VI WORKSHOP NAZIONALE DI VIROLOGIA VETERINARIA

CAVALLERIZZA REALE, TORINO, 13-14 OTTOBRE 2016

LIBRO DEGLI ATTI

UNIVERSITA DEGLI STUDI DI TORINO

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DEL PIEMONTE, LIGURIA E VALLE D'AOSTA - I. ALTARA

con la collaborazione di

SOCIETÀ ITALIANA DI DIAGNOSTICA DI LABORATORIO VETERINARIA

ANIV Associazione Nazionale Infettivologi Veterinari

Società Italiana di Virologia

Società Italiana di Patologia Aviare

con il contributo di

QIAGEN

illumina®

DESTINATARI

Medici veterinari, biologi, biotecnologi, chimici 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.

FINALITÀ ED OBIETTIVI:

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

Fornire un aggiornamento sulle nuove acquisizioni in tema di eziopatogenesi ed epidemiologia di agenti patogeni virali classici, emergenti e riemergenti in campo veterinario

Facilitare contatti e scambi di informazioni e metodologie tra gli operatori impegnati nel settore

COMITATO SCIENTIFICO

- Dr. Maria Teresa Scicluna – Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana, Roma
- Dr. Antonio Lavazza – Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia e Emilia Romagna, Brescia
- Dr. Davide Lelli – Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia e Emilia Romagna, Brescia
- Prof. Canio Buonavoglia – Università degli Studi di Bari, Bari
- Prof. Vito Martella – Università degli Studi di Bari, Bari
- Dr. Stefano Petrini – Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Umbria e Marche, Perugia
- Prof. Giuseppe Iovane – Università degli Studi Federico II, Napoli
- Prof. Ugo Pagnini – Università degli Studi Federico II, Napoli
- Prof. Fulvio Marsilio – Università degli Studi di Teramo, Teramo
- Dr. Barbara Di Martino – Università degli Studi di Teramo, Teramo
- Dr. Calogero Terregino – Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Padova
- Prof.ssa Alessandra Scagliarini – Università degli Studi di Bologna, Bologna
- Dr. Franco Maria Ruggeri – Società Italiana di Virologia
- Dr. Giovanni Savini – Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Abruzzo e Molise, Teramo
- Dr. Federica Monaco – Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Abruzzo e Molise, Teramo
- Prof. Luigi Bertolotti – Università degli Studi di Torino
- Dr. Elena Grego – Università degli Studi di Torino
- Dr. Loretta Masoero – Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte Liguria Valle d'Aosta, Torino

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA

Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Torino

Luigi Bertolotti (t: 0116709197 – f: 0116709196 – e: luigi.bertolotti@unito.it).

13 ottobre 2016

14.00-14.30	**Introduzione ai lavori e Saluto delle Autorità**
	Sessione #1 *Stefano Petrini*
14.30-15.00	**Relazione a invito** *Lentivirus dei Piccoli Ruminanti* Prof. Sergio ROSATI
15.00-16.30	*Comunicazioni libere*
15.00	Identificazione e caratterizzazione molecolare di astrovirus umano in Mytilus galloprovincialis allevati in Regione Campania *Amoroso MG, Cioffi B, Di Bartolo I, Ianiro G, Monini M, Galiero G, Fusco G.*
15.15	Utilizzo di tecniche d'indagine molecolare su un ceppo di myxomavirus evidenziato in un coniglio mummificato in corso di indagine forense *Badagliacca P, Cavadini P, Capucci L, Vantini C, Romeo G, Savini G, Lavazza A.*
15.30	Analisi molecolare di protoparvovirus dei carnivori identificati nel buffy coat dei gatti in Sardegna (Italia) *Balboni A, Bassi F, Alberto A, Zobba R, Dedola C, De Arcangeli S, Battilani M.*
15.45	Un *overview* sul nuovo genotipo di Border Disease Virus (bdv-8) in nord-ovest Italia. *Caruso C, Acutis PL, Cerutti F, Prato R, Modesto P, De Marco L, Masoero L, Peletto S.*
16.00	La diffusione globale della sindrome respiratoria Medio Oriente (MERS): un'analisi di epidemiologica classica e filodinamica molecolare *Cella E, Min J, Ciccozzi M, Angeletti S, Lo Presti A, Pelosi A, Salemi M, Prosperi M.*

16.30-17.00	*Coffee break e visita ai poster*

	Sessione #2 *Gian Mario De Mia*
17.00-18.30	*Comunicazioni libere*
17.00	Infezioni da virus nucleo-citoplasmatici a grande DNA (NCLDVs) nello storione: una problematica emergente in Italia e in Europa *Ciulli S, Mandrioli L, Sirri R, Prosperi S, Volpe E.*
17.15	Virus dell'Epatite E: identificazione di un nuovo sottotipo *De Sabato L, Vaccari G, Lemey P, Di Bartolo I.*
17.30	Analisi genomica del virus della Bursite Infettiva genotipo Ita *Felice V, Franzo G, Catelli E, Bonci M, Cecchinato M, Giovanardi D, Pesente P, Mescolini G, Listori D, Silveira F, Lupini C.*
17.45	Co-infezioni da papillomavirus e parapoxvirus in lesioni cutanee di bovini in Sicilia *Savini F, Gallina L, Di Marco P, Vicari D, Puleio R, Lavazza A, Purpari G, Guergio A, Scagliarini A.*
18.00	Potenziale impiego dei fluidi orali per la diagnosi di peste suina classica (PSC) *Petrini S, Pierini I, Molinari L, Casciari C, Pela M, Giammarioli M, Feliziani F, De Mia GM.*

18.30-19.30	*Assemblea Soci ANIV*

14 ottobre 2016

	Sessione #3 *Luigi Bertolotti*
9.00-9.30	**Relazione a invito** *L'effetto della pressione selettiva nell'evoluzione inter e intraospite di virus influenzali aviari* Dott.ssa Alice FUSARO
9.30-11.00	*Comunicazioni libere*
9.30	Il ruolo dell'associazione ospite-patogeno nell'evoluzione di alpha e betacoronavirus (CoV) nei chirotteri *Leopardi S, Gastaldelli M, Tassoni L, Zamperin G, Priori P, Scaravelli D, De Benedictis P.*
9.45	Circolazione del Virus dell'Epatite E in Italia: Analisi Filogenetica ed Evolutiva *Montesano C, Giovanetti M, Ciotti M, Cella E, Lo Presti A, Grifoni A, Zehender G, Angeletti S, Ciccozzi M.*
10.00	Analisi filogenetica spazio-temporale di virus della Border Disease nel camoscio *Luzzago C, Ebranati E, Cabezon O, Fernandez-Sirena L, Lavin S, Rosell R, Veo C, Rossi L, Cavallero S, Lanfranchi P, Ignasi M, Zehender G.*
10.15	Caratterizzazione molecolare di ceppi di virus dell'epatite E e rotavirus A identificati in ratti sinantropici in nord Italia *Ianiro G, De Sabato L, Ruggeri FM, Ostanello F, Monini M, Di Bartolo I.*
10.30	Indagine sierologica per vesivirus 2117-like nei cani *Di Profio F, Di Martino B, Melegari I, Sarchese V, Massirio I, Banyai K, Camero M, Cornacchia P, Dawgier G, Bodnar L, Marsilio F, Buonavoglia C, Martella V.*

11.00-11.30	*Coffee break e visita ai poster*

	Sessione #4 *Elena Grego*
11.30-13.00	*Comunicazioni libere*
11.30	Ruolo della proteina STAT2 come fattore determinante del tropismo specie specifico del virus della febbre gialla *Pisanelli G, Laurent-Rolle M, Morrison J, Iovane G, Garcia-Sastre A.*
11.45	Indagine preliminare sulle infezioni da *Herpesvirus* in tartarughe del genere *Testudo* in Italia: genotipizzazione e considerazioni diagnostiche *Preziuso S, Moriconi M, Cuteri V.*
12.00	Sorveglianza sierologica nell'avifauna selvatica: impiego di anticorpi monoclonali pan-avian *Prosperi A, Lelli D, Moreno A, Sozzi E, Pezzotti R, Figuerola J, Soriguer R, Capucci L, Brocchi E, Lavazza A.*
12.15	Filogeografia, filodinamica e catene di contagio di Bovine Viral Diarrhea virus sottotipo 1-f in Nord Italia. *Cerutti F, Luzzago C, Lauzi S, Ebranati E, Caruso C, Masoero L, Moreno A, Acutis PL, Zehender G, Peletto S.*
12.30	I chirotteri come reservoir di virus zoonotici emergenti in italia: implicazioni per la salute pubblica e la conservazione biologica *Lelli D, De Benedictis P, Decaro N, Prosperi A, Leopardi S, Priori P, Boniotti MB, Papetti A, Scaravelli D, Rosti E, Chiapponi C, Sozzi E, Bonilauri P, Perulli S, Moreno A, Lavazza A.*

13.00-14.30	*Pranzo*

14 ottobre 2016

	Sessione #5 *Davide Lelli*
14.30-15.00	**Relazione a invito** Virus emergenti nei carnivori domestici: potenziale rischio per la salute umana? prof. Nicola DECARO
15.00-16.30	*Comunicazioni libere*
15.00	*Clearance* del virus della rabbia dal sistema nervoso centrale mediata da anticorpi monoclonali: nuove frontiere per la terapia *De Benedictis P, Aiello R, Minola A, Rota Nodari E, Lanzavecchia A, Bourhy H, Corti D.*
15.15	Analisi del trascrittoma di cellule stromali endometriali bovine (BESC) infettate con BoHV-4 *Tebaldi G, Jacca S, Montanini B, Capra E, Rosamilia A, Cavirani S, Stella A, Castiglioni B, Ottonello S, Donofrio G.*
15.30	Caratterizzazione clinico-patologica di due differenti isolati di bluetongue virus sierotipo 1 (BTV-1) in arieti. *Pintus D, Puggioni G, Meloni G, Rocchigiani AM, Manunta D, Melzi E, Savini G, Palmarini M, Dattena M, Oggiano A, Ligios C.*
15.45	Studio della trasmissione verticale di CAEV in animali naturalmente infetti. *De Martin E, Roccaro M, Casà G, Gallina L, Scagliarini A.*
16.00	Bovine herpesvirus 4 ricombinante per una forma chimerica dell'oncoantigene HER-2 protegge nei confronti del tumore mammario in un modello murino *Macchi F, Rolih V, Quaglino E, Franceschi V, Tebaldi G, Bolli E, Rosamilia A, Cavirani S, Cavallo F, Donofrio G.*
16.30-17.00	*Chiusura dei lavori*

RELAZIONI A INVITO

dcsdc

I lentivirus dei piccoli ruminanti: dall'affinamento delle tecniche diagnostiche alla selezione genetica di soggetti resistenti

Sergio Rosati

Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Scienze Veterinarie

I lentivirus dei piccoli ruminanti (SRLV) rappresentano un gruppo eterogeneo di virus sia dal punto di vista antigenico che biologico. Dei 4 genotipi identificati finora, ben 3 circolano in Italia, rendendo necessario un affinamento delle tecniche diagnostiche degno di ben più blasonati agenti infettanti.

La storia dell'evoluzione del genotipo E, identificato per ora solo in Italia, rappresenta un interessante modello di co-evoluzione ospite/parassita, in relazione alla dimensione della popolazione recettiva, riducendo la sua virulenza se la popolazione è a rischio di estinzione. Le proprietà biologiche della variante Roccaverano del genotipo E ha inoltre interessanti proprietà profilattiche, dimostrando la capacità di modulare la carica provirale di ceppi più virulenti in corso di superinfezioni. Nell'ambito delle misure di controllo delle infezioni da SRLV, non va infine sottovalutato il ruolo potenziale della selezione genetica di soggetti "long term non progressor".

In tale contesto recenti studi si sono concentrati sui principali meccanismi di restrizione alla replicazione virale che coinvolgono l'immunità naturale e la sovra espressione di fattori cellulari ad azione antivirale.

L'effetto della pressione selettiva nell'evoluzione inter e intraospite di virus influenzali aviari

Alice Fusaro

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro

La pressione selettiva gioca un ruolo cruciale nell'evoluzione virale. La trasmissione di virus a una nuova specie, l'esposizione alla risposta immunitaria dell'ospite o altri cambiamenti ambientali possono favorire l'emergenza e la stabilizzazione di nuove varianti virali nella popolazione.

Comprendere le dinamiche dell'evoluzione della popolazione virale attraverso i processi di selezione naturale e di bottleneck genetico è fondamentale al fine di determinare i meccanismi coinvolti nella genesi di varianti virali con diverse caratteristiche biologiche.

L'avvento della tecnologia high throutput sequencing ha rivoluzionato l'analisi della quasispecie, permettendo l'identificazione di varianti a bassissima frequenza nella popolazione virale mediante un'analisi di tipo ultra-deep sequencing. Tale approccio ha consentito la caratterizzazione della variabilità genetica di virus dell'Influenza A, al fine di comprendere l'effetto della pressione immunitaria dell'ospite i) sull'evoluzione di virus influenzali aviari in ospiti mammiferi e ii) sull'emergenza di escape mutants.

Nel primo caso abbiamo dimostrato come, durante l'adattamento di un virus influenzale H3N6 di origine aviaria nel modello furetto, l'immunità verso un virus stagionale umano H3N2 possa accelerare la comparsa di mutazioni importanti nell'adattamento alla nuova specie, suggerendo che l'immunità preesistente nella popolazione umana verso i sottotipi H1 e H3 possa essere uno dei fattori chiave implicati nell'emergenza di virus pandemici.

Nel secondo caso abbiamo osservato come un'incompleta protezione vaccinale del pollame a causa dell'utilizzo di vaccini con una bassa omologia rispetto ai virus circolanti in campo possa favorire sin dai primi stadi dell'infezione la comparsa di nuove varianti genetiche, alcune delle quali potenzialmente implicate nel fenomeno del drift antigenico.

Abbiamo quindi dimostrato come la pressione immunitaria possa modificare la traiettoria evolutiva del virus, attraverso meccanismi di bottleneck selettivo. Inoltre abbiamo provato l'importanza dell'applicazione della tecnologia deep sequencing per l'identificazione precoce di varianti virali con potenziale zoonotico e di sottopopolazioni potenzialmente in grado di evadere la risposta immunitaria dell'ospite.

Virus emergenti nei carnivori domestici: potenziale rischio per la salute umana?

Nicola Decaro, Vito Martella, Canio Buonavoglia.

Università degli Studi di Bari, Dipartimento di Medicina Veterinaria

Ad eccezione della rabbia, che rappresenta la più importante zoonosi trasmessa dai carnivori domestici, in genere i virus di cane e gatto non sono considerati tra i principali agenti di zoonosi. Tuttavia, le moderne tecniche di biologia molecolare, come il *next generation sequencing*, nel giro di pochi anni hanno completamente rivoluzionato le conoscenze sul viroma di questi animali, portando alla scoperta di virus con potenziale zoonosico che non erano stati rilevati dalle tradizionali metodiche virologiche.

Allo stesso tempo, i complessi meccanismi di evoluzione dei virus, in particolare di quelli ad RNA, mediante l'accumulo di mutazioni puntiforimi, inserzioni e/o delezioni nel genoma virale, hanno permesso la comparsa, nei carnivori domestici, di nuove varianti che hanno ampliato lo spettro d'ospite ed hanno a volte innescato epidemie nella specie umana. Saranno illustrate le acquisizioni più recenti in merito agli agenti virali emergenti dei carnivori domestici ed al loro potenziale zoonotico.

In particolare, sarà discusso il possibile ruolo di cane e gatto nella trasmissione all'uomo di virus influenzali, rotavirus, calicivirus e astrovirus. Sarà, inoltre, fatto riferimento a virus che sono stati identificati solo negli ultimi anni nell'apparato enterico e respiratorio dei carnivori domestici e per i quali le conoscenze sul potere patogeno e, soprattutto, sul potenziale zoonosico risultano frammentarie o completamente assenti.

PRESENTAZIONI ORALI

CLEARANCE DEL VIRUS DELLA RABBIA DAL SISTEMA NERVOSO CENTRALE MEDIATA DA ANTICORPI MONOCLONALI: NUOVE FRONTIERE PER LA TERAPIA

P. De Benedictis[1], R. Aiello[1], A. Minola[2], E. Rota Nodari[1], A. Lanzavecchia[3], H. Bourhy[4], D. Corti[2,3]

[1]FAO and National Reference Centre for Rabies, OIE Collaborating Centre and National Reference Centre for Diseases at the Animal-Human Interface, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Italy
[2]Humabs BioMed SA, Bellinzona, Switzerland
[3]Institute for Research in Biomedicine, Università della Svizzera Italiana, Bellinzona, Switzerland
[4]Institut Pasteur, Unit of Lyssavirus Dynamics and Host Adaptation National Reference Centre for Rabies World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Rabies, Paris, France

La profilassi antirabbica post-esposizione (PEP) prevede la repentina somministrazione di più dosi vaccinali in associazione a immunoglobuline di origine equina o umana (RIG). L'efficacia della PEP diminuisce progressivamente dal momento dell'esposizione e l'infezione è invariabilmente fatale dalla comparsa dei sintomi. Un cocktail di anticorpi monoclonali (mAbs) di origine umana è stato recentemente identificato come alternativa alle RIG. Il cocktail ha dimostrato eccezionale potenza e cross-reattività, tanto da lasciarne ipotizzare un suo utilizzo differito (terapia post-esposizione, *latePET*).
Gli esperimenti hanno previsto l'infezione e il trattamento per via intramuscolare di criceti dorati (*Syrian hamsters*).
Gli animali infettati con una dose letale di virus standard sono stati sottoposti a *expPEP* oppure *stPEP*, con somministrazione rispettivamente del cocktail di mAbs o delle RIG.
In un secondo esperimento, gli animali sono stati infettati con una dose virale 2 log più alta e trattati con *stPEP* o con 40 mg/kg di mAbs al giorno 2 o 3 pi (*latePEP*). La colonizzazione del SNC da parte del virus è stata tracciata dal giorno 2 pi fino alla comparsa dei sintomi.
Gli animali sono stati osservati rispettivamente fino a 60 o 340 giorni, valutando sintomatologia, mortalità e carica virale nel sistema nervoso centrale (SNC). Ogni prova ha previsto un gruppo di controllo positivo non trattato (K).
E' stato inoltre valutato se la somministrazione dei mAbs potesse influenzare negativamente la risposta immunitaria vaccinale, mediante trattamento degli animali in assenza di infezione.
Gli animali trattati con il cocktail sono sopravvissuti al *challenge* letale, sia nella *exp-PEP* che nella *latePET*. Inoltre, il cocktail non ha influenzato la risposta immunitaria endogena.
E' importante notare che nella prova di *latePEP*, già dal giorno 2 pi è stato possibile identificare il virus in attiva replicazione nel SNC, e che sia gli animali K sia *stPEP* sono tutti deceduti il giorno 5 pi. Gli animali trattati con *latePET* sono invece sopravvissuti, nonostante la comparsa di sintomatologia, fino al giorno 340 (rispettivamente 100% e 58.33% dei *latePEP* giorni 2 e 3 pi), con differenze significative nella carica virale tra i K e *late PET*.
I mAbs in esame hanno dimostrato la loro efficacia terapeutica. Ulteriori studi su diverse vie di somministrazione e/o la somministrazione congiunta con molecole antivirali potranno dimostrare la possibilità di ampliarne la finestra terapeutica.

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI ASTROVIRUS UMANO IN MYTILUS GALLOPROVINCIALIS ALLEVATI IN REGIONE CAMPANIA

MG. Amoroso[1], B. Cioffi[1], I. Di Bartolo[2], G. Ianiro[2], M. Monini[2], G. Galiero[1], G. Fusco[1]

[1]*Unità Operativa di Diagnostica Virologica, Dipartimento di Sanità Animale, Via Salute 2 Portici (NA), Italia*
[2]*Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Viale Regina Elena 299, Roma, Italia*

Le gastroenteriti virali costituiscono una causa molto comune di morbilità e mortalità nell'uomo in tutto il mondo. Tra i patogeni virali coinvolti si annovera l'astrovirus, un virus appartenente alla famiglia delle *Astroviridae*, identificato per la prima volta nelle feci di bambini affetti da diarrea e considerato un importante causa di gastroenterite nei bambini di età inferiore a 2 anni. L'infezione può colpire anche gli adulti, in particolare anziani e immunocompromessi. La sintomatologia gastroenterica causata nell'adulto è piuttosto lieve, ed è difficilmente denunciata alle autorità sanitarie, si pensa quindi che la frequenza di infezione da questo virus sia fortemente sottostimata. Il nostro lavoro ha previsto la ricerca dell'RNA di astrovirus in 108 campioni di *Mytilus galloprovincialis* (cozza) prelevati in Regione Campania da allevamenti di classe A e B durante un periodo di 24 mesi (2014-2015). L'estrazione del virus è stata eseguita seguendo le indicazioni riportate nella ISO/TS 15216-1: 2013. Gli acidi nucleici sono stati estratti mediante strumentazione automatica MagMAX Express (Applied Biosystems). La ricerca dell'RNA virale è stata effettuata mediante Real time RT-PCR su termociclizzatore Real Time 7500 Fast (Applied Biosystems) impiegando un kit commerciale (Astrovirus Ceeram tools). Nei campioni analizzati astrovirus è stato identificato con una prevalenza elevata: 31 campioni su 108. Questa notevole positività (28.70%) è in linea con quanto riportato in studi precedenti. I campioni positivi sono stati ulteriormente analizzati mediante PCR convenzionale seguita, in caso di positività, da sequenziamento dei geni amplificati e analisi filogenetica. Due campioni sono stati riconfermati e gli ampliconi ottenuti sono stati sequenziati (Acc. n° KX027307-08) e sottoposti ad analisi filogenetica (Software Mega5). I due ceppi virali mostravano una identità del 98.5% con ceppi di astrovirus identificati nell'uomo, mostrando una stretta vicinanza con ceppi umani di genotipo 1 e 2. Il genotipo 1 è predominante in Italia, mentre il genotipo 2 è stato identificato in Italia molto più raramente e solo in tempi relativamente recenti. L'individuazione nei mitili di un virus enterico di origine umana quale astrovirus sembra suggerire una possibile contaminazione fecale dell'acqua di mare in cui tali animali sono allevati, rilevando potenziali rischi per la salute umana.

UTILIZZO DI TECNICHE D'INDAGINE MOLECOLARE SU UN CEPPO DI MYXOMAVIRUS EVIDENZIATO IN UN CONIGLIO MUMMIFICATO IN CORSO DI INDAGINE FORENSE

P. Badagliacca[1], P. Cavadini[2], L. Capucci[2], C. Vantini[3], G. Romeo[1], G. Savini[1], A. Lavazza[2]

[1] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale Abruzzo e Molise, Campo Boario, Teramo*
[2] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia e Emilia Romagna, Centro di Referenza Nazionale per le Malattie Virali dei Lagomorfi, Via Bianchi 7/9, Brescia*
[3] *Corpo Forestale dello Stato, Nucleo Investigativo per i Reati in Danno agli Animali (NIRDA), Via Giosuè Carducci 5, Roma*

Il caso presentato riporta le attività di tipizzazione molecolare di un ceppo di Myxomavirus (MYXV) il cui genoma era evidenziato in un coniglio mummificato, oggetto di indagine forense, presumibilmente deceduto 8-9 mesi prima, il cui stato di immunizzazione passiva nei confronti della mixomatosi era sconosciuto. Era tuttavia nota la pratica di vaccinazione nell'allevamento di origine del coniglio esaminato con vaccino vivo attenuato del commercio formulato con il ceppo Borghi.
Un campione di cute prelevato dal padiglione auricolare dell'esemplare in esame è stato processato secondo le metodiche descritte nel Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals dell'Organizzazione Mondiale per la Sanità Animale (OIE), relative all'estrazione del DNA, all'utilizzo dei primers di amplificazione del gene M071 di MYXV e dei targets molecolari dei ceppi vaccinali Borghi e SG33, stipiti utilizzati come ingredienti nei vaccini commerciali autorizzati per l'impiego nel coniglio in Italia.
L'analisi Blast, condotta sul sequenziamento del prodotto di amplificazione di 470 bp del gene M071 del ceppo di MYXV individuato, ha mostrato un'identità nucleotidica pari al 100% con il ceppo di riferimento Losanna (GenBanK: AF170726), del 99% con il ceppo di riferimento Moses (GenBank: JX565574) e del 97% con il ceppo vaccinale Borghi (GenBank: HM104697).
La significatività della maggiore identità nucleotidica del ceppo in esame con i ceppi di riferimento di MYXV è stata valutata mediante tecnica di PCR-RFLP consistente nell'amplificazione di un frammento di circa 982 pb della regione compresa tra i geni M143 e M144 e nella sua digestione con enzima di restrizione *ScaI.* Il pattern di digestione enzimatica ottenuto, consistente nel prodotto di due frammenti di 733 pb e 249 pb, è risultato sovrapponibile a quello del ceppo di riferimento Moses. Questa tecnica ha permesso altresì di escludere l'identificazione del ceppo in esame con i ceppi vaccinali Borghi e SG33 che non producono sottoprodotti molecolari del frammento di 982 pb.
In conclusione, per quanto sia consolidata la conoscenza della resistenza del DNA in condizione di trasformazione non colliquativa dei tessuti cadaverici, non risultano, a conoscenza degli autori, segnalazioni del rilievo del genoma di myxomavirus in carcasse mummificate.

ANALISI MOLECOLARE DI PROTOPARVOVIRUS DEI CARNIVORI IDENTIFICATI NEL BUFFY COAT DEI GATTI IN SARDEGNA (ITALIA)

A. Balboni[1], F. Bassi[1], A. Alberti[2], R. Zobba[2], C. Dedola[2], S. De Arcangeli[1], M. Battilani[1]

[1]*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO), Italia*
[2]*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Sassari, Sassari, Italia*

I gatti sono recettivi sia al parvovirus felino (FPV) che alle varianti 2a, 2b, 2c del parvovirus canino (CPV), virus che recentemente sono stati oggetto di una rivisitazione tassonomica che li considera varianti d'ospite di un'unica specie, il Protoparvovirus dei carnivori 1. Solitamente i parvovirus determinano infezioni acute, con l'eliminazione fecale del virus che cessa dopo 1-2 settimane post-infezione, in concomitanza con lo sviluppo della risposta immunitaria specifica. Diversi studi hanno comunque evidenziato la possibilità che si verifichino infezioni persistenti in particolare nel gatto. Il FPV e CPV sono stati rinvenuti nelle feci di gatti sani; si è dimostrata la persistenza dei parvovirus nelle cellule della serie bianca del sangue (WBC) nonostante la concomitante presenza di anticorpi neutralizzanti; inoltre si è riscontrata la presenza dei parvovirus nel midollo osseo di gatti sani. Questi rilievi suggeriscono che i parvovirus possano persistere nei tessuti dei gatti senza determinare lo sviluppo di una sintomatologia clinica.
Alla luce di questi ritrovamenti, è stato svolto uno screening molecolare su una popolazione di 54 gatti campionati in Sardegna ai fini di rilevare la presenza di CPV e FPV in campioni di buffy coat. E' stata poi effettuata la caratterizzazione molecolare dei virus identificati e ne sono stati approfonditi gli aspetti filogenetici e la complessità genetica. Inoltre sono stati valutati i titoli anticorpali nei sieri dei gatti risultati positivi.
Sono risultati positivi alla Real-Time PCR 9 gatti che si presentavano sani o che mostravano segni clinici non riferibili ad infezioni da parvovirus. Quattro gatti erano infettati esclusivamente con il FPV, 4 soggetti con il CPV, mentre in un soggetto è stato identificato un ceppo virale che al sequenziamento del gene VP2 mostrava un'insolita diversità genetica. Il clonaggio e le successive analisi svolte per esplorare la complessità genetica del ceppo virale, hanno evidenziato una co-infezione tra FPV e CPV-2c ed almeno 6 varianti virali coesistevano nello stesso soggetto infetto. Titoli anticorpali al di sopra del valore soglia sono stati rilevati in tutti i soggetti positivi. Concludendo, l'identificazione di FPV e CPV nelle WBC di gatti anche asintomatici nonostante la presenza di specifici anticorpi, nonchè l'elevata complessità genetica rilevata in un campione, supporta il preminente ruolo epidemiologico dei gatti come portatori nelle infezioni da parvovirus.

UN *OVERVIEW* SUL NUOVO GENOTIPO DI BORDER DISEASE VIRUS (BDV-8) IN NORD-OVEST ITALIA.

C. Caruso [1], P.L. Acutis[1], F. Cerutti[1], R. Prato[1], P. Modesto [1], L. De Marco[1], L. Masoero[1], S. Peletto[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta*

Attualmente, l'analisi filogenetica degli isolati ha segregato i ceppi di Border Disease virus (BDV) in differenti genotipi (BDV 1 – BDV 7) con distribuzione mondiale (1). In questa *overview*, vengono passati in rassegna 2 casi clinici (in capra e camoscio alpino) (2,3) in cui è stato identificato un nuovo genotipo di BDV, putativo BDV-8, circolante nel territorio del Nord - Ovest Italia e che condivide l'interfaccia domestici/selvatici. Oltre ai rilievi clinici ed anatomo-patologici, vengono passati al vaglio gli strumenti laboratoristici utili ad identificare questa nuova variante, che ha dimostrato avere un certo grado di "escape diagnostico". Infatti, in entrambi i casi, dalla nested – PCR specifica per BDV (4) si otteneva un prodotto di amplificazione della lunghezza attesa nel primo step (288 bp), mentre i primer BDV-specifici fallivano nell'amplificare il frammento interno. Tale "comportamento diagnostico" è giustificato dalla presenza di *mismatches* tra 5'UTR virale ed estremità 3' del reverse primer (PDB2) specifico per BDV: tali mutazioni, seppur in siti comuni, sono risultate divergenti tra i due ceppi (triplette ATA e ACA, rispettivamente). L'analisi di similarità ha evidenziato una identità del 77.8-89.7% nella regione 5'UTR e del 66.5-78.4% in Npro del ceppo BDV caprino con i ceppi *Pestivirus* di referenza, giustificando la proposta di un nuovo genotipo. In aggiunta, l'analisi filogenetica effettuata sul ceppo BDV isolato dal camoscio ne ha, di fatto, confermato la localizzazione in un ramo separato dell'albero filogenetico, contestualmente allo stipite caprino, evidenziando un'identità nucleotidica tra i due ceppi del 93.6% e 92.3% per 5'UTR e Npro, rispettivamente. L'isolamento virale è stato possibile solo per il ceppo identificato nel camoscio, mediante tre passaggi seriali su cellule SFTR e successiva dimostrazione dell'aumento del titolo virale mediante kit commerciali Real – time RT PCR. Va peraltro sottolineato che tali kit (IDEXX e QIAGEN), pur non essendo stati validati per la detection di BDV, si sono dimostrati idonei per la rivelazione del nuovo genotipo BDV-8. E' stato valutato anche il livello di detection del kit IDEXX BVDV Ag/Serum Plus basato sulla rivelazione dell'antigene E^{rns} (gp44-48) che ha correttamente identificato BDV-8 sia nella milza che nel polmone del camoscio.

Ai fini dello studio delle patologie da Pestivirus, la presenza di stipiti virali nuovi ed emergenti sul territorio nazionale, conferma l'importanza di inserire nei protocolli diagnostici integrati la tipizzazione molecolare degli isolati.

LA DIFFUSIONE GLOBALE DELLA SINDROME RESPIRATORIA MEDIO ORIENTE (MERS): UN'ANALISI DI EPIDEMIOLOGICA CLASSICA E FILODINAMICA MOLECOLARE

E. Cella[1,2,3], J. Min[4], M. Ciccozzi[1,5], S. Angeletti[5], A. Lo Presti[1], A. Pelosi[1], M. Salemi[3], M. Prosperi[4]

[1]*Department of Infectious, Parasitic, and Immuno-mediated Diseases, National Institute of Health, Rome, Italy*
[2]*Department of Public Health and Infectious Diseases, Sapienza University of Rome, Rome, Italy*
[3]*Department of Pathology, Immunology, and Laboratory Medicine, University of Florida, Gainesville, FL, USA*
[4]*Department of Epidemiology, University of Florida, Gainesville, FL, USA*
[5]*Department of Clinical Pathology and Microbiology Laboratory, University of Biomedical Campus, Rome, Italy*

Fin dalla sua scoperta nel 2012, oltre 1.700 casi confermati di sindrome respiratoria Medio Oriente (MERS) sono stati documentati in tutto il mondo e più di un terzo di questi casi sono morti. Il maggior numero di casi si è verificato in Arabia Saudita, ma il recente caso di esportazione di MERS-coronavirus (MERS-CoV) alla Repubblica di Corea ha dimostrato che una pandemia è una possibilità che non può essere ignorata. A causa della mancanza di chiarezza della metodologia di trasmissione, di un trattamento mirato e di possibili vaccini, la comprensione di questo virus dovrebbe essere una priorità.
Eseguendo una revisione della letteratura su MERS-CoV, abbiamo eseguito una meta-analisi qualitativa di tutti i casi confermati in laboratorio in tutto il mondo fino ad oggi, con particolare attenzione alla trasmissione internazionale e le infezioni nosocomiali. In parallelo, abbiamo utilizzato tutte le sequenze disponibili di MERS-CoV in GenBank per creare un albero filogeografico, con particolare attenzione alla temporalità geospaziale di evoluzione virale. Grazie alla combinazione dell'epidemiologia classica con filodinamica, vi presentiamo un quadro olistico della epidemia MERS dal livello molecolare a scala globale.
Abbiamo esaminato epidemie nosocomiali a partire con dall'epidemia ospedaliera individuata retrospettivamente in Giordania fino all'attuale epidemia a Riyadh, in Arabia Saudita. MERS ha attraversato molti oceani, entrando in più di otto nazioni in tra il 2012 e il 2015. In questo lavoro, la storia spazio-temporale dei casi MERS, come documentato epidemiologicamente, è stata esaminata mediante l'analisi filogenetica bayesiana. La presenza di una suddivisione delle sequenze in cluster geografici e di sequenze MERS-CoV da cammelli talvolta insieme agli isolati da esseri umani, ha indicato che più introduzioni zoonotici si sono verificate in paesi endemici. E' stata eseguita anche una sintesi dei tassi di riproduzione di base per MERS-CoV negli esseri umani e cammelli.
Insieme, queste analisi possono aiutare a identificare i fattori associati con l'evoluzione virale e la diffusione, nonché stabilire l'efficacia delle misure di controllo delle infezioni. I risultati sono particolarmente pertinenti ai paesi senza casi attuali di MERS-CoV, in quanto la loro mancanza di familiarità li rende particolarmente sensibili alla diffusione incontrollabile di un virus che può essere importato dai viaggiatori.

FILOGEOGRAFIA, FILODINAMICA E CATENE DI CONTAGIO DI BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS SOTTOTIPO 1-F IN NORD ITALIA.

F. Cerutti[1], C. Luzzago[2], S. Lauzi[2], E. Ebranati[3], C. Caruso[1], L. Masoero[1], A. Moreno[4], P.L. Acutis[1], G. Zehender[3], S. Peletto[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, Torino*
[2]*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Milano*
[3]*Dipartimento di Scienze Cliniche "Luigi Sacco", Sezione di Malattie Infettive, Università di Milano*
[4]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia*

Il virus della diarrea virale bovina (Bovine viral diarrhea virus, BVDV) tipo 1 in Italia è caratterizzato da alta variabilità genetica, con almeno 20 sottotipi presenti (1a-1t). Il sottotipo 1f è endemico in una ristretta area geografica, ed è quindi caratterizzato da una distribuzione locale. In questo lavoro si sono studiate la filodinamica e la filogeografia di BVDV-1f nel nord Italia e sono state determinate le catene di contagio in un sottogruppo di campioni provenienti dal Piemonte e dalla Valle d'Aosta.
Per la filogeografia sono state analizzate le sequenze 5'UTR di 51 campioni distribuiti in un arco temporale compreso tra il 1966 e il 2013. Successivamente è stato selezionato un sottogruppo di 12 campioni per il sequenziamento del gene *Npro* per caratterizzare le catene di contagio mediante dati molecolari ed epidemiologici.
L'analisi filogeografica ha stimato la radice dell'albero nel 1965 in Veneto. Quattro *subclade* contengono sequenze raggruppate per regione: Lombardia (n=3), Lombardia ed Emilia-Romagna (n=7), Piemonte (n=17), Piemonte e Valle d'Aosta (n=21). Il *subclade* piemontese ha una struttura "*ladder-like*", mente il *subclade* di Piemonte e Valle d'Aosta ha una struttura quasi completamente binaria. Nel sottogruppo *Npro*, la ricostruzione dell'outbreak ha identificato in un campione del Piemonte la fonte più probabile di infezione per la Valle d'Aosta. Un apposito questionario inviato ai veterinari competenti ha rivelato connessioni epidemiologiche e flussi commerciali diretti o indiretti (compravendite, fiere, mercati) tra allevamenti campionati e non campionati.
La filogeografia ha stimato che BVDV-1f, dopo la sua comparsa in Veneto, si è propagato verso ovest, diffondendosi in Lombardia ed Emilia-Romagna nei primi anni '90, e successivamente in Piemonte e Valle d'Aosta nel primo decennio del 2000. Sia l'analisi filogeografica sull'intero dataset che sul sottogruppo di *Npro* hanno indicato che BVDV-1f è stato introdotto in Valle d'Aosta a partire dal Piemonte.

INFEZIONI DA VIRUS NUCLEO-CITOPLASMATICI A GRANDE DNA (NCLDVS) NELLO STORIONE: UNA PROBLEMATICA EMERGENTE IN ITALIA E IN EUROPA

S. Ciulli[1], L. Mandrioli[1], R. Sirri[1], S. Prosperi[1], E. Volpe[1]

[1]*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna*

I virus nucleo-citoplasmatici a grande DNA (NCLDVs) sono virus epiteliotropi responsabili di infezioni del sistema tegumentario negli storioni che possono portare a focolai di mortalità. All'interno di questo gruppo sono al momento inclusi il white sturgeon iridovirus (WSIV), il Missouri River sturgeon iridovirus (MRSIV), il shortnose sturgeon virus (SNSV), il namao virus (NV) e il British Columbia white sturgeon virus (BCWSV), responsabili di infezioni in varie specie di storioni in tutto il Nord America. Sebbene la maggior parte di questi virus sia stata identificata come 'iridovirus' recenti indagini mostrano che più probabilmente si tratta di un nuovo genere e famiglia all'interno del recentemente proposto ordine *Megavirales*.

Per quanto riguarda la situazione europea una infezione da irido-like virus, evidenziata tramite microscopia elettronica, è stata segnalata in Nord Europa nel 1998 in focolai di mortalità nello storione russo (*Acipenser gueldenstaedtii*).

L'allevamento dello storione è in forte aumento in molti Paesi europei. In Italia, paese leader per la produzione di caviale, le specie di maggiore interesse per brevità del ciclo produttivo e qualità dei prodotti (caviale e carne) sono lo storione russo e lo storione siberiano (*A. baerii*).

Indagini molecolari svolte su campioni di storione russo e siberiano raccolti durante un focolaio di mortalità verificatosi nel 2015 in un allevamento del Nord Italia hanno evidenziato la presenza di un nuovo virus appartenente al gruppo dei NCLDVs. Il virus evidenziato, denominato European sturgeon NCLDV, ha mostrato un'identità dal 73,6 al 87,9% e dal 79,5 al 96,5% rispettivamente a livello nucleotidico e amminoacidico con il genoma del gene della proteina principale del capside (MCP) degli altri virus inclusi nel gruppo degli sturgeon NCLDVs (WSIV, MRSIV, SNSV, NV, BCWSV).

Contemporaneamente un altro gruppo di ricerca ha identificato e caratterizzato virus simili in 3 paesi dell'Europa occidentale in varie specie di storioni allevati.

Le indagini svolte su campioni raccolti durante il focolaio di mortalità in Italia hanno mostrato una distribuzione sistemica oltre che epiteliale dell'European sturgeon NCLDV e una persistenza del virus nei soggetti sopravvissuti all'infezione. In analogia con quanto già evidenziato per i ceppi Nord Americani di NCLDVs degli storioni, anche il ceppo Europeo ha mostrato un ciclo vitale complesso con due stadi di infezione: uno acuto e letale ed uno persistente e subclinico.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI VIRUS DELL'EPATITE E E ROTAVIRUS A IDENTIFICATI IN RATTI SINANTROPICI IN NORD ITALIA

G. Ianiro[1], L. De Sabato[1], F. M.Ruggeri[1], F. Ostanello[2], M. Monini[1], I. Di Bartolo[1]

[1]*Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia*
[2]*Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO), Italia*

Nell'uomo il virus dell'epatite E (HEV) causa un'epatite acuta in genere asintomatica, che può diventare cronica in pazienti immunosoppressi. Due dei quattro genotipi di HEV, i genotipi 3 e 4, specie *Orthohepevirus A*, sono considerati zoonotici, infettano l'uomo e diverse specie animali tra cui il suino, che viene considerato il serbatoio principale. I ceppi di HEV che infettano il ratto, appartengono ad un'altra specie, gli *Orthohepevirus C* (genotipo HEV-C1), ma sono stati identificati anche ceppi virali vicini ai ceppi zoonotici di genotipo 3.
I rotavirus di gruppo A (RVA) sono responsabili della maggior parte delle gastroenteriti acute stagionali in pazienti di età compresa tra 0 e 5 anni. Oltre gli umani, RVA infetta un'ampia varietà di mammiferi, inclusi i ratti. Il genoma di RVA è composto di 11 segmenti di dsRNA. Al fine di ottenere un'informazione dettagliata dei virus circolanti, dal 2008 è stato adottato un sistema di genotipizzazione che prevede l'assegnazione del genotipo a tutti i segmenti genomici di RVA.
La presenza di HEV in specie diverse di ratti è stata descritta in tutto il mondo con prevalenze comprese tra 0,3 e 18%, per quanto riguarda la circolazione di RVA, invece, sono ancora pochi gli studi disponibili.
Nel presente studio contenuti intestinali e campioni di fegato, provenienti da 40 ratti (*Rattus rattus*) catturati in prossimità di allevamenti suini in Nord Italia, sono stati analizzati per la ricerca dell'RNA virale di HEV e RVA. Il contenuto intestinale di un ratto (1/40, 2.5%) è risultato positivo per la presenza di RVA e uno per HEV, mentre tutti i campioni di fegato sono risultati negativi.
Il sequenziamento e l'analisi filogenetica hanno confermato la presenza del genotipo HEV-C1 di ratto, correlato ad altri ceppi di ratto identificati in America ma lontano dai ceppi di genotipo 3.
Lo stesso tipo di indagine effettuata per RVA ha permesso di stabilire il genotipo G3-P[3]-I1-R11-C11-M10-A22-N18-T14-E18-H13, il quale rappresenta una combinazione genomica caratterizzata dalla presenza di un gene di derivazione umana associato ad un genoma tipicamente animale.
In conclusione, la presenza di HEV e RVA in ratti circolanti in prossimità degli allevamenti costituisce un rischio per l'uomo, questi infatti possono servire da o ospiti o serbatoi di virus potenzialmente patogeni.

VIRUS DELL'EPATITE E: IDENTIFICAZIONE DI UN NUOVO SOTTOTIPO

L. De Sabato[1], G. Vaccari[1], P. Lemey[2], I. Di Bartolo[1]

[1]*Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Roma, Italia*
[2]*Rega Institute, Clinical and Epidemiological Virology, Leuven, Belgio*

Il virus dell'Epatite E (HEV) causa un'epatite acuta, autolimitante (mortalità 1%), che può tuttavia diventare cronica in soggetti immunodepressi. La maggior parte dei ceppi di HEV che infettano uomo e animali, appartengono alla specie *Orthohepevirus A*. Sulla base delle sequenze nucleotidiche, vengono classificati in 4 genotipi. I genotipi 1 e 2 infettano l'uomo, mentre i genotipi 3 e 4, considerati zoonotici, infettano l'uomo e diverse specie animali. I suini e in minor misura i cinghiali, vengono considerati i serbatoi principali.
All'interno dei genotipi, i ceppi virali sono classificati in sottotipi, sulla base del calcolo delle distanze genetiche delle regioni ORF1 e ORF2. Tuttavia, l'assegnazione di un nuovo ceppo ad un determinato sottotipo risulta difficoltosa a causa dell'assenza di criteri univoci. Il genotipo 3 identificato in tutto il mondo nell'uomo e nel suino, è suddiviso in 10 sottotipi (a-j). In Italia, i sottotipi più frequenti nel suino sono il g3e e il g3f. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di classificare il genoma completo di un ceppo suino di HEV estratto da un campione di feci e sequenziato tramite Ion Personal Genome Machine (PGM) e Sanger. Gli allineamenti, utilizzando i genomi completi privi della regione ipervariabile, o le sequenze complete della ORF1 o della ORF2, l'analisi filogenetica (ML) e il calcolo delle p-distance nucleotidiche sono stati effettuati utilizzando il software MEGA7. Negli alberi filogenetici ottenuti dei genomi completi e dei geni ORF1 e ORF2 il ceppo italiano forma insieme a un ceppo suino francese, un cluster separato da tutti gli altri ceppi suini e umani identificati in precedenza. Gli alberi ottenuti utilizzando singole regioni corte della Metiltransferasi, della RdRp o della parte terminale ORF2 non evidenziano questo cluster in maniera significativa. Al contrario, gli stessi risultati si ottengono utilizzando le regioni corte concatenate. Il calcolo delle p-distance inoltre conferma la sua vicinanza al ceppo francese e la separazione da tutti gli altri sottotipi. In conclusione, le analisi filogenetiche e il calcolo delle distanze tra e all'interno dei sottotipi, suggerisce l'appartenenza del ceppo italiano, ad un nuovo sottotipo. Questi risultati ci suggeriscono che, dove non è possibile analizzare il genoma completo degli isolati, per una corretta classificazione di sottotipi diversi di HEV, può essere sufficientemente informativo l'analisi di più regioni nucleotidiche e l'utilizzo di più approcci.

INDAGINE SIEROLOGICA PER VESIVIRUS 2117-LIKE NEI CANI

F. Di Profio[1], B. Di Martino[1], I. Melegari[1], V. Sacchese[1], I. Massirio[2], K. Banvai[3], M. Camero[4], P. Cornacchia[4], G. Dawgier[4], L. Bodnar[4], F. Marsilio[1], C. Buonavoglia[4], V. Martella[4]

[1]*Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo*
[2]*Azienda USL di Reggio Emilia, Reggio Emilia*
[3]*Institute for Veterinary Medical Research, Centre for Agricultural Research, Budapest, Hungary*
[4]*Università Aldo Moro di Bari, Valenzano*

I vesivirus (VeV) sono piccoli virus (38-40 nm) a RNA monocatenario, privi di envelope, appartenenti alla famiglia Caliciviridae. Nel 2003, un nuovo VeV, il ceppo 2117, è stato identificato come contaminante della linea cellulare continua CHO (Chinese hamster ovary) presso un'azienda farmaceutica tedesca. Contaminazioni simili sono state documentate presso i laboratori della biotech Genzyme, in tre distinti episodi, nel 2008 e 2009 negli Stati Uniti e nel 2008 in Belgio. Nonostante le numerose indagini, l'origine delle contaminazioni non è stata mai chiarita. Nel 2015, nuovi calicivirus, geneticamente correlati (89-90% identità nucleotidica) al VeV 2117 sono stati identificati con elevata prevalenza (64,8%) in campioni fecali di cani asintomatici provenienti da canili, e solo sporadicamente, in cani di proprietà con enterite (1,1%) o clinicamente sani (3,5%). Più recentemente, in uno screening sierologico, anticorpi anti-VeV 2117-like canino sono stati rilevati nel 7,8% di sieri umani, dimostrando la recettività dell'uomo alle infezioni sostenute da questo virus. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la prevalenza anticorpale per VeV 2117-like in una collezione di 516 sieri di cani di proprietà, suddivisi in gruppi sulla base delle classi di età. A tal fine, la proteina capsidica VP1 del VeV 2117-like canino (Bari/212/07/ITA), espressa mediante il sistema del baculovirus, è stata impiegata per l'allestimento di un kit ELISA. Tutti i sieri sono stati testati alla diluzione di 1:100. Anticorpi anti-VeV 2117-like sono stati identificati con una prevalenza complessiva del 21,5% (111/516), confermando la diffusione di questi virus o di ceppi antigenicamente correlati ad essi in cani di proprietà, sebbene con una prevalenza minore rispetto al dato molecolare riferito a contesti con elevata densità di popolazione. Esaminando la distribuzione anticorpale sulla base delle classi di età, è stata evidenziata la più bassa positività nei cani con età compresa tra 1 e 3 anni (11,1%, 7/63), mentre la più elevata è stata riscontrata negli animali di età compresa tra 4 e 6 anni (30,4%, 21/69) (P = 0,0098) e negli adulti >12 anni (30.9%, 21/68) (P = 0,0097). I risultati da noi ottenuti aggiungono ulteriori evidenze sul possibile ruolo primario del cane nella diffusione di questi virus in natura. Infine, considerando la stretta interazione uomo-cane, ulteriori indagini si rendono necessarie al fine valutare il potenziale zoonosico dei VeV 2117-like.

ANALISI GENOMICA DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA GENOTIPO ITA

V. Felice[1], G. Franzo[2], E. Catelli[1], M. Bonci[1], M. Cecchinato[2], D. Giovanardi[3], P. Presente[3], G. Mescolini[1], V. Listorti[1], F. Silveira[1], C. Lupini[1]

[1]*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - Ozzano dell'Emilia (BO)*
[2]*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova Agripolis - Viale dell'Università, 16 - Legnaro (PD)*
[3]*Laboratorio Tre Valli, Viale A. Veronesi 5, San Michele Extra (VR)*

La bursite infettiva è una malattia immunosoppressiva del pollo, ad elevata contagiosità, causata da un virus a RNA, *Infectious bursal disease virus* (IBDV), appartenente alla famiglia *Birnaviridae*, genere *Avibirnavirus,* il cui genoma codifica 5 proteine: VP5, VP2, VP4, VP3 e VP1. Sono conosciuti 2 sierotipi, di cui solo il sierotipo 1 include ceppi patogeni. IBDV è distinto nei patotipi classico, variante, *very virulent (vv)* e attenuato. Il genoma di IBDV è soggetto a mutazioni, che hanno portato all'evidenza di nuove varianti. Recentemente, in Italia, è stato segnalato un genotipo IBDV emergente, denominato ITA con caratteristiche genomiche uniche a livello della VP2.
Al fine di approfondire le caratteristiche del genotipo ITA, nel presente lavoro l'intero genoma virale è stato sequenziato e comparato alle sequenze totali o parziali di 47 ceppi IBDV disponibili in *GeneBank.*
Il genotipo ITA ha presentato residui amminoacidici comuni sia a ceppi *vv* sia a ceppi classici o attenuati. In particolare, sono stati evidenziati residui caratteristici di ceppi *vv* nelle proteine VP2, VP5 e VP1, tra i quali alcuni considerati determinanti di patogenicità. Residui caratteristici dei ceppi classici sono stati rilevati nella proteina VP2, come pure un residuo ritenuto in grado di ridurre la virulenza dei ceppi *vv* è stato evidenziato nella proteina VP1. Il genoma ha mostrato anche mutazioni peculiari nella proteina VP1, non riscontrate in alcun altro ceppo IBDV incluso nello studio.
L'analisi filogenetica ha confermato l'assenza di una stretta relazione tra ITA e gli altri ceppi IBDV. In particolare, l'analisi del segmento A, a livello del quale i sierotipi 1 e 2 divergono maggiormente, evidenziava che ITA è più vicino al sierotipo 2, rispetto ad altri genotipi.
Fenomeni di ricombinazione o riassortimento, evidenziati in molti dei ceppi IBDV inclusi nello studio, non sono stati riscontrati nel ceppo ITA.
L'analisi genomica ha confermato trattarsi di un ceppo IBDV geneticamente unico e che non presenta eventi di ricombinazione o riassortimento, nonostante l'evidenza di residui tipici di ceppi a diverso grado di virulenza. Ulteriori studi sembrano necessari, per meglio definire origine e virulenza del ceppo emergente ITA.

STUDIO DELLA TRASMISSIONE VERTICALE DI CAEV IN ANIMALI NATURALMENTE INFETTI

E. De Martin[1], M. Roccaro[1], G. Casà[1], L. Gallina[1], A. Scagliarini[1]

[1]*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università degli Studi di Bologna*

I lentivirus dei piccoli ruminanti (SRLV) sono un continuum genetico di specie di Retrovirus in grado di infettare capre e pecore provocando, rispettivamente, l'Artrite Encefalite Caprina (CAE) e la Maedi Visna (MV). La trasmissione di questi virus avviene solitamente tramite l'assunzione da parte del neonato di colostro e latte infetti, mentre nell'adulto è possibile la trasmissione orizzontale via aerosol. Non essendo disponibili vaccini e/o trattamenti terapeutici, il controllo delle infezioni è incentrato sulla separazione degli animali alla nascita, la somministrazione di colostro e latte termizzati o artificiali, la creazione di gruppi separati e l'eliminazione dei capi sieropositivi dall'allevamento, fino al completo rinnovamento del gregge. Ciononostante, si sono osservati casi di sieroconversione in circa il 10% dei soggetti, anche quando ottenuti per parto cesareo. Le opinioni riguardo all'infezione prenatale sono ancora discordanti, ma sembra che l'eventuale infezione intrauterina avvenga nelle ultime fasi della gestazione, giacché l'infezione sperimentale di feti con meno di 60 giorni di gestazione porta puntualmente a riassorbimento embrionale o aborto.

Per approfondire le informazioni riguardo alla trasmissione intrauterina, sono stati presi in esame 24 capretti nati da madri naturalmente infette da SRLV-B1 e provenienti da uno stesso allevamento. Il sangue e il cordone ombelicale sono stati prelevati entro pochi minuti dal parto, prima dell'assunzione del colostro, e le rispettive placente sono state campionate. I capretti sono stati monitorati per i 2 mesi successivi con prelievi ematici periodici per valutare il momento dell'infezione e di sieroconversione. I campioni sono stati analizzati per evidenziare la presenza del DNA provirale tramite amplificazione del promotore virale LTR-U3 in PCR. Le sequenze ottenute sono state inoltre confrontate con quelle delle varianti virali del sangue e del latte delle madri.

Il 30% dei campioni prelevati al T0 è risultato positivo, escludendo che l'infezione avvenga intrapartum, ma suggerendo che avvenga per via transplacentare. La positività di un terzo dei cordoni ombelicali e di alcune placente rafforza a sua volta questa ipotesi rispecchiando quanto evidenziato in corso d'infezione da HIV-1 nell'uomo.

CO-INFEZIONI DA PAPILLOMAVIRUS E PARAPOXVIRUS IN LESIONI CUTANEE DI BOVINI IN SICILIA

F. Savini[1], L. Gallina[1], P. Di Marco[2], D. Vicari[2], R. Puleio[2], A. Lavazza[3], G. Purpari[2], A. Guercio[2], A. Scagliarini[1]

[1]*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università degli Studi di Bologna*
[2]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo, Italy*
[3]*Reparto di Virologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", Brescia*

La papillomatosi del bovino è una malattia infettiva contagiosa virale che causa neoformazioni cutanee diffuse fino ad assumere quadri clinici di estrema gravità causando ricadute economiche rilevanti soprattutto quando le lesioni sono localizzate a livello mammario e degli organi genitali. Nelle lesioni sono fino ad oggi stati identificati e completamente sequenziati 15 tipi di Papillomavirus bovini (BPVs), in grado di colpire epidermide e derma. La patologia è distribuita a livello mondiale e la diagnosi è perlopiù effettuata clinicamente o mediante osservazione delle particelle virali al microscopio elettronico. La profilassi negli allevamenti bovini può essere eseguita con vaccini stabulogeni. La diagnosi molecolare consente di identificare tipi e varianti virali con differente potere patogeno e di caratterizzarne il genoma. Inoltre, è stato già dimostrato che le lesioni proliferative possono albergare co-infezioni con virus potenzialmente zoonotici appartenenti alla famiglia *Poxviridae*. La nostra indagine si è posta l'obiettivo di valutare la presenza e distribuzione di virus epiteliotropi in lesioni papillomatose di bovini da latte e da carne di differenti provincie della Sicilia. Campioni patologici sono stati analizzati tramite ME e le lesioni classificate istologicamente. In seguito sono state eseguite PCR con primer BPVs, orthopoxvirus e parapoxvirus specifici e Rolling Circle Amplification (RCA). In tutti i campioni è stato identificato almeno uno dei quattro generi di BPVs, tra cui i Delta tipo 1 e 2 sono risultati i più rappresentati. Le co-infezioni sono risultate più frequenti rispetto alle infezioni singole inoltre, nel 50% delle lesioni positive alla ME per il solo papillomavirus, è stato rilevato anche DNA di virus appartenenti al genere parapoxvirus. La possibilità di instaurare infezioni subcliniche nel bovino da parte di agenti zoonosici appartenenti alla famiglia *Poxviridae* è stata riportata anche da altri autori e suggerisce l'importanza della diagnosi molecolare accanto a quella clinica per evitare la trasmissione dell'infezione all'uomo e ad altri animali.

I CHIROTTERI COME RESERVOIR DI VIRUS ZOONOTICI EMERGENTI IN ITALIA: IMPLICAZIONI PER LA SALUTE PUBBLICA E LA CONSERVAZIONE BIOLOGICA

D. Lelli[1], P. De Benedictis[2], N. Decaro[3], A. Prosperi[1], S. Leopardi[2], P. Priori[4], M.B. Boniotti [1], A. Papetti[1], D. Scaravelli[4], E. Rosti[5], C. Chiapponi[1], E. Sozzi[1], P. Bonilauri[1], S. Perulli[1], A. Moreno[1], A. Lavazza[1]

[1]*Istituto Zooprofillatico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Via Bianchi 9 - Brescia, Italy*
[2]*Istituto Zooprofillatico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10 - Legnaro (PD), Italy*
[3] *Università degli Studi di Bari, Facoltà di Medicina veterinaria, Strada Provinciale per Casamassima Km 3 - Valenzano (BA), Italy*
[4]*S.T.E.R.N.A. & Museo Ornitologico "F. Foschi", via Pedrali 12, Forlì, Italy*
[5]*Centro Fauna Selvatica "Il Pettirosso", Via Nonantolana - Modena, Italy*

I pipistrelli sono universalmente conosciuti come reservoir di virus emergenti a rischio zoonosico. Considerando la carenza di dati eco-epidemiologici sulla circolazione di virus nelle popolazioni di pipistrelli in Italia, nel 2014 il Ministero della Salute ha finanziato nell'ambito del Bando Ricerca finalizzata/giovani ricercatori un progetto dal titolo *"An epizootiological survey of bats as reservoirs of emerging zoonotic viruses in italy: implications for public health and biological conservation"* finalizzato ad approfondire sia gli aspetti di sanità pubblica che di conservazione biologica attraverso lo studio delle principali infezioni virali in pipistrelli autoctoni in Italia.
L'indagine è principalmente orientata all'identificazione di coronaviruses (CoVs), lyssaviruses (LYSVs) e orthoreoviruses (MRVs), ma, attraverso un protocollo diagnostico ad ampio spettro, mira anche ad investigare la presenza di altri virus potenzialmente zoonosici o patogeni per gli stessi pipistrelli. Nel corso della sorveglianza passiva attuata nei primi 18 mesi di progetto (2014-2016) sono stati raccolti 247 campioni da 7 differenti specie, suddivisi in 142 carcasse e 105 campioni fecali. L'attività di sorveglianza attiva è stata eseguita attraverso il campionamento di 5 colonie miste di *M. myotis* e *M. blythii* localizzate nel territorio altoatesino e prevedeva la raccolta di campioni di sangue, tamponi orali e feci da un numero statisticamente significativo di soggetti.
I risultati ottenuti dimostrano che l'infezione da CoVs è largamente diffusa tra le popolazioni di pipistrelli in Italia con dati di prevalenza globali del 5-7% in 5 diverse specie. Le sequenze del genoma virale ottenute appartengono al genere Alpha-CoV e Beta-CoV clade 2c (MERS-like CoV) e 2b (SARS-like CoV). Positività sierologiche per LYSVs sono state rilevate in due colonie miste di *M. Myotis* e *M. blythii* mentre non si è ottenuta alcuna positività virale. Lo studio conferma inoltre il ruolo dei pipistrelli come carrier di una grande varietà di MRVs, permettendo l'isolamento di ceppi riassortanti dei sierotipi 1 e 2 e di ceppi MRV3 correlati a virus responsabili di forme enteriche nell'uomo e suino. Positività per astroviruses e adenovirus sono state inoltre rilevate rispettivamente in 2 campioni fecali (*Pip. kuhlii*) e in un campione d'organo (*H. savii)*. Lo studio fornisce un quadro significativo ancorché preliminare sulla distribuzione delle principali infezioni virali nei pipistrelli in Italia.

IL RUOLO DELL'ASSOCIAZIONE OSPITE-PATOGENO NELL'EVOLUZIONE DI ALPHA E BETACORONAVIRUS (COV) NEI CHIROTTERI

S. Leopardi[1], M. Gastaldelli[1], L. Tassoni[1], G. Zamperin[1], P. Priori[2], D. Scaravelli[3], P. De Benedictis[1]

[1] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)*
[2] *S.T.E.R.N.A., Forlì*
[3] *Università degli studi di Bologna, Forlì*

Il ruolo dei chirotteri nell'evoluzione di alpha e betacoronavirus (CoV) è stato finora fortemente ipotizzato, alla luce della loro notevole variabilità genetica e incidenza in diverse specie di pipistrelli a livello globale. Lo scopo del presente studio è quello di individuare le dinamiche evolutive dei CoV nei chirotteri e di valutarne le potenzialità per il salto di specie.

Le analisi filogenetiche sono state effettuante a partire da 2 database composti da sequenze di RNA-polimerasi-RNA-dipendente (*RdRp*) di CoV associati ai chirotteri (461) oppure a tutti i mammiferi (561), mediante approccio Bayesiano (MrBayes v3.2.4). La compartimentalizzazione in relazione all'ospite è stata testata con BaTS_beta_build2 e la congruenza con la filogenesi dei chirotteri con il Parafit_test (R v3.2.5). I casi di *spillover* identificati tra ospiti divergenti sono stati quindi analizzati al fine di valutare il livello di trasmissione intra-specifica nell'ospite ricevente.

I risultati di tale studio hanno supportato la stratificazione filogenetica dei CoV in base al genere, alla specie e all'origine geografica dell'ospite. Tuttavia, solamente i cluster genere-specifici sono compatibili con la definizione di specie virali distinte.

Le analisi hanno individuato 24 *spillover* tra generi diversi, confutando la co-speciazione come principale meccanismo evolutivo dei CoV. Di questi, la trasmissione intra-specifica (determinata da una maggiore variabilità genetica nella specie ricevente rispetto al cluster d'origine) è sostenuta soltanto a seguito di *spillover* tra generi correlati. Quest'ultimo risultato suggerisce che la vicinanza filogenetica tra gli ospiti favorisca il salto di specie ed è consistente con i risultati delle analisi co-evolutive, che confermano un parallelismo tra la filogenesi dei coronavirus e dei chirotteri.

In conclusione, il nostro studio suggerisce che i CoV si siano diversificati principalmente a seguito di fenomeni di salto d'ospite e non per co-divergenza come suggerito in precedenza. Ciò ne sottolinea il potenziale di emergere in nuovi ospiti. Degna di nota è la presenza di co-infezioni di alpha e betaCoV in *Rhinolophus, Pipistrellus* e *Hipposideros*, ospiti ad alto rischio di generare virus ricombinanti e con nuovo potenziale pandemico.

CIRCOLAZIONE DEL VIRUS DELL'EPATITE E IN ITALIA: ANALISI FILOGENETICA ED EVOLUTIVA

C. Montesano[1], M. Giovanetti[1], M. Ciotti[2], E. Cella[3,4], A. Lo Presti[3], A. Grifoni[5], G. Zehender[6], S. Angeletti[7], M. Ciccozzi[3,7]

[1] *Dipartimento di Biologia, Università Tor Vergata di Roma, Italia*
[2] *Laboratorio di Virologia Molecolare, Policlinico Tor Vergata di Roma, Italia*
[3] *Dipartimento di Malattie Infettive Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia*
[4] *Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie infettive, Sapienza Università di Roma, Italia*
[5] *ProxAgen Ltd, Sofia, Bulgaria*
[6] *Laboratorio di Malattie Infettive e Medicina Tropicale, Università degli Studi di Milano, Italia*
[7] *Patologia Clinica e Laboratorio di Microbiologia, Ospedale Universitario Campus Biomedico, Roma, Italia*

Il Virus dell'epatite E (HEV), una delle principali cause di epatite virale acuta nei paesi in via di sviluppo, è stato classificato in quattro genotipi principali e in una serie di sottotipi. Sono stati recentemente identificati nuovi genotipi in vari mammiferi, compreso il genotipo 3, che ha una distribuzione mondiale. E' stata studiata mediante analisi filogenetica la diversità genetica di ceppi HEV umani e ceppi HEV isolati da maiali. E' stata eseguita l'analisi temporale, con la stima della data di origine e la storia demografica del genotipo 3 di HEV. Sono stati costruiti tre dataset di sequenze: il primo ed il secondo sono stati utilizzati per analizzare e confermare il genotipo delle sequenze, mentre il terzo dataset è stato usato per stimare il tasso evolutivo e per determinare la filogenesi in scala temporale e la storia demografica. L'analisi filogenetica bayesiana ha mostrato come stima temporale per la radice dell'albero, un origine al 1907 (95% HPD: 1811-1975). Sono poi presenti due clade principali divisi in due sub-clade. L'analisi relativa allo skyline plot, effettuata separatamente per le sequenze umane e quelle isolate dai suini ha mostrato la presenza di un "collo di bottiglia" solo nello skyline relativo alle sequenze isolate dai suini. L'analisi della pressione selettiva ha rivelato solo dei siti sotto pressione selettiva negativa ($dN/dS < 1$). Questo studio supporta l'ipotesi che gli esseri umani si sono probabilmente infettati dopo il contatto con la fonte suina. I risultati sottolineano l'importanza di controllare la provenienza, il paese di origine dei suini e migliorare le misure di controllo sanitario dal punto di vista veterinario, per prevenire la diffusione delle infezioni da HEV in Italia.

ANALISI FILOGENETICA SPAZIO-TEMPORALE DI VIRUS DELLA BORDER DISEASE NEL CAMOSCIO

C. Luzzago[1], E. Ebranati[2], O. Cabezon[3,4], L. Fernandez-Sirera[3,4], S. Lavin[3], R. Rosell[4,5], C. Veo[2], L. Rossi[6], S. Cavallero[7], P. Lanfranchi[1], M. Ignasi[3], G. Zehender[2]

[1]*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia*
[2]*Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "L. Sacco", Università degli studi di Milano, Milano, Italia*
[3]*Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge, Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain*
[4]*Centre de Recerca en Sanitat Animal, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain*
[5]*Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain*
[6]*Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Grugliasco, Torino, Italia*
[7]*Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia*

Il virus della *Border disease* (BDV) appartiene al genere *Pestivirus* ed è ampiamente diffuso nell'ovino, che rappresenta l'ospite principale. Infezioni sono state segnalate anche in altri ruminanti domestici e selvatici, fra cui il camoscio. Gli stipiti di BDV segregano in almeno sette gruppi filogenetici diffusi con diversa frequenza a livello mondiale. Dal 2001 numerosi focolai associati a BDV-4 hanno determinato un forte impatto demografico nel camoscio dei Pirenei (RUPICAPRA PYRENAICA *pyrenaica*).
Al fine di ricostruire origine e diffusione spazio-temporale di BDV nel camoscio, è stata condotta un'analisi filogenetica di 95 sequenze (5'UTR) di stipiti virali isolati dal camoscio pirenaico, camoscio alpino (*R. rupicapra rupicapra*) e da ungulati domestici, includendo sia sequenze nuove che disponibili in banca dati. Gli alberi filogenetici sono stati costruiti mediante approccio bayesiano con tecniche Markov Chain Monte Carlo, utilizzando il programma BEAST v1.7.4.
L'unica sequenza disponibile di BDV nel camoscio alpino (Alpi francesi) si è confermata appartenere a BDV-6 ovino, mentre le sequenze del camoscio pirenaico si raggruppano in un unico cluster altamente significativo, che origina da BDV-4 ovino. L'introduzione di BDV-4 nella popolazione di camoscio pirenaico è risultata risalire indicativamente al 1989 nei Pirenei Orientali. L'analisi filogeografica ha permesso di ricostruire gli eventi di infezione fra le diverse aree interessate dai focolai di BDV del camoscio pirenaico, evidenziando due flussi di diffusione principali, rispettivamente verso i Pirenei Centrali e Occidentali.
In conclusione, i dati ad oggi disponibili evidenziano due quadri epidemiologici differenti nel camoscio alpino rispetto a quello pirenaico. Il camoscio alpino presenta una frequenza di infezione sporadica associata a stipiti ovini ed in assenza di manifestazioni conclamate, contrariamente all'ampia diffusione ed elevata mortalità osservata nei Pirenei. BDV-4 nel camoscio pirenaico è risultato di recente introduzione, precedendo infatti di un decennio il primo focolaio del 2001. In seguito flussi di dispersione di BDV-4 hanno permesso la diffusione ed il mantenimento dell'infezione, che attualmente risulta endemica in alcune aree dei Pirenei Occidentali.

BOVINE HERPESVIRUS 4 RICOMBINANTE PER UNA FORMA CHIMERICA DELL'ONCOANTIGENE HER-2 PROTEGGE NEI CONFRONTI DEL TUMORE MAMMARIO IN UN MODELLO MURINO

F. Macchi[1], V. Rolih[2], E. Quaglino[2], V. Franceschi[1], G.Tebaldi[1], E. Bolli[2], A. Rosamilia[a1] S. Cavirani [1], F. Cavallo[2] and G. Donofrio[1]

[1]*Department of Medical-Veterinary Science, University of Parma, Parma, Italy*
[2]*Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Molecular Biotechnology Center, University of Torino, Torino, Italy*
[3]*Department of Life Sciences, Biochemistry and Molecular Biology Unit, University of Parma, Parma, Italy*

Uno dei maggiori target impiegati nell'immunoterapia antitumorale per il cancro al seno è l'oncogene HER-2. Ad oggi l'impiego terapeutico di anticorpi monoclonali diretti contro HER-2 ha mostrato risultati soddisfacenti. Sono state inoltre sperimentate diverse strategie di immunoprofilassi contro HER-2 per risolvere il problema dovuto all'auto-tolleranza di HER-2. Mentre, la strategia meno esplorata per conferire immunizzazione attiva contro HER-2, probabilmente a causa dei rischi relativi a sicurezza ed efficacia, è stata quella delle formulazioni vaccinali basate sull'utilizzo di vettori virali.
In questo lavoro, avvalendoci delle proprietà biologiche del bovine herpesvirus 4 (BoHV-4), in termini di sicurezza, di facilità di manipolazione e delle sue già documentate capacità di trasdurre e conferire immunogenicità contro antigeni eterologhi, abbiamo testato la capacità di diversi ricombinanti HER-2/BoHV-4 per baipassare il problema relativo all'auto-tolleranza di HER-2 e per stimolare una risposta anticorpale protettiva contro il cancro al seno in topi BALB-neuT HER-2 transgenici. Tutti i costrutti testati hanno mostrato un'elevata espressione dei transgeni HER-2 ed hanno stimolato significative risposte immunitarie cellulo-mediate nei topi BALB/c sia dopo vaccinazione DNA mediata che a seguito dell'infezione virale.
In particolare, nei topi BALB neuT, solamente il costrutto virale esprimente la forma chimerica membrana-associata della proteina HER-2 (BoHV-4-RHuT-gD) ha suscitato una risposta immuno-umorale più intensa e precoce di quella indotta in seguito a vaccinazione con DNA.
In linea con questo dato sperimentale si è inoltre osservato che due somministrazioni di BoHV-4-RHuT-gD sono in grado di proteggere i topi BALB neuT dalla formazione della massa tumorale, infatti il 50% degli animali vaccinati risultano essere privi di tumore a 30 settimane dall'immunizzazione in confronto al 100% degli animali vaccinati con gli altri costrutti HER-2-BoHV-4 che mostrano almeno un tumore palpabile.

POTENZIALE IMPIEGO DEI FLUIDI ORALI PER LA DIAGNOSI DI PESTE SUINA CLASSICA (PSC)

S. Petrini[1], I. Pierini[1], L. Molinari[1], C. Casciari[1], M. Pela[1], M. Giammarioli[1], F. Feliziani[1] e G.M.De Mia[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia*

I fluidi orali sono rappresentati da saliva e trasudato e originano dal sistema circolatorio. Possono essere raccolti facilmente da singoli o gruppi di animali, previa collocazione in un box, per 15-20 minuti, di una corda di cotone che viene lasciata masticare. Successivamente, dalla corda, viene recuperato il liquido che può così essere impiegato per indagini di laboratorio. In questi ultimi anni, in veterinaria, i fluidi orali sono stati utilizzati sia per il rilievo degli anticorpi che dell'agente eziologico di diverse malattie infettive virali e batteriche. L'obiettivo della presente ricerca è stato quello di verificare il potenziale impiego dei fluidi orali per la diagnosi diretta e indiretta di PSC.

Allo scopo sono stati utilizzati 8 suini ibridi commerciali che, durante i primi 7 giorni di acclimatamento, sono stati addestrati a masticare le corde prima di essere alimentati. I suini sono quindi stati sperimentalmente infettati con il virus PSC, stipite Alfort 187. Giornalmente gli animali sono stati sottoposti ad osservazioni cliniche e a rilievo termometrico. Campioni singoli di fluido orale e sangue sono stati raccolti da ciascun animale ad intervalli di tempo regolari, fino a 51 giorni post-infezione (GPI), sia per le indagini sierologiche, condotte con ELISA commerciale e test di sieroneutralizzazione, sia per quelle virologiche, mediante Real-Time PCR.

Sette suini hanno evidenziato un rialzo febbrile che è durato in media 6 giorni, accompagnato da lieve e transitoria sintomatologia. Cinque suini sono venuti a morte tra 11 e 35 GPI, i rimanenti sono stati sacrificati alla fine dell'esperimento. La prova ELISA ha rilevato anticorpi dai campioni di sangue a partire da 15 GPI fino al termine dell'esperimento, mentre nessuna positività è stata accertata dai fluidi orali. Analogamente, anticorpi neutralizzanti sono stati riscontrati nei campioni di sangue a partire da 10 GPI, mentre i corrispondenti fluidi orali sono risultati negativi. Da tutti gli animali è stato possibile rilevare la presenza del virus sia dal sangue che dai fluidi orali, da 8 a 37 GPI.

In conclusione, contrariamente a quanto ci si aspettava, i fluidi orali non sembrano costituire una matrice idonea al rilievo degli anticorpi anti PSC. Potrebbero invece trovare un utile impiego nella ricerca diretta del virus, ad esempio nel corso di estese campagne di screening, poiché sono facilmente prelevabili e rappresentano un metodo non invasivo, alternativo a quello tradizionale.

RUOLO DELLA PROTEINA STAT2 COME FATTORE DETERMINANTE DEL TROPISMO SPECIE SPECIFICO DEL VIRUS DELLA FEBBRE GIALLA

G. Pisanelli [1,2,3], M. Laurent-Rolle [2], J. Morrison [2], G. Iovane [1], A. Garcia-Sastre [2,3,4]

[1] *Department of Veterinary Medicine and Animal Production, University of Naples Federico II, via Federico Delpino 1, Naples, Italy*
[2] *Department of Microbiology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai One Gustave L. Levy Place, New York, USA*
[3] *Global Health and Emerging Pathogens Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai One Gustave L. Levy Place, New York, USA*
[4] *Department of Medicine, Division of infectious Disease, Icahn School of Medicine at Mount Sinai One Gustave L. Levy Place, New York, USA*

Il virus della febbre gialla (YFV) è l'agente eziologico della febbre gialla, una malattia virale acuta che causa, secondo le stime dell'OMS, 200.000 casi e 30.000 morti l'anno. YFV è un virus a RNA, appartenente al genere Flavirus, famiglia Flaviviridae ed è trasmesso da diverse specie di zanzara Aedes. L'incidenza della malattia è stata drasticamente ridotta con l'introduzione del vaccino YFV-17D, nella prima metà del secolo scorso, un vaccino vivo attenuato molto efficace in grado di produrre un'immunità duratura. Tuttavia, negli ultimi anni, sono stati riportati effetti avversi associati alla vaccinazione che si manifestano sotto forma di malattia viscerotropica e neurotropica. L'incidenza di febbre gialla è in aumento dal 1980. Non ci sono farmaci antivirali disponibili per trattare la malattia, e i tentativi di sviluppare farmaci antivirali specifici per YFV o per lo sviluppo di vaccini alternativi sono stati ostacolati dalla mancanza di un modello murino immunocompetente in grado di sviluppare una sintomatologia da febbre gialla.
Il ceppo wild-type (Asibi) e il ceppo 17D (vaccino) della febbre gialla, sono in grado di infettare topi che sono difettivi nel signaling dell' interferone di tipo I (IFN-I). A differenza del topo wild-type, i topi privi del recettore per IFN-I (IFNAR) e i topi mancanti della proteina STAT1 mostrano viremia, una sintomatologia gastroenterica e mortalità quando sono infettati con YFV-Asibi. Ciò suggerisce che la risposta dell'IFN-I si comporta come il principale ostacolo all'infezione nel topo.
In questo lavoro dimostriamo che la proteina non strutturale NS5 del virus della febbre gialla (YFV-NS5) non è in grado di legare la proteina STAT2 murina e inibire il signaling dell'IFN-I in questa specie. Abbiamo mappato la regione della proteina STAT2 di origine umana che lega la proteina YFV-NS5 e abbiamo dimostrato che è la stessa regione in cui la proteina NS5 del virus di dengue (DENV) si lega a STAT2.
È interessante notare che, in contrasto con il virus di dengue, YFV-NS5 non è in grado di legare la proteina STAT2 umana in cellule murine indicando che oltre a STAT2 ci sono altri fattori specifici umani che sono necessari per la proteina YFV-NS5 all'inibizione del signaling dell'IFN-I.
Inoltre, abbiamo mostrato che anche nel criceto il signaling dell'IFN-I inibisce la replicazione del virus della febbre gialla YFV, e che nelle cellule di criceto mancano quei fattori necessari alla proteina NS5 per legare la proteina STAT2 umana.

INDAGINE PRELIMINARE SULLE INFEZIONI DA *HERPESVIRUS* IN TARTARUGHE DEL GENERE *TESTUDO* IN ITALIA: GENOTIPIZZAZIONE E CONSIDERAZIONI DIAGNOSTICHE

S. Preziuso[1], M. Moriconi[1], V. Cuteri[1]

[1]*Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria, Università di Camerino*

Le infezioni da *Herpesvirus* nelle tartarughe terrestri hanno grande importanza in quanto possono causare malattie di diversa gravità. Analogamente ad altri *Herpesvirus*, questi virus possono dare luogo ad infezioni latenti ed animali asintomatici, in seguito ad eventi stressanti, possono diventare eliminatori e presentare la malattia. In assenza di vaccini disponibili, l'individuazione dei soggetti infetti e la corretta gestione sanitaria dei gruppi sono indispensabili per la salvaguardia degli allevamenti. Per sviluppare test diagnostici efficaci è necessario conoscere bene le caratteristiche genetiche ed antigeniche dei virus che, in questo settore, sono ancora limitate.

Ad oggi gli *Herpesvirus* delle tartarughe terrestri non sono classificati ufficialmente. Tuttavia recenti studi scientifici hanno proposto il nome *Testudinid Herpesvirus* (TeHV), numerando progressivamente in senso cronologico i diversi genotipi rilevati. Attualmente sono stati proposti 4 genotipi di TeHV.

L'obiettivo di questo lavoro era quello di identificare i genotipi di TeHV circolanti in tartarughe terrestri in Italia.

Per questo scopo sono stati utilizzati 57 campioni di tartarughe terrestri prelevati tra il 2012 e il 2015. Di questi, 3 provenivano da tartarughe asintomatiche, 30 da soggetti con anamnesi di affezioni orali e/o respiratorie o di convivenza con animali deceduti e 24 da animali con anamnesi muta. Il DNA estratto dai tamponi mediante kit commerciale è stato sottoposto a nested PCR per il gene che codifica la DNA polimerasi. I prodotti ottenuti sono stati sequenziati e sottoposti ad analisi filogenetica. Sono state inoltre eseguite PCR e Real Time Sybr Green PCR per i geni UL5 e UL39, queste ultime condotte in cieco, senza conoscere i risultati dei sequenziamenti. 15 tamponi sono risultati positivi in nested PCR, 5 mostravano omologia con sequenze di TeHV-1 e 10 mostravano omologia con sequenze di TeHV-3. Le RT-PCR sono risultate positive per UL39 solamente nei 10 campioni riconducibili a TeHV-3 e per UL5 solamente nei 5 campioni di TeHV-1.

I risultati dimostrano la circolazione in Italia sia di TeHV-1 che di TeHV-3, mentre non sono stati evidenziati TeHV-2 e TeHV-4. Questo lavoro rappresenta un punto di partenza per caratterizzare meglio i diversi genotipi di TeHV, per evidenziare eventuali sottotipi e per valutare potenziali correlazioni con le manifestazioni cliniche, il tropismo d'ospite ed il grado di patogenicità.

SORVEGLIANZA SIEROLOGICA NELL'AVIFAUNA SELVATICA: IMPIEGO DI ANTICORPI MONOCLONALI PAN-AVIAN

A. Prosperi[1], D. Lelli[1], A. Moreno[1], E. Sozzi[1], R. Pezzotti[2], J. Figuerola[3], R. Soriguer[3], L. Capucci[1], E. Brocchi[1], A. Lavazza[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", Via Bianchi 9, Brescia, ITALY*
[2]*Veterinario libero professionista, Via Martignago 69/b, Sulzano (BS), ITALY*
[3]*Estación Biológica de Doñana-CSIC, Avda. Américo Vespucio s/n, Sevilla, SPAIN*

L'avifauna selvatica svolge un ruolo fondamentale come *reservoir* di diversi agenti virali, tra cui West Nile virus (WNV) ed Usutu virus (USUV). Gli uccelli migratori rappresentano inoltre una via d'introduzione e disseminazione dei virus nell'arco delle loro rotte migratorie. Pertanto le indagini sierologiche nell'avifauna selvatica sono uno strumento cruciale per acquisire informazioni epidemiologiche, ma la loro applicabilità è spesso limitata dalla carenza di saggi sierologici indiretti, funzionali al ridotto volume del campione reperibile in queste specie. Gli obiettivi di questo lavoro sono stati la produzione e la caratterizzazione di mAb *pan-avian*, cross-reattivi nei confronti delle immunoglobuline (Ig) di diverse specie aviari, e la valutazione della loro applicabilità in test ELISA indiretti. Topi Balb/c sono stati quindi immunizzati utilizzando due diversi antigeni: IgG di pollo purificate ed IgG purificate provenienti da 4 specie aviari (*Columba livia*, *Pica pica*, *Gallus gallus*, *Coturnix coturnix*) appartenenti a 4 differenti ordini. Gli ibridomi, prodotti con un protocollo standardizzato, sono stati prima sottoposti a *screening,* usando l'antigene omologo, e quindi caratterizzati usando piastre ELISA rivestite sia con le Ig di 39 specie aviari appartenenti a 14 ordini diversi, sia con Ig di mammiferi per valutarne l'eventuale reattività aspecifica. Ciò ha permesso l'identificazione e la caratterizzazione di 105 ibridomi con un differente pattern di reattività nei confronti delle Ig aviari. I mAb con il più ampio spettro di cross-reattività verso le specie aviari e nessuna cross-reattività per i mammiferi, sono stati clonati, purificati e coniugati HRP. Il coniugato col miglior quadro di reattività è stato impiegato per lo sviluppo di test ELISA indiretti, per l'identificazione di anticorpi aviari multispecie nei confronti di WNV ed USUV. Sono state sensibilizzate piastre ELISA con un antigene ricombinante corrispondente al DIII della proteina E di WNV od USUV (*Institut Pasteur*), posto quindi a contatto con sieri aviari noti. L'avvenuta reazione antigene-anticorpo è stata rilevata impiegando il mAb-HRP *pan-avian* selezionato. I risultati ottenuti sono stati quindi confrontati con quelli ricavati dal test sierologico di riferimento (sieroneutralizzazione), per una preliminare validazione.
In conclusione, i mAb *pan-avian* sono reagenti potenzialmente impiegabili in reazioni ELISA per lo studio delle infezioni virali degli uccelli domestici e selvatici.

CARATTERIZZAZIONE CLINICO-PATOLOGICA DI DUE DIFFERENTI ISOLATI DI BLUETONGUE VIRUS SIEROTIPO 1 (BTV-1) IN ARIETI

D. Pintus[1], G. Puggioni[1], G. Meloni[1], A.M. Rocchigiani[1], D. Manunta[1], E. Melzi[2], G. Savini[3], M. Palmarini[2], M. Dattena[4], M. Oggiano[1], C. Ligios[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari, Italia*
[2]*MRC–University of Glasgow Centre for Virus Research, Glasgow, United Kingdom*
[3]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo, Italia*
[4]*AGRIS –Dipartimento per la Ricerca nelle Produzioni animali, Olmedo, Sassari, Italia*

Bluetongue virus (BTV) è un arbovirus di cui si conoscono oltre 27 sierotipi che determina nei ruminanti una sindrome iperemico-emorragica estremamente variabile, caratterizzata da decorsi clinici da inapparenti ad estremamente gravi con esito letale. In questo lavoro sono comparati gli aspetti clinico-patologici, virologici e sierologici osservati in arieti inoculati con due differenti isolati di BTV sierotipo 1 (BTV1) responsabili in Sardegna delle epidemie rispettivamente del 2006 (BTV1-2006) e 2013 (BTV1-2013).
Allo scopo, campioni di sangue in EDTA positivi al test real time RTPCR BTV1-2006 (ct 25.7) e BTV1-2013 (ct 26) sono stati inoculati per via intradermica (ID) e sottocutanea (SC) a due differenti gruppi di arieti.
Gli animali sono stati sottoposti serialmente ad eutanasia ed adeguatamente campionati per le analisi sierologiche, virologiche, anatomo-istopatologiche e immunoistochimiche.
Il rialzo termico (+40°C) è comparso a 3 giorni *post inoculum* (*p.i*) nel gruppo BTV1-2006 e a 6 giorni *p.i.* nel gruppo BTV1-2013. Inoltre i giorni cumulativi di febbre sono risultati 5 e 2, rispettivamente per gli arieti inoculati con BTV1-2006 e BTV1-2013.
Tutti gli aspetti clinici si sono rilevati molto più gravi negli arieti del gruppo inoculato con l'isolato BTV1-2006, nei quali l'esito è stato fatale nel 100% dei soggetti inoculati, mentre gli arieti inoculati con BTV1-2013 hanno manifestato una lieve sintomatologica clinica. In entrambi i gruppi gli animali hanno manifestato clinicamente eritema ed edema o, al contrario, cianosi dello scroto. Immunoistochimicamente le proteine virali VP7 e NS2 di BTV sono state riscontrate nelle cellule endoteliali a livello di testicolo, epididimo e cute dello scroto già a 5 giorni *p.i.* in tutti gli arieti infettati.
La presenza di anticorpi contro BTV è stata riscontrata con cELISA a 6 giorni *p.i* in tutti gli animali inoculati. L'RNA di BTV è stato evidenziato mediante Real Time RT-PCR nel sangue e in tutti gli organi campionati, ma la presenza di RNA virale è risultata più elevata negli arieti inoculati con BTV1-2006.
Dal nostro studio emerge come, a parità di condizioni sperimentali, differenti isolati di BTV dello stesso sierotipo possano avere simili aspetti clinici ed anatomo-patologici, ma differire notevolmente per la gravità dei sintomi e lesioni, che portano ad un esito completamente diverso.

ANALISI DEL TRASCRITTOMA DI CELLULE STROMALI ENDOMETRIALI BOVINE (BESC) INFETTATE CON BOHV-4

G. Tebaldi[1], S. Jacca[1], B. Montanini[2], E. Capra[3], A. Rosamilia[1], S. Cavirani[1], A. Stella[3], B. Castiglioni[3], S. Ottonello[2] and G. Donofrio[1].

[1]Department of Medical-Veterinary Science, University of Parma, Parma, Italy
[2]Department of Life Sciences, Biochemistry and Molecular Biology Unit, University of Parma, Parma, Italy
[3]National Research Council (CNR), Institute of Agricultural Biology and Biotechnology, Lodi, Italy

Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) viene spesso isolato negli animali affetti da endometriti. E' comunque difficile associare in maniera diretta la presenza del virus e la patologia in atto.
La conoscenza è limitata inoltre per quanto riguarda i meccanismi molecolari ed i pathways cellulari usati da BoHV-4. Per cercare di colmare queste lacune, abbiamo creato le condizioni ottimali per favorire l'infezione da parte di BoHV-4 in una popolazione pura di cellule stromali endometriali bovine (BESCs), da utilizzare per l'analisi del loro trascrittoma mediante sequenziamento dell'RNA. Si è osservato che molti geni sono up-(417) o down- (181) regolati dall' infezione di BoHV-4. Come rivelato da ulteriori analisi funzionali su geni differenzialmente espressi, l'infezione di BoHV-4 colpisce vari pathways e almeno tre dei quali sono responsabili dell'up-regolazione della metalloproteinasi 1 (MMP1) e dell'interleuchina 8 (IL8).
Tali dati sono stati confermati dalla trascrizione inversa, da Real Time PCR, da western-immunoblotting e da un saggio di luciferasi utilizzando un reporter construct contenente un promotore bovino specifico per MMP 1. È stato inoltre osservato che la trascrizione di MMP1 è up-regolata dalla transattivazione del gene IE2 / RTA di BoHV-4, con conseguenti livelli eccessivamente elevati di metalloproteinasi a livello tissutale che sono causa di una guarigione potenzialmente difettosa dell'endometrio e di persistenza dello stato infiammatorio. Alla luce di tali risultati, proponiamo un nuovo modello di azione di BoHV-4 incentrata sull'up-regolazione di MMP 1 IE2-mediata e innovative strategie terapeutiche basate sulla down-regolazione di MMP1, IFN gamma-mediata.

POSTER

P01 - CCOV-II IN CAMPIONI DI CANI DEL SUD ITALIA.

Alfano F[1]., Mari V[2]., Viscardi M[1]., D'Amore M[1]., Brandi S[1]., Iannone R[1]., Galiero G[1]., Guarino A[1]., Degli Uberti B[1]., Buonavoglia C[2]., Fusco G[1].

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Via Salute 2, Portici, Napoli*
[2]*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari, Valenzano, Bari*

I coronavirus sono virus di grandi dimensioni, provvisti di envelope, con genoma ad RNA monocatenario a polarità positiva. Il loro nome deriva dalla classica forma apprezzabile al microscopio elettronico a "corona".

Il coronavirus canino (CCoV) è responsabile, di solito, di un'infezione autolimitante della mucosa intestinale del cane che decorre con una lieve sintomatologia gastroenterica caratterizzata da anoressia, diarrea di tipo mucoide e vomito. Talvolta determina un'infezione sistemica che evolve con gravi sintomi quali febbre, abbattimento, anoressia, enterite, disturbi nervosi e respiratori

Sono noti due genotipi di CCoV: CCoV-I e CCoV-II. Il genotipo CCoV-II è suddiviso nei sottotipi CCoV-IIa e CCoV-IIb. Il sottotipo CCoV-IIa comprende stipiti pantropici e stipiti enterici. Se l'infezione è sostenuta da stipiti CCoV enterici, il ritrovamento del virus resta limitato al tratto gastrointestinale; diversamente, gli stipiti pantropici, altamente virulenti, sono presenti e rilevati ad elevato titolo in polmone, milza, fegato, rene, encefalo degli animali ammalati.

Tra le varie diagnosi effettuate su organi di circa 400 cani inviati all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (IZSM) nel periodo gennaio 2012 - giugno 2016, sono stati identificati 9 stipiti di Coronavirus canino genotipo CCoV-II. Di questi, 7 sono risultati CCoV-IIa e presenti oltre che nell'intestino anche in altri organi dell'animale. Tali stipiti pantropici, parte dei quali isolati su cellule di fibroma di cane A-72, sono stati sottoposti ad analisi di sequenza per verificare sia la presenza della mutazione D125N nel gene S (ORF2) che la presenza di delezioni nei geni accessori 3abc. Attualmente è in corso il sequenziamento dell'intero genoma di questi stipiti. Su alcuni è stata effettuata inoltre anche un'analisi istologica.

Riguardo ai restanti due ceppi dei 9 CCoV-II, uno è risultato presente esclusivamente nell'intestino ed appartenente al genotipo CCoV-IIb, mentre per l'altro, identificato in un animale adulto, non è stato possibile ottenere una caratterizzazione molecolare con i sistemi diagnostici attualmente utilizzati, in quanto non è stato riconosciuto né dai primers specifici per CCoV-IIa né da quelli per CCoV-IIb. L'analisi ha rivelato, nell'intestino dell'animale in cui è stato ritrovato questo virus, lesioni specifiche dei coronavirus, e negli altri organi lesioni ascrivibili ad infezione virale. Su quest'ultimo caso sono in corso ulteriori approfondimenti.

P02 - INDAGINE SULLA PRESENZA DI CYPRINID HERPESVIRUS IN CARCINOMI A CELLULE SQUAMOSE CUTANEI DELLA CARPA CYPRINUS CARPIO.

Volpea E[1]., Sirria R[1]., Erranib F[2]., Mandriolia L[1]., Ciullia S[1].

[1]*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna*
[2]*Campus di cesena, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna*

I tumori epiteliali sono stati descritti nei ciprinidi inclusa la carpa comune (*Cyprinus carpio*). Fra le cause eziologiche di questi tumori vengono riportati sia i virus, sia gli agenti chimici. In particolare gli herpesvirus sono stati associati a fenomeni proliferativi dell'epidermide e la presenza di *Cyprinid herpesvirus 1* (CyHV-1) è responsabile della comparsa di papillomi nella carpa (Carp pox). Le infezioni da CyHV-1 sono storicamente diagnosticate con una combinazione di istologia e microscopia elettronica. Anche per i carcinomi a cellule squamose descritti nella carpa è stata ipotizzata una eziologia virale, ma indagini di microscopia elettronica hanno mancato l'evidenziazione di particelle virali. In questi casi, l'utilizzo di tecnologie molecolari può essere di notevole aiuto nell'indagine eziologica potendo evidenziare la presenza di DNA virale anche in campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFPE).
L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di investigare la presenza di CyHV in campioni di archivio di carcinomi a cellule squamose cutanei della carpa e di caratterizzare geneticamente i virus evidenziati.
Quattordici campioni di carcinomi a cellule squamose cutanei della carpa fissati in formalina e inclusi in paraffina, sono stati sottoposti a estrazione del DNA e ricerca di DNA virale riferibile a CyHV con una tecnica precedentemente pubblicata. Preliminarmente alla ricerca virale la conservazione del DNA è stata valutata tramite amplificazione di un frammento del DNA nucleare (gene TSH).
L'analisi del DNA nucleare ha dato positività in 5 casi permettendo quindi di valutare questi campioni come idonei alla ricerca del DNA virale. La ricerca di CyHV ha permesso di identificare il DNA virale in ciascuno dei 5 casi idonei all'analisi. Tre dei cinque amplificati del genoma virale sono stati sottoposti a sequenziamento e caratterizzazione genetica permettendo l'identificazione di *Cyprinid herpesvirus 1*.
La diagnosi molecolare effettuata in questo studio si è rilevata una valida alternativa all'approccio diagnostico classico rappresentato dall'indagine istologica ed ultrastrutturale per la ricerca di virus nei tessuti neoplastici FFPE.
L'indagine svolta evidenzia la presenza di CyHV-1 in carcinomi a cellule squamose cutanei della carpa facendo ipotizzare un'eziologia virale di queste formazioni neoplastiche in analogia a quanto già confermato per i papillomi. Ulteriori indagini potranno meglio chiarire il reale ruolo di questo virus nella patogenesi del carcinoma squamocellulare cutaneo della carpa.

P03 - CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEGLI STIPITI DI BOVINE LEUKEMIA VIRUS (BLV) ISOLATI IN ITALIA.

Bazzucchi M[1]., Giammarioli M[1]., Casciari C[1]., Iscaro C[1]., Feliziani F[1].

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia*

La Leucosi Bovina Enzootica (LEB) è una malattia infettiva sostenuta da un retrovirus (BLV) ormai eradicata in molti paesi europei, ma ancora presente in Italia. Nonostante rappresenti una malattia ampiamente sottovalutata, il suo impatto economico è ancora forte ed è universalmente studiata per le similitudini tra il suo agente causale ed altri retrovirus umani. In particolare, alcune analisi di filogenetica condotte su questo virus a partire dalla regione *env*, hanno dimostrato che gli isolati possono essere raggruppati in almeno dieci gruppi genetici. Questa classificazione si basa su dati disponibili nelle banche dati includendo sequenze provenienti soprattutto da America, Asia e Australia. Mancano invece studi approfonditi riguardo la caratterizzazione genetica e la classificazione di ceppi BLV isolati da animali infetti allevati in Europa. Obiettivo della nostra ricerca, è quello di ottenere informazioni riguardo i ceppi circolanti in Italia.
Il DNA provirale di 18 campioni collezionati tra il 2012 ed il 2016 è stato estratto da buffy-coat o da organi infetti utilizzando il kit QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) ed è stato utilizzato per lo studio di genotipizzazione effettuato sequenziando una porzione del gene env impiegando un protocollo di nested PCR disponibile in letteratura. Gli amplificati sono stati purificati (QIAquick PCR Purification Kit) e sequenziati mediante il kit *Big Dye Terminator v3.1 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 (444bp)*.
L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando due algoritmi disponibili nel pacchetto MEGA v.6: A. Maximum-Likelihood, con analisi bootstrap condotta su 1000 replicati, utilizzando un modello GTR (general time reversible); B.Neighbor-Joining con analisi bootstrap condotta su 10000 replicati, utilizzando un modello Kimura 2-parametri. L'albero è stato fissato sul genotipo G5 in entrambi i casi.
Da un'analisi preliminare risulta che i campioni analizzati "*clusterizzino*" entro genotipi noti G2, G4, G6, G7, G8 dei quali però solo il G7 risultava precedentemente essere stato descritto in Italia.
Questo studio getta le basi per un'analisi più estesa che si propone di coprire un arco temporale maggiore e di indagare le relazioni evolutive che intercorrono tra gli isolati.

04 - PESTE SUINA AFRICANA IN SARDEGNA: UN NUOVO APPROCCIO PER RAGGIUNGERE L'ERADICAZIONE.

Feliziani F[1]., Rolesu S[2]., Bessi Olivia O[3]., Mulas D[4]., De Mia G.M[1]., Laddomada A[2].

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia*
[2]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari*
[3]*Ministero della Salute - Direzione Generale Sanità Animale e Farmaci Veterinari*
[4]*Regione Sardegna - Servizio di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare*

La Peste Suina Africana (PSA) è una delle malattie infettive più devastanti che minacciano il comparto suinicolo a livello mondiale. La rilevanza di questa malattia è molto aumentata in seguito agli eventi epidemici iniziati nel 2007 che recentemente hanno coinvolto anche alcuni stati dell'Unione Europea. In questo quadro, desta particolare attenzione la situazione della Sardegna dove la PSA è presente dal 1978; gli sforzi per controllare l'infezione sono stati ulteriormente rafforzati con un approccio non solo di tipo sanitario, ma teso ad affrontare anche fattori di tipo sociale e culturale.
Il primo atto della nuova strategia regionale è stato l'istituzione di una "Unità di Progetto" che ha il compito di indirizzare, verificare e monitorare l'attuazione del Piano d'azione straordinario per l'eradicazione della PSA; ne fanno parte rappresentanti di diversi assessorati regionali, esperti di rilevanza internazionale, veterinari delle ASL, dell'IZS della Sardegna, delegati del Ministero della Salute e del Centro di Referenza Nazionale.
È stato elaborato un piano triennale con l'obiettivo di eradicare l'infezione, basato sulle seguenti linee principali:

- eliminazione delle fonti di persistenza del virus individuate nelle popolazioni suine illegalmente allevate nei pascoli demaniali;
- incremento dei livelli di biosicurezza degli allevamenti suinicoli attraverso una politica di premialità;
- prioritizzazione della sorveglianza basata sulla categorizzazione territoriale del rischio;
- controllo dell'infezione nelle popolazioni selvatiche.

Dopo circa un anno di attività, l'incidenza dell'infezione mostra un trend favorevole e l'analisi geospaziale circoscrive l'area infetta ad una ristretta zona storicamente endemica.
È stato prodotto un forte sforzo nel campo dell'informazione e della formazione in particolare per allevatori e cacciatori. Sono state aggiornate le norme che regolamentano la caccia al cinghiale per ottenere adeguate informazioni epidemiologiche elevando il livello di biosicurezza delle attività venatorie.
Attualmente, la PSA in Sardegna è ancora presente in forma endemica, ma forte è la determinazione istituzionale per risolvere definitivamente questo annoso problema. La strategia adottata associa le opportune misure restrittive (utili a contrastare la circolazione virale) con incentivi mirati, che puntano a migliorare e modernizzare tutto il comparto suinicolo e trasformare le attuali criticità in un'occasione di sviluppo per il territorio.

P05 - CARATTERIZZAZIONE E DIFFUSIONE DEL VIRUS DELL'ENCEFALOMIOCARDITE VIRALE (EMCV) IN ITALIA IN ANNI RECENTI.

Foglia E.A[1]., Bregoli A[1]., Pezzoni G[1]., Grazioli S[1]., Brocchi E[1].

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italia*

L'encefalomiocardite (EMC) è una virosi di varie specie animali, provocata da un virus appartenente alla famiglia *Picornaviridae*, che si può manifestare con encefaliti, miocarditi o aborti. I suini sono la specie da allevamento più sensibile.

La presenza del virus negli allevamenti suinicoli in Italia è stata dimostrata a partire dal 1986, ed in seguito è stata confermata in varie aziende del nord-est. L'EMC ha andamento stagionale ed i roditori sembrano avere un ruolo importante come vettore biologico e nel mantenimento del virus.

Il presente lavoro ha fornito aggiornamenti sia sull'evoluzione epidemiologico/molecolare che sulla diffusione del virus.

Il profilo antigenico di 50 ceppi isolati tra il 2013 e il 2015 è stato valutato con un test ELISA, utilizzando un pannello di 40 Anticorpi Monoclonali (AcM) che identificano almeno 7 diverse aree antigeniche. Nonostante una sostanziale stabilità antigenica degli isolati, variazioni sporadiche sono state osservate in alcuni epitopi di due maggiori siti antigenici coinvolti nella neutralizzazione, mentre appare stabilizzata (44/50 ceppi) la mutazione che annulla la reattività di un AcM neutralizzante, già osservata in ceppi isolati prima del 2000. Nuove mutazioni sono state occasionalmente rilevate anche in siti non coinvolti nella neutralizzazione. È invece confermata la stabilità dell'unico sito lineare target di un AcM neutralizzante.

L'analisi filogenetica basata sul gene della VP1 mostra identità nt superiore al 89.7% tra 47 ceppi italiani analizzati; 3 isolati suini di origine spagnola formano un cluster separato ma con elevata vicinanza filogenetica con i virus circolanti in Italia (identità nt superiore al 87%); 4 ceppi isolati da primati in un parco naturalistico italiano si organizzano tra quelli di origine suina, formando un sottogruppo specifico.

Per l'indagine sulla diffusione del virus sono stati esaminati circa 13.000 sieri prelevati nel 2016 in oltre 500 aziende suine della Lombardia e dell'Emilia Romagna, utilizzando un test ELISA in-house per la ricerca di anticorpi specifici. Rispetto ai dati raccolti nel 2010, è aumentata dal 54% al 71% la proporzione di aziende sieropositive con un trend in aumento della sieroprevalenza intra-allevamento, che è risultata elevata (>50%) nel 9% delle aziende, media (50%-20%) nel 22%, bassa (<20%) nel rimanente 40%. La presenza di livelli di sieropositività simili in aziende focolaio e aziende senza manifestazioni cliniche conferma la circolazione subclinica del virus.

P06 - EFFETTO NUTRACEUTICO DEI BETA-GLUCANI SU API INFETTE DA DEFORMED WING VIRUS (DWV).

Mazzei M[1]., Fronte B[1]., Sagona S[1]., Carrozza M.L.[2], Forzan M[1]., Pizzurro F[1]., Bibbiani C[1]., Miragliotta V[1]., Abramo F[1]., Millanta F[1]., Poli A[1]., Felicioli A[1].

[1]*Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa*
[2]*Scuola Normale Superiore, Pisa*

Il Deformed Wing Virus (DWV) o virus delle api deformi è responsabile di una infezione spesso in forma subclinica che è molto diffusa nell'*Apis mellifera*. Il virus appartiene alla famiglia *Picornavirales* e, come gli altri membri della famiglia, è caratterizzato da un virione nudo di piccole dimensioni racchiudente un genoma a ssRNA (+). Il virus infetta le forme larvali durante il loro sviluppo e l'infezione si manifesta con la comparsa di api neo-sfarfallate con gravi deformazioni a carico delle ali e con ridotte dimensioni del corpo. La malattia può portare al collasso della colonia ed in genere le forme più gravi sono associate ad infestazioni di *Varroa destructor,* un acaro che agisce sia come parassita che come amplificatore e vettore biologico del virus.
Le api, così come altri invertebrati, hanno sviluppato un'ampia varietà di meccanismi di difesa innata contro i vari agenti patogeni, seppur in assenza di un sistema immunitario adattativo. In molti dei meccanismi immunodifensivi degli invertebrati sono coinvolte proteine secrete da cellule dell'emolinfa dotate di attività opsonizzante, chemiotattica, battericida e perossidasica. Tali meccanismi possono essere modulati dalla presenza di varie molecole definite immunomodulatori.
Tra queste i ß-glucani, polisaccaridi ramificati non amidacei costituiti da molecole di glucosio unite insieme mediante legami glicosidici β(1,3) e β(1,6), possono rappresentare una alternativa all'utilizzo di sostanze di sintesi chimica. I ß-glucani sono costituenti della parte solubile della fibra vegetale, sono presenti in molti cereali ma anche nelle pareti cellulari di vari agenti patogeni.
Al fine di comprendere se i ß-glucani possano avere una efficace azione immunomodulante sulle api, la molecola è stata integrata nell' alimentazione di gruppi sperimentali di api in un modello di infezione naturale e sperimentale con DWV.
Gli esperimenti condotti hanno permesso di quantificare il tasso di mortalità, di stimare il numero e il grado di attivazione delle cellule deputate all'attività immunitaria, di quantizzare il virus presente nei vari distretti delle api (testa/addome) e di valutarne la replicazione. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la somministrazione di ß-glucani per via orale in api infette da DWV è associata a un significativo aumento del tasso di sopravvivenza, ad un incremento del numero di emociti, e ad una riduzione della carica virale. Tali risultati suggeriscono che questa molecola possa contribuire ad incrementare la difesa delle api verso agenti patogeni.

P07 - ELEVATA DIFFUSIONE DI NOROVIRUS GII.17 IN MOLLUSCHI BIVALVI E ACQUE DI SCARICO IN AREE DI PRODUZIONE IN ITALIA.

La Rosa G[1]., Della Libera S[1]., Proroga Y[2]., Therese R[2]., De Medici D[3]., Vito M[4]., Suffredini E[3].

[1]*Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*
[2]*Dipartimento Ispezione degli Alimenti, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (Napoli)*
[3]*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*
[4]*Dipartimento di Medicina veterinaria, Università degli studi di Bari*

Nella stagione invernale 2014/15, un nuovo ceppo di norovirus, GII.P17_GII.17 (Kawasaki 2014), è emerso come principale causa di gastroenterite in Asia, sostituendo in parte il genotipo GII.4 Sydney 2012, fino ad allora predominante. Tuttavia, il virus Kawasaki 2014 è stato segnalato solo in modo sporadico al di fuori del Sud Est asiatico, e non era prevedibile se tale virus avrebbe potuto acquisire rilevanza epidemiologica anche in altre aree geografiche. Inoltre, non è chiaro se i vaccini per norovirus attualmente in fase di sviluppo siano protettivi nei confronti del virus Kawasaki 2014 e se sia necessario rivedere il disegno dei vaccini. In Italia il ceppo Kawasaki 2014 è stato identificato nel Febbraio 2015 in due bambini ospedalizzati per gastroenterite e sembra avere acquisito carattere epidemico nella popolazione pediatrica nel corso della stagione invernale 2015-2016, sulla base dei dati di sorveglianza ospedaliera generati dalla rete ISGEV (Italian Study Group for Enteric Viruses).

Nel presente studio si riportano dati di sorveglianza ambientale che confermano la circolazione del virus Kawasaki 2014 in Italia nel corso del 2015. Campioni di molluschi (n=40), di acque di mare da zone di produzione (n=39) e di acque di scarico (n=29) sono stati raccolti in Campania nel corso del 2015 e sono stati analizzati per Norovirus GII utilizzando coppie di primer broad range (COG2F_G2SKR/ G2SKF_G2SKR). Il sequenziamento genico ha evidenziato la presenza di molteplici genotipi di Norovirus nei molluschi (GII.4, GII.2, GII.6, GII.12) e del genotipo GII.17 in 3 campioni, le cui sequenze hanno mostrato identità del 99-100% con il ceppo italiano PR668/2015/ITA identificato nel 2015. Nessuna positività per GII.17 è stata identificata con tale approccio analitico nei campioni di acque (in cui sono stati invece rilevati i genotipi GII.1, GII.2, GII.4 e GII.6). Poiché in presenza simultanea di più genotipi in un campione (condizione frequente in campioni di molluschi o di acque), il sequenziamento diretto del prodotto PCR mette in evidenza la sequenza prevalente nel campione o quella verso cui i primer mostrano maggiore affinità, al fine di rilevare l'eventuale presenza di stipiti GII.17 'nascosti' dai genotipi prevalenti, tutti i campioni positivi per norovirus GII sono stati ritestati con una nuova nested RT-PCR, specifica per norovirus GII.17. I primer sviluppati sono stati testati su un panel di 21 genotipi di norovirus GI e GII, oltre a feci di pazienti pediatrici positive per norovirus GII.17 per valutarne la specificità. Oltre ai 3 campioni già identificati mediante primer broad range, è stato così possibile indentificare la presenza di norovirus GII.17 in altri 17 campioni di molluschi ed in un campione di acqua di scarico sottocosta, in cui precedentemente erano stati evidenziati norovirus di genotipi diversi.

Il presente studio ha rivelato che il genotipo di norovirus GII.17 è diffuso a livello ambientale nel nostro territorio, essendo rilevabile sia nei molluschi bivalvi che nelle acque di scarico, confermando i dati generati dalla sorveglianza ospedaliera. Questi dati sottolineano l'importanza di monitorare l'epidemiologia dei virus enterici con approccio integrato e la necessità di aggiornare prontamente gli strumenti diagnostici.

P08 - VIRUS DELL' EPATITE E (HEV) IN REFLUI DI ALLEVAMENTI SUINICOLI DEL NORD ITALIA.

La Rosa G[1]., Della Libera S[1]., Brambilla M[2]., Bisaglia C[2]., Pisani G[3]., Ciccaglione A.R[4]., Bruni R[4]., Taffon S[4]., Equestre M[5]., Iaconelli M[1].

[1]*Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*
[2]*Unità di Ricerca per l'Ingegneria Agraria (CREA-ING), Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Laboratorio di Treviglio, Italy*

[3]*Centro Nazionale per la Ricerca e Valutazione dei Prodotti Immunobiologici, Istituto Superiore di Sanità, Roma*
[4]*Dipartimento Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*
[5]*Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Il virus dell'epatite E (HEV) è responsabile di una forma acuta di epatite infettiva diffusa in tutto il mondo. La malattia è in genere asintomatica e auto-limitante ma può tuttavia causare insufficienza epatica fulminante in pazienti in stato di gravidanza o con problemi epatici di natura cronica. Nei Paesi in via di sviluppo, si manifesta con epidemie (sostenute dai ceppi di genotipo 1 e 2) che originano a seguito del consumo di acqua contaminata; nei paesi industrializzati rappresenta una patologia emergente i cui casi clinici, per lo più sporadici, si verificano a seguito di viaggi in Paesi in cui tale malattia è endemica. Negli ultimi anni si è assistito ad un numero crescente di casi autoctoni, causati prevalentemente dal genotipo 3, per i quali è stata ipotizzata l'esistenza di una relazione con il contatto (diretto o indiretto) con fauna infetta (maiali, cinghiali, cervi). In Italia la presenza e la diffusione di HEV di genotipo 3 è stata dimostrata sia in allevamenti suinicoli, sia in animali selvatici.
Nel presente lavoro è stata valutata la presenza di HEV in reflui di allevamenti suinicoli del nord Italia, raccolti nel 2015 da 10 allevamenti. Per la ricerca del genoma virale sono state utilizzate coppie di primer *broad range* che amplificano porzioni delle regioni ORF1, ORF2 e ORF2/3. Il 79.1% dei campioni è risultato positivo per HEV e le sequenze sono state caratterizzate come genotipo 3, sottotipo 3f, ad eccezione di un campione, che non è stato possibile caratterizzare mediante BLAST e analisi filogenetica e che potrebbe pertanto rappresentare un nuovo sottotipo. Valori quantitativi di HEV RNA ottenuti mediante Real-Time PCR hanno mostrato la presenza di 600-1000 UI/ml di refluo suino.
I risultati ottenuti dimostrano l'effettiva circolazione di HEV nelle popolazioni suinicole e, se da un lato confermano il ruolo di serbatoio per ceppi di genotipo 3 svolto dai suini, dall'altro sottolineano l'importanza che la corretta gestione degli effluenti zootecnici (raccolta, stoccaggio e spandimento) ha per limitare la diffusione del virus e la conseguente contaminazione delle matrici idriche.
Il presente lavoro è stato parzialmente finanziato dal Programma: "Preparedness, Prediction and Prevention of Emerging Zoonotic Viruses with Pandemic Potential using Multidisciplinary Approaches" (FP7/2007-2013, Grant Agreement n°278433PREDEMICS).

P09 - VIRUS DELL' EPATITE E IN MOLLUSCHI BIVALVI, ACQUE DI ALLEVAMENTO E SCARICHI A MARE IN AREE DI PRODUZIONE IN ITALIA.

La Rosa G[1]., Suffredini E[2]., Proroga Y[3]., Iaconelli M[1]., Della Libera S[1]., Di Pasquale S[2]., Capuano F[3]., De Medici D[2].

[1]*Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*
[2]*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*
[3]*Dipartimento Ispezione degli Alimenti, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (Napoli)*

Negli ultimi anni è stato descritto un numero crescente di casi sporadici di epatite E (HEV) in diversi Paesi industrializzati, Italia compresa. L'HEV autoctona sembra essere trasmessa per via zoonotica, per contatto con animali (il suino è considerato il principale serbatoio) o mediante consumo di alimenti infetti. Casi sporadici sono stati attribuiti all'ingestione di molluschi bivalvi crudi o poco cotti, ma il ruolo di questi alimenti nella trasmissione della malattia non è chiaro.
In questo lavoro sono stati analizzati campioni di molluschi raccolti in Campania nel corso del 2015. In totale, nel corso del monitoraggio, sono stati raccolti 384 campioni (mitili, cannolicchi, vongole, telline) da 27 aree di produzione. Sono stati inoltre raccolti 68 campioni di acque, di cui 39 campioni di acqua di mare delle zone di molluschicoltura e 29 campioni di scarichi potenzialmente impattanti tali aree. La preparazione dei campioni di mollusco (apertura degli animali, dissezione dell'epatopancreas, estrazione degli acidi nucleici) è stata eseguita secondo la norma ISO/TS 15216, seguita da determinazione mediante real-time PCR e riamplificazione dei positivi con RT-nested-PCR. I campioni di acqua (20 litri ciascuno) sono stati concentrati mediante adsorbimento/eluizione e gli acidi nucleici sono stati estratti con il sistema semiautomatico NucliSENS easyMAG con silice magnetica. La ricerca per il virus dell'epatite E è stata effettuata utilizzando una sistema RT-nested-PCR nella regione ORF1 del virus, seguita da sequenziamento genico.
Le analisi effettuate hanno evidenziato la presenza di HEV mediante real-time PCR in 10 campioni di molluschi (2.6% del totale). Solo due di questi campioni sono stati amplificati con successo mediante nested PCR e sono stati caratterizzati come genotipo 3 (G3). Nei campioni ambientali, il virus è stato identificato in 5 campioni di acqua di mare (12.8%) delle aree di produzione, tutti caratterizzati come G3. In un'area di produzione sono stati identificati campioni positivi sia nei molluschi che nelle acque di allevamento, e le sequenze nucleotidiche hanno mostrato 100% di identità.
Nonostante la prevalenza di HEV nei campioni di molluschi sia notevolmente più bassa rispetto ad altri virus enterici (es. Norovirus), i risultati di questi studio mostrano che il virus è presente nelle aree di produzione e sottolineano la necessità di monitorare la presenza di HEV nei molluschi eduli lamellibranchi e nelle aree di allevamento.

P10 - EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI MAREK IN ITALIA NEL 2014-2016.

Mescolini G[1]., Lupini C[1]., Bellinati L[1]., Felice V[1]., Listorti V[1]., Massi P[2]., Tosi G[2]., Rossi G[3]., Presente P[3]., Cecchinato M[4]., Catelli E[1].

[1]Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - Ozzano dell'Emilia (BO).
[2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Forlì, Via don Eugenio Servadei 3/E-3/F, Forlì (FC).
[3]Laboratorio Tre Valli, Viale A. Veronesi, 5 San Michele Extra (VR).
[4]Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università di Padova, Agripolis Viale dell'Università, 16 - Legnaro (PD).

La malattia di Marek è una patologia del pollo a carattere linfoproliferativo, diffusa a livello mondiale e causata dal *Gallid alphaherpesvirus 2* (denominato anche MDV) in cui si riconoscono diversi patotipi (*mild, virulent, very virulent* e *very virulent plus*). Essa si manifesta con diverse forme cliniche, fra cui le più rilevanti sono la "classica" e l'"acuta". A tutt'oggi dati relativi alla caratterizzazione dei ceppi MDV circolanti in Italia sono carenti.
18 ceppi MDV, evidenziati nel periodo 2014 -2016 in allevamenti intensivi (n.8 – in corso forma "acuta") e rurali (n.8 – in corso di forma "classica" e n.2 - in corso di forma "acuta"), sono stati caratterizzati dal punto di vista molecolare tramite sequenziamento e analisi del gene *meq.* Tale gene è il principale oncogene virale ed alle sue caratteristiche molecolari, in particolare al numero di ripetizioni di 4 proline (PPPP) nel dominio di transattivazione della proteina, sembra essere correlata la virulenza.
Il gene *meq* è stato amplificato mediante PCR e sequenziato dopo estrazione del DNA virale da penne o organi di animali colpiti. Le sequenze nucleotidiche e amminoacidiche sono state allineate e confrontate, mediante il software *Clustal W*, con sequenze omologhe di ceppi MDV a diversa patogenicità, presenti in *GenBank*. L'analisi filogenetica è stata condotta utilizzando l'algoritmo *Neighbor-Joining*.
I ceppi evidenziati in corso di forma "classica" formavano un unico cluster e presentavano percentuali d'identità nucleotidica alte con patotipi *mild* o attenuati. I ceppi evidenziati in corso di forma "acuta" invece si raggruppavano in un altro cluster, con alcuni isolati polacchi, e presentavano elevata identità nucleotidica con ceppi *virulent*, *very virulent* e *very virulent plus*.
In conclusione ceppi MDV ad elevata virulenza, già segnalati in Europa, circolano anche nel nostro paese soprattutto nel settore avicolo industriale, nonostante la vaccinazione sia eseguita di routine in tutte le categorie produttive. Sporadicamente questi virus sono stati evidenziati, per superamento delle barriere di biosicurezza, anche nel settore rurale dove sembrano invece prevalenti ceppi a bassa virulenza associati a forme "classiche".

P11 - ANALISI BIOMOLECOLARE DI CEPPI DI FELINE PANLEUKOPENIA VIRUS (FPV) ISOLATI DA GATTI DOMESTICI.

Mira F[1]., Di Bella S[1]., Buttaci C[1]., Russotto L[1]., Cannella V[1]., Di Marco P[1]., Monteverde V[1]., Dara S[1]., Guercio A[1]., Purpari G[1].

Feline Panleukopenia Virus (FPV) e Canine Parvovirus tipo 2 (CPV-2) appartenenti alla famiglia *Parvoviridae* sono causa di malattia contagiosa e spesso fatale nei gatti e cani. FPV causa una malattia caratterizzata da febbre, gastroenterite e leucopenia. Esso è stato identificato per la prima volta agli inizi del ventesimo secolo e ha mantenuto negli anni un certo grado di stabilità genetica diversamente dal CPV-2. Negli ultimi decenni, studi molecolari più approfonditi hanno contribuito a chiarire alcuni aspetti relativi alle caratteristiche dei ceppi di FPV.

Scopo del presente lavoro è stata l'analisi biomolecolare dei ceppi di FPV presenti in campioni di origine felina esaminati nel 2015. A tal fine sono stati analizzati 56 organi prelevati da 19 gatti con sospetto clinico di Panleucopenia felina. I campioni sono stati sottoposti ad una PCR convenzionale che amplifica un frammento del gene che codifica per la proteina capsidica VP2. I campioni positivi sono stati sottoposti ad un'ulteriore PCR che amplifica l'intera sequenza del gene VP2. I prodotti di amplificazione sono stati sequenziati con metodo Sanger. Le sequenze ottenute sono state analizzate e comparate con altre sequenze di FPV depositate in GenBank. Inoltre, di due ceppi isolati su cellule CRFK è stato effettuato un sequenziamento NGS (Illumina) dell'intero genoma e le sequenze depositate in GenBank (KX434461-KX434462).

Il DNA di *Parvovirus* è stato identificato nel 68% degli organi testati. L'analisi delle sequenze ha permesso di tipizzare i ceppi come FPV e questi hanno mostrato un'elevata omologia (99,4-99,9%) con ceppi italiani e portoghesi isolati tra il 2002/2007. Nell' albero filogenetico, i nostri ceppi hanno clusterizzato con altri ceppi italiani. Dall'analisi delle sequenze aminoacidiche sono emerse delle differenze con le sequenze di ceppi vaccinali che hanno permesso di identificare i nostri come ceppi di campo. Sono state evidenziate quattro sostituzioni aminoacidiche non sinonime che interessano anche siti descritti come markers per la caratterizzazione dei tipi di *Parvovirus*.

E' noto il ruolo epidemiologico del gatto per via della sua suscettibilità sia ad FPV che a CPV, ma anche come fonte di nuove varianti di *Parvovirus*. Sebbene i ceppi FPV analizzati mostrino elevata omologia con ceppi descritti nel decennio passato, le differenze riscontrate nel corso dello studio hanno consentito di acquisire ulteriori conoscenze sulle caratteristiche molecolari dei ceppi di FPV di campo.

P12 - DIAGNOSI E TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI BORDER DISEASE VIRUS (BDV) E BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS 2 (BVDV-2) IN PICCOLI RUMINANTI, SPAGNA.

Peletto S[1]., Benito A.A[2]., Cerutti F[1]., Arnal J.L[2]., Caruso C[1]., Serrano J.D[2]., Chacon G[2]., Masoero L[1]., Acutis P.L.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Italy.*
[2]*EXOPOL SL. San Mateo de Gállego 50840, Zaragoza, Spain*

BVDV e BVD sono virus a RNA appartenenti al genere *Pestivirus,* responsabili di ingenti perdite economiche in bovini e piccoli ruminanti in tutto il mondo. Sebbene BDV sia considerata la specie in grado di infettare i piccoli ruminanti, alcuni report segnalano la presenza di BVDV-1 e BVDV-2 negli ovini. Il presente studio riporta l'identificazione molecolare e successiva tipizzazione genetica di BDV e BVDV-2 in piccoli ruminanti in Spagna.
In totale, 128 casi clinici da 18 province spagnole sono stati analizzati mediante un saggio di qPCR pan-*Pestivirus* avente come target un frammento della 5'UTR virale. I campioni includevano tessuti fetali, placenta e tamponi genitali. I campioni risultati positivi sono stati sottoposti a qPCR specie-specifica per discriminare BDV, BVDV-1 e BVDV-2, e sequenziati usando i primer BE e B2 che amplificano una regione di 288 bp della 5'UTR.
L'infezione da *Pestivirus* è stata rilevata nel 25% (32/128) dei casi: in tessuti fetali (27%), tamponi genitali (35%) e placente (7%). BDV è stato identificato mediante qPCR nel 39% dei campioni positivi, BVDV-2 nel 61%, mentre BVDV-1 non è stato rilevato. L'analisi filogenetica basata sulla regione 5'UTR di un panel di 19 casi positivi ha dimostrato la presenza dei genotipi BDV-4 e BDV-5, mentre tre sequenze non erano classificabili in genotipi noti, collocandosi in un *cluster* separato. Le sequenze di BVDV sono state tutte classificate nel sottotipo BVDV-2b, filogeneticamente vicine a sequenze di riferimento da regioni francesi confinanti.
La circolazione di *Pestivirus* nei piccoli ruminanti è stata in precedenza segnalata in Spagna attraverso metodi sierologici e molecolari, ma sempre limitatamente a BDV. Il presente studio ha caratterizzato dal punto di vista filogenetico i ceppi di BDV circolanti, mettendo in evidenza una spiccata variabilità genetica e, inaspettatamente, ha rilevato la presenza di BVDV sottotipo 2b in ovi-caprini naturalmente infetti da diverse province spagnole. L'analisi di similarità di questi isolati di BVDV-2b ha dimostrato la quasi completa identità.

P13 - CARATTERIZZAZIONE DI OVINE HERPES VIRUS 2 (OVHV-2) IN SARDEGNA.

Coradduzza E[1]., Rocchigiani A.M[1]., Murtino A.P[1]., Pala G.M[1]., Pilo C.E[2]., Rossi R.[1], Puggioni G.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari, Italia*
[2]*Dipartimento di Medicina Veterinaria Università di Sassari*

OvHV-2 causa un'infezione sistemica spesso ad esito letale in bovini e altri ungulati, inclusi cervi, bisonti e maiali, conosciuta come febbre catarrale maligna (MCF). La pecora, il muflone e la capra si infettano in maniera asintomatica ed agiscono come *reservoir* con un importante ruolo epidemiologico nella trasmissione del virus. In Sardegna a tutt'oggi MCF è stata segnalata sporadicamente in vitelli, ma è possibile che il dato sia sottostimato.
In questo lavoro, al fine di valutare in Sardegna il ruolo di *reservoir* dell'ovino e la prevalenza del virus in questa specie, sono stati utilizzati 1160 campioni di sangue prelevati da animali appartenenti a 24 allevamenti distribuiti sul territorio regionale.
Tutti i campioni sono stati esaminati mediante amplificazione in Real Time PCR di una porzione del gene altamente conservato ORF 75.
In tutti gli allevamenti sono state rilevate positività, con 286 campioni positivi e una prevalenza media intra-allevamento del 25%; i risultati dimostrano quindi che OvHV-2 è endemico nella nostra Regione. In particolare sono risultati positivi i 7 allevamenti della provincia di Nuoro con 108 campioni positivi su 320 esaminati (33%), i 6 allevamenti della provincia di Sassari con 60 positivi su 305 esaminati (20%), i 2 della provincia di Oristano con 17 positivi su 75 esaminati (23%) e i 9 di quella di Cagliari con 101 positivi su 460 (21%).
Per la tipizzazione genetica del virus, circolante nelle diverse zone della Sardegna, è stata effettuata l'amplificazione di una porzione dei geni variabili Ov9.5 e ORF 73 selezionando 5 campioni tra quelli provenienti dalla provincia di Oristano, 9 da quella di Nuoro, 7 da quella di Sassari e 21 da quella di Cagliari.
Le sequenze ottenute tramite sequenziamento diretto sono state comparate mediante BioEdit con quelle presenti in banca dati. I dati preliminari relativi al gene ORF73 mostrano polimorfismo tra i ceppi circolanti nelle diverse province e anche all'interno dello stesso allevamento. L'analisi delle sequenze di Ov9.5 mostra alta similarità (99%) con quelle disponibili in banca dati derivate da campioni bovini (Russel et al 2014). L'analisi filogenetica di Ov9.5 effettuata con il software Mega6, utilizzando il metodo Neighbor-joining e il modello Kimura 2 parametri, ha evidenziato che un gruppo clusterizza co Ov9.5 0401 (HG813101), un secondo gruppo con Ov9.5 0201 (HG813098), Ov9.5 0202 (HG813099) e Ov9.5 0203 (HG813100) e un terzo con Ov9.5 0301 (HG813102).

P14 - IMMUTATA VIRULENZA DI BLUETONGUE VIRUS SIEROTIPO 1 IN CAMPIONI DI SANGUE ARCHIVIATI PER 10 ANNI A TEMPERATURA DI REFRIGERAZIONE.

Puggioni G[1]., Pintus D[1]., Meloni G.[1], Rocchigiani A.M1., Manunta D[1]., Savini G[2]., Oggiano A[1]., Ligios C[1].

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari, Italia*
[2]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo, Italia*

L'infezione da virus della Bluetongue (BTV) è caratterizzata da una lunga viremia che, a seconda della specie animale, può durare fino a 100 giorni.
Qui riportiamo la persistenza della virulenza di un isolato di BTV sierotipo 1 (BTV1) in campioni di sangue clinici rimasti refrigerati per 10 anni.
Lo studio è stato condotto su campioni di sangue intero prelevati da ovini viremici con sintomatologia durante l'epidemia di BTV1 del 2006 in Sardegna. I campioni sono rimasti stoccati in frigorifero a 5 ± 3 °C per circa 10 anni.
Nel 2016, nell'ambito di un più vasto esperimento, i campioni sono stati testati mediante Real Time RT-PCR per riconfermare la presenza di BTV1, dopodiché un'aliquota di 10 ml è stata inoculata per via endovenosa in un ariete BTV-free.
A 5 giorni *post inoculum* (*p.i.*) l'animale ha presentato una grave sintomatologia clinica riconducibile a BTV, caratterizzata da grave congiuntivite, edema sottomandibolare, iperemia orbitale e delle narici con marcato scolo nasale, cianosi della lingua, laminite, anoressia e prostrazione. Considerate le irreversibili condizioni cliniche a 10 giorni *p.i.* l'animale è stato sottoposto a eutanasia.
L'RNA di BTV è stato evidenziato mediante Real Time RT-PCR nel sangue e negli organi campionati, mentre mediante cELISA, non è stata rilevata alcuna siero conversione nei confronti di BTV.
Alla necroscopia si sono evidenziate emorragie nell'intima della arteria polmonare e necrosi dei muscoli papillari del ventricolo sinistro. Nel rumine sono emerse congestione vasale, emorragie ed erosioni della mucosa. Inoltre numerosi linfonodi periferici apparivano ingrossati, edematosi ed emorragici.
I quadri istologici corrispondenti, a livello del derma cutaneo e della lamina propria degli organi viscerali controllati, erano caratterizzati da gravi vasculiti e perivasculiti a carico dei capillari, associate ad aspetti di ipertrofia endoteliale, edema, congestione vasale ed emorragie.
L'inalterata virulenza di BTV1 da noi riscontrata in campioni di sangue refrigerato per 10 anni, sebbene non aiuti ad evidenziare nuovi aspetti patologici o epidemiologici di questa arbovirosi, stimola lo studio dei meccanismi attraverso cui il virus preserva la sua infettività nel tempo in tessuti o fluidi.

P15 - CANINE DISTEMPER VIRUS (CDV) NELLA VOLPE (VULPES VULPES ICHNUSAE) IN SARDEGNA: ASPETTI CLINICI, ANATOMO-ISTOPATOLOGICI, VIROLOGICI E ANALISI FILOGENETICA.

Rossi R[1]., Rocchigiani A.M.[1], Cancedda M.G[1]., Pintus D[1]., Pintore A[1]., De Nurra D[1]., Pudda F[2]., Cherchi M[1]., Liogios C[1]., Puggioni G.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari, Italia*
[2]*C.A.R.F.S. Bonassai, Agenzia Forestas Sardegna, Olmedo, Italia*

Nel periodo 2014-2015 si è verificata un'epidemia di CDV in volpi nel nord-ovest Sardegna. Sono stati analizzati complessivamente 14 esemplari di cui 11 recuperati vivi e 3 trovati morti. I soggetti vivi ricoverati presso il C.A.R.F.S. di Olmedo (SS) manifestavano atassia, depressione del sensorio, congiuntivite muco purulenta, in alcuni casi diarrea emorragica e sono deceduti nell'arco di 2 - 48 ore.
L'esame necroscopico ha evidenziato grave stato di deperimento organico e scolo muco purulento oculo-nasale.
Cervello, polmone, muco congiuntivale e sangue in EDTA sono stati sottoposti ad indagine biomolecolare per la ricerca di CDV. In tutti i soggetti è stato possibile evidenziare la presenza del virus mediante amplificazione in RTPCR di una porzione altamente conservata del gene che codifica per la nucleoproteina (gene N).
Su sezioni di cervello e polmone sono stati eseguiti esami istologici (ematossilina e eosina) e immunoistochimici per la ricerca del virus.
All'esame istologico sono stati evidenziati quadri lesivi riferibili a broncopolmonite interstiziale cronica e a lieve e diffusa meningite non purulenta.
All'analisi immunoistochimica è stata riscontrata positività specifica a CDV a livello dell'epitelio bronchiale e della popolazione cellulare infiammatoria associata, mentre a livello cerebrale sono state caratterizzate positività neuronali isolate o in cluster.
Per tipizzare il virus identificato nelle 14 volpi è stata effettuata l'amplificazione di una porzione di 968 pb del gene che codifica per l'emoagglutinina (gene H). Al fine di verificare l'eventuale similarità genetica del virus tra domestico e selvatico sono stati inclusi nell'analisi 4 campioni di cane identificati positivi per CDV nello stesso arco temporale.
Le sequenze ottenute tramite sequenziamento diretto sono state comparate mediante BioEdit con analoghe sequenze riportate in banca dati. L'analisi filogenetica effettuata con il software Mega6, utilizzando il metodo Neighbor-joining e il modello Kimura 2 parametri, ha evidenziato che i ceppi identificati nelle volpi e in due cani clusterizzano in un unico gruppo all'interno del *lineage* Europe Wildlife, mentre gli altri due ceppi di CDV identificati in cane si collocano all'interno del *lineage* Artico.

P16 - ESPRESSIONE DEL GENE ENV DI ORIGINE RETROVIRALE NELLA PLACENTA EQUINA.

Stefanetti V.[1], Merenzoni M.L.[1], Passamonti F[1]., Cappelli K[1]., Garcia-Etxebarria K.[2], Coletti M.[1], Capomaccio S.[1]

[1] *Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Medicina Veterinaria, Via San Costanzo 4, Perugia, Italy.*
[2] *Department of Genetics, Physical Anthropology and Animal Physiology, University of Basque Country-UPV/EHU, BioCruces Health Research Institute, Leioa, Spain*

I retrovirus endogeni (ERVs) sono elementi virali originati da retrovirus esogeni e presenti in elevata quantità (8-10%) nel genoma di tutti i vertebrati. Nel corso dell'evoluzione, i retrovirus esogeni hanno integrato il loro DNA nelle cellule germinali dell'ospite permettendone la trasmissione alla progenie. Molti ERVs sono rimasti nel genoma dei loro ospiti per milioni di anni, andando incontro a mutazioni che ne hanno causato l'inattivazione, quindi l'incapacità di produrre elementi infettanti. Tuttavia, la conservazione di alcune open reading frames (ORFs) intatte suggerisce che tali sequenze retrovirali possano aver mantenuto una funzione per l'ospite. Precedenti studi in letteratura hanno identificato il gene *env* di origine retrovirale, codificante per le proteine dell'envelope, come un gene essenziale nella placentazione dei mammiferi. Tale peculiarità è legata alla capacità fusogenica che queste proteine hanno e che per questo sono state chiamate "sincizine". Fino ad ora, tutte le sincizine sono state associate a tre tipi di placentazione cosiddetti "invasivi", dove svolgono un ruolo nella formazione del sinciziotrofoblasto. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'espressione del gene di origine retrovirale *env*, in un panel di tessuti equini e nella placenta, che non prevede formazione di sinciziotrofoblasto.
È stata condotta un'indagine *in silico* volta a selezionare nel genoma equino gli ERVs da analizzare. Utilizzando tre algoritmi (LTR_STRUCT, BLAST e Retrotector) sono stati individuati ERVs svelati da almeno due approcci bioinformatici su tre. Un'ulteriore riduzione è stata ottenuta scegliendo sequenze *env* retrovirali omologhe alla glicoproteina di superficie di ERVs equini noti. ORFs più lunghe di 300 aminoacidi sono state cercate con ORFfinder di NCBI, e le risultanti 15 candidate sono state allineate per disegnare i primer nella regione di maggiore diversità. Tramite un saggio di qRT-PCR è stata valutata l'espressione del gene *env* nei diversi tessuti equini. È interessante notare che, sebbene la placenta equina non preveda la formazione di sinciziotrofoblasto nell'interfaccia materno-fetale, i nostri risultati mostrano che tale sequenza di origine retrovirale è significativamente più espressa (30-fold-change) a livello placentare rispetto agli altri tessuti esaminati, suggerendo un possibile ruolo di tali sequenze retrovirali endogene nella placentazione equina.

P17 - PRESENZA E DIFFUSIONE IN EUROPA DEL HARE CALICIVIRUS (HACV), UN LAGOVIRUS NON PATOGENO DELLA LEPRE BRUNA (LEPUS EUROPAEUS).

Cavadini P[1]., Molinari S[1]., Chiari M[2]., Pezzoni G[3]., Brocchi E[3]., Stalder G[4]., Posautz A[4]., Capucci L[1]., Lavazza A.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia e Emilia Romagna, Centro di Referenza Nazionale per le Malattie Virali dei Lagomorfi, Via Bianchi 7/9, Brescia*
[2] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia e Emilia Romagna, OEVRL, Via Bianchi 7/9, Brescia*
[3] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia e Emilia Romagna, Reparto Agenti ad Alta Diffusione, Via Bianchi 7/9, Brescia*
[4] *Research Institute of Wildlife Ecology, Department of Integrative Biology and Evolution, University of Veterinary Medicine, Savoyenstrasse1, Vienna, Austria*

Introduzione. La Sindrome della lepre bruna europea (EBHS) è un'epatite acuta causata da un calicivirus (EBHSV) appartenente, come l'RHDV del coniglio, al genere *Lagovirus.* Oltre a virus patogeni, il genere include diversi virus non patogeni, tutti identificati nel coniglio, di cui il Rabbit Calicivirus (RCV) è il prototipo. Poiché dati sierologici indicavano la presenza di lagovirus non patogeni anche nella lepre bruna europea, uno studio recente ci ha permesso di identificare in via preliminare tale virus (Hare Calicivirus – HaCV) nell'intestino di lepri allevate. Scopo di questo lavoro è confermare nel tempo la presenza dell'HaCV nell'allevamento di origine e verificare la sua diffusione nelle lepri selvatiche in alcuni Paesi Europei.
Metodi. Dal 2010 al 2015 sono stati campionati 323 intestini da lepri selvatiche provenienti da Emilia Romagna e Lombardia e da lepri di un allevamento in provincia di Brescia, unitamente a 210 intestini di lepri selvatiche cacciate nel 2011 in Austria e Germania. I campioni sono stati analizzati in RT-PCR, utilizzando dei primers universali per lagovirus ed i campioni positivi caratterizzati filogeneticamente per sequenziamento del gene della proteina capsidica. L'analisi sierologica sugli animali presenti in allevamento si è basata su metodiche ELISA in grado di evidenziare sia anticorpi anti-EBHSV specifici sia lagovirus cross-reattivi.
Risultati e discussione. Il gene della VP60 dell'HaCV è stato identificato in 71 campioni di diversa origine. L'HaCV mostra un'identità nucleotidica media del 73% e amminoacidica dell'82% con le sequenze di EBHSV e rispettivamente del 68% e 76,3% con le sequenze di RHDV. L'analisi filogenetica ha mostrato come tutte le sequenze identificate si raggruppino in uno specifico ramo dell'albero divergente da quello dell'EBHSV. Per quanto riguarda l'allevamento all'origine dell'isolamento (primo caso positivo retrospettivo del 2012), successivi isolamenti, anche in lepri rilasciate su territorio, e ripetute analisi sierologiche hanno confermato la persistenza del virus a tutto il 2015. Le identificazioni multiple in più paesi Europei confermano la probabile elevata diffusione dell'HaCV nelle lepri selvatiche. L'assenza di malattia con quadri simil-EBHS negli animali presenti in allevamento come pure negli animali selvatici, conferma la non patogenicità di questo nuovo lagovirus.

P18 - DIARREA EPIDEMICA DEL SUINO: STUDIO LONGITUDINALE IN QUATTRO ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA.

Bertasio C[1]., Giacomini E[1]., Lazzaro M[1]., Perulli S[1]., Papetti A[1]., Lavazza A[1]., Lelli D[1]., Alborali G[1]., Boniotti M.B.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia, Italy*

Introduzione. La diarrea epidemica del suino (PED) è una **malattia virale** causata da un coronavirus appartenente al genere *Alphacoronavirus*. Nel suino, la malattia si manifesta con diarrea, vomito, disidratazione e alta mortalità nei suinetti lattanti. Negli ultimi anni, la PED ha avuto un notevole impatto economico in Asia e negli USA e, a partire dal 2014, è ricomparsa anche in Europa. In questo lavoro viene descritto uno studio longitudinale condotto su quattro aziende suinicole del nord Italia, colpite da PED nel 2015.

Materiali e Metodi. In ogni azienda sono state selezionate 8-10 scrofe e 19-30 suini neonati per la raccolta dei dati clinici, prelievi di sangue, feci e tamponi rettali. Le scrofe sono state campionate solo al primo prelievo; i suinetti a 3-6 giorni di età e ad intervalli di 15-30 giorni, nel corso di 2-4 mesi (prelievo 1-6: P1-6). I sieri sono stati analizzati con cELISA per valutare la presenza di anticorpi, mentre le feci e tamponi rettali sono stati sottoposti a qPCR Real-Time per la quantificazione del titolo virale.

Risultati. Il 96% degli animali positivi alla PCR hanno evidenziato segni clinici. Le scrofe hanno mostrato titoli virali molto eterogenei con valori massimi di 6.4, 8.3, 7.6 e 6.5 $\log_{10}$ copie/mL nell' azienda 1, 2, 3 e 4 rispettivamente. Nei suinetti, la presenza del virus in P1 tramite PCR è stata del 63-100%, in P2 è scesa al 10-22% e in P3 solo pochi animali hanno mostrato quantità di virus rilevabili. In P1 i titoli virali hanno mostrato picchi fino a 8.5 $\log_{10}$ copie/mL, con medie sovrapponibili tra i quattro allevamenti. Il 54% delle scrofe ha rivelato positività al test sierologico, mentre in P1 la percentuale di suinetti con anticorpi anti-PEDV è stata del 12%. Solo il 3% dei suinetti positivi al test cELISA mostrano assenza di segni clinici evidenti. La percentuale di animali con anticorpi rilevabili raggiunge il picco massimo entro le tre settimane di età, per poi rimanere stabile fino alla fine dello studio.

Conclusioni. La valutazione dei sintomi clinici e l'analisi dei titoli virali e anticorpali degli animali hanno permesso di comprendere la dinamica dell'infezione di PEDV in azienda. Essi possono essere considerati dei validi indicatori per definire lo stadio della malattia all'interno di un allevamento oltre che rappresentare degli utili strumenti per comprendere la trasmissione e la circolazione del virus tra i vari settori, informazione fondamentale per l'adozione di misure di controllo e di contenimento.

19 - SORVEGLIANZA SIEROLOGICA PER HANTAVIRUS E FLAVIVIRUS NEI RODITORI SELVATICI IN ITALIA CENTRALE.

Sozio G[1]., Cosseddu GM[1]., di Domenico M[1]., Di Gennaro A[1]., Conte F.[1], Angelico G[2]., Cammà C[1]., Pascucci I.[1], Monaco F[1].

[1] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Via Campo Boario – Teramo*
[2] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini, n°1 – Perugia*

I roditori possono fungere da reservoir di numerosi patogeni zoonotici. Gli Hantavirus, in particolare i virus Puumala (PUUV) e Dobrava (DOBV), causano nell'uomo una febbre emorragica con sindrome renale (HFRS). PUUV è trasmesso dall'arvicola rossastra (*Myodes glareolus*), DOBV è trasmesso da roditori del genere *Apodemus.* In Italia, finora, non sono stati notificati casi di HFRS. Il genere Flavivirus comprende diversi virus zoonotici, tra questi i virus West Nile (WNV) e Usutu (USUV) circolano in Italia da anni. Nel nostro paese, le informazioni sulla circolazione di questi patogeni nei roditori sono scarse. Questo studio è stato realizzato con lo scopo di valutare la circolazione di Hantavirus e Flavivirus nei roditori selvatici nelle regioni di Abruzzo e Marche. I roditori sono stati catturati con trappole Sherman in 21 siti forestali, tra luglio 2014 e Aprile 2016. I soggetti catturati sono stati identificati e dopo sedazione si è proceduto: alla determinazione del sesso e dell'età, alla misurazione del peso e al prelievo di sangue dal plesso mandibolare. Infine gli animali sono stati liberati nei siti di cattura. Sono stati analizzati 90 sieri di: *Apodemus flavicollis* (n=60), *Apodemus sylvaticus* (n=6), *M. glareolus* (n=22), *Eliomys quercinus* (n=2). Per la diagnosi di Hantavirus è stato impiegato il test rapido per l'identificazione di anticorpi specifici (IgG) per PUUV nei roditori (ReaScan® Ab-Dect Puumala IgG – Reagena). La diagnosi di Flavivirus è stata effettuata mediante saggio ELISA competitivo (INgezim WNV Compac – Ingenasa). I campioni positivi e dubbi al test ELISA sono stati ulteriormente sottoposti ai test di sieroneutralizzazione (SN) per la conferma di WNV e USUV. Nessun campione è risultato positivo al test per PUUV, mentre positività al test Elisa per WNV sono state riscontrate in 4 campioni di *A. flavicollis*, catturati in Abruzzo (n=2) e nelle Marche (n=2). Il test di SN ha confermato 2 campioni positivi per WNV e nessuno per USUV. I risultati di questo studio indicano l'assenza di circolazione di PUUV nelle aree campionate. La sorveglianza per Hantavirus nei roditori dovrebbe essere estesa ad aree più ampie del territorio nazionale. Il riscontro di positività ai test sierologici per il virus West Nile mostra che i roditori selvatici sono sensibili al virus in condizioni naturali. Il significato epidemiologico di questa osservazione deve essere ulteriormente approfondito.

P20 - AGGIORNAMENTO SUI CEPPI DI CANINE DISTEMPER VIRUS CIRCOLANTI IN ITALIA.

Mira F[1]., Di Bella S[1]., Gucciardi F[1]., Vicari D[1]., Guarraci A[2]., Vullo S[1]., Chetta M[1]., Cammarata G[1]., Purpari G[1]., Guercio A.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri"*
[2]*Medico Veterinario Libero Professionista, Palermo*

Il cimurro è una malattia del cane causata da Canine Distemper Virus (CDV), un RNA virus appartenente al genere *Morbillivirus* della famiglia *Paramyxoviridae*. Il genoma di CDV codifica per sei proteine virali tra cui l'emoagglutinina, codificata dal gene H. I ceppi circolanti di CDV sono raggruppati principalmente in sette lineages sulla base della correlazione genetica del gene H. Studi precedenti hanno evidenziato la circolazione in Italia di almeno tre distinti lineages (Europe-1, Europe Wildlife ed Arctic). Recentemente, ceppi appartenenti al lineage Arctic sono stati segnalati in Italia anche in lupi, volpi e tassi.
Obiettivo del presente lavoro è stata la valutazione biomolecolare dei ceppi di CDV isolati in Sicilia nel 2015. A tale scopo sono stati analizzati 126 campioni (tamponi oculocongiuntivali, feci ed organi) prelevati da 32 cani con sospetto cimurro. I campioni sono stati sottoposti ad una RT-PCR (Barrett T. *et al*., 1993) che amplifica un segmento del gene P, che ha dato esito positivo in 43 campioni di 18 cani. I campioni di 6 cani sono stati sottoposti ad un'ulteriore RT-PCR (Demeter Z. *et al*., 2007) che amplifica l'intera sequenza del gene H. I prodotti di amplificazione sono stati sequenziati. Le sequenze ottenute sono state analizzate e comparate con altre disponibili in GenBank. E' stata effettuata l'analisi filogenetica.
L'analisi delle sequenze ha evidenziato un'elevata omologia reciproca (99,7-100%). La comparazione ha rilevato un'identità nucleotidica (99,6-99,8%) con ceppi isolati in cani provenienti dall'Ungheria e con ceppi di cani e carnivori selvatici (>99%) identificati nel 2013 in Italia. L'analisi filogenetica ha identificato questi ceppi come appartenenti al lineage Arctic. All'interno di questo lineage i nostri ceppi formano un cluster separato insieme ad altri ceppi di recente isolamento (2012-2015). Rispetto ai primi ceppi appartenenti al lineage Arctic segnalati in Italia nel 2006, questi ceppi mostrano quattro sostituzioni non sinonime comuni, di cui una interessa un potenziale sito di glicosilazione. Nei ceppi esaminati è stata evidenziata anche un'altra sostituzione non sinonima (F172), già presente in cani del nord-est italiano nel 2000.
Questi dati preliminari indicano che, seppure i ceppi di CDV analizzati appartengano allo stesso lineage, presentano patterns aminoacidici differenti che potrebbero condizionare l'interazione virus-ospite.

P21 - VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI INTRODUZIONE DELL'INFLUENZA AVIARIA IN EMILIA-ROMAGNA TRAMITE CONTATTO CON AVIFAUNA SELVATICA.

Procopio A[1]., Galletti G[1]., Santi A[1]., Paternoster G[1]., Licata E[2]., Guberti V[3]., Tamba M.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna*
[2]*Dipartimento di Sanità Pubblica Azienda USL di Modena - Servizio veterinario*
[3]*Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale*

Il piano nazionale di sorveglianza dell'influenza aviaria (PNIA) individua le province da controllare sulla base della densità di allevamenti e sulla presenza di zone umide. Le regioni possono individuare altre aree a rischio di introduzione del virus per contatto con l'avifauna selvatica, serbatoio del virus.
A tale scopo in Emilia-Romagna è stato sviluppato un indice di rischio di introduzione per contatto con avifauna selvatica (IRIS), che viene determinato dalla vicinanza ad aree umide, dall'abbondanza di anatidi, dall'estensione dei loro movimenti e dalla prevalenza di Influenza Aviaria (IA). Il territorio regionale è stato suddiviso in celle da 1 Kmq, utilizzando la griglia di riferimento europea fornita dalla European Environment Agency, e per ciascuna cella è stato calcolato il relativo IRIS, che rappresenta la densità per Kmq di anatidi infetti. I dati utilizzati di prevalenza (5%), censimento e distanze di volo sono stati raccolti nel periodo invernale. Per individuare valori soglia attraverso i quali stabilire delle classi di rischio è stata analizzata la distribuzione di IRIS nelle celle attorno a 33 focolai primari di IA (6 HPAI, 27 LPAI), rilevati in Emilia-Romagna dal 2000 al 2015. Sono stati individuati tre livelli di rischio (basso, medio, alto) utilizzando il 33esimo percentile (0.25) e la mediana (0.40) di questa distribuzione; in tal modo è stato possibile definire le aree a rischio nelle quali applicare eventuali misure preventive.
Poiché i parametri utilizzati nel calcolo di IRIS sono riferiti al periodo di svernamento dell'avifauna selvatica (nov-feb), abbiamo valutato separatamente la distribuzione di IRIS attorno ai focolai invernali e non invernali. Le distribuzioni non appaiono differenti, suggerendo che, anche durante il periodo in cui avvengono le migrazioni e cambiano le dinamiche della prevalenza di IA nell'avifauna selvatica, IRIS permette comunque l'individuazione delle aree dove è più probabile il contatto tra anatidi infetti e pollame.
Dalla classificazione ottenuta risultano ad alto rischio introduzione ampie porzioni delle province di Forlì-Cesena, Ravenna, Bologna e Ferrara. Quest'ultima è stata aggiunta all'elenco delle province a rischio del PNIA sulla base del presente studio ed è stata sede nella primavera 2016 di un focolaio HPAI H7N7 in un allevamento biologico di ovaiole. L'indagine epidemiologica ha evidenziato che il virus IA molto probabilmente è entrato in allevamento attraverso contatti con la fauna selvatica.

P22 - STIMA DELL'ACCURATEZZA DI UN TEST ELISA INDIRETTO PER LA DIAGNOSI DI WEST NILE NEI CORVIDI. UN MODELLO A CLASSI LATENTI.

Procopio A[1]., Caminiti A[1]., Prosperi A[1]., Perulli S[1]., Lelli D[1+]., Galletti G[1]., Moreno A[1]., Paternoster A[1]., Santi A[1]., Licata E[2]., Gelmini L[1]., Rugna G[1]., Lavazza A[1]., Tamba M.[1]

[1]*Istituto zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER)*
[2]*Dipartimento di Sanità Pubblica Azienda USL di Modena - Servizio veterinario*

Il virus West Nile (WNv) è uno dei più diffusi arbovirus e negli ultimi anni è diventato endemico in alcune regioni italiane. L'avifauna selvatica migratoria e stanziale è implicata nella diffusione e nel mantenimento del WNv in un territorio. Lo studio si propone di stimare la Sensibilità (Se) e la Specificità (Sp) diagnostica di un test ELISA indiretto per il rilevamento di anticorpi nei confronti del WNv nei corvidi. Il test è stato messo a punto presso il Laboratorio di Virologia dell'IZSLER, per disporre di uno strumento di screening rapido ed economico.

Tra il 2013 e il 2014 sono stati prelevati 137 campioni di siero (67 nel 2013 e 70 nel 2014) da gazze (*Pica pica*), di età inferiore a un anno, abbattute nelle province di Ferrara e Modena. I campioni sono stati testati in parallelo con il test ELISA e con il test di sieroneutralizzazione (SN), secondo la metodica OIE (cut-off 1:10). Il test ELISA impiega un antigene ricombinante corrispondente al dominio III della proteina E dell'envelope di WNv (*Istituto Pasteur*), adsorbito su piastra, posto a reazione con sieri in esame alla diluizione 1:500. Per il rilevamento delle immunoglobuline aviari si è utilizzato un anticorpo monoclonale "pan-avian" coniugato con perossidasi.

I risultati dei due test sono stati analizzati con modelli bayesiani a classi latenti, per stimarne Se e Sp diagnostica a diversi cut-off del test ELISA. I modelli sono stati implementati con e senza termini di dipendenza condizionale tra ELISA e SN. Il Bayesian P-value è stato utilizzato per valutare la bontà di adattamento dei modelli, il DIC (Deviance Information Criterion) per la scelta del modello. Le elaborazioni sono state svolte con WinBUGS.

Per tutti i cut-off è stato selezionato il modello che non contiene i termini di dipendenza condizionale. Risultati: con il cut-off 10% OD il test ELISA ha Se 93% (=mediana; 95%PCI: 83-100%) e Sp 79% (95%PCI: 55-99%), il test SN ha Se 86% (95%PCI: 74-99%) e Sp 84% (95%PCI: 65-99%). Con il cut-off 30% OD, la Se del test ELISA è 78% (95% PCI: 52-99%) e la Sp 94% (95% PCI: 83-100%), il test SN ha Se 95% (95%PCI: 84-100%) e Sp 63% (95%PCI: 48-94%). Come atteso, all'aumentare del cut-off diminuisce la Se ed aumenta la Sp del test ELISA, che sembra avere delle buone performance in termini di accuratezza a tutti i cut-off considerati. I sieri sono stati raccolti in un'area in cui circola anche il virus Usutu, stesso sierogruppo del WNv, e questo può avere influito sui valori di specificità stimati.

P23 - CIRCOLAZIONE DI CORONAVIRUS IN QUATTRO SPECIE DI CHIROTTERI DEL PIEMONTE.

Rizzo F[1]., Bertolotti L[2]., Robetto S[1]., Lelli D[3]., Rosati S.[2], Culasso P[4]., Calvini M[4]., Toffoli R[4]., Orusa R.[1], Mandola M.L.[1]

[1]*Istituto zooprofilattico sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZS PLV), Via Bologna 148, Torino*
[2]*Dipartimento di Scienze Veterinarie,Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO)*
[3]*Istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna*
[4]*Chirosphera*

In seguito alla comparsa di zoonosi altamente virulente, è stato dimostrato il ruolo dei pipistrelli nel loro mantenimento e la capacità di questi mammiferi di ospitare virus geneticamente anche molto diversi. Il presente studio si propone di indagare la circolazione di virus nelle popolazioni di chirotteri del Piemonte e Liguria. Qui riportiamo i risultati ad oggi raggiunti nell'identificazione di alpha coronavirus (αCoVs) in tre specie di chirotteri in Piemonte.

Tamponi orali, urina, feci e carcasse in buono stato di conservazione sono stati raccolti da chirotterologi autorizzati nel periodo di attivita' dei chirotteri dal 2013 al 2015. Lo screening molecolare per la famiglia delle *Coronavirinae* e' stato realizzato con una PCR end point specifica per il gene per la RNA polimerasi virale (RdRp). I campioni positivi sono stati caratterizzati filogeneticamente e messi in coltura sulle linee continue Vero, Mark 145 e TB1Lu.

Ad oggi 184 chirotteri appartenenti a 18 specie diverse sono stati analizzati. La positivita' per Coronavirus e' risultata in 11 esemplari delle specie *Myotis nattereri*, *Myotis daubentonii*, *Pipistrellus kuhlii* e *Pipistrellus pipistrellus*. La caratterizzazione filogenetica e' stata possibile per nove sequenze del frammento RdRp (382 bp) di Coronavirus ottenute da campioni di feci e urina appartenenti alle specie *M. nattereri (n=3)*, *P. kuhlii* (n=2) e *P. pipistrellus* (n=4). Le tre sequenze di αCoV riscontrate in *M.nattereri* formano un unico clade divergente per il 15% da sequenze di αCoV in *M.nattereri* identificate in Inghilterra. La determinazione di specie sulla base della sequenza del Citocromo B ha rivelato che i tre esemplari appartenevano alla specie *M.nattereri SpA*, una nuova specie in via di definizione all'interno del complesso di specie criptiche *M. nattereri.* Tre sequenze di αCoV ritrovate in *P.pipistrellus* formano un unico clade, mentre la quarta risulta divergente per il 28% dalle altre. Inaspettatamente le due sequenze di αCoV in *P.kuhlii* risultano al 25% divergenti tra di loro.

Sulla base della filogenesi del frammento RdRp risulta che tutte le sequenze identificate in questo studio appartengono al genere alpha coronavirus. Inoltre, un lineage divergente di αCoV e' stato caratterizzato in *M.nattereri SpA*.

In conclusione, i nostri risultati confermano l'associazione specie specifica tra coronavirus e specie ospite, ma resta da chiarire la notevole divergenza riscontrata in αCoV di chirotteri della stessa specie.

P24 - PESTE SUINA AFRICA IN SARDEGNA NEL 2015: ESPLORAZIONE DEI DATI SIEROLOGICI TRAMITE ANALISI SPAZIALE.

Scoccia E.[1], Maresca C[1]., Oggiano A[2]., Bandino E[2]., Ruiu A[2]., Addis G[2]., Iscaro C[1]., Feliziani F.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia*
[2]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna*

La Peste Suina Africana (PSA) rimane una malattia endemica in Sardegna e nonostante l'adozione di severe misure per contrastarla, dal 2011, è stata osservata una significativa ondata epidemica della malattia. Il monitoraggio sierologico, che prevede il controllo della popolazione di suini domestici e selvatici, è un importante strumento previsto dal piano di eradicazione. Inoltre, la sorveglianza sierologica è prevista nel caso di focolaio di PSA negli allevamenti suini situati nella zona di sorveglianza e di protezione.
Lo scopo di questo lavoro è stato quello di esplorare la geografia del territorio con strumenti informatizzati utilizzando i dati sierologici derivanti dall'applicazione del piano.
Per questo studio sono state considerate le diagnosi sierologiche effettuate dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna nel 2015. Nello specifico sono stati valutati i campioni sieropositivi (al test di screening e/o prova di conferma) e mappate le relative aziende considerando positivo l'allevamento con almeno un campione sieropositivo. L'analisi spaziale è stata condotta attraverso la produzione di mappe puntiformi, di concentrazione e la creazione di aree *hotspots* utilizzando il *software freeware* QGIS 2.4.0-Chugiak. È stata valutata l'eventuale associazione tra i sieropositivi riscontrati nelle due aree di rischio individuate (alto e basso rischio) con l'*Odds Ratio* (OR) e il test del chi-quadrato (χ^2) di *Pearson* per verificare la significatività (*p-value*$\leq$0,05*)* tramite il *software* Stata 11.2.
Sono stati testati 89150 sieri provenienti da 11292 aziende, di queste 11006 sono state georeferenziate. 152 aziende sono risultate positive, la loro georeferenziazione ha messo in evidenza 6 *hotspots* che si trovano nell'area conosciuta come la zona storicamente endemica per PSA. Inoltre è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa con le aree classificate a basso rischio (p=0,0049) con un OR pari a 1,28 (IC95%: 1,08-1,52), indicando la probabilità di avere un 28% in più di campioni positivi nelle aree ad alto rischio.
La rilevazione di animali sierologicamente positivi è un indicatore importante della circolazione virale; spesso è anche l'unica traccia della circolazione virale, ed è fondamentale attribuire a queste informazioni il corretto significato epidemiologico. L'applicazione di strumenti geografici in questo campo è molto utile nella categorizzazione del rischio e per valutare la diffusione dell'infezione nella popolazione target.

P25 - EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEGLI SRLV NEL MEDITERRANEO.

Bertolotti L[1]., Reina R.[2], Puggioni G[3]., Dei Giudici S[3]., Rocchigiani A.M[3]., Rosati S.[1]

[1]*Dipartimento Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO)*
[2]*Universidad Pública de Navarra, Instituto de Agrobiotecnología, Pamplona, Spagna*
[3]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari, Italia*

E' noto come i lentivirus dei piccoli ruminanti siano un gruppo di virus eterogeneo, in grado di infettare sia ovini che caprini. Dopo la caratterizzazione dei due primi ceppi associati all'infezione nella pecora (Visna Maedi virus – VMV) e nella capra (virus della artrite encefalite caprina – CAEV), gli SRLV sono stati geneticamente suddivisi in 4 genotipi (A, B, C ed E), la cui diffusione è risultata essere molto ampia, in particolare per i genotipi A (VMV-like) e B (CAEV-like), mentre i restanti genotipi risultano essere più localizzati geograficamente. Se per il genotipo A sono stati identificati numerosi sottotipi (A1-A15) il genotipo B è considerato meno eterogeneo; infatti le sequenze disponibili sembrano essere strettamente correlate al prototipo CAEV B1, mostrando nei sottotipi B2 e B3 una minore variabilità. Il genotipo E risulta essere ancora più ristretto a due soli sottotipi identificati al momento solo in Italia.
Gli studi condotti finora hanno mostrato forti legami epidemiologici nel bacino del mediterraneo. Esempi di questi legami sono forniti dai genotipi B ed E.
In questo lavoro sono state prese in considerazione le sequenze di SRLV-B e SRLV-E provenienti da Italia e Spagna. I campioni analizzati provengono da allevamenti ovini e caprini in cui test sierologici di screening hanno mostrato una forte reattività. Il DNA estratto da buffy coat è stato utilizzato per amplificare una regione di 800 bp del genoma del provirus e le sequenze nucleotidiche ottenute mediante sequenziamento diretto sono state utilizzate per descrivere le relazioni filogenetiche tra i diversi ceppi e per inferirne l'evoluzione. Per ottenere queste informazioni è stato utilizzato un approccio bayesiano (MrBayes e BEAST, basati sull'analisi dei modelli evolutivi GTR).
I risultati mostrano come i ceppi di SRLV siano fortemente legati tra loro e si siano differenziati in momenti storici più o meno recenti. Infatti nel caso del sottotipo B3, le analisi mostrano come i ceppi sardi e spagnoli siano geneticamente simili pur formando un clade divergente rispetto ai prototipi Fonni e Volterra, con una storia evolutiva relativamente recente (*Timing Most Recent Common Ancestor*: 15-20 anni). Diverso il caso del genotipo E, all'interno del quale i sottotipi E1 e E2 indicano come progenitore un ceppo sardo databile a metà del 1800.
In entrambi i casi, la relazione tra differenti ceppi e il legame tra le differenti aree geografiche è noto e ben supportato dalle analisi condotte: gli scambi commerciali sono da sempre considerati un fattore di rischio per la trasmissione di agenti infettivi e, in questo caso, le informazioni contenute nel genoma virale permette di identificarne il periodo storico.

P26 - STUDIO DELL'EVOLUZIONE DEL VIRUS DELLA MALATTIA VESCICOLARE DEL SUINO IN ITALIA ATTRAVERSO L'ANALISI DELLE SEQUENZE GENOMICHE COMPLETE E DEL PROFILO ANTIGENICO.

Bregoli A[1]., Foglia E[1]., Pezzoni G[1]., Grazioli [1]., Calzolari M[1]., Chiapponi C[1]., Brocchi E. [1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna*

La Malattia Vescicolare del Suino (MVS) è causata da un virus appartenente al genere *Enterovirus* famiglia *Picornaviridae*, il genoma è costituito da RNA a filamento positivo di circa 7400 nt. Il virus è presente con un solo sierotipo e 4 distinte varianti genomico-antigeniche. Il virus è stato riscontrato per la prima volta nel 1966 in Italia, poi in vari paesi europei negli anni 70-80; in seguito è persistito solo in Italia fino al 1992, quando una nuova variante introdotta dall'Olanda ha dato origine a sporadici focolai in Belgio, Spagna, Portogallo e si è insediata in Italia fino al 2015.

Un obiettivo di questo lavoro è stato lo studio dell'evoluzione dei virus MVS circolanti in Italia dal 1992 al 2015 (variante genomico-antigenica più recente), attraverso l'analisi del genoma completo, ottenuto con piattaforma MiSeq (Illumina), di 184 ceppi rappresentativi dell'arco temporale considerato ed inclusivi di alcuni rappresentanti delle 3 varianti precedenti.

Per ogni ceppo sono state ottenute sequenze quasi complete della lunghezza di 7335 nt. L'analisi filogenetica bayesiana della porzione codificante, mostra la separazione dei ceppi italiani dell'ultima variante in due cluster principali, con un probabile progenitore comune risalente al 1990-91. Un primo cluster comprende due sub-lineaggi distinti, di cui uno composto da virus isolati nel periodo più lontano (1992-98) e l'altro composto da virus isolati dal 2004 in poi, probabilmente derivati da una re-introduzione dal Portogallo (lineaggio "portoghese"). Il secondo cluster comprende ceppi evoluti in Italia dal 1995 al 2007 (lineaggio italiano).

A partire dal 2007, sono stati individuati prevalentemente ceppi generati da un evento di ricombinazione tra lineaggio italiano e portoghese.

L'evoluzione antigenica di 54 ceppi rappresentativi dell'ultima decade è stata analizzata utilizzando un pannello di 25 Anticorpi Monoclonali (AcM) di cui 18 neutralizzanti. L'analisi del profilo antigenico, basata su 5 diversi siti target degli AcM neutralizzanti e confrontata con gli isolati degli anni precedenti già caratterizzati, rileva una sostanziale uniformità dei ceppi ma con alcuni trend evolutivi, in particolare rispetto al sito Ib (VP1, B-C loop) soggetto a mutazione e retromutazione che modificano nel tempo la reattività dei rispettivi AcM target, e rispetto al sito IV (VP1 C-end), che muta perdendo gradualmente la reattività dell'AcM target. Sono in corso analisi comparative tra le variazioni antigeniche e genetiche.

P27 - SEQUENZIAMENTO COMPLETO DI DIVERSI SUB-GENOTIPI DI BVDV-1 MEDIANTE NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS).

Bazzucchi M.[1], Bertolotti L.[2], Rossi E.[1], Giammarioli M[1]., Rosati S.[2], De Mia GM.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia*
[2]*Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO)*

L'Italia, con la accertata presenza di 14 sub-genotipi virali diversi, rappresenta il Paese con la più elevata diversità genetica per BVDV-1. E' noto che la variabilità genetica e antigenica incidono nella diagnosi e nell'applicazione di idonee misure di controllo nei confronti della malattia. Gli studi disponibili in letteratura sulla caratterizzazione genetica del virus BVDV, sono stati sino ad ora effettuati mediante analisi parziale delle regioni genomiche *5'UTR* e, in minor misura, *Npro*. L'obiettivo del presente studio è stato quello di ottenere sequenze complete di 7 isolati virali appartenenti a sub-genotipi diversi di BVDV-1, alcuni dei quali, mai sottoposti in precedenza a *full genome sequencing*.
Allo scopo sono stati analizzati 7 isolati collezionati tra il 2004 e il 2012, appartenenti ai sub-genotipi 1a (275/2005), 1b (3240/2006), 1c (858/2009), 1e (7219/2005), 1g (50808/2004), 1h (44789/2007) e 1r (11803/2012). L'RNA virale è stato estratto da supernatante cellulare dopo opportuna digestione enzimatica con DNase ed RNase. Le librerie sono state preparate utilizzando il kit TruseqRNA (Illumina), quantificate mediante real time PCR e sequenziate mediante Illumina Miseq (Illumina). Per ciascun campione sono state allestite sia librerie *pare-end* che *mate-pair.* Le *reads* generate sono state analizzate mediante un approccio "assembling de novo" e l'utilizzo degli strumenti di analisi Abyss, Velvet e Mira, integrati in Geneious 9.1.2.
In 6 casi, la procedura di assemblaggio ha permesso di ottenere la sequenza completa. Per un campione invece, è stato necessario completare la sequenza con il metodo Sanger. La lunghezza dei genomi ottenuti varia tra 11.832 bp e 12.681 bp, con un *coverage* variabile tra 300X e 31kX. In tutti i casi è stato possibile identificare la sequenza codificante per l'intera poliproteina virale. In un campione, è stata inoltre evidenziata la co-presenza sia del biotipo *ncp* che di quello *cp*, caratterizzato dall'inserzione di un frammento di ubiquitina bovina. L'analisi filogenetica effettuata sulle sequenze complete, ha confermato l'appartenenza a 7 sub-genotipi distinti. La costituzione di una banca dati di sequenze complete per ogni sub-genotipo circolante di BVDV-1 potrà facilitare lo studio di fenomeni come la deriva antigenica e chiarire il ruolo delle *quasi-specie* virali nel corso dell'infezione. Tutto ciò sarà di notevole aiuto nella messa a punto di idonei programmi vaccinali e, conseguentemente, nelle strategie di eradicazione dell'infezione.

P28 - SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE DI UN CEPPO PATOGENO DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA EQUINA.

Stefanetti V[1]., Capomaccio S[1]., Passamonti F[1]., Cook F[2]., Autorino G[3]., Scicluna MT[3]. , Coletti M[1]., Silvestrelli M[1]., Cappelli K.[1]

[1]Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia, Via San Costanzo 4, Perugia
[2]Gluck Equine Research Center, University of Kentucky, Lexington, United States
[3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana "M. Aleandri" Via Appia Nuova, 1411 Roma

L' Anemia Infettiva Equina (EIA) è una malattia virale degli equidi diffusa in tutto il mondo e sostenuta da un Lentivirus della famiglia Retroviridae. I genomi completi pubblicati in banca dati fino ad oggi derivano da pochi ceppi: quello del Nord America EIAV Wyoming, quello cinese EIAV Liaoning, giapponese EIAV Miyazaki 2011 e irlandese, EIAV IRE, quest'ultimo derivante da un focolaio di EIA in Italia ed Irlanda nel 2006 a seguito della trasmissione iatrogena del virus da sacche di plasma infetto. Nel presente studio, campioni di sangue e organi provenienti da cavalli di quel focolaio sono stati saggiati per gag e pol virale. I campioni positivi sono stati amplificati per l'intero genoma provirale attraverso una Long Run PCR, risultante in un amplicone di circa 8000 bp. I due campioni selezionati per il sequenziamento derivano da animali sintomatici ma con due differenti decorsi clinici (uno venuto a morte qualche giorno dopo l'infezione e l'altro dopo 5 mesi di malattia, caratterizzata da picchi febbrili). Dal momento che le mutazioni nel genoma EIAV sono collegate al numero dei picchi febbrili nel tempo, era ipotizzabile un diverso tasso di mutazione del genoma provirale in questi due soggetti. Tali campioni sono stati quindi sequenziati tramite un approccio NGS, utilizzando la piattaforma Roche 454 Flex. Le sequenze consenso sono state annotate e inserite in GenBank (KM247554, KM247555). Le reads ottenute sono state mappate sul genoma di riferimento irlandese (JX480631), dimostrando una percentuale di identità nucleotidica del 99.200% e 99.261% rispettivamente, supportando l'ipotesi che il focolaio irlandese e italiano del 2006 avessero la stessa origine.

Delle varianti chiamate (61 per KM247555 e 66 per KM247554), 37 erano presenti in entrambi i genomi, 24 solo in KM247555 e 29 in KM247554.

In conclusione, in questo studio sono state riportate per la prima volta le sequenze genomiche complete di due isolati italiani di EIAV. Il vantaggio di un sequenziamento NGS sta nell'elevato coverage che si ottiene per ogni singola base sequenziata, caratteristica che permette di effettuare una "variant calling", quindi di valutare le differenze dei campioni rispetto al genoma di riferimento. Inoltre avendo avuto diversi tempi di osservazione, è stata possibile l'identificazione di polimorfismi accumulati nel tempo. La maggior parte della mutazioni, scoperte a livello provirale, produce varianti non sinonimo, soprattutto KM247554 (66 SNP), a sottolineare che l'animale che ha avuto più picchi febbrili ha una quantità di mutazioni che pesantemente influenza la sequenza proteica.

P29 - FELINE CALICIVIRUS IN GATTI CON FORME SISTEMICHE GRAVI.

Elia G[1]., Camero M[1]., Bob S[2]., Martella V[1]., Tempesta M[1]., Buonavoglia C[1]., Decaro N.[1]

[1]*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari, Valenzano (Bari), Italia*

[2] *Libero Professionista, Ambulatorio Veterinario Associato Bo-Ferro, Torino*

Il calicivirus felino (FCV) provoca, generalmente, nei gatti una malattia respiratoria lieve e autolimitante. Tuttavia, negli ultimi anni sono state descritte forme di calicivirosi estremamente gravi (calicivirosi virulenta sistemica), caratterizzate da un coinvolgimento multiorgano ed un elevato tasso di mortalità. La diagnosi di queste forme sistemiche non è semplice: l'estrema variabilità genetica/antigenica di FCV non ha sinora permesso di identificare marker genetici specifici dei ceppi virulenti. Vengono descritti 3 casi di infezione da FCV in gatti con forme sistemiche gravi ad esito infausto. Gli animali presentavano una grave forma respiratoria con evidente dispnea. Solo in un caso è stato osservato un caratteristico edema della testa e concomitante presenza di ulcere linguali. I gatti sono risultati positivi sia a FCV che al parvovirus felino (FLPV). Il riscontro positivo dell'indagine immunoistichimica per FCV, possibile solo sugli organi di un animale, pur avvalorando il sospetto di calicivirosi sistemica, ha tuttavia evidenziato una maggiore distribuzione dell'antigene virale nell'intestino piuttosto che in organi, quali rene e polmone, con lesioni necroscopiche gravi. In base alla caratterizzazione molecolare i ceppi FCV sono risultati eterogenei tra di loro e non è stato possibile ritrovare delle mutazioni genetiche in grado di giustificare il fenotipo altamente virulento dei ceppi. Come già noto in letteratura, la mancanza di marker genetici degli stipiti FCV ipervirulenti conferma che la forma sistemica di calicivirosi felina può risultare associata ad un range estremamente ampio di genotipi FCV.

P30 - STUDIO IN VITRO DELL'EFFETTO DI BOHV-1 SULL'ESPRESSIONE DI ALCUNI RECETTORI TOLL-LIKE IN PBMC DI BOVINO.

Turin L.[1], Risalde M[1,2]., Riva F[1]., Romero-Palomo F[3]., Gómez-Villamandos J.C[3]., Luzzago C.[1]

[1]*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia*
[2]*SaBio (Health and Biotechnology), IREC, National Wildlife Research Institute (CSIC-UCLM-JCCM), Ciudad Real, Spain*
[3]*Department of Comparative Pathology, Veterinary Faculty, University of Córdoba-Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), Edificio Sanidad Animal, Campus de Rabanales, Córdoba, Spain*

I recettori della famiglia Toll-like (TLR) sono proteine transmembrana che riconoscono ligandi non-self e attivano la trasduzione del segnale che porta alla risposta immunitaria. Ogni TLR riconosce determinati ligandi, che possono essere molecole tipiche dei patogeni. I TLR coinvolti nella risposta antivirale sono TLR3, che riconosce dsRNA virale, TLR7 e TLR8, che riconoscono ssRNA virale e TLR9, che riconosce sequenze CpG non metilate.
Al fine di indagare le alterazioni della risposta immunitaria indotte da Herpesvirus Bovino di tipo 1 (BoHV-1) sono stati misurati i livelli di espressione di TLR 3, 7, 8 e 9 in cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) prelevate da 4 manze provenienti da un allevamento bovino indenne per BHV-1 e per virus della Diarrea Virale Bovina (BVDV) e da un soggetto persistentemente infetto (PI) da BVDV. I PBMC sono stati coltivati in vitro, infettati con BHV-1 e testati dopo 2, 18 e 48 ore per l'espressione dell'RNA messaggero dei TLR mediante Real-Time PCR. Controlli negativi (PBMC non infetti con BHV-1) sono stati predisposti per tutti i campioni.
Per TLR3 e TLR9 i livelli di espressione sono risultati molto contenuti sia per gli infetti che per i controlli. L'espressione dei recettori TLR7 e TLR8, molto bassa o assente a 2 e 18 ore, risulta down-regolata da BHV-1 a 48 ore; è interessante osservare che a 48 ore post-infezione è stato osservato il picco di replicazione di BHV-1 nei PBMC nel modello indagato e conseguentemente anche una elevata concentrazione di RNA messaggero responsabile della modulazione dei recettori.
I PBMC dell'animale PI da BVDV hanno espresso TLR7, TLR8 e TLR9 a livelli più elevati rispetto agli altri animali, a tutti i tempi testati e indipendentemente dall'infezione da BHV-1, tranne per TLR3, per il quale l'espressione risulta assente. L'andamento osservato nel soggetto PI mostra un'alterata risposta immunitaria verosimilmente conseguente al continuo stimolo costituito dalla moltiplicazione di BVDV.
Ulteriori indagini contribuiranno a chiarire i complessi i meccanismi attraverso i quali da un lato l'ospite rileva il virus e attiva la trasduzione dei segnali per un'efficace risposta immunitaria e dall'altro il virus evade la risposta dell'ospite.

P31 - VALUTAZIONE PRELIMINARE DELLA CORRELAZIONE TRA LESIONI ISTOPATOLOGICHE E TITOLO ANTICORPALE IN PECORE INFETTE DA MAEDI VISNA VIRUS IN SPAGNA.

Gayo. E[1], Polledo.L[2], Preziuso.S[4], Balseiro.A[3], Pérez Martínez.C[1], García Iglesias.M.J[1], and García Marín.J.F[1].

[1] *Dipartamento di Anatomia Patologica, Facoltà di Veterinaria, Università di León (Spagna)*
[2] *Micros Veterinaria, León, Spagna*
[3] *SERIDA, Gijón, Spagna*
[4] *Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria, Università di Camerino (Italia).*

Maedi Visna Virus (MVV) provoca infezioni croniche progressive linfoproliferative prevalentemente nella pecora. La diffusione nei diversi organi ed i quadri lesivi istopatologici possono essere variabili in tipologia ed estensione. L'obiettivo di questo lavoro era quello di valutare se esista una correlazione tra tipologia di lesione tissutale e titolo sierico di anticorpi anti-MVV in pecore di razza Assaf naturalmente infette.
Sono stati analizzati campioni di polmone, mammella e SNC inviati al Servizio di Diagnostica Patologica della Facoltà di Medicina Veterinaria di León (Spagna) e prelevati da 45 ovini sieropositivi e 8 sieronegativi per MVV. Le sezioni istologiche sono state sottoposte ad indagini immunoistochimiche (IIC) con anticorpi anti-CD3 per i linfociti T, anti-CD79 per i linfociti B, anti-CD68 per i macrofagi e anti-p28 e anti-gp135 per MVV. Sulla base di queste analisi, i campioni sono stati classificati come “lymphocytic pattern” (LP), caratterizzato da una netta predominanza di linfociti T, o “histiocytic pattern” (HP), con elevata quantità di macrofagi e linfociti B. Il titolo di anticorpi anti-MVV è stato valutato su campioni di siero mediante un kit ELISA commerciale (Elitest®, Hyphen BioMed, France). L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA test SPSS statistics. Le differenze tra i gruppi sono state valutate con il test di comparazione multipla di Dunnett ed i valori sono stati considerati statisticamente significativi per $P<0.001$.
Lesioni riferibili a MVV sono state osservate almeno in un organo nei 45 animali sieropositivi ma non negli 8 negativi. In particolare le lesioni rilevate in 21 soggetti erano HP, in 16 animali erano LP e in 8 animali si presentavano nella stessa sezione in forma mista HP-LP. La positività IIC per MVV appariva maggiore nei campioni classificati come HP rispetto a quelli LP. Inoltre gli animali con lesioni HP mostravano titoli anticorpali più alti rispetto agli animali LP. Animali con lesioni miste HP-LP presentavano titoli anticorpali intermedi tra quelli degli animali LP e HP.
Questi risultati preliminari suggeriscono che animali con lesioni di tipo HP abbiano titoli anticorpali più elevati ed una maggiore quantità di virus negli organi target, mentre gli animali con lesioni di tipo LP presenterebbero titoli più bassi e minore quantità di virus, sebbene siano necessari ulteriori approfonditi studi per quantificare e tipizzare il virus e per ampliare la casistica.

P32 - EVOLUZIONE DELL'RHDV2 VERSO L'ALTA PATOGENICITÀ: URGENZA DI UN VACCINO OMOLOGO PER LA TUTELA DELLE PRODUZIONI CUNICULE.

Capucci L.[1], Cavadini P[1]., Schiavitto M.[2], Lombardi G[1]., Lavazza A.[1]

[1] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia e Emilia Romagna, Centro di Referenza Nazionale per le Malattie Virali dei Lagomorfi, Via Bianchi 7/9, Brescia*

[2] *Centro Genetico Associazione Nazionale Coniglicoltori Italiani (ANCI), Volturara Appula (FG)*

Introduzione. La malattia emorragica del coniglio (Rabbit Hemorrhagic Disease – RHD) è un epatite acuta dell'animale adulto causa di mortalità >80%. L'agente eziologico è un calicivirus (RHDV, genere Lagovirus) identificato per la prima volta in Cina nel 1984, diffusosi in breve in tutti i continenti e causa di ingenti danni per la zootecnia. Nel 2010 è stato identificato per la prima volta in Francia un nuovo virus (RHDV2) correlato geneticamente all'RHDV, ma diverso per profilo antigenico e patogenicità (mortalità media del 20%). Qui presentiamo i dati di un infezione sperimentale con ceppi RHDV2 italiani isolati nel 2014 e 2015.

Metodi. L'infezione sperimentale è stata eseguita in area BL3, previa autorizzazione del Ministero della Salute e nel rispetto delle norme nazionali (DM 4/3/2014 n°26) ed Europe (2010/63/EU) sulla sperimentazione animale. Tre gruppi di 5 conigli adulti, sieronegativi per RHDV ed RHDV2, sono stati infettati per via orale con 1 ml di un omogenato di fegato allo 0,5% w/v rispettivamente dei ceppi: 1) RHDVBs89, 2) RHDV2Ta14, 3) RHDV2Ch15. I conigli sono stati tenuti sotto osservazione clinica fino alla comparsa dei sintomi di RHD. Alla necroscopia sono seguiti test ELISA ed in PCR sul fegato per il rilevamento dell'RHDV ed RHDV2.

Risultati e discussione. I due isolati RHDV2 hanno causato RHD acuta in 4 dei 5 animali infettati, con risultati identici a quello del ceppo di riferimento RHDVBs89. Il tempo medio di mortalità è stato di 70 ore per l'RHDV2Ta14, identico a quello dell'RHDVBs89, e di 85 ore per l'RHDV2Ch15. L'esame necroscopico e gli alti titoli virali rilevati in ELISA hanno confermato l'RHD acuta in tutti gli animali. Un animale per ciascun gruppo è deceduto per una enterite batterica e non per RHD; l'esame anatomo-patologico non ha evidenziato lesioni specifiche di RHDV e i fegati erano positivi solo in PCR.

I dati dimostrano che gli isolati più recenti di RHDV2 hanno un grado di patogenicità (≥80% di mortalità) simile a quello dell'RHDV e di 4 volte superiore ai primi isolati del 2010 e 2011. I dati trovano conferma anche dalle osservazioni di focolai di RHD in campo da RHDV2 con mortalità in aumento negli anni.

Poiché sia risultati sperimentali che osservazioni sul campo hanno dimostrato che conigli vaccinati con l'RHDV sono protetti solo in minima parte dall'RHD causata dall'RHDV2, si sottolinea l'urgenza di poter disporre di un vaccino RHDV2 autorizzato per l'uso sul campo.

Dal punto di vista scientifico, i dati avvalorano l'ipotesi che RHDV2 non sia una variante dell'RHDV ma piuttosto un virus di nuova emergenza.

P33 - BOHV-4 COME VETTORE PER UN SINGOLO ANTIGENE ETEROLOGO PROTEGGE TOPI STAT1 (-/-) DALL'EFFETTO LETALE DEL MONKEYPOXVIRUS.

Menozzi V[1]., Franceschi V[1]., Parker S[2]., Rosamilia A[2]., Tebaldi G[2]., Macchi F[2]., Pompilio D[1]., Buller M.R[2]., Donofrio G.[1]

[1]*Department of Medical-Veterinary Science, University of Parma, Parma Italy*
[2]*Molecular Microbiology and Immunology, Saint Louis University School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA*

Il Monkeypoxvirus (MPXV) è l'agente eziologico di una zoonosi da orthopoxvirus emergente nella foresta tropicale africana, endemica nel bacino del Congo, sporadica nell'Africa dell'ovest e ad oggi può essere considerata come una patologia trascurata che interessa principalmente gli abitanti di regioni rurali particolarmente povere. La possibilità di essere infettati dal virus aumenta per le popolazioni che conducono una vita a stretto contatto con la natura. Il virus può essere trasmesso da persona a persona, anche se la vaccinazione contro il vaiolo è in grado di offrire una valida difesa contro l'MPXV. La campagna di vaccinazione contro il vaiolo in Africa, tuttavia, si è conclusa nel 1980 e per questo motivo la maggior parte della popolazione, ad oggi, non è protetta contro le infezioni del Monkeypoxvirus. La diffusione della malattia dipende dall'esposizione all'agente eziologico tramite non solo il contatto animale-persona, ma anche persona-persona. Ad oggi, tuttavia, non sono ancora disponibili terapie approvate dalla FDA e lo sviluppo di vaccini è ancora limitato da problemi legati alla sicurezza. Proprio per questi motivi, nuovi studi riguardanti la patogenesi, la profilassi e la terapia sono di interesse non solo per la comunità scientifica, ma anche per il governo, vista la possibilità di sfruttare il virus come agente bioterroristico. In questo studio viene presentato un nuovo approccio per lo sviluppo di un vaccino che sfrutta tre herpesvirus bovini (BoHV-4) ricombinanti come vettori per l'espressione di tre glicoproteine del Monkeypox (A29L, M1R e B6R), valutando la protezione contro l'effetto letale conferita a topi knockout per STAT1. BoHV-4-A-CMV-A29LgD_{106}ΔTK, BoHV-4-A-EF1α-M1RgD_{106}ΔTK e BoHV-4-A-EF1α-B6RgD_{106}ΔTK sono stati ottenuti tramite tecnologie ricombinanti ed è stata dimostrata la loro capacità di esprimere il transgene. Tutti e tre i virus si sono dimostrati sicuri dopo la somministrazione intraperitoneale, senza causare perdita di peso o evidenti eventi avversi. In seguito è stato dimostrato che il virus BoHV-4-A-EF1α-M1RgD_{106}ΔTK è in grado di offrire una protezione del 100% contro mortalità e morbidità e dell'80% se combinato con BoHV-4-A-CMV-A29LgD_{106}ΔTK e BoHV-4-A-EF1α-B6RgD_{106}ΔTK in topi $STAT^{(-/-)}$. Questo lavoro dimostra quindi l'efficacia di BoHV-4 come vettore e come strumento per la vaccinazione.

P34 - PROPRIETÀ IMMUNOGENICHE DI BOHV-4 RICOMBINANTE COME VETTORE PER LA GLICOPROTEINA GP1,2 DEL VIRUS DI EBOLA. DALLA PROGETTAZIONE IN SILICO ALLA SPERIMENTAZIONE IN VIVO.

Rosamilia A[1]., Tebaldi G[1]., Franceschi V[1]., Macchi F[1]., Verna E[1]., Cavirani S[1]., Donofrio G.[1]

[1]*Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università di Parma, Italia*

Il limite principale di lavorare con agenti patogeni come il virus Ebola (EBOV) è la necessità di strutture di contenimento molto costose. Pertanto, per potenziare le opportunità di sviluppo di vaccini verso EBOV, sono necessari approcci innovativi e diversi. Nel presente studio, è stata generata una piattaforma vaccinale utilizzando il virus di Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) ricombinante, BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK, che trasporta una sequenza del gene sintetico della glicoproteina immunodominante (GP) di EBOV. Nelle cellule trasdotte con BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK la GP di EBOV è stata abbondantemente espressa senza che si palesasse una diminuzione della replicazione virale. Nonostante la capra non sia un animale suscettibile all'infezione da parte di EBOLA, rappresenta un ottimo modello sperimentale per BoHV-4-based vector. Le capre immunizzate con BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK hanno prodotto alti titoli di anticorpi anti-EBOV GP, conferendo una risposta anticorpale rilevabile fino ad oltre sei mesi dall'inoculo. Inoltre, non è stato dimostrato che BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK provocasse una viremia e una localizzazione secondaria del virus negli animali immunizzati. Alti titoli anticorpali rilevabili con saggi ELISA sono considerati un valido mezzo per predire l'efficacia di un vaccino sperimentale contro EBOLA. La strategia che sfrutta l'utilizzo di geni sintetici ORF/BoHV-4 descritta qui, è un potenziale prototipo a basso costo utilizzabile per la sperimentazione di agenti patogeni di categoria A. Inoltre, il suo utilizzo è stato dimostrato essere sicuro ed efficace nell'immunizzazione sperimentale delle capre che possono essere utilizzate come siero-produttori durante.

P35 - STUDIO RETROSPETTIVO SULLA PRESENZA DI ANTICORPI ANTI VIRUS DELL'EPATITE E (HEV) IN SIERI DI DONATORI E VETERINARI CHE LAVORANO A CONTATTO CON SUINI.

De Sabato L.[1], Di Bartolo I[1]., Montomoli E.[2], Trombetta C[2]., Ruggeri F.M[1]., Ostanello F.[3]

[1]Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Roma, Italia
[2]Università di Siena, Dipartimento di Medicina Molecolare e dello Sviluppo, Siena, Italia
[3]Università di Bologna, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Ozzano dell'Emilia (BO), Italia

L'epatite E, causata dal virus dell'epatite E (HEV), è un'epatite acuta, di frequente asintomatica e autolimitante, che cronicizza prevalentemente nei pazienti immunodepressi. Quattro principali genotipi, raggruppano la maggior parte dei ceppi di HEV. I genotipi 1 e 2, trasmessi per via oro-fecale, infettano solo l'uomo e causano focolai epidemici nei paesi in via di sviluppo, legati al consumo di acqua contaminata. I genotipi 3 e 4, circolanti nei paesi sviluppati, infettano uomo e animali. Il suino è considerato il principale serbatoio dei ceppi zoonotici. Nei paesi sviluppati l'incidenza di forme autoctone è in costante aumento, con casi singoli o piccole epidemie causate dal consumo di carne cruda o poco cotta di maiale, cinghiale e cervo. Inoltre, sono stati descritti casi di epatite E correlati a trasfusioni di sangue.
In Europa, la sieroprevalenza nella popolazione generale varia tra lo 0,26% (Grecia) e il 52,5% (Francia).
Alcuni studi riportano valori di sieroprevalenza più elevati in alcune categorie professionali esposte al contatto con i serbatoi di HEV (allevatori, veterinari, cacciatori). In Italia la sieroprevalenza varia tra l'1,3% e il 9,1% per i donatori di sangue e il 2,7-2,9% per la popolazione generale.
In questo studio è stata valutata la sieroprevalenza, anti-HEV IgG e IgM, in 170 donatori di sangue e in 83 veterinari che lavorano a contatto con i suini, raccolti in Italia nel 2004. La ricerca di anticorpi è stata effettuata utilizzando un test ELISA commerciale e un in-house Western Blotting che utilizza come antigene la proteina capsidica di un ceppo suino di genotipo 3 di HEV. La sieroprevalenza osservata (IgG anti-HEV) è stata del 9,64% nei veterinari (8/83) e dell'8,82% (15/179) nei donatori. Inoltre, 3 dei 15 sieri di donatori di sangue positivi per IgG sono risultati positivi per IgM, pur in assenza di RNA virale.
In conclusione, nessuna differenza significativa di sieroprevalenza è stata osservata tra i due gruppi, come probabile conseguenza delle buone pratiche igieniche adottate dai veterinari coinvolti. Inoltre, la presenza di anticorpi nei donatori di sangue indica un pregresso contatto con HEV, suggerendo la necessità di una sorveglianza più attenta in questa categoria di soggetti.

P36 - IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI CEPPI DI EPATITE E (HEV) NEI CINGHIALI IN ABRUZZO.

Melegari I[1]., Di Profio F[1]., Sarchese V[1]., Robetto S[2]., Orusa R[2]., Martella V[3]., Marsilio F[1]., Di Martino B.[1]

[1]*Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo*
[2]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte-Liguria-Valle d'Aosta; CeRMAS: Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Animali Selvatici*
[3]*Facoltà di Medicina Veterinaria, Università Aldo Moro di Bari, Valenzano, Italy*

Il virus dell'epatite E (HEV) è un piccolo virus sprovvisto di *envelope* appartenente al genere *Orthohepevirus*, famiglia *Hepeviridae*. L'analisi di sequenza nucleotidica dell'intero genoma ha permesso di identificare quattro principali genotipi di HEV in grado di causare infezione nell'uomo. I genotipi (Gt) 1 e Gt2 presentano diffusione endemica nei paesi in via di sviluppo e sono stati finora identificati soltanto nell'uomo, mentre Gt3 e Gt4, associati a casi sporadici di epatite E nei paesi industrializzati, riconoscono come ospiti recettivi oltre l'uomo anche numerose specie animali. Suini, cinghiali e cervi sono attualmente considerati i principali serbatoi di infezione. Nel presente lavoro sono riportati i risultati di un'indagine molecolare per HEV condotta su una collezione di campioni fecali ottenuti da cinghiali adulti abbattuti nel corso delle regolari attività venatorie 2012-2014 in Valle d'Aosta e Abruzzo. Un totale di 196 campioni sono stati sottoposti a screening molecolare mediante nested RT-PCR impiegando due set di primer, ConsORF1 e ConsORF2, in grado di amplificare rispettivamente un frammento di 287-nt della regione altamente conservata della metiltransferasi (MTase) (ORF1) e un frammento di 145-nt localizzato al 3' di ORF2. L'RNA di HEV è stato identificato nell'1.5% (3/196) degli animali testati. Tutti i campioni positivi provenivano da cinghiali abbattuti in Abruzzo (6.25%, 3/48). L'analisi di sequenza della regione parziale della MTase ha mostrato per tutti i campioni la più alta identità nucleotidica (90,0-93,0%) con ceppi HEV Gt3 precedentemente identificati in Germania in un cinghiale (wbGER27) e in due pazienti umani (47832 e 47832c) con epatite cronica. L'applicazione di un protocollo RACE 3' ha permesso di ottenere per un ceppo HEV, il WB/P6-15/ITA, la sequenza di circa 3-kb che includeva la regione 3' di ORF1, e le sequenze complete dei geni ORF3 e ORF2 (numero di accesso a GenBank: KU508285). Sulla base dell'analisi filogenetica dell'intero gene ORF2, il ceppo WB/P6-15/ITA, è stato classificato all'interno del sottotipo c.

P37 - ANALISI MOLECOLARE DI VIRUS CON POTENZIALE ZOONOSICO E PATOGENO IN CANI DELL'ISOLA DI SÃO VICENTE, CAPO VERDE.

Prato R[1]., Chiavassa E[1]., Tizzani P[2]., Peletto S[1]., Acutis P.L[1]., Contadini F[2]., Peano A[2]., Caruso C[1]., Masoero L[1].

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta*
[2]*Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO)*

Norovirus (NoVs*), Kobuvirus* (KVs) e virus dell'epatite E (HEV), sono riconosciuti come agenti zoosici emergenti a diffusione mondiale. Per i Paesi industrializzati, sono disponibili numerosi dati epidemiologici su questi patogeni; tali dati, non sono altrettanto esaustivi per i Paesi in via di sviluppo, in relazione ad una scarsa possibilità di eseguire analisi *in loco*. In questo studio è stato allestito un protocollo di campionamento, stoccaggio e trasporto di campioni provenienti dall'Isola di São Vicente, Capo Verde, che ha permesso all'IZSPLV di effettuare analisi biomolecolari per la ricerca di virus zoonosici (NoVs, KVs, HEV) e a potenziale patogeno (CAV 1-2; CoVs) in feci di cani. Sono state raccolte 36 feci di cani e stemperate su carta bibula imbevuta di soluzione RNAlater-like. L'estrazione di acidi nucleici (RNA e DNA) è avvenuta mediante Trizol e kit a colonnine con successiva quantificazione di RNA/DNA (Nanodrop). La resa e la purezza degli acidi nucleici (RNA /DNA) è risultata ottimale per tutti i campioni eseguiti. Lo stoccaggio di materiale fecale su carta bibula imbevuta di soluzione RNA-later like si è dimostrata una procedura efficiente e in grado di sopperire agli impedimenti logistici e tecnici che non permettono l'esecuzione di un campionamento "tradizionale". Le analisi molecolari per HEV, NOV-1 e NOV-2, e CAV 1-2, condotte in PCR convenzionale e Real time, hanno dato esito negativo. Tale negatività può essere dovuta ad una bassa prevalenza dei patogeni nella popolazione, non rilevabile con il limitato campionamento effettuato. Di contro, sono state riscontrate positività per CoVs (3/36) e KVs (3/36) con una prevalenza dell'8,3%. La circolazione di CoVs è stata descritta anche da AA in un'altra Isola dell'arcipelago di Capo Verde (Vila do Maio) seppur con prevalenze più basse (1,9%); per quanto concerne KVs il nostro studio rappresenta la prima segnalazione per Capo Verde. Alla luce di ciò e, considerando il contesto sociale/sanitario dei territori oggetto di studio (densità popolazione canina; fenomeno del randagismo; mancanza di strutture sanitarie adeguate), è auspicabile un'implementazione dell'attività di sorveglianza anche nei confronti di altri virus patogeni (CDV e CPV) o a potenziale zoonosico (Rotavirus), al fine di indirizzare campagne vaccinali e valutare il ruolo della popolazione canina come "reservoir" di malattie trasmissibili all'uomo.