 2010-2011 in cani e volpi. Quindi, nel territorio italiano, circola probabilmente, sia nel cane che nella volpe, un unico ceppo o ceppi molto simili di CAAdV-1 ed i casi di malattia registrati negli ultimi anni sarebbero da ricondurre ad una non adeguata copertura vaccinale piuttosto che all'emergenza di nuove varianti virali. Inoltre, il CAAdV-2 è stato identificato sia da materiale fecale che da urine, dimostrando come queste due matrici biologiche svolgano un ruolo importante nella eliminazione e diffusione del virus. La pratica vaccinale appare quindi tuttora indispensabile nel prevenire lo sviluppo dell'epatite infettiva poiché il CAAdV-1 circola ancora nella popolazione canina.

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEI VIRUS DELLA MALATTIA VESCICOLARE DEL SUINO IN ITALIA NEL PERIODO 2002-2013

Dennis Benedetti, Giulia Pezzoni, Chiara Chiapponi, Santina Grazioli, Stefano Pongolini, Emiliana Brocchi

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

La Malattia Vescicolare del Suino (MVS) è una malattia infettiva contagiosa dei maiali sostenuta da un virus a RNA con polarità positiva appartenente al genere *Enterovirus*. Il suo genoma è organizzato in un'unica *Open Reading Frame* (ORF) fiancheggiata alle estremità 5' e 3' da regioni non tradotte (UTRs), l'unica ORF codifica per 4 proteine strutturali nella regione P1 (VP1, VP2, VP3 and VP4) e sette non-strutturali nelle regioni P2-P3 (2A, 2B, 2C, 3A, 3B,3C e 3D). Negli ultimi 10 anni, la MVS è stata diagnosticata solo in Italia ad eccezione di sporadici focolai segnalati in Portogallo (2003, 2007). L'epidemiologia molecolare del virus MVS, condotta rispetto alla porzione del genoma codificante per la proteina strutturale VP1, ha evidenziato sin dal 2004 la contemporanea circolazione in Italia di due sotto-gruppi virali: uno comprendente virus evoluti in Italia dal 1992 (lineaggio italiano) e l'altro comprendente virus isolati inizialmente in Portogallo nel 2003 e successivamente nel Centro-sud Italia dal 2004 (lineaggio Portoghese). Questo quadro epidemiologico è stato confermato dall'analisi filogenetica basata su una porzione della regione genomica 3D di 73 virus isolati tra il 2002 ed il 2010, che ha mostrato una concordanza del 100% con la clusterizzazione ottenuta in VP1. Recentemente nell'ambito di uno studio di validazione di metodiche molecolari per la ricerca del virus della MVS, l'analisi filogenetica comparativa condotta su 27 ceppi virali e basata su tre diverse regioni genomiche, VP1, 3D e 5'UTR, ha mostrato una differente clusterizzazione di sette ceppi, la maggior parte dei quali isolati tra il 2011 ed il 2013; questi risultavano classificati nel lineage portoghese in base all'analisi genomica delle porzioni VP1 e 5'UTR, e al lineage italiano rispetto alla regione 3D. Questi risultati hanno suggerito l'occorrenza di un evento di ricombinazione tra i ceppi appartenenti ai due lineaggi circolanti, ulteriormente indagato attraverso il sequenziamento genomico completo dei virus coinvolti. Nove isolati, comprendenti i tre sotto-gruppi virali evidenziati dagli studi precedenti (Italiano, Portoghese e possibile ricombinante), sono stati interamente sequenziati attraverso tecniche di sequenziamento di nuova generazione (piattaforma Illumina) e l'evento di ricombinazione è stato confermato da specifici software (Simplot, Recco, RDP); in particolare i ceppi ricombinanti presentano le regioni 5'UTR, P1 e parte della P2 del lineage Portoghese e la rimanente parte del genoma del lineage Italiano. Questi dati confermano come gli eventi di ricombinazioni intervengano nei meccanismi evolutivi degli *Enterovirus* e nel caso specifico hanno contribuito alla variabilità genetica del virus MVS.

P.5 SEQUENZIAMENTO COMPLETO DI VIRUS INFLUENZALI MEDIANTE NEXT GENERATION SEQUENCING E PIATTAFORMA ION TORRENT PGM

Arianna Boni (a), Guendalina Zaccaria (a), Livia Di Trani (a), Giovanni Loris Alborali (b), Davide Lelli (b), Paolo Cordioli (b), Gabriele Vaccari (a), Ana Moreno (b)

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

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

L'uomo è parte integrante del complesso ciclo epidemiologico dei virus influenzali di tipo A (INF A), che emersi da un ospite animale, possono causare nella popolazione umana infezioni sporadiche e autolimitanti. Ne sono esempi i casi di trasmissione all'uomo di H5N1 HPAIV, endemico in molti Paesi, anche del bacino mediterraneo, ed H7N9, LPAIV circolante in Cina dal 2013. Al contrario, il virus H1N1pdm 2009, quadruplo riassortante di virus influenzali aviari e suini, si è diffuso rapidamente dal serbatoio animale all'uomo, causando la prima pandemia del terzo millennio, con gravi ripercussioni socio-sanitarie ed economiche. La sorveglianza attiva globale e la caratterizzazione dei virus influenzali sono strumenti essenziali per la preparazione contro potenziali eventi pandemici. Il Next Generation Sequencing (NGS) offre la possibilità di ottenere in tempi brevi informazioni sul genoma completo di patogeni infettivi. In questo studio è stato sviluppato e validato un protocollo NGS utilizzando il sequenziatore Personal Genome Machine (PGM) Ion Torrent. Sono stati analizzati n° 42 virus di influenza suina (SIVs) isolati dal 1998 al 2013 in allevamenti di Lombardia ed Emilia-Romagna. Il genoma virale è stato amplificato utilizzando *primers* universali per INF A. Le librerie sono state costruite utilizzando dei barcode nucleotidici, in modo da analizzare più SIVs contemporaneamente su uno stesso chip. L'analisi bioinformatica è stata realizzata utilizzando il Ion Torrent suite software o il software CLC bio per le analisi de novo e mapping. Il protocollo NGS ha consentito il sequenziamento full genome ed analisi di tutti i sottotipi (H3N2, H1N1, H1N2 ed H1N1pdm2009) di SIVs inclusi nello studio. Sequenze ottenute con metodo di sequenziamento Sanger, eseguito su alcuni campioni, e quelle ottenute con NGS hanno mostrato 100% di identità nucleotidica, confermando la correttezza dei dati NGS, ottenuti in tempi più brevi ed a costi ridotti. I risultati delle analisi filogenetiche hanno confermato i dati della iniziale tipizzazione antigenica, indicando anche fenomeni evolutivi di SIVs circolanti negli allevamenti di Lombardia ed Emilia-Romagna durante 15 anni dello studio. La tecnologia NGS messa a punto, consente quindi la sorveglianza dei flussi genici interspecie ed intraspecie di INF A, utile ai fini della prevenzione in sanità umana ed animale ed il controllo continuativo del passaggio diretto o indiretto all'uomo di virus influenzali aviari o suini con potenziale pandemico.

P.6 IMPIEGO DI ANTICORPI MONOCLONALI PER LA DIAGNOSI DI PESTE EQUINA MEDIANTE IMMUNOFLUORESCENZA

Grazia Bortone, Antonella Ciarelli, Mirella Luciani, Tiziana Di Febo, Chiara Di Pancrazio,
Liana Teodori, Federica Monaco, Manuela Tittarelli
Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise G. Caporale, Teramo

La peste equina (African Horse Sickness, AHS) è una malattia virale a possibile esito letale che colpisce i solipedi, trasmessa da insetti vettori del genere *Culicoides*. Endemica in molte regioni dell'Africa Sub-sahariana e caratterizzata da tassi di mortalità variabili nella popolazione equina, con picchi superiori al 90% nei cavalli, la AHS è stata responsabile negli ultimi anni di occasionali focolai infettivi nelle regioni medio occidentali della penisola iberica, facendone prevedere una possibile introduzione nel resto dell'Europa. Pertanto è di interesse lo sviluppo di sistemi diagnostici con specificità e sensibilità elevate, in grado di evidenziare in tempi brevi la presenza della malattia. L'agente eziologico è l'African Horse Sickness virus (AHSV), a RNA bicatenario e classificato nella famiglia *Reoviridae*, genere *Orbivirus*, di cui si conoscono 9 sierotipi distinguibili in sieroneutralizzazione e caratterizzati da un diverso grado di patogenicità. L'AHSV è costituito da sette proteine strutturali, tra cui la VP7 rappresenta quella maggiormente conservata e responsabile della reattività di sierogruppo e perciò considerata *target* ideale per la messa a punto di test diagnostici. Scopo del lavoro è stata la produzione di anticorpi monoclonali (MAbs) diretti verso la VP7-AHSV e la loro applicazione in test di immunofluorescenza diretta (*ImmunoFluorescence Assay*, IFA). Topi Balb/c sono stati immunizzati con AHSV sierotipo 9. Sono stati ottenuti 6 cloni secernenti in grado di riconoscere selettivamente la VP7-AHSV e non cross-reattivi nei confronti di virus correlati quali Bluetongue virus (BTV) ed Epizootic Hemorrhagic disease virus (EHDV). Per la standardizzazione del sistema diagnostico in IFA, monostrati confluenti di cellule Vero sono stati infettati con i 9 sierotipi di AHSV ed incubati con il MAb-FITC 7F11E14, selezionato tra i sei diversi cloni. Tutti i vetrini infetti con AHSV hanno mostrato una fluorescenza granulare citoplasmatica "a polvere di stelle", mentre vetrini con monostrati di Vero non infette e cellule infette con BTV ed EHDV sono risultati negativi all'immunofluorescenza. Questi risultati preliminari indicano che il MAb-FITC 7F11E14 è un candidato idoneo per la messa a punto di un test IFA per la diagnosi di peste equina.

EPIDEMIA DI EPATITE A IN ITALIA ASSOCIATA A CONSUMO DI FRUTTI DI BOSCO SURGELATI

Roberto Bruni (a), Anna Rita Ciccaglione (a), Dario De Medici (b), Valeria Alfonsi (c), Luca Busani (b), Simona Di Pasquale (b), Michele Equestre (d), Martina Escher (b), Lara Ricotta (c), Caterina Rizzo (c), Gaia Scavia (b), Stefania Taffon (a), Maria Elena Tosti (c), Maria Grazia Pompa (e), Vanessa Martini (e), Stefania Iannazzo (e), Marina Nadia Losio (f), Giorgio Varisco (f), Enrico Pavoni (f), Mario Massaro (g), Benedetta Cappelletti (g), Pietro Noè (g), Alessandra Menghi (g), Sarah Guizzardi (g), Raffaello Lena (g), Giuseppe Plutino (g), Domenico Monteleone (g), Silvio Borrello (g)

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

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

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

(d) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(e) *Ufficio V, Direzione Generale della Prevenzione, Ministero della Salute, Roma*

(f) *Centro di Riferimento Nazionale per i Rischi Emergenti nella Sicurezza Alimentare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia*

(g) *Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e della Nutrizione, Ministero della Salute, Roma*

Ai primi di maggio 2013 la Germania ha segnalato attraverso l'*Epidemic Intelligence Information Systems* (EPIS) e l'*Early Warning and Response System* (EWRS) sette casi di epatite A in turisti che avevano soggiornato nel Nord Italia. A seguito della segnalazione, il Sistema Epidemiologico Integrato delle Epatiti Virali Acute (SEIEVA) ha riportato un aumento di casi di epatite A nella stessa area nel 2013. Dal sequenziamento di una porzione di genoma (VP1/2A) del virus dell'epatite A (HAV) si è accertato che i casi tedeschi e quelli italiani erano infettati da virus di genotipo IA con una identica sequenza, definita "sequenza *outbreak*" (*Accession Number* KF182323). Per monitorare i casi di epatite A in tutto il Paese e valutare le possibili fonti di infezione è stato istituita una *task force* interdisciplinare coordinata dal Ministero della Salute. Uno studio retrospettivo caso-controllo (119 casi, 419 controlli) ha indicato il consumo di frutti di bosco surgelati (OR 4.2, 95% CI 2,5-7,0) come possibile fonte di infezione. Le prove di laboratorio hanno rilevato la presenza di HAV in alcuni campioni di frutti di bosco surgelati con un metodo di *nested PCR*. Il sequenziamento di uno dei campioni positivi ha mostrato il 100% di identità con la "sequenza *outbreak*". Allo scopo di individuare le possibili fonti di contaminazione HAV di frutti di bosco surgelati è stato inoltre avviato un esercizio di tracciabilità, coordinato a livello europeo. Dal 1° gennaio 2013 al 28 febbraio 2014 sono stati segnalati ai sistemi nazionali di sorveglianza un totale di 1.463 casi di epatite A. Ad oggi, sono state confrontate le sequenze da 357 casi italiani, che avevano i requisiti di sequenza stabiliti di concerto con l'ECDC. In 238 casi (66,7%) si è osservata una "sequenza *outbreak*". Nei rimanenti casi si sono osservate sequenze di genotipo IA non correlate, oppure IB; un solo

caso aveva genotipo IIIA. Al fine di prevenire la diffusione dell'epidemia, è stata effettuato il richiamo dei lotti di frutti di bosco surgelati risultati positivi per la presenza di HAV. Inoltre il Ministero della Salute ha raccomandato attraverso il sito web di cuocere i frutti di bosco surgelati per 2 minuti prima del consumo. Le indagini svolte indicano i frutti di bosco surgelati come veicolo di infezione per questa epidemia. Recentemente altri sei paesi dell'Unione Europea hanno segnalato casi di HAV con la stessa “sequenza *outbreak*” con nessuna storia di viaggi in Italia.

P.7 INFEZIONI DA FLAVIVIRUS NEI PASSERIFORMI MIGRATORI CATTURATI ALL'INTERNO DEL COMUNE DI ROMA NELL'AUTUNNO DEL 2010

Andrea Capobianco Dondona (a), Federica Monaco (a), Luigina Di Gialleonardo (a),
Jacopo G. Cecere (b), Giovanni Savini (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise G. Caporale, IZSAM,
Teramo

(b) Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, ISPRA, Roma

Negli ultimi 15 anni si sono intensificate le segnalazioni di focolai causati da *Flavivirus* sia nell'uomo che negli animali in Europa e in tutto il bacino del Mediterraneo. In Italia, il virus della West Nile è stato segnalato per la prima volta in Toscana nel 1998 e dieci anni più tardi nel Nord-est del Paese. Analogamente il virus dell'Usutu, anch'esso in grado di causare malattia nell'uomo e negli uccelli, è stato segnalato per la prima volta in Toscana nel 1996 e dieci anni dopo nelle regioni settentrionali dell'Italia. Da allora entrambi i virus sono riusciti ad adattarsi, diffondersi ed endemizzare in molte aree del territorio nazionale infettando uccelli stanziali e vettori locali. Tra le possibili modalità d'introduzione e di diffusione di questi virus in Italia sono state formulate diverse ipotesi e gli uccelli migratori, considerati potenziali *carrier* di infezione, sono tra quelle più accreditate. Per questo motivo, a settembre 2010 durante la stagione migratoria autunnale, sono stati raccolti campioni di sangue e tamponi orali e cloacali da 121 degli oltre 800 passeriformi catturati nell'Oasi di Castel di Guido (Roma). Dagli uccelli accidentalmente deceduti sono inoltre stati prelevati il cervello ed i reni. I tamponi, gli organi e, ove in quantità sufficiente, il siero sono stati testati tramite qRT-PCR per *Flavivirus*, Usutu virus (USUV) e West Nile virus (WNV). Tutti i sieri sono stati testati in sieroneutralizzazione per valutare la presenza di anticorpi nei confronti di WNV ed USUV. Dai campioni esaminati in qRT-PCR, un siero appartenente ad un beccafico (*Sylvia borin*) è risultato contenere RNA di *Flavivirus* ed un campione di siero di un merlo (*Turdus merula*) è risultato positivo alla siero neutralizzazione con un titolo pari a 1:20 nei confronti dell'USUV. Pur consapevoli del numero esiguo di campioni testati, è interessante notare che se anche solo lo 0,8% (1/121) dei passeriformi migratori che transitano sul territorio italiano fosse infetto da *Flavivirus*, ben 700.000 uccelli infetti sorvolerebbero due volte l'anno l'Italia, rischiando d'introdurre o reintrodurre nuovi virus. Si stima infatti che oltre 2 miliardi di passeriformi migrino ogni anno dai quartieri riproduttivi Europei verso l'Africa per lo svernamento, per tornare nuovamente in Europa in primavera. Sebbene la maggior parte di questi animali usi rotte migratorie che non comprendono l'Italia, può essere ipotizzato che almeno 15.000.000 di passeriformi (meno del 5%) usino invece la nostra penisola come autostrada verso le coste Africane ed un numero ancora maggiore durante la migrazione primaverile.

P.8 DIAGNOSI DI LABORATORIO DELLA RABBIT HAEMORRHAGIC DISEASE (RDH) CAUSATA DALL'RHDV2

Lorenzo Capucci, Patrizia Cavadini, Giuliana Botti, Emiliana Brocchi, Antonio Lavazza
*Centro di Referenza Nazionale per le Malattie Virali dei Lagomorfi, Istituto Zooprofilattico
Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia*

La Malattia emorragica del coniglio (RHD) è un'epatite acuta del coniglio adulto (*Oryctolagus cuniculus*) ad esito letale con mortalità e morbilità dell' 80-90%. Emersa negli anni '80, l'RHD si è rapidamente diffusa a più continenti. L'agente causale è un calicivirus del genere *Lagovirus*. Nel 2010 in focolai di RHD in Francia, è stata identificata una variante genetica dell'RHDV. Studi recenti ipotizzano che la variante sia emersa *ex novo* da un'origine non identificata e che costituisca quindi una nuova specie virale (RHDV2). La proteina capsidica (VP1 - 60 kDaltons), nella parte che contiene gli aa di superficie del virus (regione P2 aa 287-484), mostra una elevata divergenza, in media del 22% circa. Fra le diverse conseguenze della significativa diversità genetica fra i virus, quella che i metodi diagnostici sviluppati ed in uso per l'RHDV mostrano significativi limiti nella diagnosi dell'RHDV2. Per i metodi virologici, si è dimostrato che l'emoagglutinazione (HA) mantiene la sua validità, fermo restando le sue limitazioni generali (possibili falsi negativi per ceppi non HA e strutturalmente degradati). Per le reazioni ELISA sandwich se basate su sieri policlonali prodotti verso l'RHDV, possono essere usate, ma considerando il significativo calo in sensibilità e quindi un concreto rischio di esiti falsi negativi. Presso il CRN di Brescia è stata prodotto un nuovo pannello di MAbs anti-RHDV2 con i quali è stata allestita un ELISA specifica (differenziale) per il nuovo virus con *performance* diagnostiche simili a quella per l'RHDV. In aggiunta sono studiati nuovi *primers* (F: posizione nt sulla VP1 109-129; R: posizione nt VP1 567-590) che consentono di identificare in RT-PCR l'RHDV2, *cross* reagendo solo in alcuni casi e con bassa sensibilità con l'RHDV. Per la sierologia i diversi metodi usati per l'RHDV (ELISA competizione, ELISA IgG, IgA ed IgM) sono stati resi RHDV2 specifici semplicemente sostituendo i reagenti immunologici. Nel caso della cELISA il rapporto fra i titoli ottenuti con i due metodi (variabile da 1/4 a 1/64) permette di distinguere quale dei due virus ha infettato gli animali in esame (o quale vaccino è stato usato). Dati preliminari indicano che i titoli IgA consentono di identificare l'occorrenza di re-infezioni enteriche in animali immuno-protetti e il tipo di RHDV responsabile. In ogni caso va tenuto presente che la diagnosi dell'RHDV2 potrebbe risultare più difficoltosa di quella dell'RHDV, sia per una potenziale maggior presenza di casi cronici che per il concreto riscontro di una maggior variabilità antigenica.

EPIDEMIOLOGIA DELLA RABBIT HAEMORRHAGIC DISEASE CAUSATA DALL' RHDV TIPO 2 ED EVOLUZIONE DEL VIRUS

Lorenzo Capucci, Patrizia Cavadini, Giuliana Botti, Emiliana Brocchi, Antonio Lavazza
Laboratorio di Referenza OIE per la Rabbit Haemorrhagic Disease, Centro nazionale di referenza per le malattie virali dei Lagomorfi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

La RHD è un'epatite acuta virale del coniglio adulto (*Oryctolagus cuniculi*) con indici di mortalità e morbilità superiori all'80%. Emersa in Cina negli anni '80, l'RHD ha devastato la conigliicoltura Europea sino all'introduzione del relativo vaccino. All'oggi è endemica in più continenti, in particolare là dove è più presente il coniglio selvatico. Nel 2010 in focolai occorsi in Francia è stata identificata una variante genetica dell'RHDV, un Calicivirus, con divergenza nucleotidica della proteina capsidica intorno al 20%. Sebbene apparentemente meno patogena, la malattia colpiva sia animali vaccinati che di poche settimane. Studi successivi hanno portato ad ipotizzare che la variante fosse in realtà l'emergenza di una nuova specie virale (RHDV2). I dati a disposizione sulla diffusione dell'RHDV2 sono desumibili quasi esclusivamente da pubblicazioni scientifiche recenti e per poco o nulla dai sistemi di sorveglianza nazionali. L'RHDV2 si è rapidamente diffuso in Italia e Spagna, con la Francia principali produttori di conigli, ove più focolai sono stati identificati nel 2011. In Spagna e Francia l'RHDV2 è stato ripetutamente identificato anche nella popolazione selvatica, ove sembrerebbe manifestare un maggior grado di patogenicità. È recente l'identificazione dell'RHDV2 anche in UK. Sebbene con capacità diffusive comparabili a quelle dell'RHDV, la percentuale di mortalità indotta appare minore e variabile (fra il 10 e 60%). Analisi antigeniche effettuate con pannelli di MAbs anti-RHDV e anti-RHDV2 portano a classificare i due virus al confine fra sottotipi distanti e sierotipi. Il dato è confermato anche dai dati sierologici comparati e dalla limitata protezione rilevata direttamente sul campo. Da qui la necessità di approntare un vaccino omologo per l'RHDV2. L'analisi antigenica degli isolati nazionali dal 2011 all'oggi, per quanto limitata dal basso numero, dimostra la rapida comparsa di più varianti RHDV2 con frequenza superiore a quella rilevata durante i primi anni di diffusione dell'RHDV. Ciò potrebbe derivare da almeno due fattori. Quale virus di recente emergenza, l'adattamento al nuovo ospite potrebbe essere ancora in corso, con selezione di genotipi a maggior fitness. La popolazione cunicola Europea, sia commerciale che selvatica, è in larga parte immunizzata e quindi anche protetta, dall'RHDV. Tale stato protegge invece in minima parte dall'RHDV2 che ha quindi relativa libertà di diffondersi. In aggiunta, quale virus ad RNA, potrebbe essere "spinto", attraverso successivi minimi cambi antigenici, verso un vero sierotipo. Per quanto sopra, risulta indubbia l'importanza di seguire l'evoluzione antigenica dell'RHDV2 anche in funzione della scelta del ceppo/i da utilizzare nella produzione dei vaccini.

P.9 IDENTIFICAZIONE DI UNA NUOVA VARIANTE DI BORDER DISEASE (BDV) IN ALLEVAMENTI CAPRINI IN PIEMONTE

Claudio Caruso (a), Elisa Chiavassa (a), Simona Zoppi (a), Roberto Riganò (b), Marco Vernè (c), Alessandro Dondo (a), Pier Luigi Acutis (a), Loretta Masoero (a), Simone Peletto (a)

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

(b) Azienda Sanitaria Locale Torino 3, Torino

(c) Veterinario Libero Professionista, Torino

Il virus della *Border disease* (BDV) appartiene al genere *Pestivirus*, famiglia *Flaviviridae*. Attualmente, l'analisi filogenetica degli isolati ha segregato i ceppi di BDV in differenti genotipi (BDV 1-BDV 7) con distribuzione mondiale. Recentemente, in due allevamenti del Piemonte e della Liguria, è stata segnalata la circolazione di BDV genotipo 3 in una capra con infezione persistente. Nel presente lavoro si riporta la caratterizzazione di uno stipite BDV atipico in un capretto nato morto in un allevamento misto (24 bovini/20 caprini) della Provincia di Torino. Episodi di natimortalità sono stati osservati in diverse capre pluripare con nascita di capretti disvitali, con tremori muscolari e sintomatologia nervosa. In uno dei capretti pervenuti per l'accertamento delle cause di morte, in cui all'esame necroscopico si evidenziavano ulcere ed erosioni abomasali, è stato applicato un protocollo di diagnostica differenziale per escludere i principali agenti abortigeni. La ricerca del genoma di BDV in milza e polmone è avvenuta mediante *nested* - PCR sulla regione 5'UTR del virus secondo il protocollo descritto da Vilcek che utilizza *primer* panpestivirus nel primo *step* di amplificazione e BDV specifici nel secondo. Inaspettatamente, dalla *nested* - PCR si otteneva un prodotto di amplificazione della lunghezza attesa al primo *step*, mentre i *primer* BDV specifici fallivano nell'amplificare il frammento interno. La successiva analisi della nuova sequenza ha confermato la presenza di numerosi *mismatches* a livello dei siti di attacco dei *primer* interni BDV specifici. La ricerca in BLAST ha rivelato una similarità non superiore al 93% con le sequenze di BDV depositate, tranne che per un'unica sequenza identificata in un ovino nel 2006 in Svizzera, con similarità del 96%. L'analisi filogenetica ha inoltre dimostrato che la sequenza identificata diverge rispetto alle sequenze rappresentative dei genotipi di BDV noti. Contestualmente, tutti gli animali dell'azienda (bovini e caprini) sono stati sottoposti a ricerca anticorpale e *nested* - PCR. Al momento del prelievo, nessun animale è risultato viremico; tutti i bovini (24/24) e 19/20 caprini son risultati positivi agli anticorpi, indicando una pregressa circolazione virale. Ai fini dello studio delle patologie da *Pestivirus*, la presenza di diversi stipiti virali circolanti nel territorio piemontese, conferma l'importanza di inserire nei protocolli diagnostici integrati la ricerca di tali forme virali con la relativa filogenesi degli isolati. La disponibilità delle sequenze di BDV circolanti sul territorio oggetto dello studio, potrà fornire un ulteriore contributo per definire link epidemiologici e un'evidente ricaduta nel controllo di tali forme patologiche.

P.10 HEV (HEPATITIS E VIRUS): STUDIO VIROLOGICO E SIEROLOGICO CROSS SECTIONAL IN SUINI E LAVORATORI ESPOSTI A RISCHIO ZOOTOTICO

Claudio Caruso (a), Paola Modesto (a), Alfonso Rosamilia (b), Simone Peletto (a), Laura Chiavacci (a), Bruno Sona (c), Filippo Balsamelli (d), Valeria Ghisetti (e), Pier Luigi Acutis (a), Nicoletta Vitale (a), Loretta Masoero (a)

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

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

(c) *Azienda Sanitaria Locale Cuneo 1, Cuneo*

(d) *Medico Chirurgo Libero Professionista, Torino*

(e) *Ospedale di Malattie Infettive Amedeo di Savoia, Torino*

Lo scenario epidemiologico di HEV e le possibili modalità di trasmissione zoonotica nei paesi industrializzati non sono del tutto chiare. Al fine di stabilire la prevalenza di anticorpi anti-HEV e le relazioni filogenetiche degli eventuali isolati virali in allevamenti suinicoli piemontesi e in categorie umane professionalmente a rischio, è stato condotto uno studio *cross - sectional* sierologico e virologico in suini e lavoratori a rischio zoonotico. Sono stati campionati 42 allevamenti per un totale di 879 campioni di sangue (410 magroncelli/469 scrofe) e 504 campioni di *pool* di feci ambientali (246 reparto magroncelli/258 reparto scrofe). Le aziende positive al test ELISA sono risultate 41/42 per un totale di 441/879 (50,23%) capi positivi. La categoria produttiva caratterizzata dalla sieropositività più elevata è risultata quella delle scrofe (71,15%), mentre tra i magroncelli la positività è stata del 26,3%. La presenza di RNA virale nelle feci è stata rilevata nel 31,0% (13/42) delle aziende. La categoria produttiva con positività virologica più elevata è risultata quella dei magroncelli (40/246, 16,3%) mentre tra le scrofe la positività è stata del 6% (15/258). L'analisi filogenetica ha classificato tutti gli isolati (uno per allevamento) come HEV genotipo 3, sottotipi 3c (n=1), 3e (n=2) e 3f (n=9). Per lo studio di sieroprevalenza nell'uomo sono stati arruolati 142 soggetti, di cui 69 esposti al fattore di rischio "contatto diretto con suini" e 73 "non esposti". Cinque soggetti (3,52%) sono risultati positivi alle IgG anti-HEV, indice pertanto di infezione pregressa. Tra i 5 positivi, 4 rientravano nella categoria "professionalmente esposti" (4 allevatori) ed 1 nella categoria "non esposti". Tutti i soggetti umani sono risultati negativi alla ricerca di RNA virale. L'alta sieroprevalenza nei suini suggerisce un'endemizzazione del virus negli allevamenti Piemontesi. L'analisi filogenetica degli isolati ha identificato tutti gli stipiti come genotipo 3, gruppo che include sia sequenze di origine umana che suina, supportando l'ipotesi di un potenziale zoonotico degli stipiti di HEV circolanti. Il dato di sieropositività negli umani (3,52%) è sovrapponibile a quello della popolazione generale e non si discosta dal *range* di prevalenza complessivo sul territorio nazionale variabile tra 1% e 5%. Non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi di popolazione. Tuttavia, l'analisi statistica ha evidenziato come essere "allevatore" rappresenti un importante fattore di rischio (OR 10.1) per HEV. Questo aspetto suggerirebbe che l'esposizione prolungata ai suini nel nostro studio rappresenti il fattore di rischio principale.

LESIONI CUTANEE PROLIFERATIVE NEI RUMINANTI: EVIDENZA DI INFEZIONI MULTIPLE DA VIRUS EPITELIOTROPI

Giovanni Casà (a), Laura Gallina (a), Federica Savini (a), Marine Morent (b), Bernadette Trentin (b), David Piquemal (b), Antonio Lavazza (c), Roberto Puleio (d), Vincenza Cannella (d), Giuseppa Purpari (d), Patrizia Di Marco (d), Annalisa Guercio (d), Alessandra Scagliarini (a)

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

(b) *Skuldtech, Montpellier, Francia*

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

(d) *Istituto Zooprofilattico della Sicilia, Palermo*

Le famiglie *Papillomaviridae* and *Poxviridae* comprendono diverse specie virali in grado di infettare i mammiferi. Tra i *Poxviridae*, i generi *Parapoxvirus* ed *Orthopoxvirus*, includono virus che penetrano tramite soluzioni di continuo della pelle o delle mucose e provocano lesioni pustolose nei ruminanti e nell'uomo. La famiglia *Papillomaviridae* comprende numerosi generi nei quali sono compresi tipi virali in grado di infettare i ruminanti. Questo studio è stato effettuato allo scopo di identificare i virus epiteliotropici responsabili di forme cliniche definite comunemente "papillomatosi" nei bovini. A questo scopo, campioni cutanei prelevati da animali colpiti da lesioni proliferative, sono stati sottoposti ad analisi istopatologiche e virologiche. La *Rolling circle amplifications* (RCA) è stata effettuata allo scopo di identificare la presenza di genomi circolari, successivamente analizzati mediante enzimi di restrizione e sequenziamento. Tutti i campioni di DNA sono stati inoltre analizzati mediante *mini-array*, un test innovativo in grado di identificare nello stesso campione la presenza di acido nucleico virale di diversi generi di poxvirus zoonosici. I risultati ottenuti hanno permesso di dimostrare che, in molti casi, le lesioni proliferative erano il risultato di co-infezioni da parte di papillomavirus e poxvirus. In particolare *Epsilon-papillomavirus* e *Delta-papillomavirus* BPV-1 e 2, responsabili di fibropapillomatosi, sono stati identificati in un numero limitato di casi mentre la maggior parte degli animali è risultato infetto con *Xi-papillomavirus*. Le analisi eseguite con *mini-array assay* hanno permesso di rivelare che la maggior parte degli animali era co-infetto con *Pseudocowpoxvirus* o *Bovine Papular Stomatitis virus* e *Cowpoxvirus*. Le successive analisi tramite sequenziamento hanno confermato questi risultati. I dati ottenuti dimostrano che le cosiddette "papillomatosi" possono essere il risultato di infezioni multiple da parte di diverse specie di virus epiteliotropi e che le sole analisi istopatologiche e microscopiche non sono in grado di identificare tutti i virus presenti nelle lesioni alcuni dei quali trasmissibili all'uomo.

P.11 GENOTIPIZZAZIONE SIEROLOGICA DEI LENTIVIRUS DEI PICCOLI RUMINANTI IN ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA

Elisa Chiavassa (a), Claudio Caruso (a), Chiara Nogaro (b), Loretta Masoero (a)
(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino
(b) Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi, Grugliasco, Torino

I lentivirus dei piccoli ruminanti (SRLV) sono un gruppo eterogeneo di virus capaci di infettare pecore e capre e sono responsabili della Visna Maedi (MV) e dell'Artrite Encefalite Caprina (CAE). Tali virus determinano gravi perdite economiche nell'allevamento ovicaprino causando infezioni lente e persistenti a carico di polmone, articolazioni, sistema nervoso centrale e mammella. Dal punto di vista antigenico, la maggior parte dei SRLV può essere classificato come *MVV-like* o *CAEV-like*, corrispondenti al genotipo A e B rispettivamente. Recentemente è stato identificato un genotipo E, altamente divergente da MVV e CAEV, in capre di razza Roccaverano nel Nord-ovest dell'Italia. Il controllo di tali infezioni prevede l'identificazione e la successiva eliminazione dei soggetti infetti dal momento che, ad oggi, non esistono presidi immunizzanti. Pertanto l'utilizzo di tecniche diagnostiche affidabili e rapide risulta essere essenziale. Alcuni test per la determinazione degli anticorpi (AGID ed ELISA, test raccomandati dall'OIE 2008) sono stati sviluppati e impiegati in corso di piani di controllo in diversi paesi europei. Sono stati testati 163 sieri provenienti da 13 allevamenti ovicaprini del Nord-ovest Italia. I campioni sono stati testati con un test ELISA indiretto di *screening* (*Eradikit® SRLV Screening*) sensibilizzato con un mix di peptidi derivanti dalle proteine *gag* e *env* di 3 genotipi di SRLV. I campioni positivi sono stati successivamente genotipizzati con un test ELISA indiretto (*Eradikit® SRLV Genotyping*) sensibilizzato con antigeni specifici per l'identificazione dei genotipi circolanti (A, B, E). Il genotipo B è stato rilevato in 8 allevamenti, mentre il genotipo A in 2. In 2 aziende è stata evidenziata la circolazione di entrambi i genotipi. Non è stata evidenziata circolazione del genotipo E, ad oggi segnalato solo in particolari razze caprine. Questi dati preliminari confermano l'alta diffusione del genotipo B e la coesistenza di diversi genotipi in allevamenti ovicaprini. La presenza del genotipo A in caprini e del genotipo B in ovini dimostra inoltre l'assenza di barriere di specie nelle infezioni da SRLV. L'indagine necessita di un ampliamento del numero di campioni per valutare la reale prevalenza e l'impatto sanitario che le infezioni da SRLV hanno nelle regioni oggetto di studio.

DISTRIBUZIONE DI *LYMPHOCYSTIVIRUS* IN TESSUTI TARGET E NON TARGET DI ORATE (*SPARUS AURATA*) NATURALMENTE INFETTE

Sara Ciulli (a), Enrico Volpe (a), Ana Cristina De Aguiar Saldanha Pinheiro (a), Michele Moscato (b), Santino Prospero (a)

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

(b) Panittica Pugliese, Brindisi

Il virus della linfocisti (LCDV) è responsabile di una patologia cutanea a carattere benigno che colpisce molteplici specie ittiche sia marine sia di acqua dolce. Nel Mediterraneo la specie più colpita è l'orate (*Sparus aurata*) con conseguenti perdite economiche nell'allevamento a causa di scarso accrescimento e disomogeneità della taglia nei pesci guariti e mortalità dovuta a sovra infezioni secondarie delle ferite. Nonostante la linfocisti sia conosciuta fin dalla fine dell'ottocento, solo recenti indagini hanno evidenziato una diffusione sistemica del virus e un'infezione persistente nei soggetti dopo la guarigione. La limitata disponibilità di tecniche efficaci di diagnosi e studio dei *Lymphocystivirus*, dovuta alla loro scarsa e difficile coltivabilità *in vitro*, ha, infatti, a lungo ridotto le possibilità di studiare questa infezione. La recente messa a punto di una *real-time* PCR, da parte del nostro gruppo di ricerca, idonea alla rilevazione e quantificazione del genoma dell'LCDV in tessuti di soggetti infetti e non infetti, rappresenta un nuovo valido strumento di studio per approfondire le conoscenze su questa infezione. In questo studio la metodica *real-time* PCR è stata utilizzata per la ricerca del genoma virale in tessuti target (pinne pettorale e caudale) e non target (milza, cervello e occhio) utilizzando 12 soggetti campionati durante un focolaio naturale alcuni dei quali mostravano lesioni a diverso stadio clinico (in sintomatologia/in regressione) ed altri guariti. La ricerca ha evidenziato la presenza del genoma virale sia a carico dei tessuti target sia a livello dei tessuti non target. La quantificazione della carica virale ha però rilevato una diversa distribuzione del genoma virale con quantità significativamente più elevate a carico delle pinne caudale e pettorale (10^6 - 10^7 copie di DNA virale/ul) rispetto a quanto evidenziato negli organi interni (10^3 - 10^5 copie di DNA virale/ul). La distribuzione del genoma virale ha mostrato un quadro simile in soggetti sintomatici, in soggetti in fase regressiva e in soggetti completamente guariti. A livello delle pinne caudale e pettorale e della milza la carica virale rilevata era di valore decrescente nei soggetti in sintomatologia, in regressione e guariti, ma le differenze non sono risultate significative all'analisi statistica. Il genoma virale è stato costantemente rilevato nei tessuti dei soggetti guariti anche ad elevata carica virale (10^2 - 10^7) mostrando una persistenza del virus dopo la remissione dei sintomi. Ulteriori studi saranno necessari per dimostrare l'infettività del virus persistente nei soggetti guariti e la durata dell'infezione dopo la remissione dei sintomi.

VALUTAZIONE DELL' IMMUNOGENICITÀ E DELL'EFFICACIA DI UN VACCINO INATTIVATO CONTRO LA PESTE DEI PICCOLI RUMINANTI NELLE CAPRE

Gian Mario Cosseddu, Andrea Capobianco Dondona, Federica Iapaolo, Gianluca Orsini, Francesca Izzo, Chiara Pinoni, Andrea Polci, Graziana Bortone, Federico Ronchi, Federica Monaco

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

La Peste dei piccoli Ruminanti (PPR) è una malattia virale altamente contagiosa che provoca elevata mortalità nei piccoli ruminanti domestici e selvatici. La malattia ha un forte impatto economico in paesi in via sviluppo in cui l'allevamento di capre e pecore costituisce una parte rilevante del reddito agricolo. Negli ultimi 30 anni si è osservata una notevole espansione dell'areale di distribuzione della PPR, che attualmente è endemica in gran parte dei continenti Africano e Asiatico. Dal 1999 la PPR viene segnalata con continuità in Turchia. Nel 2008 la malattia compare per la prima volta in Marocco, causando centinaia di focolai in pochi mesi, successivamente viene notificata in Tunisia nel 2009 e nel 2012, in Algeria nel 2012 e 2013, in Egitto nel 2012. La circolazione della PPR in prossimità dei confini dell'Unione Europea, genera preoccupazione per il rischio della possibile introduzione in Europa e per le conseguenze che un simile evento potrebbe avere per l'allevamento ovino e caprino. Il ricorso alla vaccinazione, unitamente all'uso di misure generiche di profilassi, rappresenta una misura efficace a rallentare o bloccare la diffusione geografica dell'infezione. Attualmente sono disponibili 4 vaccini vivi attenuati, prodotti con ceppi africani (Nigeria/75) e indiani (Sungri 96, Arasur 87 e Coimbatore 97), che vengono diffusamente usati nelle campagne vaccinali nelle regioni endemiche. Allo scopo di fornire un'alternativa profilattica più confacente all'uso nelle zone indenni, abbiamo prodotto un vaccino spento contro la PPR. Il ceppo marocchino M/08 è stato propagato su cellule Vero/SLAM, inattivato con BEI (Binary ethyleneimine), purificato, concentrato e addizionato con l'adiuvante AFSA2. Quattro capre sono state inoculate con il vaccino, per la via sottocutanea, e tre, non vaccinate, sono state utilizzate come controllo. Le quattro capre sono state rivaccinate dopo 36 giorni. La risposta immunitaria è stata rilevata mediante test di siero neutralizzazione dimostrando che la somministrazione di 2 dosi di vaccino è in grado di stimolare una forte risposta immunitaria nel 100% degli animali. Successivamente, le capre vaccinate e quelle di controllo sono state inoculate con un ceppo virulento di PPRV per via intranasale. I controlli hanno presentato rialzo significativo della temperatura, viremia ed escrezione virale prolungata attraverso le mucose oculari, nasali e buccali e attraverso le feci. Al contrario le capre vaccinate sono risultate protette nei confronti dell'infezione sperimentale, non mostrando i sintomi clinici osservati nei controlli, né tracce di viremia o escrezione virale, dimostrando la piena efficacia protettiva del vaccino impiegato.

P.12 LA SORVEGLIANZA INTEGRATA PER LA PREVENZIONE ED IL CONTROLLO DI AGENTI PATOGENI EMERGENTI E RI-EMERGENTI TRASMESSI DA VETTORE NEL BACINO DEL MEDITERRANEO

Maria Grazia Dente, Flavia Riccardo, Silvia Declich
*Centro Nazionale di Epidemiologia Sorveglianza e Prevenzione della Salute, Istituto
Superiore di Sanità, Roma*

Nel gennaio 2014, ha preso l'avvio il Progetto Europeo MEDILABSECURE che opererà per quattro anni con il finanziamento dalla Comunità Europea (DGDEVCO) ed il contributo del Ministero della Salute Italiano. Consolidando ed estendendo la Rete di Laboratori del Mediterraneo istituita tra il 2011 e il 2013 con il Progetto Europeo EpiSouth, il progetto MEDILABSECURE ha come obiettivo il controllo dei rischi per la salute pubblica nelle regioni del Mediterraneo, dei Balcani e del Mar Nero attraverso la comunicazione, il training, lo scambio di informazioni e il supporto tecnico ai Paesi. In particolare, il Progetto intende rafforzare le capacità di identificazione precoce e diagnosi di patogeni causanti malattie trasmesse da vettore con il contributo sinergico di quattro Pacchetti di lavoro (WP), coordinati dall'Institut Pasteur di Parigi:

- Virologia Animale - Centro de Investigacion en Sanidad Animal (Madrid-Spagna);
- Virologia umana e Biosicurezza - Institut Pasteur (Parigi-Francia);
- Entomologia medica - Institut de Recherche pour le Developpement (Montpellier-Francia); Sanità Pubblica - Istituto Superiore di Sanità (ISS, Roma-Italia).

Per rafforzare e facilitare l'integrazione della sorveglianza, la valutazione del rischio e la diagnosi precoce in tutte le aree coinvolte per l'identificazione e diagnosi di malattie trasmesse da vettore (virologia animale, virologia umana ed entomologia medica) sono state inserite attività incentrate sulla salute pubblica sotto la guida dell'Italia (ISS). L'ISS intende infatti valutare il livello nazionale di integrazione dei sistemi di sorveglianza e definire che tipo di collegamenti esistano tra i flussi di dati relativi a virologia animale, virologia umana ed entomologia medica, e il sistema di sorveglianza nazionale per le malattie trasmissibili. Questi collegamenti saranno studiati attraverso una indagine trasversale ed un'analisi di situazione identificando buone pratiche nazionali che possano divenire modelli di riferimento nella regione ed individuando punti di forza, lacune ed esigenze da condividere con le Istituzioni operanti nel settore.

P.13 ANEMIA INFETTIVA EQUINA: VALUTAZIONE DELL' EVOLUZIONE DELL' INFEZIONE E DEI FATTORI DI RISCHIO IN UMBRIA E MARCHE

Annalisa Dettori (a), Gian Luca Autorino (b), Silva Costarelli (a), Anna Duranti (a), Laura Faccenda (a), Andrea Felici (a), Gianni Perugini (a), Eleonora Scoccia (a), Carmen Maresca (a)
(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia
(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

L'Anemia Infettiva Equina (AIE) è una malattia virale che colpisce gli equidi ed è sostenuta da un virus della famiglia *Retroviridae* appartenente al genere *Lentivirus*; determina ingenti perdite economiche e divieti nell'esportazione degli animali. In Italia dal 2006 (a seguito dell'emergenza europea) al 2011 si sono succeduti piani di sorveglianza nazionali con obbligo di test sierologici ed iscrizione all'anagrafe equina. L'obiettivo della ricerca (condotta tramite uno studio *cross-sectional*) è stato quello di ottenere dati di sieroprevalenza nella popolazione di equidi in Centro Italia (Umbria e Marche) e tramite un'analisi epidemiologica-statistica dei dati scaturiti dai piani di sorveglianza (dal 2007 al 2011), valutare l'evoluzione della prevalenza ed individuare eventuali fattori di rischio. La popolazione *target* comprendeva equidi umbri e marchigiani testati nei cinque anni per AIE (con test sierologico AGID-OIE) e le aziende che detenevano gli equidi testati. Per tutte le variabili incluse nelle schede di accompagnamento è stata effettuata un'analisi descrittiva, un'analisi bivariata e multivariata. Le eventuali associazioni sono state valutate con l'*Odds Ratio* (OR) mentre la significatività statistica è stata stimata utilizzando il test Chi-quadrato (χ^2) di Pearson e il test esatto di Fisher. È stato considerato significativo un valore di P (*p-value*) $\leq 0,05$. Le prevalenze aziendali e di capi nelle due Regioni sono sovrapponibili a quelle nazionali (*Report* del Centro di Referenza Nazionale per l'Anemia Infettiva Equina-CRAIE); i dati umbri sono più alti rispetto a quelli marchigiani. In entrambe le Regioni, le prevalenze sono diminuite passando dallo 0,88% (2007) allo 0,25% (2011). Rispetto agli altri equidi, nel mulo le prevalenze sono sempre risultate più alte (con valori di OR significativi); negli ultimi tre anni le positività in questi equidi sono nettamente diminuite attestandosi intorno al 2,5% in Umbria e all'1% nelle Marche. Le classi di età più a rischio sono state quelle comprese tra 6 e 13 anni e oltre 13 anni. In Umbria e Marche, Regioni prettamente appenniniche, il mulo grazie alla sua costituzione robusta e all'adattabilità ai vari tipi di ambiente, viene ancora utilizzato come animale da lavoro o da soma in zone rurali impervie, per esempio per la raccolta della legna e quindi risulta più esposto ai vettori dell'infezione. In tempi di revisione di spesa pubblica i fattori di rischio identificati tramite questa ricerca, essendo legati specificatamente al territorio, possono fornire le basi per attuare una sorveglianza *ad hoc*, non più basata su un'intera popolazione ma su categorie di popolazione "a rischio".

RICERCA DEL VIRUS DELL' EPATITE E (HEV) IN SALSICCE DI FEGATO

Ilaria Di Bartolo (a), Giorgia Angeloni (a), Eleonora Ponterio (a), Fabio Ostanello (b), Franco Maria Ruggeri (a)

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

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

L'epatite E è una malattia dell'uomo con caratteristiche di epatite acuta, causata da un virus a RNA, HEV. I ceppi di HEV che infettano i mammiferi, sono classificati in 4 genotipi, tra cui l'1 e il 2 infettano solo l'uomo, mentre i genotipi 3 e 4 infettano sia l'uomo sia gli animali. I ceppi zoonotici sono stati identificati principalmente nel suino, che è considerato il serbatoio asintomatico, e occasionalmente altre specie animali (cinghiale, cervo, coniglio). Nei paesi in via di sviluppo la malattia ha un ciclo interumano e causa diffuse epidemie causate dal consumo di acqua contaminata con feci. Nei paesi industrializzati vengono descritti casi sporadici autoctoni sostenuti da ceppi dei genotipi 3 e 4. In alcuni di questi casi è stata provata la trasmissione del virus (genotipo 3) attraverso il consumo di carne poco cotta di maiale o cervo. In Italia, il genotipo 3 è stato messo in evidenza nel fegato di suini macellati ed è stato associato ad alcuni casi umani. Nel presente studio, è stata investigata la presenza di HEV in prodotti a base di carne suina (salsicce di fegato), che nel nostro Paese sono spesso consumate crude. Nel 2012, 4 confezioni di salsicce di fegato, fresche e stagionate, sono state acquistate in un punto vendita. L'RNA totale è stato estratto da porzioni di salsiccia di circa 250 mg. Attraverso una *real-time PCR* quantitativa sono state ricercate porzioni di genoma di HEV e di Adenovirus suino (come indicatore di contaminazione fecale). Il genoma di HEV è stato ritrovato sia in salsicce fresche (10 positivi su 45 porzioni da 250 mg) sia stagionate (1 campione positivo su 23 analizzati). Sono state condotte anche RT-PCR convenzionali e le analisi di sequenza hanno rilevato la presenza di HEV di genotipo 3, vicino per identità nucleotidica a ceppi umani e suini circolanti in Europa. Sebbene non sia stato possibile dimostrare la vitalità del virus, né sia nota la dose infettante, i risultati confermano un possibile rischio associato al consumo di alcuni alimenti. Considerando che all'elevata prevalenza di HEV nei suini corrisponde un ridotto numero di casi nell'uomo, è possibile ipotizzare che HEV genotipo 3 abbia una bassa virulenza nell'uomo o necessiti di una dose infettante elevata. In tal senso, non essendo ancora disponibile un sistema efficace di crescita *in vitro*, l'utilizzo della biologia molecolare e in particolare della qRT-PCR si è rilevato molto utile per una stima quantitativa della presenza del virus.

P.14 VIRUS DELL' EPATITE E (HEV) IN UNA POPOLAZIONE ITALIANA DI CERVI

Ilaria Di Bartolo (a), Eleonora Ponterio (a), Giorgia Angeloni (a), Federico Morandi (b), Sandro Nicoloso (c), Fabio Ostanello (d), Franco Maria Ruggeri (a)

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

(b) *Parco Nazionale dei Monti Sibillini, Visso, Macerata*

(c) *DREAm-Italia, Pistoia*

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

Nell'uomo, l'epatite E è una malattia con caratteristiche tipicamente di epatite acuta con scarse probabilità di cronicizzazione. L'agente eziologico (HEV) è un virus a RNA, classificato nel genere *Hepevirus*. Nei mammiferi si distinguono almeno 4 diversi genotipi di HEV: 1 e 2 infettano solo l'uomo, 3 e 4 hanno caratteristiche zoonotiche e infettano uomo e animali (suino, cinghiale, cervo). Nei Paesi in via di sviluppo la malattia nell'uomo si manifesta con grandi epidemie causate dal consumo di acqua contaminata da feci ed è sostenuta da ceppi di genotipo 1 e 2. Nei Paesi industrializzati, i casi clinici di epatite E sono prevalentemente sporadici e generalmente legati a viaggi in Paesi endemici. Tuttavia, negli ultimi anni è stato descritto un numero crescente di casi autoctoni, causati da infezioni sostenute dai genotipi 3 e 4. Alcuni di essi sono stati messi in relazione al contatto diretto o indiretto con suini, cinghiali o cervi infetti da genotipo 3. In Europa la presenza e la diffusione dell'infezione di HEV di genotipo 3 è stata dimostrata sia in allevamenti suini sia in animali selvatici (cinghiali, cervi). Nel presente lavoro è stata valutata la presenza di HEV in una popolazione di cervi (*Cervus elaphus*) dell'Appennino tosco-emiliano: 200 sieri, raccolti tra il 2007 e il 2010 da altrettanti animali abbattuti nell'ambito di piani di controllo della specie, sono stati esaminati per la ricerca di anticorpi anti-HEV. Per la ricerca del genoma virale sono stati esaminati 91 sieri scelti in modo casuale. La ricerca degli anticorpi è stata condotta utilizzando un test ELISA basato sulla proteina ricombinate del capsido di un ceppo italiano di HEV suino (genotipo 3), da noi espressa e purificata. Complessivamente, il 13,5% dei campioni di siero sono risultati positivi al test ELISA utilizzato. La presenza dell'RNA virale è stata rilevata in 10 dei 91 sieri selezionati (11%). L'esame di due sequenze ha confermato la presenza di HEV di genotipo 3. I risultati ottenuti dimostrano che l'infezione da HEV è presente anche nella popolazione di cervi dell'Appennino Tosco-Emiliano e confermano come anche questa specie possa rappresentare un potenziale serbatoio per ceppi di genotipo 3 con potenzialità zoonotiche. Considerando che la presenza di HEV è già stata segnalata in popolazioni di cinghiale, l'osservazione della diffusione di HEV anche nei cervi individua un potenziale ulteriore rischio di infezione per contatto diretto e/o indiretto di alcune categorie (cacciatori, veterinari, operatori faunistico-venatori).

P.15 CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI SAPOVIRUS E NOROVIRUS IDENTIFICATI IN SUINI ALLEVATI IN ITALIA

Ilaria Di Bartolo (a), Silvia Tofani (a), Giorgia Angeloni (a), Eleonora Ponterio (a), Fabio Ostanello (b), Franco Maria Ruggeri (a)

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

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

Infezioni sostenute da Norovirus (NoV) e Sapovirus (SaV), entrambi membri della famiglia Caliciviridae, sono state descritte in vari paesi europei, più raramente in Italia, in suini sia asintomatici sia diarroici. Questi virus infettano anche l'uomo e sono responsabili di circa il 50% delle gastroenteriti nell'adulto. In particolare, i ceppi di NoV che infettano il suino sono molto simili geneticamente a quelli responsabili di malattia nell'uomo, e anche per i SaV esistono molti genotipi, alcuni vicini nell'uomo e nel suino. In questo studio, sono stati esaminati campioni fecali prelevati sia da animali asintomatici (201) sia da suini con diarrea (89), allevati nel Nord Italia. La ricerca del genoma virale per i calicivirus è stata condotta mediante RT-PCR, amplificando una regione conservata all'interno dell'RNA polimerasi RNA dipendente (RdRp). Uno solo dei 201 animali asintomatici esaminati è risultato positivo per NoV; tutti gli 89 campioni provenienti da animali con diarrea hanno fornito esito negativo. I SaV sono stati identificati più di frequente, rispettivamente nel 6,9% e nel 20% degli animali asintomatici e con diarrea. I ceppi virali sono stati caratterizzati mediante analisi di sequenza. Il ceppo di norovirus è stato classificato come GII.18 che, sebbene appartenente allo stesso genogruppo dei ceppi umani di norovirus, è un genotipo ad oggi comune tra i soli ceppi suini. I ceppi di sapovirus appartenevano sia al genogruppo GIII tipico dei suini, sia a genogruppi identificati solo di recente, più vicini ai ceppi che infettano l'uomo ma ancora non caratterizzati. I risultati ottenuti dimostrano l'elevata prevalenza di Caliciviridae in suini sia asintomatici sia, almeno per i SaV, con diarrea. Queste osservazioni andrebbero valutate in termini: a) di eventuale ruolo che questi virus hanno, in possibile sinergia con altri patogeni, nel determinismo di forme diarroiche del suino; b) di eventuale origine zoonotica di forme di gastroenterite. Il presente studio rappresenta la prima segnalazione della presenza di NoV in suini allevati in Italia.

P.16 SUPERINFEZIONE CHE INFLUENZANO LA RICOMBINAZIONE NEI NOROVIRUS

Elisabetta Di Felice (a), Chiara Ceci (a), William Zonta (b), Edmilson Ferreira de Oliveira-Filho (b), Barbara Di Martino (a), Fulvio Marsilio (a), Axel Mauroy (b), Etienne Thiry (b)

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

(b) *Fundamental and Applied Research in Animal Health Center and Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium*

I Norovirus (NoV) sono piccoli virus (38-40 nm) a RNA monocatenario sprovvisti di *envelope* appartenenti alla famiglia *Caliciviridae*. I NoV attualmente vengono riconosciuti come una delle più importanti cause di gastroenterite acute di origine non batterica nell'uomo coinvolgendo tutte le classi di età e soprattutto contesti comunitari. I meccanismi molecolari che influenzano l'evoluzione dei NoV sono l'accumulo di mutazioni puntiformi e la ricombinazione. L'obiettivo sarà quello di dimostrare che la ricombinazione è un evento che può essere influenzabile dall'impiego di diversi parametri di coinfezione/superinfezione. In letteratura, gli studi sugli eventi ricombinanti che caratterizzano i NoV umani risultano piuttosto limitati a causa dell'assenza di un substrato cellulare che ne permetta la replicazione *in vitro*. Nel presente lavoro è stato sviluppato un modello sperimentale basato sull'impiego dell'unico NoV, il norovirus murino (MNV), in grado di replicare su substrato cellulare. A tal fine monostrati di cellule RAW264.7 sono stati coinfezati e superinfettati con due ceppi di MNV (CW1 e WU20) utilizzando diversi indici di molteplicità (MOI) e differenti tempi di infezione. I surnatanti sono stati collezionati a 24 e 48 ore post-infezione e quindi sottoposti a metodo delle placche. All'interno della popolazione virale risultante da tale coinfezione/superinfezione, 36 cloni per ciascuna condizione sono stati selezionati e purificati dalle placche e, successivamente, utilizzati per infettare nuovi monostrati cellulari di RAW264.7. Il monitoraggio degli eventi ricombinanti è stato eseguito mediante PCR e *real-time* PCR dopo estrazione dell'RNA virale e retrotrascrizione, impiegando due set di *primer* in grado di amplificare le regioni site all'estremità iniziale di ORF1 e all'estremità terminale di ORF3. I risultati che permetteranno di quantificare la distribuzione dei ceppi presenti nel surnatante della superinfezione, sono ancora in corso di analisi.

P.17 ETEROGENEITÀ GENETICA DI NOROVIRUS BOVINI IDENTIFICATI IN ITALIA

Elisabetta Di Felice (a), Federica Di Profio (a), Irene Melegari (a), Chiara Ceci (a), Axel Mauroy (b), Etienne Thiry (b), Barbara Di Martino (a), Fulvio Marsilio (a)

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

(b) *Fundamental and Applied Research in Animal Health Center and Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium.*

I Norovirus (NoV) sono piccoli virus a RNA monocatenario appartenenti alla famiglia *Caliciviridae*. Sulla base dell'analisi di sequenza del gene ORF2 codificante per la proteina capsidica VP1, i NoV sono attualmente classificati in sei genogruppi (G), con GI, GII e GIV responsabili di gastroenterite nell'uomo. Calicivirus enterici morfologicamente simili a NoV umani sono stati identificati per la prima volta in vitelli diarroici nel Regno Unito nel 1978 e in Germania nel 1980. Il sequenziamento nucleotidico dell'intero genoma ha permesso di classificare i NoV bovini (BoNoV) all'interno del genogruppo III in due genotipi, GIII.1 (prototipo Bo/Jena/80/DE) e GIII.2 (prototipo Bo/Newbury/76/UK). I BoNoV hanno una diffusione mondiale con una maggiore prevalenza di virus GIII.2-like. Tuttavia, studi recenti basati sull'analisi nucleotidica a livello della giunzione fra la polimerasi (RdRp) ed il capsido, hanno dimostrato la circolazione di ceppi ricombinanti. Nel presente lavoro vengono riportati i risultati di un'indagine per la ricerca e tipizzazione di BoNoV condotta su quattro allevamenti bovini ubicati nelle province di Teramo e Pescara. A tal fine, 104 tamponi rettali collezionati da vitelli asintomatici sono stati sottoposti a nested RT-PCR impiegando due set di *primer* specifici per BoNoV in grado di amplificare un frammento di 326 bp della RdRp. L'RNA di BoNoV è stato identificato nel 10,5% (11/104) degli animali testati. L'analisi di sequenza ha evidenziato per nove sequenze un'elevata identità nucleotidica (nt) (88-96%) con i ceppi GIII.2-like, mentre per due è stata rilevata la maggiore identità (87-90% nt) con i BoNoV GIII.1-like. Per sette ceppi è stata ottenuta anche una sequenza di circa 750 bp che includeva oltre che la regione parziale della RdRp, la regione 5' capsidica. Sulla base dell'analisi molecolare, cinque ceppi sono risultati strettamente correlati con BoNoV GIII.2-like, mentre solo uno dei due ceppi con polimerasi GIII.1-like, ha mostrato la maggiore identità nucleotidica nei confronti di BoNoV appartenenti al genotipo 1. Il ceppo 80/TE/IT che possedeva una polimerasi GIII.1-like, a livello capsidico ha mostrato la più alta identità con ceppi GIII.2-like, suggerendo un fenomeno di ricombinazione a livello della giunzione ORF1/ORF2.

INFEZIONI DA MORBILLIVIRUS E CETACEI, UNA STORIA IN ITINERE

Cristina E. Di Francesco (a), Fulvio Marsilio (a), Sandro Mazzariol (b), Giovanni Di Guardo (a)

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

(b) *Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi, Legnaro, Padova*

Gli animali spiaggiati rappresentano una ricchissima fonte di informazioni utili a conoscere lo stato di salute delle popolazioni di cetacei che vivono in mare. Ciò premesso, nel corso degli ultimi 25-30 anni, si sono affacciati sulla scena nuovi membri del genere *Morbillivirus*, che hanno provocato una serie di epidemie in più specie e popolazioni di cetacei in varie zone del pianeta. Particolarmente drammatici sono stati gli eventi succedutisi, a partire dal 1987-'88 e dal 1990-'92, nelle popolazioni di tursiopi (*Tursiops truncatus*) lungo le coste orientali statunitensi e di stenelle striate (*Stenella coeruleoalba*) del Mediterraneo occidentale. Oltre alle predette specie, sia il globicefalo (*Globicephala melas*) tra il 2006 e il 2008, sia la balenottera comune (*Balaenoptera physalus*) tra il 2011 e il 2013, sono state vittime di distinti *clusters* epidemici verificatisi sempre nel Mediterraneo occidentale; un ulteriore evento ha riguardato per la prima volta, nella seconda metà del 2013, la popolazione di tursiopi dell'Adriatico settentrionale. Dagli studi finora condotti si evince una sostanziale corrispondenza dei profili genetici ed antigenici tra gli stipiti virali identificati nelle 4 epidemie succedutesi nel Mediterraneo occidentale, che a loro volta risultano strettamente correlati con quelli responsabili di analoghi eventi verificatisi lungo le coste orientali statunitensi. Di contro, i ceppi virali recentemente identificati in singoli esemplari di *Sotalia guianensis* e *Tursiops aduncus*, spiaggiatisi rispettivamente lungo le coste del Brasile e dell'Australia occidentale, presentano marcate differenze genomiche ed antigeniche rispetto a quelli finora caratterizzati nell'Emisfero boreale. Riguardo all'interazione virus-ospite, si sottolinea con particolare enfasi il sinergismo eziopatogenetico esistente fra l'agente biologico, da un lato, ed un'ampia gamma di contaminanti ambientali immunotossici, dall'altro lato, posto che i cetacei odontoceti sono in grado di accumularne rilevanti quantità nei loro tessuti. Di notevole interesse sono altresì sia la presunta trasmissione materno-fetale dell'infezione, sia la documentata persistenza del virus nel tessuto cerebrale di singoli individui appartenenti alle specie *S. coeruleoalba* e *T. truncatus*. Gli studi futuri dovrebbero approfondire non solo la caratterizzazione degli stipiti virali coinvolti, ma anche e soprattutto le complesse dinamiche d'interazione virus-ospite, con particolare riferimento ad eventuali determinanti biologici di suscettibilità/resistenza nei confronti dell'infezione.

P.18 ANALISI FILOGENETICA DI CEPPI DI CANINE DISTEMPER VIRUS CIRCOLANTI NEI CANI DELL'ITALIA CENTRALE

Cristina E. Di Francesco (a), Francesca Profeta (a), Alessandra Di Giuseppe (a), Ernesto Zuffada (b), Leonardo Gentile (c), Vincenza Di Pirro (c), Simone Angelucci (d), William Castorani (e), Claudio D'Antonio (f), Fulvio Marsilio (a)

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

(b) *Azienda Sanitaria Locale 1 Avezzano Sulmona L'Aquila, Servizio Veterinario di Sanità Animale, Sulmona, L'Aquila*

(c) *Parco Nazionale d'Abruzzo, Lazio e Molise, Pescasseroli, L'Aquila*

(d) *Parco Nazionale della Majella, Sulmona, L'Aquila*

(e) *Medico Veterinario, Castelnuovo Vomano, Teramo*

(f) *Medico Veterinario, Alba Adriatica, Teramo*

Nel 2013 un focolaio di cimurro ha interessato la popolazione di lupo appenninico (*Canis lupis*) del Parco Nazionale d'Abruzzo, Lazio e Molise (PNALM), causando la morte di 20 esemplari di età compresa tra 6 mesi e 5 anni. Sia sugli animali rinvenuti in vita con sintomatologia sospetta che sulle carcasse recuperate, è stato possibile evidenziare *Canine Distemper Virus* (CDV) mediante RT-PCR e Immunoistochimica. La successiva tipizzazione genetica ha consentito di identificare il ceppo di CDV come appartenente al *lineage* Artico, dimostrandone per la prima volta la circolazione nella fauna selvatica in Europa. Al fine di verificare l'ipotesi che la trasmissione dell'infezione sia avvenuta dal cane domestico alle specie selvatiche, nel presente lavoro è stato effettuato uno studio retrospettivo mediante caratterizzazione genetica dei ceppi di CDV identificati da cani con sintomatologia riferibile a cimurro, conferiti dal 2010 ad oggi, presso la Facoltà di Medicina Veterinaria di Teramo. Sono stati recuperati e sottoposti ad analisi del gene H n. 9 ceppi di CDV provenienti da diversi comuni delle province di Teramo e L'Aquila, confinanti o compresi nell'area del PNALM. La comparazione delle sequenze ottenute ha evidenziato un livello di identità del 100% tra i ceppi di CDV circolanti nella popolazione canina negli anni 2012-2013, e tra questi e il virus responsabile dell'epidemia nel lupo. Tale identità si riduce al 97,11% comparando le stesse sequenze con quelle ottenute nel corso del 2010. L'analisi filogenetica ha dimostrato come tutti i ceppi analizzati formino un *cluster* unico all'interno del *lineage* Artico. Diversamente da quanto osservato in uno studio precedentemente condotto nella stessa regione, non è stato possibile riscontrare la presenza di ceppi di CDV appartenenti al *lineage* Europeo nei campioni analizzati. Tali risultati confermano come il *lineage* Artico di CDV circolasse già tra i cani del Centro Italia prima del 2013, avvalorando l'ipotesi che l'infezione sia stata trasmessa da questi alla fauna selvatica. I risultati ottenuti ribadiscono la necessità di attuare nel cane la profilassi vaccinale nei confronti del cimurro, non solo per il controllo dell'infezione nella popolazione domestica, ma anche per tutelare la conservazione delle specie selvatiche ritenute a maggior rischio di estinzione.

P.19 INDAGINE SIEROLOGICA PER NOROVIRUS DI GENOGRUPPO IV NELL'UOMO

Barbara Di Martino (a), Federica Di Profio (a), Elisabetta Di Felice (a), Simona De Grazia (b), Giovanni M. Giammanco (b), Ivano Massirio (c), Eleonora Lorusso (d), Canio Buonavoglia (d), Fulvio Marsilio (a), Vito Martella (d)

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

(b) *Università degli Studi, Palermo*

(c) *Azienda USL di Reggio Emilia, Reggio Emilia*

(d) *Università degli Studi Aldo Moro, Valenzano, Bari*

I Norovirus (NoV) sono piccoli virus (38-40 nm) a RNA monocatenario sprovvisti di *envelope* appartenenti alla famiglia *Caliciviridae*. I NoV attualmente rappresentano una delle principali cause di gastroenterite di origine non batterica nell'uomo. Sulla base dell'analisi di sequenza del gene ORF2 codificante per la proteina capsidica VP1, i NoV sono suddivisi in sei Genogruppi (G): GI, GII e GIV sono riconosciuti come causa di gastroenterite nell'uomo, ma il genotipo II è predominante, essendo responsabile dell'80-90% delle infezioni. Calicivirus enterici geneticamente correlati a NoV GIV (*Alphatron-like*) sono stati recentemente identificati nelle feci di un cucciolo di leone con gastroenterite emorragica e successivamente in feci di cani e gatti con diarrea. Sulla base dell'analisi di sequenza della proteina VP1, i nuovi ceppi identificati nei carnivori sono stati classificati come GIV.2, mentre i NoV umani sono GIV.1. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la presenza di anticorpi specifici anti-GIV.1 e anti-GIV.2 in una collezione di sieri umani. A tal fine le particelle simil-virali (VLPs: *virus-like particles*) di NoV GIV.1 e GIV.2 generate mediante sistema baculovirus sono state impiegate per l'allestimento di un kit ELISA ricombinante per valutare le prevalenze di anticorpi specifici per NoV GIV. Un totale di 535 sieri umani, suddivisi in gruppi sulla base delle classi di età, è stato quindi sottoposto a *screening* sierologico. Anticorpi specifici per entrambi i genotipi sono stati individuati con una prevalenza compresa tra il 6,6% e il 44,8% per i NoV GIV.1 e tra il 6,8% e il 15,1% per i GIV.2. Esaminando la prevalenza anticorpale sulla base delle diverse classi di età, è stata evidenziata la più elevata positività sierologica anti-GIV.1 in bambini di età compresa tra 5 e 10 anni e negli adulti > 50 anni, mentre la sieroprevalenza più elevata per NoV GIV.2 è stata riscontrata nei soggetti di età compresa tra i 15 e i 35 anni. I risultati ottenuti confermano la diffusione di NoV GIV.1 in persone appartenenti a diverse classe di età e dimostrano per la prima volta la circolazione nell'uomo di NoV GIV.2 di carnivori o di NoV geneticamente correlati. L'ipotesi che i carnivori domestici possano rappresentare un *reservoir* di virus enterici per l'uomo è molto suggestiva e merita sicuramente di essere approfondita.

P.20 IDENTIFICAZIONE DI *KOBUVIRUS* NELLE VOLPI (*VULPES VULPES*)

Barbara Di Martino (a), Federica Di Profio (a), Irene Melegari (a), Serena Robetto (b), Riccardo Orusa (b), Fulvio Marsilio (a)

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

(b) *CeRMAS, Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Animali Selvatici, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte-Liguria-Valle d'Aosta, Torino*

I *Kobuvirus* sono piccoli virus sprovvisti di *envelope* del diametro approssimativo di 35-38 nm, appartenenti alla famiglia *Picornaviridae*. Sulla base della più recente classificazione, il genere *Kobuvirus* include tre specie: Aichivirus A (precedentemente denominato Aichi virus umano), Aichivirus B (in passato *Bovine Kobuvirus*) e Aichivirus C (*Porcine Kobuvirus*). Recentemente *Kobuvirus* enterici, geneticamente correlati a *Kobuvirus* umani appartenenti alla specie Aichivirus A, sono stati identificati in campioni fecali di cane e gatto, dimostrando per la prima volta la possibile circolazione di tali virus nei carnivori. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la presenza di *Kobuvirus* nelle volpi (*Vulpes Vulpes*) mediante indagine molecolare. A tal fine sono stati collezionati presso il CERMAS (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte-Liguria-Valle d'Aosta) 34 tamponi fecali ottenuti da volpi abbattute nel corso dell'attività venatoria o rinvenute morte in alcune province della Valle D'Aosta e del Piemonte. I campioni sono stati testati per *Kobuvirus* mediante RT-PCR impiegando una coppia di *primer* ad ampio spettro che ha per *target* una regione conservata del gene 3D di tutti i membri del genere *Kobuvirus*. L'RNA di *Kobuvirus* è stato identificato nel 14,7% (5/34) degli animali testati. L'analisi di sequenza della regione parziale 3D (KF781168-KF781172) ha evidenziato in tutti i campioni un'elevata identità nucleotidica (92,7-96,8%) con i ceppi di *Kobuvirus* canino (CaKV) precedentemente identificati negli Stati Uniti, Regno Unito e Italia. Tutti i campioni risultati positivi sono stati ulteriormente analizzati mediante RT-PCR per l'amplificazione dell'intero gene codificante la proteina capsidica VP1 (KF781163-KF781167). L'analisi filogenetica ha confermato per i cinque ceppi identificati la stretta correlazione genetica con analoghe sequenze CaKV (identità aminoacidica 98-100%) finora disponibili sui database. I dati ottenuti nel presente studio dimostrano per la prima volta la circolazione di *Kobuvirus* nelle volpi.

IDENTIFICAZIONE DI AICHI VIRUS (AIV) NEI REFLUI PRIMARI

Federica Di Profio, Irene Melegari, Elisabetta Di Felice, Fulvio Marsilio, Barbara Di Martino

Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Teramo

Il virus Aichi (AiV) è un piccolo virus, sprovvisto di *envelope*, con RNA monocatenario a polarità positiva (~8,2 kb), appartenente al genere *Kobuvirus*, famiglia *Picornaviridae*. Il primo AiV è stato isolato nel 1989 in Giappone in un paziente affetto da gastroenterite acuta. Successivamente ceppi AiV sono stati identificati in altri paesi asiatici, in Europa, Sud America e Tunisia in pazienti con gastroenterite ad eziologia sconosciuta. Sulla base delle informazioni finora acquisite, le principali fonti di infezione sono rappresentate da acqua o alimenti contaminati. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la presenza di AiV nelle acque in entrata presso gli impianti di depurazione della Ruzzo Reti S.p.A per valutare il rischio di contaminazioni primarie di prodotti per il consumo umano e animale. A tal fine sono stati eseguiti 48 tamponi sulle griglie grossolane e sottili poste nei collettori in entrata di quattro principali impianti di depurazione siti nella Provincia di Teramo. L'indagine molecolare per la ricerca dell'RNA di AiV è stata condotta mediante RT-PCR impiegando due set di *primer* (UNK-F/R e Ai6261/6679) in grado di amplificare rispettivamente un frammento di 217 bp del gene 3D e una regione di 519 bp localizzata sulla giunzione 3CD del genoma di AiV. Dei 48 campioni testati, 2 (4,16%) sono risultati positivi all'RT-PCR con *primer* universali per *Kobuvirus* (KC488329-KC488330). Sei campioni (12,5%) sono risultati positivi quando sottoposti a *screening* con *primer* Ai6261/Ai6779 specifici per AiV (KC488325-KC488328 e KC693051-KC693052). L'analisi di sequenza del frammento di 217 bp della regione 3D ha evidenziato che i due ceppi italiani risultavano geneticamente correlati (identità nucleotidica 89,0-99,0%) a sequenze AiV-like identificate in Cina, Giappone, Brasile, Germania e Ungheria, mostrando la maggiore identità con i ceppi appartenenti al genotipo B. In seguito ad analisi molecolare della regione 3CD, le sei sequenze AiV-like mostravano il 97,9-99,7% di identità tra loro, e la più alta correlazione genetica (identità nucleotidica 96,0-99,0%) con gli AiV identificati in Cina e Germania. L'identità nei confronti di altri ceppi europei, segnalati in Svezia e Francia, era compresa tra l'88,0% ed il 91,5%. L'analisi filogenetica, basata sulla sequenza nucleotidica di 519 bp della giunzione 3CD, ha confermato il raggruppamento dei sei ceppi italiani con gli AiV identificati in Cina, Germania, Brasile, Giappone e Bangladesh, nel genotipo B. I risultati ottenuti hanno definitivamente dimostrato la presenza di AiV in Italia, e nello specifico in tutti gli impianti di depurazione analizzati, suggerendo un'ampia distribuzione nell'area geografica testata.

IN VIVO IMAGE ANALYSIS DI BOHV-4

Gaetano Donofrio, Valentina Franceschi, Sarah Jacca

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Parma

Bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) è un gammaherpesvirus molto diffuso in grado di replicare in un gran numero di specie cellulari sia *in vitro* che *in vivo*, ed è in grado di stabilire infezione persistente nelle cellule della linea monocitaria/macrofagica sia del suo ospite naturale, il bovino, che nell'animale usato come modello sperimentale, il coniglio. Vari lavori hanno dimostrato come BoHV-4 sia un ottimo candidato per l'utilizzo come vettore per il trasferimento genico. La possibilità di modificare e manipolare il suo genoma sotto forma di Cromosoma Artificiale Batterico (BAC) ha aperto la strada ai suoi possibili utilizzi come vettore di antigeni vaccinali e per il trasferimento genico. Ad oggi in letteratura sono disponibili una notevole quantità di dati generati *in vitro* riguardanti tali aspetti, ma ciò non corrisponde a dati ottenuti da studi *in vivo*. Questo lavoro si è quindi posto l'obiettivo di analizzare la biodistribuzione di un nuovo virus BoHV-4 ricombinante in grado di esprimere il gene reporter luciferasi (BoHV-4-A-CMVluc Δ TK), dopo il suo inoculo per via intraperitoneale o intravenosa in topi. BoHV-4-A-CMVluc Δ TK è stato generato tramite ricombinazione omologa in un ceppo di BoHV-4 isolato dalla frazione cellulare del latte di una bovina sana, il cui genoma è stato clonato come BAC. La cassetta di espressione per la proteina luciferasi è stata quindi inserita all'interno del gene della Timidina Chinasi, la cui interruzione non risulta dannosa per la replicazione virale. Dapprima è stato dimostrato che il virus ricombinante aveva identiche proprietà replicative, se paragonato al ceppo parentale, e che le cellule trasdotte/infettate con tale virus esprimevano la luciferasi in grandi quantità; in seguito è stata studiata la replicazione virale tramite analisi di imaging *in vivo* nel topo. L'inoculo di BoHV-4-A-CMVluc Δ TK nei topi, per entrambe le vie di somministrazione, ha mostrato come il virus si localizzasse esclusivamente nel fegato, come indicato dalle analisi di *imaging* e, più nel particolare, negli epatociti, come dimostrato da studi di immunistochemica. Questi dati hanno fornito nuovi dettagli sul comportamento biologico di BoHV-4 *in vivo* e, per la prima volta, hanno evidenziato un possibile e potenziale uso di vettori basati su tale virus per il trasferimento genico mirato al fegato.

RUOLO DELL'IFN- γ NEL CONTROLLO DELLA METRITE *POST PARTUM* DEL BOVINO INDOTTA DA BOHV-4

Gaetano Donofrio, Sarah Jacca, Valentina Franceschi

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Parma

Le patologie uterine del bovino sono le principali responsabili della ridotta efficienza riproduttiva di un allevamento di bovini da latte, in quanto provocano un forte impatto sulla crescita dei costi sanitari della mandria attraverso la diminuzione delle gravidanze e della produzione di latte. Lo stato di malattia o di salute dell'utero è determinato dall'interazione tra la componente patogena e la contrastante risposta immunitaria dell'ospite e, quindi, dall'eventuale prevalenza dell'una o dell'altra. Tra i patogeni uterini, nonostante i batteri siano i soli ad essere tradizionalmente considerati, possono essere annoverati anche alcuni virus, tra i quali l'Herpesvirus Bovino 4 (BoHV-4), spesso associato ad infezioni batteriche. Di contro, nell'ospite, vi sono alcune molecole prodotte nell'utero, che contrastano l'infezione e la replicazione del patogeno. In questo lavoro è stata analizzata l'interazione tra cellule endometriali stromali bovine (BESCs) infettate con BoHV-4 e l'interferone gamma (IFN- γ). Partendo dal particolare tropismo di BoHV-4 verso le BESCs, è stata ottenuta una popolazione pura di BESCs e ne è stata dimostrata la derivazione mesenchimale attraverso saggi di immunocistochimica per i marker vimentina e citocheratina. Le BESCs esprimono recettori funzionali per l'IFN- γ (IFNGR) di tipo 1 e 2, come si è evidenziato mediante trattamento con IFN- γ di BESCs transfettate con un costrutto reporter ottenuto clonando il promotore dell'indolammina 2,3-diossigenasi bovina 1 (IDO1) a valle del gene reporter della luciferasi. Inoltre, nelle cellule BESCs trattate con IFN- γ oppure costitutivamente secernenti IFN- γ , la crescita virale è fortemente limitata e, di conseguenza, anche l'effetto citopatico. L'espressione di IDO1 nelle BESCs è incrementata da IFN- γ ed è stato precedentemente dimostrato che IDO1 costituisce un importante mediatore per alcuni effetti patogenostatici dell'IFN- γ . Tuttavia, inibitori di IDO1 così come cellule costitutivamente esprimenti IDO1 non sono in grado di annullare l'effetto dell'IFN- γ sulle BESCs infettate con BoHV-4. Anche l'espressione del gene Immediate Early (IE2) di BoHV-4 risulta diminuita a livello trascrizionale dall'attivazione del pathway dell'IFN- γ , indipendentemente dall'espressione di IDO1; ciò è stato confermato dalla delezione di un'area del promotore del gene IE2 contenente il potenziale elemento responsivo ed interagente con il fattore di trascrizione inibitorio indotto da IFN- γ nelle BESCs. I dati ottenuti in questo lavoro evidenziano sia il fondamentale ruolo delle BESCs come cellule target/effettrici per l'IFN- γ secreto dalle cellule immunitarie professionali competenti risiedenti a livello stromale nell'endometrio, che l'importanza dell'IFN- γ uterino per il controllo dell'infezione da BoHV-4 e nel passaggio da un'infezione persistente/latente ad una malattia cronica, quale l'endometrite.

P.21 MONITORAGGIO DI ROTAVIRUS AVIARI DI GRUPPO A E D IN DIVERSE SPECIE AVIARIE DA ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA

Emiliana Falcone (a), Maria Beatrice Boniotti (b), Elena Canelli (b), Marina Monini (a), Chiara Busi (b), Edoardo Vignolo (b), Antonio Lavazza (b), Franco Maria Ruggeri (a)

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

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

I Rotavirus (RVs), tra i principali agenti eziologici di malattie enteriche in diverse specie di mammiferi e uccelli, sono classificati in sette gruppi (A-G), sulla base della mobilità elettroforetica degli 11 segmenti di RNA a doppio filamento e delle caratteristiche antigeniche della proteina capsidica VP6. Nelle specie aviarie sono stati riscontrati con maggiore frequenza i rotavirus appartenenti ai gruppi A e D, mentre solo occasionalmente sono stati identificati rotavirus aviari appartenenti ai gruppi F e G. Le infezioni causate da rotavirus aviari (AvRVs) sono più frequenti nei tacchini, ma sono diffuse anche tra polli, fagiani, faraone, pernici, quaglie e, più sporadicamente, piccioni e anatre. La sindrome enterica nei giovani uccelli è una delle principali preoccupazioni per l'industria del pollame, in grado di causare gravi perdite economiche. Il monitoraggio della distribuzione dei AvRVs in diverse specie aviarie è uno strumento utile per l'acquisizione di dati epidemiologici e per comprendere meglio l'ecologia dei rotavirus aviari in natura. Lo scopo di questo studio retrospettivo è quello di fornire informazioni sulla prevalenza e l'epidemiologia dei rotavirus aviari circolanti in Italia durante il periodo 2006-2012, per monitorare la diversità e la variabilità nel tempo dei due gruppi antigenici (A e D) maggiormente diffusi tra queste specie. Sono stati analizzati 115 campioni di feci e/o contenuti intestinali, positivi per la presenza di RVs alla microscopia elettronica, provenienti da allevamenti di diverse specie aviarie del Nord e del centro Italia in presenza di focolai di enterite. I risultati del nostro studio indicano che il 14,8% e il 50,4% dei campioni analizzati appartengono rispettivamente ai gruppi A e D. Sono stati inoltre individuati nel 34,8% dei campioni co-infezioni dei due gruppi AvRV-A e AvRV-D. È interessante notare, come la co-infezione con entrambi i gruppi è stata evidenziata soprattutto tra i polli (48%) e tra i tacchini (20%). L'elettroferotipizzazione eseguita su campioni selezionati ha confermato i risultati ottenuti mediante RT-PCR. I risultati di questo studio forniscono nuovi dati sulla prevalenza dei gruppi AvRV-A e AvRV-D nelle specie aviarie in Italia. L'analisi dettagliata delle sequenze, permetterà di definire eventuali correlazioni con gli stipiti isolati nei mammiferi e individuare l'eventuale presenza di ceppi appartenenti a gruppi meno diffusi tra la popolazione aviaria.

INDAGINE SULLA PRESENZA DI *ORNITHODOROS ERRATICUS* IN SARDEGNA: RISULTATI PRELIMINARI

Francesco Feliziani (a), Lina Mur (b), Carmen Iscaro (a), Ennio Bandino (c), Manuel Liciardi (c), Annalisa Oggiano (c), Angelo Ruiu (c), Sandro Rolesu (c), José Manuel Sanchez Vizcaino (b)

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

(b) Universidad Complutense de Madrid, UCM, Madrid, Spain

(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Cagliari

La Peste Suina Africana (PSA) è una malattia infettiva dei suidi domestici e selvatici, causata da un virus DNA appartenente alla famiglia *Asfarviridae*, che può replicare ed essere trasmesso da una zecca molle del genere *Ornithodoros*. In Africa, questo ruolo è svolto da *Ornithodoros moubata*, mentre in Europa ed in particolare nella penisola iberica, è stata segnalato *Ornithodoros erraticus* quale vettore del virus. In Sardegna, dove la PSA è endemica dal 1978, non è mai stata dimostrata la presenza della zecca, né si hanno informazioni attendibili al riguardo. La ricerca diretta di *Ornithodoros* si esegue con trappole a CO₂ o per mezzo di apparecchi aspiranti, ma è resa complicata dalle caratteristiche legate alla biologia del vettore. Studi precedenti condotti da ricercatori spagnoli, hanno però evidenziato la possibilità di rilevare tracce indirette della presenza della zecca mediante indagini sierologiche: è stato infatti messo a punto un test ELISA che utilizza come antigene un estratto proteico delle ghiandole salivari di *Ornithodoros*. Questo metodo può quindi essere efficacemente utilizzato in indagini di *screening* su sieri suini per meglio indirizzare le ricerche dirette di questi *argasidi*. Su queste basi, 1200 campioni di siero suino sono stati selezionati tra quelli derivanti dalla routinaria attività di sorveglianza sierologica per PSA, mediante un campionamento stratificato e randomizzato in modo da rappresentare l'intero territorio della Regione Sardegna. Successivamente, i campioni sono stati sottoposti al test ELISA per individuare le aree più indicate alle indagini di campo mediante il *carbon dioxide trapping method*. Solo pochi sieri (1,5%) hanno fornito risultati fortemente positivi, ma sono state comunque individuate alcune zone dove applicare le ricerche dirette; le analisi entomologiche degli artropodi rilevati nelle catture fino ad ora effettuate non hanno però permesso di identificare zecche riferibili al genere *Ornithodoros*. Questi risultati rafforzano l'opinione che considera le zecche molli assenti dal territorio sardo, ma vanno in ogni caso considerati come preliminari, perché devono ancora essere completate le ricerche di campo nei siti selezionati mediante lo *screening* sierologico; inoltre, nel prossimo futuro, verranno saggiati anche sieri prelevati da cinghiali per verificare, indirettamente, l'eventuale esposizione dell'ospite selvatico al morso della zecca.

P.22 GENERAZIONE DI *VIRUS LIKE PARTICLES* PER IL VIRUS DELLA MALATTIA EMORRAGICA EPIZOOTICA DEL CERVO

Mario Forzan (a), Sushila Maan (b), Maurizio Mazzei (a), Manjunatha Belaganahalli (b), Lucia Bonuccelli (a), Monica Calamari (c), Maria Luisa Carrozza (d), Valentina Cappello (e), Mariagrazia Di Luca (f), Patrizia Bandecchi (a), Peter Mertens (b), Francesco Tolari (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi, Pisa*

(b) *Institute for Animal Health, Pirbright, United Kingdom*

(c) *Dipartimento di Biologia, Università degli Studi, Pisa*

(d) *Scuola Normale Superiore, Pisa*

(e) *Center for Nanotechnology Innovation@NEST, istituto italiano di tecnologia, Pisa*

(f) *Laboratorio NEST, Istituto Nanoscienze-CNR, Pisa; Scuola Normale Superiore, Pisa*

La malattia emorragica epizootica del cervo (EHD) è causata da un orbivirus (EHDV) trasmesso da culicoidi, del quale si conoscono otto diversi serotipi. Il virus infetta cervidi e bovino. Il genoma virale è composto da 10 segmenti di RNA bicatenario monocistronici e i virioni sono costituiti da un capsido con due gusci proteici concentrici formati dalle proteine strutturali VP3 e VP7 (capside interno) e VP2 e VP5 (capside esterno). L'interesse nei confronti della EHD è cresciuto a partire dal 2006, quando il virus è stato isolato dal bovino in Medio Oriente e Nord Africa. Per il tipo di trasmissione vettoriale, simile a quello della bluetongue, e la sua presenza nel bacino del Mediterraneo la EHD è a rischio di introduzione anche in Europa. Le *Virus Like Particles* (VLPs) sono già state prodotte per diversi virus che infettano l'uomo e gli animali ed un vaccino a base di VLPs contro il papillomavirus umano è già presente sul mercato. In questo lavoro sono state generate VLPs a partire da uno stipite di EHDV-6 isolato in Marocco nel 2006. I geni codificanti per le 4 proteine capsidiche del virus sono stati clonati ed espressi in un sistema baculovirus ricombinante/cellule di insetto, usando il vettore di espressione pAcUW51 il quale consente la simultanea espressione di due geni. Sono stati creati due baculovirus ricombinanti uno codificante per VP2 e VP5 ed uno per VP3 e VP7. Dopo aver verificato l'inserimento dei geni codificanti per ognuna delle proteine virali nei due baculovirus, ne è stata accertata l'espressione proteica tramite *immunoblotting* e colorazione con *Blue di Coomassie* effettuati dopo infezione di cellule Sf9. L'infezione contemporanea con i due baculovirus ricombinanti ha portato alla produzione di VLPs la cui struttura, analizzata dopo concentrazione per ultracentrifugazione ed osservazione al microscopio elettronico a trasmissione, è risultata simile ai virioni di EHDV. La disponibilità di VLPs per EHDV-6 apre nuove prospettive per un loro utilizzo come antigene nella preparazione di kit diagnostici sierologici e per la eventuale produzione di vaccini per il controllo dell'infezione nel bovino.

P.23 EPISODI DI RICOMBINAZIONE FRA STIPITI DI PRRSV CIRCOLANTI IN NORD ITALIA

Giovanni Franzo (a), Mattia Cecchinato (a), Marco Martini (a), Letizia Ceglie (b),
Alessandra Gigli (b), Michele Drigo (a)

(a) Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, MAPS, Università degli Studi,
Legnaro, Padova

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

L'agente responsabile della Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), è un RNA virus caratterizzato da un genoma di circa 15kb a singolo filamento nel quale sono state identificate almeno nove *Open Reading Frames* (ORFs). È classificato nell'ordine *Nidovirales*, famiglia *Arteriviridae*, genere *Arterivirus*.

La ricombinazione tra stipiti differenti del virus della Porcine Reproductive and Respiratory Sindrome (PRRSV) è stata riportata sia *in vitro* sia *in vivo*. Ciononostante evidenze di ricombinazione riportate in studi di campo sono rare e principalmente ottenute dalla comparazione di sequenze ottenute da campionamenti su larga scala (es. Stati). Questo studio è rivolto ad indagare l'entità del fenomeno su scala spazialmente e temporalmente più piccola usando sia sequenze di stipiti italiani disponibili in *GenBank* che sequenze acquisite a partire da 162 campioni di suini (siero e polmone) provenienti da allevamenti locati in tre regioni del Nord Italia e raccolti dal 2009 al 2012. L'analisi di ricombinazione è stata condotta su ORF5, ORF7 e sulla loro concatenazione tramite il programma RDP3. Su alcuni stipiti ricombinanti particolarmente significativi è stata eseguita la predizione *in silico* degli epitopi target della GP5 nonché l'analisi della struttura proteica e dei profili di glicosilazione. La storia filogeografica dei *pattern* di migrazione degli stipiti di PRRSV, considerando la provincia come livello minimo, è stata ricostruita usando l'approccio bayesiano implementato in BEAST. In totale sono state ottenute le sequenze di 131 ORF5, 111 ORF7 e 66 sequenze concatenate. È stata evidente la predizione di sei eventi di ricombinazione, frequenza particolarmente elevata se comparata ad altri studi. L'elevato tasso di migrazione virale riscontrato tra le province, facilitando fenomeni di co-infezione con stipiti diversi, sembra ben giustificare questa evidenza. Tre eventi mostravano almeno un *breakpoint* nella regione non sequenziata tra ORF5 e ORF7 e negli altri tre era coinvolta la regione della GP5 interessando, in un caso, il tratto corrispondente al maggiore epitopo di neutralizzazione. Degna di nota è stata l'identificazione degli stessi stipiti ricombinanti nella medesima azienda a distanza di tempo, a testimonianza di una loro certa *fitness* potenzialmente riconducibile alle differenze strutturali fra i virus parentali e ricombinanti. Considerando la frequenza di ricombinazione e la capacità di generare stipiti di caratteristiche imprevedibili, ulteriori sforzi dovrebbero essere dedicati allo studio delle conseguenze di questo fenomeno sui vari aspetti quali infettività, immunogenicità e patogenicità, fornendo maggiori conoscenze sulle spinte evolutive di PRRSV.

P.24 MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI *REAL-TIME* PCR PER LA DIAGNOSI E LA DIFFERENZIAZIONE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE SOTTOTIPO A E B

Giovanni Franzo (a), Michele Drigo (a), Caterina Lupini (b), Elena Catelli (b), Andrea Laconi (b), Valeria Listorti (b), Marco Martini (a), Mattia Cecchinato (a)

(a) *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi, Legnaro, Padova*

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

I metapneumovirus Aviari (aMPV) sono virus ad RNA appartenenti alla famiglia delle Paramyxoviridae, 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 gravi, che possono sfociare nella Sindrome della Testa Gonfia (SHS). Sono stati sino ad ora individuati 4 sottotipi di aMPV (A, B, C e D). La presenza di manifestazioni cliniche, non patognomoniche per infezione da aMPV, la scarsa capacità di replicazione del virus nell'organismo ospite e la sua capacità di causare infezioni subcliniche, nonché la sua variabilità genetica, rendono necessari metodi diagnostici molto accurati e sensibili. La biologia molecolare offre un'alternativa veloce, sensibile, specifica e pratica per la diagnosi delle infezioni sostenute da aMPV. Per questa ragione nel corso degli anni sono stati messi a punto diversi protocolli di RT-PCR. Più recentemente, particolare attenzione è stata rivolta allo sviluppo di metodiche basate sull'uso di *real-time* RT-PCR. I protocolli finora sviluppati prevedono l'utilizzo di sonde oligonucleotidiche specifiche marcate con fluorofori. Tuttavia questo approccio comporta un rilevante costo iniziale, una più complessa ottimizzazione della metodica ed una spiccata suscettibilità alla variabilità genomica nella regione target. A partire da questi presupposti, al fine di rilevare, quantificare e genotipizzare i due sottotipi di aMPV più diffusi (i.e. sottotipo A e B), si è scelto di mettere a punto e validare una *real-time* RT-PCR, avente come target il gene SH, basata sull'uso del SYBR Green I. La metodica ha dimostrato una sensibilità analitica paragonabile a quella di altri test riportati in bibliografia essendo in grado di rilevare, per entrambi i sottotipi, titoli virali dell'ordine di 0.5 TCID₅₀/mL. L'elevata efficienza di reazione (efficienza~90%) e la linearità nella relazione fra titoli virali e Crossing point (Cp) riscontrati, rendono inoltre la metodica adatta anche alla quantificazione virale. L'ottimizzazione delle condizioni di reazione e l'analisi della curva di melting permettono contestualmente di garantire una elevata specificità del test (assenza di cross-reazioni con altri comuni patogeni aviari) e la discriminazione dei due sottotipi, le cui Temperature di melting (T_m) si sono rivelate caratteristiche (T_m media per aMPV-A=82,72 e per aMPV-B=81,94) e altamente ripetibili nelle diverse prove fatte in corso di validazione. Complessivamente queste caratteristiche rendono il nostro protocollo di *real-time* RT-PCR un test sensibile, specifico e rapido, utilizzabile per la contestuale diagnosi, quantificazione e genotipizzazione dei sottotipi di aMPV più diffusi a livello mondiale.

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI BPV-7 IN LESIONI PROLIFERATIVE DELLA MAMMELLA IN BOVINE DA LATTE IN ITALIA

Laura Gallina, Federica Savini, Giovanni Casà, Giovanni Donati, Angelo Peli, Alessandra Scagliarini, Santino Prospero

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

Ad oggi sono noti tredici diversi tipi di Papillomavirus bovini (BPV1-1/13), classificati, in base alla sequenza del gene strutturale L1, in tre generi: *Delta*-papillomavirus (BPV-1/2/13), *Epsilon*-papillomavirus (BPV-5/8) e *Xi*-papillomavirus (BPV-3/4/6/9/10). Il BPV tipo 7 è stato identificato per la prima volta in Giappone in lesioni a carico della cute della mammella e in tessuto sano di bovino, recentemente è stato segnalato anche in Brasile. Questo lavoro rappresenta la prima segnalazione di BPV-7 in Italia. Il virus è stato trovato in due stalle di bovini dell'Emilia-Romagna che presentavano lesioni mammarie. Il sequenziamento dell'intero genoma di due differenti campioni virali, IT-215 e IT-221, ha mostrato un'identità nucleotidica del 99,5% della ORF L1 rispetto al BPV-7 identificato in Giappone (unico BPV-7 interamente sequenziato) ma una delezione di 36 aminoacidi nel gene strutturale L2 del campione IT-215 e un'inserzione di 6 aminoacidi nella ORF L2 del campione IT-221. La delezione e l'inserzione si trovano nella stessa posizione del gene L2 e sembrano causare rispettivamente l'eliminazione e l'inserzione di un coil e di un motivo riconosciuto delle cellule T. La delezione nella ORF L2 è stata identificata in 2 di 21 campioni di BPV-7 provenienti dalla stessa stalla. Entrambi i BPV-7 isolati in Italia inoltre mostrano inserzioni di 155 e 117 nucleotidi nella regione regolatoria non codificante (LCR) del genoma rispetto al BPV-7 di riferimento. Il sequenziamento dell'intero genoma dei due campioni virali ritrovati in Italia può contribuire a una migliore definizione e classificazione del papillomavirus bovino di tipo 7 ancora non assegnato ad alcun genere e di cui si hanno pochissime segnalazioni. In particolare lo studio delle inserzioni e delle delezioni genomiche, nei differenti campioni virali, potrebbero contribuire a definire il ruolo patogenetico del virus nelle lesioni epiteliali mammarie. Alcuni Autori hanno dimostrato che le lesioni mammarie dei bovini sono spesso associate alla presenza di diversi tipi di papillomavirus suggerendo che non vi sia un unico agente causale. Questo studio conferma che lesioni mammarie proliferative nei bovini possono essere causate da BPV-7 associati ad altri tipi di Papillomavirus, ma non deve essere esclusa anche la presenza di virus epiteliotropi come i *Parapoxvirus* trasmissibili all'uomo.

P.25 CETACEI SPIAGGIATI LUNGO LE COSTE ITALIANE: INDAGINI DIAGNOSTICHE *POST MORTEM*

Federica Giorda (a), Alessandra Pautasso (a), Barbara Iulini (a), Maria Domenica Pintore (a), Antonio Petrella (b), Antonio Pintore (c), Anna Toffan (d), Francesco Sholl (e), Giuliana Terracciano (e), Fabio Di Nocera (f), Mario Latini (g), Nicola Ferri (h), Santo Caracappa (i), Silva Rubini (j), Sandro Mazzariol (k), Giovanni Di Guardo (l), Marco Ballardini (a), Walter Mignone (a), Cristina Casalone (a)

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

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

(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

(d) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnano, Padova

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

(f) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Salerno

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

(h) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo

(i) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo

(j) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna, Ferrara

(k) Università degli Studi, Padova

(l) Università degli Studi, Teramo

Durante l'anno 2013 sono giunte alla Banca Dati Spiaggiamenti le segnalazioni relative a 244 cetacei spiaggiati lungo le coste italiane, 122 dei quali si riferiscono al solo trimestre gennaio-marzo e sono circoscritti alle coste tirreniche. Essendo questo ultimo valore eccedente di 10-12 volte la media degli animali spiaggiati negli ultimi 25 anni nell'area di interesse, si è potuto a buon diritto definire "evento di mortalità anomala" (UME). Gli IIZZSS territorialmente competenti sono intervenuti per effettuare la necropsia su 105 soggetti, 43,4% dei cetacei spiaggiati, applicando un protocollo di campionamento e diagnostico standardizzato. In dettaglio, sono stati eseguiti esami microbiologici, virologici e sierologici per la ricerca dei principali patogeni conosciuti nei cetacei: *Morbillivirus* (DMV), *Herpesvirus* (HV), *Brucella spp.*, *Photobacterium damsela* e *Toxoplasma gondii*. La scelta delle indagini diagnostiche è stata fortemente influenzata dallo stato di conservazione della carcassa, che nella maggior parte dei casi era inclusa tra il grado 3 (moderata decomposizione) e il grado 5 (mummificata). I risultati delle indagini *post mortem* sono stati condivisi e raccolti in maniera armonica nel database "Re.da.ce" gestito dall'IZSPLVA. Tramite metodica RT-PCR, DMV è stato identificato in 31 soggetti su un totale di 78 testati (39,74%), HV in 15 esemplari su 35 (42,86%) e *Toxoplasma gondii* in 5 soggetti su 62 (8,06%). Tra i batteri riscontrati all'esame microbiologico è emerso *Photobacterium damsela*, isolato in 38 su 59 soggetti esaminati (64%), frequentemente in associazione con HV e DMV. Mediante esami colturali è stata riscontrata la presenza di *Brucella ceti* in un solo soggetto su 49 testati, spiaggiatosi in Puglia. In conclusione, l'intervento coordinato degli IIZZSS, l'applicazione di protocolli di campionamento standardizzati e la condivisione dei risultati delle indagini diagnostiche *post mortem* ha permesso per la prima volta in Italia di fornire un quadro generale sullo stato di salute dei

mammiferi marini nei nostri mari. In particolare, in occasione dell'emergenza di mortalità anomala durante i primi 3 mesi dell'anno lungo le coste tirreniche, gli IZZSS hanno rappresentato un importante strumento operativo nell'ambito della Rete Nazionale Spiaggiamenti per la gestione dell'evento e la formulazione di un'ipotesi causale. DMV, considerato universalmente tra i patogeni di maggior importanza negli eventi di mortalità di massa, potrebbe aver esplicitato la sua azione immunodeprimente, da solo ed in associazione ai composti organoclorurati rinvenuti. Ulteriori studi sono necessari per caratterizzarne il genoma e i fattori di specificità d'ospite coinvolti nell'interazione ospite-patogeno, elementi che potrebbero rivelarsi utili per prevederne la ricomparsa.

IDENTIFICAZIONE DI FLAVIVIRUS IN ZANZARE RACCOLTE IN VENETO E TRENINO

Michela Grisenti (a,b), Ana Vázquez (c), Laura Herrero (c), Laureano Cuevas (c), Esperanza Perez (c), Daniele Arnoldi (a), Mara Scremin (a, d), Mari Paz Sanchez-Seco (c), Gioia Capelli (d), Antonio Tenorio (c), Annapaola Rizzoli (a)

(a) *Dipartimento Biodiversità ed Ecologia Molecolare, Centro Ricerca ed Innovazione, Fondazione Edmund Mach, FEM, San Michele all'Adige, Trento*

(b) *Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi, Grugliasco, Torino*

(c) *Laboratorio Arbovirus y Enfermedades Viricas Importadas, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain*

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

Gli *Insect Specific Flavivirus* (ISFs) sono Flavivirus (famiglia *Flaviviridae*) che apparentemente infettano solo insetti, recentemente scoperti e identificati in un numero crescente di regioni geografiche e specie di zanzare. Tra i Flavivirus sono inoltre presenti importanti agenti patogeni per gli animali e l'uomo, quali West Nile virus e Usutu virus (USUV). Recentemente si stanno studiando le possibili relazioni ecologiche ed evolutive tra i vari Flavivirus e in particolare, le conseguenze della loro interazione all'interno del vettore su replicazione e trasmissione virale. Per approfondire la conoscenza circa la presenza di Flavivirus in Trentino e Veneto, due regioni diverse per caratteristiche ambientali, meteorologiche ed ecoepidemiologiche, da maggio a ottobre 2012 abbiamo realizzato una cattura di zanzare, impiegando trappole *BG-Sentinel* collocate in ambiente rurale e urbano. Per lo *screening* dei Flavivirus, abbiamo utilizzato una generica RT-nested-PCR mirata su una regione del gene NS5 e l'analisi filogenetica è stata realizzata su un frammento di 1000bp dello stesso gene. Abbiamo tentato l'isolamento virale su linee cellulari C6/36 (da *Aedes albopictus*) di alcuni campioni positivi. I surnatanti freschi e le cellule di colture cellulari con evidente effetto citopatico, sono stati utilizzati per studi di Microscopia Elettronica (ME). In Veneto abbiamo raccolto 52.096 zanzare femmine e 1.190 maschi appartenenti alle specie *Oc. geniculatus*, *Oc. caspius*, *Cx. pipiens*, *Cx. territans*, *Cx. modestus*, *Cs. annulata*, *An. plumbeus*, *An. maculipennis*, *Ae. cinereus/geminus*, *Ae. albopictus*, *Ae. vexans* e *Ae. koreicus*. Abbiamo rilevato USUV in *Cx. pipiens*, e un ISFs, l'*AedesFlavivirus* (AeFV), in *Cx. pipiens* e *Ae. albopictus*. In un altro *pool* di *Cx. pipiens* abbiamo trovato identificato una presunta nuova sequenza di ISF. In Trentino abbiamo raccolto 1.622 zanzare femmine e 464 maschi appartenenti alle specie *Oc. geniculatus*, *Cx. pipiens*, *Cx. hortensis*, *An. plumbeus*, *An. maculipennis* e *Ae. albopictus*, rilevando AeFV in *pools* di *Ae. albopictus*. Alcuni AeFV sono stati isolati in coltura cellulare e identificati in ME. Il nostro studio riporta per la prima volta la presenza di sequenze di AeFV in *Cx. pipiens*, conferma la diversa situazione eco-epidemiologica precedentemente rilevata nel Nord-est Italia e l'elevata prevalenza di AeFV in *Ae. albopictus*, evidenziando l'elevato grado di identità nucleotidica tra virus circolanti nelle due aree di studio. Inoltre, sostiene l'idea dell'influenza delle condizioni climatiche sul ciclo di trasmissione virale e suggerisce che un'elevata prevalenza di ISFs può influenzare replicazione e trasmissione di altri virus più patogeni. Ulteriori studi sperimentali sono necessari per confermare tale ipotesi.

P.26 SCHMALLENBERG VIRUS IN ITALIA: I RISULTATI DELLE ATTIVITÀ DI SORVEGLIANZA

Federica Iapaolo, Andrea Polci, Francesca Izzo, Gian Mario Cosseddu, Federica Monaco
*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise G. Caporale, IZSAM,
Teramo*

Nel 2011 un nuovo arbovirus è stato segnalato per la prima volta in Germania diffondendosi, nei mesi successivi, a gran parte dei paesi Europei. Il virus, denominato Schmallenberg (SBV), appartiene al genere *Orthobunyavirus* ed è stato in grado di infettare ruminanti domestici e selvatici. SBV è trasmesso da vettori del genere *Culicoides* ed induce manifestazioni cliniche aspecifiche e transitorie negli adulti. L'infezione è tuttavia temibile negli animali gravidi per la capacità del virus di attraversare la barriera placentare provocando aborto, natimortalità o malformazioni nel feto. In Italia il primo caso di infezione è stato confermato a febbraio 2012 in un'azienda in Provincia di Treviso. Tale evidenza ha indotto il Ministero della Salute ad istituire un piano di sorveglianza per determinare la diffusione e l'eventuale impatto economico di SBV in Italia attraverso la notifica dei casi sospetti. I campioni prelevati dalle aziende sospette e dalle aziende localizzate nel raggio di 4 km sono stati esaminati dal Centro di Referenza Nazionale per lo Studio e l'accertamento delle Malattie Esotiche degli animali così come stabilito nelle note Ministeriali. L'obiettivo del lavoro è di fornire un quadro della diffusione di SBV in Italia basato sui dati ottenuti dall'attività di sorveglianza condotta tra febbraio 2012 e maggio 2013. Ottantaquattro i focolai confermati mediante RT PCR in Veneto, Piemonte, Trentino Alto Adige e Sardegna; in quest'ultima sono stati registrati il 90% dei casi clinici. Il genoma virale è stato identificato nel 42% dei feti testati e in 30/6.350 campioni di sangue esaminati. Nell'intervallo di tempo considerato sono stati conferiti e saggiati circa 6.400 campioni per la diagnosi sierologica. La presenza di anticorpi è stata determinata in 153 aziende di 11 regioni. Nell'arco di tempo incluso nello studio la presenza di SBV sul territorio nazionale è risultata limitata, soprattutto se confrontata con quella riportata in altri paesi Europei con circolazione virale. Questa differenza trova in parte giustificazione nella difficoltà di emettere un sospetto diagnostico negli adulti con la conseguente mancata notifica dei casi sospetti. Altro fattore che potrebbe aver indotto a sottostimare la prevalenza di SBV è la circolazione contemporanea, in alcune aree, del virus della bluetongue che, al pari di SBV è un abortigeno. Per definire con maggior precisione la prevalenza di SBV in Italia, valutarne le variazioni nel tempo in relazione all'immunità acquisita, ai vettori coinvolti e ai ceppi virali circolanti è opportuno proseguire le attività di sorveglianza sulla popolazione sensibile.

P.27 DATI PRELIMINARI DEL SEQUENZIAMENTO DEL VIRUS DI SCHMALLEMBERG CIRCOLATO IN ITALIA

Francesca Izzo, Chiara Pinoni, Grazia Bortone, Federica Monaco
*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise G. Caporale, IZSAM,
Teramo*

Il virus di Schmallenberg (SBV), comparso in Germania nel 2011, è un patogeno emergente responsabile di malformazioni congenite, aborti e natimortalità nei ruminanti. Il genoma ad RNA è organizzato in tre segmenti denominati S (Small), M (Medium), L (Large). Le analisi molecolari di tali segmenti hanno consentito la classificazione di SBV nel genere *Orthobunyavirus*, sierogruppo Simbu. È trasmesso da insetti ematofagi del genere *Culicoides* la cui ampia diffusione ha reso possibile la circolazione di SBV in gran parte dell'Europa, Italia compresa. Nell'ottica di contribuire alla definizione della variabilità molecolare dei virus responsabili dei focolai europei abbiamo investigato le caratteristiche genomiche dei ceppi di SBV che hanno circolato nel nostro Paese. Dagli organi positivi alla *real-time* PCR, l'RNA virale è stato estratto, retrotrascritto, amplificato e sottoposto a sequenziamento con metodo di *Sanger*. Da un bovino ed una capra provenienti dal Veneto e da 2 capre ed 11 ovini provenienti dalla Sardegna è stato possibile determinare la sequenza delle due "open-reading-frame" (ORF) sovrapposte contenute nel segmento S. Queste codificano la proteina nucleo-capsidica (N) e la proteina non strutturale (NSs). Dal confronto delle sequenze ottenute con quelle segmento S del primo virus isolato in Germania non sono state evidenziate variazioni nucleotidiche nei campioni provenienti dal Veneto. Diverse sostituzioni nucleotidiche, da una a 3 per campione, sono state individuate nei campioni provenienti dalla Sardegna. Alcune di esse danno luogo a sostituzioni aminoacidiche. Quelle numericamente più rappresentative sono: la sostituzione di una H con una R in posizione 84 della proteina NSs (3 campioni su 13); la sostituzione di una S con una N in posizione 111 della proteina N (10 campioni su 13). Quest'ultima tra l'altro già osservata, seppur in eterozigosi, in un virus di Schmallenberg atipico isolato in Olanda. Dal momento che il segmento S è quello maggiormente conservato, i dati in nostro possesso sembrerebbero indicare una variabilità geografica tra i virus circolati in Italia. Se da un lato questa ipotesi potrebbe trovare ulteriori conferme con il sequenziamento dell'intero genoma virale, dall'altro va sottolineata la necessità di identificare variazioni nucleotidiche nel segmento S perché potrebbero condizionare la virulenza di questo arbovirus. Recenti studi su SBV e altri patogeni correlati hanno infatti evidenziato che le proteine N e NSs possono influenzare rispettivamente l'attività replicativa-trascrizionale e la risposta immunitaria dell'ospite. Riteniamo pertanto interessante proseguire nell'attività di caratterizzazione genetica per il monitoraggio di eventuali mutazioni nei ceppi virali circolanti.

P.28 MONITORAGGIO DELLE CONTAMINAZIONI DA NOROVIRUS E VIRUS DELL'EPATITE A IN MOLLUSCHI BIVALVI IN PUGLIA

Gianfranco La Bella, Mariateresa D'Alessandro, Giovanna La Salandra
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

I Norovirus (*NoV*, *Caliciviridae*) e il virus dell' Epatite A (*HAV*, *Picornaviridae*) rappresentano la causa di principali zoonosi rispettivamente di gastroenterite acuta e di epatite virale nell'uomo, costituendo un importante problema di sanità pubblica. Entrambi si diffondono per via oro-fecale, sono capaci di dare infezioni a basse dosi (1-10 UFP) e di sopravvivere a lungo nell'ambiente esterno. I Molluschi Bivalvi Vivi (MBV) rappresentano importanti veicoli di patogeni gastroenterici, a causa della loro capacità di filtrare l'acqua e di concentrare oltre alle sostanze nutritive anche virus e batteri presenti nell'ambiente in cui vivono. Scopo del presente lavoro è stato condurre uno studio di monitoraggio delle contaminazioni da questi agenti virali nei molluschi bivalvi provenienti dagli allevamenti della Regione Puglia nel triennio 2011-2013. Sono stati analizzati 232 campioni di molluschi di diverse specie (143 *Mytilus galloprovincialis*, 28 *Tapes decussatus*, 17 *Venus gallina*, 9 *Ostrea edulis*, e altre specie). La ricerca di *HAV* e di *NoV*, genogruppi GI e GII, è stata condotta utilizzando il protocollo fornito dal Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR-ISS) e consiste in diverse fasi: prelievo e omogeneizzazione dell'epatopancreas, estrazione e concentrazione virale, estrazione dell'acido nucleico, analisi molecolare. Quest'ultima prevede la retrotrascrizione dell'RNA virale e la successiva amplificazione, che sono state condotte utilizzando una *one-step real-time* RT-PCR con sonde e *primer* specifici per *NoV* GI, GII e *HAV*. Dei 232 campioni analizzati, 53 sono risultati positivi per Norovirus (22,8%). In particolare, dei 53 campioni 28 sono positivi per *NoV* GI (12%), 14 per GII (6%) e 11 GI+GII (4,74%). Inoltre, 4 campioni sono risultati positivi per *HAV* (1,72%) e di questi, 3 sono anche positivi per Norovirus GI e 1 per GI+GII. Per anno, sono stati caratterizzati 18 campioni positivi negli anni 2011 e 2012 e 17 nel 2013. I dati riportati mostrano un'alta presenza di *NoV* in MBV rispetto ad altri studi simili, con una prevalenza del genogruppo GI. Al contrario, il dato sulla co-presenza di entrambi i genogruppi è in accordo con studi presenti in letteratura. Per *HAV*, i pochi campioni positivi sono relativi all'inizio dell'anno 2011 e il risultato può essere associato ad un caso sporadico. Sono necessari ulteriori dati e un monitoraggio costante per ottenere un quadro più approfondito sulla contaminazione di MBV con virus enterici con l'obiettivo di garantire ai consumatori prodotti sempre più salubri e sicuri in termini di analisi del rischio e sicurezza alimentare.

Lavoro svolto con fondi Ministero della Salute RC IZS PB 06/11

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI DUE ENTEROVIRUS BOVINI

Gianvito Lanave (a), Viviana Mari (a), Cristiana Catella (a), Krisztian Bányai (b), Ilke Karayel (c), Feray Alkan (c), Canio Buonavoglia (a), Vito Martella (a)

(a) *Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi Aldo Moro, Bari*

(b) *Institute for Veterinary Medical Research, Centre for Agricultural Research, Hungary*

(c) *Ankara University, Department of Virology, Turkey*

Gli Enterovirus (EV) costituiscono un ampio genere all'interno della famiglia Picornaviridae e comprendono 10 specie virali, tra cui gli enterovirus bovini (BEV). I BEV sono virus con un capsido nudo che circonda un core di RNA a singolo filamento con polarità positiva di 7,4 kb e sono stati ritrovati principalmente nei bovini ma poco si conosce in merito al loro potenziale patogeno. L'obiettivo dello studio è stato la caratterizzazione molecolare di due virus citopatogeni adattati a crescere in vitro su cellule, usando la tecnologia NGS (*Next Generation Sequencing*). Il ceppo 421(2.7) è stato isolato su cellule VERO da vitelli con enterite in un allevamento da latte dalla Turchia. Il ceppo 47/13 è stato isolato in cellule MDBK da vitelli con enterite di un allevamento in Puglia. Entrambi i virus sono stati propagati serialmente su colture cellulari ed hanno dato luogo, a partire dal secondo passaggio, ad effetto citopatico, con formazione di cellule tondeggianti translucide e rapida lisi del monostrato. I virus non erano caratterizzabili con gli strumenti a disposizione in laboratorio. All'osservazione in microscopia elettronica erano visibili piccoli virus nudi tondeggianti di circa 30 nm di diametro. Al fine di caratterizzare i virus, l'RNA è stato retro-trascritto ed usato come substrato per una PCR con primer random. Il prodotto PCR è stato usato per generare una libreria successivamente sottoposta a sequenziamento di tipo NGS su piattaforma Ion Torrent. Le read sono state sottoposte ad analisi bioinformatica per il controllo di qualità col programma PRINSEQ e l'assemblaggio delle read in contig è stato effettuato con il software Velvet. L'analisi preliminare dei contig è stata effettuata mediante BLAST, identificando i due virus come enterovirus. Successivamente si è assemblato il genoma col programma BWA usando la sequenza di riferimento di un enterovirus bovino (NC_001859). In tal modo si è ricostruito l'80% del genoma del virus 421(2.7) ed il 55% del genoma del virus 47/13. Il genoma è stato completato usando una strategia overlapping per colmare i gap. I virus sono stati infine tipizzati come enterovirus bovino di tipo E usando un database *online* (<http://www.picornaviridae.com/enterovirus>). L'informazione generata in questo progetto sarà utilizzata per sviluppare specifici strumenti diagnostici per migliorare l'algoritmo diagnostico delle enteriti virali nei vitelli.

P.29 MAMMALIAN ORTHOREOVIRUS: CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DI ISOLATI DA CANE, GATTO E PIPISTRELLO

Davide Lelli, Ana Moreno, Alice Prosperi, Antonio Lavazza, Maria Beatrice Boniotti, Elisabetta Raffini, Paolo Cordioli

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

Gli orthoreovirus dei mammiferi (MRVs) sono RNA virus della famiglia *Reoviridae* in grado di infettare potenzialmente tutte le specie di mammiferi. Originariamente descritti come virus “orfani” (REO = *Respiratory Enteric Orphans*), in quanto non associati ad alcuna patologia, sono oggi considerati possibile causa di forme respiratorie, enteriche e neurologiche. Recentemente sono stati identificati nuovi MRVs in pipistrelli in Italia e Germania altamente correlati con un virus isolato nel cane in Italia nel 2004. Successivamente è stato descritto un caso di gastroenterite acuta in un bambino in Slovenia causato da un virus che presenta il più alto valore di similarità nucleotidica per i sopracitati virus da pipistrello. Allo scopo di approfondire le possibili relazioni genomiche tra MRVs da differenti specie di mammiferi, viene riportato l'isolamento di MRVs da cane, gatto e pipistrello e la relativa caratterizzazione genomica del gene S1 completo. Sessantacinque campioni di feci di cane e 31 di gatto sono stati sottoposti ad esame virologico in coltura cellulare (linea LLCMK2). La caratterizzazione genomica è stata eseguita su 6 ceppi virali isolati da cane, 3 da gatto e 16 da pipistrello tramite sequenziamento completo del gene S1 (1416 bp). I ceppi sono stati precedentemente tipizzati come MRV tipo 3 tramite Multiplex RT-PCR. Le sequenze sono state confrontate con quelle di riferimento ottenute da *GenBank* mediante allineamento con il programma *clustal W*. L'albero filogenetico è stato costruito con il programma MEGA 5 utilizzando il metodo *neighbour-joining*, modello *Tamura-Nei*. Le topologie evidenziate sono state confermate con i metodi *maximum likelihood* e *maximum parsimony*. L'analisi filogenetica ha evidenziato che i virus analizzati si dividono in 4 cluster ben differenziati. Un primo cluster è formato da tutti gli isolati da cane e gatto che formano insieme ad alcuni ceppi da pipistrello un gruppo omogeneo con percentuale di identità >99%. Un secondo cluster è costituito dall'isolato umano identificato in Slovenia e dai due isolati da pipistrello in Italia e Germania. I restanti due cluster sono costituiti dai soli isolati da pipistrello in Italia. Lo studio ha evidenziato una scarsa variabilità tra i ceppi isolati da cane e gatto mentre risultano maggiormente differenziati gli isolati da pipistrello. Da sottolineare l'elevata correlazione con la più alta percentuale di identità (99,2%) tra il ceppo umano sloveno ed un ceppo italiano isolato da pipistrello. I dati ottenuti ampliano le conoscenze sull'epidemiologia dei reovirus in considerazione del limitato numero di sequenze MRVs disponibili in banca dati.

P.30 VARIAZIONI BIOLOGICHE E GENOMICHE DI BIOTIPI DELL'INFLUENZA AVIARE PROPAGATI IN DIFFERENTI SUBSTRATI BIOLOGICI

Tina Lombardo (a), Riccardo Villa (a), Silvia Dotti (a), Sabrina Renzi (a), Chiara Chiapponi (b), Stefano Pongolini (b), Maura Ferrari (a)

(a) *Reparto Substrati Cellulari e Immunologia Cellulare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia*

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

Il sistema biologico d'elezione impiegato per l'isolamento e la replicazione dei virus dell'Influenza è rappresentato dall'embrione di pollo. Tale sistema biologico permette la crescita di un'ampia gamma di virus influenzali. È tuttavia da rilevare che taluni isolati di campo non presentano una crescita immediata e la propagazione seriale può causare mutazioni, con comparsa di varianti, differenti dal punto di vista antigenico ai virus originali. Di notevole interesse è la possibilità di sostituire l'embrione di pollo con le colture cellulari, sistema più disponibile in laboratorio. Obiettivo dello studio è stata la valutazione delle caratteristiche biologiche e genomiche di differenti biotipi del virus dell'Influenza aviare, amplificati serialmente utilizzando quale substrato sia embrione di pollo SPF (Specific Pathogen Free) che tre differenti linee cellulari, note per essere recettive al virus Influenzale: NSK (Newborn Swine Kidney), MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), UMNSAH/DF1 (Chicken embryo fibroblasts). I biotipi di virus selezionati sono stati: H5N1 LPAI A/mallard/Italy/3401/05, H5N2 HPAI A/chicken/Italy/8/A98, H7N1 HPAI A/turkey/Italy/4580/99, H7N3 LPAI A/turkey/Italy/2962/V03, H9N2 LPAI A/turkey/Wisconsin/66, forniti dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Padova). La variazione di patogenicità, a seguito della propagazione seriale dei virus in esame, è stata valutata mediante prove in vivo condotte su polli SPF di razza White Leghorn di 6 settimane di età, inoculati per via endovenosa al fine di determinare l'indice di patogenicità intravenosa (IVPI). I biotipi virali propagati al primo e decimo passaggio nei sistemi biologici utilizzati, sono stati inoltre sottoposti a sequenziamento al fine di rilevare possibili mutazioni acquisite durante l'amplificazione seriale. La maggior parte dei biotipi virali è risultata in grado di replicare già dal primo passaggio sui tre tipi cellulari con induzione di effetto citopatico, tranne il biotipo H9N2 LPAI A/turkey/Wisconsin/66 che non ha replicato nella linea cellulare UMNSAH/DF1. I valori dell'indice di patogenicità intravenosa, invece, sono risultati inferiori a seguito della propagazione virale nelle linee cellulari rispetto all'embrione di pollo, ad eccezione di H7N1 HPAI A/Turkey/Italy/4580/99. Le indagini perseguite hanno confermato come le colture cellulari possano rappresentare un valido sistema alternativo all'embrione di pollo per l'amplificazione del virus dell'Influenza aviare. Il sequenziamento genomico completo ha evidenziato che l'adattamento del virus dell'Influenza A ai differenti sistemi biologici può essere responsabile di mutazioni non descritte in precedenza in letteratura, con conseguente sostituzione amminoacidica il cui ruolo, sotto il profilo antigenico, deve essere accuratamente valutato.

ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI UN NUOVO MEMBRO DELLA SPECIE *PTEROPINE ORTHOREOVIRUS* DA VOLPI VOLANTI IMPORTATE DALL'INDONESIA

Alessio Lorusso, Massimiliano Orsini, Liana Teodori, Massimo Ancora, Alessandra Leone,
Andrea Capobianco Dondona, Federica Monaco, Giovanni Savini
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell' Abruzzo e del Molise G. Caporale, Teramo

La globalizzazione ed, in parte, le odierne abitudini e stravaganze dell'uomo moderno nella scelta dei pets domestici, favoriscono, con le nuove tecnologie disponibili, la scoperta e la caratterizzazione di nuovi agenti patogeni. I pipistrelli, probabilmente la popolazione di vertebrati più varia, abbondante, e geograficamente diffusa sulla terra, sono serbatoio di importanti virus zoonosici alcuni dei quali responsabili di gravi epidemie con mortalità elevata quali i virus Hendra e Nipah. I virus Hendra e Nipah hanno come *reservoir* naturale i pipistrelli della frutta o volpi volanti del genere *Pteropus*, ampiamente diffusi in Australia, Indonesia, Malesia. Il primo Orthoreovirus (famiglia *Reoviridae*) fusogenico, il Nelson Bay virus, isolato dalle volpi volanti, risale al 1968 in Australia, mentre è del 2007 l'isolamento e la caratterizzazione del virus Melaka, responsabile di sintomatologia febbrile e respiratoria in un uomo venuto a contatto con una volpe volante. Successivamente sono stati isolati da pazienti con sintomi respiratori altri Orthoreovirus quali il Kampar, il Miyazaki-Bali/2007, geneticamente ed antigenicamente correlati con il prototipo Nelson Bay virus. Tutti hanno dimostrato, fortunatamente, modesta trasmissione interumana. Insieme al virus Pulau, isolato da una volpe volante nel 2007 nell'Isola di Tioman (Malesia), formano la specie recentemente proposta come *Pteropine Orthoreovirus*. Nel presente studio, mediante *next generation sequencing*, è stato possibile sequenziare l'intero genoma del virus Indonesia/2010 isolato da campioni di feci e saliva di una volpe volante importata dall'Indonesia. I campioni erano pervenuti presso i laboratori dello IZSAM per accertare l'assenza dei virus Hendra e Nipah. Indonesia/2010 È stato propagato con successo *in vitro* su un vasto *range* di cellule, comprese quelle di insetto. La costellazione genomica è quella tipica degli Orthoreovirus in quanto formata da dieci segmenti, alcuni dei quali policistronici, di dsRNA. Il virus Indonesia/2010 è filogeneticamente correlato in ogni segmento con gli altri virus della specie *Pteropine Orthoreovirus*, quindi potenzialmente zoonosico. Il presente studio evidenzia ancora una volta l'importanza delle volpi volanti o più in generale, dei pipistrelli, come vettori di virus zoonosici e del pericolo biologico che si nasconde nella importazione di animali provenienti da aree geografiche lontane ed ecologicamente diverse rispetto all'Europa.

VARIABILITÀ GENETICA DI BVDV E FREQUENZA DI GENOTIPI E SOTTOTIPI IN ITALIA NEL PERIODO 1995-2013

Camilla Luzzago (a), Stefania Lauzi (a), Erika Ebranati (b), Monica Giammarioli (c), Ana Moreno (d), Vincenza Cannella (e), Loretta Masoero (f), Elena Canelli (d), Annalisa Guercio (e), Claudio Caruso (f), Massimo Ciccozzi (g,h), Gian Mario De Mía (c), Pier Luigi Acutis (f), Gianguglielmo Zehender (b), Simone Peletto (f)

(a) *Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi, Milano*

(b) *Sezione Malattie Infettive, Dipartimento di Scienze Cliniche Luigi Sacco, Università degli Studi, Milano*

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

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

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

(f) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, Torino*

(g) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(h) *Università Campus Biomedico, Roma*

Il virus della diarrea virale bovina (BVDV) è un pestivirus con un impatto rilevante sulla salute e sulla produttività dei bovini. La tipizzazione molecolare di BVDV ha permesso la differenziazione del virus in due genotipi (BVDV-1 e BVDV-2) e l'identificazione di una nuova specie putativa, denominata HoBi-like, la cui circolazione in bovini naturalmente infetti è stata di recente segnalata, per la prima volta in Europa, in Italia meridionale. Con l'intento di aggiornare le informazioni sulla variabilità genetica di BVDV in Italia, sia per monitorare la situazione nazionale che per porre le basi per studi di epidemiologia molecolare, una vasta collezione di sequenze (n=371) della regione 5'UTR del virus è stata selezionata per identificare genotipi e sottotipi circolanti sul territorio nazionale con una risoluzione a livello di singolo allevamento. I risultati hanno confermato che BVDV-1 è il genotipo con più alta frequenza, mentre BVDV-2 è stato rilevato sporadicamente e la segnalazione più recente risale al 2004. Nessun BVDV della nuova specie HoBi-like è stato identificato. Tra i sottotipi di BVDV-1, sono stati osservati quattro pattern di distribuzione: sottotipi ad alta prevalenza con un'ampia distribuzione spazio-temporale (BVDV-1b, 1e); sottotipi a bassa prevalenza con una vasta diffusione geografica (BVDV-1a, 1d, 1g, 1h, 1k), sottotipi a bassa prevalenza presenti in aree geografiche ristrette (BVDV-1f) e sottotipi sporadici rilevati solo in singoli allevamenti (BVDV-1c, 1j, 1l). BVDV-1c, k, l sono peraltro segnalati per la prima volta in Italia. Nella maggioranza degli allevamenti risulta circolare un'unica variante genetica, ma i risultati dimostrano la possibilità di co-infezione con varianti genetiche diverse, sia in allevamenti da latte che da carne. L'Italia settentrionale conferma il ruolo preponderante per l'introduzione e la dispersione di BVDV sul territorio nazionale. Tuttavia l'identificazione di varianti sporadiche in aree più ristrette suggerisce anche il rischio di introduzione attraverso differenti flussi commerciali o prodotti biologici contaminati.

P.31 NUOVO PROTOCOLLO DI NEXT GENERATION SEQUENCING PER LA CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEL VIRUS DEL CIMURRO APPARTENENTE AL LINEAGE ARTICO

Maurilia Marcacci, Daria Di Sabatino, Barbara Cipro, Iolanda Mangone, Valeria Marini, Ottavia Di Filippo, Giovanni Savini, Alessio Lorusso
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise G. Caporale, Teramo

Il cimurro è una malattia infettiva contagiosa dei canidi, sostenuta da un virus, il *Canine Distemper Virus* (CDV), appartenente al genere *Morbillivirus* della famiglia *Paramyxoviridae*. Si tratta di un'infezione caratterizzata da un'elevata morbilità e mortalità, che colpisce carnivori domestici, selvatici e mammiferi marini. Il cimurro è presente nella popolazione canina in forma endemica in molte aree del mondo ed è stato ripetutamente confermato nella fauna selvatica europea. Nel 2013 numerosi casi gravi di cimurro sono stati segnalati nella popolazione canina delle regioni Abruzzo, Molise e Puglia. In Abruzzo, forme gravi di malattia sono state inoltre osservate in alcuni esemplari di tasso, volpe e lupo appenninico. Questo studio descrive la messa a punto di un veloce e robusto protocollo di *Next Generation Sequencing* (NGS) su piattaforma *Ion PGM™* che è stato utilizzato per ottenere la sequenza completa del genoma del ceppo CDV2784/2013, prototipo dei ceppi responsabili dei casi cimurro nei cani e lupi nel corso del 2013. CDV2784/2013 è stato dapprima isolato su cellule Vero SlamDog da un tampone congiuntivale di un cane infetto. L'RNA totale è stato quindi utilizzato per la preparazione del campione da processare in NGS. Il software di analisi MIRA versione 4.0rc4 ha prodotto un totale di 403 *contigs*. L'intero genoma (15.690 bp) è stato quindi sequenziato con successo. Il ceppo CDV2784/2013 appartiene al *lineage* artico, ampiamente diffuso in Europa, Asia e Stati Uniti e presenta il 92% di identità nucleotidica con il ceppo vaccinale Onderstepoort. Il protocollo sviluppato e descritto in questo studio, basato su tecnologia *Ion PGM™* per RNA non segmentato a polarità negativa, ha permesso di sequenziare per la prima volta in modo rapido ed efficace l'intero genoma di un ceppo artico di CDV.

P.32 IDENTIFICAZIONE DI CALICIVIRUS IN GATTI CON FORME ENTERICHE

Vito Martella (a), Cristiana Catella (a), Livia Bodnar (a), Michele Camero (a), Alessandra Cavalli (a), Giuseppe Palermo (b), Giovanni Romito (c), Gianvito Lanave (a), Barbara Di Martino (d), Domenico Galante (e), Maria Assunta Cafiero (e), Canio Buonavoglia (a)

(a) *Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi Aldo Moro, Bari*

(b) *Libero Professionista, Novara*

(c) *Libero Professionista, Bologna*

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

(e) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, Foggia*

I Calicivirus felini (FCV) sono virus molto variabili e recentemente sono state descritte forme sistemiche iperacute. I gatti con infezione acuta e gli animali con infezione persistente eliminano il virus tramite secrezioni oro-nasali e congiuntivali. I segni clinici principali sono ulcere orali, sintomi delle prime vie respiratorie e febbre. FCV inoltre è spesso isolato da gatti con stomatite o gengivite cronica. Nelle forme iper-virulente, si può osservare febbre, edema cutaneo, lesioni ulcerative sulla testa e le zampe e ittero, con mortalità elevata negli adulti. In letteratura esistono segnalazioni sporadiche sull'identificazione di FCV dal tratto enterico. Tale via non è considerata solitamente come possibile fonte di eliminazione e diffusione di FCV. Inoltre FCV non è considerato un virus entero-patogeno. Tuttavia, l'infezione sperimentale con un ceppo FCV, isolato da gatti con alterazioni neurologiche e scarsamente correlato con il virus vaccinale F9, ha determinato diarrea acquosa profusa sia in gatti *specific pathogen free* non vaccinati che in gatti vaccinati con ceppo F9. Inoltre, è stato possibile osservare differenze biologiche tra ceppi isolati dalle feci e ceppi isolati dal primo tratto dell'apparato respiratorio o da lesioni orali, in quanto, a differenza degli stipiti di origine respiratoria, gli isolati FCV di origine enterica sono resistenti alla bile. Al fine di valutare la possibile associazione di FCV con forme enteriche, in questo studio sono stati analizzati 202 tamponi rettali di gatti con sintomi enterici acuti e 27 gatti asintomatici usati come gruppo di controllo. I soggetti erano sia animali domestici presentati a visita medica o animali inseriti in gattili. Questi ultimi sono stati campionati prima dell'introduzione nel gattile. Tutti i campioni sono stati sottoposti a *screening* con RT-PCR utilizzando diversi set di *primer* per calicivirus. FCV è stato identificato nel 27% (55/202) dei gatti sintomatici mentre non è stato trovato in nessuno dei gatti asintomatici di controllo. La positività per FCV valutata con test chi-square sembra correlata significativamente alla presenza di sintomi gastro-enterici ($p=0,003$; $OR=2,02$; $IC=0,7-5,5$). Sebbene il possibile ruolo enteropatogeno di FCV dovrebbe essere confermato mediante infezioni sperimentali in modello animale, questo studio dimostra per la prima volta che FCV può essere associato a forme enteriche nei gatti. Inoltre, animali con età tra 0-3 mesi sembrano avere maggiore predisposizione a contrarre l'infezione ($p=0,21$; $OR=1,55$; $IC=0,8-2,9$). Questo dato è compatibile con il fatto che a tale età gli anticorpi colostrali ormai siano scesi sotto i livelli minimi protettivi e quindi i gattini diventino suscettibili all'infezione.

KOBUVIRUS FELINI IN GATTI DIARROICI IN ITALIA

Irene Melegari (a), Federica Di Profio (a), Maria Grazia Pennisi (b), Fulvio Marsilio (a), Barbara Di Martino (a)

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

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

I *Kobuvirus* (genere *Kobuvirus*) sono piccoli virus (35-38 nm) a RNA monocatenario (8,2-8,4 kb) sprovvisti di *envelope*, appartenenti alla famiglia *Picornaviridae*. Come prototipo di questo genere è annoverato il virus Aichi (AiV) dell'uomo, attualmente riconosciuto come uno dei patogeni virali associati a forme di gastroenterite ad eziologia sconosciuta. Nell'aprile 2013, *Kobuvirus* geneticamente correlati ad AiV (identità nucleotidica dell'81%) sono stati identificati nelle feci di gatti diarroici in Korea, sollevando interessanti interrogativi sul ruolo enteropatogeno di questi nuovi virus nel gatto, nonché sul potenziale impatto zoonosico. Al fine di acquisire ulteriori informazioni epidemiologiche, nel presente studio sono stati analizzati 66 campioni fecali collezionati da gatti con diarrea (n° 20) e da gatti asintomatici (n° 46) di età compresa tra i 2 e i 12 mesi. I campioni sono stati testati mediante RT-PCR impiegando un set di *primer* ad ampio spettro che ha per *target* una regione conservata del gene 3D e *primer* specifici per *Kobuvirus* felino. Inoltre, tutti i tamponi rettali sono stati sottoposti a *screening* molecolare per comuni patogeni virali del gatto quali virus della panleucopenia felina (FPV), calicivirus felino (FCV) e coronavirus enterico felino (FECV). L'RNA di *Kobuvirus* felino è stato identificato nel 15% (3/20) degli animali con sintomatologia enterica, da solo (1/20) o in associazione con il DNA di FPV (2/20). Nessuno dei gatti asintomatici è risultato positivo per *Kobuvirus*. Sulla base dell'analisi di sequenza del gene 3D, i tre ceppi italiani sono risultati strettamente correlati ai ceppi coreani (identità nucleotidica del 92-93%). I risultati ottenuti nel presente lavoro hanno dimostrato che la circolazione di questi nuovi virus felini non è limitata all'area geografica dove per primi sono stati segnalati. Ulteriori indagini basate sullo *screening* di una più ampia collezione di campioni sono necessarie al fine di stabilire definitivamente l'eventuale ruolo eziologico dei *Kobuvirus* nelle enteriti del gatto.

IPOFERTILITÀ DA VIRUS BLUE TONGUE SIEROTIPO 1 NEGLI ARIETI

Giorgio Meloni (a), Giontonella Puggioni (a), Giovanni Savini (b), Davide Pintus (a), Giuseppe Marruchella (b), Angela Maria Rocchigiani (a), Maria Dattena (c), Daniela Manunta (a), Rosario Scivoli (a), Annalisa Oggiano (a), Claudia Contu (a), Ciriaco Ligios (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo

(c) AGRIS, Dipartimento per la Ricerca nelle Produzioni Animali, Olmedo, Sassari

La Blue Tongue (BT) è una patologia infettiva non contagiosa dei ruminanti trasmessa da artropodi vettori. L'agente eziologico della malattia è un RNA virus appartenente alla famiglia *Reoviridae* genere *Orbivirus*, del quale si conoscono attualmente 26 sierotipi. Nel periodo estate/autunno 2013, il virus Blue Tongue sierotipo 1 (BTV1) ha provocato in Sardegna un'epidemia dove in associazione alla sintomatologia classica, negli arieti si è evidenziato un coinvolgimento del tratto genitale, caratterizzato da una severa ipertermia ed edema dello scroto. In questo lavoro si descrivono gli aspetti patologici, virologici e gli effetti sulla fertilità causati dall'infezione naturale da BTV1. Lo studio è stato condotto su 12 arieti selezionati da 8 aziende, nei quali erano state osservate manifestazioni cliniche di BT. Gli arieti sono stati soppressi a 15 (n. 1), 30 (n. 2), 60 (n. 2), 100 (n. 6) e 140 (n. 1) giorni dopo l'inizio della sintomatologia clinica. All'esame autoptico il sangue, i testicoli, l'epididimo, le ghiandole accessorie maschili e i linfonodi regionali sono stati adeguatamente campionati per le analisi sierologiche, virologiche e anatomo-istopatologiche. Tutti gli arieti sono risultati positivi al test ELISA condotto per la ricerca di anticorpi contro BTV. L'RNA di BTV1 è stato evidenziato mediante *real-time* RT-PCR nel sangue, nella milza e nei linfonodi regionali di tutti gli arieti sino a 60 giorni dall'inizio dei sintomi, mentre nelle ghiandole accessorie e nei testicoli fino a 30 giorni. L'esame istologico ha evidenziato nei testicoli una diffusa degenerazione dell'epitelio seminifero con una riduzione del numero degli strati cellulari e la comparsa di cellule giganti intratubulari. Era inoltre evidente una oligospermia e nei casi più gravi una azospermia. Nei testicoli, esaminati a 15, 30 e 60 giorni dopo il manifestarsi dei sintomi della malattia, la degenerazione testicolare era caratterizzata da edema intertubulare così come dalla mancanza di spermatozoi maturi e cellule germinali. Infine negli animali soppressi a 100 e 140 giorni è stata osservata una fibrosi intertubulare e una minore severità della degenerazione delle cellule dell'epitelio seminifero. Sebbene ipofertilità sia stata riportata in arieti vaccinati con BTV2 vivo attenuato, con ceppi di campo di BTV1 e 8 sperimentalmente inoculati in arieti non si sono riprodotte lesioni a livello del tratto genitale. Nel nostro studio si dimostra per la prima volta che nel corso di infezione naturale da BTV1 negli arieti è possibile riscontrare una grave degenerazione delle cellule dell'epitelio seminifero con un parziale recupero osservabile solo dopo i 100 giorni. Rimane tuttavia ancora da determinare se l'azione patogena di BTV1 derivi da un tropismo diretto verso le cellule germinali.

P.33 COMPARAZIONE DI DUE METODI DI ESTRAZIONE DI RNA GENOMICO IN CAMPIONI DI SALIVA PER LA RILEVAZIONE DEL VIRUS DELLA PRRS IN SUINI IN FASE DI MAGRONAGGIO

Ilaria Miceli (a), Milena Monnier (a), Silvia Marro (b), Nicoletta Vitale (a), Simona Zoppi (a), Alessandro Dondo (a), Marco Faccenda (b), Maria Goria (a)
(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino
(b) Veterinario Libero Professionista, Cuneo

La Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRS) è una malattia infettiva contagiosa, ad eziologia virale, che induce nel comparto zootecnico suinicolo gravi conseguenze sanitarie ed economiche. Il controllo di questa patologia viene attuato sia attraverso la profilassi vaccinale, sia adottando rigide misure di biosicurezza interne ed esterne, nonché con il condizionamento dei futuri riproduttori prima di introdurli nell'allevamento. Per la diagnosi di PRRS nei controlli di routine è più frequentemente utilizzato il siero, poiché è semplice da prelevare e si presta per armonizzarsi con altre indagini. Ad oggi una promettente matrice alternativa al siero sembra essere rappresentata dalla saliva, con cui la gestione dei controlli potrebbe essere migliorata per l'approccio non invasivo e sincronizzata per economicità con altre indagini riguardanti patologie causate da virus a RNA (es. swine influenza virus). Tuttavia l'estrazione dell'RNA genomico dalla saliva risulta essere una procedura ancora da ottimizzare, a causa della massiccia presenza di enzimi degradanti RNA. Allo scopo di valutare le potenzialità della matrice saliva rispetto a campioni di siero dei medesimi soggetti, sono stati prelevati 412 campioni, di cui 206 di saliva (sul singolo capo) e 206 di siero, da 35 soggetti in fase di magronaggio-ingrasso provenienti da un allevamento con comprovata presenza di infezione da PRRSV. Il protocollo sperimentale prevedeva il prelievo di siero e saliva ogni 2 settimane per un periodo di osservazione complessivo di 10 settimane. I campioni di saliva sono stati sottoposti a due diversi approcci estrattivi e l'amplificazione è stata effettuata mediante tecnica RT-nested PCR. Un metodo di estrazione impiegava l'utilizzo di uno stabilizzatore (RNAlater, Qiagen, addizionato alla saliva al momento del prelievo) in associazione al kit *Rneasy micro kit* (Qiagen), mentre l'altro metodo si era basato sull'utilizzo del kit *MagVet™ Universal Purification Kit* applicato con estrattore automatico *KingFisher* (Thermo Fisher Scientific Inc.). Complessivamente, il primo protocollo applicato alla matrice saliva ha rilevato la presenza di 59 campioni positivi sul totale di 206, mentre il secondo ne ha rilevati 67; sul siero le positività riscontrate sono state 62. I due metodi hanno mostrato *performances* simili. Il secondo protocollo di estrazione ha mostrato una performance migliore poiché ha confermato tutte le positività riscontrate con il primo protocollo e ha rilevato la presenza del genoma virale in un numero più elevato di campioni. Questo studio preliminare conferma che la matrice saliva può essere convenientemente utilizzata per monitorare l'infezione da PRRS e ulteriori approfondimenti metodologici potrebbero migliorarne l'applicabilità.

P.34 MOSQUITO SPECIFIC FLAVIVIRUS RILEVATI IN PIEMONTE E IN LIGURIA NEL CORSO DELLA SORVEGLIANZA ENTOMOLOGICA

Paola Modesto (a), Federica Verna (a), Alessandra Pautasso (a), Danila Francese (a), Andrea Mosca (b), Claudia Boin (a), Francesco Cerutti (a), Paola Gazzuola (a), Lucia Florio (a), Maria Cristina Radaelli (a), Barbara Iulini (a), Marco Ballardini (a), Walter Mignone (a), Simone Peletto (a), Marino Prearo (a), Pier Luigi Acutis (a), Cristina Casalone (a)

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

(b) Istituto per le Piante da Legno e l'Ambiente, IPLA, Torino

Il genere *Flavivirus* include importanti agenti zoonotici trasmessi da vettori artropodi; negli ultimi anni, l'emergenza sanitaria causata da questi patogeni ha spinto diversi paesi a sviluppare piani di sorveglianza entomologica che prevedono la cattura, l'identificazione dei vettori e la ricerca virale tramite tecniche biomolecolari. Sono stati così identificati virus appartenenti a un particolare gruppo di Flavivirus, capaci di replicare solo nelle zanzare, e incapaci di infettare i vertebrati, da cui la denominazione di mosquito specific Flavivirus (MSF): il *cell fusing agent virus* (CFAV), il *Kamiti River virus* (KRV), il *Culex flavivirus* (CxFV), l'*Aedes flavivirus* (AeFV), il *Quang Binh virus*, il *Nakiwogo virus* e il *Calbertado virus*. I MSF si mantengono in natura grazie alla trasmissione verticale negli insetti e potrebbero rappresentare una primordiale forma evolutiva di Flavivirus. Sebbene non rappresentino un pericolo per l'uomo, gli MSF sono di crescente interesse per la possibile interazione nel vettore biologico con i Flavivirus zoonotici. Il presente lavoro riporta l'identificazione e l'analisi filogenetica eseguita su MSF rilevati in Piemonte e Liguria nel corso della sorveglianza entomologica condotta nell'anno 2013. Da luglio a ottobre 2013, sono state posizionate, in siti sono stati selezionati secondo criteri di rischio, 39 trappole (33 in Piemonte, 6 in Liguria) in funzione per 24 ore, con frequenza di campionamento bimensile. Le zanzare, identificate a livello di specie, sono state raggruppate in *pools* di 50 individui, rispettando sito, specie e data di prelievo. L'RNA è stato estratto da ogni *pool*, dopo omogeneizzazione in PBS sterile, con *RNeasy Mini kit* (Qiagen) secondo un protocollo automatizzato su strumento *Qiacube* (Qiagen) e analizzate secondo il metodo descritto da Scaramozzino nel 2001. L'analisi filogenetica è stata eseguita con il software *MrBayes* su un frammento del gene NS5 e utilizzando *jModelTest2* per la selezione del modello di sostituzione nucleotidica. Tra luglio e ottobre 2013 sono stati raccolti ed analizzati 679 *pools* in Piemonte e 112 *pools* in Liguria. La specie più rappresentata è stata *Culex pipiens* (43% in Piemonte, 50% in Liguria), seguita da *Ochlerotatus caspius* (33%) in Piemonte e da *Aedes albopictus* (49%) in Liguria. Sono risultati positivi per MSF 30 *pools* in Piemonte: 13 *Ae. vexans*, 9 *Oc. caspius*, 3 *Ae. albopictus*, 4 *Cx. pipiens*, 1 *Oc. geniculatus*. In Liguria sono stati rilevati due *pools* positivi appartenenti alla specie *Ae. albopictus*. La valutazione e l'elaborazione dei dati sono in corso e i risultati definitivi saranno riportati nel lavoro presentato.

SEQUENZIAMENTO E ANALISI FILOGENETICA DELL'INTERO GENOMA DI CEPPI DI ROTAVIRUS SUINI

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

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

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

I Rotavirus di gruppo A (RVA) sono causa di gastroenterite acuta negli individui giovani di molte specie animali. L'infezione da rotavirus ha un importante impatto economico sul settore agricolo, i suini inoltre possono rappresentare un potenziale serbatoio per la trasmissione zoonotica di rotavirus all'uomo. Per studiare la diversità genetica di ceppi suini di RVA in Italia e individuarne le possibili caratteristiche zoonotiche, 25 campioni fecali provenienti da suini con diarrea, campionati tra il 2009 e il 2010 in tre province del nord Italia, sono stati caratterizzati mediante genotipizzazione delle proteine capsidiche VP7 e VP4 (genotipo G e P) tramite RT-PCR e sequenziamento. Tre campioni sono stati selezionati per effettuare il sequenziamento dell'intero genoma virale e l'analisi filogenetica sugli 11 segmenti. In seguito all'individuazione di ceppi con genotipo T7 del gene NSP3 (identificato per la prima volta in Italia), è stato effettuato anche il sequenziamento dei geni NSP3 di tutti i campioni. La diagnosi di RVA è stata effettuata mediante ELISA e microscopia elettronica. I ceppi analizzati mostravano genotipi G e P tipici di RVA suini (G4, G5, G9; P[6], P[13], P[23]). Il sequenziamento *full-length* degli 11 segmenti del genoma è stato effettuata su tre isolati G9 (genotipo emergente nell'uomo che in molti paesi risulta essere il genotipo principalmente individuato). La maggior parte dei segmenti genici appartenevano alla costellazione di genotipo 1 (*Wa-like*), cui appartengono principalmente i ceppi di RVA isolati nell'uomo, ma sono stati individuati anche genotipi come I5 (VP6) e A8 (NSP1), tipici dei RVA suini e identificati raramente tra i RVA umani. Di particolare interesse è stata l'individuazione di ceppi di RVA con genotipo T7 del gene NSP3. Questo genotipo è stato precedentemente individuato in ceppi di rotavirus insoliti, di possibile origine suina o bovina, isolati da bambini con diarrea. Recenti studi suggeriscono che il genotipo G9 potrebbe essere stato introdotto dal suino nella popolazione umana mediante eventi di riassortimento genico. L'osservazione che alcuni genotipi di RVA isolati nel suino risultano simili ai virus individuati nei bambini, sottolinea l'importanza della sorveglianza dei RVA negli animali al fine di poter chiarire e controllare un possibile loro ruolo di serbatoio genico di ceppi di RVA emergenti patogeni per l'uomo.

LA SORVEGLIANZA SANITARIA NELLE AZIENDE BOVINE GE NEGATIVE MEDIANTE ANALISI SU LATTE DI MASSA

Elvira Muratore (a), Chiara Nogarol (a), Dario Ariello (b), Margherita Profiti (a), Luigi Bertolotti (a), Sergio Rosati (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi, Torino*

(b) *Azienda Sanitaria Locale TO3, Sanità Animale, Torino*

Il mantenimento della qualifica di azienda indenne da Rinotracheite Infettiva Bovina (IBR) rappresenta un costo elevato in termini di risorse umane e materiali, dal momento che tutti gli animali in età diagnostica devono essere sottoposti annualmente ad un esame sierologico individuale. Il test sierologico attualmente utilizzato è di tipo competitivo, il quale non risulta particolarmente sensibile nel caso sia applicato su latte di massa a causa della eccessiva diluizione degli anticorpi nel campione in esame. Per superare questi inconvenienti sono stati sviluppati un protocollo di purificazione/concentrazione delle immunoglobuline IgG da latte ed un test ELISA di tipo indiretto utilizzando la glicoproteina E ricombinante di Bovine Herpesvirus 1 (BoHV1) espressa in un sistema eucariota. La sensibilità analitica del test è stata inizialmente valutata in laboratorio con diluizioni scalari di latte positivo in latte negativo. In tali condizioni il test consente di ottenere un risultato positivo alla diluizione 1:40 (prevalenza teorica intra-allevamento di 2,5%). In condizioni di campo il test è stato applicato su campioni di latte massale provenienti da aziende indenni, ufficialmente indenni e positive, delle quali era noto lo stato sanitario dei singoli animali in lattazione. Fra queste ultime sono risultate positive al test, aziende con prevalenza di infezione negli animali in lattazione superiore al 2,5%. Fra le aziende indenni ed ufficialmente indenni (n=46), una è risultata positiva al test ELISA indiretto dopo la purificazione/concentrazione del campione di latte di massa. Su quest'ultima, i campioni di latte individuale (n=67) hanno evidenziato una singola positività (prevalenza 1,49%), confermata con esame sierologico ufficiale: una vacca di 10 anni, vaccinata con vaccino tradizionale vivo 7 anni prima e mai allontanata dopo la negativizzazione sierologica. Si è trattato verosimilmente di una positività da riattivazione del ceppo vaccinale senza fase escretiva. Il latte di questo animale ha comunque positivizzato il test ELISA e ha consentito di confermare la validità del test in condizioni di campo. Escludendo di conseguenza questo campione, il test proposto ha presentato una specificità diagnostica del 100% (95% CI 92,2%-100%). Il metodo descritto può essere quindi proposto come metodo di *screening* per la sorveglianza delle aziende da latte che hanno ottenuto la qualifica di indennità de IBR, consentendo di svelare circolazioni virali anche di modesta entità. Inoltre, un ulteriore vantaggio presentato da questo approccio, è rappresentato dalla possibilità di intensificare i controlli, aumentando così la precocità del processo diagnostico nel controllo e nella sorveglianza di IBR.

VALUTAZIONE DELLA TRASMISSIONE INTER-SPECIE DI VIRUS INFLUENZALI H3N8 TRAMITE L'UTILIZZO DI ESPIANTI D'ORGANO RESPIRATORI SUINI

Livia Victoria Patrono (a,c), Claudia Zanardello (b), Francesco Bonfante (a), Calogero Terregino (a), Ilaria Capua (a), Pablo Murcia (c)

(a) Dipartimento di Scienze Biomediche Comparative, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

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

(c) MRC, Centre for Virus Research, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Scotland

I virus dell'Influenza A sono virus ad RNA con genoma segmentato appartenenti alla famiglia *Orthomyxoviridae* la cui ecologia si distingue per l'ampio spettro di ospiti e per le frequenti trasmissioni inter-specie. All'inizio degli anni 2000 un virus dell'influenza equina (EIV) appartenente al sottotipo H3N8 ha saltato la barriera di specie e si è stabilito nella popolazione canina dando origine all'influenza canina (CIV). Inoltre, tra il 2004 ed il 2006, due virus H3N8 filogeneticamente correlati all'influenza equina sono stati isolati da maiali in Cina. Il maiale è un ospite molto importante nell'ecologia dei virus influenzali in quanto suscettibile a numerosi virus di diversa origine animale. Per indagare le variazioni del *range* di ospite dei virus influenzali è utile ripercorrere in circostanze controllate ciò che accade in natura. Gli espianti d'organo rappresentano un'alternativa alle sperimentazioni *in vivo*, permettendo di caratterizzare il potenziale replicativo dei virus e riducendo il numero di animali utilizzati a fini sperimentali. Lo scopo del presente lavoro è studiare il tessuto tropismo di virus H3N8 equini appartenenti a diversi periodi evolutivi utilizzando gli espianti d'organo respiratori di suino. Espianti di mucosa nasale, trachea e polmoni sono stati prelevati da suinetti di 6-8 settimane di vita e messi in coltura per 24h. Successivamente, sono stati inoculati con una dose standard di diversi virus H3N8 equini e con un H3N2 suino. A 6, 24, 48, 72 e 96 ore post infezione sono stati prelevati campioni in duplicato per la quantificazione virale, analisi istologiche e di immunoistochimica. Il virus H3N2 suino ha replicato in tutte le colture di tessuto raggiungendo titoli elevati e causando danni istologici simili a quelli osservati *in vivo*. I virus equini più vecchi hanno dimostrato una maggior affinità per i tessuti suini rispetto a virus recenti, raggiungendo il picco di replicazione a 72h post infezione e preferendo le vie respiratorie più profonde. Gli esami istologico ed immunoistochimico hanno confermato i dati virologici rilevando diffuso danno bronchiolare ed elevata presenza di nucleoproteina virale nei polmoni. I dati ottenuti suggeriscono che i determinanti evolutivi giocano un ruolo importante sulle variazioni dello spettro di ospiti dei virus dell'influenza equina.

P.35 EPIDEMIA DI EPATITE A E CONSUMO DI FRUTTI DI BOSCO: CORRELAZIONE TRA CASI UMANI E ALIMENTO IN LOMBARDIA ED EMILIA-ROMAGNA

Enrico Pavoni (a), Chiara Chiapponi (b), Laura Baioni (b), Ilaria Barbieri (a), Bianca Borrini (c), Alba Carola Finarelli (c), Marina Fridel (c), Claudio Gualanduzzi (c), Lucia Nocera (c), Giorgio Varisco (d), Stefano Pongolini (b), Marina Nadia Losio (a)

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

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

(c) Regione Emilia-Romagna, Bologna

(d) Centro di Referenza Nazionale per i Rischi Emergenti in Sicurezza Alimentare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

In Italia, tra gennaio 2013 e febbraio 2014, sono stati notificati 1.463 casi di epatite A di cui 161 confermati come correlati al consumo di frutti di bosco. In totale, tra aprile 2013 (periodo in cui è stata rilevata la prima correlazione tra infezione e consumo di frutti rossi) e aprile 2014, presso l'IZSLER di Brescia sono stati analizzati 493 campioni ufficiali di frutti di bosco surgelati tra cui: 331 mix di frutti di bosco, 62 confezioni di lamponi, 36 di ribes, 21 di fragole, 18 di mirtillo nero e 5 di mirtillo rosso. Di questi, 134 sono pervenuti dalla Regione Emilia-Romagna, 24 dalla Lombardia ed i restanti 315 dal Trentino A.A., Veneto, Toscana, Umbria, Marche, Lazio, Abruzzo e Calabria. Nell'ambito dell'approfondimento epidemiologico del focolaio presente nelle due regioni di competenza dell'IZSLER, 75 campioni di feci provenienti da altrettanti casi umani segnalati di epatite A sono stati esaminati per la ricerca del virus dell'epatite A (HAV) con metodiche biomolecolari. Per le analisi di rilevamento, è stato eseguito un metodo accreditato presso l'IZSLER, basato su una *seminested*-PCR in grado di amplificare la regione genomica maggiormente conservata VP1-VP3. Per le analisi genetiche, i campioni positivi sono stati sottoposti a *nested*-PCR, specifica per la regione variabile VP1/2a ed è stato sequenziato il frammento derivato di 520 nucleotidi. I frammenti sequenziati sono stati allineati con sequenze di HAV presenti in *GenBank* (tra cui la sequenza *outbreak* HAV genotipo IA [KF182323] isolata in feci umane e legata al consumo di frutti di bosco) ed è stata condotta l'analisi genetica. Fra i frutti di bosco, 12/493 (2,4%) sono risultati positivi ad HAV; tuttavia, la caratterizzazione genomica è stata possibile solo per 3 di essi (tutti mix di frutti rossi) altamente correlati (> 99% di identità nucleotidica) alla sequenza *outbreak*. Fra i campioni umani, 61 sono risultati positivi per HAV e di 59 è stato possibile ottenere la sequenza. Del frammento esaminato, in 48/58 campioni la sequenza è risultata identica o altamente correlata alla sequenza *outbreak*. Fra i restanti campioni, 7 appartenevano al genotipo IA *non-outbreak*, 3 al genotipo IIB e 1 al genotipo IIIA. Questi dati indicano che l'83% dei casi umani genotipizzati presso l'IZSLER presenta la sequenza virale *outbreak* o una sequenza ad essa altamente correlata. Inoltre le sequenze di HAV da frutti di bosco sono pressoché identiche ai casi umani rafforzando l'ipotesi che tale alimento sia stato una fonte comune di infezione.

P.36 ASSOCIAZIONE DEI POLIMORFISMI DEL GENE AGER CON LA SUSCETTIBILITÀ ALLA SCRAPIE NELLA CAPRA

Simone Peletto, Claudia Boin, Paola Modesto, Silvia Colussi, Maria Grazia Maniaci, Stefano Turini, Maria Mazza, Pier Luigi Acutis
Centro di Referenza Nazionale per le Encefalopatie Animali, CEA, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Al di là delle note associazioni tra polimorfismi del gene *PRNP* e scrapie, lo studio di possibili correlazioni di altri geni con la malattia è auspicabile. In tal senso, il CEA ha in precedenza identificato un'associazione tra scrapie caprina e un polimorfismo indel del gene *SPRN*, che codifica per la proteina prion-like Shadoo. Nel presente studio è stata indagata la variabilità genetica del gene *Receptor for the Advanced Glycation End Product (AGER)* e le sue implicazioni nella suscettibilità/resistenza alla scrapie della capra. Il gene *AGER* è stato selezionato come gene candidato per il suo ruolo nella malattia di Alzheimer e perché sono dimostrate interazioni tra *AGER* e peptidi prionici in grado di attivare la microglia, amplificando il danno neuronale. Le analisi sono state condotte su 92 capre (29 positive alla scrapie e 63 controlli negativi) da differenti focolai. Due protocolli di PCR in grado di generare frammenti sovrapposti sono stati messi a punto utilizzando *primer* disegnati su sequenze omologhe bovine per amplificare l'intera sequenza del gene *AGER* (~ 3 Kb). Per ogni polimorfismo sono state calcolate le frequenze alleliche e genotipiche e la loro possibile associazione con la scrapie è stata indagata utilizzando il test del Chi-quadrato. L'analisi delle sequenze ha dimostrato la presenza di 10 SNP e di un polimorfismo indel. Due di queste mutazioni sono risultate associate con la suscettibilità alla scrapie. Lo SNP in posizione 416 (A→G) localizzato nella ORF ha dimostrato una frequenza significativamente più alta dell'allele 416-A nei casi rispetto ai controlli ($p=0,029$). Questo risultato è stato confermato anche dall'analisi dei genotipi: i genotipi A/G e A/A sono risultati associati con la positività alla scrapie ($p=0,011$). Inoltre, la delezione di un esanucleotide GTGTGT in posizione 989 è risultata significativamente associata con la scrapie dall'analisi delle frequenze genotipiche ($p=0,020$). L'analisi effettuata sugli alleli ha rivelato solo una tendenza ($p=0,080$), sebbene concordante. Il presente studio dimostra che l'allele 416-A e i genotipi A/G e A/A del gene *AGER* caprino sono correlati alla suscettibilità alla scrapie. Di conseguenza, le capre portatrici dell'allele 416-G sembrano essere a minor rischio di sviluppare la malattia. Inoltre, l'allele GTGTGT-del in posizione 989 è risultato più frequente nella capre positive alla scrapie. I dati ottenuti indicano quindi che il gene *AGER* potrebbe essere utilizzato come *target* ancillare di selezione per il controllo della scrapie. Inoltre, le associazioni identificate supportano l'idea che *AGER* sia coinvolto nel meccanismo di disfunzione neuronale della malattia da prioni.

P.37 DIAGNOSI SIEROLOGICA DI PESTE SUINA AFRICANA: CONFRONTO DELLE *PERFORMANCES* DI TEST IMMUNOENZIMATICI

Stefano Petrini, Carmen Iscaro, Michela Pela, Claudia Pellegrini, Francesco Feliziani
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

La recente evoluzione epidemiologica della Peste Suina Africana (PSA) nell'Est Europa è avvertita come una forte minaccia per l'intero comparto suinicolo e dimostra come questa infezione possa diffondersi superando i confini nazionali degli stati in cui la malattia è presente in forma endemica. In questo scenario, è fondamentale disporre di efficaci strumenti da applicare nei sistemi di sorveglianza. Utili informazioni sullo stato sanitario delle popolazioni *target* possono essere desunte dall'applicazione di test di *screening* di cui è però necessario conoscere le caratteristiche per un uso adeguato e corretto dei risultati da essi ottenuti. In questo ambito, il Centro di Referenza Nazionale per lo Studio delle Malattie da Pestivirus e Asfivirus (CEREP), ha avviato un confronto delle *performances* analitiche di cinque nuovi prodotti ELISA, di cui due recentemente disponibili in commercio, l'ELISA Svanovir® ASF-Ab Combi e l'ELISA Svanovir® ASF-Ab Confirmation (Svanova) e tre prototipi (A, B, C). Per lo studio sono stati utilizzati campioni di siero positivi e negativi per PSA, selezionati tra quelli che compongono la banca sieri del CEREP. Le *performances* di ciascun kit sono state valutate comparandone i risultati con quelli ottenuti con il test di immunoperossidasi (IPT) e con l'ELISA INGEZIM PPA Compac (Ingenasa), che rappresenta il primo prodotto ad essere immesso sul mercato. La concordanza di ciascun test ELISA con l'IPT è stata valutata utilizzando il coefficiente K di Cohen. I risultati ottenuti, hanno evidenziato una sensibilità analitica compresa tra il 48,6% e il 100% per quanto attiene ai prodotti registrati, mentre per quanto riguarda i prototipi sono stati osservati valori compresi tra il 25% e il 43,8%. Per quanto concerne la specificità analitica, i prodotti registrati hanno mostrato valori variabili dal 62,9% al 80,3%, diversamente da quanto accertato per i prototipi che hanno evidenziato valori pari al 100%. I risultati riguardanti la concordanza, hanno mostrato un valore di grado modesto, per quanto attiene al prodotto ELISA Svanovir® ASF-Ab Combi ($K=0,276$) e ai prototipi B ($K=0,252$) e C ($K=0,344$), mentre il prodotto Svanovir® ASF-Ab Confirmation ($K=0,591$) e il prototipo A ($K=0,438$) hanno mostrato un grado di concordanza moderato. L'ELISA INGEZIM PPA Compac ha evidenziato un valore di concordanza eccellente ($K=0,875$). Sulla base dei risultati ottenuti, si può concludere che i prodotti saggiati, hanno generato *performances* inferiori rispetto sia all'IPT che all'ELISA INGEZIM PPA Compac.

P.38 INDAGINI VIROLOGICHE E SIEROLOGICHE EFFETTUATE SU CINGHIALI CACCIATI NELLA REGIONE UMBRIA

Stefano Petrini, Carmen Iscaro, Elisabetta Rossi, Carmen Panzieri, Claudia Torresi, Andrea Antolini, Francesco Feliziani

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

La popolazione di cinghiali in Italia, come nel resto d'Europa, è in continua crescita e questa tendenza, oramai consolidatasi negli anni, porta in evidenza anche problematiche di tipo sanitario. Purtroppo, spesso non è possibile effettuare studi *ad hoc* per conoscere lo stato di salute di questi animali. Pertanto, basandosi su campioni collezionati nell'ambito di altri progetti di ricerca, sono state condotte indagini virologiche e sierologiche su 81 cinghiali cacciati nella Provincia di Perugia durante la stagione venatoria 2012, al fine di verificare la presenza dei virus più comunemente associati alla patologia suina. Allo scopo sono stati presi in considerazione campioni d'organo (tonsilla palatina, polmone, intestino, fegato, rene, milza) e di siero per allestire rispettivamente prove virologiche e sierologiche. Per quanto attiene alle ricerche virali, i campioni sono stati seminati su diverse linee di colture cellulari recettive ai seguenti virus: Influenza suina (SIV); virus erpetico del suino tipo 1 (SuHV-1), Circovirus suino tipo 2 (PCV-2), virus della sindrome respiratoria e riproduttiva del suino (PRRSV). Gli isolamenti virali, sono stati poi confermati attraverso la prova di immunofluorescenza, utilizzando sieri coniugati con isotiocianato di fluoresceina disponibili in commercio. Le indagini sierologiche sono state eseguite utilizzando test ELISA commerciali nei confronti del SuHV-1, PCV-2 e PRRSV mentre, per quanto riguarda il SIV, è stata allestita la prova di inibizione dell'emoagglutinazione virale (IHA). I risultati virologici, hanno evidenziato il 19,7% di positività nei confronti del PRRSV e l'81,4% nei confronti di PCV-2, mentre il tentativo di isolamento virale nei confronti del SuHV-1 e del SIV ha fornito esiti negativi da tutti i campioni. Diversamente, i risultati sierologici, hanno mostrato una positività del 11,1% riferita al PRRSV, del 49,3% per PCV-2 e del 33,3% nei confronti di SuHV-1. Per quanto concerne il SIV, sono state accertate positività pari a 80,2%, 12,3% e di 45,6% rispettivamente nei confronti dei sottotipi H1N1, H1N2 e H3N2. I risultati di questo studio confermano la circolazione dei virus più comunemente diffusi nel suino domestico anche nei suidi selvatici. In particolare, si nota un'elevata diffusione del virus dell'influenza suina con un peculiare riferimento al sottotipo H1N1. Rimane ancora da indagare il ruolo che il cinghiale può rivestire nell'epidemiologia delle principali infezioni del suino.

P.39 COMPARAZIONE DI TRE SAGGI ELISA *HOME-MADE* PER LA RILEVAZIONE DI ANTICORPI ANTI-HEV NEI SUINI IN CONDIZIONI DI CAMPO

Giulia Pezzoni, Antonino Caminiti, Lidia Stercoli, Giorgio Galletti, Emiliana Brocchi
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

Il virus dell'Epatite E (HEV) è responsabile di epatiti acute nell'uomo. Il genoma è costituito da un filamento di RNA positivo ed è organizzato in tre *Open Reading Frame* (ORF). La ORF2, che codifica per la proteina capsidica, è considerata la maggior componente immunogena del virus. Sono noti quattro genotipi, di cui il 3 ed il 4 sono stati isolati dall'uomo, dal suino e da altre specie animali. L'infezione da HEV è una zoonosi, e vi sono numerose evidenze di trasmissione attraverso l'assunzione di carni crude contaminate. Lo scopo del nostro studio è stato lo sviluppo ed il confronto delle *performance* di tre ELISA *home-made* per la rilevazione di anticorpi anti-HEV nei suini. I tre saggi fanno uso di Anticorpi Monoclonali (AcM) ed antigeni ricombinanti. L'ELISA 1 e 2 sono di tipo indiretto, ed entrambe utilizzano l'AcM anti-IgG suine 4B6, marcato con perossidasi, per il rilevamento degli anticorpi suini. L'ELISA 3 è di tipo competitivo ed utilizza l'AcM anti-HEV 4E12 come competitore dei sieri in esame per il legame all'antigene: per questa caratteristica l'ELISA 3 rileva anticorpi anti-HEV indipendentemente dalla specie. Rispetto agli antigeni, nell'ELISA 1 è utilizzato l'antigene ricombinante corrispondente alla porzione C-terminale 394aa-660aa della ORF2 prodotto in *E.coli*, direttamente adsorbito, mentre nell'ELISA 2 e 3 la porzione della ORF2 112aa-608aa espressa in *baculovirus* è catturata dall'AcM anti-HEV 4E12. Sono stati esaminati un totale di 779 sieri di suini allevati in 27 aziende. Data l'indisponibilità di un *gold standard*, l'accuratezza dei tre saggi è stata valutata mediante un approccio Bayesiano a classi latenti ed una regressione logistica ad effetti misti (per considerare l'effetto dovuto al raggruppamento dei suini negli allevamenti). I risultati hanno mostrato che i tre test hanno un valore diagnostico simile in termini di sensibilità (mediana della distribuzione a posteriori dall'89% al 94%, ed intervalli di credibilità al 95% (IC 95%) tutti sovrapposti). In termini di specificità, l'ELISA 1 è risultata di poco superiore all'ELISA 3 (mediana ELISA 1: 99%, IC 95%: 98-100%; ELISA 3: 90%, 95%, IC 95%: 86-94%). Tuttavia, questa differenza potrebbe essere dovuta al più ampio spettro di anticorpi (IgG ed IgM) che l'ELISA 3 può rilevare. I nostri risultati suggeriscono che i tre saggi sono strumenti utili per la rilevazione e la gestione dell'infezione da HEV in campo. Tutti i test ELISA sviluppati beneficiano dell'utilizzo di reagenti riproducibili (MAbs e antigeni ricombinanti) i quali rendono le analisi altamente standardizzabili.

P.40 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI UN CEPPO DI VIRUS DELLA FEBBRE DELLA VALLE DEL RIFT

Chiara Pinoni (a), Andrea Polci (a), Umberto Molini (b), Adrianatus Maseke (b), Massimo Scacchia (a), Federica Monaco (a)

(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise G. Caporale, Teramo*

(b) *Central Veterinary Laboratory, CVL, Windhoek, Namibia*

La Febbre della Valle del Rift (RVF) è una malattia zoonotica ad eziologia virale dei ruminanti e di altre specie di animali domestici e selvatici. Negli animali domestici, la forma clinica è condizionata dall'età degli animali colpiti con un'elevata mortalità nei giovani e forme abortive negli animali gravidi. Il virus è trasmesso principalmente da zanzare del genere *Aedes* e *Culex*, tuttavia è documentata la trasmissione diretta attraverso il contatto con organi di animali viremici o aerosol. L'agente eziologico è un Phlebovirus appartenente alla famiglia *Bunyaviridae* con un genoma composto da un singolo filamento di RNA tripartito: il segmento L (*Large*) codifica per la RNA polimerasi virale, il segmento M (*Medium*) per le glicoproteine dell'envelope Gn e Gc e il segmento S (*Small*) per la nucleoproteina Np e per una proteina non strutturale Ns, principale fattore di virulenza. Obiettivo del lavoro è la caratterizzazione molecolare e funzionale di un ceppo di campo di RVF isolato nel corso di un focolaio verificatosi in Namibia nel 2010. Dall'isolato è stato estratto l'acido nucleico virale, amplificato in RT-PCR e sequenziato l'intero genoma virale. Tutte le operazioni descritte sono state eseguite nel rispetto delle condizioni di biosicurezza necessarie alla manipolazione del virus della RVF. Le sequenze dei tre segmenti genomici sono state confrontate con le rispettive sequenze presenti in banca dati e utilizzate per analisi filogenetiche, di caratterizzazione molecolare e funzionale. Il ceppo Namibia 2010 è risultato essere filogeneticamente vicino ad un ceppo umano isolato in Namibia nel 2004 ed appartenente al *lineage* H. La topologia degli alberi ottenuti utilizzando ciascuno dei tre segmenti genomici è risultata sovrapponibile escludendo fenomeni di riassortimento tra virus diversi. I risultati confermano la variabilità genetica estremamente limitata del RVFV nonostante l'ampia dispersione geografica. Tale conservazione potrebbe essere ricondotta a vincoli funzionali dettati dalla necessità di infettare ospiti diversi, che si riflettono a livello genomico limitando l'evoluzione dalle glicoproteine di superficie, dall'RNA polimerasi virale e dalla proteina NSs. Le caratteristiche epidemiologiche del virus, l'aumento della movimentazione di animali e merci su scala globale, i cambiamenti climatici in grado di influenzare le dinamiche delle popolazioni vettoriali, sono alcuni dei fattori in grado di aumentare il rischio di diffusione della RVFV al di fuori delle aree endemiche. In questo quadro si colloca l'importanza di collezionare nuovi ceppi, sequenziarli ed affinare l'analisi filogenetica al fine di ottenere informazioni sempre aggiornate ed utili allo sviluppo di test diagnostici, vaccini e farmaci antivirali.

P.41 CARATTERIZZAZIONE DI *FRINGILLA COELEBS* PAPILOMAVIRUS IDENTIFICATO IN ITALIA

Alice Prospero (a), Laura Gallina (b), Giovanni Casà (b), Federica Savini (b), Mario Chiari (a), Giovanni Loris Alborali (a), Alessandra Scagliarini (b), Antonio Lavazza (a)

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

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

Il *Fringilla coelebs* Papillomavirus (FcPV) appartiene alla famiglia delle *Papillomaviridae*, che comprende diverse specie in grado di infettare sia l'uomo che gli animali, dando luogo a lesioni epiteliali proliferative, solitamente autolimitanti e che spesso esitano in regressione spontanea. Ad oggi sono state isolate solo quattro specie di papillomavirus aviari: *Fringilla coelebs* papillomavirus (FcPV), *Psittacus erithacus* papillomavirus (PePV), *Francolinus leucoscepus* papillomavirus (FIPV) e il non ancora classificato *Pygoscelis adeliae* papillomavirus 1 (PaCV1). I papillomavirus hanno virioni sferici, con diametro tra 55 e 60 nm, privi di envelope e presentano morfologia costante indipendentemente dal sito e dal tipo delle lesioni. Sono caratterizzati da un genoma circolare dsDNA di circa 8.000 bp, che nei papillomavirus aviari codifica per sei proteine precoci (E1, E2, E4, E6, E7, E9) e due tardive (L1, L2). L'incidenza di questa malattia è solitamente abbastanza ridotta (1,3% nella popolazione), anche se, quando entra in un gruppo, tende ad infettare la maggior parte dei soggetti. Dal punto di vista clinico le lesioni cutanee indotte da FcPV si presentano come papillomi squamosi, prevalentemente a carico del piede e del tarso-metatarso. Le prime segnalazioni di lesioni riferibili a papillomavirus in fringuelli e peppole risalgono al 1969, ma ad oggi sono disponibili un numero limitato di dati relativi al genoma di questi virus ed in particolare non vi sono segnalazioni in bibliografia riguardo ceppi responsabili di infezioni in Italia. Il nostro lavoro, svolto partendo da campioni di fringuelli e peppole pervenuti al servizio di diagnostica dell'IZSLER, è stato incentrato sulla ricerca di particelle virali riferibili a papillomavirus mediante microscopia elettronica e sulla successiva caratterizzazione del genoma virale. Il DNA genomico circolare di FcPV è stato amplificato mediante RCA (*Rolling Circle Amplification*) ed in seguito analizzato mediante taglio enzimatico. I frammenti ottenuti sono stati in seguito clonati e quindi sequenziati. La regione che comprende i geni E1, E2 ed E7, del FcPV isolato in Italia, ha mostrato un'elevata percentuale d'identità rispetto all'unica sequenza disponibile in banca dati e riferita ad un ceppo virale isolato in USA.

P.42 WEST NILE DISEASE IN SARDEGNA NEL 2013: RISULTATI DELLA SORVEGLIANZA ENTOMOLOGICA

Giantonella Puggioni (a), Renata Rossi (a), Angela Maria Rocchigiani (a), Cipriano Foxi (a), Sandro Rolesu (a), Stefano Cappai (a), Giorgio Meloni (a), Gino Vento (a), Maria Goffredo (b), Ottavio Portanti (b), Federica Monaco (b), Giovanni Savini (b), Giuseppe Satta (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo

La *West Nile Disease* (WND) è una zoonosi causata da un arbovirus, trasmessa da zanzare, che può causare forme di meningo-encefalite negli uccelli, negli equidi e nell'uomo. In seguito al focolaio verificatosi in Toscana nel 1998, il Ministero della Salute dal 2002 ha attivato il Piano Nazionale di Sorveglianza per la WND. In Sardegna la WND è comparsa per la prima volta a fine estate 2011 con casi clinici in cavalli, avifauna e uomo. Il lavoro presenta i risultati della sorveglianza entomologica per West Nile Virus (WNV) in Sardegna nel 2013. Tale sorveglianza è stata effettuata con lo scopo di definire le specie di culicidi maggiormente competenti, individuare il periodo dell'anno di maggior abbondanza, valutare l'overwintering dei culicidi e del virus nelle specie di zanzare. Il territorio regionale è stato diviso in due aree: Area a Circolazione Virale (ACV) comprendente il territorio in cui negli anni passati è stata rilevata circolazione virale, e Area Esterna (AE) comprendente tutto il territorio regionale non incluso nell'ACV. Nell'area ACV sono state individuate 10 aziende nelle quali le zanzare sono state catturate con le trappole: a) CDC Light Trap, b) BG Sentinel e c) Gravid Trap. Nelle 25 aziende individuate nell'AE sono state utilizzate le trappole CDC Light Trap e BG Sentinel. Le catture sono state eseguite per tutto il 2013 a cadenza mensile, per due giorni e due notti consecutive. Le zanzare catturate sono state distinte in base alla specie, al sesso, e le femmine, a loro volta, secondo la presenza (ingorgate) o assenza del pasto di sangue nell'addome. Per ciascuna delle tre categorie sono stati creati *pool* composti da un massimo di 50 individui distinti per località e data di cattura. La presenza del virus negli insetti è stata accertata mediante saggio *real-time* RT-PCR che consente l'identificazione simultanea dei *lineage 1* e *2* mediante l'amplificazione di una regione comune NS2A. I campioni positivi sono stati in seguito testati mediante *real-time* RT-PCR specifiche per determinare il *lineage* di appartenenza. Nel 2013, sono state complessivamente effettuate 824 catture con la presenza di 9.808 culicidi (1.015 *pool*) appartenenti a 17 specie. *Culex pipiens*, con il 33% dei culicidi catturati, e *Ochlerotatus caspius*, con il 24%, sono state le specie più frequentemente rilevate. *Culex pipiens* è stata presente tutto l'anno con popolazioni abbondanti da aprile ad ottobre e un picco nel mese di giugno. *Ochlerotatus caspius* è risultata assente solo nei mesi di gennaio e febbraio con un picco di abbondanza nel mese di luglio. L'analisi biomolecolare effettuata sui 1.015 *pool* per rilevare WNV, ha evidenziato la presenza del virus, identificato come appartenente al *lineage 2*, in due *pool* di zanzare catturate dalla CDC Light Trap nel comune di Olbia. Entrambi i *pool* positivi erano costituiti da femmine non ingorgate appartenenti alla specie *Cx. pipiens*. Il primo era composto da 7 esemplari catturati la prima settimana di settembre e il secondo da 2 femmine catturate la seconda settimana di ottobre. Le indagini confermano l'importante ruolo epidemiologico rivestito dal *Cx. pipiens* nel trasmettere e diffondere WNV in Sardegna.

P.43 MONITORAGGIO DELLO STATO SANITARIO DELL' AVIFAUNA MIGRATORIA IN PIEMONTE

Maria Cristina Radaelli (a), Francesca Rizzo (a), Mauro Giammarino (b), Simona Zoppi (a),
Alessandro Dondo (a), Rosaria Possidente (a), Maria Lucia Mandola (a), Laura Chiavacci (a)

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

(b) Dipartimento di Prevenzione, Azienda Sanitaria Locale CNI, Fossano, Cuneo

L'avifauna migratoria è un importante *reservoir* nella trasmissione di infezioni, causa di ingenti danni negli allevamenti avicoli, e potenziale minaccia per la salute pubblica. Durante la migrazione gli uccelli sfruttano le numerose aree umide piemontesi per una sosta temporanea o la nidificazione. Per individuare precocemente l'introduzione di patogeni, nel 2013 è stato adottato in Piemonte un piano di monitoraggio dell'avifauna migratoria e svernante. Sono state selezionate alcune delle principali aree umide, dove i prelievi sono stati eseguiti contestualmente a sessioni di inanellamento. In questi siti sono stati sottoposti alle indagini anche animali provenienti da abbattimenti selettivi o rinvenuti morti. I principali agenti ricercati sono stati Orthomyxovirus, Paramyxovirus, Flavivirus e clamidie nei soggetti vivi; sulle carcasse sono state approfondite le cause di mortalità. Gli *screening* sono stati effettuati con *real-time* RT-PCR per la rilevazione del gene M di Influenza tipo A e di Newcastle Disease, e una *real-time* PCR per il gene dell' rRNA 23S delle clamidie. Per la ricerca di arbovirus è stata utilizzata una PCR *end point* per il gene NS5 del genere *Flavivirus*. Negli animali sottoposti a necropsia sono sempre stati ricercati *Campylobacter* e *Salmonella spp.* Le analisi di tipizzazione sui campioni positivi hanno previsto *real-time* RT-PCR *one-step* per il gene delle proteine H5, H7, H9 dell'Influenza aviare, una *real-time* PCR per il gene ompA di *Chlamydia psittaci* e il sequenziamento del frammento NS5 per l'identificazione della specie *Flavivirus*. Le conferme di positività sono state effettuate dai rispettivi Centri di Referenza. Da marzo 2013 a marzo 2014 sono stati testati soggetti di specie migratorie sia su lunga che su breve distanza per un totale di 455 uccelli, provenienti da 12 differenti siti. Sono state rilevate positività per *C. psittaci* in una cinciallegra, influenza aviare (non H5, H7, H9) in quattro germani reali (di cui uno oggetto di ricattura), Paramyxovirus aviare genogruppo 6 in un germano reale e Chlamydiaceae atipiche in 7 germani reali. Il campionamento ha compreso siti eterogenei, caratterizzanti della composita realtà geografica piemontese (zone umide, territori fluviali, parchi cittadini, periurbani o di vasta estensione, riserve naturali e aree di risaia). Bisogna anche sottolineare la varietà delle specie aviarie campionate: migratori sulle lunghe distanze e tipologie dai movimenti a breve raggio. Sebbene non si possano escludere altri siti di importazione dei patogeni oggetti di questo studio sul territorio regionale, le informazioni ottenute hanno fornito una buona valenza descrittiva della condizione sanitaria dell'avifauna migratoria ospitata in Piemonte.

P.44 MONITORAGGIO SIEROLOGICO DEI CINGHIALI (SUS SCROFA) ABBATTUTI NELLE PROVINCE DI GENOVA E LA SPEZIA

Elisabetta Razzuoli (a), Fabrizio Lazzara (a), Laura Migone (a), Massimo Gennari (a), Danja Rubini (a), Marialaura Giunta (a), Guendalina Vito (a), Laura Serracca (b), Carlo Ercolini (b), Gian Mario De Mia (c), Maria Silvia Gennero (d), Angelo Ferrari (a)

(a) *Laboratorio di Diagnostica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Genova*

(b) *Laboratorio di Diagnostica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, La Spezia*

(c) *Centro di Riferenza Nazionale per lo Studio delle Malattie da Pestivirus e da Asfvirus, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia*

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

Nell'arco dell'ultimo decennio la popolazione dei cinghiali presenti sul territorio ligure è passata da poche migliaia di capi ad oltre 30.000 soggetti. L'alta densità di popolazione può determinare problemi sia di tipo ecologico che sanitario; infatti il cinghiale può fungere da serbatoio per importanti malattie che possono colpire l'uomo ed altri mammiferi quali i suini. In quest'ambito, risultano di particolare interesse la Malattia di Aujeszky (ADV), la Malattia Vescicolare (MVS) e la Peste Suina Classica (PSC). Tuttavia, sono disponibili pochi dati sulla prevalenza di queste patologie nella popolazione di cinghiali presente nelle province di Genova e La Spezia. Con lo scopo di colmare tali lacune è stato predisposto un piano di monitoraggio biennale (2013/2014-2014/2015) delle suddette malattie; il presente lavoro riporta i risultati ottenuti durante la stagione venatoria 2013/2014. In totale sono stati raccolti 472 campioni provenienti da cinghiali cacciati nelle Province di Genova (420) e La Spezia (52). Sui campioni è stata valutata mediante ELISA la presenza di anticorpi (Ab) anti-MVS, ADV e Pestivirus; i sieri risultati positivi a quest'ultimo test sono stati sottoposti a sieroneutralizzazione per verificare la presenza di Ab anti-PSCV. In nessuno dei sieri esaminati è stata rilevata la presenza di Ab anti-MVS, mentre il 4,8% è risultato positivo alla ricerca di Pestivirus; tuttavia non è stata evidenziata la presenza di Ab anti-PSCV. La prevalenza sierologica per PSC e MVS rilevata è in accordo con quella ottenuta nei piani di monitoraggio di Piemonte, Toscana ed Emilia-Romagna e permette di escludere la circolazione del virus tra i suidi selvatici del territorio provinciale. Per quanto concerne l'ADV, la sieroprevalenza nelle province di La Spezia e Genova è risultata rispettivamente del 21,1% e 35,9%; tale differenza è statisticamente significativa ($P < 0,05$; test chi-quadrato) ed indica una maggior circolazione del virus in quest'ultima provincia. In particolare, nella Provincia di Genova si assiste ad un graduale aumento ($P < 0,05$; test chi-quadrato) della positività sierologica da ovest verso est con picchi nelle aree a confine con la Provincia di Parma (45% Sturla, 42,3% Aveto). Tali dati sono in accordo con i risultati ottenuti sia in piani

di monitoraggio europei che in quelli di alcune regioni italiane e confermano la circolazione del virus sul territorio ligure, evidenziando il rischio d'infezione per le specie recettive (es. cani, suini) che possono venire a contatto con gli animali infetti.

P.45 AGENTI PATOGENI EMERGENTI IN VOLATILI SELVATICI: RISCONTRI NEL TERRITORIO LIGURE

Francesca Rizzo (a), Walter Mignone (a), Giusy Niosi (a), Riccardo Orusa (a), Nadia Vicari (b), Simone Peletto (a), Francesco Cerutti (a), Federica Monaco (c), Giovanni Savini (c), Maria Lucia Mandola (a)

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

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

(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise, Teramo*

La Regione Liguria, affacciata sul Mar Tirreno, è una zona a rischio elevato per l'introduzione, da parte di volatili migratori, di agenti zoonotici emergenti, sia di natura virale che batterica. Nel corso della migrazione autunnale, uccelli acquatici migratori a lungo raggio, a partire dalla Finlandia e lungo le direttrici di volo del Paleartico occidentale, attraversano Paesi Bassi, nord ovest Italia e Sardegna, fino a raggiungere le aree di svernamento del Nord Africa; nel periodo primaverile si assiste, invece, ad una inversione del flusso migratorio a partire dalle aree africane. In entrambi i casi, le coste liguri rappresentano, per molti di essi, aree di rifugio e sosta temporanea. Il presente lavoro espone i risultati della sorveglianza passiva realizzata in Liguria, con la collaborazione dei Servizi Veterinari della Provincia di Imperia, su volatili selvatici trovati malati, feriti o morti dal 2011 a oggi. Nel corso dello studio 188 esemplari, appartenenti a quindici Ordini aviari, sono stati raccolti e sottoposti a visita autoptica e analisi biomolecolari. Gli acidi nucleici estratti dai tessuti, quali Sistema Nervoso Centrale (SNC), cuore, fegato, reni, polmone e intestino, sono stati amplificati con metodiche *real-time* PCR per la ricerca di Influenza tipo A, Newcastle virus e Chlamydiaceae. Al fine di rilevare eventuali infezioni da flavivirus nei volatili, è stata utilizzata una PCR classica specifica per una porzione della regione NS5 di Flavivirus. Sono state riscontrate positività per *C. psittaci* in una tortora e per clamidia atipica in gabbiani reali e fenicottero; un altro gabbiano reale è risultato infetto dal sottotipo influenzale aviario H13N2. I virus influenzali a bassa patogenicità sono comuni in molte specie di Caradriformi, mentre, per quanto ne sappiamo, questo è il primo riscontro di clamidie atipiche in gabbiano reale e fenicottero. Nel mese di maggio 2013 un lodolaio (*Falco subbuteo*), specie migratrice a lungo raggio, viene trovato morente in territorio collinare in Provincia di Imperia; l'animale muore poco dopo presso il Centro di Recupero di Sanremo. L'autopsia evidenzia cachessia e edemi discrasici. Le analisi di sequenza del frammento NS5 di Flavivirus, ottenuto in PCR, rilevano la presenza di materiale genetico riconducibile a West Nile virus (WNV), *Lineage 1*, nel rene e nel SNC. La successiva analisi filogeografica, realizzata su un frammento di 400 bp del *polyprotein* gene di WNV, ha collocato il ceppo nel Kenyan/Western Mediterranean *clade*, comprendente la maggior parte delle sequenze dell'Europa occidentale e Nord Africane. Il rilevamento di WNV nei tessuti del lodolaio conferma l'importante ruolo giocato dagli uccelli migratori nella diffusione di WNV e, più in generale, dei flavivirus in Europa e nel bacino del mediterraneo. L'Italia, rifugio e sosta temporanea di molte specie di uccelli migratori, ne risulta esposta in maniera continuativa.

P.46 STUDIO DEI SITI DI GLICOSILAZIONE DELLA GP51 DEL VIRUS DELLA LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA

Giorgia Rizzo, Katia Forti, Anna Serroni, Sara Baglivo, Valentina Zingarelli, Giovanna Ferrante, Monica Cagiola, Antonio De Giuseppe
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Il Virus della Leucosi Bovina (BLV), l'agente eziologico della Leucosi Enzoistica Bovina (LEB), è un *Retrovirus* della famiglia dei *Retroviridae*, genere *Deltaretrovirus*. Esso comprende agenti in grado di causare forme tumorali nei mammiferi, negli uccelli e nei rettili. Il genoma del BLV è un trascritto di RNA di circa 9 Kb che contiene geni regolatori e geni strutturali (*gag-pol-env*) necessari alla sintesi delle particelle virali. Le glicoproteine dell'*env* gp51 e gp30 sono prodotte a seguito di un processo proteolitico, mediato da una proteasi cellulare, di un unico precursore di 72 KDa (gp72). La gp30, una proteina transmembrana, media la fusione tra la membrana virale e cellulare durante il processo di infettività. La gp51, definita come glicoproteina di superficie e legata alla gp30 tramite un ponte disolfuro, è responsabile dell'interazione tra la particella virale e il recettore cellulare. La gp51 è la proteina dotata di maggior potere immunogeno negli animali infettati con il BLV ed è in grado di indurre una risposta anticorpale, precoce e neutralizzante. Precedenti studi hanno evidenziato che le proprietà antigeniche e conformazionali della gp51 richiedono una proteina nativa e glicosilata. Sebbene le caratteristiche topografiche e strutturali della gp51 sono state ben determinate, rimane ancora da chiarire, in termini funzionali e strutturali, il ruolo della frazione oligosaccaridica della stessa. La gp51 possiede infatti, otto putativi *consensus* NXT/S di glicosilazione dei quali due localizzati nella regione Amino-terminale e sei nella parte Carbossi-terminale. Attraverso la tecnica della mutagenesi-sito specifica, le asparagine (N) appartenenti a tali potenziali siti di glicosilazione sono state mutagenizzate in alanine (A). Una serie di costrutti, codificanti per la gp51 e relativi mutanti (A67, A129, A230, A203, A251, A256, A271, A287), sono stati così generati e trasfettati in cellule BHK-21. I prodotti d'espressione sono stati analizzati tramite test Elisa e *Western blot*. Lo studio ha evidenziato che tutti i residui amminoacidici di N sono glicosilati ad eccezione della N67; inoltre i risultati sperimentali hanno dimostrato che la frazione glicidica associata alla N96 è essenziale per la conformazione e la reattività della gp51. I siti posti nella regione Carbossi-terminale, invece, non sembrano essere coinvolti nella determinazione delle caratteristiche immunogeniche, nonostante presentano un elevato grado di glicosilazione. Questi risultati meritano ulteriori approfondimenti al fine di stabilire se queste frazioni oligosaccaridiche, in particolare quelle relative ai siti della regione Carbossi-terminale, potrebbero essere coinvolte nel processo di infettività e/o di maturazione dell'*env* virale senza escludere un possibile meccanismo di virus *escape*.

P.47 INDAGINI VIROLOGICHE ED ISTO-PATOLOGICHE SU UN CASO DI FEBBRE CATARRALE MALIGNA IN SARDEGNA

Angela Maria Rocchigiani (a), Davide Pintus (a), Giovanni Antonio Carboni (a), Elisabetta Coradduzza (a), Maria Giovanna Cancedda (a), Loretta Demartis (a), Paola Marcello (b), Ciriaco Ligios (a), Giantonella Puggioni (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

(b) Unità Sanitaria Locale n.1, Sassari

La febbre catarrale maligna (MCF) è una virosi dei ruminanti domestici e selvatici ed è causata da Ovine Herpesvirus type 2 (OvHv2) e da Alcelaphine Herpesvirus type 1 (AIHV-1) appartenenti al genere *Rhadinovirus*. OvHv2 determina sintomatologia clinica, ad esito spesso letale, nei bovini e nei cervi tenuti in cattività, mentre altre specie, tra cui la pecora, il muflone e la capra si infettano in maniera asintomatica ed agiscono come *reservoir*. In Sardegna, escludendo una segnalazione nel 2010 su base sierologica, MCF non risulta mai essere stata segnalata da un punto di vista clinico e virologico. In questo studio sono riportati gli aspetti clinici, virologici ed istopatologici osservati in un caso di MCF diagnosticato in un vitello allevato in Sardegna. All'esame clinico l'animale si presentava in stato cachettico con cherato-congiuntivite, esoftalmia, scialorrea, trisma mandibolare e iperemia ed erosioni a livello della mucosa gengivale. Vista l'irreversibilità della sintomatologia, l'animale è stato sacrificato e sottoposto ad esame autoptico con prelievo di cervello, rene, fegato, polmone, intestino e timo. Tali organi sono stati suddivisi in due aliquote di cui una fissata in formalina al 10% per gli esami istopatologici e l'altra utilizzata per le analisi batteriologiche e virologiche. I campioni sono stati analizzati per la ricerca di BVDV e BHV1 con tecniche di immunofluorescenza e biomolecolari, BRSV e PI3 con tecniche di immunofluorescenza diretta, BT mediante *real-time* RT-PCR. La ricerca virologica specifica per OvHV-2 è stata effettuata con tecniche biomolecolari *real-time* PCR (kit del commercio LSI), *real-time* PCR. Macroscopicamente è stata riscontrata una degenerazione epato-renale ed una enterite catarrale-emorragica. L'esame istologico ha evidenziato in tutti gli organi un quadro lesivo indicativo di MCF. Gli aspetti salienti riscontrati sono stati una vasculite fibrinoide-necrotizzante generalizzata con un'infiltrazione di cellule mononucleate soprattutto a livello cerebrale, del glomerulo renale, dello spazio portale epatico ed infine a carico dei vasi della sottomucosa intestinale. Le indagini batteriologiche hanno messo in evidenza la presenza di *Pasteurella* sp. nel polmone. Le indagini virologiche hanno messo in evidenza esclusivamente una positività per OvHv2 in tutti gli organi esaminati. L'amplificato è stato sequenziato con metodo Sanger per la verifica della sua specificità e clonato con *TA Cloning Kit* (Invitrogen, Life Technologies) per il suo utilizzo come controllo positivo. Considerata la diffusione delle caratteristiche lesioni microscopiche e l'elevata carica virale riscontrata in tutti gli organi esaminati, l'esame istologico e la *real-time* PCR risultano essere strumenti ottimali per la diagnosi di conferma di MCF nei casi clinici sospetti.

P.48 IL PAPILOMA VIRUS BOVINO TIPO 13, UN NUOVO DELTAPAPILOMAVIRUS, NELLE INFEZIONI VESCICALI DEL BOVINO

Sante Roperto (a), Valeria Russo (b), Manuela Martano (b), Leonardo Leonardi (c), Marita Georgia Riccardi (b), Franco Roperto (d)

(a) *Settore Malattie Infettive, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi Federico II, Napoli*

(b) *Settore Patologia Generale, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi Federico II, Napoli*

(c) *Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Perugia*

(d) *Dipartimento di Biologia, Università degli Studi Federico II, Napoli*

I Papillomavirus sono virus oncogeni specie-specifici, a DNA e con uno spiccato epiteliotropismo. Il ciclo biologico del virus appare strettamente correlato con il ciclo cellulare delle cellule epiteliali. I papillomavirus sono patogeni sia per l'uomo che per gli animali domestici e selvatici. In Medicina Veterinaria, il bovino appare maggiormente interessato all'infezione da papillomavirus (BPVs). In questa specie sono stati identificati 13 papillomavirus che si rendono responsabili prevalentemente di tumori cutanei, esofagei ed uroteliali. I papillomavirus bovini sono classificati in tre generi: a) *Deltapapillomavirus* (BPV-1, BPV-2, BPV-13); b) *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 e BPV-8); c) *Xipapillomavirus* (BPV-3, BPV-4, BPV-5, BPV-9, BPV-10, BPV-11, BPV-12). Il BPV-7 non è stato ancora assegnato, ma è stato proposto il genere *Dyoxipapillomavirus*. I Deltapapillomavirus sono gli unici papillomavirus che manifestano anche uno spiccato tropismo per le cellule mesenchimali e si caratterizzano per esprimere una forte patogenicità anche in altre specie. Sono, infatti, associati con sarcoidi equini, con tumori uroteliali del bufalo, nonché con tumori cutanei in antilopi, giraffe, leoni africani etc. Il BPV-13 è il più recente virus ad essere stato identificato in un fibropapilloma cutaneo in un bovino ed in due sarcoidi equini. Da un punto di vista epidemiologico, finora la sua presenza è limitata in alcune zone del Brasile. Noi descriviamo in 28 tumori uroteliali di bovini podolici, alimentati con felce e/o con alimenti contaminati con felce, la presenza del BPV-13. È la prima segnalazione di questo virus in Europa ed il nostro studio dimostra che il virus è oncogeno anche per le cellule uroteliali, dimostrando un tropismo ed una potenziale infettività sovrapponibile agli altri due meglio conosciuti Deltapapillomavirus. I campioni di vescica sono stati prelevati in macelli pubblici e privati da animali regolarmente macellati come previsto dalla normativa vigente. Una parte è stata fissata in formalina sulla quale è stata formulata la diagnosi istologica dopo aver preparato i campioni secondo le procedure routinarie. Una parte è stata conservata in ghiaccio secco ed in RNA later per le analisi molecolari. La diagnosi molecolare, circa la presenza del virus, è stata fatta amplificando e sequenziando frammenti di DNA corrispondenti alle regioni di L1 (288 bp) ed E5 (153 bp) del BPV-13. Inoltre, l'espressione virale è stata studiata con indagini di RT-PCR che documenta la presenza di trascritti di E5 e con l'evidenziazione morfologica, immunistochemica ed immunofluorescente dell'oncoproteina, responsabile della trasformazione neoplastica delle cellule uroteliali.

CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI PESTIVIRUS OVINI E CAPRINI ASSOCIATI A SINDROMI BORDER-LIKE TRA IL 2002 E IL 2014

Elisabetta Rossi, Moira Bazzucchi, Cristina Casciari, Ilaria Pierini, Monica Giammarioli, Gian Mario De Mia

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

La *border disease* è una malattia infettiva degli ovini e dei caprini caratterizzata da aborti e sterilità negli adulti e dalla nascita di agnelli disvitali. È sostenuta da un virus (BDV) appartenente alla famiglia *Flaviviridae*, genere *Pestivirus*, antigenicamente correlato ai virus della diarrea virale del bovino (BVDV) e della peste suina classica (PSC). In Italia sindromi *border-like* sono state descritte sin dai primi anni '90, tuttavia la successiva caratterizzazione di questi stipiti, ha dimostrato la loro appartenenza al genotipo BVDV-2. Attualmente il BDV è distinto in almeno 7 subgenotipi, da BDV-1 a BDV-7. Nel presente studio sono stati caratterizzati geneticamente 11 *Pestivirus*, attraverso analisi di sequenza della regione genomica 5'-UTR. I virus analizzati sono di origine ovina, tranne uno che è stato isolato dalla capra, coprono l'arco temporale 2002-2014 e provengono dalle regioni Lazio, Marche, Toscana e Basilicata. Sei di essi sono associati ad aborto, i rimanenti sono invece stati evidenziati nelle milze di soggetti adulti. La caratterizzazione genetica è stata effettuata a partire dal materiale originale. L'RNA totale è stato estratto mediante il *QIAamp Viral RNA mini Kit* (QIAGEN). La sintesi del cDNA è stata effettuata utilizzando dei *random primers*. La regione 5'-UTR è stata amplificata utilizzando la coppia di *primers* 324/326 che amplifica un frammento di 288 bp. Gli amplificati sono stati purificati e sequenziati mediante il kit *Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing*, utilizzando il sequenziatore *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer*. Le sequenze nucleotidiche *forward* e *reverse*, allestite da tre diversi amplificati, sono state allineate mediante il software *ClustalX.2* con sequenze di stipiti di riferimento presenti in *GenBank*. L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando l'algoritmo *neighbour-joining* con il pacchetto *MEGA v3.1*. L'analisi di *bootstrap* è stata condotta su 10.000 replicati. Tutti gli isolati sono stati caratterizzati come BDV e clusterizzano in 4 gruppi genetici distinti, BDV-1 (n=3), BDV-3 (n=2), BDV-5 (n=1) e BDV-7 (n=5). La presenza di 4 subgenotipi circolanti, tra i quali il BD-1 e il BD-5, osservati per la prima volta in Italia, testimonia l'elevata diversità genetica del BDV nel nostro Paese. Ciò è da attribuire alla scarsa attenzione che gli allevatori rivolgono verso questa patologia, come pure alle frequenti movimentazioni di animali che espongono all'ingresso di nuove varianti virali.

P.49 PAPPILLOMATOSI BOVINA: INDAGINE EPIDEMIOLOGICA IN EMILIA-ROMAGNA

Federica Savini, Laura Gallina, Sara Mancini, Giovanni Donati, Angelo Pelia, Alessandra Scagliarini

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

I Papillomavirus bovini (BPVs) inducono l'insorgenza di lesioni benigne iperproliferative di cute e/o mucosa che possono progredire a malignità nella specie bovina. Ad oggi ne sono noti 13 tipi, classificati in base alle caratteristiche genetiche del gene strutturale L1 nei tre generi *Delta*, *Epsilon*, *Xi*, e il non ancora assegnato BPV-7. Benché le lesioni tendano a regredire spontaneamente, possono causare gravi danni di tipo economico a causa della loro localizzazione, spesso a livello delle mammelle. Nelle lesioni è più frequente riscontrare un solo tipo di BPV, ma non sono rari i casi di co-infezioni. Scopo della nostra indagine è stato quello di caratterizzare i BPVs responsabili di lesioni in bovini da latte e da carne provenienti da allevamenti in diverse province (Bologna, Modena, Forlì-Cesena, Rimini) della Regione Emilia-Romagna. Per questo scopo sono state prelevate 72 lesioni di tipo papula/pustola o papilloma da altrettanti soggetti. Come suggerito dalla letteratura, i campioni sono stati sottoposti a PCR qualitativa con l'utilizzo sia di *primer* degenerati che specifici, entrambi in grado di amplificare una porzione del gene L1. Per meglio identificare i tipi virali e la presenza di co-infezioni, a questa tecnica è stata affiancata la *Rolling Circle Amplification* (RCA) con successivo taglio enzimatico tramite endonucleasi. I campioni sono stati inoltre sequenziati per comprendere meglio i *pattern* di digestione. L'indagine ha fornito i primi dati epidemiologici della Regione Emilia-Romagna rivelando una distribuzione non uniforme dei diversi tipi di BPVs sul territorio. Nella maggior parte dei casi le lesioni erano causate da co-infezioni, tra queste è da evidenziare anche quella con BPV-7, identificato per la prima volta in Italia e già noto in Giappone e Brasile. La nostra indagine evidenzia l'elevata diffusione del papillomavirus bovino sul territorio e sottolinea la necessità di utilizzare differenti tecniche diagnostiche per la loro identificazione.

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIVIRALE DI siRNA NEI CONFRONTI DI DIFFERENTI BIOTIPI DEL VIRUS DELL'INFLUENZA A

Elena Stoppani (a), Sabrina Renzi (a), Silvia Dotti (a), Riccardo Villa (a), Maura Ferrari (a),
Ivan Bassi (b), Franco Lucchini (b)

(a) *Reparto Substrati Cellulari e Immunologia Cellulare, Istituto Zooprofilattico
Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia*

(b) *Centro Ricerche Biotecnologiche, Università Cattolica del Sacro Cuore, Cremona*

Le problematiche di ordine sanitario riguardanti il virus dell'influenza A, che si sono verificate in epoca recente (virus influenzale pandemico H1N1), hanno evidenziato come l'ospite animale possa fungere anche da *reservoir* nella trasmissione di tale agente patogeno all'uomo. In particolare, il suino riveste un ruolo chiave nell'ambito della potenziale ricombinazione tra biotipi differenti del virus dell'influenza. La comparsa di nuovi biotipi estremamente virulenti in grado di rendere inefficace il protocollo standard di vaccinazione ha portato allo studio di nuovi farmaci/molecole ad azione antivirale ed in questo contesto un particolare interesse è rivestito dal fenomeno noto come *RNA interference* (RNAi). Recentemente infatti, numerose pubblicazioni hanno dimostrato come gli *short interfering RNA* (siRNAs), abbiano la capacità di svolgere la funzione di agenti antivirali, inibendo la traduzione di determinate sequenze ribonucleotidiche e quindi la sintesi di proteine essenziali per la replicazione virale. Nel presente studio, è stato dimostrato come l'espressione costitutiva di singole sequenze siRNA in cellule coltivate *in vitro*, determini l'inibizione della replicazione di differenti biotipi di virus dell'influenza A. A tal fine, sono state impiegate sequenze siRNA disegnate sulla regione della nucleoproteina (NP) conservata nei diversi biotipi. Colture cellulari di MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) sono state quindi trasfettate stabilmente con un vettore di espressione per i siRNA e sottoposte ad infezione con i seguenti biotipi di virus dell'influenza suina (SIV): A/SW/1521/98, H1N2; A/SW/1523/98, H3N2 e A/SW/1513/1/98, H1N1. Inoltre, è stato utilizzato anche il biotipo di influenza aviare A/TK/Italy/2676/2000, H7N1. Due siRNA selezionati hanno dimostrato una buona capacità di inibire la replicazione virale *in vitro*; infatti, in nessun campione cellulare infettato è stata rilevata la presenza di effetto citopatico. Parallelamente, gli stessi risultati sono stati confermati tramite *real-time RT-PCR*. Questa tecnica ha consentito infatti di rilevare una marcata depressione dell'*mRNA* codificante la NP nei campioni cellulari che esprimono gli specifici siRNA. In sintesi quindi, lo studio svolto ha dimostrato l'efficacia dei siRNA nell'inibire la replicazione *in vitro* di differenti biotipi virali selezionati dell'influenza A suina ed aviare, suggerendo il prosieguo delle indagini in due differenti direttrici. La prima volta a valutare l'efficacia di tale strategia nei confronti di virus dell'influenza A umana e di altri biotipi dell'influenza aviare. La seconda riguardante la valutazione, mediante test *in vivo*, della reale capacità inibente la replicazione virale in quanto si ritiene che l'impiego di siRNA possa rappresentare una strategia terapeutica innovativa ed efficace da attuare sia in medicina umana che veterinaria.

P.50 SIEROPREVALENZA DEI VIRUS USUTU E WEST NILE NELL'AVIFAUNA DELLA REGIONE PIEMONTE NEL 2012-2013

Isis Victoriano Llopis (a), Luca Rossi (a), Andrea Mosca (b), Annapia Di Gennaro (c), Liana Teodori (c), Federica Monaco (c), Alessio Lorusso (c), Giovanni Savini (c)

(a) *Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi, Torino*

(b) *Istituto per le Piante da Legno e l'Ambiente, IPLA, Torino*

(c) *Laboratorio di Referenza OIE per la West Nile Disease, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise G. Caporale, Teramo*

Il virus Usutu (USUV) e il virus West Nile (WNV) sono agenti patogeni a trasmissione vettoriale appartenenti alla famiglia *Flaviviridae* genere *Flavivirus*. Entrambi possono causare gravi forme neurologiche anche fatali nell'uomo e in alcune specie animali domestiche e selvatiche. Il ciclo biologico dei due virus si perpetua attraverso la trasmissione tra le zanzare (principalmente del genere *Culex*) che ne rappresentano i vettori biologici, ed alcune specie di uccelli - stanziali o migratori, selvatici e sinantropici - che ricoprono il ruolo di serbatoio ed amplificatore del virus. Le specie aviari maggiormente interessate appartengono agli ordini Passeriformi, Ciconiformi, Anseriformi, Columbiformi, Falconiformi e Strigiformi. Agli uccelli migratori è imputato il ruolo di diffusori dell'infezione e l'introduzione dei due virus nei Paesi europei, Italia compresa, è con ogni probabilità legata alle loro rotte migratorie. L'uomo e i cavalli possono infettarsi, ma sono considerati ospiti a fondo cieco, in quanto non sviluppano livelli di viremia tali da infettare i vettori e completare così il ciclo di trasmissione. Negli ultimi anni focolai di Usutu e West Nile sono stati con sempre maggior frequenza segnalati in Italia, specie nelle regioni settentrionali. Questo studio descrive i risultati di una indagine sierologica per evidenziare anticorpi neutralizzanti nei confronti di USUV e WNV in uccelli selvatici, residenti e migratori di corto e lungo raggio, catturati in Piemonte da inanellatori accreditati tra marzo 2012 e giugno 2013. In totale sono stati prelevati campioni appartenenti a 47 specie diverse di uccelli selvatici. Su 297 campioni di siero esaminati, 4 hanno evidenziato anticorpi neutralizzanti nei confronti di USUV ($P=1,34\%$, IC 95% 0,36-3,4), mentre 10 su 233 campioni di siero sono risultati positivi per WNV ($P=4,29\%$, IC 95% 2,07-7,75). Un numero significativamente ($p<0,001$) superiore di positività per WNV è stato rilevato tra i migratori trans-Sahariani ($P=21\%$, IC 95% 9,55-37,3) rispetto agli uccelli residenti e ai migratori di corto raggio, mentre non sono state riscontrate differenze statisticamente significative per USUV. Titoli anticorpali nei confronti di USUV e WNV sono stati rilevati anche in uccelli di specie residenti ($n= 2$). Quest'ultimo risultato potrebbe stare ad indicare che entrambi i virus abbiano o stiano circolando in Piemonte.

INDAGINE SU *BETANODAVIRUS* IN MOLLUSCHI BIVALVI

Enrico Volpe, Patrizia Serratore, Santino Prosperi, Sara Ciulli
Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi, Ozzano dell'Emilia, Bologna

Pesci e molluschi fanno parte in natura di un unico ecosistema all'interno del quale vengono integrate le risorse disponibili. L'acquacoltura integrata multi-trofica (IMTA) si prefigge di sfruttare questo modello naturale per ridurre i problemi ecologici generati dagli impianti di maricoltura combinando l'allevamento di specie acquatiche appartenenti a diversi livelli della catena alimentare quali pesci, molluschi e alghe. Nonostante gli innegabili benefici ambientali ed economici che questa tipologia di allevamento apporta, la convivenza di pesci e invertebrati filtratori, quali i molluschi bivalvi, può generare interazioni che influenzano l'epidemiologia delle malattie infettive. I molluschi bivalvi, possono, infatti, concentrare e quindi diventare serbatoio per importanti organismi patogeni dei pesci. I *Betanodavirus* sono responsabili di una grave patologia che colpisce molteplici specie ittiche marine oggetto di allevamento. I *Betanodavirus* sono stati isolati anche da molteplici pesci selvatici asintomatici. In Korea è stata inoltre riportata la presenza di *Betanodavirus* in varie specie di invertebrati fra i quali *Mytilus galloprovincialis*. La presenza di *Betanodavirus* è stata indagata tramite RT-nested/PCR in 57 lotti di molluschi bivalvi, prelevati da punti vendita, di provenienza sia nazionale che estera. Nell'indagine sono stati inclusi campioni di 3 diverse specie di molluschi: vongola verace (*Tapes philippinarum*), ostrica concava (*Crassostrea gigas*) e mitilo (*M. galloprovincialis*). I virus evidenziati sono stati sequenziati e sottoposti ad analisi filogenetica. La presenza di *Betanodavirus* è stata evidenziata in tutte e 3 le specie di molluschi analizzate anche se con diversa prevalenza di infezione: 5% in mitilo, 32% ostrica e 42% in vongola. Il virus rilevato è risultato appartenere alla specie *Redspotted grouper nervous necrosis virus* (RGNNV), una delle specie di *Betanodavirus* più comunemente diffuse negli allevamenti di pesci marini in tutto il mondo, compreso il Mar Mediterraneo e l'Oceano Atlantico, aree di origine dei molluschi bivalvi analizzati nello studio. Al fine di studiare la natura dell'interazione fra i molluschi e il virus, 150 soggetti di *T. philippinarum* appartenenti ad un lotto risultato negativo alla ricerca virale, è stato infettato sperimentalmente con *Betanodavirus* tramite immersione. La presenza del virus è stata monitorata tramite metodica molecolare semi-quantitativa 1, 3 e 24 ore post infezione. I soggetti contaminati sono risultati ancora positivi al virus dopo 24 ore di immersione in acqua pulita. La carica virale è risultata costante in tutti i campioni analizzati. Ulteriori studi saranno effettuati per verificare l'infettività del virus presente nei molluschi.

Il progetto è stato svolto grazie ai finanziamenti di SERINAR, Fondazione Cassa di Risparmio di Cesena, DSMV

P.51 ANALISI FULL GENOME MEDIANTE NEXT GENERATION SEQUENCING (SU PIATTAFORMA ION TORRENT PGM™) DI CORONAVIRUS ISOLATO DA PIPISTRELLO IN ITALIA

Guendalina Zaccaria (a), Davide Lelli (b), Arianna Boni (a), Livia Di Trani (a), Alice Papetti (b), Maria Beatrice Boniotti (b), Paolo Cordioli (b), Ana Moreno (b), Gabriele Vaccari (a)

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

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

I chiroteri rappresentano il serbatoio naturale di numerosi patogeni virali trasmissibili all'uomo. Le analisi filogenetiche di coronavirus isolati da pipistrello hanno dimostrato l'origine zoonotica dell'epidemia di SARS-CoV, virus appartenente al genere *Betacoronavirus* (β -CoVs), ed evidenziato nel *Rhinolophus sinicus* l'ospite naturale piú probabile. Dal 2012 sono stati segnalati 536 casi umani di infezione da un nuovo β -CoV, Mers-CoV, caratterizzati da elevata mortalità (145 morti confermate fino ad oggi). Tutti i casi riportati, compresi quelli denunciati in Europa, Asia sud-orientale e negli Stati Uniti, sono stati collegati a casi primari di infezione provenienti dal Medio Oriente. Gli studi epidemiologici e virologici hanno evidenziato nel cammello la probabile fonte di infezione primaria per l'uomo; inoltre numerose ricerche ipotizzano che alcune specie di chiroteri possano rappresentare il serbatoio naturale di un progenitore di Mers-CoV. Il nostro studio si propone di definire un protocollo per il sequenziamento del genoma di Coronavirus, utilizzando nuove tecnologie di sequenziamento (NGS). A tale scopo, è stato analizzato un campione di contenuto intestinale prelevato da un pipistrello appartenente alla famiglia dei Vespertilionidi, riscontrato positivo con RT-PCR specifica per CoV. Il genoma virale è stato amplificato utilizzando la tecnica *sequence independent single primer amplification* (SISPA) e sequenziato con sequenziatore Ion PGM™. L'analisi bioinformatica è stata realizzata con i software Ion Torrent suite e CLCbio utilizzando assemblaggio "*de novo*" e/o *mapping*. Le analisi bioinformatiche hanno permesso di definire il genoma completo del nostro isolato (circa 30 kb) e di identificare le principali regioni codificanti relative ai geni di ORF1ab, spike, envelope, membrana e nucleocapside, oltre a 5 regioni omologhe a Orf4a, Orf4b, Orf5 ed Orf8. Mediante l'analisi filogenetica della sequenza della RNA polimerasi RNA dipendente, il nostro isolato è stato classificato come appartenente al gruppo C dei β -CoVs. Il confronto della sequenza completa del campione con quelle disponibili in Genbank mostra un'omologia del 80% con un query-coverage del 80% con i Mers-CoV, mentre un'omologia del 78% con un query-coverage del 60% con il gruppo di Bat-CoV HKU5, isolati in Cina. I dati ottenuti nel presente studio dimostrano come la tecnica di NGS messa a punto e le analisi bioinformatiche adottate siano utilizzabili per ottenere il genoma completo di *CoVs* direttamente da campioni biologici, anche di isolati non strettamente correlati a quelli conosciuti.

PARAMETRI IMMUNOLOGICI ASSOCIATI A DIVERSE DOSI DI VACCINI ANTI-PORCINE CIRCOVIRUS 2

Cinzia Zanotti, Davide Lelli, Nicola Martinelli, Massimo Amadori
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

L'utilizzo estensivo di vaccini contro il PCV2 si è rivelato efficace nel controllo dell'infezione virale e della sindrome multisistemica del deperimento del suino. In questo studio, 20 suini sono stati vaccinati con preparati a contenuto antigenico controllato per identificare parametri di risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata predittivi della protezione *in vivo* nei confronti del virus. Due gruppi di suini sono stati trattati rispettivamente con il vaccino inattivato *Circovac* e con solo adiuvante dello stesso vaccino, gli altri 3 con dosi scalari (10X, 5X e 2,5X) di un vaccino inattivato da noi preparato con particelle virali purificate a concentrazione nota. Dopo 4 settimane tutti i suini sono stati infettati per via intranasale con 2×10^5 TCID₅₀ di virus PCV2a. I titoli Ab sono stati valutati mediante test ELISA a competizione e sieroneutralizzazione su cellule PK-15, la viremia tramite *real-time* PCR. La risposta cellulo-mediata è stata valutata come rilascio Ag-specifico di IFN- γ da sangue intero (ELISA), numero di cellule Ag-specifiche secernenti IFN- γ (ELISPOT) e proliferazione cellulare (rivelazione dell'antigene Ki-67). Tra il giorno 14 e 21 post-infezione i suini appartenenti al gruppo di controllo hanno sviluppato completa viremia, 3 suini appartenenti rispettivamente ai gruppi 10X, 5X e *Circovac* hanno mostrato viremia a titolo inferiore mentre i restanti soggetti sono risultati completamente protetti dall'infezione. La vaccinazione ha indotto un iniziale aumento dei titoli Ab ELISA proporzionale alla dose somministrata, un calo in concomitanza dell'infezione e un successivo rialzo dopo 14 giorni. 7 giorni dopo l'infezione si è osservato un aumento significativo di Ab neutralizzanti rispetto ai titoli pre-vaccinazione in tutti i gruppi tranne quello di controllo (aumento al 14° giorno), ma nessuna correlazione dose vaccinale-titoli Ab. I test di rilascio di IFN- γ da sangue intero e di ricerca del Ki-67 hanno mostrato una chiara curva dose-risposta: sia nella fase post-vaccinazione che in quella post-infezione i suini trattati con dosaggio vaccinale più basso hanno mostrato una maggiore positività ad entrambi i test, associata ad una più elevata protezione verso la viremia. Il numero di cellule secernenti IFN- γ non è risultato in accordo con questi dati. Tutti i dosaggi vaccinali testati erano in grado di azzerare o ridurre sensibilmente la carica virale mediante un meccanismo non correlato al titolo di Ab neutralizzanti. L'effetto protettivo potrebbe essere correlato alla capacità, soprattutto dei vaccini a più basso contenuto antigenico, di polarizzare la risposta immunitaria in senso antivirale, con un ruolo presumibilmente importante di linfociti T CD8 β +, citotossici, Classe I-ristretti.

INDICE DEGLI AUTORI

Acutis P.L.; 26; 27; 62; 68; 73
Agnoli C.; 16
Alborali G.L.; 19; 78
Alfonsi V.; 21
Alkan F.; 58
Altigeri A.; 13
Amadori M.; 93
Ancora M.; 61
Angeloni G.; 34; 35; 36
Angelucci S.; 40
Antolini A.; 75
Ariello D.; 70
Arnoldi D.; 54
Autorino G.L.; 14; 15; 33
Baglivo S.; 84
Baioni L.; 72
Bakonyi T.; 4
Balboni A.; 16; 17
Ballardini M.; 52; 68
Balsamelli F.; 27
Bandecchi P.; 48
Bandino E.; 47
Bányai K.; 58
Barbieri I.; 72
Bassi I.; 89
Battilani M.; 16; 17
Bazzucchi M.; 87
Belaganahalli M.; 48
Benedetti D.; 18
Benedetti M.; 13
Bertolotti L.; 70
Bettini G.; 16
Bodnar L.; 64
Boin C.; 68; 73
Bonfante F.; 71
Boni A.; 19; 92
Boniotti M.B.; 46; 59; 92
Bonuccelli L.; 48
Borrello S.; 21
Borrini B.; 72
Bortone G.; 20; 31; 56
Botti G.; 24; 25
Bourhy H.; 6
Brocchi E.; 18; 24; 25; 76
Brocherel G.; 13
Bruni R.; 21
Buonavoglia C.; 41; 58; 64
Busani L.; 21
Busi C.; 46
Cafiero M.A.; 64
Cagiola M.; 84
Calamari M.; 48
Camero M.; 64
Caminiti A.; 76
Cancedda M.G.; 85
Canelli E.; 46; 62
Cannella V.; 28; 62
Capelli G.; 54
Capobianco Dondona A.; 23; 31; 61
Cappai S.; 79
Cappelletti B.; 21
Cappello V.; 48
Capua I.; 71
Capucci L.; 24; 25
Caracappa S.; 52
Carboni G.A.; 85
Carrozza M.L.; 48
Caruso C.; 26; 27; 29; 62
Casà G.; 28; 51; 78
Casalone C.; 52; 68
Casciari C.; 87
Castorani W.; 40
Catella C.; 58; 64
Catelli E.; 50
Cavadini P.; 24; 25
Cavalli A.; 64
Cecchinato M.; 49; 50
Cecere J.G.; 23
Ceci C.; 37; 38
Ceglie L.; 49
Cersini A.; 14
Cerutti F.; 68; 83
Chiapponi C.; 18; 60; 72
Chiari M.; 78

Chiavacci L.; 27; 80
 Chiavassa E.; 26; 29
 Ciarelli A.; 20
 Ciccaglione A.R.; 21
 Ciccozzi M.; 62
 Cipro B.; 63
 Ciulli S.; 30; 91
 Colussi S.; 73
 Contu C.; 66
 Coradduzza E.; 85
 Cordioli P.; 19; 59; 92
 Corradi V.; 15
 Cosseddu G.M.; 31; 55
 Costarelli S.; 33
 Cuevas L.; 54
 D'Alessandro M.; 57
 D'Antonio C.; 40
 Dattena M.; 66
 De Aguiar Saldanha Pinheiro A.C.; 30
 De Giuseppe A.; 84
 De Grazia S.; 41
 De Medici D.; 21
 De Mia G.M.; 62; 81; 87
 Declich S.; 32
 Demartis L.; 85
 Dente M.G.; 32
 Dettori A.; 33
 Di Bartolo I.; 34; 35; 36
 Di Febo T.; 20
 Di Felice E.; 37; 38; 41; 43
 Di Filippo O.; 63
 Di Francesco C.E.; 39; 40
 Di Gennaro A.; 90
 Di Gialleonardo L.; 23
 Di Giuseppe A.; 40
 Di Guardo G.; 39; 52
 Di Luca M.; 48
 Di Marco P.; 28
 Di Martino B.; 37; 38; 41; 42; 43; 64; 65
 Di Nocera F.; 52
 Di Pancrazio C.; 20
 Di Pasquale S.; 21
 Di Pirro V.; 40
 Di Profio F.; 38; 41; 42; 43; 65
 Di Sabatino D.; 63
 Di Trani L.; 19; 92
 Donati G.; 51; 88
 Dondi F.; 16; 17
 Dondo A.; 26; 67; 80
 Donofrio G.; 44; 45
 Dotti S.; 60; 89
 Drigo M.; 49; 50
 Duranti A.; 33
 Ebranati E.; 62
 Equestre M.; 21
 Ercolini C.; 81
 Escher M.; 21
 Faccenda L.; 33
 Faccenda M.; 67
 Falcone E.; 46
 Felici A.; 33
 Feliziani F.; 47; 74; 75
 Ferrante G.; 84
 Ferrari A.; 81
 Ferrari M.; 60; 89
 Ferreira de Oliveira-Filho E.; 37
 Ferri N.; 52
 Finarelli A.C.; 72
 Florio L.; 68
 Forti K.; 84
 Forzan M.; 48
 Foxi C.; 79
 Franceschi V.; 44; 45
 Francese D.; 68
 Franzo G.; 49; 50
 Fridel M.; 72
 Frontoso R.; 14; 15
 Galante D.; 64
 Galletti G.; 76
 Galletti S.; 15
 Gallina L.; 28; 51; 78; 88
 Gazzuola P.; 68
 Gennari M.; 81
 Gennero M.S.; 81
 Gentile L.; 40
 Ghisetti V.; 27
 Giammanco G.M.; 41
 Giammarino M.; 80
 Giammarioli M.; 62; 87
 Gigli A.; 49
 Giorda F.; 52
 Giordani R.; 14

Giunta M.; 81
 Giunti M.; 16; 17
 Goffredo M.; 79
 Goria M.; 67
 Grazioli S.; 18
 Gregnanini S.; 14
 Grisenti M.; 54
 Gualanduzzi C.; 72
 Guercio A.; 28; 62
 Guidoni M.; 13
 Guizzardi S.; 21
 Herrero L.; 54
 Horzinek M.C.; 3
 Ianiro G.; 69
 Iannazzo S.; 21
 Iapaolo F.; 31; 55
 Iscaro C.; 47; 74; 75
 Iulini B.; 52; 68
 Izzo F.; 31; 55; 56
 Jacca S.; 44; 45
 Karayel I.; 58
 Kaspers B.; 7
 La Bella G.; 57
 La Salandra G.; 57
 Laconi A.; 50
 Lanave G.; 58; 64
 Latini M.; 52
 Lauzi S.; 62
 Lavazza A.; 24; 25; 28; 46; 59; 69; 78
 Lazzara F.; 81
 Lelli D.; 19; 59; 92; 93
 Lena R.; 21
 Leonardi L.; 86
 Leone A.; 61
 Liciardi M.; 47
 Ligios C.; 66; 85
 Listorti V.; 50
 Lombardo T.; 60
 Lorenzetti R.; 14
 Lorusso A.; 61; 63; 90
 Lorusso E.; 41
 Losio M.N.; 21; 72
 Lucchini F.; 89
 Luciani M.; 20
 Lupini C.; 50
 Luzzago C.; 62
 Maan S.; 48
 Mancini S.; 88
 Mandola M.L.; 80; 83
 Mangone I.; 63
 Maniaci M.G.; 73
 Manna G.; 14; 15
 Manunta D.; 66
 Marcacci M.; 63
 Marcello P.; 85
 Maresca C.; 33
 Mari V.; 58
 Marini V.; 63
 Marro S.; 67
 Marruchella G.; 66
 Marsilio F.; 9; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43;
 65
 Martano M.; 86
 Martella V.; 41; 58; 64
 Martinelli N.; 93
 Martini M.; 49; 50
 Martini V.; 21
 Mascioni A.; 15
 Maseke A.; 77
 Masoero L.; 26; 27; 29; 62
 Massaro M.; 21
 Massirio I.; 41
 Mauroy A.; 37; 38
 Mazza M.; 73
 Mazzariol S.; 39; 52
 Mazzei M.; 48
 Melegari I.; 38; 42; 43; 65
 Meloni G.; 66; 79
 Menghi A.; 21
 Mertens P.; 48
 Miceli I.; 67
 Mignone W.; 52; 68; 83
 Migone L.; 81
 Modesto P.; 27; 68; 73
 Molini U.; 77
 Mollace C.; 17
 Monaco F.; 20; 23; 31; 55; 56; 61; 77;
 79; 83; 90
 Monini M.; 46; 69
 Monnier M.; 67
 Monteleone D.; 21
 Morandi F.; 35

Moreno A.; 19; 59; 62; 92
 Morent M.; 28
 Mosca A.; 68; 90
 Moscato M.; 30
 Mur L.; 47
 Muratore E.; 70
 Murcia P.; 71
 Nicoloso S.; 35
 Niosi G.; 83
 Nocera L.; 72
 Noè P.; 21
 Nogarò C.; 29
 Nogarol C.; 70
 Oggiano A.; 47; 66
 Orsini G.; 31
 Orsini M.; 61
 Orusa R.; 42; 83
 Ostanello F.; 34; 35; 36
 Palermo G.; 64
 Pallone A.; 15
 Panzieri C.; 75
 Papetti A.; 92
 Patrono L.V.; 71
 Pautasso A.; 52; 68
 Pavoni E.; 21; 72
 Pela M.; 74
 Peletto S.; 26; 27; 62; 68; 73
 Peli A.; 51
 Pelia A.; 88
 Pellegrini C.; 74
 Pennacchio F.; 8
 Pennisi M.G.; 65
 Perez E.; 54
 Perugini G.; 33
 Petrella A.; 52
 Petrini S.; 74; 75
 Pezzoni G.; 18; 76
 Pierini I.; 87
 Pinoni C.; 31; 56; 77
 Pintore A.; 52
 Pintore M.D.; 52
 Pintus D.; 66; 85
 Piquemal D.; 28
 Plutino G.; 21
 Polci A.; 31; 55; 77
 Pompa M.G.; 21
 Pongolini S.; 18; 60; 72
 Ponterio E.; 34; 35; 36
 Portanti O.; 79
 Possidente R.; 80
 Prearo M.; 68
 Profeta F.; 40
 Profiti M.; 70
 Prospero A.; 59; 78
 Prospero S.; 17; 30; 51; 91
 Puggioni G.; 66; 79; 85
 Puleio R.; 28
 Purpari G.; 28
 Radaelli M.C.; 68; 80
 Raffini E.; 59
 Razzuoli E.; 81
 Renzi S.; 60; 89
 Riccardi M.G.; 86
 Riccardo F.; 32
 Ricci I.; 13; 15
 Ricotta L.; 21
 Riganò R.; 26
 Rizzo C.; 21
 Rizzo F.; 80; 83
 Rizzo G.; 84
 Rizzoli A.; 54
 Robetto S.; 42
 Rocchigiani A.M.; 66; 79; 85
 Rolesu S.; 47; 79
 Romito G.; 64
 Ronchi F.; 31
 Roperto F.; 86
 Roperto S.; 86
 Rosamilia A.; 27
 Rosati S.; 70
 Rosone F.; 14; 15
 Rossi E.; 75; 87
 Rossi L.; 90
 Rossi R.; 79
 Rubini D.; 81
 Rubini S.; 52
 Ruggeri F.M.; 34; 35; 36; 46; 69
 Ruiu A.; 47
 Russo V.; 86
 Sanchez-Seco M.P.; 54
 Saralli G.; 13
 Satta G.; 79

Savini F.; 28; 51; 78; 88
Savini G.; 23; 61; 63; 66; 79; 83; 90
Scacchia M.; 77
Scagliarini A.; 28; 51; 78; 88
Scavia G.; 21
Scicluna M.T.; 14; 15
Scivoli R.; 66
Scoccia E.; 33
Scremin M.; 54
Serracca L.; 81
Serratore P.; 91
Serroni A.; 84
Sezzi E.; 13
Sholl F.; 52
Simula M.; 15
Sona B.; 27
Stercoli L.; 76
Stoppani E.; 89
Taffon S.; 21
Tenorio A.; 54
Teodori L.; 20; 61; 90
Terracciano G.; 13; 52
Terregino C.; 71
Thiry E.; 37; 38
Tittarelli M.; 20
Tofani S.; 36
Toffan A.; 52
Tolari F.; 48
Torresi C.; 75
Tosti M.E.; 21
Trentin B.; 28
Turi F.; 13
Turini S.; 73
Vaccari G.; 19; 69; 92
Varisco G.; 21; 72
Vàzquez A.; 54
Vento G.; 79
Verin R.; 16
Verna F.; 68
Vernè M.; 26
Victoriano Llopis I.; 90
Vignolo E.; 46
Villa R.; 60; 89
Viola M.R.; 13
Vitale N.; 27; 67
Vito G.; 81
Vizcaino J.M.S.; 47
Volpe E.; 30; 91
Zaccaria G.; 19; 69; 92
Zanardello C.; 71
Zanotti C.; 93
Zehender G.; 62
Zingarelli V.; 84
Zonta W.; 37
Zoppi S.; 26; 67; 80
Zuffada E.; 40

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

Roma, gennaio-marzo 2014 (n.1) 2° Suppl.