

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Workshop nazionale di virologia veterinaria

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

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 28-29 novembre 2005

RIASSUNTI

A cura di
Susan Babsa, Ivana Purificato e Franco Maria Ruggeri

Dipartimento di Sanità Alimentare e Animale

ISSN 0393-5620
ISTISAN Congressi
05/C10

Istituto Superiore di Sanità

Workshop nazionale di virologia veterinaria. Diagnostica ed epidemiologia delle infezioni virali degli animali. Istituto Superiore di Sanità, 28-29 novembre 2005. Riassunti.

A cura di Susan Babsa, Ivana Purificato e Franco Maria Ruggeri
2005, v, 77 p. ISTISAN Congressi 05/C10 (in italiano e inglese)

Il Workshop, svolto in collaborazione con gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali di Lazio e Toscana e di Umbria e Marche e la Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, ha l'obiettivo di riunire veterinari, biologi e tecnici di laboratorio delle strutture del Servizio Sanitario Nazionale (Istituto Superiore di Sanità, Istituti Zooprofilattici Sperimentali, Servizi veterinari di Aziende Sanitarie Locali e Regioni) e dell'Università che operano nei campi della patogenesi, diagnostica, epidemiologia e profilassi delle infezioni virali degli animali, al fine di facilitare contatti e scambi di informazioni e metodologie tra gli operatori impegnati nel settore. Il Workshop intende fornire un aggiornamento sulle nuove conoscenze di base e lo sviluppo di tecniche innovative per l'identificazione e la caratterizzazione dei diversi agenti virali implicati nelle principali patologie animali, e analizzare le nuove acquisizioni in tema di eziopatogenesi ed epidemiologia di agenti patogeni virali classici, emergenti e riemergenti in campo veterinario.

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

Istituto Superiore di Sanità

National Workshop on Veterinary Virology. Diagnosis and epidemiology of viral infections of animals. Istituto Superiore di Sanità, Rome, November 28-29, 2005. Abstract book.

Edited by Susan Babsa, Ivana Purificato and Franco Maria Ruggeri
2005, v, 77 p. ISTISAN Congressi 05/C10 (in Italian and English)

The Workshop is organized in collaboration with the Istituti Zooprofilattici Sperimentali of Lazio-Toscana and Umbria-Marche and with Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche of Brescia. It is aimed to gather veterinarians, biologists and technicians from the bodies of the Italian National Health Service (ISS, IZS, Veterinary Services of ASL and Regions) and from the University working in the areas of pathogenesis, diagnosis, epidemiology and prevention of viral infections of animals, to facilitate contacts and exchange of knowledge and methods between workers of the field. The Workshop will provide an update of the new basic knowledge and the development of innovative techniques for identification and characterization of the different viral agents involved in the main pathologies of animals, and will review the new advances on etiology and pathogenesis as well as epidemiology of classical, emerging and re-emerging viral pathogens of animals.

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

Responsabile scientifico:

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

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

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

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

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

© 2005 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

INDICE

Programma	iii
Note per la consultazione	v
Relazioni	1
Comunicazioni e Poster	23
Indice degli autori	75

PROGRAMMA

Lunedì 28 novembre 2005

**Prima sessione
INFEZIONI SISTEMICHE E CUTANEE**

Moderatori: Paolo Martelli, Cristiana Patta

14.30 *Biologia delle infezioni da Lentivirus dei piccoli ruminanti*
Francesco Tolari

Infezioni da Pestivirus

Gian Mario De Mia

*Test diagnostici strategici per il controllo delle malattie virali vescicolari (Afta e
Malattia Vescicolare del suino)*

Emiliana Brocchi

ORF virus: non solo ectima

Alessandra Scagliarini

16.00 Intervallo e visita poster

17.00 Comunicazioni

Martedì 29 novembre 2005

**Seconda sessione
LE EMERGENZE VIRALI IN SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA**

Moderatori: Canio Buonavoglia, Santo Caracappa

8.30 *Virus West Nile: approcci diagnostici in relazione all'epidemiologia dell'infezione*
Gianluca Autorino

Influenza aviare e sue implicazioni di salute pubblica

Ilaria Capua

Ecologia dei virus influenzali Tipo A negli animali nel bacino del Mediterraneo

Mauro Delogu

10.20 Intervallo e visita poster

Terza sessione
INFEZIONI ENTERICHE

Moderatori: Livia Di Trani, Santino Prosperi

10.50 *Coronavirus felini e peritonite infettiva*
Nicola Decaro

Calicivirus enterici: una zoonosi emergente?
Franco Maria Ruggeri

Recenti acquisizioni sulle correlazioni evolutive tra rotavirus animali e umani
Vito Martella

12.50 Intervallo e visita poster

Quarta sessione
SORVEGLIANZA E PROFILASSI DELLE INFEZIONI VIRALI

Moderatori: Antonio Lavazza, Giorgio Poli

13.50 *Quali e quanti sono i calicivirus dei lagomorfi? Una rassegna dei recenti dati su RHDV, EBHSV e virus correlati*
Lorenzo Capucci

Virus della rabbia e rabbia-correlati: situazione e prospettive per una malattia antica
Franco Mutinelli

Vaccini virali: quadro normativo e prospettive in ambito UE
Francesco Meliota

15.20 Comunicazioni e premiazione dei lavori selezionati

16.20 Conclusioni e chiusura dei lavori

NOTE PER LA CONSULTAZIONE

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

I lavori sono divisi in due sezioni:

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

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

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

Relazioni

BIOLOGIA DELLE INFEZIONI DA LENTIVIRUS DEI PICCOLI RUMINANTI

Francesco Tolari, Patrizia Bandecchi, Maurizio Mazzei
Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti, Università degli Studi di Pisa

Sotto la denominazione di Lentivirus dei piccoli ruminanti (SRLV) vengono raggruppati i virus MVV e CAEV responsabili di Maedi Visna Ovina e Artrite Encefalite Caprina, ma attualmente considerati come unica popolazione virale. Infatti diversi studi filogenetici hanno dimostrato che la classificazione basata sulla specificità di ospite può non essere sufficientemente accurata e questo è stato suffragato dalla identificazione di stipiti *MVV-like* in capre e di stipiti *CAEV-like* in pecore. La scoperta in Italia di un nuovo gruppo di isolati ovisini più simili a CAEV che ai classici stipiti di MVV fa pensare che le specie animali, piuttosto che specifici genotipi virali, possono giocare un ruolo importante nel determinare gli aspetti clinici. Recentemente è stato dimostrato che sequenze aminoacidiche di regioni immunodominanti dell'antigene principale capsidico e analogamente sequenze relative al gene ipervariabile *env* degli SRLV presentano una certa variabilità. La diversa reattività sierologica verso peptidi sintetici preparati da tali sequenze aminoacidiche può essere usata per discriminare gli stipiti *CAEV-like* dagli stipiti *MVV-like*.

Questi virus provocano in pecore e capre infezioni lente multisistemiche e persistenti associate a lesioni croniche progressive a carico di polmone, mammella, sistema nervoso centrale e articolazioni. A differenza dei lentivirus T-linfotropi gli SRLV non sono in grado di determinare immunodeficienza. Spesso la malattia decorre in forma subclinica e per il lungo periodo di incubazione caratteristico delle infezioni da lentivirus, la comparsa dei sintomi, non sempre evidenti e spesso poco patognomoniche, si verifica a distanza di anni dall'infezione. Pertanto la diagnosi della malattia è affidata soprattutto ad indagini di laboratorio, sia con metodiche dirette che indirette.

La malattia si trasmette da animali infetti ad animali sani con diverse modalità: per via inalatoria, a seguito di contatti stretti e prolungati soprattutto durante i periodi di stabulazione; per via digerente per assunzione da parte dei neonati di colostro e/o latte contenenti particelle virali e cellule infette; secondo alcune osservazioni occasionalmente è anche possibile la trasmissione transplacentare.

Una volta che il virus è penetrato nell'organismo infetta le cellule della linea monocito-macrofagica o i loro precursori, che risultano le cellule bersaglio primarie del virus e svolgono un ruolo importante nella trasmissione virale.

Il virus integra il proprio genoma nel DNA dei monociti dando luogo ad una infezione latente.

Il numero dei monociti infetti può essere molto basso (una cellula infetta ogni 10^5 - 10^6 leucociti), il ruolo di queste cellule è quello di fungere da "cavallo di Troia" e trasportare il virus ai vari organi e tessuti eludendo la reazione umorale e cellulare già attiva nell'organismo dell'animale infetto. In tali sedi i monociti maturano a macrofagi e in quel momento il virus approfitta della differenziazione cellulare per replicarsi e passare alle

cellule dei tessuti bersaglio. Al contrario di altri retrovirus gli SRLV non necessitano per replicarsi della divisione cellulare, ma piuttosto della differenziazione cellulare.

Gli organi bersaglio sono polmoni, mammella, articolazioni e SNC. La frequenza con la quale questi organi sono colpiti può variare in relazione a fattori genetici dell'ospite e allo stadio virale in causa. In alcuni casi il numero delle cellule infette è notevolmente alto. Per esempio nei polmoni di pecore infette circa il 12% dei macrofagi alveolari esprimono il virus, mentre la percentuale dei macrofagi infetti in tessuti non bersaglio, come il fegato, risulta molto bassa. Il virus si replica nelle cellule dell'epitelio ghiandolare mammario e le particelle virali gemmano nel lume alveolare. Questo fenomeno è funzionale ad una efficiente trasmissione dell'infezione ai neonati tramite colostro e latte. Anche i polmoni rivestono un ruolo importante nel meccanismo di trasmissione, perché in seguito alla loro infezione il virus può facilmente raggiungere l'ambiente esterno e venire trasmesso tramite le secrezioni bronchiali.

I diversi stipti virali possono differire nel loro tropismo cellulare; stipti più spiccatamente neurotropi differiscono parzialmente nelle sequenze nucleotidiche di *env* e LTR e mostrano una maggiore facilità di replicazione su substrati di plesso corioideo.

Come gli altri Lentivirus anche gli SRLV presentano una notevole variabilità genetica che influenza le proprietà biologiche e antigeniche.

Un certo grado di variabilità può essere evidenziato fra isolati virali ottenuti dallo stesso gregge e anche dallo stesso soggetto durante il lungo decorso dell'infezione. Questo fenomeno contribuisce alla persistenza virale, consente al virus di eludere le difese immunitarie dell'ospite e costituisce il principale ostacolo allo sviluppo di vaccini efficaci. Un nuovo approccio alla immunizzazione può essere fornito dai vaccini innovativi e in particolare dai vaccini a DNA sui quali sono in corso sperimentazioni. La variabilità genetica può comportare anche problemi nella diagnostica determinando una sottostima della prevalenza di infezione nelle popolazioni infette. I problemi riguardano la diagnosi diretta, basata sulla ricerca di sequenze virus specifiche mediante tecniche di PCR, in quanto può risultare difficile identificare sequenze genomiche comuni ai vari isolati virali sulle quali disegnare *primers* universali. Per quanto riguarda la diagnosi indiretta, basata sulla ricerca di anticorpi specifici negli animali infetti, la scelta degli antigeni deve essere fatta tenendo presente la notevole variabilità antigenica dei virus che circolano nelle diverse aree geografiche.

La variabilità genetica può avere importanti conseguenze non solo sulla possibilità di sviluppo di test diagnostici, ma anche sull'evoluzione delle caratteristiche biologiche del virus in relazione alla virulenza e a possibili ampliamenti dello spettro d'ospite. SRLV possono penetrare in cellule di origine umana, ma non si replicano o lo fanno in modo limitato a causa della scarsa attività del promotore virale in queste cellule, eventuali mutazioni potrebbero estendere lo spettro d'ospite di questi virus.

INFEZIONI DA PESTIVIRUS

Gian Mario De Mia

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

I pestivirus rappresentano agenti infettivi molto ben adattati alla loro specie ospite. Sostengono infezioni molto variegata nella loro evoluzione e perciò di non sempre facile rilievo. Ci sono diversi fattori che differenziano il genere pestivirus dagli altri membri della famiglia Flaviviridae cui essi appartengono. Tra questi, degni di rilievo sono la produzione della proteina non-strutturale Npro e la loro cross reattività antigenica. Il confronto tra sequenze della regione Npro ha consentito di individuare all'interno del genere pestivirus diversi *cluster*. Quattro di questi corrispondono alle quattro specie (o genotipi) riconosciuti: il genotipo 1 include ceppi per lo più di origine bovina (BVDV 1); il genotipo 2 comprende il virus della peste suina classica (PSCV); il genotipo 3 include isolati da ovini (o anche suini) con caratteristiche di "veri" virus Border Disease (BDV); il genotipo 4 comprende isolati sia bovini che ovini (BVDV 2). Tre ulteriori *cluster* includono un pestivirus isolato dalla giraffa, uno isolato dall'antilope pronghorn, e tre pestivirus raggruppati nello stesso genotipo e rappresentati da contaminanti di siero fetale bovino oltre ad uno stipite isolato dal bufalo brasiliano. In aggiunta ai sopracitati genotipi, recentemente sono stati geneticamente caratterizzati stipiti di pestivirus che, per le loro caratteristiche molecolari, sembrano anch'essi costituire nuovi *cluster*. Essi sono stati isolati dal camoscio dei Pirenei, da feti caprini in Italia centrale (stipite 712/02) e da pecore tunisine. Sia lo stipite "camoscio" che lo stipite 712/02 presentano percentuali di omologia di sequenza con il BDV attorno al 70%, tali quindi da fare ritenere che possano essere inclusi proprio all'interno di questo genotipo.

Nell'ambito dei ruminanti, il virus della Diarrea Virale del Bovino è unanimemente ritenuto uno dei più importanti patogeni della specie bovina. Si tratta di un virus ubiquitario e a diffusione cosmopolita la cui sieroprevalenza, nei paesi che non attuano alcun controllo per questa infezione, si stima possa essere compresa tra il 70% e il 90%. Gli stipiti non citopatogeni sono predominanti, il biotipo citopatogeno ha invece un ruolo attivo nel determinismo della malattia delle mucose. Il BVDV può rendersi responsabile di una varietà di condizioni cliniche. L'infezione acuta può accompagnarsi ad una sintomatologia inapparente o, al contrario, essere caratterizzata da un quadro clinico grave. Le infezioni persistenti (animali PI) acquisite in utero, determinano perdite economiche dovute per lo più ad un calo delle performances (ri)produttive. Tutti i piani di controllo si basano sulla individuazione e successiva eliminazione dei soggetti PI che costituiscono il serbatoio naturale del BVDV. Per quanto riguarda le forme acute, di solito considerate meno importanti, bisogna tuttavia tener conto del fatto che stanno circolando con sempre maggior frequenza stipiti a virulenza più elevata che nel passato. Inoltre, proprio le infezioni acute sono responsabili del 93% delle infezioni in utero dalle quali, come detto, originano i soggetti PI. Oggi si tende ad attribuire agli animali con infezione acuta un importante significato epidemiologico in quanto ritenuti, in assenza di animali PI, responsabili del mantenimento del virus in allevamento. Studi compiuti da più parti del mondo hanno dimensionato il problema relativo alle infezioni da BVDV concludendo che le perdite

economiche (dirette e indirette) che sono in grado di arrecare sono tutt'altro che trascurabili. La loro diffusione unitamente all'impatto economico che determinano sulle produzioni, ha indotto molti paesi alla pianificazione e alla implementazione di programmi di controllo e/o di eradicazione.

Il virus *Border Disease*, è responsabile di una sindrome congenita degli ovini e dei caprini caratterizzata da aborti e nascita di agnelli con anomalie del vello, disturbi nervosi di varia entità, ipomielinogenesi, malformazioni scheletriche e scarsa vitalità. L'elevato indice di mortalità degli agnelli nelle prime settimane di vita, le perdite dovute agli aborti e all'infertilità nonché lo scarso sviluppo dei sopravvissuti giustificano l'importanza della malattia.

La peste suina classica è un'infezione virale che colpisce il suino domestico e il cinghiale e che assume un ruolo rilevante dal punto di vista economico, soprattutto nei paesi con spiccata vocazione alla suinicoltura. La malattia si manifesta di solito in forma acuta e con elevata mortalità, sebbene nell'ultimo decennio si è assistito ad un aumento di casi caratterizzati da forme subcliniche o inapparenti che ne hanno reso più difficile l'individuazione precoce e la conseguente diagnosi. In particolare, la possibilità che il suino possa infettarsi anche con il BVDV e con il BDV (unica specie animale recettiva a tutti e tre i pestivirus) non fa che accrescere le difficoltà diagnostiche di laboratorio.

TEST DIAGNOSTICI STRATEGICI PER IL CONTROLLO DELLE MALATTIE VIRALI VESCICOLARI (AFTA E MALATTIA VESCICOLARE DEL SUINO)

Emiliana Brocchi, Santina Grazioli, Franco De Simone

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

L'innovazione tecnologica e l'ampliamento delle conoscenze scientifiche in ambito di diagnosi di laboratorio contribuiscono significativamente al controllo delle malattie infettive. Tra le infezioni sostenute da picornavirus, rivestono particolare importanza l'Afta Epizootica, per il rischio di introduzione in Europa, la diffusibilità e le devastanti conseguenze e la Malattia Vescicolare del Suino (MVS), perché soggetta a rigorosa politica di controllo nonostante la diminuita morbilità e perché l'Italia è l'unico paese dell'Unione Europea in cui la circolazione virale è ufficialmente dichiarata.

La rapida conferma di laboratorio e la caratterizzazione dei virus coinvolti nei focolai primari è una condizione essenziale per l'attivazione delle misure di controllo, inclusa, nel caso dell'Afta, la scelta di un idoneo vaccino. Test sensibili basati sull'amplificazione degli acidi nucleici e test immunologici che sfruttano le molteplici proprietà degli anticorpi monoclonali offrono una gamma completa di sistemi diagnostici.

Le linee guida per la conferma di laboratorio delle due malattie vescicolari non indicano un particolare test come metodo d'elezione ma suggeriscono di affiancare test diversi adattandoli alle circostanze. Circa l'80% dei casi clinicamente evidenti può essere confermato e tipizzato con un semplice e rapido test ELISA eseguito direttamente su materiale vescicolare, mentre nelle forme cliniche lievi (comuni nella MVS, o nei casi di Afta negli ovini) o su campioni biologici dove la concentrazione virale è ridotta (es. sangue o feci nel caso di MVS; sangue o fluido oro-faringeo nel caso di Afta) i test RT-PCR nelle svariate procedure descritte offrono una sensibilità persino superiore all'isolamento virale. Tra questi, la PCR *real-time* permette la possibilità di automazione, condizione che può essere utile per fronteggiare punte di emergenza diagnostica, come quelle verificatesi durante l'epizootia inglese di Afta nel 2001, in cui la richiesta di analisi era superiore a 1000 campioni per settimana. In quell'occasione, la diagnosi di laboratorio *post-mortem*, eseguita su campioni provenienti da allevamenti abbattuti preventivamente, perché contigui ad allevamenti con evidenza clinica di malattia, dimostrò che solo il 30% di quei casi era positivo: una maggiore potenzialità diagnostica, raggiungibile attraverso l'esecuzione robotizzata della RT-PCR, avrebbe evitato l'abbattimento preventivo nel 70% dei casi.

Un potenziale limite della PCR per la diagnosi di Afta è rappresentato dal fatto che i protocolli validati e più sensibili riconoscono qualunque virus aftoso ma non permettono di identificarne il sierotipo. L'isolamento virale, soprattutto nei focolai primari e nei casi indicativi, resta quindi un test basilare come sorgente dell'agente eziologico da sottoporre a caratterizzazione genomica e antigenica. La sequenziazione di frammenti genomici e l'analisi del profilo antigenico con l'ausilio di anticorpi monoclonali forniscono elementi chiave per tracciare l'origine dei focolai e l'evoluzione virale, oltre ad indirizzare la scelta di un idoneo vaccino. Tali test, strategici per analisi epidemiologiche e per il controllo delle

malattie, hanno permesso, ad esempio, di fronteggiare e chiarire la complessa situazione epidemiologica verificatasi in Italia nel 2003, con la circolazione contemporanea di un virus aftoso di tipo O e di due varianti antigeniche di enterovirus della MVS.

Basati sugli stessi principi dei test di laboratorio sono anche i prototipi di *penside test*, la cui efficacia e strategia di impiego per l'Afta sono in corso di studio.

In particolare, è in via di sviluppo la produzione di *dipsticks* per l'identificazione rapida di antigeni aftosi basati sull'impiego di particelle di latex colorate, coniugate con anticorpi monoclonali; le caratteristiche reattive dell'anticorpo tracciante conferiscono al test i requisiti desiderati, ad esempio la tipo-specificità o la cross-reattività tra sierotipi diversi.

Nonostante la sensibilità debba essere migliorata, questi *penside test*, facili nell'impiego, robusti e stabili, potrebbero essere un valido ausilio in aggiunta all'esame clinico e alle indagini epidemiologiche, soprattutto in Paesi dove l'Afta è endemica e le infrastrutture per il trasporto dei campioni e laboratoristiche sono inadeguate. In paesi esenti da Afta Epizootica i *penside test* potrebbero trovare applicazione nella conferma di focolai secondari e per avvalorare l'opportunità di abbattimento in allevamenti contigui ad un focolaio. Inoltre la disponibilità di *penside test* per la dimostrazione di anticorpi potrebbe velocizzare la conferma di casi secondari clinicamente dubbi, ad esempio negli ovini infetti. La tecnologia dei *penside test* si è estesa anche al test PCR, grazie allo sviluppo di strumentazione semplificata e mobile: benché con tali mezzi la sensibilità potrebbe raggiungere i livelli dei test di laboratorio, in una estesa epizootia un limite applicativo potrebbe essere l'insufficiente disponibilità di apparecchiature mobili nei punti strategici.

In ogni caso, devono essere sviluppate linee guida relative al processo di validazione, e alle indicazioni sull'uso, sul personale autorizzato e sulle azioni da intraprendere a seconda del risultato fornito attraverso i *penside test*.

L'efficacia dei piani di sorveglianza per le malattie vescicolari dipende largamente, oltre che dalla diagnosi virologica, dalle performance diagnostiche e dalle varie tipologie dei test sierologici.

Ad esempio, per la MVS l'utilizzo combinato di tre test sierologici con diversa funzione (ELISA competitiva come test di *screening*, Sieroneutralizzazione come test di conferma e determinazione dell'isotipo per definire la cronologia dell'infezione) permette di mantenere sotto controllo l'accreditamento delle regioni indenni e di individuare l'estensione della circolazione virale nelle regioni non accreditate.

Nel campo dell'Afta Epizootica, l'innovazione più significativa è rappresentata dai nuovi test immunoenzimatici per la differenziazione tra animali infetti e vaccinati, basati sull'identificazione di anticorpi verso le proteine non strutturali del virus come marker di infezione (FMD NSP-ELISA). Attraverso studi estensivi eseguiti su campioni sperimentali e svariate situazioni di campo, sono state definite le performance diagnostiche, in termini di specificità e sensibilità di questi test, nelle diverse possibili condizioni immunologiche. Tali informazioni sono essenziali e rappresentano la base per la stesura di linee guida volte ad indirizzare l'uso dei test FMD NSP-ELISA, il disegno e l'interpretazione dei programmi di sierosorveglianza tesi ad identificare o escludere la persistenza di infezione aftosa dopo un focolaio. Tali test saranno strategici anche nel caso di incursione di virus aftosi in Europa, dal momento che la direttiva europea in vigore autorizza la scelta della vaccinazione d'emergenza in regime di *vaccinate-to-live* come strategia per il controllo dell'Afta.

ORF VIRUS: NON SOLO ECTIMA

Alessandra Scagliarini

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Alma Mater Studiorum, Bologna

Il virus ORF è il prototipo virale del genere *Parapoxvirus* ed è l'agente eziologico dell'ectima contagioso una malattia diffusa a livello mondiale negli allevamenti ovi-caprini. La malattia provoca gravi perdite economiche negli allevamenti e rappresenta una zoonosi professionale la cui diffusione è strettamente connessa alla presenza e all'entità del patrimonio ovi-caprino. L'interesse di immunologi e virologi nei confronti del virus ORF è mirato a chiarire come questo sia in grado di infettare ripetutamente gli animali nonostante la vigorosa risposta immunitaria e infiammatoria sviluppata in seguito ad infezione naturale o a vaccinazione. Come dimostrato per altri *Poxvirus* l'agente eziologico dell'ectima contagioso ha infatti sviluppato meccanismi in grado di interferire e sovvertire la risposta immunitaria dell'ospite grazie a fattori immunomodulatori codificati da alcuni geni localizzati nelle regioni terminali del genoma. L'organizzazione genomica presenta analogie con quella di altri *Poxvirus* ed è caratterizzata dalla presenza di una regione centrale molto conservata che contiene i geni essenziali per la replicazione del DNA e la sintesi delle strutture virali e due regioni terminali ipervariabili sede dei geni responsabili della virulenza, della patogenicità e dell'*host range*. La malattia può colpire animali di tutte le età anche se nei giovani si osservano, in genere, le forme cliniche più gravi. Lesioni proliferative e ricorrenti con aspetto simil-tumorale vengono segnalate negli animali e nell'uomo specie in soggetti immunocompromessi. Ad oggi non esistono vaccini in grado di proteggere efficacemente dalla malattia e non esiste una terapia specifica. Il virus ORF viene utilizzato come prototipo per studi sull'attività antivirale di nucleosidi aciclici fosfonati (ANPs) che possono fornire importanti dati su possibili presidi terapeutici utilizzabili in caso di attacco bioterroristico con *smallpoxvirus* e *monkeypoxvirus*. L'attività di (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]cytosine (HPMPC, cidofovir, CDV, Vistide®) e di analoghi nucleosidici è stata dimostrata *in vitro* ed *ex vivo* con l'ausilio di colture organotipiche differenziate in grado di riprodurre la fisiologia della cute ovina. Recentemente è stata inoltre dimostrata l'efficacia del trattamento topico con cidofovir che può quindi essere considerato come possibile candidato per la terapia di persone e animali infetti.

VIRUS WEST NILE: APPROCCI DIAGNOSTICI IN RELAZIONE ALL'EPIDEMIOLOGIA DELL'INFEZIONE

Gianluca Autorino

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lazio e della Toscana, Roma

Anche se negli ultimi anni sono stati raggiunti notevoli progressi rispetto alla conoscenza dei meccanismi di trasmissione, all'epidemiologia e alla diagnosi della *West Nile Disease*, rimangono da chiarire ancora molti aspetti. I sistemi di sorveglianza tengono conto del ciclo epidemiologico dell'infezione e di conseguenza per la diagnosi di laboratorio diversi sono i metodi impiegati. Assieme alla definizione di caso, vengono illustrati e discussi vantaggi e problemi connessi all'impiego dei diversi metodi disponibili in relazione a sensibilità, specificità, tempi di esecuzione e infine sicurezza in laboratorio. È di fondamentale importanza disporre di metodi da impiegare per la diagnosi differenziale nei confronti di altre infezioni sostenute da virus appartenenti alla stessa o ad altre famiglie, responsabili di sindromi neurologiche nelle diverse specie animali oggetto di sorveglianza, ai fini delle azioni di allerta e della gestione dell'emergenza. Vengono forniti elementi relativi ai recenti indirizzi della ricerca e i risultati degli studi di epidemiologia molecolare che hanno caratterizzato i diversi stipti isolati nelle aree interessate dalle epidemie degli ultimi anni.

INFLUENZA AVIARE E SUE IMPLICAZIONI DI SALUTE PUBBLICA

Ilaria Capua

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

Le infezioni naturali con virus influenzali di tipo A sono state riportate in una varietà di specie comprendenti l'uomo, suini, mammiferi marini, mustelidi e gli uccelli. Mentre negli animali, e in particolare nei volatili, le infezioni con virus influenzali si verificano frequentemente, nell'uomo l'introduzione di nuovi sottotipi responsabili di infezioni pandemiche si verifica in media ogni 25-40 anni. L'importanza del *reservoir* animale nella genesi delle infezioni influenzali umane, è anche legato all'ecologia di questi virus. È noto che i mammiferi si infettano con ceppi virali appartenenti ad un numero limitato di sottotipi di emoagglutinina e neuroaminidasi, negli uccelli sono state isolate la maggior parte delle combinazioni date da tutti i 16 tipi di emoagglutinina e i 9 tipi di neuroaminidasi, a testimonianza del fatto che il pool genico di questa virosi si trova nei volatili.

Nel ventesimo secolo l'improvvisa emergenza di ceppi antigenicamente diversi trasmissibili all'uomo, detto *shift* antigenico, ha provocato 4 infezioni con carattere pandemico: nel 1918 (H1N1), nel 1957 (H2N2), nel 1968 (H3N2), e nel 1977 (H1N1). L'analisi genetica dei virus isolati nel corso di queste pandemie ha dimostrato che i "nuovi" ceppi sono emersi, quasi sicuramente, dopo il riassortimento di geni di virus di origine aviaria e umana in ospiti permissivi. Il riassortimento genico è un meccanismo biologico noto per i virus influenzali, e permette a virus di diversa origine, tramite la coinfezione della medesima cellula di dare origine ad una progenie virale che contenga dei virus "ibridi" ovvero con parte del genoma ereditato da tutti e due i virus parentali. La teoria più accreditata è che il suino rappresenti l'anello di congiunzione fra i virus dei volatili e quelli dei mammiferi, essendo ospite permissivo ad entrambe le popolazioni virali. Si riteneva infatti che il virus aviario dovessero inevitabilmente passare per il suino e acquisire geni eterologhi prima di essere in grado di infettare l'uomo. Dati recenti, raccolti dal 1996 in poi hanno evidenziato, in sette diversi episodi, la possibilità di infezione diretta dell'uomo con virus influenzali aviari. A seconda del sottotipo e della virulenza dei virus si sono verificate forme cliniche di diversa gravità, da episodi del tutto asintomatici a episodi caratterizzati da insufficienza respiratoria e morte del soggetto. La situazione di endemia che si è creata in Asia con il ceppo H5N1 risulta allarmante per la massiccia circolazione virale in una zona nella quale, elevate densità di avicoli, suini ed esseri umani coabitano in assenza di norme igieniche di base. La coinfezione della medesima cellula da parte di un virus aviario e un virus altamente contagioso per l'uomo in un ospite permissivo (uomo o suino) potrebbe rappresentare l'origine di una nuova pandemia influenzale umana. Il fenomeno del riassortimento genico potrebbe avvenire dando origine ad un virus in grado di diffondere rapidamente nella popolazione umana con le caratteristiche di aggressività e di antigenicità e di un virus aviario verso il quale la popolazione umana è scoperta dal punto di vista immunitario. La generazione di un virus con queste caratteristiche e la sua rapida diffusione potrebbe avere delle conseguenze catastrofiche, paragonabili a quelle descritte durante l'epidemia "Spagnola" del 1918-1919, la quale a suo tempo provocò tra i 20 e i 40 milioni di decessi.

ECOLOGIA DEI VIRUS INFLUENZALI DI TIPO A NEGLI ANIMALI SELVATICI NEL BACINO DEL MEDITERRANEO

Mauro Delogu

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

Il primo isolamento di un virus influenzale da specie aviarie selvatiche a vita libera è stato effettuato in Sud Africa nel 1961 a carico di sterne comuni (*Sterna hirundo*): nell'ambito di un episodio di mortalità che ha coinvolto circa 1300 volatili appartenenti a questa specie è stato isolato un virus appartenente al sottotipo H5N3 (A/tern/South Africa/61), caratterizzato da un'elevata patogenicità. Successivamente, durante un'epidemia di malattia di *Newcastle* verificatosi in California nel pollame domestico, numerosi virus influenzali di tipo A sono stati isolati da anatidi selvatici. Questo reperto ha dato inizio, a partire dalla metà degli anni '70, ad indagini sistematiche volte a determinare la presenza e diffusione dell'influenza aviaria in natura. Le ricerche finora condotte hanno evidenziato il ruolo centrale degli uccelli acquatici nell'ecologia dell'influenza. In particolare gli anatidi selvatici assumono fondamentale importanza in quanto in grado di fornire, attraverso vari meccanismi, il pool genetico origine di tutti i virus influenzali di tipo A sia nella popolazione umana sia in quelle animali.

Le ricerche da noi svolte negli ultimi 13 anni evidenziano come anche nell'area mediterranea gli uccelli acquatici, e soprattutto gli Anseriformi, rivestano il ruolo centrale nell'ecologia dell'influenza aviaria. Di seguito saranno sintetizzati i principali risultati ottenuti da tali indagini:

- le basse prevalenze di isolamento virale riscontrate durante il periodo invernale sono attribuibili alla frequentazione del Mediterraneo da parte delle specie serbatoio nel periodo successivo al picco epidemico;
- è stato evidenziato il possibile ruolo dell'intervento umano sulla dinamica dell'infezione;
- è stata ipotizzata l'esistenza di cicli epidemiologici distinti in specie simpatriche.

Sono stati raccolti dati relativi alla circolazione dei sottotipi H5 e H7, potenzialmente patogeni per il pollame domestico. La presenza continua di virus appartenenti al sottotipo H5 è stata dimostrata sia dall'isolamento virale sia dai risultati della sierologia. Per quanto riguarda il sottotipo H7 è interessante notare la mancata evidenza, sierologica e virologica, della sua circolazione nelle specie oggetto di studio per 6 periodi invernali consecutivi. Tale dato include campioni raccolti alla fine del 1999, quando il virus H7N1, era già comparso negli allevamenti intensivi.

Sono stati evidenziati i meccanismi di eliminazione virale a bassa prevalenza nella circolazione invernale del virus.

È stato isolato in specie selvatiche il sottotipo H7N3 LPAI, precursore dell'H7N3 LPAI che, ad un anno di distanza, ha causato danni ingenti nell'allevamento intensivo dimostrando ulteriormente di poter indurre sieroconversioni nell'uomo.

CORONAVIRUS FELINI E PERITONITE INFETTIVA

Nicola Decaro

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

I coronavirus felini (FCoV) comprendono due distinti sierotipi, FCoV tipo I e tipo II, differenziabili su base antigenica e genetica. Il sierotipo I riconosce una maggiore diffusione nella popolazione felina, ma, al contrario di FCoV tipo II, è difficilmente adattabile alla crescita *in vitro*. FCoV tipo II deriva da processi di ricombinazione genetica con il coronavirus del cane (CCoV), poichè possiede la estremità 5' della ORF1b (gene della replicasi virale) e l'intera ORF2 (gene S che codifica per la proteina degli *spikes*) di CCoV, mentre la restante parte del genoma è di origine felina. Entrambi i sierotipi comprendono due biotipi: un biotipo enterico, scarsamente patogeno, responsabile di lievi forme di enterite, e un biotipo altamente virulento, associato ad una grave forma morbosa, definita peritonite infettiva felina (FIP).

Il biotipo enterico è in grado di determinare infezioni persistenti a livello intestinale, con scarse conseguenze su base clinica. In una bassa percentuale di gatti persistentemente infetti (circa il 5-10% degli animali sieropositivi) il biotipo enterico subisce una variazione del tropismo, acquisendo la capacità di infettare i monociti/macrofagi. La variazione del tropismo è stata messa in relazione a mutazioni genetiche, che comprendono inserzioni a livello dei geni gruppo-specifici 3c e 7b e mutazioni puntiformi a livello di gene S. L'infezione dei monociti/macrofagi rappresenta la chiave di volta del meccanismo patogenetico della FIP, poichè esita in un coinvolgimento del sistema immunitario, con deplezione linfocitaria e ipergammaglobulinemia.

La disregolazione della risposta immunitaria comporta l'insorgenza di una grave patologia immunomediata, che può determinare due distinte forme cliniche: una forma effusiva o umida, caratterizzata prevalentemente da essudazione fibrinosa nelle cavità pleurica e addominale, e una forma non effusiva o secca, caratterizzata prevalentemente da lesioni piogranulomatose in vari organi.

Solo una risposta cellulare ottimale e precoce è in grado di prevenire l'insorgenza della FIP. La risposta anticorpale nei confronti di FCoV non protegge dalla malattia, ma, al contrario, sembra esacerbarne il decorso clinico, determinando una forma fulminante (*early death syndrome*). Tale fenomeno, che prende il nome di esaltazione anticorpo-dipendente (*antibody-dependent enhancement*, ADE), è responsabile della attuale mancanza di presidi immunizzanti efficaci nei confronti della FIP. Infatti, la somministrazione di vaccini sperimentali, vivi attenuati, a subunità (allestiti con le proteine M e/o N), ricombinanti (esprimenti la proteina S), allestiti con mutanti termosensibili, si sono dimostrati scarsamente efficaci o, in alcuni casi, hanno determinato un decorso rapidamente letale della malattia. Tuttavia, recentemente, sono stati sperimentati con successo vaccini vivi modificati, i quali sono stati deleti dei geni gruppo-specifici (3abc o 7ab) mediante sistema di *reverse genetic*. Tuttavia, solo l'impiego su vasta scala consentirà di verificare se tali vaccini sono realmente efficaci per proteggere dalla FIP.

CALICIVIRUS ENTERICI: UNA ZONOSI EMERGENTE?

Franco Maria Ruggeri

Dipartimento di Sanità Alimentare e Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

I virus della famiglia *Caliciviridae* sono diffusi in tutto il mondo animale, e sono causa di infezione e patologie a carico di diversi apparati. Sul piano dell'evoluzione si presentano pertanto come una famiglia in grado di adattarsi a condizioni largamente eterogenee, anche se le specie attualmente riconosciute sembrano mostrare quella elevata specializzazione d'ospite che è tipica di gran parte dei virus. Dei quattro generi riconosciuti, i calicivirus enterici, già noti come *small round viruses* o SRV e *small round structured viruses* o SRSV, sono oggi inclusi nei generi *Norovirus* e *Sapovirus* e sono più tipicamente patogeni umani. I Norovirus sono riconosciuti come una causa di gastroenterite sia sporadica che epidemica di crescente importanza in tutto il mondo, essendo ritenuti il secondo agente causale di gastroenterite acuta infantile e responsabili sino ad oltre la metà degli episodi epidemici di vomito-diarrea per tutte le classi di età. Data l'impossibilità di isolare questi agenti in colture cellulari, la diagnosi viene effettuata principalmente mediante tecniche di biologia molecolare (RT/PCR, ibridazione, sequenziamento) o attraverso la ricerca di antigeni virali nelle feci con i pochi kit ELISA diagnostici di recente introduzione. Per la natura altamente variabile dei membri del genere *Norovirus*, gli attuali sistemi immunologici non sono tuttavia in grado di fornire dati utili ai fini di studiare le relazioni epidemiologiche tra diversi casi clinici o distinti focolai epidemici. Studi sulla variabilità e sulla evoluzione dei ceppi, e sui link epidemiologici sono invece resi possibili dalla definizione del genotipo e genogruppo virale di appartenenza mediante analisi di sequenza e confronto in database o attraverso l'impiego di tecniche sofisticate quali la *Reverse Line Blot Hybridization* (RLBH) con l'uso di molteplici sonde genotipo-specifiche. L'impiego di queste tecniche rende possibile lo studio evolutivo degli agenti virali e la loro diffusione a livello transnazionale, anche in correlazione con i flussi dei prodotti alimentari dalle zone di origine, attraverso sistemi di sorveglianza integrati a livello europeo. A tale fine è stato sviluppato un Consorzio Europeo (FBVE) che coinvolge 12 diversi paesi, attraverso Progetti di ricerca e sorveglianza nell'ambito del 6° Progetto Quadro, per la messa a punto di sistemi integrati medico-veterinari epidemiologici e virologici, e che opera attraverso database condivisi. In tale contesto, i risultati di un'esperienza pilota condotta in Italia negli ultimi anni mostrano la circolazione nel paese di popolazioni eterogenee di *Norovirus* e la loro somiglianza genetica con ceppi virali diffusi in altri paesi europei. In particolare, tra la fine del 2004 e l'inizio del 2005, è stata riscontrata in diversi focolai epidemici nel nord Italia la presenza di una variante del ceppo GGIL.4 Lordsdale, evolutasi nel settembre 2004 in Olanda da un ceppo predominante da anni in gran parte d'Europa. Queste osservazioni mostrano come anche l'Italia rientri nell'ambito della circolazione dei ceppi di *Norovirus* maggiormente attivi in ambito europeo, consistentemente sia con il mercato globale dei prodotti alimentari che con il crescente spostamento di persone in ambito comunitario. Ciò può in particolare essere desunto da alcuni episodi epidemici descritti negli ultimi anni. Recentemente, *Norovirus* sono stati riconosciuti quale causa di infezione intestinale nel bovino, e analisi di sequenza hanno mostrato analogie con i ceppi circolanti nell'uomo,

anche se gli isolati bovini sono ad oggi classificati all'interno di un genogruppo (III) specifico, distinto da quelli che includono i ceppi umani (I, II, IV). Analisi condotte su campioni di feci da bovini di allevamenti del nord Italia hanno ulteriormente confermato la complementarità di tratti di sequenza dei ceppi bovini con i *primer* impiegati comunemente per la diagnostica umana, nella regione target della RNA polimerasi (RdRp, ORF1). Tuttavia, le sequenze identificate sono risultate molto diverse da tutte le sequenze di Norovirus umani depositate nei database disponibili, incluso quello del Consorzio *Food Borne Virus in Europe* (FBVE), che annovera la maggiore collezione di sequenze recenti di Norovirus europei. Al contrario, le sequenze ottenute apparivano strettamente correlate con due diversi lineaggi evolutivi di Norovirus bovini, rispettivamente ceppi OHIO e *Newbury-agent 2*, descritti negli USA e in Gran Bretagna. A ulteriore conferma della tipicità dei ceppi di Norovirus bovino, l'analisi di alcune sequenze effettuate nella regione ORF2, codificante la proteina capsidica, ha mostrato per questi stessi ceppi virali differenze sostanziali con le sequenze nucleotidiche e aminoacidiche note per i ceppi umani. Se pure i dati attuali non appaiono a favore di una ipotesi di trasmissione zoonotica dei Norovirus, resta il fatto che questi agenti rientrano nella lista B di priorità nella Direttiva sulle zoonosi 2003/99/EC, essendo gli stessi certamente trasmessi anche attraverso il consumo di molluschi bivalvi. Inoltre, recenti acquisizioni mostrano l'elevata capacità di Norovirus sia umani che animali di ricombinare a livello della sequenza di giunzione tra ORF1 e ORF2, attraverso un meccanismo simile al *crossing-over*, con frequenze dell'ordine del 10%, nel corso di infezioni multiple con diversi ceppi virali. Questi *shift* genetici sono stati al momento descritti solo tra virus di una stessa specie, ma i dati restano ancora parziali. Conseguentemente, ne deriva la necessità di perfezionare gli studi sui ceppi di origine diversa estendendo l'analisi di sequenza anche all'ORF2, prima di escludere una trasmissione ed evoluzione zoonotica dei Norovirus. Il rischio di adattamento e salto di specie, soprattutto nel caso di virus ad RNA ad elevata diffusione e resistenza ambientale, deve essere considerato realistico anche alla luce di quanto riportato recentemente per altri sistemi virali, quali Coronavirus e Influenzavirus.

RECENTI ACQUISIZIONI SULLE CORRELAZIONI EVOLUTIVE TRA ROTAVIRUS ANIMALI e UMANI

Vito Martella, Canio Buonavoglia

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

I rotavirus di gruppo A (famiglia *Reoviridae*) sono importanti enteropatogeni umani e animali. I rotavirus possiedono un genoma ad RNA bicatenario, composto da 11 distinti segmenti, che codificano per 6 proteine strutturali e 6 proteine non strutturali. Le proteine del capsido esterno, VP4 e VP7, sono i principali antigeni neutralizzanti e definiscono 26 P (*protease sensitive*) and 15 G (*glycoprotein*) tipi. I G e P tipi sono distribuiti in modo peculiare nelle varie specie animali, suggerendo una restrizione di specie, sebbene siano stati identificati in diverse occasioni alcuni G e P tipi insoliti, poiché considerati caratteristici dei rotavirus animali.

Sebbene i rotavirus siano considerati specie-specifici, le infezioni eterologhe sono permesse sia in condizioni naturali che sperimentali. Studi su modelli animali (conigli e topini) hanno dimostrato che solo i virus omologhi possono replicare efficacemente e diffondere orizzontalmente. Sulla base dell'approccio jenneriano, stipiti animali, naturalmente attenuati per l'uomo, sono stati utilizzati per la costruzione di vaccini per la profilassi della rotaviosi nell'uomo. La sperimentazione in campo di tali vaccini ha dimostrato che il rotavirus di scimmia Rhesus (RRV), MMU18006, e i rotavirus bovini, NCDV, UK e WC3 replicano limitatamente nell'uomo, sebbene siano in grado di indurre risposta immunitaria. Tuttavia, diversi studi hanno anche dimostrato che in condizioni sperimentali i rotavirus possano infettare e indurre malattia in un modello animale eterologo. È stato visto, infatti, che stipiti umani (HRV) possono replicare e riprodurre la malattia in animali neonati. Nel modello suino, stipiti HRV virulenti possono indurre diarrea e viremia, mentre stipiti HRV attenuati non ne sono in grado. Nel modello coniglio, lo stipite di scimmia Rhesus RRV è risultato in grado di replicare efficacemente e di essere trasmesso orizzontalmente. Inoltre, uno stipite aviare, (PO-13) è risultato in grado di causare enterite nel modello topo.

Mediante analisi di riassortanti naturali o creati in laboratorio, diversi segmenti genomici (VP3, VP4, VP7, NSP1, NSP2 e NSP4) sono stati implicati nel fenomeno della restrizione di specie e nel controllo della virulenza. Esperimenti basati sulla creazione di riassortanti e prove di infezione in modelli animali non hanno dato risposte conclusive ma hanno dimostrato che il controllo della virulenza e della restrizione di specie risiede in complesse interazioni di più geni, sotto l'influenza del background genetico del virus. Tuttavia, la comprensione delle basi molecolari di tali meccanismi è ancora ostacolata dalla mancanza di un sistema genetico e dalla frammentarietà dei dati di sequenza.

Lo studio dei virus eterologhi e dei riassortanti inter-specie uomo/animali identificati in natura può aiutare a capire come i rotavirus attraversino le barriere di specie e può aiutare ad individuare i meccanismi molecolari che regolano tale fenomeno. Importanti informazioni per comprendere l'ecologia dei rotavirus sono state ottenute mediante prove di ibridazione RNA-RNA. I rotavirus di una singola specie animale costituiscono un distinto

genogruppo e condividono un elevato livello di omologia genetica. Almeno 3 distinti genogruppi sono stati tuttavia identificati nei rotavirus umani, AU-1, Wa e DS-1-like. Il riassortimento ha luogo molto frequentemente tra rotavirus dello stesso genogruppo, ma raramente tra virus di genogruppi differenti. Mentre i dati epidemiologici, hanno dimostrato diversi esempi di riassortanti inter-genogruppo, ci sono tuttavia pochi dati di trasmissione inter-specie di virus completamente eterologhi (in tutti i segmenti genomici) da una specie all'altra, sebbene la popolazione umana sia soggetta ad alti livelli di esposizione verso virus animali in molti contesti socio-economici e geografici. Prove crociate di ibridazione RNA-RNA, emoagglutinazione, e analisi di sequenza hanno suggerito la trasmissione inter-specie di stipiti rotavirus tra diverse specie, inclusi l'uomo, i bovini, i suini, i cani, i gatti, i cavalli, i conigli e gli uccelli.

Presumibilmente, quando i rotavirus infettano ospiti eterologhi, essi non sono in grado di diffondere in modo efficiente nella nuova specie ospite. All'opposto, i rotavirus eterologhi tenderebbero a riassortire con rotavirus della popolazione ospite, creando nuovi virus che possono avere più *chance* di infettare e diffondere nella nuova specie. Alcuni segmenti genomici sono più probabilmente coinvolti nei meccanismi di adattamento in condizioni naturali. Per esempio, i virus umani G6P[9], che sono identificati frequentemente in Ungheria, possono essersi originati da virus analoghi al virus umano G6P[9] PA151, isolato agli inizi degli anni 80 in Italia. Il virus PA151 mediante prove di cross-ibridazione, ha dimostrato possedere almeno 3 segmenti genomici, codificanti per le proteine VP4 (4°), NSP1 (5°) e NSP4 (10°), derivati da virus umani di genogruppo AU-1 e almeno 6 dei segmenti rimanenti, incluso il gene VP7, derivati da un virus bovino. Allo stesso modo, gli stipiti HRV G10P[11], che sono molto comuni nella popolazione umana in India, possono avere originato mediante riassortimento tra virus bovini e virus umani. La completa caratterizzazione del genoma dello stipite HRV indiano I321, G10P[11], mediante ibridazione e analisi di sequenza, ha evidenziato che 9 segmenti genomici sono di origine bovina, mentre i geni NSP1 e NSP3 sono derivati da virus umani. Inoltre, i geni VP7, NSP1, NSP4 e VP6 dello stipite umano I16E, G9P[11], isolato in India, sono derivati da virus umani mentre il gene VP4 è di origine bovina. Altri stipiti HRV inusuali, di sierotipo G5, sono stati descritti in Brasile, Argentina e Paraguay, a partire dagli inizi degli anni 80. Mediante ibridazione RNA-RNA e analisi di sequenza, questi virus sono risultati essere dei riassortanti naturali interspecie tra virus umani di genogruppo Wa e virus di suini. Infine, l'analisi di sequenza del genoma degli stipiti HRV G9P[19], di cui è prototipo il virus RMC321, identificati in una epidemia di gastroenterite infantile in Manipur, India, nel 1987-1998, ha evidenziato che almeno 7 segmenti genomici sono chiaramente di derivazione suina. Studi filogenetici su virus animali e umani sembrano suggerire ripetute introduzioni di rotavirus animali nella popolazione umana e alcuni alleli derivati da rotavirus animali sembrano essere stabilmente entrati nel pool allelico dei HRV.

Nell'insieme, i dati suggeriscono uno scenario analogo a quello evidenziato per i virus influenzali, che possono indurre infezioni asintomatiche, o anche gravi e letali, in una specie eterologa, ma che difficilmente riescono a propagarsi efficacemente nel nuovo ospite, a meno che non si adattino mediante acquisizione di segmenti genomici tramite riassortimento, o, eventualmente, mediante selezione positiva di mutazioni puntiformi in alcuni geni chiave.

QUALI E QUANTI SONO I CALICIVIRUS DEI LAGOMORFI? UNA RASSEGNA DEI RECENTI DATI SU RHDV, EBHSV E VIRUS CORRELATI

Lorenzo Capucci, Antonio Lavazza

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

La Malattia Emorragica Virale del coniglio (MEV) anche conosciuta come RHD, dall'inglese *Rabbit Haemorrhagic Disease*, è una malattia altamente contagiosa e fatale del coniglio domestico e selvatico (*Oryctolagus cuniculus*), il cui agente eziologico è un calicivirus (RHDV). Una malattia simile, denominata *European Brown Hare Syndrome* (EBHS) è stata descritta nella lepre bruna (*Lepus europaeus*) e l'agente eziologico, anch'esso un calicivirus, è antigenicamente correlato ma distinto da RHDV. RHD è stata segnalata per la prima volta in Cina nel 1984, mentre è stata identificata due anni dopo in Europa, dove ha causato una serie di epidemie sia nei conigli industriali che nelle popolazioni di selvatici. Attualmente RHD è endemica in Asia, Europa, Australia e Nuova Zelanda. Focolai di malattia sono stati segnalati in America centrale (Messico e Cuba), Arabia Saudita, Africa. Nel 2000, 2001 e 2005, 4 distinti focolai sono stati identificati negli USA. Recentemente è stata segnalata anche nell'America del sud (Uruguay). Come la maggior parte dei virus a RNA, anche RHDV è provvisto di una consistente variabilità genetica che implica e favorisce una notevole variabilità antigenica, peraltro favorita dall'ampia e rapida diffusione dell'infezione virale a livello mondiale. Nonostante questo dal 1984, anno della prima identificazione, fino al 1996 tutti i ceppi virali isolati sono risultati appartenere ad un unico sierotipo e tutte le indagini di epidemiologia molecolare, eseguite mediante sequenziazione del gene che codifica la proteina strutturale VP60 dei diversi isolati, non hanno permesso di evidenziare l'esistenza di differenze significative nella composizione aminoacidica (differenze tra il 2 e il 5%) fino alla fine del 1996. In realtà oltre al ceppo "classico", di cui il nostro prototipo è il ceppo BS89, è stata dapprima identificata una mutante HA-negativa, che presenta delle differenze nelle proprietà emoagglutinanti dipendenti dalla temperatura di incubazione, e in seguito è stata descritta, quasi contemporaneamente in Italia e Germania, una variante antigenica ad inalterato potere patogeno (RHDVa). L'RHDVa è considerata un sottotipo del ceppo originale e per la sua diagnosi differenziale è disponibile un test specifico basato sull'uso di anticorpi monoclonali (MAbs). Il pannello completo dei MAbs anti RHDV e anti RHDVa permette di monitorare l'eventuale esistenza di altre nuove varianti. RHDVa era già presente in alcune regioni d'Italia nel 1997 al momento della sua prima identificazione e negli anni successivi ha manifestato la tendenza a diffondersi con una certa velocità. In questi ultimi anni la tendenza di RHDVa a sostituire progressivamente il ceppo RHDV "classico" risulta ancora più evidente e appare più diffuso in quelle regioni del nord (Piemonte, Lombardia, Emilia Romagna) e del sud Italia (Campania) dove la conigliicoltura industriale è maggiormente sviluppata. Inoltre, dai nostri dati risulta presente in pressoché tutta Italia, ad eccezione della Sicilia. Uno dei motivi che possono favorire la comparsa di varianti antigeniche è proprio la pressione selettiva sul virus da parte di una popolazione vaccinata e

protetta. In sostanza la mutazione genomica e di conseguenza antigenica, che si è verificata sulla struttura di RHDV e che ha coinvolto il suo sito neutralizzante principale da cui è scaturita la nuova variante RHDVa, può essere considerata come il tentativo strategico del virus per sopravvivere. Da notare che nel corso di recenti prove di tipizzazione e caratterizzazione, in almeno due casi si sono rilevati ceppi RHDV con caratteristiche antigeniche peculiari. Questi stipti, provenienti da aree geografiche differenti e isolati in due periodi differenti dell'anno 2004, hanno mostrato una reattività con il pannello dei MAbs peculiare e differente non solo rispetto al ceppo classico e alla variante RHDVa ma anche fra essi stessi. In considerazione, quindi, delle consistenti differenze antigeniche tra RHDV e RHDVa e della elevata variabilità del calicivirus agente di RHD si ritiene opportuno e raccomandabile continuare a seguire l'evoluzione del virus in campo attraverso piani di monitoraggio epidemiologico, in particolare per quanto concerne la capacità dei vaccini "ceppo classico" in commercio di proteggere da infezioni con variante RHDVa, al fine di trovarsi preparati, nell'eventualità che vi fossero evidenti riduzioni nel livello di protezione ottenibili a fronte della comparsa di ulteriori nuove varianti o stipti, ad approntare nuovi presidi vaccinali più specifici e omologhi. Inoltre, sebbene la malattia emorragica del coniglio (RHD) sia stata segnalata in Italia nel 1986 la possibile esistenza di uno o più ceppi virali non patogeni correlati antigenicamente a RHDV è stata ipotizzata sulla base della evidenza di anticorpi naturali in Europa fin dal 1975, prima cioè della comparsa di RHD, e in allevamenti indenni e mai vaccinati. Tale ipotesi ha trovato conferma nella identificazione in conigli sani di un altro virus, correlato a RHDV, chiamato *Rabbit calicivirus* (RCV). RCV è diverso da RHDV in termini di patogenicità (è privo di potere patogeno), di titolo virale e tropismo (replica a basso titolo a livello intestinale) e per la sequenza primaria delle proteine strutturali (omologia del 92%). Dal momento che gli anticorpi verso RCV potrebbero conferire un livello di protezione variabile verso RHD, è stato suggerito il possibile ruolo di questi virus apatogeni RHDV-like nel ridurre l'impatto della malattia emorragica virale. Per controllare la diffusione di RCV negli allevamenti italiani, sono state condotte a più riprese indagini epidemiologiche in diverse regioni d'Italia, effettuando prelievi di sangue in conigli da carne al momento della macellazione, da cui è emerso che circa il 35% degli allevamenti controllati erano infetti da RCV. Infine, i dati sieroepidemiologici raccolti in diverse parti del mondo e in particolare quelli provenienti dal continente oceanico, suggeriscono l'esistenza di uno o più virus apatogeni correlati antigenicamente a RHDV. I risultati dell'indagine sierologica per RHD eseguita su sieri raccolti prima dell'introduzione di RHD in Australia e Nuova Zelanda mostrano chiaramente l'esistenza in alcune popolazioni di conigli selvatici di livelli sierici di anticorpi anti-RHDV. È tuttavia importante sottolineare che tali titoli anticorpali sono stati rilevati utilizzando dei metodi ELISA ad elevata sensibilità, basati sull'utilizzo di antigeni parzialmente denaturati, e come tali in grado di riconoscere un'ampia varietà di epitopi virali, mentre si sono ottenuti risultati pressoché totalmente negativi usando sistemi ELISA altamente specifici in grado di riconoscere anticorpi prodotti verso epitopi di superficie del solo RHDV. Nel complesso, quindi, i dati sieroepidemiologici e virologici fino ad oggi disponibili indicherebbero l'esistenza di almeno un altro calicivirus dei lagomorfi, correlato a RHDV ma in parte differente per caratteristiche antigeniche e genomiche.

VIRUS DELLA RABBIA E RABBIA-CORRELATI: SITUAZIONE E PROSPETTIVE PER UNA MALATTIA ANTICA

Franco Mutinelli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

La rabbia è una zoonosi virale responsabile di encefalomyelite, causata da virus della famiglia *Rhabdoviridae* del genere *lyssavirus*, di cui si conoscono sette genotipi e che ha come *reservoir* i mammiferi, in particolare carnivori e pipistrelli. Il genotipo 1 raggruppa i ceppi del virus della rabbia classico che si trovano in quasi tutti gli stati del mondo. I genotipi da 2 a 7 comprendono i virus correlati al virus della rabbia, come di seguito elencati: *Lagos bat*, *Mokola*, *Duvenhage*, *European bat lyssavirus 1* (EBL-1), *European bat lyssavirus 2* (EBLV-2), *Australian bat lyssavirus* (ABLV).

I lyssavirus dei mammiferi terricoli (che non volano) appartengono al genotipo 1 e sono stati isolati in tutto il mondo. Solo alcuni stati sono indenni da rabbia dei mammiferi terricoli, quali Nuova Zelanda, Australia, Giappone, Regno Unito, Irlanda, Scandinavia e Islanda. Altri stati, fra i quali molti Stati europei, sono oggi indenni da rabbia terricola grazie alla realizzazione delle campagne di vaccinazione orale delle volpi. Nelle Americhe isolati virali appartenenti al genotipo 1 sono stati riscontrati in mammiferi volanti, quali pipistrelli ematofagi e insettivori.

L'epidemiologia della rabbia ha subito notevoli cambiamenti nel corso degli ultimi anni a seguito del suo controllo o eliminazione in numerose specie animali terricole in Europa e nell'America settentrionale. Contemporaneamente sono state caratterizzate numerose varianti di lyssavirus e sono state anche identificate la loro distribuzione e le specie animali ospiti. Tuttavia, nuovi lyssavirus sono stati isolati dai pipistrelli insettivori in Europa e frugivori in Australia, facendo emergere interrogativi sul significato epidemiologico di detti isolamenti, nonché sull'appropriatezza e efficacia delle misure di prevenzione esistenti per l'uomo e gli animali.

È quindi evidente come la rabbia sia una malattia in continua evoluzione in tutto il mondo. I notevoli passi avanti registrati nel campo dell'immunologia, vaccinologia, virologia molecolare ed epidemiologia a partire dagli anni '80 hanno consentito di migliorare le conoscenze relativamente alla circolazione del virus della rabbia.

Si sottolinea la necessità di costanti studi di epidemiologia molecolare e di sorveglianza per rilevare la eventuale trasmissione del virus da specie *reservoir* a specie non *reservoir* (animali e uomo), e per monitorare anche la comparsa di specifici ceppi di virus della rabbia in nuove specie animali e in nuove aree geografiche che, molto spesso, è legata alle attività dell'uomo (ad esempio, movimentazione dei selvatici e importazione di animali).

L'analisi filogenetica ha fornito un importante sostegno alla teoria secondo la quale l'evoluzione dei lyssavirus dei pipistrelli è avvenuta molto prima della comparsa della rabbia nei carnivori, che è stata probabilmente conseguenza di un normale cambio di ospite dal pipistrello al carnivoro. Questo cambio di ospite è stato osservato anche fra i selvatici.

Un esempio è la comparsa di una variante del ceppo di lyssavirus del pipistrello *Myotis* in Arizona nel 2002 che ha causato un'epidemia di rabbia nello *skunk*.

Emergono inoltre nuovi agenti responsabili della rabbia, come dimostra la segnalazione di nuovi quattro lyssavirus. Il virus del pipistrello del Caucaso occidentale è quello che maggiormente si allontana dai lyssavirus conosciuti e per il quale non risultano efficaci né la vaccinazione pre-esposizione né il trattamento post-esposizione attualmente disponibili.

L'epidemiologia della rabbia dei pipistrelli necessita di essere ulteriormente approfondita così da poter individuare i reali rischi per la salute dell'uomo e dei carnivori domestici e possano essere applicate efficaci misure di prevenzione alle persone che manipolano i pipistrelli. Queste attività di ricerca devono essere realizzate in stretta collaborazione fra esperti di chiroteri e ricercatori che si occupano di rabbia. In Europa, l'obiettivo per il futuro è l'eliminazione della rabbia degli animali terricoli. Questo comporta necessariamente il coordinamento degli interventi per mantenere la condizione di stato indenne da rabbia in quegli stati che attualmente lo sono; il fornire assistenza tecnica e raccomandazioni per gli Stati europei che non sono ancora coinvolti nei programmi di prevenzione, in particolare dell'Europa orientale (Ucraina e Russia Europea), dell'Europa settentrionale (Stati baltici) e dell'Europa meridionale (Romania, Bulgaria).

Va ricordato che la rabbia, pur non risultando fra le priorità dell'OMS, rappresenta ancora un importante problema di sanità pubblica, soprattutto nelle aree in cui la rabbia urbana è endemica, come Asia e Africa. Sono infatti oltre 40.000 i casi di rabbia segnalati nell'uomo ogni anno e questi decessi sono quasi sempre associati ad infezione causata dal genotipo 1 trasmesso dal cane. I bambini di età compresa fra cinque e quindici anni sono i più colpiti e circa 7,5 milioni sono le persone che ogni anno ricorrono al trattamento post-esposizione. Tuttavia, il numero di casi di rabbia nell'uomo e negli animali è ancora considerato sottostimato. Inoltre, dal momento che la sorveglianza epidemiologica in molti paesi in via di sviluppo dell'Asia e dell'Africa è assente, irregolare o insufficiente, risulta difficile stimare anche i livelli di mancata segnalazione. Di conseguenza, anche se come obiettivo è molto difficile e ambizioso, c'è la necessità di un coordinamento degli interventi nel settore per aumentare i programmi di sorveglianza della rabbia in Africa e Asia, con la finalità di ridurre l'incidenza della rabbia in questi continenti.

VACCINI VIRALI: QUADRO NORMATIVO E PROSPETTIVE IN AMBITO UE

Francesco Meliota
Fatro, SpA, Ozzano Emilia, Bologna

I vaccini virali per uso veterinario nell'Unione Europea sono regolati dalle norme generali relative al farmaco veterinario, dalle monografie di Farmacopea Europea (vaccini per uso veterinario e singole monografie relative ai singoli prodotti) e dalle linee guida specifiche per i farmaci ad attività immunologica.

Tale normativa dell'Unione per armonizzare i requisiti dei vaccini in tutti gli Stati Membri si è sviluppata e definita progressivamente negli anni, in particolare a seguito della Direttiva 92/18/CEE, fino a riguardare oggi quasi tutti gli aspetti relativi a qualità, innocuità ed efficacia, che costituiscono le caratteristiche fondamentali del farmaco per la legislazione europea.

Contemporaneamente però alla definizione delle norme suddette, il progresso delle biotecnologie ha offerto opportunità uniche per lo sviluppo e la produzione di vaccini per le malattie virali degli animali.

La risposta in termini di nuovi vaccini virali disponibili per l'uso sia in medicina umana che veterinaria non è stata finora proporzionale alle attese e alle previsioni, sia per difficoltà tecniche incontrate nello sviluppo di prodotti efficaci, sia per il sostanziale freno che le stringenti regole comunitarie hanno imposto alle biotecnologie anche in questo settore, rispetto a paesi extraeuropei.

Tuttavia proprio negli ultimi anni pare di assistere ad un'inversione di tendenza, anche grazie all'ulteriore sviluppo delle conoscenze e delle tecnologie applicabili.

Comunicazioni e Poster

P1 DETECTION OF HEPATITIS E VIRUS (HEV) IN PAIRED SAMPLES OF SERUM AND FAECES OF PIGS IN SPAIN

Salceda Fernández-Barredo (a), Carolina Galiana (a), Santiago Vega (a), Angel García (a),
Maria Teresa Gómez (a), Antonio Hernandis (b), Maria Teresa Pérez-Gracia (a)
(a) *Departamento de Atención Sanitaria, Salud Pública y Sanidad Animal, Facultad de
Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad Cardenal Herrera-CEU, Moncada,
Valencia;*
(b) *Centro de Investigación y Tecnología Animal del Instituto Valenciano de
Investigaciones Agrarias, Segorbe, Valencia. Conselleria de Agricultura, Pesca i
Alimentació de la Generalitat Valenciana*

Hepatitis E constitutes generally the main hepatitis non-A non B that is transmitted enterically in developing countries. The mortality associated with this infection is usually scarce, but it may increase by up to 25% in pregnant women. A surprisingly high prevalence of antibodies among the population in industrialised areas has been described that is not related to the few detected cases of hepatitis E in patients without a trip record to endemic areas. The swine livestock has been revealed in the last years as an important reservoir of the virus. Hence, the objective of this study is to determine the sanitary status of the swine farms in Spain, as well as the presence of VHE and the identification of those stages in which pigs are infectious to other animals and to humans.

Paired samples of serum and faeces were obtained from the same animal at the same moment, in a total of 131 pigs distributed in 24 swine farms in the Valencian Community. The samples of serum and faeces underwent an extraction of the RNA followed by retrotranscription and nested-PCR, that was later visualized in an agarose gel of 2%.

The presence of HEV-RNA was detected in serum and/or faeces of 30 animals (22.9%), although none of these demonstrated clinical signs. The highest rate (57.14%) was observed in pigs between 9 and 12 weeks of age. HEV was detected in both samples in 9 animals, mainly pigs between the 8 and the 12 weeks of age. This is the first study in Spain with a sample size so high and the first one that is carried out taking paired samples of serum and faeces of the same animal in a population infected naturally by HEV. As a result of this study the partial sequences of 6 porcine strains of faeces, manure ditch and serum have been obtained (Genbank DQ093564 until DQ093569). These sequences belong to the genotype 3, including the majority of porcine strains and those from humans where no trip history to endemic areas has been reported. The study allowed us to detect in which of the productive phases pigs are shedding the virus and indicate that the use of manure as fertilizers could contaminate surface and drinking waters.

This Project was financed by grants from Cardenal Herrera-CEU University (PRUCH 04/8), Escuela Valenciana de Estudios de Salud (053/2005) and Conselleria de Empresa, Universidad y Ciencia de la Generalitat Valenciana (GV05/132).

P2 VARIAZIONI DELLA PREVALENZA DEL G- E P- TIPO DI ROTAVIRUS ISOLATI DA BOVINI DELL'ITALIA SETTENTRIONALE

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

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

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

Nel decennio 1994-2004 è stata condotta la caratterizzazione molecolare mediante *nested-reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR) di 260 campioni fecali provenienti da allevamenti bovini situati in alcune province dell'Emilia Romagna e Lombardia. Il campionamento è stato condotto a partire da vitelli affetti da grave sintomatologia enterica o deceduti in seguito a diarrea acuta.

Tutti i campioni fecali testati risultavano positivi per rotavirus in saggio ELISA diagnostico.

In differenti periodi di studio, il sierotipo G[6] risultava prevalente nella popolazione bovina, seguito dal sierotipo G[10], mentre il tipo G[8] circolava a basse frequenze.

P[11] e P[5] rappresentavano i sierotipi più comuni presenti negli animali, mentre il sierotipo P[1] si riscontrava raramente.

I genotipi più comuni si identificavano quindi nelle combinazioni G6,[P11], G10,[P11], e G6,[P5]. Dai risultati ottenuti inoltre, si riscontrava la presenza di infezioni miste e di ceppi non tipizzabili.

I dati ottenuti nella seguente indagine suggeriscono come la distribuzione sul territorio dei genotipi prevalenti sia suscettibile di variazioni temporali. Il genotipo G6,[P5] è stato predominante per oltre 4 anni (1994-1998) sul territorio, ha subito un marcato decremento nel secondo periodo di studio (2002-2003) ed è riemerso nella stagione 2003-2004.

G8,[P11] è stato osservato nella stagione 1994-1998 e 2003-2004 ma non nell'interposto biennio 2002-03.

Nel 1994-98, il 44% dei ceppi G[6] identificati appartenevano al genotipo G6,[P11]. Nella stagione di studio successiva la percentuale di positività agli stessi è salita a valori pari al 60%. In seguito, sono state condotte ulteriori indagini mediante sequenziamento nucleotidico su ceppi non tipizzabili mediante PCR al fine di individuare variabilità genotipica o la presenza di riassortanti di ceppi presenti sul territorio oggetto di studio.

Variabilità periodiche delle combinazioni circolanti nella popolazione, così come la dominanza di determinati G e P tipi potrebbero favorire l'insorgenza di nuovi stipiti virulenti nonché lo sviluppo di un'immunità tale da impedire rivirulentazioni di stipiti esistenti. Recenti acquisizioni relative ai sierotipi G[6] e G[10] isolati da pazienti pediatrici sintomatici e non confermano la reale possibilità in natura di trasmissione inter-specie bovino-uomo. Inoltre, è ben documentata e fondamentale alla comprensione dell'epidemiologia virale l'ipotesi della possibile insorgenza di virus atipici originanti da reiterati salti di specie.

GENERAZIONE DI VIRUS RIASSORTANTI INFLUENZALI AVIARI H7N5 DA UTILIZZARE NELL'AMBITO DI UNA STRATEGIA DI VACCINAZIONE "DIVA"

Maria Serena Beato, Michela Rigoni, Adelaide Milani, Valeria Brasola, Ilaria Capua
*Centro di Referenza Nazionale e OIE/FAO per la Malattia di Newcastle e l'Influenza
Aviare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

Gli allevamenti avicoli italiani sono stati interessati, dal 1999 ad oggi, da sei diverse introduzioni di virus influenzali aviari appartenenti ai sottotipi H5 e H7. Al fine di limitare gli abbattimenti, l'Italia ha sviluppato un sistema di vaccinazione alternativa, che permette l'identificazione degli animali infetti nell'ambito di una popolazione vaccinata noto come sistema "DIVA" (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*). A seguito dell'attuale situazione internazionale si è ritenuto opportuno sviluppare ulteriormente la strategia "DIVA", generando dei virus riassortanti con caratteristiche più idonee alla differenziazione degli animali infetti dai vaccinati.

Sono stati individuati come virus "progenitori" il virus H7N3 (A/ck/It/9289/02), donatore dell'emoagglutinina (HA), e il virus H12N5 (A/duck/Alberta/76) donatore della neuroamminidasi, con l'obiettivo di generare un virus H7N5. Il virus riassortante H7N5 è stato ottenuto in uova embrionate di pollo SPF mediante coinfezione dei due virus progenitori. I cloni virali di sottotipo H7N5 sono stati selezionati con il metodo delle placche su MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*). La tipizzazione virale è stata eseguita mediante metodiche di inibizione dell'emoagglutinazione e della neuramminidasi. La caratterizzazione completa dei virus riassortanti è stata ottenuta mediante sequenziamento degli 8 geni e comparazione delle sequenze con quelle dei virus progenitori.

Sono stati generati due virus influenzali aviari sottotipo H7N5. Il virus riassortante A/Av-R1/Italy/05 ha ereditato dal virus sottotipo H7N3 il gene codificante per l'emoagglutinina e il gene interno codificante per la nucleoproteina (NP) e dall'H12N5 il gene per le proteine NS, PB1, PB2, M e PA. Il virus riassortante A/Av-R2/Italy/05 ha ereditato dal progenitore H7N3 il gene H, NP e PB2 e i rimanenti dal virus H12N5.

Un virus di sottotipo H7N5 presenta i requisiti di base per essere un candidato come stipite virale da utilizzare per la produzione di vaccini nell'ambito della strategia "DIVA". I virus riassortanti, generati nell'ambito della presente ricerca, possedendo una neuroamminidasi che è stata riscontrata molto raramente in natura, riducono significativamente le probabilità che si verifichi una introduzione di virus influenzale del medesimo sottotipo.

I fondi relativi alla ricerca in oggetto sono stati ottenuti attraverso il progetto di ricerca finalizzata 2003 (RF IZSVE 2003) e attraverso il finanziamento del Ministero della Salute "Emergenza influenza Aviare"

ATTIVITÀ DI SORVEGLIANZA 2006 PER LA MALATTIA VESCICOLARE DEL SUINO IN ACCORDO CON LINEE GUIDA COMUNITARIE E OIE

Silvia Bellini (a), Massimo Boldini (a), Ugo Santucci (b), Emiliana Brocchi (a)
(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Brescia;
(b) Dipartimento della Prevenzione e della Comunicazione, Direzione Generale della Sanità Veterinaria e degli Alimenti, Ministero della Salute, Roma

La malattia vescicolare del suino (MVS) è stata segnalata per la prima volta in Italia nel 1966. Al tempo la malattia nel suino era clinicamente indistinguibile dall'afta epizootica e questo è il motivo principale per cui questa malattia a decorso benigno era stata collocata nella lista A dell'OIE.

A partire dal 1995 in Italia sono iniziate le attività di sorveglianza nei confronti della MVS, i piani predisposti avevano come obiettivo finale l'eradicazione della malattia, da raggiungersi mediante l'accreditamento sanitario delle aziende e delle regioni. I piani di sorveglianza nel tempo sono stati aggiornati, modificando anche le azioni da intraprendere per raggiungere l'obiettivo previsto, questo si è reso necessario per adeguarsi alla mutata situazione epidemiologica e ai cambiamenti osservati nel quadro clinico della malattia.

Nel corso degli anni la MVS è stata persistentemente segnalata in alcune regioni dell'Italia meridionale che non hanno mai raggiunto l'accreditamento, occasionalmente però la malattia ha fatto la sua comparsa anche in regioni dell'Italia centro settentrionale, dove è stata rapidamente controllata ed estinta (1998-1999, 2002, 2004). In tali circostanze, la presenza della MVS in aree ad elevata densità suinicola, ha destando notevole preoccupazione sia a livello nazionale che comunitario.

Il piano predisposto per il 2006 ha come obiettivo il mantenimento dell'accreditamento nelle regioni accreditate e il raggiungimento di tale obiettivo per quelle che non lo hanno mai raggiunto, prevede modalità di sorveglianza differenziate a seconda dello stato sanitario delle regioni e tiene conto della diversa realtà zootecnica e commerciale esistente sul territorio nazionale. Infatti, nelle regioni del nord e di parte del centro prevalgono allevamenti di tipo intensivo ed esistono forti motivazioni che spingono allevatori e produttori a mantenere uno status di indennità nei confronti della malattia al fine di non subire limitazioni commerciali di animali vivi e di prodotti derivati verso gli altri Stati Membri e Paesi Terzi.

Il piano si basa su principi di regionalizzazione e di compartimentalizzazione, così come previsto dal Codice Zoosanitario dell'OIE e tiene conto delle norme impartite con la recente decisione comunitaria per la MVS (SANCO 10238/2005).

RICERCA MEDIANTE NESTED-RT-PCR DEL VIRUS DELL'EPATITE E IN ALLEVAMENTI SUINI ITALIANI

Andrea Caprioli (a), Francesca Martelli (a), Fabio Ostanello (a), Ilaria Di Bartolo (b), Franco Maria Ruggeri (b), Livio Del Chiaro (c), Francesco Tolari (c)

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

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

(c) *Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti, Università degli Studi di Pisa*

L'epatite E costituisce un grave problema di sanità pubblica in molti paesi in via di sviluppo. L'agente eziologico è un RNA virus attualmente classificato nel genere *Herpevirus*. La malattia si trasmette principalmente per via oro-fecale. Nei paesi industrializzati, i casi clinici di epatite E sono sporadici, tuttavia HEV è considerato un agente di zoonosi emergente e il suino è ritenuto un serbatoio del virus. Infezioni sperimentali hanno dimostrato la possibilità di trasmissione interspecifica e alcuni studi hanno rilevato un'elevata prevalenza anticorpale anti-HEV in soggetti professionalmente esposti ai suini. In Giappone, alcuni casi sono stati associati all'ingestione di carne cruda di suino e di cinghiale. Il presente lavoro ha come obiettivo la valutazione della presenza di HEV negli allevamenti suini italiani.

34 pool di feci e 22 campioni di siero sono stati raccolti da 5 allevamenti, da animali clinicamente sani di 2-5 mesi di età. La ricerca del genoma virale è stata effettuata mediante una nested-RT-PCR con *primers* degenerati per l'ORF2 di HEV. Gli amplificati (148bp) sono stati sequenziati.

Il genoma di HEV è stato evidenziato in 2 pool fecali provenienti da 2 aziende e prelevati da animali di 4,5 e 2,5 mesi. I campioni di siero sono risultati negativi. L'analisi filogenetica delle sequenze virali, denominate HEVBO/01 e HEVPI/01, ha dimostrato l'appartenenza di entrambi i ceppi al genotipo 3 di HEV, cui appartengono tutti i ceppi indigeni suini e umani identificati in Europa. I 2 ceppi, tuttavia, differivano sensibilmente l'uno dall'altro, mostrando una identità nucleotidica tra loro pari solo all'84%. Entrambi i ceppi possono essere raggruppati con ceppi evidenziati in altri paesi industrializzati, benché HEVBO/01 risulti sostanzialmente diverso da altri ceppi di HEV finora conosciuti. HEVPI/01 è risultato invece correlato (90% di identità nucleotidica) ad un ceppo umano (AY540113) evidenziato in un caso autoctono di epatite E in Spagna.

Questo lavoro rappresenta la prima segnalazione della presenza di HEV negli allevamenti suini italiani. Conferma inoltre che il virus può essere presente in suini clinicamente sani. Questo desta una certa preoccupazione per le possibili implicazioni di sanità pubblica legate ai potenziali rischi di infezione mediante contatto con suini infetti o ingestione di carne o organi contaminati. Al momento sono in corso ulteriori studi per valutare la prevalenza dell'infezione in suini provenienti da allevamenti di diversa tipologia e per caratterizzare i ceppi circolanti nel nostro paese.

P3 LA RICERCA MEDIANTE PCR DEL VIRUS DELL'EPATITE A PER IL MONITORAGGIO IGIENICO SANITARIO DEI MOLLUSCHI BIVALVI

Santo Caracappa, Fabrizio Vitale, Daniela Polizzi, Stefano Reale, Maria Vitale
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Palermo

Il virus A dell'epatite (HAV) è responsabile di epatite acuta sia nell'uomo sia in alcuni primati. Una delle maggiori emergenze sanitarie riguarda la trasmissione di agenti virali attraverso l'alimentazione e i problemi igienico-sanitari che ne derivano. In questo lavoro gli autori presentano un protocollo molecolare per la determinazione di sequenze specifiche del genoma del virus dell'epatite A (HAV). Studi *in vivo* e *in vitro* hanno evidenziato la presenza di un unico sierotipo antigenico del virus. Una struttura antigenica così conservata riflette una sequenza aminoacidica altrettanto conservata a livello delle proteine del *capside*. Questa limitata variabilità antigenica se da un lato ha precluso l'impiego dei metodi sierologici ai fini della corretta identificazione delle sorgenti di infezione, dall'altro consente di fare diagnosi attraverso l'evidenziazione di strutture comuni. In situazioni sia di epidemia che di epidemia della malattia, l'analisi di sequenze nucleotidiche di porzioni limitate del genoma di HAV rappresenta, un approccio alternativo per l'identificazione precoce di elementi infettanti. In particolare è stato ottimizzato un protocollo sperimentale che prevede la retroscrittura e la PCR *semi-nested* per l'individuazione dell'agente virale nei molluschi bivalvi (cozze, vongole). Il procedimento prevede una fase di omogeneizzazione del campione in esame, una fase di estrazione dell'RNA tramite l'utilizzo di un kit specifico, una fase di amplificazione dell'RNA virale e una fase di verifica tramite elettroforesi. Nel nostro studio abbiamo preventivamente analizzato 40 campioni di cozze e 20 di vongole allo scopo di ottimizzare il protocollo di indagine. L'HAV, pur essendo un virus a RNA a singolo filamento, mostra una notevole resistenza ambientale che ne favorisce la diffusione. La presenza di tale agente eziologico nelle acque dolci e marine, è uno dei più grossi problemi di sanità pubblica, dato che i molluschi bivalvi, nutrendosi attraverso la filtrazione di ingenti quantità di acqua, concentrano nell'epatopancreas virus, batteri e altri agenti infettivi. L'infezione è endemica in tutto il mondo, con manifestazioni epidemiche soprattutto dove le condizioni igieniche e sanitarie influenzano i punti critici lungo le filiere produttive.

P4 VIRUS ORF DA PECORE E CAPRE NELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA: STUDIO DEL GENE VEGF-E E COSTRUZIONE DI UN ALBERO FILOGENETICO

Giusy Cardeti, Armando Damiani, Lidia Ponticello, Marina Cittadini, Amadeo Demetrio
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma

Il virus ORF è un virus a DNA, appartenente al genere *Parapoxvirus*, famiglia *Poxviridae*. È responsabile nelle pecore e nelle capre dell'ectima contagioso, malattia spesso a carattere endemico caratterizzata da formazione di pustole e croste principalmente a livello dei capezzoli nelle madri e del muso negli agnelli. Tra i fattori di virulenza del virus ORF è stata individuata una glicoproteina omologa al fattore di crescita endoteliale VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) dei mammiferi, che come tutti i componenti di questa famiglia, è in grado di prevenire l'apoptosi e di indurre proliferazione vasale e vasodilatazione. In Nuova Zelanda sono stati isolati due ceppi (NZ 2 e NZ 7) che hanno dimostrato una significativa differenza nella sequenza aminoacidica del VEGF-E: altri ceppi di ORF potrebbero pertanto codificare per ulteriori varianti del fattore di virulenza. Al fine di investigare sulle variazioni di sequenza e sulla distribuzione del gene VEGF del virus ORF, sono stati esaminati campioni da pecore e capre allevate nel Lazio e in Toscana, costituiti da croste labiali e mammarie e da mucosa linguale, in cui erano state evidenziate al Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM) particelle virali riferibili a *Parapoxvirus*.

Durante il periodo 1998-2003 su un totale di 61 campioni, 46 sono risultati positivi per virus ORF. I campioni sono stati quindi sottoposti ad amplificazione del gene VEGF-E con una tecnica di PCR e quindi sequenziati. Tutti i ceppi evidenziati nelle pecore (n.13) sono stati riconosciuti come varianti NZ 2-like; nelle capre invece sono state identificate n.2 varianti NZ 7-like e n.1 variante NZ 2-like, ma con peculiarità più vicine al ceppo NZ 7. Le sequenze sono state quindi analizzate, allineate e utilizzate per la costruzione di un albero filogenetico da cui si evince che le varianti NZ 2-like appartengono ad un unico *cluster* nettamente separato e distanziato dal *cluster* formato dalle varianti NZ 7-like.

ELISA CON ANTICORPI MONOCLONALI PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI ANTI-EMOAGGLUTININE SOTTOTIPO H5 E H7 NELLA DIAGNOSTICA SIEROLOGICA DELL'INFLUENZA AVIARE

Paolo Cordioli, Ana Moreno Martin, Davide Lelli, Massimo Tranquillo, Enrica Sozzi,
Andrea Luppi, Emiliana Brocchi
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia

Le recenti epizootie di influenza aviare da sottotipi H7 e H5 verificatesi in Italia hanno determinato un aumento del numero di indagini virologiche e sierologiche. Secondo le nuove indicazioni dell'OIE, dal Maggio 2005 tutti i virus H7 e H5 vengono identificati come *notifiable avian influenza viruses* per il rischio di possibili mutazioni verso l'alta patogenicità. Si evidenzia quindi la necessità di disporre di metodiche sierologiche da utilizzare in aggiunta e come supporto alla inibizione dell'emoagglutinazione prevista dal DPR 656/96, soprattutto in quei casi di reazioni anomale, dubbie o di sieri emolitici.

Sono quindi state messe a punto due ELISA competitive, basate sull'utilizzo di anticorpi monoclonali (MAbs). Le prove di reattività nei confronti di 22 ceppi H7 e 10 ceppi H5, sia di referenza che di campo, hanno permesso di individuare 3 MAbs (3G1, 7A4, 1A6) per H7 e 2 (5A6 e 5D8) per H5, utili per l'allestimento di prove sierologiche preliminari. Le prove di competizione con antisieri sperimentali reattivi nei confronti delle diverse emoagglutinine e con sieri di campo hanno individuato come MAbs di elezione il 3G1 per l'ELISA H7 e il 5D8 per l'ELISA H5. Il protocollo operativo prevede l'adsorbimento delle piastre rispettivamente con gli antigeni H7N1 e H5N2 parzialmente purificati alla diluizione d'uso. I sieri vengono esaminati in due diluizioni (1/5-1/10) e contemporaneamente viene aggiunto il corrispettivo MAb coniugato con perossidasi. Valutazioni preliminari della sensibilità e della specificità delle ELISA H7 e H5 sono state condotte tramite l'analisi di 700 sieri di pollo e tacchino suddivisi come segue:

- 220 sieri di pollo e tacchino provenienti da allevamenti situati in zone indenni e controllati con esito negativo in Agar gel precipitazione (AGID) e in ELISA per la ricerca anticorpi nei confronti della nucleoproteina tipo A;
- 331 sieri di tacchino provenienti da allevamenti naturalmente infetti da H7N1 LPAI (20 sieri) e H7N3 LPAI (311 sieri);
- 93 sieri di tacchino provenienti da allevamenti naturalmente infetti da H5N2 LPAI;
- 10 sieri di pollo SPF infetti sperimentalmente con H5N3;
- 10 sieri di pollo SPF infetti sperimentalmente con H5N9;
- 36 sieri di tacchino vaccinati con vaccino bivalente H7N1 e H5N9.

I risultati, valutati statisticamente confrontando i risultati di ogni ELISA H5 e H7 con il rispettivo *test gold standard* (HI) hanno fornito i seguenti valori di sensibilità e specificità:

- H7: Se= 99.7%(IC95%: 98.2-99.9); Sp= 100% (IC95%: 98.6-100);
- H5: Se= 100% (IC95%: 96.8-100); Sp= 98.5%(IC95%: 97.0-99.3).

PS DIAGNOSI SIEROLOGICA DELLA LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA (LEB): STUDIO PRELIMINARE SULLA GLICOPROTEINA 51 RICOMBINANTE DELETA

Antonio De Giuseppe, Miriam Menichelli, Eleonora Micci, Giulio Severi, Monica Cagiola, Katia Forti, Francesco Feliziani

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Il virus della Leucosi Bovina (BLV) appartiene alla famiglia *Retroviridae* che include agenti in grado di causare forme tumorali nei mammiferi, negli uccelli e nei rettili. Questo virus determina una risposta anticorpale che non blocca la sua replicazione nell'ospite. Numerosi paesi hanno da tempo intrapreso piani di eradicazione nei confronti della LEB, basati sull'evidenziazione di animali infetti attraverso diagnosi sierologiche. Le tecniche tradizionalmente usate sono l'Immunodiffusione in Gel di Agar e l'ELISA, le quali utilizzano come antigene la glicoproteina dell'*envelope* (gp51). Questa proteina riveste particolare importanza nei meccanismi di infezione e si è dimostrata fortemente immunogena.

Recentemente è stato dimostrato che una gp51 ricombinante prodotta in cellule d'insetto può essere impiegata in test immunoenzimatici migliorando le performance di sensibilità e specificità. Prove sperimentali hanno però evidenziato che la gp51 sintetica tende a formare degli aggregati macromolecolari limitandone le sue capacità di interazione con gli anticorpi. Per questo motivo la proteina non risulta attualmente purificabile dal baculovirus ricombinante e non si presta ad un adsorbimento diretto su piastra.

Per ovviare a tali inconvenienti, parte del gene codificante i primi 184 aminoacidi della regione NH₂-terminale della gp51 è stato amplificato mediante PCR, clonato nel vettore di trasferimento in baculovirus pFast Bac1 e sequenziato. A seguito della trasformazione dei batteri competenti DH10Bac con tale costrutto, il DNA bacmidico ottenuto è stato transfettato in cellule d'insetto Sf9. In seguito è stato isolato e amplificato un baculovirus ricombinante (Bac- Δ 184rgp51) in grado di esprimere una gp51 in forma secreta e deleta nella sua regione COOH-terminale. Tale proteina è stata poi caratterizzata attraverso l'impiego del *Western blotting* e del test ELISA.

Studi preliminari dimostrano che questo nuovo antigene ricombinante Δ 184-rgp51 è più stabile della gp51 completa; ciò potrebbe permettere la purificazione della proteina dal baculovirus e ne consentirebbe l'impiego in adsorbimento diretto su piastre per ELISA.

Ulteriori ricerche appaiono necessarie per definire le sequenze aminoacidiche responsabili dell'aggregazione della gp51, al fine di sintetizzare una proteina ricombinante deleta oppure una gp51 completa e mutata che dia complete garanzie di stabilità e conservi le sue piene capacità di interazione con gli anticorpi conformazionali. Solo in seguito il nuovo test ELISA potrebbe essere confrontato con altri test già in commercio, attraverso l'esame di un adeguato campione di sieri positivi e negativi, per valutare le sue performance in termini di sensibilità e specificità.

P6 CORONAVIRUS DEL FAGIANO (PHCOV): ISOLAMENTO DEL VIRUS E INDAGINI SIEROLOGICHE IN FAGIANI ALLEVATI IN ITALIA

Maria Alessandra De Marco (a), Elena Catelli (b), Elisabetta Raffini (c), Mauro Delogu (b), Matteo Frasnelli(c), Francesca Paganelli (c), Ana Moreno Martin (c), Ilaria Barbieri (c), Barbara Bedini (d), Mattia Cecchinato (b), Livia Di Trani (d), Antonio Lavazza (c)

(a) *Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica, Ozzano Emilia, Bologna;*

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

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

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

Il fagiano rappresenta una delle principali specie aviarie di interesse faunistico-venatorio allevate in Italia. Il coronavirus del fagiano, associato fin dagli anni '80 a malattia respiratoria e renale viene oggi considerato specie differente (PhCoV) dal virus delle bronchite infettiva (IBV), seppure ad esso antigenicamente correlato. Scopo di questo lavoro è descrivere la presenza di PhCoV in soggetti allevati nel nord Italia, sia attraverso l'isolamento e caratterizzazione del virus sia a seguito di indagine sierologico-epidemiologica in animali allevati e a vita libera. Sono stati isolati due ceppi, rispettivamente nel 1996 e 2000, in corso di episodi caratterizzati da mortalità (fino al 10%) nei giovani di 2-7 settimane e presenza di lesioni renali (urolitiasi) e gotta viscerale. L'isolamento è avvenuto su uova embrionali di pollo inoculate per via allantoidea e confermato mediante ME. Per la caratterizzazione virale, oltre allo studio delle lesioni renali e viscerali mediante microscopia elettronica ultrastrutturale, si è eseguito un test di sieroneutralizzazione con 12 ceppi di IBV, da cui è emerso solo un basso titolo sieroneutralizzante con il ceppo CR-84221. Lo studio delle caratteristiche genetiche degli isolati e del grado di correlazione con IBV si è basato sul sequenziamento e di due segmenti genomici (*Spike*, S1 e *Matrix*, M) e sul confronto filogenetico con le sequenze disponibili in *GenBank*. L'identità del gene S1 è risultata più elevata, per entrambi gli isolati, con il ceppo B1648 (88.1% e 91.3%) mentre l'identità del gene M era praticamente la medesima con tutti i ceppi di IBV controllati (88.3% - 92.1%). La regione ipervariabile S1 degli isolati italiani è stata confrontata con quella dei ceppi inglesi descritti nel 2002 e si è visto che la più elevata identità di entrambi i ceppi era verso il ceppo PhUK/438/94 (88.8% e 94.0%). L'indagine sierologica è stata condotta in Emilia Romagna al fine di stabilire la presenza e diffusione del coronavirus sia in popolazioni allevate (704 sieri da 16 aziende, nel 1998) che a vita libera (275 sieri tra il 1995 e il 2002). Per l'evidenziazione degli anticorpi *cross* reattivi con IBV è stato usato un test ELISA del commercio. Sono stati rilevati animali sieropositivi in 6 delle 16 aziende esaminate e il numero dei soggetti sieropositivi variava da 2 (4.5%) a 5 (11.4%) mentre, per quanto concerne gli animali selvatici, si sono trovati due soli soggetti positivi. In conclusione, questi dati permettono di affermare la presenza del coronavirus in popolazioni di fagiani allevati, ma non in animali a vita libera ed enfatizzano il rischio di trasmissione di infezioni alla fauna selvatica legate alle procedure di gestione faunistico venatoria.

P7 DIAGNOSI DI FEBBRE CATARRALE MALIGNA MEDIANTE *REAL-TIME* PCR

Nicola Decaro (a), Donatella Nava (b), Marco Campolo (a), Maria Stella Lucente (a),
Domenico Fenizia (b), Canio Buonavoglia (a)

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

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

La febbre catarrale maligna (MCF) è una malattia infettiva del bovino e di alcuni ruminanti selvatici, causata, nei Paesi *extra*-africani, dall'herpesvirus ovino tipo 2 (OvHV-2). Le pecore sono i *carrier* asintomatici dell'infezione e i bovini e i cervidi sono le specie in cui si sviluppano le forme clinicamente manifeste. Poiché OvHV-2 non è stato adattato alla crescita *in vitro*, la diagnosi di MCF nel bovino è comunemente effettuata mediante tecniche tradizionali non altamente affidabili, quali l'esame istologico su sezioni d'organo e la ricerca di anticorpi specifici. Recentemente sono stati messi a punto test molecolari, quali PCR e *real-time* PCR, per la identificazione del DNA di OvHV-2 nel sangue e nei tessuti.

Si riportano i risultati delle prove di *real-time* PCR eseguite su campioni biologici prelevati da bovini con sintomatologia riferibile a MCF e da pecore che erano allevate nelle medesime aziende. Sono stati analizzati campioni di sangue e tamponi oculari e nasali prelevati *intra-vitam* e campioni d'organo prelevati *post-mortem* da bovini con sintomi riferibili a MCF, nonché campioni di sangue e tamponi oculari e nasali delle pecore. Dei 9 bovini esaminati, 6 sono risultati positivi per MCF: l'acido nucleico di OvHV-2 è stato evidenziato in tutti i campioni raccolti *intra-vitam* e *post-mortem* dagli animali positivi. I titoli di DNA virale sono risultati alti in tutti i campioni esaminati, raggiungendo valori massimi nel polmone (fino a $5,99 \times 10^6$ copie di DNA/10 μ l di estratto) e nella trachea (fino a $5,45 \times 10^6$ copie di DNA/10 μ l di estratto).

Per quanto riguarda le pecore allevate in promiscuità con i bovini affetti da MCF, sia i tamponi oculo-nasali che i campioni di sangue sono risultati positivi per OvHV-2, anche se a titoli molto bassi (10^1 - 10^2 copie di DNA/10 μ l di estratto). In questi animali, l'infezione da OvHV-2 è stata confermata dai risultati positivi della immunofluorescenza indiretta per la ricerca di anticorpi specifici, eseguita su campioni di siero. I risultati della presente indagine dimostrano la elevata sensibilità e versatilità della *real-time* PCR sia per la diagnosi di MCF nei bovini con sintomi clinici che per la identificazione degli animali *carrier* dell'infezione.

Il presente studio è stato realizzato con i finanziamenti ricevuti dal Ministero della Salute (Progetto Ricerca Corrente 2003 "Epidemiologia e diagnosi della febbre catarrale maligna nei ruminanti") e dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (PRIN 2004 "Patologia infettiva dei ruminanti").

P8 APPLICABILITÀ DELL'ANALISI PER ANTICORPI BVD NEL LATTE DI MASSA BOVINO NELLA REALTÀ DELL'ALLEVAMENTO VENETO

Debora Dellamaria (a), Marianna Merenda (a), Maria De Mateo Aznar (a), Gioia Capelli (a), Paolo Fent (b), Stefano Nardelli (a)

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

(b) *Associazione Regionale Allevatori Veneto, Padova*

La ricerca di anticorpi nel latte di massa è ampiamente utilizzata come strumento di controllo di numerose malattie infettive nell'allevamento bovino. Il latte offre, infatti, numerosi vantaggi rispetto al tradizionale prelievo di sangue (facilità di raccolta, minor costo per analisi, minore stress per l'animale), tanto che la normativa comunitaria ne prevede l'impiego per il monitoraggio di alcune malattie infettive inserite nei piani di risanamento ufficiali (IBR, Brucellosi, Leucosi). Per ciò che riguarda l'infezione da virus BVD (BVDV) la ricerca di anticorpi nel latte di massa mediante test ELISA è utilizzata in alcuni paesi per monitorare la presenza dell'infezione sul territorio (Austria, Paesi Scandinavi).

892 campioni di latte di massa provenienti da altrettante aziende distribuite nella Regione Veneto sono stati sottoposti alla ricerca di anticorpi nei confronti di BVDV mediante kit ELISA commerciale specifico per anticorpi verso la proteina non strutturale NS2-3; tale reazione è stata scelta in quanto rivolta verso una proteina altamente conservata in tutti i ceppi di BVDV e nei confronti della quale il potere immunogeno dei vaccini, specialmente se inattivati, risulta ridotto.

Dalle analisi eseguite risulta che quasi la metà (46%) delle aziende considerate presentano scarsa o nulla reattività nei confronti di BVDV. Inoltre, per quanto numericamente meno consistenti, i dati riferiti ad aziende nelle quali è stato riscontrato un soggetto persistentemente infetto (PI), mostrano costantemente una forte reattività del latte; viceversa, il riscontro di tale forte reattività non sempre si associa alla presenza di soggetti PI. In tale contesto il latte di massa potrà pertanto essere agevolmente utilizzato nelle stalle a reattività scarsa o nulla per monitorare l'eventuale comparsa di soggetti immunotolleranti.

Per quanto riguarda i parametri riproduttivi aziendali, essi non appaiono influenzati dalla presenza o assenza degli anticorpi BVD; al contrario, questi stessi parametri risultano significativamente peggiori nelle stalle che evidenziano una forte reattività anticorpale verso *Neospora caninum*. La mancata correlazione tra la positività anticorpale per BVDV e i parametri riproduttivi aziendali potrebbe essere spiegata con il fatto che, come sopra detto, la reattività sul latte non è necessariamente indicativa della presenza in stalla di soggetti PI al momento dell'indagine. Al contrario l'associazione tra presenza di anticorpi e infezione attiva da *Neospora caninum* risulta più stretta, data la probabile persistenza del parassita per tutta la vita degli animali infetti.

P9 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEL CORONAVIRUS DEL CANE MEDIANTE METODICHE *REAL-TIME* RT-PCR GENOTIPO-SPECIFICHE

Costantina Desario (a), Maria Stella Lucente (a), Marco Campolo (a), Francesco Cirone (a), Nicola Cavaliere (b), Gabriella Elia (a), Nicola Decaro (a)

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

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

Il coronavirus del cane (CCoV) è responsabile di enteriti di diversa gravità in cuccioli di 2-3 mesi di età. Attualmente sono noti due distinti genotipi di CCoV, che sono classificati in relazione alle correlazioni genetiche con i coronavirus felini (FCoV): CCoV tipo I è geneticamente correlato a FCoV tipo I, mentre CCoV tipo II è correlato a FCoV tipo II. Diversamente da CCoV tipo II, CCoV tipo I non è stato adattato alla crescita *in vitro*. Sono stati messi a punto sistemi RT-PCR differenziali per la caratterizzazione dei genotipi CCoV, ma non esistono metodiche per la quantificazione dei rispettivi acidi nucleici. Nel presente lavoro si riporta la messa a punto di due metodiche *real-time* RT-PCR genotipo-specifiche per la identificazione e la quantificazione dell'RNA di CCoV tipo I e tipo II in campioni di feci raccolte da cani con diarrea. I due *test* sono risultati altamente specifici (nessuna cross-reattività tra i due genotipi), sensibili (fino a 10^1 copie di RNA standard) e riproducibili (coefficienti di variazione *intra-assay* e *interassay* ottimali), assicurando una precisa stima del numero di copie di RNA virale in campioni con ampio range di acido nucleico (da 10^1 a 10^8 copie di RNA standard). Rispetto alle classiche tecniche RT-PCR genotipo-specifiche, le metodiche *real-time* RT-PCR sono risultate maggiormente sensibili e rapide, con un notevole aumento del numero di campioni che possono essere processati nella stessa corsa. Le due metodiche sono state utilizzate per la ricerca e la quantificazione dell'RNA dei due genotipi in campioni di feci raccolti da cani con infezione naturale o sperimentale. Dei 174 campioni di campo analizzati, 77 (44,25%) sono risultati positivi per CCoV tipo I, 46 (26,44%) per CCoV tipo II, 38 (21,84%) per entrambi i genotipi, con titoli generalmente più elevati per il tipo I rispetto al tipo II (titoli mediani pari a $9,14 \times 10^4$ e $2,24 \times 10^4$ copie di RNA/ μ l di estratto, rispettivamente). Per quanto riguarda i cani infettati sperimentalmente con CCoV tipo I, CCoV tipo II o entrambi i genotipi, l'escrezione virale è stata dimostrata per periodi lunghi (fino 67-68 giorni post-infezione), con titoli più elevati per il genotipo I rispetto al genotipo II sia nei cani con infezione singola (fino a $7,00 \times 10^6$ e $1,35 \times 10^5$ copie di RNA/ μ l di estratto, rispettivamente) che nei cani con infezione doppia (fino a $1,21 \times 10^6$ e $2,41 \times 10^5$ copie di RNA/ μ l di estratto, rispettivamente).

P10 CLONAGGIO, ESPRESSIONE E CARATTERIZZAZIONE ANTIGENICA DELLA PROTEINA DEL CAPSIDE DI UN CEPPO UMANO DI NOROVIRUS

Ilaria Di Bartolo (a), Silvia Crudeli (a), Silvia Giugliano (a), Marina Monini (a), Maria Grazia Ammendolia (b), Franco Maria Ruggeri (a)

(a) *Dipartimento di Sanità alimentare e animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma;*

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

Il genere Norovirus, uno dei quattro della famiglia *Caliciviridae*, comprende una varietà di piccoli virus (27 nm) con genoma a RNA a singola elica, che sono tra i principali agenti etiologici di gastroenterite sia sporadica infantile che epidemica nell'adulto e sono largamente diffusi in tutto il mondo. Dagli studi sinora effettuati è emerso che i Norovirus si diffondono nella maggior parte dei casi mediante trasmissione interpersonale, ma anche attraverso cibi contaminati sia alla produzione che durante la filiera.

Non sono stati ancora sviluppati dei sistemi di coltura *in vitro* per questi virus, pertanto la diagnosi di infezione virale si basa sulla visualizzazione dei virioni nei campioni clinici o sull'identificazione dell'RNA virale mediante metodi di biologia molecolare.

Nell'ambito di un progetto pilota di sorveglianza delle gastroenteriti virali, il nostro laboratorio ha identificato un ceppo di Norovirus quale agente causale di un'epidemia di gastroenterite avvenuta in un villaggio turistico in località Scanzano Jonico (sud Italia) nel luglio del 2000. La caratterizzazione molecolare del ceppo virale implicato ha dimostrato che questo apparteneva al genotipo di Norovirus II.4 (Lordsdale), predominante in tutta Europa.

Il gene ORF2 del ceppo identificato, codificante per la proteina del capsido VP1, è stato clonato nel vettore ricombinante di Baculovirus ed espresso in cellule di insetto Sf9. I lisati cellulari sono stati esaminati al microscopio elettronico con tecniche di colorazione negativa, ed è stato osservato che la proteina VP1 espressa, si autoassemblava efficientemente in particelle simil-virali prive di genoma, denominate VLPs (*Virus Like Particle*). Le VLP prodotte sono state purificate e utilizzate come antigene per produrre un siero policlonale e anticorpi monoclonali. I reattivi immunologici ottenuti in topi Balb/c ci hanno permesso di caratterizzare le VLPs prodotte mediante saggi ELISA e *Western blotting*. I risultati preliminari ottenuti indicano l'immunogenicità nel topo delle VLPs prodotte, che potranno quindi essere utilizzate in saggi immunodiagnostici e permetteranno di ottenere una mappatura fine degli epitopi del capsido del ceppo Lordsdale di Norovirus.

VALUTAZIONE DELL'IMMUNOGENICITÀ DELLA PROTEINA CAPSIDICA VP1 DEL CALICIVIRUS FELINO PRODOTTA MEDIANTE IL SISTEMA DI ESPRESSIONE DEL BACULOVIRUS RICOMBINANTE

Barbara Di Martino (a), Christopher Wilbirch (b), Ilaria Meridiani (a), Fulvio Marsilio (a), Polly Roy (b)

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

(b) *Department of Infectious and Tropical Disease, London School of Hygiene & Tropical Medicine, University of London*

Il Calicivirus Felino (FCV) è uno dei patogeni più comunemente associati al complesso delle infezioni delle prime vie respiratorie del gatto, caratterizzato da una spiccata variabilità antigenica. Nonostante nel corso degli ultimi vent'anni la profilassi vaccinale sia stata effettuata su larga scala, FCV è tuttora molto diffuso. Ciò potrebbe essere attribuibile alla selezione di ceppi FCV antigenicamente diversi dallo stipite vaccinale F9 e/o all'incapacità del vaccino di impedire l'eliminazione del virus nell'ambiente e/o alle possibili reazioni post-vaccinali. Le particelle *virus-like* (VLPs) rappresentano una specifica classe di vaccini a subunità in grado di mimare la struttura delle particelle virali pur non contenendo materiale genetico infettante. Scopo del lavoro è stato dapprima quello di assemblare *Feline Calicivirus-Like Particles* (FCVLPs) utilizzando il sistema di espressione del baculovirus e successivamente di valutarne l'immunogenicità mediante prove di sieroneutralizzazione (SN) tra sieri iperimmuni prodotti in conigli e quindici ceppi selvaggi di FCV. A tal fine l'intero gene codificante la proteina capsidica (VP1) del ceppo vaccinale F9 di FCV è stato inserito nel sito *Bam*H1 del vettore pAcYM1 sotto il controllo del promotore della poliedrina. Il vettore ingegnerizzato è stato cotrasfettato con il DNA linearizzato del baculovirus AcNPV. Per la produzione di FCVLPs le cellule *Sf9* sono state infettate con una molteplicità di infezione (MOI) di 3. A 48 ore post-infezione (PI) la proteina VP1 è stata concentrata su cuscino di saccarosio e purificata in CICs. L'espressione di VP1 è stata valutata mediante *Western blotting* (WB) attraverso l'impiego di anticorpi anti-F9 prodotti in coniglio, mentre lo studio morfologico è stato effettuato mediante elettromicroscopia a trasmissione (TEM). L'immunogenicità di FCVLP è stata valutata inoculando quattro conigli per via sottocutanea a distanza di 21 giorni. La risposta anticorpale è stata monitorata per un tempo complessivo di tre mesi mediante SN. Per valutare la capacità neutralizzante degli anticorpi anti-FCVLP nei confronti di ceppi eterologhi, sono stati esaminati mediante SN quindici ceppi FCV precedentemente isolati. L'analisi mediante WB ha rilevato la presenza di una banda del peso molecolare di 58 kDa corrispondente alle dimensioni di VP1 di FCV. La maggior parte di FCVLPs osservate al TEM si presentavano morfologicamente simili alla particella virale infettante. L'immunizzazione dei conigli con FCVLPs ha indotto una risposta anticorpale evidenziabile già dopo la prima vaccinazione con un sensibile aumento del titolo in seguito a richiamo. I quindici ceppi FCV esaminati mediante SN sono stati tutti neutralizzati dagli anticorpi anti-FCVLPs con titoli compresi tra 1:10 e 1:20.

DIAGNOSI RAPIDA DI INFLUENZA AVIARE MEDIANTE *REAL-TIME* RT-PCR ONE STEP

Livia Di Trani (a), Barbara Bedini (a), Emiliana Falcone (a), Isabella Donatelli (b), Laura Campitelli (a), Barbara Chiappini (a), Maria Alessandra De Marco (c), Mauro Delogu (d), Canio Buonavoglia (e), Gabriele Vaccari (a)

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

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

(c) *Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica, Ozzano Emilia, Bologna;*

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

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

La diffusione dei focolai di influenza aviaria A/H5N1 e gli episodi di mortalità nell'uomo registrati nei paesi del Sud-Est asiatico, hanno determinato un crescente allarme nella comunità scientifica e nell'opinione pubblica a causa del potenziale pandemico rappresentato dalla evoluzione del virus.

La tempestiva identificazione del virus nelle specie aviarie domestiche e selvatiche, attraverso l'impiego di strumenti diagnostici altamente sensibili, specifici e di rapida esecuzione, è essenziale per l'adozione rapida ed efficace delle misure sanitarie di controllo.

La *real-time* RT-PCR, basata sull'impiego di sonde fluorescenti, rappresenta lo strumento diagnostico in grado di garantire l'identificazione dei virus influenzali, sia umani che aviari, presentando notevoli vantaggi in termini di rapidità, sensibilità e specificità rispetto alle metodiche classiche di isolamento del virus e alle altre metodiche molecolari.

Nell'ottica di un continuo miglioramento dell'iter diagnostico per l'identificazione del virus dell'influenza aviaria, è stato sviluppato un saggio di *real-time* RT-PCR, impiegando una sonda fluorescente *Minor Groove Binder*, che presenta una serie di innovazioni rispetto alle piattaforme per *real-time* sinora disponibili per la diagnostica virologica.

Il sistema diagnostico è stato calibrato e ottimizzato in termini di specificità, utilizzando un panel di virus influenzali aviari, di origine suina, equina, oltre che umana, dimostrando inoltre una sensibilità tale da renderlo applicabile per lo screening di campioni biologici prelevati dalle specie aviarie domestiche e selvatiche.

SITUAZIONE EPIDEMIOLOGICA DELLA LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA IN ITALIA

Francesco Feliziani (a), Morgan Avetta (b), Nicola Ferrarini (b), Gianni Perugini (a), Domenico Rutili (a)

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

(b) Ministero della Salute, Roma

La Leucosi bovina enzootica (LEB) è una malattia contagiosa che colpisce i bovini. L'agente eziologico appartiene alla famiglia delle Retroviridae che raccoglie virus in grado di causare forme tumorali nei mammiferi, negli uccelli e nei rettili. La Comunità Europea ha emanato specifiche linee guida finalizzate alla eradicazione della LEB, le quali sono state recepite anche dall'Italia (D.L. n. 358 del 2 maggio 1996), seppure con un certo ritardo rispetto agli altri paesi a zootecnia avanzata. Il Servizio Veterinario Pubblico ha per questo individuato ed eliminato gli animali infetti attraverso un capillare monitoraggio sierologico, arrivando a certificare gli allevamenti indenni. Una provincia è indenne quando tutti i bovini presenti sul territorio sono sottoposti a controlli e almeno il 99,8% degli allevamenti sono indenni da LEB. Una regione è indenne quando tutte le province sono libere dall'infezione.

Il sistema informativo del piano è basato sulla rendicontazione prevista dalla Decisione 2002/677/CE del 22 agosto 2002; esso consente di monitorare lo stato di avanzamento del piano su base annuale.

È stata dunque condotta un'analisi relativa all'andamento epidemiologico della LEB registrando gli effetti che l'applicazione del piano ha determinato. La valutazione ha riguardato sia l'evoluzione della sieroprevalenza di aziende e animali positivi sia le attività di controllo dei Servizi Veterinari.

Il dato relativo alla sieroprevalenza è sicuramente confortante. Si è infatti registrato un netto calo degli allevamenti e degli animali infetti in tutto il territorio nazionale. Il decremento dei livelli di infezione non è però stato uniforme. Mentre alcune regioni del centro nord hanno già acquisito o stanno per raggiungere la qualifica di indennità, in diverse regioni del centro sud permangono delle sacche di persistenza dell'infezione.

Nelle regioni del sud parallelamente a questa situazione epidemiologica si è osservato un deficit delle attività di controllo; comunque, la quota di allevamenti non controllati rispetto ai controllabili è in netta diminuzione specialmente negli ultimi anni. Paradossalmente invece, nella Regione Lazio, che attualmente fa registrare il valore di prevalenza più alto, si è sempre distinta per aver controllato tutto il patrimonio controllabile. Un altro dato interessante è legato all'evoluzione tecnologica che in questi ultimi anni hanno fatto registrare le prove diagnostiche impiegate nel monitoraggio sierologico. I laboratori hanno progressivamente sostituito la tradizionale prova di immunodiffusione in gel di agar (AGID) con prove immunoenzimatiche (ELISA). In molti casi l'impiego dell'ELISA, che garantisce una maggiore efficacia in termini di sensibilità, è stato determinante ai fini del risanamento di alcune aziende.

P11 PCR E *REAL-TIME* PCR: DUE METODICHE A CONFRONTO NELLA DIAGNOSI DI INFEZIONE DA CIRCOVIRUS NELLE ANATRE (DuCV)

Elena Fringuelli (a), Alistair Scott (b), Andrea Beckett (b), John McKillen (c), Joan Smyth (c), Vilmos Palya (d), Robert Glavits (e), Eva Ivanics (e), Annette Mankertz (f), Maria Pia Franciosini (a), Daniel Todd (c)

(a) *Dipartimento di Scienze Biopatologiche e Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, Università degli Studi di Perugia;*

(b) *Department of Veterinary Science, Queen's University of Belfast, Stormont, Belfast;*

(c) *Veterinary Sciences Division, Department of Agriculture and Rural Development for Northern Ireland, Stormont, Belfast;*

(d) *Ceva-Phylaxia Veterinary Biologicals Co., Budapest;*

(e) *Central Veterinary Institute, Budapest;*

(f) *P24 Xenotransplantation, Robert Koch-Institut, Berlin*

Recentemente è stata identificata la sequenza di un nuovo circovirus, indicato come Duck circovirus (DuCV), in anatre provenienti da un allevamento della Germania. Fino ad ora l'infezione da circovirus nelle anatre è stata descritta in un solo lavoro dove la diagnosi è basata su l'esame istologico e la microscopia elettronica su due anatre di sei settimane di età con disordine nel piumaggio e perdita di peso. Noi descriviamo il primo sviluppo di un test di PCR per la diagnosi di infezione da DuCV e per lo studio della prevalenza di infezione in anatre morte o malate. Descriviamo, inoltre, lo sviluppo di un test di *real-time* PCR basato sulla chimica del SYBR Green per monitorare la carica virale nei soggetti infetti. Sia nella classica PCR che nella *real-time* PCR abbiamo usato lo stesso set di primer disegnato, per amplificare un frammento di 230bp, all'interno del gene Rep del DuCV.

I due test hanno mostrato la stessa sensibilità (13×10^3 copie di DNA virale/ml) quando il plasmide ricombinante contenente il gene Rep del DuCV da noi clonato e usato come target è stato diluito in acqua. Quando lo stesso plasmide è stato diluito con DNA cellulare estratto da un campione negativo di borsa di Fabrizio (BF), condizione che più si avvicina al DNA estratto da un campione clinico, la sensibilità della PCR si è ridotta di 100 volte, mentre quella della *real-time* PCR di 10 volte dimostrano la maggiore sensibilità di quest'ultima metodica. La specificità delle due metodiche è stata dimostrata quando campioni di BF positivi per la presenza di PiCV (pigeno circovirus) e GoCV (Goose circovirus) sono risultati negativi. Il sequenziamento di 5 prodotti di PCR ha ulteriormente confermato tale risultato.

Mediante il classico test di PCR, 85 (84%) su 101 campioni di BF prelevati da anatre morte o malate provenienti da 35 (94%) su 37 allevamenti ungheresi testati sono risultati positivi per la presenza di DuCV al test di PCR. Su 54 campioni scelti, 50 (92%) sono risultati positivi alla *real-time* e solo 38 (70%) alla classica PCR. Sebbene l'infezione da DuCV è stata diagnosticata in soggetti di età compresa fra 1 e 12 settimane, i soggetti di età maggiore di 5 settimane hanno mostrato una più alta carica virale. Il significato clinicopatologico della carica virale richiede tuttavia un maggiore approfondimento.

P12 PREVALENCE OF HEPATITIS E VIRUS (HEV) IN VETERINARIANS WORKING WITH SWINE AND STUDENTS FROM SPAIN (COMUNIDAD VALENCIANA)

Carolina Galiana (a), Salceda Fernández-Barredo (a), Angel García (a), Santiago Vega (a), Maria Teresa Gómez (a), Antonio Hermandis (b), Maria Teresa Pérez-Gracia (a)

(a) *Departamento de Atención Sanitaria, Salud Pública y Sanidad Animal, Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad Cardenal Herrera-CEU, Moncada, Valencia;*

(b) *Centro de Investigación y Tecnología Animal del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Segorbe, Valencia. Conselleria de Agricultura, Pesca i Alimentació de la Generalitat Valenciana*

Hepatitis E is considered endemic in developing countries due to poor sanitary conditions of drinking water. In industrialized countries, this disease has been found mainly in individuals who have travelled to endemic zones. However, the increasing number of autochthonous cases of hepatitis E and the recent findings of HEV in domestic animals such as poultry and swine, indicate that HEV may be undetected in idiopathic non-A non-B hepatitis between the strains detected in human sera of asymptomatic individuals and swine faeces. The aim of this study was to detect the presence of HEV-RNA among veterinarians of swine and students.

A total of 121 individuals were included in a serologic screening to detect the presence of HEV. They were distributed in two separate groups taking into consideration the level of exposition to swine: low or no exposition, such as nursery students (n=88) and medium-high exposition, such as swine veterinarians (n=33).

HEV-RNA extraction was performed using a QiAmp Viral RNA Kit (Qiagen, USA) according to manufacturer's directions. Viral cDNA was obtained after retrotranscription in presence of reverse primer 3157N and then used as template in a nested-PCR, in order to amplify a 348 base pair (bp) fragment belonging to ORF2 fragment (putative capsid gene). Sera were also tested for antibodies against HEV (anti-HEV IgG and anti-HEV IgM) using ELISA (Biokit, Barcelona).

A total of two students (2.27%) and eight veterinarians (24.24%) were HEV-RNA positive ($p < 0.05$, 95% confidence interval, κ : 12.99). Furthermore, two students (2.27%) and three veterinarians (9.09%) were positive for anti-HEV IgG. Anti-HEV IgM was detected in 6.06% (2/33), these positive sera belonging to swine veterinarians.

Veterinarians working with swine in Spain seem to be at an increased risk of infection with HEV. Our data supports the evidence that hepatitis E is a zoonosis.

This project was financed by grants from Cardenal Herrera-CEU University (PRUCH 04/8), Escuela Valenciana de Estudios de Salud (053/2005) and Conselleria de Empresa, Universidad y Ciencia de la Generalitat Valenciana (GV05/132).

P13 CONFRONTO DI METODICHE PER LA DIAGNOSI DI INFEZIONE DA NOROVIRUS IN PAZIENTI PEDIATRICI CON GASTROENTERITE

Giovanni Giammanco (a), Simona De Grazia (a), Stefania Ramirez (a), Claudia Colomba (b), Serenella Arista (a)

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

(b) *Istituto di Patologia Infettiva e Virologia, Università degli Studi di Palermo*

È noto il ruolo dei norovirus quali agenti di enterite virale epidemica. Le limitate informazioni epidemiologiche tuttora disponibili sul loro ruolo in casi sporadici di enterite stimolano ad indagare in tal senso. L'estrema variabilità dei norovirus rende difficile la messa a punto di test validi per la loro identificazione in campioni fecali. Attualmente, la ricerca di antigeni o del genoma virale trova maggiori applicazioni. Obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'impiego di differenti metodiche per la diagnosi di infezione da norovirus in 199 bambini, di età < 3 anni, ospedalizzati a Palermo nel 2004 per enterite acuta.

Le tecniche utilizzate sono state:

- una RT-PCR che amplifica la regione della polimerasi virale con i *primer* specifici JV12a e JV13b;
- una PCR, effettuata con gli stessi *primer*, ma a partire da cDNA ottenuto *con random primer* esamerici;
- una eminested PCR condotta con i *primer* Ni e JV13b interni ai precedenti;
- un test ELISA commerciale, in grado di rivelare la presenza e differenziare antigeni specifici dei norovirus di genogruppo I e II.

Mediante RT-PCR convenzionale, il 32% dei campioni ha rivelato presenza di norovirus. Una maggiore sensibilità, con un incremento di circa il 10%, si è ottenuta mediante eminested PCR. L'impiego del cDNA, utile per il saggio contemporaneo di più agenti virali, ha mostrato una minore sensibilità della RT-PCR. La tecnica ELISA ha fornito risultati discordanti, in termini di sensibilità e specificità, rispetto alle precedenti metodiche. I risultati ottenuti hanno dimostrato un ampio ruolo dei norovirus quali agenti di enteriti sporadiche infantili anche nella nostra area geografica. La possibilità di amplificazione genica con impiego dei *primer* JV12a e JV13b ci induce a ritenere che i genotipi di norovirus circolanti a Palermo siano analoghi a quanto riscontrato nel nord Italia o in altri paesi occidentali. Una conferma mediante sequenziamento dei ceppi virali verrà in seguito effettuata.

A fini diagnostici, nella nostra esperienza, l'utilizzo di un secondo *step* di amplificazione ha fornito i migliori risultati, ma una strategia basata sull'impiego di più coppie di *primer* che riconoscono diverse regioni del genoma merita ulteriori sviluppi. La discordanza coi risultati ottenuti in ELISA induce a ritenere le tecniche di amplificazione una scelta prioritaria nella diagnostica delle infezioni da norovirus. Ulteriori studi sulla variabilità antigenica e la cross-reattività di questi virus sono necessari per la messa a punto di tecniche immuno-enzimatiche affidabili.

P14 COMPARAZIONE DI DIFFERENTI REGIONI GENOMICHE PER L'ANALISI FILOGENETICA DI TESCHOVIRUS

Giuseppina La Rosa (a), Michele Muscillo (a), Antonio Di Grazia (a), Stefano Fontana (a), Maria Tollis (b)

(a) *Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma;*

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

Gli enterovirus suini, membri della famiglia *Picornaviridae*, sono stati recentemente classificati, sulla base di studi molecolari, in tre gruppi: enterovirus suini A che includono il sierotipo 8, enterovirus suini B che includono i sierotipi 9 e 10 e un nuovo genere chiamato *Teschovirus* che comprende una singola specie con almeno 11 diversi sierotipi. Sono virus responsabili di patologie di varia entità nel suino: lesioni del derma, disordini neurologici, disordini di fertilità, gastroenteriti, pericarditi e miocarditi.

In questo lavoro è stato condotto uno studio di caratterizzazione molecolare di *Teschovirus*, mediante amplificazione (RT-PCR), sequenziamento e analisi filogenetica, di diverse regioni genomiche. Le RT-PCR sono state testate su una collezione di 7 ceppi di riferimento dell'ATCC (*American Type Culture Collection*) e 3 ceppi dell'IAHPL (*Animal Health Pirbright Laboratory*) e su una collezione di enterovirus suini, provenienti dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini". Per la caratterizzazione a livello di sierotipo, sono state comparate cinque diverse regioni: la regione del 5'non-codificante (5'NC), la regione codificante per la RNA-polimerasi RNA-dipendente (RpRd) e le regioni codificanti per le proteine VP1, VP2 e VP4 del capsido virale. Sono state utilizzate sia coppie di *primer* pubblicate, sia nuove coppie di *primer* degenerati, costruite sulla base del multiallineamento di 26 sequenze di *Teschovirus* presenti in banca dati. Delle 5 coppie di *primer*, soltanto quelle per l'amplificazione delle regioni RpRd, VP4 e VP1 sono risultate ad ampio spettro, cioè in grado di amplificare sia i ceppi di campo che gli standard di riferimento. Le sequenze nella regione della RNA-polimerasi non hanno evidenziato variabilità genetica tra i ceppi, dal momento che la regione è altamente conservata; invece, le sequenze nella regione del capsido VP4 e VP1 hanno mostrato variabilità genetica intraspecie.

L'analisi filogenetica (condotta sulle sequenze dei ceppi di riferimento, dei ceppi di campo oltre a sequenze di *Teschovirus* ottenute dalle banche dati) ha evidenziato che, nella regione VP4, ceppi appartenenti allo stesso sierotipo spesso si raggruppano in *cluster* separati, e non in taxa monofiletici; nella regione del capsido VP1, invece, l'albero filogenetico ha mostrato raggruppamenti dei diversi sierotipi in *cluster* monofiletici, indicando che la regione è utile per la tipizzazione molecolare.

La caratterizzazione molecolare mediante analisi filogenetica nella VP1 risulta di grande utilità non solo per la diagnosi rapida di *Teschovirus* in campioni clinici e ambientali, ma anche per studi epidemiologici globali su tali virus, di cui si hanno scarse conoscenze, soprattutto a livello nazionale.

P15 PREVALENZA E DIFFUSIONE DELLA VARIANTE PATOGENA DEL VIRUS DELLA MALATTIA VIRALE EMORRAGICA DEL CONIGLIO (RHDVA) NEGLI ALLEVAMENTI CUNICOLI ITALIANI

Antonio Lavazza (a,b), Anna Cerrone (c), Fabrizio Agnoletti (d), Gianni Perugini (e), Alessandro Fioretti (f), Lorenzo Capucci (a,b)

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

(b) *OIE Reference Centre for Haemorrhagic Disease of Lagomorphs, Brescia;*

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

(d) *Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Sezione di Treviso, Padova;*

(e) *Istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche, Sezione di Macerata, Perugia;*

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

La Malattia Emorragica Virale del coniglio (RHD), è una malattia contagiosa e fatale del coniglio domestico e selvatico (*Oryctolagus cuniculus*), il cui agente eziologico è un calicivirus (RHDV). Tutti i ceppi di RHDV conosciuti appartengono a un solo sierotipo e le differenze genomiche riscontrate fra i diversi isolati sono minime. Oltre al ceppo “classico” sono state descritte una mutante HA-negativa e, in Italia e Germania, una variante antigenica patogena. Tale variante, RHDVa, è considerata un sottotipo del ceppo originale e per differenziarla è stato allestito un test specifico basato su anticorpi monoclonali (MAbs). Inoltre è stato preparato un pannello completo di MAbs grazie al quale è possibile svelare l'eventuale esistenza di altre nuove varianti. Questa indagine è stata realizzata per valutare la prevalenza dei ceppi patogeni di RHDV in Italia e l'eventuale comparsa di varianti. Campioni di fegato e milza sono stati sottoposti a tipizzazione mediante *sandwich* ELISA standard e con pannello di MAbs e *Western Blot*.

Un'indagine condotta nel 2000 indicò che RHDVa era presente in alcune regioni d'Italia dal 1997 con una percentuale di isolati sul totale dei casi di RHD del 9,5%, che raddoppiava nel 1998 (17,5%) e arrivava al 40% nel 1999. L'attitudine di RHDVa a sostituire progressivamente il ceppo “classico” è confermata dal 33,6% dei positivi nel 2000, 63,8% nel 2001, 55,8% nel 2002, 81% nel 2003 e 74,2% nel 2004. RHDVa appare più diffuso nelle regioni dove la conigliicoltura industriale è maggiormente sviluppata (Piemonte, Lombardia, Emilia Romagna e Campania).

Il virus è presente in tutta Italia, ad eccezione della Sicilia, dove tutti i ceppi appartengono al ceppo classico. In considerazione delle consistenti differenze antigeniche tra RHDV e RHDVa riteniamo opportuno continuare a seguire l'evoluzione del virus in campo attraverso piani di monitoraggio epidemiologico, in particolare per quanto concerne la capacità dei vaccini “ceppo classico” in commercio di proteggere da infezioni con variante RHDVa.

P16 RISULTATI DI UNA INDAGINE SIEROEPIDEMIOLOGICA SULLA DIFFUSIONE DEL CALICIVIRUS APATOGENO DEL CONIGLIO (RCV) IN ANIMALI ALLA MACELLAZIONE

Antonio Lavazza (a), Gianni Perugini (b), Monica Cerioli (a), Anna Cerrone (c), Giuliana Botti (a), Lorenzo Capucci (a)

(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia;*

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

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

L'esistenza virus non patogeni correlati antigenicamente al virus della malattia emorragica virale (RHDV) è stata ipotizzata fin dal 1975 sulla base dell'evidenza di anticorpi naturali e ha trovato conferma nella identificazione in conigli sani del *Rabbit Calicivirus* (RCV). Per controllare la diffusione di RCV in Italia è stata condotta un'indagine sieroepidemiologica tra il 1999 e il 2004 esaminando sangue da conigli da carne prelevato al macello mediante un ELISA competitivo che riconosce anche gli anticorpi indotti da RCV. Per classificare correttamente lo stato immunologico dei conigli, si sono usati anche test ELISA che rilevano immunoglobuline IgG, IgA e IgM. Durante la prima indagine (1999, nord Italia) quasi tutti i conigli testati (>95%) di 24 dei 39 gruppi campionati sono risultati negativi per anticorpi anti-RHDV. Invece, più del 60% degli animali di 13 gruppi sono risultati positivi con titoli compresi tra 1/20-1/320, sebbene i dati anamnestici confermassero l'assenza di focolai di malattia da oltre un anno e che i conigli all'ingrasso non venissero vaccinati verso RHDV. Durante la seconda indagine (2002-2003, centro-sud Italia) sono risultati positivi 516 sieri su 1786 (28,9%) con titoli perlopiù compresi tra 1/20-1/320. Il dato di positività (4 allevamenti) o negatività (11 allevamenti) di ciascuna azienda è stato verificato tramite prelievi ripetuti nell'arco di 6 mesi e in un'unica azienda si è potuta osservare sierconversione dopo 6 mesi. In 5 allevamenti la percentuale di positività era compresa tra 20 e 60%.

Nell'indagine 2004 in Italia centrale sono stati esaminati 831 sieri di cui 474 (57,04%) positivi. Dodici allevamenti (52,2%) erano positivi, 7 (30,4%) negativi e in 4 (17,4%) si sono avuti risultati dubbi. I titoli erano compresi tra 1/20-1/640. La presenza IgA è prova di una immunizzazione attiva ed esclude anticorpi passivi di origine materna o da vaccinazione. Inoltre, in due aziende sono state evidenziate IgM in associazione a IgA a testimonianza di un'infezione recente.

I risultati di queste indagini mostrano chiaramente che la presenza e la distribuzione del virus RCV è radicata e costante sin dal 1999. Si ritiene che gli anticorpi indotti da RCV siano protettivi verso RHDV e possano interferire con l'infezione o il corso della malattia, agendo da "vaccini naturali".

P17 VALUTAZIONE DI METODI MOLECOLARI PER LA RILEVAZIONE DI NOROVIRUS IN CAMPIONI DI *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* SPERIMENTALMENTE CONTAMINATI

Francesca Leoni (a), Cristina Canonico (a), Federica Moscatelli (a), Elena Rocchegiani (a), Franco Maria Ruggeri (b)

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

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

Tra gli alimenti coinvolti nella trasmissione all'uomo di virus enterici un ruolo significativo è rivestito dai molluschi eduli lamellibranchi, sia per la loro capacità come organismi filtratori di concentrare al loro interno particelle virali presenti nelle acque, sia per l'abitudine alimentare di consumarli crudi o poco cotti. Virus a trasmissione oro-fecale responsabili di patologie gastroenteriche nell'uomo sono stati correlati direttamente o tramite evidenze epidemiologiche al consumo di molluschi bivalvi in diversi paesi del mondo. La normativa vigente in Italia (D.Lg.vo 530/92) che regola dal punto di vista sanitario la produzione e la commercializzazione dei molluschi bivalvi, non contempla l'accertamento delle contaminazioni di origine virale. I progressi compiuti nel campo delle tecniche molecolari hanno reso possibile lo sviluppo di metodiche basate sulla rilevazione degli acidi nucleici, applicabili non soltanto a campioni clinici, ma anche a matrici di origine alimentare o ambientale. I Norovirus sono tra i più importanti virus enterici a trasmissione oro-fecale responsabili di patologie gastroenteriche dell'uomo associate al consumo di molluschi bivalvi. Lo scopo del presente lavoro era di mettere a confronto metodiche molecolari per la rilevazione dell'RNA virale di Norovirus in campioni di *Mytilus galloprovincialis* sperimentalmente contaminati. La sospensione virale per la contaminazione dei molluschi è stata preparata partendo da un campione clinico contenente Norovirus del genogruppo II (Lordsdale). Omogenato di *Mytilus galloprovincialis* è stato contaminato con diluizioni seriali della sospensione virale e l'RNA del Norovirus è poi stato estratto in parallelo con due metodiche, una che prevedeva un kit commerciale basato su colonnine con membrana di silice e un'altra con un reagente commerciale per l'estrazione dell'RNA (*Trizol Reagent*). Due metodiche di retrotrascrizione dell'RNA virale con *Random Primers* sono poi state valutate in parallelo e ciascun retrotrascritto è stato amplificato utilizzando metodiche di PCR *booster* o *hemi-nested* con *primer* localizzati nella regione virale della RNA polimerasi RNA dipendente o della ORF1/2. Metodiche differenti di estrazione, retrotrascrizione e amplificazione in PCR hanno evidenziato con sensibilità diverse la presenza di Norovirus nei campioni di *Mytilus galloprovincialis* sperimentalmente contaminati.

P18 ANALISI EPIDEMIOLOGICA DI VIRUS ENTERICI IN PRODOTTI DI MITICOLTURA: QUATTRO ANNI DI MONITORAGGIO

Marina Nadia Losio, Enrico Pavoni, Irene Zanni, Paolo Boni
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia

Negli ultimi anni i virus in grado di trasmettere patologie gastroenteriche all'uomo hanno assunto un ruolo sempre più importante nell'ambito della produzione e della commercializzazione di prodotti destinati ad un ampio consumo sia in Italia che in Europa. La loro circolazione rappresenta una problematica sanitaria in continua espansione, poiché essi sono responsabili della maggior parte delle gastroenteriti non batteriche. I principali virus trasmessi all'uomo mediante gli alimenti comprendono i rotavirus, il virus dell'epatite A, gli enterovirus e i norovirus. Tra gli alimenti maggiormente coinvolti nel determinismo delle tossinfezioni, si annoverano i molluschi eduli lamellibranchi in virtù della loro attività filtratoria e di accumulo di patogeni nella porzione edibile. In Italia, la normativa vigente prevede l'analisi dei molluschi nei confronti degli agenti batterici, ma non prende in considerazione indagini di tipo virologico. Tuttavia, l'assenza di correlazione tra contaminazioni batteriche e virali è documentata in letteratura e ciò suggerisce la necessità di migliorare la qualità delle procedure di controllo. Nell'ambito della ricerca volta alla messa a punto di nuove metodiche di indagine presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia, si è cercato di valutare la presenza di virus dell'epatite A (HAV), enterovirus, norovirus e rotavirus in campioni di molluschi provenienti da tutte le zone costiere d'Italia e d'Europa. Questi, comprendenti cozze, vongole, ostriche (per un totale di 775 campioni), sono stati raccolti in un arco di tempo di 45 mesi (gennaio 2002-settembre 2005), e analizzati anche per la presenza di *E. coli*. La determinazione di *E. coli* è stata effettuata in accordo col metodo ufficiale (*Most Probable Number*), mentre i virus enterici, dotati di un genoma ad RNA positivo a singola elica, sono stati analizzati mediante RT-nested-PCR con *primer* specifici per ciascuno di essi; per i norovirus, caratterizzati da una elevata variabilità genomica, è stata sviluppata una RT-nested-PCR con *primer* degeneri, seguita da una caratterizzazione genotipica mediante sequenziamento. I risultati ottenuti per *E. coli* si sono mantenuti entro i limiti posti dalla normativa (<230/100g). Contrariamente, le analisi virologiche hanno evidenziato la presenza di campioni positivi anche quando questi rientravano nei parametri per *E. coli*. In particolare, il 4,77% è risultato positivo per HAV, il 4,38% per enterovirus, il 2,45% per norovirus, mentre lo 0,9% per rotavirus.

Da questi dati si può concludere che nelle acque delle zone di raccolta vi è un'elevata circolazione di virus a conferma del rischio rappresentato dai molluschi per la salute umana se consumati crudi o poco cotti.

P19 CONFRONTO DI METODI DI DIAGNOSI IN PCR PER ALCUNE INFEZIONI DEI SUINI E DEI BOVINI: RISULTATI DEL PROGETTO “INTERPCR”

Mario Luini (a), Serena Astarita (b), Paolo Bonilauri (a), Gian Mario De Mia (c), Silvia Faccini (a), Maura Ferrari (d), Monica Giammarioli (c), Valentina Gualdi (a), Simone Magnino (e), Ludovica Maietti (a), Carlo Rosignoli (a), Nadia Vicari (e), Riccardo Villa (d)
(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Emilia Romagna, Brescia;
(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Napoli;
(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Umbria e delle Marche, Perugia;
(d) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Emilia-Romagna, Centro Substrati Cellulari, Brescia;
(e) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Emilia Romagna, Pavia

Gli obiettivi del progetto INTERPCR (www.interpcr.org) sono portare al confronto i metodi applicati in 9 diversi laboratori della rete degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali per la diagnosi di alcune importanti infezioni dei bovini e dei suini (PRRSV, PCV II, *Lawsonia intracellularis*, *Leptospira spp.*, *Neospora caninum*, BRSV, BVDV, Virus della Malattia di Aujeszky (ADV), Virus Influenza A, *Mycoplasma hyopneumoniae*, Chlamydia/Chlamydophila, Brucella, Parvovirus suino) per arrivare a standardizzare e validare i metodi selezionati. Sono descritte le fasi del progetto e, come esempio, i risultati ottenuti con le PCR per ADV:

- circolazione fra i laboratori partecipanti dei metodi utilizzati per ciascuna diagnosi considerata;
- confronto della sensibilità, praticità e costo di ciascun metodo;
- sviluppo e standardizzazione dei metodi selezionati e valutazione della concordanza con i metodi interni per sensibilità (generalmente nested PCR) mediante calcolo dell’indice K di Cohen;
- validazione dei metodi attraverso prove interlaboratorio e calcolo dei parametri di accordanza e concordanza.

Vengono descritte in dettaglio le fasi della selezione dei metodi scelti per la fase 4 di validazione per ADV. Sono stati scelti e messi a confronto mediante calcolo dell’indice K un metodo di PCR diretta e un metodo nested in combinazione con 2 metodi di estrazione del DNA (Qiagen Dneasy tissue kit e estrazione con soluzione di lisi). Il confronto ha mostrato ottima concordanza ($K = 0,82$), fra il metodo nested e il metodo diretto, in combinazione con il kit Qiagen. La PCR diretta è stata sottoposta a validazione in un circuito interlaboratorio con 7 partecipanti, con buoni risultati di accordanza e concordanza.

Il metodo selezionato per ADV e analogamente quelli selezionati e validati per gli altri agenti target presi in esame (metodi di PCR diretta in combinazione con tecniche di estrazione dell’acido nucleico semplici e generalmente poco costose) possono essere raccomandati per l’uso nella diagnosi di routine in laboratori veterinari di prima istanza, come le sezioni diagnostiche degli Istituti Zooprofilattici o laboratori privati.

EVIDENZIAMENTO DEL VIRUS VISNA-MAEDI MEDIANTE *REAL-TIME* PCR IN TESSUTI DI OVINI NATURALMENTE E SPERIMENTALMENTE INFETTI

Caterina Maestrale, Silvia Dei Giudici, Adriana Galistu, Silvia Crudeli, Bernardetta Ibba, Paola Melis, Maria Pina Vargiu, Simona Macciocu, Giulia Demurtas, Giantonella Puggioni, Ciriaco Ligios

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

Il virus Visna-Maedi (VVM) è un retrovirus della sottofamiglia dei Lentivirus che nell'ovino provoca comunemente polmonite interstiziale linfoproliferativa e mastite linfoproliferativa, più raramente encefalite non purulenta demielinizzante e artrite. L'isolamento del virus mediante espanto primario dei tessuti dall'animale infetto, al momento della necropsopia, risulta particolarmente indaginoso, richiede tempi molto lunghi e la necessità che i campioni siano prelevati subito dopo la morte dell'animale. Nel presente lavoro è stato standardizzato un metodo diagnostico basato su tecnica di *real-time* PCR con chimica *TaqMan*, per evidenziare il DNA provirale e l'RNA del virus Visna-Maedi dal polmone e dalla ghiandola mammaria di ovini naturalmente o sperimentalmente infetti.

Allo scopo i *primers* e la sonda marcata con fluoroforo FAM sono stati disegnati per amplificare un tratto conservato di circa 100 paia di basi della sequenza del gene *gag* del VVM. La *real-time* PCR è stata eseguita sul DNA totale e sul cDNA retrotrascritto dall'RNA totale estratti dal polmone e della ghiandola mammaria. Poiché le curve di amplificazione apparivano non prima del 35° ciclo, è stato necessario aumentare il numero dei cicli di PCR sino a 50.

La quantificazione della carica virale degli organi è stata effettuata confrontando il campione di cDNA con una curva standard ottenuta con diluizioni seriali di cDNA di virus in coltura, con carica nota, e normalizzata su una curva standard del gene *housekeeping* 18S rRNA ovino.

Negli organi da noi esaminati, con questa tecnica l'evidenziazione del VVM si è dimostrata più efficiente amplificando l'RNA virale in quanto presente nei tessuti in quantità maggiore rispetto al DNA provirale. La carica virale maggiore è stata quantificata a livello del polmone. Con questa tecnica, in soggetti sieropositivi asintomatici provenienti da greggi infetti, si è evidenziato VVM nel tessuto ghiandolare mammario privo di lesioni istopatologiche.

P20 DIVERSITÀ GENETICA/ANTIGENICA DEI ROTAVIRUS: IDENTIFICAZIONE DI UN NUOVO P GENOTIPO, P[26], NEI SUINI

Vito Martella (a), Eleonora Lorusso (a), Serenella Arista (b), Michele Camero (a), Nicola Decaro (a), Antonio Lavazza (c), Giovanni Pezzetti (d), Canio Buonavoglia (a)
(a) Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Università degli Studi di Bari;
(b) Dipartimento di Igiene e Microbiologia, Università degli Studi di Palermo;
(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia-Emilia Romagna, Brescia;
(d) Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Umbria e Marche, Perugia

I rotavirus di gruppo A sono virus ad RNA bicatenario segmentato (11 segmenti). I rotavirus sono importanti enteropatogeni umani e animali e sono classificati in G e P tipi sulla base delle proteine capsidiche VP7 e VP4. Sono sinora stati identificati e/o stabiliti 15 G tipi e 25 P tipi. Lo stipite rotavirus suino PoRV è stato identificato durante uno studio epidemiologico in Italia, in un allevamento suino della Lombardia. La specificità VP4 (P tipo) non è risultata determinabile con i comuni sistemi di genotipizzazione RT-PCR e pertanto il segmento genomico 4, codificante per la proteina capsidica VP4, è stato sequenziato. La sequenza aminoacidica è stata comparata a quella di tutti i P genotipi VP4 noti. La proteina VP4 è risultata avere omologia compresa tra 59,7% (stipite bovino KK3, P8[11]) e 86,09% (PoRV A46, P[13]) a livello aminoacidico. Inoltre, la sequenza aminoacidica del frammento VP8*, che contiene la zona ipervariabile e che è correlato alla specificità antigenica, ha mostrato bassa omologia, compresa tra 37,52% (stipite bovino 993/83, P[17]) e 73,6% (PoRV MDR-13, P[13]), con quella dei rimanenti 25 P genotipi. L'analisi filogenetica ha mostrato che la VP4 dello stipite PoRV 134/04-15 si è evoluta da virus simili a stipiti suini P[13] e a stipiti di coniglio P[22]. L'analisi di sequenza dei geni VP7, VP6 e NSP4 dello stipite PoRV 134/04-15 ha inoltre mostrato che il virus possiede una elevata omologia (95,9%) nel gene VP7 verso virus G5 suini, un genogruppo I VP6, e un genogruppo NSP4 Wa-simile (genotipo B). Nell'insieme, i dati indicano che il ceppo PoRV 134/04-15 rappresenta il prototipo di un nuovo genotipo VP4, P[26], e forniscono un'ulteriore dimostrazione della vasta diversità genetica e antigenica dei rotavirus di gruppo A.

P21 RICERCA MEDIANTE PCR DI TORQUE TENO VIRUS (TTV) IN SUINI ALLEVATI IN ITALIA

Francesca Martelli (a), Andrea Caprioli (a), Ilaria Di Bartolo (b), Fabio Ostanello (a), Franco Maria Ruggeri (b)

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

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

I Torque Teno Virus (TTV), messi in evidenza per la prima volta nell'uomo nel 1997, appartengono ad un genere di ancora incerta classificazione definito Anellovirus. Gli Anellovirus sono virus di piccole dimensioni, privi di *envelope*, a simmetria icosaedrica, con DNA circolare a singolo filamento, caratterizzati da una spiccata variabilità genetica. La prevalenza nell'uomo è elevata (80-100%) e il virus è presente in soggetti clinicamente sani. TTV sono stati identificati anche in primati non umani, bovini, ovini, polli, cani, gatti e suini. I TTV umani e quelli suini dimostrano una identità nucleotidica di circa il 46%. La ricerca di TTV mediante PCR in sieri suini provenienti da diverse regioni geografiche ha evidenziato una prevalenza che va dal 33% al 100%. Questo lavoro ha come obiettivo la stima della prevalenza di TTV in suini allevati in Italia.

Sono stati esaminati 151 sieri provenienti da 8 aziende suinicole del nord Italia. I campioni sono stati prelevati da animali clinicamente sani di 3-4 mesi di età (lattoni) e di 8-9 mesi (grassi). Per ciascun allevamento sono state raccolte informazioni anamnestiche relative a: dimensioni, tipologia aziendale, tipo di *management*, caratteristiche ambientali, metodi di profilassi e misure di biosicurezza. Il genoma virale è stato ricercato utilizzando una PCR che utilizza *primers* in grado di amplificare 2 domini conservati di una regione non tradotta del genoma virale. I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati su gel di agarosio al 2%. Per confermare la loro identità, alcuni prodotti positivi sono stati sequenziati.

DNA di TTV è stato evidenziato in 37 dei 151 sieri suini testati (24,5%); in 7 delle 8 aziende esaminate era presente almeno un soggetto positivo. La prevalenza aziendale è risultata compresa tra lo 0% e il 53,3%; le prevalenze più elevate sono state riscontrate nelle aziende da ingrasso e in quelle con scarse condizioni igieniche. L'assenza di misure di profilassi igienico-sanitaria sembra essere associata ad un aumento della percentuale di soggetti positivi in allevamento. Inoltre, la prevalenza è risultata più elevata nei lattoni (33,3%) rispetto ai soggetti grassi (16,5%).

Il presente lavoro riporta la presenza di TTV in suini provenienti da allevamenti italiani. Non è noto se i TTV rappresentino un rischio sanitario per il suino o per altre specie. Nel presente studio, tutti gli animali esaminati erano clinicamente sani e ciò depone a favore dell'apatogenicità di questi virus. Sono tuttavia necessari ulteriori studi per valutare il reale potenziale patogeno dei TTV o la loro possibile co-partecipazione a forme patologiche ad eziologia multifattoriale. Inoltre, la possibile frequente esposizione umana a ceppi di TTV provenienti da suini, dovrebbe essere valutata come potenziale rischio zoonotico.

P22 ASPETTO ZONOSICO DEI ROTAVIRUS DI GRUPPO A: UN ROTAVIRUS DI CONIGLIO È PATOGENO NELL'UOMO

Jelle Matthijnsens (a), Vito Martella (b), Eleonora Lorusso (b), Mustsafizur Rahman (a),
Sofie De Vos (a), Canio Buonavoglia (b), Marc Van Ranst (a)

(a) *Laboratory of Clinical and Epidemiological Virology, Department of Microbiology and
Immunology, Rega Institute for Medical Research, University of Leuven;*

(b) *Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Università degli Studi di Bari*

I rotavirus di gruppo A sono importanti enteropatogeni umani e animali. Il genoma dei rotavirus è formato da 11 segmenti di RNA bicatenario (dsRNA). Lo stipite rotavirus umano B4106, identificato da un bambino con grave enterite, è un virus a pattern elettroforetico ultracorto, specificità antigenica P[14],G3, e genogruppo NSP4 B, rare caratteristiche nei virus umani. Mediante analisi di sequenza e filogenetica, i geni VP7, VP4 e NSP4 dello stipite B4104 sono risultati analoghi a quelli dei rotavirus di coniglio, suggerendo una possibile origine animale o la natura riassortante del virus. Per determinare l'esatta origine di questo virus inusuale, le sequenze dei geni codificanti per la proteina VP1, VP2, VP3, VP6, NSP1, NSP2, NSP3, e NSP5/6 sono state determinate e analizzate.

Inoltre, la sequenza di tutti gli 11 segmenti genomici di un virus P[14],G3 di coniglio, lo stipite 30/96, è stata determinata per poter effettuare una analisi comparativa a livello di tutto il genoma virale. Nell'insieme, l'omologia tra lo stipite umano B4106 e quello di coniglio 30/96 è risultata del 93,4% a livello nucleotidico e del 96,9% a livello aminoacidico. Tutti i geni dello stipite umano sono risultati strettamente correlati a virus di coniglio nell'analisi filogenetica. L'alterata mobilità elettroforetica dell'undicesimo segmento dell'RNA virale del virus B4106, risultante in un pattern ultracorto, è dovuta a parziale duplicazione e concatamerizzazione all'estremità 3'.

Nell'insieme, i dati suggeriscono in modo estremamente convincente che un rotavirus dotato di tutti gli 11 segmenti di dsRNA derivati da un virus di coniglio è stato capace di infettare e causare una grave forma di enterite, tale da rendere necessaria l'ospedalizzazione, in un paziente umano, un dato che sottolinea il potenziale ruolo zoonosico dei conigli per l'uomo. Lo studio di virus eterologhi o di stipiti riassortanti animali-uomo può fornire un utile strumento per comprendere come i rotavirus possano attraversare la barriera di specie e infettare l'uomo.

P23 ALLESTIMENTO DI DUE TEST ELISA VIROLOGICI CON ANTICORPI MONOCLONALI PER LA TIPIZZAZIONE DI VIRUS INFLUENZALI H5 E H7

Ana Moreno Martin, Davide Lelli, Emiliana Brocchi, Antonio Lavazza, Enrica Sozzi,
Andrea Luppi, Paolo Cordioli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia

Tramite l'utilizzo di anticorpi monoclonali (MAbs) specifici per le emoagglutinine H7 e H5 sono state allestite due *double antibody sandwich* ELISA (DAS-ELISA) per la tipizzazione dei virus influenzali dei sottotipi H7 e H5.

Per la produzioni dei MAbs specifici H7 e H5 sono stati immunizzati topi Balb/C rispettivamente con diversi ceppi H7 (A/Tk/It/2676/99 H7N1, A/Tk/It/214845/02 H7N3, A/Teal/It/10971/04 H7N7) e un ceppo H5 (A/Tk/En/28/73 H5N2). In seguito a quattro differenti fusioni, sono stati prodotti 42 ibridomi specifici per H7 e 20 per H5 e, successivamente, sono stati clonati 3 MAbs specifici H7 e 3 MAbs specifici H5. Sulla base della loro reattività in ELISA sono stati scelti due MAbs, uno specifico H7 denominato 7A4 e uno H5 (5D8), che sono stati utilizzati nella messa a punto di una DAS-ELISA H7 e una H5 rispettivamente.

La loro sensibilità analitica è stata valutata testando diluizioni scalari da 10^{-1} a 10^{-5} di 3 ceppi diversi del sottotipo H7 e 4 del sottotipo H5 a titolo noto ed è risultata essere equivalente a $10^4 \text{EID}_{50}/0,1\text{ml}$ per l'ELISA H7 e $10^{4,5} \text{EID}_{50}/0,1\text{ml}$ per l'ELISA H5.

Inoltre, la specificità di ogni MAb nei confronti del rispettivo fenotipo è stata determinata analizzando 22 differenti ceppi del sottotipo H7, 10 del sottotipo H5 e 4 appartenenti ad altri sottotipi, utilizzando le tecniche di inibizione dell'emoagglutinazione ed ELISA. Il MAb 7A4 ha inibito la attività emoagglutinante di tutti i ceppi H7 testati, ad eccezione di 2 dei 7 ceppi H7N1 LPAI analizzati, mentre in H7 DAS-ELISA, il medesimo MAb 7A4 ha evidenziato reattività nei confronti di tutti i ceppi H7 analizzati. Il MAb 5D8 ha riconosciuto tutti i ceppi H5 testati sia tramite HI che in DAS-ELISA. Nessuna reazione crociata nei confronti dei ceppi appartenenti agli altri sierotipi è stata evidenziata sia in HI che in ELISA.

P24 IDENTIFICAZIONE DI UN CEPPO ATIPICO DI ROTAVIRUS IN UNA BAMBINA CON ENTERITE

Maria Cristina Medici, Monica Martinelli, Laura Anna Abelli, Maria Cristina Arcangeletti, Flora De Conto, Federica Pinardi, Laura Zerbini, Giuseppe Dettori, Carlo Chezzi
Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Università degli Studi di Parma

I rotavirus (famiglia *Reoviridae*) sono virus enteropatogeni dell'uomo e degli animali, costituiti da un capsidone trilaminare e un genoma segmentato (11 segmenti di RNA bicatenario). I rotavirus sono classificati in 7 sierogruppi antigenici (da A a G). Lo stipite umano ADRV-N, identificato recentemente in Cina, è il prototipo di un nuovo gruppo antigenico. I rotavirus di gruppo A, B e C sono stati descritti sia nell'uomo che negli animali, mentre quelli di gruppo D, E, F e G sono stati trovati solo negli animali. La migrazione elettroforetica degli 11 segmenti del dsRNA virale consente di ottenere i profili elettroforetici (elettroferotipi) del genoma di rotavirus, che possono essere correlati al sierogruppo di appartenenza. I rotavirus di gruppo A dei mammiferi hanno elettroferotipo 4:2:3:2, mentre quelli dei gruppi B ed E hanno elettroferotipo 4:2:2:3 e quelli di gruppo C hanno elettroferotipo 4:3:2:2. I rotavirus di gruppo A sono la principale causa di diarrea infantile nel mondo (350.000-870.000 decessi all'anno). I rotavirus non di gruppo A sono stati osservati circolare con minor frequenza: quelli di gruppo B associati a vaste epidemie di enterite in adulti in Cina e quelli di gruppo C a focolai epidemici di enterite in adulti e bambini in Asia, Europa e Sud America. In questa nota viene descritto il ritrovamento di un inusuale stipite di rotavirus, identificato dalle feci di una bambina nel corso di un eccezionale periodo epidemico di enterite verificatosi a Parma tra gennaio e maggio 2005. Nel corso di tale periodo, 134 di 271 bambini (49,4%) (età mediana 22 mesi) ricoverati con enterite presso l'Ospedale Maggiore, sono risultati positivi per rotavirus, tutti tranne uno di gruppo A. Quest'ultimo, osservato nelle feci alla microscopia elettronica e non rivelato mediante agglutinazione al lattice per rotavirus di gruppo A, all'analisi elettroforetica dell'RNA virale ha evidenziato un profilo inusuale 4:3:2:2, tipico dei rotavirus di gruppo C. Questo gruppo di virus è stato descritto, oltre che nell'uomo, anche in diverse specie animali, quali suini, bovini, cani e furetti. Tuttavia non è chiaro se gli animali possano veicolare e trasmettere l'infezione all'uomo, o se, al contrario, esista una forte restrizione di specie. Rotavirus atipici sono stati già segnalati in Italia agli inizi degli anni '90. La presente segnalazione pertanto conferma la circolazione in Italia di rotavirus di gruppo C e suggerisce di includere la ricerca di tali enteropatogeni nei protocolli diagnostici. L'analisi di sequenza dei geni VP7, VP4 e VP6 permetterà di capire l'esatta origine di questo ceppo.

CREAZIONE E APPLICAZIONE DI UN DATABASE PER LA GENOTIPIZZAZIONE DEL PARAMYXOVIRUS AVIARE TIPO 1: RISULTATI SU CEPPI ISOLATI IN ITALIA NEL PERIODO 2004- 2005

Isabella Monne, Cristian De Battisti, Francesca Bettini, Ilaria Capua, Giovanni Cattoli
*Centro di Referenza Nazionale e OIE/FAO per la Malattia di Newcastle e l'Influenza
Aviare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

La malattia di Newcastle è un'infezione che colpisce i volatili causata dal Paramyxovirus aviare sierotipo 1 (APMV-1; genere *Avulavirus*, famiglia *Paramyxoviridae*). A seconda della patogenicità del ceppo virale, si distinguono virus lentogeni, mesogeni e velogeni in grado di determinare un quadro sintomatologico variabile. Questi virus rappresentano una grave minaccia per l'industria avicola poiché i ceppi virulenti, velogeni, possono determinare infezioni sistemiche con alte percentuali di mortalità nel pollame domestico. Nell'ultimo decennio sono state sviluppate numerose metodiche per identificare e tipizzare velocemente gli APMV-1. Presso il centro di referenza comunitario per la malattia di Newcastle (VLA- Weybridge) è stato recentemente adottato un sistema di caratterizzazione molecolare basato sull'identificazione di 6 genogruppi principali di APMV-1. Allo scopo di creare una maggiore uniformità tra le metodiche utilizzate a livello comunitario per la tipizzazione di APMV-1 e per poter disporre di dati confrontabili e utili ad indagini di tipo epidemiologico molecolare, il Centro Nazionale di Referenza (CNR) per la malattia di Newcastle ha adottato il metodo per la caratterizzazione genetica sopra menzionato. Si è quindi proceduto alla creazione di un database informatico contenente oltre 300 sequenze di ceppi di APMV-1 rappresentativi dei 6 genogruppi. Tale archivio viene ora utilizzato routinariamente per la tipizzazione genetica degli APMV-1 che giungono al CNR. A tal fine la sequenza nucleotidica di una porzione del gene F (297 pb) di ogni ceppo virale viene analizzata filogeneticamente, dapprima allo scopo di identificare il genogruppo d'appartenenza e, successivamente, per studi di tipo epidemiologico-molecolari. Tale metodo di tipizzazione è stato applicato per lo studio di 56 APMV-1 isolati in Italia tra il 2004 e il primo semestre del 2005. L'applicazione del sistema di caratterizzazione genetica ha permesso di rivelare la circolazione nel nostro paese di 3 genotipi distinti di APMV-1: il genotipo 1, formato in gran parte da ceppi lentogeni alcuni dei quali utilizzati a scopo vaccinale; il genotipo 4, sottogruppo b, rappresentato in prevalenza da ceppi appartenenti alla variante "piccione" PPMV-1 positivi alla tipizzazione con il mAb 617/161 e il genotipo 6, costituito quasi esclusivamente da patotipi lentogeni. L'indagine genetica ha inoltre permesso di identificare la presenza di un ceppo assegnato al genogruppo 5b, tipicamente costituito da virus velogeni, in un gruppo di volatili da voliera importati dal Pakistan.

Questa metodica si è dimostrata un mezzo veloce e affidabile per riconoscere il patotipo dei ceppi isolati e per formulare ipotesi epidemiologiche sull'origine degli APMV-1 circolanti nel nostro territorio.

MICROSCOPIA ELETTRONICA E TIPIZZAZIONE DI ROTAVIRUS DI POLLO E DI TACCHINO IDENTIFICATI IN CORSO DI FOCOLAI DI ENTERITE

Maria Vittoria Murgia (a), Monica Cerioli (a), Elena Catelli (b), Antonio Lavazza (a)
(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia;*
(b) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina
Veterinaria, Università degli Studi di Bologna*

L'uso della microscopia elettronica in colorazione negativa (metodo Airfuge), per il suo buon livello di sensibilità, è stata ampiamente usata per la diagnosi virologica delle enteriti aviarie. Durante il periodo 2003-2005 sono stati conferiti ed esaminati 418 campioni di feci e intestino di pollo e tacchino provenienti da focolai di enterite. I soggetti colpiti avevano un'età compresa tra 1 e 5 settimane e provenivano da diverse regioni italiane e dall'estero: 9 campioni di tacchino dalla Spagna e 2 campioni di pollo dalla Germania.

I campioni sono stati esaminati mediante microscopia elettronica in colorazione negativa (metodo Airfuge); la presenza di virus è stata dimostrata nel 53% dei campioni e, nell'ambito dei positivi, rotavirus era presente nel 58% dei casi. Tali dati hanno confermato l'importanza del rotavirus quale agente eziologico delle enteriti nel pollo e nel tacchino e pertanto si è proceduto alla tipizzazione dei ceppi di rotavirus identificati mediante elettroforesi dell'RNA virale su gel di poliacrilamide, al fine di determinarne elettroferogruppo ed elettroferotipo.

Tra tutti i campioni positivi per rotavirus sono stati selezionati, sulla base dell'origine geografica e rilievo epidemiologico, e sottoposti ad elettroferotipizzazione 46 campioni di pollo e 57 campioni di tacchino, di cui è stato possibile tipizzarne 36 di tacchino e 21 di pollo.

Per quanto concerne i campioni di pollo, 19 sono risultati appartenere al gruppo D, 1 al gruppo C e 1 mostrava un pattern atipico. All'interno dello stesso elettroferogruppo, gli elettroferotipi risultavano molto simili tra loro anche se non identici.

Per quanto concerne i campioni di tacchino, 19 sono risultati appartenere al gruppo A e 17 al gruppo D. Gli elettroferotipi di gruppo A sono stati identificati in campioni provenienti da diversi allevamenti che appartenevano a 4 aziende integrate, mentre quelli di gruppo D sono stati isolati in allevamenti che facevano parte di due aziende integrate. All'interno dello stesso elettroferogruppo è stato possibile identificare campioni aventi sia uno stesso elettroferotipo, sia elettroferotipi simili, ma non identici. Inoltre si è notato che ogni gruppo integrato presentava dei propri elettroferotipi, fatto questo che permette di arguire che dal punto di vista epidemiologico l'appartenenza ad un determinato gruppo integrato sia più rilevante della distribuzione geografica.

Questo lavoro è parte integrante di un progetto che mira alla caratterizzazione dei ceppi di rotavirus aviari e alla definizione di eventuali correlazioni con gli stipiti isolati da mammiferi.

P25 PREVALENZA E FATTORI DI RISCHIO DELLA BVD NEI BUFALI DELLA REGIONE CAMPANIA: INDAGINE PRELIMINARE

Donatella Nava (a), Onofrio Silvestre (a), Giuliano Cacciapuoti (b), Vincenzo Caligiuri (a),
Loredana Cozzolino (a), Francesca Solimene (a)

(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Napoli;*

(b) *Medico Veterinario Libero Professionista*

La diarrea virale bovina (BVD/MD), è una malattia infettiva e contagiosa sostenuta da un virus, BVDV, appartenente alla famiglia dei *Flaviviridae*, genere *Pestivirus*. Il BVD è un virus ad RNA monocatenario ed è distinto in due genotipi: BVDV 1 e BVDV 2. La BVD è una patologia ampiamente diffusa a livello mondiale, economicamente rilevante. Infatti, anche se spesso subclinica, può indurre disturbi respiratori, forme enteriche e soprattutto disturbi della sfera riproduttiva. La prevalenza dell'infezione a livello nazionale non è nota. Un'indagine condotta nel 2002-2004 tra i riproduttori della specie bovina, ha evidenziato, nella regione Campania, una prevalenza dell'80% a livello di allevamenti e del 31% di singoli capi. Per quanto concerne la specie bufalina, dati preliminari, derivati da uno studio condotto nei primi mesi del 2005 su un limitato numero di aziende della provincia di Caserta, hanno evidenziato una prevalenza interaziendale dell'85%, mentre quella intra aziendale è oscillata tra il 3% e il 19%. Al fine di valutare la situazione epidemiologica e identificare i principali fattori di rischio di tale patologia, è stato effettuato un campionamento statistico su 60 aziende bufaline nella provincia di Caserta; contestualmente al prelievo dei campioni, è stato somministrato agli allevatori un questionario per avere indicazioni circa le dimensioni dell'allevamento, introduzione di capi, il tipo di fecondazione, vaccinazioni effettuate ed eventuali problemi di ipofertilità. Tutti i campioni di sangue sono stati testati per la ricerca di anticorpi nei confronti del virus BVDV tramite un test ELISA competitivo.

I risultati ottenuti hanno consentito di valutare la prevalenza dell'infezione nelle varie categorie in correlazione con i principali fattori di rischio nell'area interessata. Tali dati potranno servire da base per l'elaborazione di eventuali strategie di controllo e/o eradicazione nei confronti di tale patologia.

P26 DIAGNOSI RAPIDA QUALITATIVA E QUANTITATIVA DI INFEZIONI DI *BLUE TONGUE VIRUS* (BTV) TRAMITE MOLECULAR BEACON

Germano Orrù (a), Maria Laura Ferrando (a), Valeria Braina (c), Giovanni Savini (d), Paola De Santis (b), Manuele Liciardi (c)

(a) *Dipartimento di Chirurgia e Scienze Odontostomatologiche, Università degli Studi di Cagliari;*

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

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

(d) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale Abruzzo e Molise, Teramo*

Il presente lavoro descrive una metodica molecolare che utilizza particolari sonde fluorescenti, i *Molecular beacons*, in grado di rilevare e quantizzare almeno 10 differenti sierotipi di BTV, compresi gli stipiti circolanti nel bacino del Mediterraneo (1, 2, 4, 9 e 16).

Il *Molecular beacon* è una sonda oligonucleotidica, comprendente una porzione ad anello (*loop*) e una porzione a forma di colletto (*stem*) che chiude le estremità 5' e 3' della molecola. La porzione ad anello è costituita da una sequenza nucleotidica costruita in modo tale da risultare complementare ad una sequenza bersaglio specifica per BTV. La porzione a colletto è costituita da due sequenze complementari appaiate in modo che le estremità 5' e 3' siano vicine. Al 5' viene legato un fluorocromo (*reporter*) e al 3' una sostanza schermante il fluorocromo (*quencher*). La molecola si apre solo se la complementarità tra la sequenza portata dalla porzione ad anello e la sequenza bersaglio è completa. La differenza anche di una sola base impedisce all'anello di aprirsi, determinando un elevato grado di specificità. Quando la molecola è chiusa il fluorocromo non emette nel visibile in quanto schermato dal *quencher*, mentre quando è aperta il fluorocromo non più schermato emette fortemente luce se eccitato da radiazioni luminose o ultraviolette. La reazione di ibridizzazione tra sonda e sequenza bersaglio viene evidenziata in tempo reale tramite *thermalcycler* dotati di lettore ottico o a occhio nudo. Sono stati sviluppati due differenti saggi molecolari per una rapida diagnosi di laboratorio di infezione da BTV:

- un metodo quantitativo in PCR *real-time*;
- una metodica in RT-PCR qualitativa.

Il frammento bersaglio utilizzato è stato ricavato nella regione conservata del gene che codifica la proteina non-strutturale NS3/3A. Al fine di valutare la potenzialità del metodo come *tool* diagnostico, sono stati saggiati 90 campioni clinici ovini (organi e sangue) da animali immuni e infetti, testati precedentemente con metodi diretti e indiretti. L'analisi qualitativa ha mostrato una sensibilità pari a 10^3 cDNA molecole/PCR e un range dinamico di quantificazione da 10^3 a 10^{11} ($R^2=0,98$). Entrambe le metodiche (quantitativa e qualitativa) hanno mostrato una specificità pari al 100%. La versatilità e velocità del metodo può rappresentare un aspetto importante nei casi di movimentazione degli animali, esempio bovini, per escludere in tempi accettabili la presenza del virus.

P27 RICERCA DIRETTA DELL'HEV-RNA MEDIANTE PCR REAL-TIME CON MOLECULAR BEACON

Germano Orrù (a), Manuele Liciardi (b), Ginevra Orrù (a), Vincenzo Piras (a),
Gesuina Pusceddu (a), Marco Regali (c), Giuseppina Masia (d), Rosa Cristina Coppola (d)
(a) *Dipartimento Sanità Pubblica, Policlinico Universitario, Cagliari;*
(b) *Dipartimento di Chirurgia e Scienze Odontostomatologiche, Università degli Studi di
Cagliari;*
(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Cagliari;*
(d) *Servizio Veterinario ASL 8, Cagliari*

Il virus dell'epatite E (HEV) è responsabile di una malattia itterica acuta e autolimitante trasmessa per via oro-fecale. Il primo ceppo animale di HEV è stato isolato in un maiale negli Stati Uniti nel 1997 e denominato *Swine HEV*; esiste ormai l'evidenza che sia responsabile di una zoonosi trasmissibile all'uomo sia per contatto diretto che per ingestione di carni crude o mal cotte di animali infetti (maiale, cervo). La diagnosi sierologica di HEV è solitamente affiancata da un test diretto più specifico e sensibile quale la RT-PCR, che consente di rilevare il genoma virale nel siero ma presenta la limitazione di essere puramente qualitativo e richiede tempi di esecuzione relativamente lunghi. Nel 2003 il nostro gruppo ha ideato una procedura in *real-time* PCR per la ricerca e la quantificazione dell'HEV-RNA in *single step* mediante *LightCycler* e *SYBR Green I*: tale metodica si è dimostrata molto sensibile, riuscendo a rilevare il virus sino a 10 cDNA/PCR in sole 4-5 ore in un range di quantificazione altamente lineare da 10 a 10⁶ cDNA/PCR e con un buon coefficiente di correlazione. Tuttavia l'utilizzo di un "DNA-Dye" aspecifico quale il *SYBR Green* può complicare la lettura dei risultati a causa della formazione di dimeri di *primers*. Per questo motivo abbiamo sviluppato la nostra tecnica sostituendo il *SYBR Green I* con una sonda oligonucleotidica circolare altamente specifica, il *Molecular Beacon* (MB); questa "modifica" permette la determinazione univoca del campione positivo senza dover ricorrere, nella fase post-amplificazione, all'analisi della curva di *melting* che a volte può risultare laboriosa.

Il protocollo di amplificazione prevede:

- 20 pmoli (1µM vol. finale) di *Molecular Beacon* disegnato su una regione dell'ORF2 costante in tutti gli HEV di origine umana-suina o aviaria depositati in banca dati;
- l'utilizzo di *LightCycler-RNA Amplification Kit Hybridization Probes* (Roche);
- 2 µl di RNA estratto da feci suine e da siero umano.

La presenza di HEV-RNA è stata riscontrata in 4 su 30 campioni di feci suine esaminati (13,3%) e in nessuno dei 10 campioni di siero umani anti-HEV positivi.

Il metodo descritto consente di rilevare e quantizzare l'HEV-RNA in tempi brevi e con elevati standard di specificità e sensibilità (10² molecole HEV cDNA/PCR.).

È ipotizzabile l'utilizzo della tecnologia MB in apparecchiature in grado di identificare l'RNA virale direttamente "sul campo", consentendo di isolare precocemente gli animali infetti e controllare in modo efficace la diffusione del virus.

P28 LOW-DOSE INTERFERON- α TREATMENT FOR FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS INFECTION

Benedetta Passeri (a), Elena Perdetti (b), Massimo Amadori (b), Patrizia Isola (c) Patricia Di Pede (d), Anna Rita Telera (d), Rosanna Vescovini (d), Fausto Quintavalle (a), Mauro Pistello (d)

(a)Dipartimenti di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma;

(b)Dipartimento della Salute Animale e Immunoprofilassi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Brescia;

(c)Dipartimento di Patologia Sperimentale, Università degli Studi di Pisa;

(d)Dipartimento di Medicina Interna e Scienze Biomediche, Università degli Studi di Parma

Feline Immunodeficiency Virus sustains an AIDS-like syndrome in cats, which is considered a relevant model for human AIDS. Under precise enrolment requirements, 30 naturally-infected cats showing overt disease were included in a trial of low-dose, oral human interferon- α treatment. Twenty-four of them received 10 IU/Kg of human interferon- α and 6 placebo only on a daily basis under veterinary supervision. The low dose human interferon- α treatment significantly prolonged the survival of virus infected cats ($p < 0,01$) and brought to a rapid improvement of disease conditions in the infected hosts. Amelioration of clinical conditions was neither correlated with plasma viremia, nor with proviral load in leukocytes. A good survival of CD4+ T cells and a slow increase of CD8+ T cells was also observed in human interferon- α treated cats.

Interestingly, the improvement of the total leukocyte counts showed a much stronger correlation with the recovery from serious opportunistic infections. As shown in other models of low-dose interferon- α treatment, there was a rapid regression of overt immunopathological conditions in virus-infected cats. This hints at a major role of interferon- α in the control circuits of inflammatory cytokines, which was probably the very foundation of the improved clinical score and survival despite the unabated persistence of virus and virus-infected cells.

P29 PRODUZIONE, CARATTERIZZAZIONE E IMPIEGO IN UN TEST ELISA DELLA GLICOPROTEINA GP51 DI BOVINE LEUKEMIA VIRUS (BLV), ESPRESSA TRAMITE BACULOVIRUS RICOMBINANTE

Giulia Pezzoni, Aldo Borrè, Massimo Boldini, Paolo Cordioli, Santina Grazioli, Emiliana Brocchi

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

I programmi di eradicazione della Leucosi Ezootica Bovina sono basati sulla ricerca di anticorpi verso la glicoproteina gp51 del retrovirus (BLV) responsabile della malattia, attraverso test idonei per l'applicazione su siero, pool di sieri, latte di massa. La sorgente di antigene per i test sierologici è generalmente rappresentata da cellule di rene fetale di agnello persistentemente infette, dalla cui coltura si ricava e concentra la glicoproteina virale gp51. Obiettivo di questo lavoro è stato la produzione un antigene ricombinante immunologicamente simile alla gp51 nativa, il cui utilizzo in test diagnostici comporti vantaggi in termini di biosicurezza e di standardizzazione rispetto all'antigene nativo.

La componente glicoproteica di gp51 è fondamentale per la preservazione delle caratteristiche antigeniche, pertanto è stato scelto il sistema di espressione baculovirus, in grado di attuare modificazioni post-traduzionali il più simili possibile a quelle che avvengono in organismi superiori. I geni virali codificanti per la gp51 e per il peptide leader, deputato alla veicolazione delle proteine sulla membrana citoplasmatica, sono stati inseriti in un vettore specifico per baculovirus, unitamente ad un oligonucleotide legato in posizione 3' che codifica per una coda di istidine. La proteina espressa (r-gp51) è stata identificata sia nel terreno di crescita delle colture cellulari infettate con baculovirus ricombinante, sia nei lisati cellulari. Il profilo di reattività della glicoproteina virale e di quella ricombinante sono risultati sovrapponibili. In particolare, entrambe sono riconosciute in *Western blotting* da due anticorpi monoclonali (5C9 e 2F8), reattivi verso due diversi epitopi lineari, ma non dall'anticorpo 4C5, diretto verso un epitopo conformazionale. In prove *ELISA-trapping*, l'anticorpo monoclonale 4C5 cattura la r-gp51 con la migliore efficienza, favorendo l'esposizione degli epitopi più immunogeni e rendendoli accessibili agli anticorpi presenti in sieri positivi; la reattività dei sieri è maggiore verso r-gp51 secreta, probabilmente perché in questa componente è presente la glicoproteina nella forma matura, mentre a livello cellulare possono essere presenti forme proteiche in via di maturazione.

La r-gp51 è stata paragonata all'antigene virale prodotto da cellule persistentemente infette nel test sierologico *ELISA-trapping*, utilizzato correntemente per la dimostrazione di anticorpi anti-BLV. Il test comporta la cattura dell'antigene virale nativo o della r-gp51 da parte dell'anticorpo monoclonale 4C5, seguita dall'incubazione dei campioni di siero o latte in esame e infine da anticorpi monoclonali anti-IgG bovine coniugati con perossidasi.

Sono stati analizzati in parallelo 775 campioni di latte di massa e 300 sieri bovini che includevano campioni positivi (più di 100) e negativi: le performance diagnostiche dei due antigeni sono risultate sovrapponibili e la concordanza dei risultati è stata del 100%.

VALUTAZIONE DEGLI ANTICORPI VERSO I CORONAVIRUS FELINI E CONFRONTO DI TECNICHE SEROLOGICHE

Annamaria Pratelli

Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Valenzano, Bari

I coronavirus felini (FCoVs) sono distinti in due sierotipi, I e II, in base alle correlazioni sierologiche con il coronavirus del cane (CCoV). Il sierotipo I è il virus originale ma cresce con difficoltà nelle colture cellulari. FCoV II invece viene coltivato *in vitro* anche se è meno diffuso rispetto al sierotipo I. FCoVs sono responsabili di infezioni subcliniche nei gatti e le percentuali più elevate di infezione si registrano nei gattili e negli allevamenti. Sono tuttavia virus ubiquitari e il monitoraggio sierologico permette di ottenere informazioni attendibili sulla loro diffusione nell'ambiente. In Italia i dati sulla presenza di FCoVs sono scarsi. Sono stati quindi raccolti 100 sieri di gatti provenienti da gattili e ambienti domestici della Puglia e è stata valutata la presenza di anticorpi verso FCoVs I e II mediante il test VN messo poi a confronto con i test ELISA e IFI. La ricerca di anticorpi verso FCoV I è stata valutata solo mediante IFI, dal momento che FCoV I replica con difficoltà *in vitro*, che ha svelato una sieropositività pari al 72%. Ottanta sieri risultati positivi verso FCoV II mediante VN, sono stati confermati in ELISA. L'ELISA ha inoltre svelato ulteriori 2 sieri positivi rispetto alla VN e ulteriori 4 sieri positivi rispetto alla IFI. Tutti i sieri positivi in ELISA sono stati confermati con il *Western blotting*. In definitiva il test ELISA si è rivelato sostanzialmente più sensibile rispetto a VN e IFI, svelando una sieropositività verso FCoV II pari a 82%. Quando VN è stata considerata come *test gold standard*, l'ELISA ha dimostrato una sensibilità pari al 100% e una specificità pari al 90%, con un agreement del 98%. Quando l'ELISA è stata confrontata con il test IFI considerato come *gold standard*, la sensibilità è stata ancora 100%, la specificità 81%, con un agreement del 96%.

L'elevata percentuale di positività verso FCoVs osservata, conferma che l'infezione da FCoV è ampiamente diffusa nei gatti della Puglia, anche se la diffusione percentuale dei due sierotipi è differente da quella stimata in altre aree geografiche dove prevale il sierotipo I. Inoltre nel presente studio il test ELISA ha dimostrato una buona sensibilità e specificità per la ricerca di anticorpi verso FCoV, così come è stato osservato nel passato per la ricerca di anticorpi verso CCoV, e può essere considerata come test valido per lo screening sierologico dei gatti verso FCoVs.

LOCALIZZAZIONE DI MAEDI VISNA VIRUS (MVV) NEL MIDOLLO OSSEO: STUDIO PRELIMINARE IN AGNELLI NATI DA PECORE INFETTATE SPERIMENTALMENTE

Silvia Preziuso (a), Giacomo Tenzoni (a), Giovanni Braca (b), Vincenzo Cuteri (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Camerino;*

(b) *Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Pisa*

In corso di infezione da Maedi Visna Virus (MVV) il midollo osseo sembra svolgere un ruolo importante nel mantenimento dell'infezione, pur non essendo interessato da alterazioni patologiche. Allo scopo di valutare la localizzazione di MVV nel midollo osseo durante le prime fasi dell'infezione colostrale, 8 agnelli nati da pecore infettate sperimentalmente con virus noto sono stati alimentati con il colostro materno e quindi sottoposti ad eutanasia a 1, 2, 3, 4, 7, 10, 30 giorni e ad 1 anno dalla nascita. Campioni di midollo osseo rosso prelevati dal femore, fissati in formalina e inclusi in paraffina sono stati esaminati mediante immunistochemica (MoAb anti-p28) e PCR-ibridazione *in situ* (gene *pol*) per l'evidenziazione di MVV. Su sezioni seriali è stato impiegato l'anticorpo monoclonale VPM32 per marcare le cellule monocito-macrofagiche.

L'immunistochemica per MVV è risultata negativa nei campioni prelevati dagli agnelli di 1, 2, 3 e 4 giorni d'età, debolmente positivo negli agnelli di 7 e 10 giorni e fortemente positivo negli agnelli di 30 giorni e 1 anno d'età. Indagini preliminari di PCR-ibridazione *in situ* effettuate sul campione prelevato dall'agnello di 30 giorni hanno evidenziato il DNA provirale. Il midollo osseo rappresenta pertanto un sito di replicazione di MVV, come dimostrato dall'evidenziazione in questa sede del DNA provirale e dell'antigene p28. Tale localizzazione appare piuttosto precoce, tra il quarto e il settimo giorno dall'assunzione del colostro infetto, ed è duratura in quanto positività immunistochemiche sono state osservate nell'animale di un anno d'età e sono state precedentemente descritte in pecore infettate da almeno tre anni. L'antigene virale è stato identificato in cellule della linea monocito-macrofagica (VPM32 positive), ma non è stato possibile, al momento, definirne il grado di differenziazione. La replicazione del virus a livello midollare potrebbe coinvolgere sia le cellule progenitrici monocito-macrofagiche che i macrofagi maturi residenti. MVV potrebbe raggiungere il midollo osseo mediante monociti infetti di origine ematica che, in questa sede, darebbero origine ai macrofagi residenti. Virus prodotti durante la replicazione nei macrofagi potrebbero infettare cellule contigue tra cui le cellule staminali che, dividendosi, potrebbero trasmettere il provirus alle cellule "figlie", rimanendo probabilmente infette e costituendo così dei veri e propri serbatoi.

In conclusione, il midollo osseo rappresenterebbe un bersaglio precoce di MVV e un serbatoio permanente del virus; saranno necessari ulteriori studi volti a caratterizzare con sicurezza i tipi cellulari coinvolti e a rendere pertanto più comprensibili i meccanismi patogenetici dell'infezione.

P30 PESTE SUINA AFRICANA IN SARDEGNA: REALIZZAZIONE DI UN SISTEMA INFORMATIVO A SUPPORTO DELLA SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA

Sandro Rolesu (a), Daniela Aloï (a), Cristiana Patta (a), Gïantonella Puggioni (a), Annalisa Oggiano (a), Salvatore Montinaro (b), Raffaele Piroddi (b), Elena Fogarizzu (b), Francesco Feliziani (c)

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

(b) *Regione Autonoma della Sardegna, Assessorato della Sanità e dell'Assistenza Sociale, Servizio della Prevenzione, Cagliari;*

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

La peste suina africana, in Sardegna dopo un periodo di relativa calma epidemica durato all'incirca cinque anni, risultato anche delle azioni previste dal Piano di Eradicazione, ha subito durante l'anno 2004 la piú intensa ed estesa ondata epidemica degli ultimi dieci anni. La realizzazione *ad hoc* di un adeguato Sistema Informativo ha consentito il monitoraggio costante della situazione e la realizzazione di una serie di indicatori utili al governo-controllo dell'emergenza. L'Unità di Crisi Regionale ha avuto modo di avere a disposizione dati aggiornati in tempo reale e di realizzare quindi in modo compiuto il proprio ruolo a supporto degli enti preposti (Regione-Ministero). Il sistema è stato realizzato con strumenti informatici di facile utilizzo e integrato da un Sistema GIS (Mapinfo ®) al fine di realizzare una reportistica corredata da adeguate mappe tematiche. Il Sistema Informativo utilizza come fonte di dati principale gli adempimenti previsti dalle norme vigenti e i relativi diagrammi di flusso consolidati, che vengono validati e trattati all'interno del sistema al fine di generare informazioni immediatamente fruibili. La realizzazione del Sistema Informativo all'interno dell'Osservatorio Epidemiologico Veterinario Regionale ha reso possibile l'incrocio di dati provenienti da fonti diverse consentendo una adeguata analisi di congruità e di allineamento degli stessi.

PESTE SUINA AFRICANA IN SARDEGNA: ANALISI DELL'EPIDEMIA 2004

Sandro Rolesu (a), Daniela Aloï (a), Cristiana Patta (a), Giantonella Puggioni (a), Annalisa Oggiano (a), Salvatore Montinaro (b), Raffaele Piroddi (b), Elena Fogarizzu (b), Domenico Rutili (c)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari;

(b) Regione Autonoma della Sardegna, Assessorato della Sanità e dell'Assistenza Sociale, Servizio della Prevenzione, Cagliari;

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

La peste suina africana, dal 1997 ha rappresentato in Sardegna un fenomeno che ha progressivamente assunto i caratteri di una endemia localizzata in zone ben individuate, limitate ad alcuni comuni della provincia di Nuoro e definite ad alto rischio. Nel corso del 2004 si è osservata una epidemia di entità paragonabile a quella che è stata registrata nel corso dei primi anni in cui è comparsa nell'isola e ha interessato anche territori mai coinvolti prima da focolai di malattia. La presente analisi tenta di descrivere in modo preciso l'epidemia utilizzando a tal fine metodiche di epidemiologia descrittiva. Viene analizzato in particolare l'andamento nel tempo, la distribuzione dei focolai nello spazio al fine di individuare eventuali *cluster* spazio-temporali, la tipologia degli allevamenti sede di focolaio allo scopo di evidenziare eventuali fattori di rischio correlati. Viene analizzato inoltre un focolaio nel selvatico e la individuazione della zona Infetta conseguentemente realizzata. Vengono infine prese in considerazione una serie di variabili che possono aver influenzato l'andamento epidemiologico e la numerosità dei focolai anche in funzione della applicazione per la prima volta delle norme contenute all'interno del Decreto Legislativo 20 febbraio 2004, n. 54, e quindi del manuale di diagnostica. Il manuale prevede una serie di linee guida da applicare nel corso delle varie fasi di intervento in caso di focolaio e la realizzazione di controlli di laboratorio, che hanno determinato un innalzamento del livello di sensibilità complessiva delle procedure di analisi epidemiologica.

INFEZIONE DA WEST NILE VIRUS (WNV) NEGLI ANIMALI: INDAGINI ANATOMO- ISTOPATOLOGICHE E IMMUNOISTOCHEMICHE

Claudia Salvadori (a), Daniela Carli (a), Carlo Cantile (a), Giovanni Di Guardo (b), Mario Aruspici (a)

(a) *Dipartimento di Patologia Animale Profilassi e Igiene degli Alimenti, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Pisa;*

(b) *Dipartimento di Scienze Biomediche Comparative, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo*

Il virus *West Nile* (WNV), un arbovirus appartenente alla famiglia *Flaviviridae*, è responsabile nell'uomo e negli animali di una malattia febbrile, talvolta con sintomatologia neurologica ad esito fatale. Le zanzare ne rappresentano i vettori biologici, mentre gli uccelli si comportano da serbatoi e amplificatori di infezione, presentando una viremia consistente e di lunga durata. Infezioni da WNV sono state descritte in oltre 250 specie animali domestiche, selvatiche e da zoo, interessando uccelli, cavalli, cani, gatti, renne, foche, scoiattoli, lupi, procioni, alpaca e alligatori. Nell'estate del 1998, WNV si è reso responsabile di una malattia neurologica ad esito anche letale in almeno 14 cavalli di una limitata area della Toscana. I cavalli mostravano sintomi neurologici quali ipermetria, deficit propriocettivi, atassia asimmetrica degli arti posteriori e debolezza muscolare. Istologicamente le lesioni erano caratterizzate da una polioencefalomielite non suppurativa con manicotti perivascolari formati prevalentemente da linfociti T e macrofagi, associati a focolai multipli di microgliosi nodulare e raramente a degenerazione neuronale e neuronofagia. Le lesioni erano prevalentemente localizzate a livello delle corna ventrali e laterali del midollo spinale, in particolare nei segmenti toraco-lombari. Le segnalazioni delle forme neurologiche dell'infezione sono numerose nel cavallo e nell'uomo, considerati gli ospiti a fondo cieco del virus, sebbene siano descritte anche in altre specie animali quali ad esempio il cane e la foca. Mentre nella foca la morfologia e la topografia delle lesioni sono simili a quelle riportate nei cavalli, nel cane, oltre alle lesioni a carico del sistema nervoso centrale, caratterizzate da meningoencefalite non suppurativa, sono descritte, al pari di altre specie, anche miocardite e nefrite. La colonizzazione di tessuti extraneurali da parte di WNV è tipica degli uccelli, ma può avvenire anche nell'uomo, negli scoiattoli e negli alligatori. L'infezione da WNV, seppur emergente e generalmente presente alle nostre latitudini durante i mesi estivi, dovrebbe figurare nella diagnostica differenziale in animali di ogni età, sia domestici che selvatici, con sintomatologia neurologica in atto. L'esame anatomo-patologico dei soggetti colpiti e, in particolare, la caratterizzazione delle peculiari lesioni neuropatologiche supportano il sospetto di infezione da WNV, che può essere confermata mediante indagini immunoistochimiche e biomolecolari. L'esame anatomo-istopatologico costituisce pertanto un validissimo strumento ai fini dell'individuazione di animali infetti, apportando utili conoscenze allo studio della biologia e della patogenesi della infezione, il cui riconoscimento in specie diverse riveste un notevole interesse anche in sanità pubblica, considerato il documentato potenziale zoonosico del WNV.

P31 PRESENZA DI SEQUENZE GENICHE DI PAPILLOMAVIRUS ALL'INTERNO DI NEOPLASIE SPONTANEE MULTIPLE IN DUE CAPRE CONSANGUINEE

Paola Simeone (a), Leonardo Della Salda (b), Giovanni Di Guardo (b), Lucio Petrizzi (c), Aldo Venuti (a)

(a) *Istituto Oncologico Regina Elena, Roma;*

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

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

La presenza di sequenze geniche papillomavirali è stata finora descritta raramente nella capra, in particolare nel contesto di lesioni tumorali. Il presente lavoro descrive i risultati delle indagini anatomo-istopatologiche, immunoistochimiche, ultrastrutturali e biomolecolari su una serie di neoplasie multiple, di varia natura, insorte in due capre adulte consanguinee in sede oculare, perioculare, palpebrale e perineale. Più in particolare, le lesioni in oggetto sono state classificate, a seconda dei casi, come fibropapillomi cutanei multipli, carcinomi squamosi oculari e cutanei, un melanoma maligno della cute periorbitale e un fibrosarcoma oculare. Poiché i quadri morfologici osservati in alcune delle suddette lesioni apparivano compatibili con una un'etiologia papillomavirale, a dispetto della negatività degli esami sia immunoistochimici per l'antigene L1 di papillomavirus, sia ultramicroscopici per la presenza di particelle virali, si sono effettuate alcune indagini biomolecolari. Non avendo a disposizione in banca-dati sequenze virali isolate dalla capra, né sequenze clonate di un papillomavirus caprino, sono state adottate diverse strategie per individuare sequenze simil-papillomavirali nei campioni esaminati. In primo luogo si è tentato di amplificare alcune sequenze utilizzando diversi primers che fossero in grado di amplificare più tipi di papillomavirus (PV). Il sequenziamento diretto degli amplificati così ottenuti ha rivelato la presenza di sequenze di DNA con scarse omologie rispetto ai papillomavirus di altre specie. In una seconda fase si è utilizzata la tecnica del *Rolling Circle Amplification* (RCA), con la quale abbiamo evidenziato la presenza di sequenze di DNA circolare. Per valutare più correttamente i dati di RCA e PCR, le sequenze amplificate sono state marcate con biotina e utilizzate in ibridazione *in situ* su campioni di capre malate, che a differenza dei controlli sani mostravano un'intensa colorazione nucleare. Recentemente è stato riportato l'isolamento e il sequenziamento, da cute normale di capra, di un papillomavirus che presenta una scarsa omologia di sequenza rispetto a tutti gli altri PV finora sequenziati, ad eccezione di BPV-3 e BPV-6 (comunque inferiore al 60%). L'allineamento delle sequenze isolate dai nostri campioni ha mostrato un'omologia con BPV-3 e BPV-6 analoga a quella sopra riportata. Quest'ultimo dato ci consente di supporre non soltanto l'esistenza di uno o più PV nella specie caprina, ma anche un'azione condizionante l'insorgenza di diversi tumori nello stesso individuo, analogamente a quanto già descritto in medicina umana in pazienti consanguinei. Ulteriori ricerche sono in corso al fine di ottenere la sequenza completa dell'isolato virale in questione, onde permetterne il confronto con quello isolato da capre sane.

P32 CIRCOVIRUS NEL TACCHINO: INDAGINI PRELIMINARI

Omar Tarhuni (a), Elena Fringuelli (a), Patrizia Casagrande Proietti (a), Giampaolo Asdrubali (a), Armando Damiani (c), Monica Cerioli (b), Emilia del Rossi (a) Maria Pia Franciosini (a)

(a) *Dipartimento Scienze Biopatologiche e Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, Università degli Studi di Perugia;*

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

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

Le attuali metodiche di allevamento hanno portato in questi ultimi tempi, anche nel tacchino, al verificarsi di situazioni immunodepressive, spesso non inquadrabili da un punto di vista eziologico, che hanno favorito la comparsa di patologie condizionate e multifattoriali.

Nel tacchino gli agenti di natura infettiva a sicura azione immunosoppressiva non sono poi molti se si fa eccezione per l'adenovirus, responsabile della enterite emorragica e per i retrovirus, causa della reticolendoteliosi e della malattia linfoproliferativa che, peraltro, producono lesioni assai peculiari. Alcuni virus ad azione immunodepressiva nel pollo, quali il virus della malattia di Marek, isolati anche nel tacchino, si sono rivelati incostanti nel produrre lesioni a carico degli organi linfatici primari se inoculati in questa specie. In questi ultimi tempi, la frequente segnalazione di circovirus, agenti infettivi notoriamente immunolesivi in numerose specie avicole ha portato a ipotizzare la loro presenza anche nei tacchini. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di indagare la possibile esistenza di circovirus nel tacchino partendo dal riscontro, negli organi linfatici primari, di lesioni macro e microscopiche simili a quelle riscontrate nei piccioni. Le indagini sono state condotte in soggetti "scarti" di circa 2 mesi di età che presentavano all'esame clinico ritardo dell'accrescimento. I tacchini, dopo prelievo di sangue, sono stati sottoposti ad esami necroscopici e campioni di borsa di Fabrizio e timo sono stati raccolti per indagini istopatologiche, e ultrastrutturali. Gli stessi campioni sono stati sottoposti a test di PCR, *Nested PCR* e *Southern Blotting* insieme al contenuto intestinale.

Il test di PCR è stato effettuato, utilizzando un set di *primer* disegnato in base alla comparazione con le sequenze genomiche complete di altri circovirus aviari (CoCv, BFDV, DuCV e il CaCV). Il nuovo set di *primer*, capace di amplificare un frammento di 271bp, è stato testato sul DNA estratto dal sangue, dal contenuto intestinale, dai campioni provenienti dal timo e dalla borsa di Fabrizio. Il sequenziamento dei prodotti di PCR tramite i programmi *Blast* e *Clustalw* ha messo in luce che erano specifici del circovirus con una elevata omologia con gli altri circovirus presenti in NCBI DNA banca dati.

Sebbene i risultati ottenuti siano incoraggianti sono necessari ulteriori studi indirizzati alla completa caratterizzazione del genoma al fine di poter eseguire altre indagini, quali, ad esempio, l'ibridazione in situ, idonee a confermare la presenza di circovirus nel tacchino.

P33 IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI ASTROVIRUS IN TACCHINI E FARAONE IN ITALIA

Anna Toffan (a), Christian De Battisti (a), Antonio Lavazza (b), Monica Cerioli (b), Annalisa Salviato (a), Calogero Terregino (a), Giovanni Cattoli (a)

(a) *Centro di referenza OIE, FAO e Nazionale per l'Influenza Aviaria e la malattia di Newcastle, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova;*

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

Le infezioni da astrovirus possono interessare una varietà di specie comprendenti i mammiferi (incluso l'uomo) e gli uccelli, causando nei soggetti giovani sindromi enteriche di lieve e media gravità. Nelle specie aviarie gli astrovirus sono stati descritti nel pollo, nell'anatra, nel tacchino e, recentemente, anche nella faraona. In Italia sono stati segnalati numerosi episodi di enterite riconducibili ad infezione da astrovirus, in particolare in allevamenti intensivi di tacchini e faraone. Alla luce di questo dato lo scopo del presente lavoro è stato individuare la presenza di astrovirus in tacchini e faraone con sindrome enterica. I ceppi identificati mediante osservazione al microscopio elettronico sono stati caratterizzati mediante sequenziamento e analisi filogenetica.

Sono stati monitorati 42 allevamenti commerciali di tacchini e 13 di faraone nei quali era stata segnalata sintomatologia enterica, per un totale di 57 campioni (42 di tacchino e 19 di faraona) costituiti da contenuto intestinale. Tutti i campioni sono stati analizzati mediante microscopia elettronica. È stata quindi effettuata una caratterizzazione di tipo molecolare sui campioni risultati positivi all'osservazione al microscopio elettronico. A tal fine è stato estratto dal contenuto intestinale l'RNA e amplificato mediante RT-PCR utilizzando una coppia di *primer* aventi come bersaglio la ORF 1b codificante per la polimerasi degli astrovirus del tacchino (Turkey AstroVirus-TastV). I prodotti di amplificazione sono stati successivamente sequenziati. L'analisi filogenetica è stata eseguita su un tratto dell'ORF 1b di lunghezza pari a 577 nucleotidi.

In tutti i campioni esaminati è stata identificata la presenza di particelle virali con morfologia riferibile ad astrovirus mediante osservazione al microscopio elettronico.

L'analisi delle sequenze ha confermato l'identificazione degli amplificati ottenuti mediante RT-PCR come astrovirus. Gli astrovirus identificati nel tacchino sono stati suddivisi in due distinte linee genetiche entrambe correlate a TastV di tipo 2. All'analisi filogenetica, le sequenze dei virus identificati nel contenuto intestinale delle faraone si sono distribuite in un gruppo distinto rispetto agli astrovirus del tacchino, pur mantenendosi correlati al gruppo TAstV2.

In questo lavoro è stata accertata per la prima volta la circolazione in Europa di astrovirus correlati al gruppo TAstV2.

L'analisi filogenetica eseguita su ORF 1b ha inoltre dimostrato l'esistenza di un certo grado di eterogeneità tra gli astrovirus, identificando due distinte linee genetiche per i virus presenti nei tacchini e una terza linea genetica nelle faraone.

Ulteriori studi sono in corso per una completa caratterizzazione degli astrovirus circolanti nella popolazione di faraone in Italia.

CIRCOLAZIONE AUTONOMA DI VIRUS BT SIEROTIPO 2 DI ORIGINE VACCINALE NELLA PROVINCIA DI FORLÌ-CESENA

Giovanni Vecchi (a), Rodingo Usberti (b), Marco Tamba (a), Michele Dottori (a), Paolo Bonilauri (a), Paola Massi (a), Paolo Cordioli (a), Concita Fallacara (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna, Brescia;

(b) Azienda USL, Servizio Veterinario, Forlì

La *Blue Tongue* (BT) è presente in Italia dal 2000. Attualmente sono presenti in Italia quattro diversi sierotipi: 2, 4, 9, 16. Dal 2001 la BT è oggetto di un piano di eradicazione basato sulla vaccinazione obbligatoria con vaccino vivo attenuato di: bovini, ovini e caprini nelle aree in cui circola il virus di campo. In tutto il territorio nazionale è inoltre attivo un piano di sorveglianza entomologica e sierologica per definire le aree libere da infezione e quelle nelle quali le movimentazioni animali sono limitate. Gli animali vaccinati sono comunque liberi di muoversi trascorsi 30 giorni dalla vaccinazione.

Nella primavera del 2004 sono stati individuati 15 allevamenti con 42 bovini sieropositivi per il sierotipo 2 della BT (BTV2) in un'area dell'Appennino forlivese, posta a oltre 100 km dalla zona di vaccinazione. Attraverso la sorveglianza entomologica e sierologica integrativa nella stessa area è stato possibile dimostrare la circolazione virale di un BTV2 di origine vaccinale durante l'estate del 2004: il virus è stato isolato da bovini e individuato tramite PCR nel vettore *C. obsoletus*.

Un monitoraggio svolto nell'inverno 2004-05 nell'area interessata ha mostrato che durante l'estate 2004 la prevalenza di infezione negli allevamenti è passata dal 15% al 71% e nei capi dal 2% al 17%.

Circolazione virale del ceppo di BTV2 vaccinale è stata rilevata anche durante l'estate 2005.

Si ritiene che nell'Appennino forlivese si sia creata una zona di endemia da BTV2 vaccinale e che alla luce di questa scoperta debbano essere rivisti gli obiettivi del piano di eradicazione e progettato un programma di sorveglianza che tenga conto del fatto che il BTV vaccinale può diffondersi autonomamente.

P34 SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF BORDER DISEASE VIRUS INFECTION ASSOCIATED WITH OVINE AND CAPRINE ABORTION IN THE COMUNIDAD VALENCIANA (SPAIN)

Santiago Vega (a), Carolina Galiana (a), Salceda Fernández-Barredo (a), Angel García (a), Maria Teresa Gómez (a), Maria Luz Roche (b), Ignacio Ferre (c), Antonio Hernandis (d), Maria Teresa Pérez-Gracia (a)

(a) *Departamento de Atención Sanitaria, Salud Pública y Sanidad Animal, Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad Cardenal Herrera-CEU, Moncada, Valencia;*

(b) *Laboratorio de Sanidad Animal, Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación, Generalitat Valenciana, Valencia;*

(c) *Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Ciudad Universitaria, Madrid;*

(d) *Centro de Investigación y Tecnología Animal del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Segorbe, Valencia. Conselleria de Agricultura, Pesca i Alimentació de la Generalitat Valenciana*

Border disease (BD) is a congenital viral disease of sheep and goats. BD virus (BDV) is a pestivirus of the genus *Flaviviridae* and is closely related to classical swine fever virus and bovine virus diarrhoea virus (BVDV). The disease in goats is rare and characterized by abortions. Clinical signs in sheep include barren ewes, abortions, stillborn lambs and small weak lambs at birth. In Spain only a few clinical cases of BD have been reported, however in sheep, antibodies have been frequently found. The principal objective of our work was to determine the relationship that exists between the Border Disease Virus and abortions in herds of sheep and goats in the Comunidad Valenciana (Spain). Between 2001 and 2003 a total of 413 serums corresponding to cases of ovine abortions and 123 serums corresponding to caprine abortions were examined. The detection of antibodies (Abs) against BDV was carried out using a commercial ELISA test using a protein (p80/120) common to all of the variants of BDV. The seroprevalence of antibodies against BVD was 29,7% (159/536) (37,8% for the ovine stock (156/413) and 2,4% for the caprine stock (3/123)). The prevalence of the seropositive herds was 57.7% (30/52) (23,07% (3/13)) in caprine stock and 69,23% (27/39) of the ovine herds. The infection by BDV was present as an infectious agent combined with other infectious agents in 96,29% of the cases in ovine stock (26/27) and in 100% of caprine stock (3/3).

The observations carried out indicate a broad diffusion of the BDV within the Comunidad Valenciana. The presence of BDV is more prevalent in sheep herds than in goat herds, differing from the findings of other authors. When other infectious agents associated with abortions in sheep and goats were studied it was found that BD is the most prevalent of the mixed infections associated with these abortions. The results of *absorbance* given by the ELISA test may be used to predict the presence or absence of PI animals in herds through a serological analysis of a reduced number of animals within a particular herd.

(61,63% of the animals showed a seroprevalence of titre of antibodies (D.O. < 0,200), such a finding is based on the fact that the titre of Abs of the PI animals is greater than those from farms without PI animals even when using inactivated vaccines.

INDICE DEGLI AUTORI

- Abelli, L.A.; 56
Agnoletti, F.; 46
Aloi, D.; 66; 67
Amadori, M.; 62
Ammendolia, M.G.; 38
Arcangeletti, M.C.; 56
Arista, S.; 44; 52
Aruspici, M.; 68
Asdrubali, G.; 70
Astarita, S.; 50
Autorino, G.; 10
Avetta, M.; 41
Bandecchi, P.; 3
Barbieri, I.; 34
Battista, P.; 26
Beato, M.S.; 27
Beckett, A.; 42
Bedini, B.; 34; 40
Bellini, S.; 28
Bettini, F.; 57
Boldini, M.; 28; 63
Boni, P.; 49
Bonilauri, P.; 50; 72
Borrè, A.; 63
Botti, G.; 47
Braina, V.; 60
Brasola, V.; 27
Brocchi, E.; 7; 28; 32; 55; 63
Buonavoglia, C.; 16; 35; 40; 52; 54
Cacciapuoti, G.; 59
Cagiola, M.; 33
Caligiuri, V.; 59
Camero, M.; 52
Campitelli, L.; 40
Campolo, M.; 35; 37
Canonico, C.; 48
Cantile, C.; 68
Capelli, G.; 36
Cappucci, L.; 47
Cappuccini, F.; 26
Caprioli, A.; 29; 53
Capua, I.; 11; 27; 57
Capucci, L.; 18; 46
Caracappa, S.; 30
Cardeti, G.; 31
Carli, D.; 68
Casagrande Proietti, P.; 70
Catelli, E.; 34; 58
Cattoli, G.; 57; 71
Cavaliere, N.; 37
Cecchinato, M.; 34
Cerioli, M.; 47; 58; 70; 71
Cerrone, A.; 46; 47
Chezzi, C.; 56
Chiappini, B.; 40
Cirone, F.; 37
Cittadini, M.; 31
Colomba, C.; 44
Coppola, R.C.; 61
Cordioli, P.; 32; 55; 63; 72
Cozzolino, L.; 59
Crudeli, S.; 38; 51
Cuteri, V.; 65
Damiani, A.; 31; 70
De Battisti, C.; 57; 71
De Conto, F.; 56
De Giuseppe, A.; 33
De Grazia, S.; 44
De Marco, M.A.; 34; 40
De Mateo Aznar, M.; 36
De Mia, G.M.; 5; 50
De Santis, P.; 60
De Simone, F.; 7
De Vos, S.; 54
Decaro, N.; 13; 35; 37; 52
Dei Giudici, S.; 51
Del Chiaro, L.; 29
del Rossi, E.; 70
Della Salda, L.; 69
Dellamaria, D.; 36
Delogu, M.; 12; 34; 40
Demetrio, A.; 31
Demurtas, G.; 51
Desario, C.; 37

Dettori, G.; 56
 Di Bartolo, I.; 29; 38; 53
 Di Grazia, A.; 45
 Di Guardo, G.; 68; 69
 Di Martino, B.; 39
 Di Pede, P.; 62
 Di Trani, L.; 34; 40
 Donatelli, I.; 40
 Dottori, M.; 72
 Elia, G.; 37
 Faccini, S.; 50
 Falcone, E.; 26; 40
 Fallacara, C.; 72
 Feliziani, F.; 33; 41; 66
 Fenizia, D.; 35
 Fent, P.; 36
 Fernández-Barredo, S.; 25; 43; 73
 Ferrando, M.L.; 60
 Ferrari, M.; 50
 Ferrarini, N.; 41
 Ferre, I.; 73
 Fioretti, A.; 46
 Fogarizzu, E.; 66; 67
 Fontana, S.; 45
 Forti, K.; 33
 Franciosini, M.P.; 42; 70
 Frasnelli, M.; 34
 Fringuelli, E.; 42; 70
 Galiana, C.; 25; 43; 73
 Galistu, A.; 51
 García, A.; 25; 43; 73
 Giammanco, G.; 44
 Giammarioli, M.; 50
 Giugliano, S.; 38
 Glavits, R.; 42
 Gómez, M.T.; 25; 43; 73
 Grazioli, S.; 7; 63
 Gualdi, V.; 50
 Hernandis, A.; 25; 43; 73
 Ibba, B.; 51
 Isola, P.; 62
 Ivanics, E.; 42
 La Rosa, G.; 45
 Lavazza, A.; 18; 26; 34; 46; 47; 52; 55;
 58; 71
 Lelli, D.; 32; 55
 Leoni, F.; 48
 Liciardi, M.; 60; 61
 Ligios, C.; 51
 Lorusso, E.; 52; 54
 Losio, M.N.; 49
 Lucente, M.S.; 35; 37
 Luini, M.; 50
 Luppi, A.; 32; 55
 Luz Roche, M.; 73
 Macciocu, S.; 51
 Maestrone, C.; 51
 Magnino, S.; 50
 Maietti, L.; 50
 Mankertz, A.; 42
 Marsilio, F.; 39
 Martella, V.; 16; 52; 54
 Martelli, F.; 29; 53
 Martin, A.M.; 32; 34; 55
 Martinelli, M.; 56
 Masia, G.; 61
 Massi, P.; 72
 Matthijnssens, J.; 54
 Mazzei, M.; 3
 McKillen, J.; 42
 Medici; 56
 Meliota, F.; 22
 Melis, P.; 51
 Menichelli, M.; 33
 Merenda, M.; 36
 Meridiani, I.; 39
 Micci, E.; 33
 Milani, A.; 27
 Monini, M.; 26; 38
 Monne, I.; 57
 Montinaro, S.; 66; 67
 Moscatelli, F.; 48
 Murgia, M.V.; 58
 Muscillo, M.; 45
 Mutinelli, F.; 20
 Nardelli, S.; 36
 Nava, D.; 35; 59
 Oggiano, A.; 66; 67
 Orrù, Germano; 60; 61
 Orrù, Ginevra; 61
 Ostanello, F.; 29; 53
 Paganelli, F.; 34

Palya, V.; 42
 Passeri, B.; 62
 Patta, C.; 66; 67
 Pavoni, E.; 49
 Perdetti, E.; 62
 Pérez-Gracia, M.T.; 25; 43; 73
 Perugini, G.; 41; 46; 47
 Petrizzi, L.; 69
 Pezzetti, G.; 52
 Pezzoni, G.; 63
 Pinardi, F.; 56
 Piras, V.; 61
 Piroddi, R.; 66; 67
 Pistello, M.; 62
 Polizzi, D.; 30
 Ponticello, L.; 31
 Pratelli, A.; 64
 Prezioso, S.; 65
 Puggioni, G.; 51; 66; 67
 Pusceddu, G.; 61
 Quintavalle, F.; 62
 Raffini, E.; 34
 Rahman, M.; 54
 Ramirez, S.; 44
 Reale, S.; 30
 Regali, M.; 61
 Rigoni, M.; 27
 Rocchegiani, E.; 48
 Rolesu, S.; 66; 67
 Rosignoli, C.; 50
 Roy, P.; 39
 Ruggeri, F.M.; 14; 26; 29; 38; 48; 53
 Rutili, D.; 41; 67
 Salvadori, C.; 68
 Salviato, A.; 71
 Santucci, U.; 28
 Savini, G.; 60
 Scagliarini, A.; 9
 Scott, A.; 42
 Severi, G.; 33
 Silvestre, O.; 59
 Simeone, P.; 69
 Smyth, J.; 42
 Solimene, F.; 59
 Sozzi, E.; 32; 55
 Tamba, M.; 72
 Tarhuni, O.; 70
 Telera, A.R.; 62
 Tenzoni, G.; 65
 Terregino, C.; 71
 Todd, D.; 42
 Toffan, A.; 71
 Tolari, F.; 3; 29
 Tollis, M.; 45
 Tranquillo, M.; 32
 Usberti, R.; 72
 Vaccari, G.; 40
 Van Ranst, M.; 54
 Vargiu, M.P.; 51
 Vecchi, G.; 72
 Vega, S.; 25; 43; 73
 Venuti, A.; 69
 Vescovini, R.; 62
 Vicari, N.; 50
 Villa, R.; 50
 Vitale, F.; 30
 Vitale, M.; 30
 Wilbirch, C.; 39
 Zanni, I.; 49
 Zerbini, L.; 56

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

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

Roma, settembre 2005 (n. 3) 17° Suppl.