

# **Relazione finale PRC2017002**

## **(Riassunto)**

**“Studio dell’evoluzione genetica dell’RHDV2 dal 2011 all’oggi e mapping dettagliato dei principali determinanti antigenici: la base per la scelta del miglior vaccino?”**

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute, Dipartimento della Sanità Pubblica Veterinaria, della Sicurezza alimentare e degli Organi Collegiali per la Tutela della Salute

Responsabile Scientifico: Dott.ssa Patrizia Cavadini

e-mail: [patrizia.cavadini@izsler.it](mailto:patrizia.cavadini@izsler.it)

Tel. 030/2290388

Data inizio progetto: 29/12/2017

Data fine progetto: 28/09/2020

Data stampa relazione: 28/09/2020

Collaboratori: Giovanni Campisi, Francesca Merzoni, Silvia Brodini, Alessandra Previdi, Lorenzo Capucci, Antonio Lavazza, Cristina Palotta.

## **RIASSUNTO**

La malattia emorragica del coniglio (Rabbit Haemorrhagic Disease, RHD), epatite virale acuta e letale del coniglio, è comparsa in Europa nel 1986, causando inizialmente ingenti danni alla conigliicoltura, poi in parte ridotti dall'utilizzo di adeguati vaccini. Il controllo di questa malattia è complicato dalla peculiarità dell'agente eziologico, un calicivirus (RHDV) ad RNA, ad elevata variabilità genetica ed antigenica, ormai endemico nel territorio. All'interno dei 6 distinti genotipi (G1-G6), si distinguono almeno 2 sottotipi antigenici. Dal 2011 si è diffuso in Europa una nuova variante di RHDV (RHDV2) con caratteristiche distintive, quali il causare RHD anche nei conigli lattanti e malattia nelle lepri (1, 2). RHDV2 ha causato devastanti epidemie dovute alla significativa diversità antigenica da RHDV, presumibilmente due distinti sierotipi, e quindi scarsa/nulla efficacia dei vaccini commerciali disponibili, tutti prodotti con RHDV. Inoltre, nella sua evoluzione RHDV2 ha incrementato la patogenicità (3). Dati preliminari di tipizzazione antigenica mediante anticorpi monoclonali (MAbs) specifici in nostro possesso, suggeriscono che nella sua prima fase di evoluzione (fase adattativa all'ospite) il virus ha dato origine a più varianti antigeniche, talune significativamente diverse fra loro, con differenze legate anche alle diverse localizzazioni geografiche. Ne consegue che nella produzione di un vaccino verso RHDV2, indispensabile per una protezione specifica, è necessario porre particolare attenzione nella scelta del ceppo utilizzato. Grazie ai reagenti esclusivi che sono stati prodotti in questi anni presso IZSLER e alla ampia collezione di isolati rappresentativi di tutto il territorio italiano è stato possibile caratterizzare finora circa 165 isolati sia dal punto di vista molecolare che antigenico.

Scopo di questo progetto di ricerca era da un lato studiare la filogenesi dell'RHDV2 dal 2011, anno di prima identificazione in Italia, all'oggi anche in relazione ai ceppi circolanti in Europa e caratterizzare, se esistenti, i diversi RHDV2 ricombinanti circolanti sul territorio italiano ("Iberian-like" e nuovi ricombinanti "Italian-like"); inoltre definire l'evoluzione antigenica di RHDV2 in Italia, inclusa l'identificazione dei principali sottotipi attualmente circolanti e localizzare i principali determinanti antigenici sulla superficie del virus che potrebbero essere oggetto di sostituzioni aminoacidiche (5).

## **PAROLE CHIAVE**

Lagovirus-evoluzione-ricombinazione

## MATERIALI E METODI

### *Campioni RHDV2 positivi*

I campioni analizzati in questo progetto di ricerca sono stati precedentemente caratterizzati come RHDV2 presso il laboratorio di Proteomica dell'IZSLER, mediante tecnica ELISA e gli omogenati di fegato (10% w/v in PBS), sono stati conservati a -20°C al 50% in glicerolo.

Nella seguente tabella sono elencati i campioni con l'indicazione degli anni di identificazione e la provenienza geografica.

N°progr	Anno	Provenienza	N°progr	Anno	Provenienza	N°progr	Anno	Provenienza	N°progr	Anno	Provenienza
1	2016	Palermo	22	2016	Trento	43	2016	Palermo	65	2018	Messina
2	2016	Sassari	23	2016	Trento	44	2016	Sassari	66	2018	Sicilia
3	2016	Agrigento	24	2016	Parma	45	2016	Sassari	67	2018	Sassari
4	2016	Napoli	25	2016	Livorno	46	2016	Sassari	68	2018	Roma
5	2016	Foggia	26	2016	Trento	47	2016	Roma	69	2018	Perugia
6	2016	Roma	27	2016	Piacenza	48	2016	Roma	70	2018	Ancona
7	2016	Parma	28	2016	Piacenza	49	2016	Roma	71	2018	Aquila
8	2016	Perugia	29	2016	Chieti	50	2016	Benevento	72	2018	Terni
9	2016	Firenze	30	2016	Pesaro-Urbino	52	2017	Reggio Emilia	73	2018	Lecco
10	2016	Pesaro Urbino	31	2016	Milano	53	2017	Piacenza	74	2018	Genova
11	2016	Trento	32	2016	Milano	54	2017	Roma	75	2018	Verona
12	2016	Milano	33	2016	Roma	55	2017	Palermo	76	2018	Sondrio
13	2016	Cuneo	34	2016	Roma	56	2017	Roma	77	2017	Trento
14	2016	Bergamo	35	2016	Brescia	57	2017	Palermo	78	2017	Trento
15	2016	Belluno	36	2016	Reggio Emilia	58	2017	Palermo	79	2017	Trento
16	2015	Napoli	37	2016	Piacenza	59	2017	Palermo	80	2017	Trento
17	2015	Benevento	38	2016	Roma	60	2017	Sassari	81	2017	Trento
18	2015	Bergamo	39	2016	Palermo	61	2017	Sassari	82	2017	Trento
19	2015	Treviso	40	2016	Roma	62	2017	Sassari	83	2017	Trento
20	2015	Treviso	41	2016	Palermo	63	2017	Roma	84	2017	Trento
21	2015	Salerno	42	2016	Palermo	64	2018	Salerno	85	2017	Trento

N°progr	Anno	Provenienza	N°prog	Anno	Provenienza	N°prog	Anno	Provenienza	N°prog	Anno	Provenienza
86	2018	Lazio	107	2018	Sicilia	128	2018	Sicilia	150	2014	Treviso
87	2018	Sicilia	108	2018	Sardegna	129	2018	Sardegna	151	2018	Milano
88	2018	Rimini	109	2018	sondrio	130	2018	sondrio	152	2018	Bergamo
89	2018	Sicilia	110	2018	sondrio	131	2018	sondrio	153	2018	Treviso
90	2018	Sicilia	111	2018	Sardegna	132	2018	Sardegna	154	2018	Treviso
91	2018	Sicilia	112	2018	Sardegna	133	2018	Sardegna	155	2018	Perugia
92	2018	Sicilia	113	2018	Sardegna	134	2018	Sardegna	156	2018	Avellino
93	2018	Sicilia	114	2018	Sardegna	135	2018	Sardegna	157	2018	Chieti
94	2018	Sicilia	115	2018	Sardegna	137	2012	Cremona	158	2012	Taranto
95	2018	Umbria	116	2018	Sardegna	138	2012	Catania	159	2012	Chieti
96	2018	Umbria	117	2018	Sardegna	139	2013	Cuneo	160	2013	Brescia
97	2018	Varese	118	2018	Sicilia	140	2013	Varese	161	2013	Brescia
98	2018	Latina	119	2018	Lecco	141	2013	Cuneo	162	2013	Latina
99	2018	Latina	120	2018	Parma	142	2013	Ferrara	163	2013	Foggia
100	2018	Messina	121	2018	Latina	143	2013	Ferrara	164	2013	Isernia
101	2018	Parma	122	2018	Lazio	144	2013	Padova	165	2013	Pesaro Urbino
102	2018	Parma	123	2018	Milano	145	2013	Cuneo			
103	2018	Latina	124	2018	Sondrio	146	2013	Cuneo			
104	2018	Milano	125	2018	Lazio	147	2014	Modena			
105	2018	Pesaro	126	2018	Catania	148	2014	Benevento			
106	2018	Trento	127	2018	Brescia	149	2014	Treviso			

### *Estrazione del RNA virale analisi mediante RT-PCR e sequenziamento genico*

L'RNA virale è stato estratto utilizzando 20µl di omogenato di fegato di coniglio conservato in glicerolo aggiunto ad 1ml di TRIZOL seguendo le istruzioni del produttore. Per l'amplificazione del genoma virale è stato utilizzato il kit One-Step RT-PCR della Qiagen e le sequenze dei primers sotto riportati.

**Tabella 1.** Primers utilizzati per amplificare una porzione del genoma di RHDV2

Nome	Sequenza (5'-3')	Posizione sul genoma (nt)	Zona di amplificazione
<b>RHDV2-5149F</b>	GAC TTT GTATGCAAGGAGCTCAA	5149- 5180	Amplifica solo i ceppi RHDV2 non ricombinanti
<b>RHDV2-116R</b>	CTAGTAGTGGCCACAACACC	5393-5412	
<b>RHDV2-4420F</b>	GTGGC RTTGACATGACMTC	4420-4439	Amplificazione vp60 e regione a cavallo del break point di ricombinazione
<b>RHDV2-116R</b>	CTAGTAGTGGCCACAACACC	5393-5412	
<b>RHDV2-5225F</b>	GCTACGATGCTGCTAGGAAGATACT	5225-5249	

<b>RHDV2-5893R</b>	GTTGTTATAAACGCTCAGGACCA	5865-5887	
<b>RHDV-F</b>	CCTGTTACCATCACCATGCC	5789-5808	
<b>RHDV2-6694R</b>	CGAACATGATGGGTGTGTTCC	6667-6686	
<b>RHDV2-FRAF</b>	GTTACCCTGGAAGCAGTTCGT	6204-6224	
<b>RHDV2-109R</b>	ACTACTAGCGTGGTCACCACC	5405-5425	
<b>RHDV-24-F</b>	GTGAAAGTTATGGCGGCTATGTCCG	1-24	
<b>RHDV-664-R</b>	TCTTCATGAAGTCTTTCCTGT	644-664	Amplificazione p16

I prodotti di amplificazione purificati mediante colonnine da gel, sono stati sequenziati in entrambe le direzioni utilizzando il kit big dye terminator (Applied Biosystems) e gli elettroferogrammi analizzati con il software DNASTAR Lasergene 10 Core Suite.

L'analisi filogenetica è stata eseguita con il software MEGA 6 (Tamura et al., 2013) usando il metodo Maximum-likelihood ed i parametri GTR+G+I come modello di sostituzione nucleotidica.

L'analisi di ricombinazione è stata eseguita con il software SimPlot.

### ***ELISA sandwich per la caratterizzazione degli isolati RHDV2***

La tipizzazione degli isolati RHDV2 è stata effettuata mediante Sandwich ELISA come precedentemente descritto (5). In breve, la piastra ELISA è stata adsorbita con siero di coniglio anti RHDV2 ad alto titolo, successivamente è avvenuta l'incubazione con estratti di fegato dei singoli campioni. I campioni sono stati pre titolati in ELISA ed utilizzati alla diluizione corrispondente al 70-80% del valore OD 492 di plateau. Successivamente la piastra è stata incubata con i singoli 21MAbs utilizzati ad una concentrazione tra i 25 e 100 ng/ml. Infine quale catcher è stato usato il reagente "IgG di coniglio anti IgG topo" marcato con HRP e la reazione sviluppata con OPD (0,5 mg/ml).

Poiché, nonostante la pre titolazione, la reattività generale fra singoli campioni è soggetta a variabilità, al fine di una comparazione corretta fra campioni, i dati grezzi sono stati oggetto di "normalizzazione", ove le OD vengono trasformate in percentuale di reattività.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### *Analisi mediante sequenziamento genico di una porzione del genoma di RHDV2 e relativa analisi filogenetica*

Per caratterizzare dal punto di vista molecolare i ceppi circolanti di RHDV2 (anni 2012-2018) sul territorio italiano, è stato amplificato interamente il gene codificante la proteina capsidica VP60 più una regione a monte di circa 800bp corrispondente ad una porzione del gene codificante la RdPolimerasi (p58) ed inoltre è stata sequenziata una regione di circa 650bp corrispondente al gene p16. In totale sono stati amplificati circa 3Kb del genoma di RHDV2. La scelta di amplificare e successivamente sequenziare due porzioni del genoma a monte del gene vp60, nasce dal fatto che in letteratura sono stati descritti ceppi di RHDV2 ricombinanti il cui break point di ricombinazione è localizzato o a pochi nucleotidi a valle del codone di start (ATG) della VP60 o doppia ricombinazione in corrispondenza anche del gene p16 (4).

#### Analisi mediante Blast del gene p60 e relativa analisi filogenetica

L'analisi blast utilizzando il software MegAlign della sequenza codificante la vp60 dei diversi ceppi ha evidenziato un range di identità nucleotidica compresa tra il 95%-99% se confrontati con il ceppo di riferimento RHDV2Ud11 (GenBank JQ929052). L'analisi filogenetica effettuata con le sequenze della vp60 di questi campioni confrontate con le sequenze di ceppi di RHDV-RHDV2-RCV presenti in GenBank, ha evidenziato come tutti i ceppi analizzati si localizzino nel gruppo corrispondente a RHDV2 (**Figura 1A**), in accordo all'analisi blast.

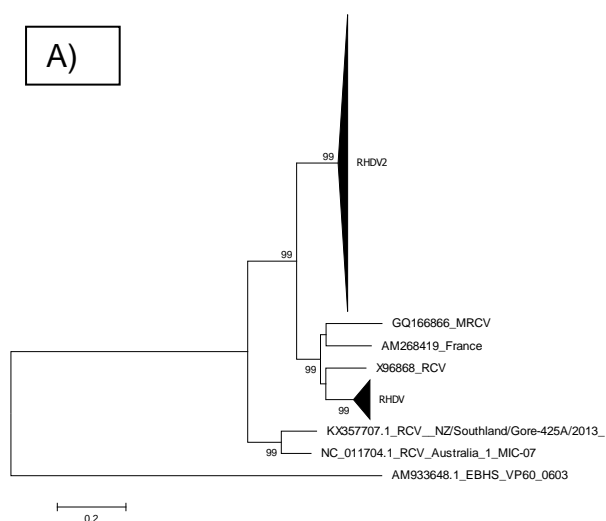
#### Analisi mediante Blast del gene p58 e p16

Come già detto in precedenza, si è deciso di sequenziare una porzione del gene p58, che codifica per la Polimerasi virale, localizzata a monte del gene vp60, per indagare eventuali ricombinazioni. La sequenza ottenuta (di circa 800bp), corrispondente ad una porzione del gene p58, è stata confrontata con il ceppo di riferimento spagnolo RHDV\_N11\_KM878681 utilizzando il software MegAlign, dando un range di identità nucleotidica tra il 77%-100%. **Diciannove** campioni presentavano una identità nucleotidica con il ceppo di riferimento spagnolo inferiore al 90% ed erano anche quelli che non avevano dato amplificazione con i primers RHDV2-5149F/ RHDV2-116R, suggerendo un evento di ricombinazione, confermato dall'analisi filogenetica (**Figura 1B**) e SimPlot. L'analisi filogenetica è stata condotta con il programma Mega6, con il metodo Maximum Likelihood. Come evidenziato nella Figura 1B, **17** campioni sono dei ricombinanti che mantengono la vp60 di RHDV2 e la porzione del genoma che codifica per le proteine non strutturali che deriva da un ceppo di RHDV-G1, che non ha mai circolato in Italia, bensì nella penisola Iberica. Poiché questi ricombinanti sono

stati descritti in Spagna e Portogallo è verosimile che i virus identificati in Italia siano arrivati dalla penisola Iberica.

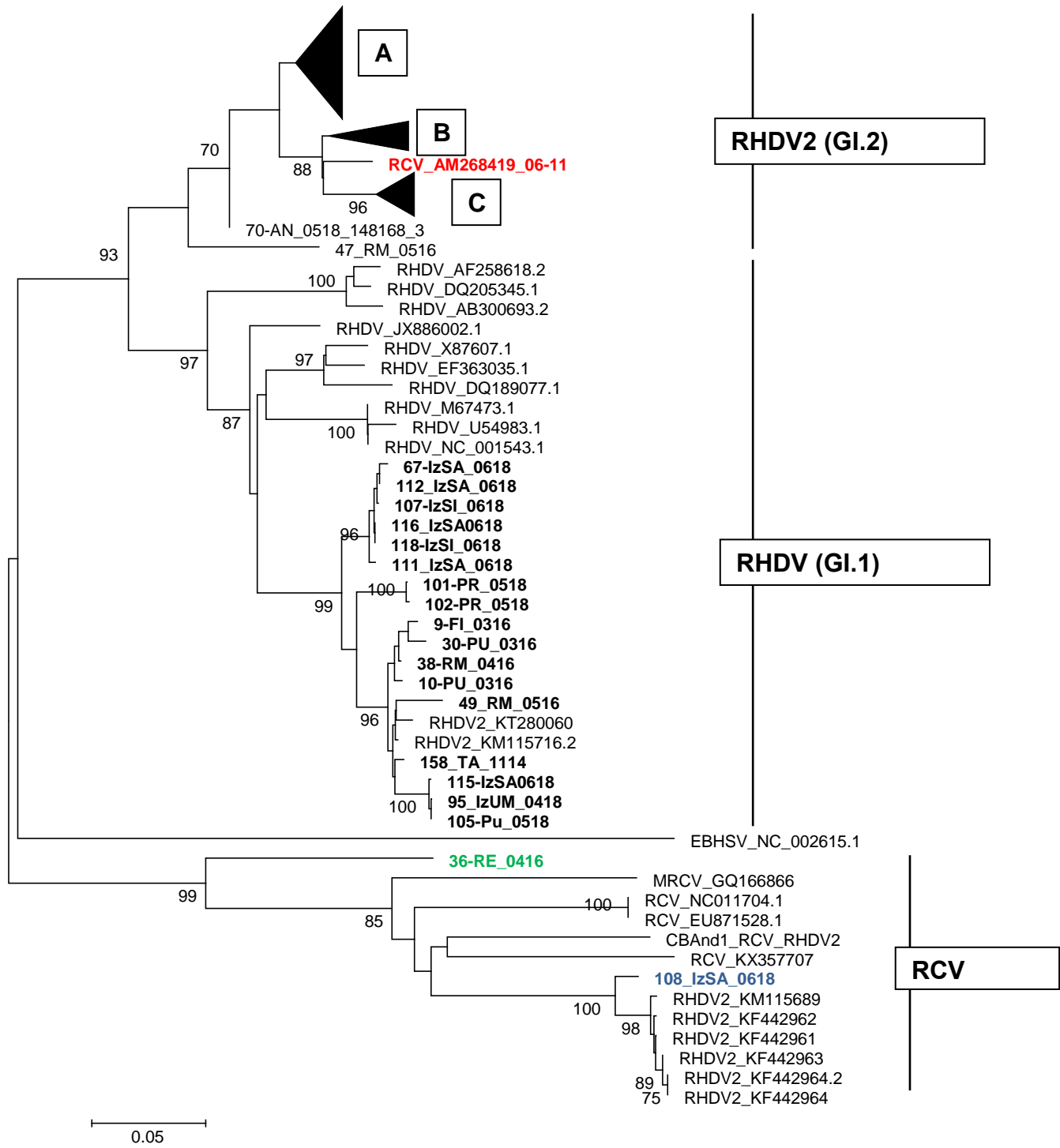
L'analisi SimPlot su questi campioni, ha confermato l'evento di ricombinazione, in corrispondenza dell'ATG della proteina capsidica, in accordo con i dati presenti in letteratura.

Un campione identificato a Reggio Emilia nel 2016 (36-RE\_0416), è probabilmente un ricombinante con un ceppo RCV-E2, ovvero con un ceppo non patogeno di lagovirus, identificato per la prima volta in Australia e successivamente in Europa, mostrando un'identità nucleotidica dell'88% con la porzione p58 del ceppo KP090976. Analizzando però la porzione p16 localizzata al 5' di questo campione, l'identità nucleotidica risultava essere maggiore verso RHDV2 e minore verso RCV-E2, suggerendo una doppia ricombinazione. Per questo motivo il genoma del campione 36 è stato interamente sequenziato e sottoposto ad analisi SimPlot e RdP4 per verificare l'ipotesi. Le analisi condotte hanno in effetti dimostrato che il campione risulta essere un doppio ricombinante, con la porzione 5' del genoma proveniente da un virus RHDV2, la porzione centrale da un virus RCV, mentre la porzione capsidica e p10 da un ceppo RHDV2. Questo è il primo virus doppio ricombinante RHDV2/RCV-E2/RHDV2 trovato in Italia, ed il primo ricombinante italiano RHDV2 con un virus non patogeno RCV. Considerando che i virus non patogeni sono stati descritti in conigli italiani (sia in allevamento che selvatici) si può ipotizzare che l'evento di ricombinazione sia avvenuto in un animale italiano. E' stato identificato un ulteriore virus ricombinante con un ceppo di RCV-A1(108-



IzSA). E' interessante notare come il ceppo non patogeno francese RCV\_AM268419\_06-11, si localizza nel gruppo dei campioni RHDV2 a differenza di quanto evidenziato con l'analisi filogenetica del gene vp60 in cui il virus si localizza nel cluster dei lagovirus non patogeni. L'ipotesi è che questo virus possa essere un ricombinante, oppure che i ceppi RHDV2 si siano a loro volta originati da una ricombinazione tra un virus parentale sconosciuto ed un virus non patogeno (7), ipotesi recentemente proposta dal gruppo portoghese di Abrantes et al. 2020.

B)





**Figura 1: A)** Albero filogenetico Maximum Likelihood (GTR+G+I) del gene vp60 relativo alle 165 sequenze italiane ottenute in questo lavoro. Le sequenze di riferimento degli altri lagovirus RHDV, RCV, EBHSV sono state prese da GenBank. Tutti i 165 ceppi italiani analizzati in questo progetto si localizzano nel cluster RHDV2 che nell'immagine è stato compresso per una più chiara lettura.

**B)** Albero filogenetico considerando solo la porzione del genoma relativo alla p58 (circa 800pb a monte del gene vp60). A, B e C rappresentano tre gruppi all'interno del cluster di RHDV2 in cui si localizzano alcuni ceppi italiani analizzati in questo studio. In grassetto sono indicati i ceppi italiani che si localizzano nel cluster di RHDV (Genogruppo G1) o RCV. In verde un ceppo italiano che si localizza nel cluster dei virus non patogeni, ma su un braccio isolato ed in rosso il ceppo non patogeno francese che si localizza nel cluster dei ceppi RHDV2 italiani ed europei.

L'analisi filogeografica basata sulle sequenze del gene vp60, ha evidenziato che il primo ceppo di RHDV2 sia arrivato in Italia dalla Francia nel 2011, inizialmente nella provincia di Udine nord-orientale, poi si è spostato in Sardegna, e da lì si è successivamente diffuso in tutto il paese. Negli anni successivi ci sarebbe stata anche un'introduzione di ceppi dalla Penisola Iberica ed è interessante notare che alcuni ceppi sarebbero stati introdotti in Italia dalla Francia.

### **Studio antigenico degli isolati RHDV2 mediante anticorpi monoclonali**

Dal 2011 al 2020 il Centro di Referenza ha archiviato oltre 700 isolati di RHDV2, provenienti soprattutto dai territori di competenza dell'IZSLER, ma anche in buona rappresentanza delle diverse regioni Italiane. In precedenti PRC il Centro di Referenza ha prodotto e caratterizzato un pannello di 20 Anticorpi Monoclonali (AcM) anti RHDV2. Ogni isolato selezionato, è stato esaminato in ELISA sandwich per la reattività verso i singoli AcM anti RHDV2, ed i risultati sono stati trasformati in percentuale di reattività rispetto al legame verso il virus usato come immunogeno (100%). Sono dunque stati individuati tre tipi di reattività: legame pieno (> 70%), legame parziale (15-69%), perdita di legame (< 15%). Sulla base dei diversi profili di reattività evidenziati nei differenti ceppi circolanti, i dati nel loro complesso mostrano come nell'evolversi dell'epidemia di RHDV2 sul territorio nazionale il virus sia andato incontro a più modificazioni del profilo antigenico, anche per probabile introduzione di nuove varianti da altri paesi europei. Questa è la ragione per cui è stato prodotto anche un nuovo pannello di AcM verso l'RHDV2 TV2014 in aggiunta a quello già disponibile verso l'RHDV Fra1032, uno dei primi isolati francesi del 2010. L'analisi complessiva degli isolati, ha evidenziato come alcune varianti più di altre si siano diffuse su tutto il territorio e come alcune di queste varianti abbiano generato sotto varianti minori. Il profilo dominante all'oggi in circolo è quello dell'isolato RHDV Tv14, caratterizzato dalla reattività

di 2 gruppi di AcM (gruppo 1: 4D2, 3G2 e 2A10, gruppo 2: 2H10 e 4D12) che riconoscono 2 epitopi distinti (come meglio specificato sotto). I due profili prevalenti sono 4D2 e 4H12 positivo e 4D2 negativo e 4H12 positivo. Da notare come per ognuno dei due profili siano poi presenti sotto varianti, negative o positive, per altri AcM. Minoritari sono poi i profili 4D2 positivo e 4H12 negativo, come pure 4D2 e 4H12 negativo. Per dare concreto valore sia conoscitivo che pratico ai profili antigenici tracciati dagli AcM anti RHDV2 è necessario identificare gli epitopi dei singoli AcM, vale a dire stabilire in che area della superficie virale si lega l'AcM (mappatura degli AcM). Il principio alla base della mappatura dell'epitopo è che la perdita di reattività dell'AcM sia dovuta ad una sostituzione di uno o più amminoacidi chiave che costituiscono l'epitopo. Dall'allineamento delle sequenze amminoacidiche della VP60 ottenute da isolati positivi e negativi per un determinato AcM (almeno 10 se disponibili), il software di analisi Mega 6, elimina dalle sequenze tutti gli amminoacidi comuni e lascia solo quelli con una sostituzione per posizione. In Figura 2 sono riportate le sequenze che hanno consentito di mappare l'epitopo degli AcM 4D2-3G2 e 2A10, molto probabilmente rappresentativi in realtà di un unico AcM. Nella parte alta della figura sono riportate le posizioni degli amminoacidi variati nella porzione della VP60 esposta verso l'esterno. L'identificazione dell'aa chiave avviene per semplice comparazione ove si cerca di identificare quali modifiche sono presenti solo negli isolati negativi (in rosso) rispetto a quelli positivi (in verde). Nel caso dell'AcM 4D2 si evince che una posizione chiave è certamente quella dell'aa 347 ove negli isolati ELISA positivi sono sempre presenti la valina o l'isoleucina mentre negli isolati negativi l'aa treonina o serina. Da aggiungere che la posizione 347 è quella con maggior numero di modifiche della VP60, che in totale sono 5, perché in alcuni isolati è stata identificata una alanina. Per questo aa i risultati non sono però certi come per gli altri o per implicazione di altri aa o per errori tecnici (sono in corso verifiche per stabilirlo).

		2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5								
		8	9	0	0	1	2	2	4	4	6	6	6	6	7	8	8	9	9	0	0	1	1	3	3	4	5	5	7	8	9	0	2	4	4	4				
Isolato	ELISA	5	9	1	7	5	0	4	7	9	4	5	7	9	3	4	6	1	2	4	9	1	5	2	4	6	5	9	7	0	6	8	0	1	2	3				
107-lzSI_0618	Green	.	K	.	.	L	A	.	V	.	.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	V	.	.	.	.	.	L	T	.				
137_CR_1112	Red	.	.	.	.	L	A	.	T	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
138_CT_1112	Red	.	.	.	.	L	A	.	T	V	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	I	.	V	.	A	.	.	.	.	.	.	T	.			
25-LI_1215	Green	.	.	.	.	L	A	.	I	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	I	.	.	.	.	I	.	.	.	L	.	.	.			
1-PA0316	Green	.	.	.	.	F	V	.	I	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.		
10-PU_0316	Red	.	.	.	.	L	A	.	T	.	S	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.		
11-TN_0216	Red	.	.	.	N	L	A	.	T	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
7-PR_0116	Green	.	.	.	.	L	A	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	T	.	.		
2-SS_0516	Green	.	.	.	.	L	A	.	V	.	.	S	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.		
32-MI_0416/3	Green	.	.	.	N	L	A	.	I	.	S	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.		
3-AG_0516	Green	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
41-PA_05162	Green	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
45-SS_0516/5	Green	.	.	.	.	L	A	.	V	.	.	S	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.		
46-SS_0516/7	Green	.	K	.	.	L	A	.	I	.	.	S	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.		
49-RM_0516/3	Red	.	.	.	.	L	A	.	T	V	S	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
49_RM_0516/3	Red	.	.	.	.	L	A	.	T	V	S	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
14-BG_1016	Green	.	.	.	.	L	T	.	I	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
5-FG_1116	Green	.	.	.	.	A	.	V	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
8-PG_1016	Red	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
58-CT_0817	Green	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
57-TR_0817/2	Green	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	V	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
60_MI_1017	Green	.	K	.	.	A	V	I	.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	
73-LC_0318	Green	.	K	.	.	A	V	V	.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	
74_GE_0218	Red	Y	.	.	.	L	A	.	T	.	S	.	M	V	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
64_SA_0118	Red	Y	.	.	.	L	A	.	S	.	S	.	M	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
100-lzME_0518	Red	Y	.	.	.	L	A	.	S	.	S	.	M	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
108-lzSA_0618	Red	.	.	.	.	L	A	V	T	.	S	S	.	F	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	
110-SO_0618	Red	Y	.	.	.	L	A	T	T	.	S	.	M	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
65-ME_0418	Green	Y	.	.	.	L	A	.	V	.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	L	T	.		
118_lzSI_0618	Green	.	.	.	.	.	.	.	T	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
123_MI_0718	Green	.	.	.	.	.	A	V	V	.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
127_BS_0718	Green	Y	.	.	.	L	A	.	I	.	S	.	M	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

**Figura 2:** mapping dell'epitopo degli AcM 4D2-3G2-2A10. I 3 AcM si legano allo stesso epitopo per il quale l'aa in posizione 347 riveste un ruolo chiave. Valina e isoleucina consentono il legame degli AcM al virus, mentre treonina e serina lo impediscono per modifica della conformazione dell'epitopo.

Una simile analisi condotta sui restanti AcM ha consentito di mappare l'epitopo degli AcM 4H12-2H10. Diversamente da quello del 4D2 la struttura dell'epitopo appare più complessa. Infatti gli isolati positivi in ELISA hanno in comune la sequenza 299 K, 369 F, 455 V mentre quelli negativi (perdita dell'epitopo) quella 299 R, 369 Y, 455 I. I risultati ottenuti dal presente PRC, non conclusivi data la complessità dell'obiettivo e che troveranno continuità in un PRC finanziato dal Ministero che inizierà a breve, cominciano a dare qualche risposta preliminare. Partendo dalla reazione degli AcM verso gli isolati, sono stati indentificati almeno 15 epitopi. Fra questi una decina mostrano una significativa/elevata capacità di inibire l'emoagglutinazione dei globuli rossi indice che si legano per certo alla superficie esterna del virus ed hanno quindi, con elevata probabilità, potere protettivo (il loro legame impedisce l'infezione e/o la malattia).

#### **BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO ESSENZIALE**

1. Le Gall-Reculé G. et al. (2013). *Vet Res* 44:81.
2. Puggioni G. et al. (2013). *Vet Res* 44:96.
3. Capucci L. et al. (2017). *Vet Rec* 180.
4. Lopes AM. et al. (2015). *J Gen Virol* 96, 1309-1
5. Lopes AM. et al. (2014). *Virology* 468-470.
6. Camacho-Sillero L et al. (2019). *Veterinary Microbiology* 237:108361.
7. Abrantes J. et al. (2020). *Scientific Reports* 10, 14502.