

NOROVIRUS GII IN FECI DI SUINI ALLEVATI NEL NORD ITALIA: IDENTIFICAZIONE DI DUE DIVERSI GENOTIPI

GII NOROVIRUS IN SWINE FAECAL SAMPLES IN NORTHERN ITALY: IDENTIFICATION OF TWO DIFFERENT GENOTYPES

CAVICCHIO L.¹, RIZZO G.¹, CUNIAL G.¹, MILANI A.¹, LACONI A.¹, CAMPALTO M.¹, PAGLIARI M.¹, USTULIN M.¹, MONNE I.¹, FORZAN M.², VIO D.¹, BONFANTI L.¹, BEATO M.S.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, (IZSVe), Viale dell'Università 10, 35020, Legnaro (Padova), Italy; ² Università di Pisa, Veterinary Sciences Department, Viale delle Piagge, 2, 56124 PISA, Italy.

Parole chiave: Norovirus (NoVs), suino, GII

Keywords: Norovirus (NoVs), swine, GII

RIASSUNTO

I Norovirus (NoVs) sono considerati una delle principali cause di gastroenteriti acute virali nell'uomo a livello globale. I NoVs, appartenenti alla famiglia dei *Caliciviridae*, sono classificati in 7 genogruppi (G), da GI a GVII, suddivisi in 40 genotipi. I NoVs umani associati a gastroenterite appartengono ai genogruppi GI, GII e GIV. I NoVs sono stati riscontrati in diverse specie animali, inclusi i suini risultati positivi per GII. L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, ha condotto un progetto di ricerca con lo scopo di indagare la presenza di NoVs nelle feci di suini allevati nelle regioni di competenza e di studiarne le caratteristiche geniche. I dati presentati si riferiscono alle indagini condotte tra il 2017 e il 2019, per investigare la presenza e circolazione di NoVs nella popolazione suinicola del Veneto e Friuli Venezia Giulia (FVG). Dal campionamento di feci eseguito, al macello e in allevamento, è stato possibile identificare NoVs GII.11 e GII.18. Ad oggi questa rappresenta la prima segnalazione del genotipo GII.18 in Italia e in Europa.

ABSTRACT

Noroviruses (NoVs) are one of the major causative agents of non-bacterial gastroenteritis in humans all over the world. NoVs, belonging to *Caliciviridae*, are classified into seven genogroups (G), from GI to GVII, which are further subdivided into 40 genotypes. NoVs identified in human gastroenteritis cases are: GI, GII and GIV. NoVs have also been isolated from several animal species, including pigs which resulted positive for GII. The Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie conducted a research project that aimed to investigate the presence of NoVs in swine faeces collected in the competence area and to study their genetic characteristics. The present work describes the results of the project conducted between 2017 and 2019, based on a cognitive survey on the presence of NoVs in the swine population of Veneto and Friuli Venezia Giulia (FVG). Based on the sampling scheme adopted, it was possible to identify NoV GII.11 and GII.18: to date this is the first case of GII.18 reported in Italy and Europe.

INTRODUZIONE

I Norovirus (NoVs) sono causa di oltre il 90% di gastroenteriti virali nell'uomo a livello globale [1]. La trasmissione di questi piccoli virus (25-35nm), avviene per via oro-fecale attraverso l'ingestione di alimenti, molluschi, verdura o acqua contaminati in diversi punti della filiera, e secondariamente per via aerea, attraverso il contatto con persone infette o a seguito di formazione

di particelle di aerosol generate da episodi di vomito ‘a getto’ [2]. L’eliminazione fecale di NoV, avviene prima della manifestazione clinica, e in maniera prolungata, aumentando nella popolazione il rischio di infezione e re-infezione. Inoltre il virus è molto resistente nell’ambiente esterno e presenta una bassa dose infettante diffondendosi velocemente in ambienti chiusi e con alta presenza di persone [3].

I virus del genere Norovirus appartengono alla famiglia *Caliciviridae* che a sua volta comprende i generi Sapovirus, Lagovirus, Nebovirus e Vesivirus. I NoVs presentano un genoma a RNA a singolo filamento a polarità positiva (ssRNA+), di circa 7,5Kb, organizzato in tre Open Reading Frame (ORFs) codificanti rispettivamente per proteine non strutturali (ORF1), tra cui la RNA polimerasi RNA-dipendente - RdRp, la proteina maggiore del capsido Viral Protein 1-VP1 (ORF2) e la proteina minore del capsido VP2 (ORF3) [4]. Sono classificati in sette genogruppi (GI – GVII) in base alla composizione amminoacidica della proteina VP1, coinvolta nei meccanismi di interazione recettoriale e specificità di legame virus-cellula ospite [5]. Sono stati identificati oltre 40 diversi genotipi all’interno dei 7 genogruppi. L’alto tasso di mutazione e la ricombinazione genica, che nei NoVs avviene frequentemente in una regione *hotspot* a livello della giunzione ORF1/ORF2 mediante un meccanismo simile al crossing-over, rendono la classificazione di questi virus a volte complessa. Oltre all’individuazione di nuovi genotipi e specie, è frequente isolare ceppi ricombinanti con caratteristiche genotipiche intermedie, difficili da classificare [6].

I virus appartenenti ai gruppi GI, GII e GIV sono responsabili di gastroenteriti acute nell’uomo [7]. In particolare, il genotipo 4 del genogruppo II (GII.4) è responsabile di circa l’85% degli episodi epidemici di gastroenterite nell’uomo [1]. Il genotipo umano NoV GII.4 è stato identificato in feci di suino, dimostrando come tale genogruppo possa infettare uomo e ospite animale anche in condizioni naturali, sia in prodotti di carne suina, suggerendo una possibile trasmissione zoonosica attraverso la catena alimentare [8]. Tali evidenze sperimentali hanno posto l’attenzione sul potenziale zoonosico dei NoVs e sul ruolo del suino nell’epidemiologia di questa complessa infezione.

I NoVs appartenenti ai genogruppi: GII.11, GII.18, GII.19, sono identificati in feci di suino [9] asintomatici [10] e non [11].

Attualmente sono limitati i dati in letteratura sulla presenza in Italia di NoVs nel serbatoio animale, quale il suino: l’unico caso descritto è relativo a un NoVs GII.11, identificato in feci di suino, in assenza di sintomatologia gastroenterica [12].

Il presente lavoro descrive i risultati del progetto di ricerca condotto tra il 2017 e il 2019, basati su una indagine conoscitiva sulla presenza di NoVs nella popolazione suina del Veneto e Friuli Venezia Giulia.

MATERIALI E METODI

La presenza di NoVs nella popolazione suina del Nord Est Italia è stata indagata tramite campionamenti di feci al macello ed in allevamento. In assenza di dati bibliografici relativi alla prevalenza inter-aziendale, la numerosità campionaria minima necessaria per la stima della prevalenza di NoVs in ogni Regione è stata calcolata ipotizzando una prevalenza del 50% (con una confidenza del 95% e un margine di errore del 5%) e ripartita proporzionalmente sulla base della popolazione di allevamenti di suini da ingrasso complessiva in Veneto e Friuli Venezia Giulia (FVG). Il numero complessivo delle aziende da ingrasso, attive al 31/12/2016, era pari a 396 per il FVG e 1411 per il Veneto. Un’azienda è stata definita “attiva” quando è stato registrato in Banca Dati Regionale dell’Anagrafe Zootecnica Regionale almeno un censimento con n. capi > 0 o una movimentazione di animali nell’anno di riferimento. Sulla base di tali considerazioni è stato pianificato un campionamento nel corso del 2017 condotto al macello sia in Veneto che FVG, come prima indagine conoscitiva. In base ai dati ottenuti dai campionamenti al macello

eseguiti nel 2017, i campionamenti a partire dal 2018 sono stati effettuati in allevamento nella sola regione del Veneto.

In totale sono stati prelevati e analizzati campioni provenienti da 148 allevamenti, 82 nel 2017, 68 nel 2018 e 4 nel 2019. In totale sono stati raccolti 305 campioni di feci, di cui 85 raccolti nel 2017 e 208 nel 2018 e 12 nel 2019. Inoltre sono stati analizzati 24 intestini di suino, di cui 17 provenienti da allevamenti del Friuli Venezia Giulia e 7 del Veneto, prelevati da suini con quadro di patologia gastroenterica all'esame autoptico nell'anno 2017. Le province coinvolte nel campionamento, sia in allevamento sia al macello, sono state in totale 10 di cui 7 nel Veneto (Belluno, Padova, Rovigo, Treviso, Venezia, Verona, Vicenza) e, 3 nel Friuli Venezia Giulia (Gorizia, Pordenone, Udine). Nel 2017, i campionamenti al macello sono stati effettuati per tutte le province in esame. Nel 2018, i campionamenti in allevamento sono stati eseguiti nelle province di Padova, Rovigo, Treviso, Venezia, Verona e Vicenza, nel 2019 nella provincia di Verona. Le categorie di animali campionati sono state le seguenti: scrofe e scrofette in box, scrofe in gabbia o sala parto, suinetti/suini da ingrasso fino a 150 gg, suini da ingrasso con un'età superiore ai 150 gg e verri.

Il campionamento effettuato nel 2017 è stato svolto in sede di macellazione presso stabilimenti regionali selezionati in base al numero di aziende conferenti capi provenienti dal territorio coinvolto nel progetto. Le feci sono state raccolte in pool da 5 individui per azienda. A partire dal 2018, ad esclusione di 18 campioni prelevati in singolo al macello, il campionamento è stato effettuato in allevamento. Sono stati prelevati pool costituiti da diversi campioni in base alla categoria di animale presente: nel caso di animali campionabili singolarmente, come per le scrofe in sala parto e scrofe in gabbia, il pool era rappresentativo di 5 capi, mentre per i verri di 2 capi. Nel caso invece di animali allevati in box, il pool era costituito da più campioni prelevati nell'ambito di diversi box (dai 12 ai 16 campioni in 3-4 box). Da Ottobre 2018 a Gennaio 2019 i pool sono stati prelevati in allevamenti sia da ingrasso sia in riproduzioni a ciclo chiuso su soggetti da ingrasso di età superiore ai 90 giorni.

I campioni di intestino sono stati omogenati utilizzando 20-40mg di tessuto e 0,5ml di MEM (Minimal Essential Medium, Sigma Aldrich) addizionato con 1% di PenStrep (10000 UI/ml di Penicillina G, 100mg/ml di Streptomycina), mediante Tissue Lyser (Qiagen). L'RNA è stato estratto con il kit commerciale "High Pure RNA Tissue kit" (Roche Life Science). Per ciascun campione di feci, 1gr di materiale è stato diluito 1:5 (w/v) in 4ml di MEM supplementato con 1% di PenStrep. Il campione è stato quindi miscelato con vortex e centrifugato per 5 minuti a 14000xg e il surnatante utilizzato per l'estrazione dell'RNA mediante il kit "QIAamp Viral RNA mini kit" (QIAGEN). Gli estratti, trattati con DNAasi, sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

Al fine di non escludere nell'analisi molecolare alcuna variante di NoVs animale, è stata applicata una metodica molecolare (RT-PCR), di screening, in grado di identificare tutti i generi virali della famiglia *Caliciviridae*. Per confermare un eventuale campione positivo per NoVs, si è reso necessario il sequenziamento del prodotto di PCR ottenuto. Tale PCR utilizza la coppia dei primers "p290-p110" [13], aventi come target un frammento di 300 paia di basi (bp) del gene codificante per l'RdRp. La fase di amplificazione dei cDNA è stata condotta con il kit "GoTaq G2 Flexi" (Promega).

Le feci campionate nel 2017 sono state analizzate mediante una RT-PCR due steps utilizzando random primers per la fase di retroscrittura (RT) seguendo le istruzioni d'uso riportate nel kit "SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR" (Invitrogen). A seguito di una fase di ottimizzazione della RT-PCR, le feci campionate dal 2018 in poi sono state analizzate con una metodica one step RT-PCR, utilizzando il kit "SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase" (Invitrogen) e la coppia di primers "p290-p110" [13].

I prodotti di PCR sono stati in seguito visualizzati su gel di acrilamide al 7%, colorato mediante

impregnazione argentica. Gli amplificati dei campioni risultati positivi mediante RT-PCR, che hanno mostrato su gel una banda idonea in termini di dimensioni e quantità dell'amplificato, sono stati sequenziati mediante metodo Sanger. Le sequenze ottenute del gene RdRp, (300 bp), sono state confrontate con quelle attualmente disponibili in GenBank usando il software BLAST. Con un approccio di primer walking disegnando dei primers *ad hoc* a partire dalla sequenza RdRp e utilizzando il primer VN3T20 [9] è stato sequenziato il gene VP1. È stata eseguita l'analisi filogenetica dei NoVs identificati dal 2017 fino a Giugno 2018, utilizzando le sequenze nucleotidiche di 300 bp ottenute del gene RdRp e del gene VP1. Al fine di ottenere maggiori informazioni sulle caratteristiche genetiche dei NoVs identificati, sono stati disegnati dei primers per ottenere sequenze di lunghezza superiore ai 300 bp del gene RdRp, utilizzando la taq "OneStep Superscript III Reverse Transcriptase-Platinum Taq High Fidelity kit" (Invitrogen). Le sequenze ottenute sono state allineate usando il software MAFFT. Per le sequenze del gene RdRp, l'albero filogenetico è stato costruito con il metodo Maximum Likelihood (ML) utilizzando il software PhyML 3.1 con analisi di bootstrap con 1000 repliche e con il modello Kimura 2 (K2P) di sostituzione nucleotidica. Per la sequenza di VP1 è stato utilizzato il modello di sostituzione nucleotidica SYM + R4, con 100 repliche di bootstrap.

RISULTATI

Sono stati analizzati in totale 329 campioni di cui 305 feci e 24 intestini. Sessantuno campioni sono risultati positivi per *Caliciviridae* di cui 60 feci e 1 intestino (Tabella 1).

La positività per la RT-PCR si è basata sulla visualizzazione di un amplificato del gene RdRp di circa 300 bp. L'analisi di sequenza del frammento di 300 bp del gene RdRp dei 60 campioni di feci positive per *Caliciviridae* ha dato il seguente esito: 26 campioni positivi per Norovirus, 19 feci per Sapovirus, 15 campioni non analizzabili a causa di un amplificato non idoneo al sequenziamento. Un campione di intestino su 24 è risultato positivo per Sapovirus (Tabella 1).

I campioni di feci risultati positivi per *Caliciviridae* provengono tutti dalla regione Veneto e il campione di intestino positivo per Sapovirus proviene dal Friuli Venezia Giulia (Udine). La maggior parte dei campioni positivi per NoVs (23/26) sono stati identificati nel 2018, con un maggior numero di casi nella provincia di Treviso (Tabella 2).

I campioni di feci positivi per *Caliciviridae* (26 NoVs e 19 Sapovirus) sono stati identificati in Veneto e non in FVG, e provengono da aziende zootecniche situate nella provincia di Padova (10 campioni), Verona (14 campioni), Treviso (16 campioni), Vicenza (4 campioni), e Rovigo (1 campione) (Tabella 2). L'analisi filogenetica del frammento di 300 pb del gene RdRp dei campioni identificati in Veneto, ha evidenziato l'appartenenza di 22 campioni su 26 positivi NoVs al genotipo GII.11 e 4 al GII.18 (Tabella 2). I NoVs GII.11 sono stati identificati nel 2017 (2), nel 2018 (19) e nel 2019 (1), i NoVs GII.18 sono stati identificati nel 2018. I campioni positivi per GII.11 sono stati prelevati nelle province di Padova, Treviso, Verona, Vicenza e Rovigo, prevalentemente in suini da ingrasso. I positivi per GII.18 sono stati identificati nelle province di Padova e Treviso in suini da ingrasso, di questi, due sono stati prelevati nello stesso allevamento (Tabella 2).

L'analisi filogenetica condotta per il gene RdRp evidenzia che i NoVs GII.11 si dividono in due piccoli gruppi, un primo gruppo simile a ceppi riscontrati in Olanda nel 2009, un secondo gruppo costituito da soli campioni italiani. I NoVs GII.18 sono correlati a NoVs identificati in Canada nel 2009, U.S.A. nel 2004 e Brasile nel 2007. Inoltre è stata ottenuta con metodo Sanger, la sequenza completa di VP1 di un solo campione positivo per NoV GII.11 identificato nel 2017. L'analisi filogenetica di questa sequenza conferma l'appartenenza del ceppo al genotipo GII.11, e risulta correlata a NoVs identificati in Giappone nel 1997 e in Sud Corea nel 2007. I campioni positivi per NoVs (26) sono stati sottoposti a sequenziamento di una porzione maggiore del gene RdRp, ottenendo 14 sequenze di circa 800 pb, per le quali è in corso l'analisi filogenetica.

DISCUSSIONE

I dati riportati in questo studio indicano la presenza di NoVs nella popolazione suina presente in Veneto con circolazione di due diversi genotipi GII (GII.11 e GII.18). Il campionamento eseguito nell'ambito del presente studio, ha identificato per la prima volta la circolazione del GII.18 in suini in Italia e Europa. La differente distribuzione dei positivi tra le due regioni nel 2018, potrebbe essere associata alla differente modalità di campionamento, ovvero in allevamento (Veneto) o al macello (Veneto e FVG) e anche alla differente classe di età dei soggetti campionati (nel 2018 sono stati campionati suini dai 30 gg ai 9 mesi). Inoltre è da notare che l'aumento del numero di positività nel 2018 corrisponde all'identificazione di un diverso genotipo ovvero il GII.18. Tale dato indica l'importanza di un appropriato campionamento, al fine di individuare la presenza di NoVs e tracciarne la diversità genetica. Alla luce dei risultati ottenuti, la presenza di NoVs nella popolazione suina del nord-est italiano è stata rilevata principalmente nei suini all'ingrasso, tuttavia tale dato dovrebbe essere confermato da ulteriori indagini. La scarsità di dati e sequenze disponibili in database pubblici sui NoVs nella popolazione suina Italiana ed Europea, limitano la comprensione sulla diffusione di questi virus in particolare dei NoVs GII e la formulazione di ipotesi sulla loro origine ed evoluzione.

La maggior parte delle sequenze di NoVs disponibili in GenBank sono relative ad un frammento di 300 bp del gene RdRp e per la comparabilità dei dati, l'analisi filogenetica del presente studio è stata eseguita utilizzando lo stesso frammento del gene RdRp. Tuttavia per una migliore caratterizzazione di questi virus è importante poter disporre di maggiori informazioni genetiche, in particolare quella del gene VP1, codificante una proteina capsidica a cui sono associate le principali caratteristiche antigeniche del virus.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro dimostra la co-circolazione di due differenti genotipi di NoVs nella popolazione suina del Nord-Est, la cui diffusione andrebbe monitorata nel tempo al fine di comprenderne i meccanismi evolutivi e di trasmissione inter-specie. Le generazioni di sequenze di NoVs suini costituisce un importante contributo per comprendere l'evoluzione di questi virus e per studiarne i meccanismi di trasmissione inter-specie. Tuttavia rimangono delle domande aperte riguardo l'epidemiologia di tale infezione, il ruolo dei suini nella trasmissione e nel mantenimento di NoVs GII e il potenziale zoonotico di NoVs del suino.

RINGRAZIAMENTI

Il presente studio è stato finanziato dal Ministero della Salute (IZSVE RC12/15). Un particolare ringraziamento è rivolto ai veterinari libero professionisti e non che hanno collaborato durante i campionamenti ed in particolare il: Dott.Daniele Boffo, Dott. Stefano Adami e Dott. Fabrizio Cestaro.

BIBLIOGRAFIA

1. Belliot G., Lopman B.A., Ambert-Balay K., Pothier P. (2014) "The burden of norovirus gastroenteritis: an important foodborne and healthcare-related infection". *Clin Microbiol Infect* 20:724-30.
2. Mathijs E., Stals A., Baert L., Botteldoorn N., Denayer S., Mauroy A. et al. (2012) "A review of known and hypothetical transmission routes for noroviruses" *Food Environ Virol* 4:131-52.
3. Nenonen N.P., Hannoun C., Svensson L., Toren K., Andersson L.M., Westin J. et al. (2014) "Norovirus GII.4 detection in environmental samples from patient rooms during nosocomial outbreaks" *J Clin Microbiol* 52:2352-8.
4. De Rougemont A., Ambert-Balay K., Belliot G., Pothier P. (2010) "Norovirus infections: an overview" *Med Sci (Paris)* 26:73-8.

5. Vinjé JI. (2015) “Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus” *J Clin Microbiol.* 53(2):373-81.
6. Bull R.A., Hansman G.S., Clancy L.E., Tanaka M.M., Rawlinson W.D., White P.A. (2005) “Norovirus Recombination in ORF 1/2 overlap” *Emerg Infect Dis* 11:1079–85.
7. Ramani S1, Atmar RL, Estes MK. (2014) Epidemiology of human noroviruses and updates on vaccine development. *Curr Opin Gastroenterol.* 30(1):25-33.
8. Mattison K., Shukla A., Cook A., Pollari F., Friendship R., Kelton D., Bidawid S., Farber J.M. (2007) “Human norovirus in swine and cattle” *Emerg Infect Dis* 13:1184-88.
9. Wang Q-H., Han M.G., Cheetham S., Souza M., Funk J.A., Saif L.J. (2005) “Porcine noroviruses related to human noroviruses” *Emerg Infect Dis* 11:1874–1881.
10. Machnowska P., Ellerbroek L., Johne R. (2014) “Detection and characterization of potentially zoonotic viruses in faeces of pigs at slaughter in Germany” *Vet Microbiol* 168:60-8.
11. Silva P.F., Alfieri A.F., Barry A.F., de Arruda Leme R., Gardinali N.R., van der Poel W.H. et al. (2015) “High frequency of porcine norovirus infection in finisher units of Brazilian pig-production systems” *Trop Anim Health Prod* 47:237-41.
12. Di Bartolo I., Tofani S., Angeloni G., Ponterio E., Ostanello F., Ruggeri F.M. (2014) “Detection and characterization of porcine caliciviruses in Italy” *Arch Virol* 159:2479-84.
13. Jiang X., Huang P.W., Zhong W.M., Farkas T., Cubitt D.W., Matson D.O. (1999) “Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR” *J Virol Methods* 83:145-154.

Tabella 1. Risultati ottenuti mediante end point RT-PCR e sequenziamento suddivisi per tipologia di matrice.

Table 1. Results obtained by endpoint RT-PCR and sequencing according to the type of the original sample matrix.

	Positivi Calicivirus			Negativi
	Norovirus	Sapovirus	Non sequenziabili	
Feci	26	19	15	245
Intestini	0	1	0	23
Totale	26	20	15	268

Tabella 2. Origine e anno di campionamento dei positivi Norovirus e Sapovirus.

Table 2. Province of origin and sampling year of the Norovirus and Sapovirus positive samples.

	Norovirus			Sapovirus			Totale
	2017	2018	2019	2017	2018	2019	
Padova*	1	4	0	0	5	0	10
Rovigo	0	1	0	0	0	0	1
Treviso*	0	11	0	0	5	0	16
Vicenza	0	4	0	0	0	0	4
Verona	1	3	1	1	7	1	14
Udine	0	0	0	1	0	0	1
Totale	2	23	1	2	17	1	46

*Province in cui è stato individuato NoVs GII.18, i rimanenti campioni positivi per NoV sono stati classificati come GII.11.

*Provinces in which was identified NoVs GII.18, the remaining NoVs positive samples were classified as GII.11.



Figura 1. Albero filogenetico, costruito con metodo ML e modello di sostituzione nucleotidica, K2P di un frammento del gene RdRp di 300 bp. Le sequenze dei NoV suini italiani identificati in questo studio (mostrati in rosso) sono stati allineati con le sequenze di riferimento RdRp di NoV umani e suini disponibili in GenBank.

Figure 1. Phylogenetic tree, constructed with ML method and K2P model of nucleotide substitution, of a 300bp RdRp gene fragment. Sequences of Italian swine NoVs identified in this study (shown in red) aligned with the RdRp reference sequences of human and swine NoVs available in GenBank.

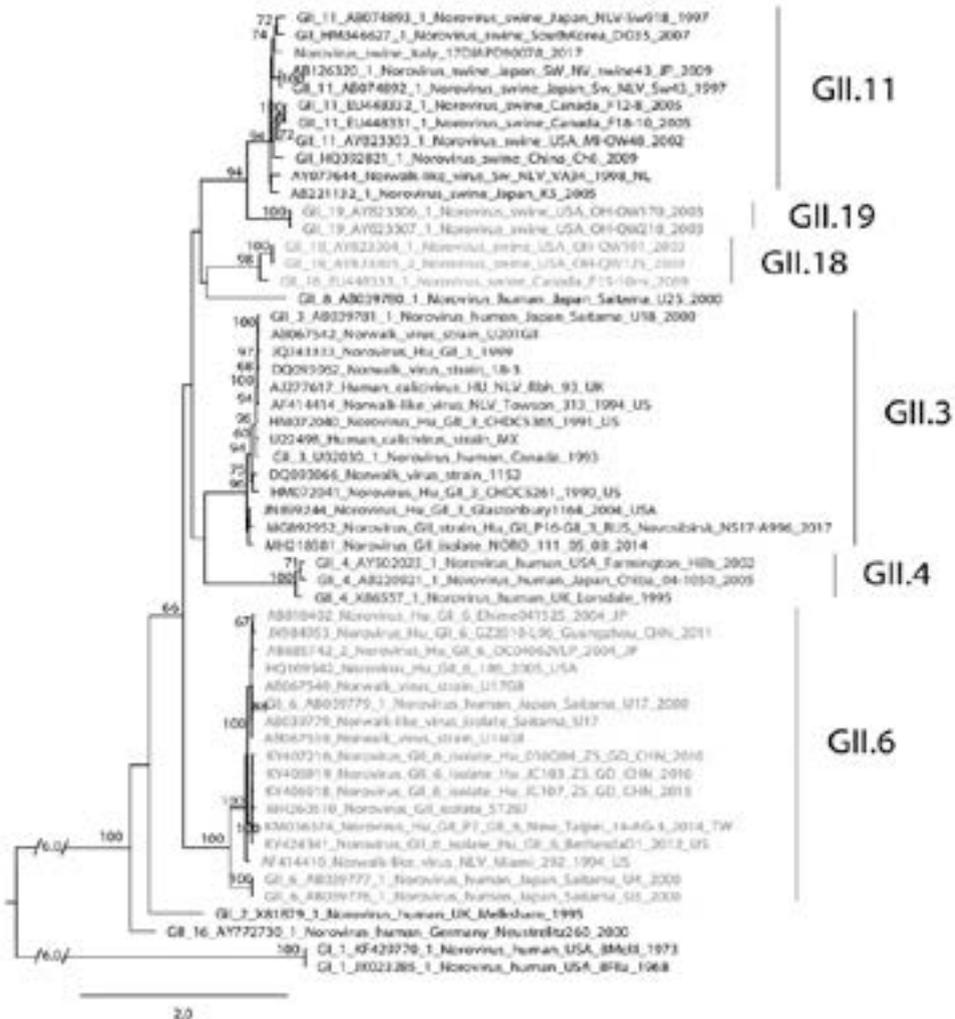


Figura 2. Albero filogenetico, costruito con metodo ML e modello di sostituzione nucleotidica SYM + R4 di un frammento di gene VP1 di 1700bp. La sequenza VP1 di NoV suino italiana identificata in questo studio (mostrata in rosso) è allineata con le sequenze di riferimento VP1 di NoV umani e suini disponibili in GenBank.

Figure 2. Phylogenetic tree, constructed with ML method and SYM+R4 model of nucleotide substitution, of a 1700bp VP1 gene fragment. VP1 sequence of Italian swine NoVs identified in this study (shown in red) was aligned with the VP1 reference sequences of human and swine NoVs available in GenBank.