

Epatite virale da adenovirus canino tipo 1: indagine retrospettiva su ceppi virali identificati in fegati inclusi in paraffina



Dagli anni Settanta in poi, l'intensa pratica vaccinale ha consentito un efficace controllo dell'epatite infettiva canina o epatite di Rubarth sostenuta dall'adenovirus canino di tipo 1 (CAAdV-1). Ciò nonostante, ancora oggi vengono segnalati focolai di malattia. Per valutare le differenze genetiche esistenti tra i ceppi di CAAdV-1 che circolavano nella popolazione canina italiana in epoca precedente alla vaccinazione ed i ceppi virali recentemente identificati è stata effettuata un'indagine retrospettiva su sezioni di fegato di cane incluse in paraffina, con lesioni istologiche riconducibili all'infezione da CAAdV-1. Otto cani deceduti negli anni 1961-1969 ed uno deceduto nel 2010 sono stati selezionati e la diagnosi molecolare di infezione da CAAdV-1 è stata effettuata su estratti di DNA da tessuti in paraffina amplificando il tratto terminale del gene E3.

L'analisi eseguita sulle sequenze nucleotidiche ottenute e su quelle di referenza ha evidenziato una completa identità tra i virus identificati nei cani deceduti prima del 1970 e tra questi ed i virus identificati negli ultimi anni in Italia. I risultati ottenuti suggeriscono che, prima della diffusione della pratica vaccinale nei confronti dell'epatite infettiva canina, circolasse in Italia un unico ceppo di CAAdV-1, o ceppi molto simili, e che questo possa essere tuttora presente sul territorio nazionale, anche se sarà necessario un ampliamento della casistica e delle porzioni di genoma sequenziate per confermare tale ipotesi. Inoltre, questo studio evidenzia la capacità dei test molecolari di rilevare il DNA virale in preparati istologici datati, con importanti implicazioni per la diagnosi retrospettiva e per gli studi di evoluzione molecolare.

Andrea Balboni,
DVM, PhD

Livia Guarin,
Med Vet

Giuliano Bettini,
Prof

Mara Battilani*,
Prof

INTRODUZIONE

L'adenovirus canino di tipo 1 (CAAdV-1), responsabile dell'epatite infettiva di Rubarth, e l'adenovirus canino di tipo 2 (CAAdV-2), responsabile della tracheobronchite infettiva o tosse dei canili, appartengono alla famiglia *Adenoviridae*, genere *Mastadenovirus*¹.

I due virus si differenziano geneticamente, per tropismo cellulare ed antigenicamente, essendo distinguibili mediante siero neutralizzazione ed inibizione dell'emoagglutinazione^{1,2}.

Il CAAdV-1 infetta i carnivori appartenenti alle famiglie *Canidae*, *Mustelidae* ed *Ursidae*^{3,4}, determinando prevalentemente epatite a corpi inclusi basofili nei domestici e forme encefaliche nei selvatici. Sono state inoltre segnalate forme encefaliche in cuccioli immunodepressi⁵ ed epatiti nelle volpi^{6,7}. Dagli anni '70, l'utilizzo di un vaccino vivo modificato allestito con CAAdV-2, che conferisce cross-protezione per entrambi i tipi virali, ha permesso un efficace controllo della malattia ma non l'eradicazione^{3,8}. Pertanto, anche se ad oggi l'epatite in-

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra 50, 40064, Ozzano Emilia (BO), Italy

* Corresponding author (mara.battilani@unibo.it)

Ricevuto: 06/10/2014 - Accettato: 18/03/2015

fettiva viene scarsamente considerata dai veterinari liberi professionisti, vengono tuttora segnalati focolai di malattia. In Italia, gli ultimi focolai di epatite infettiva nel cane domestico sono stati riportati nelle province di Brindisi, Matera e Bari, tra il Febbraio del 2001 ed il Gennaio del 2006⁹ ed uno studio del 2011 ha evidenziato la circolazione di entrambi i tipi virali nelle volpi in provincia di Pisa¹⁰.

Questo studio si è prefissato l'obiettivo di valutare le differenze genetiche esistenti tra i ceppi di CAAdV-1 circolanti nella popolazione canina italiana precedentemente alla diffusione della vaccinazione ed i ceppi virali recentemente identificati.

Indagine retrospettiva su sezioni di fegato di cane incluse in paraffina.

A tale scopo è stata effettuata una indagine retrospettiva su sezioni di fegato di cane incluse in paraffina, con lesioni istologiche tipicamente riconducibili all'infezione da CAAdV-1, presenti nell'archivio del Servizio di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) dell'Università di Bologna.

MATERIALI E METODI

Selezione dei campioni oggetto dello studio

I campioni di fegato inclusi in paraffina e cera d'api al 3% di otto cani deceduti tra il 1961 ed il 1969 sono stati selezionati dall'archivio del Servizio di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) dell'Università di Bologna, sulla base delle alterazioni tipicamente riferibili ad epatite di Rubarth rilevate agli esami necroscopici ed istologici.

Inoltre, un campione di fegato incluso in paraffina appartenente ad un cane deceduto nel 2010 che presentava, sia all'esame necroscopico che a quello istologico, lesioni riferibili ad ICH è stato incluso nello studio. I

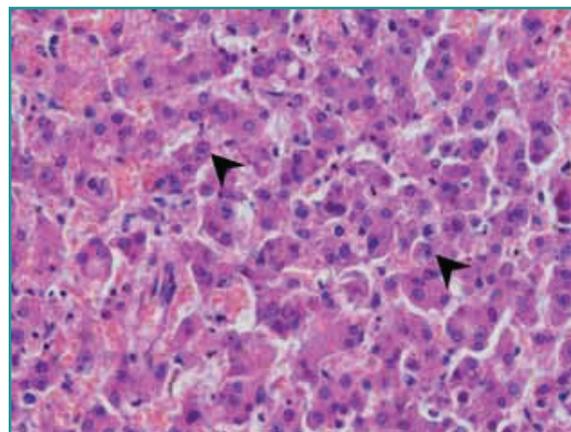


Figura 1 - Cane, fegato, evidenti numerosi corpi inclusi intranucleari (Ematossilina-Eosina, 40X).

soggetti selezionati (riportati in Tabella 1) presentavano all'esame necroscopico: petecchie in mucose e sierose, congestione epatica e splenica, enterite emorragico-catarrale e presenza di essudato sieroso-emorragico-fibrinoso in cavità peritoneale.

All'esame istologico, eseguito su sezioni epatiche con colorazione ematossilina-eosina, era evidenziabile una grave epatite necrotizzante con corpi inclusi basofili intranucleari (Figura 1).

Estrazione del DNA da tessuto incluso in paraffina

Porzioni dello spessore di 16-25 µm sono state tagliate da ciascun campione di fegato e destinate all'estrazione del DNA. Per eliminare la paraffina, i campioni sono stati trattati con una miscela di isoparaffine, Solvent Plus (Carlo Erba, Rodano, MI, Italy). Le sezioni istologiche sono state sottoposte a due lavaggi consecutivi con 1500 µl di Solvent Plus a temperatura ambiente per 15 minuti seguiti da centrifugazione a 14000 rpm per 5 minuti. Eliminato il surnatante, per asportare i residui di Solvent Plus, sono stati effettuati due lavaggi con 1500 µl di alcool etilico assoluto (100% v/v) seguiti da centrifugazione a 14000 rpm per 5 minuti. Eventuali residui di alcool etilico sono inoltre stati eliminati per evaporazione, sottoponendo il pellet ad incubazione a 37 °C per 15 minuti.

Terminata l'operazione di eliminazione della paraffina, l'estrazione del DNA è stata effettuata tramite un kit commerciale a colonnine, Nucleo Spin Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germany) seguendo le istruzioni del produttore. Gli estratti di DNA sono stati conservati a -20°C.

Tabella 1 - Cani inclusi nello studio				
Cane	Data del decesso	Razza	Sesso	Età
379	1961	Meticcio	M	3m
378	1962	Cocker	M	1m
380	1964	Segugio svizzero	ND	3m
381	1966	ND	ND	ND
382	1966	ND	ND	ND
383	1966	Bracco	ND	4a
384	1966	Cocker	ND	ND
385	1969	Pastore tedesco	M	6a
313	2010	Meticcio	F	3a

ND: non disponibile.

La diagnosi di infezione da CA_{AdV}-1 è stata effettuata amplificando il tratto terminale del gene E3 e regioni limitrofe mediante una metodica di polymerase chain reaction (PCR).

Amplificazione del DNA virale

La diagnosi di infezione da CA_{AdV}-1 è stata effettuata amplificando il tratto terminale del gene E3 e regioni limitrofe mediante una metodica di polymerase chain reaction (PCR) in grado di distinguere il CA_{AdV}-1 dal CA_{AdV}-2 poiché si producono ampliconi di dimensioni differenti, rispettivamente di 508 bp e 1030 bp^{11,12}. La PCR è stata eseguita utilizzando la Taq DNA-polymerase Kit (QIAGEN, Hilden, Germania). Come controlli positivi di reazione sono stati utilizzati: il DNA estratto dal vaccino CanigenCEPPi/L (Virbac, Carros, Francia) allestito con il ceppo CA_{AdV}-2 Toronto A26/61 attenuato ed il DNA estratto dal campione di fegato 113-5L di volpe rossa (*Vulpes vulpes*) precedentemente testato e risultato positivo per CA_{AdV}-1 (sequenza con numero di accesso GenBank JX416839)¹⁰. Durante l'esecuzione della reazione sono state adottate tutte le precauzioni standard per evitare eventuali contaminazioni ed un bianco di reazione, costituito da acqua ultrapura, è stato incluso nella reazione per escludere eventuali falsi positivi.

Al termine della reazione di amplificazione, i prodotti della PCR sono stati valutati sottoponendo a corsa elettroforetica in gel d'agarosio all'1,5% 5 µl di ogni ampli-

cane (p/v) colorato con bromuro di etidio in buffer TAE (standard tris-acetate-EDTA) insieme al marker 1 Kb DNA Ladder (New England, BioLabs, Ipswich, MA, USA) per valutare la dimensione degli amplificati. Al termine della corsa elettroforetica, la visualizzazione degli amplificati è avvenuta con il transilluminatore a luce UV.

Sequenziamento ed analisi delle sequenze

I prodotti di PCR ottenuti delle dimensioni attese sono stati purificati utilizzando il kit High Pure PCR Product Purification (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania) e sequenziati direttamente, sia con il primer forward che con il primer reverse, utilizzando il sequenziatore ABI 3730xl 96-capillary DNA Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

Le sequenze nucleotidiche sono state assemblate e tradotte in sequenze aminoacidiche tramite il programma BIOEDIT sequence alignment editor version 7.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Le sequenze nucleotidiche assemblate sono state allineate con 12 sequenze di referenza di adenovirus canino e di pipistrello presenti nel database di GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). In particolare, due ceppi virali di referenza sono stati identificati in volpi rosse italiane nel 2011¹⁰. Le sequenze di referenza utilizzate sono riportate in Tabella 2. Le relazioni filogenetiche delle sequenze nucleotidiche ottenute, insieme con le sequenze di referenza, sono state elaborate utilizzando il software MEGA versione 5.05¹³. Il modello di distanza evolutiva è stato scelto utilizzando la funzione Find Best DNA/Protein Model implemen-

Tabella 2 - Sequenze di referenza di adenovirus utilizzate

Virus	Codice identificativo di GenBank	Provenienza	Anno di isolamento o identificazione	Ospite	Nomenclatura utilizzata
CA _{AdV} -1_ceppo B579	GQ340423	India	2006	cane	CA _{AdV} -1_B579_GQ340423
CA _{AdV} -1_ceppo vaccinale CLL	U55001	/	1996*	/	CA _{AdV} -1_CLL_U55001
CA _{AdV} -1_ceppo RI261	Y07760	Inghilterra	1996	cane	CA _{AdV} -1_RI261_Y07760
CA _{AdV} -1	EF057101	India	2006	cane	CA _{AdV} -1_India2006_EF057101
CA _{AdV} -1_ceppo vaccinale GLAXO	M60937	/	1991*	/	CA _{AdV} -1_GLAXO_M60937
CA _{AdV} -1_ceppo Utrecht	S38238	Olanda	1992*	cane	CA _{AdV} -1_Utrecht_S38238
CA _{AdV} -1_ceppo 09-13F	JX416838	Italia	2011	volpe	CA _{AdV} -1_09-13F_JX416838
CA _{AdV} -1_ceppo 113-5L	JX416839	Italia	2011	volpe	CA _{AdV} -1_113-5L_JX416839
CA _{AdV} -2_ceppo Toronto A26/61	CAU77082	Canada	1961	cane	CA _{AdV} -2_TA26/61_CAU77082
CA _{AdV} -2_ceppo Manhattan	S38212	USA	1992*	cane	CA _{AdV} -2_Manhattan_S38212
BtAdV_ceppo TJM	GU226970	Cina	2009	pipistrello	BtAdV_TJM_GU226970
BtAdV-2_ceppo PPV1	JN252129	Germania	2011	pipistrello	BtAdV-2_PPV1_JN252129

* Per queste sequenze è stato indicato l'anno di inserimento del database di GenBank poiché l'anno di isolamento/identificazione del virus non era disponibile.

tata in MEGA (<http://www.megasoftware.net/>) e, dall'analisi effettuata, il modello Kimura 2-parametri con χ distribution è risultato il migliore per tutte le sequenze. L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando il metodo neighbor-joining ed i valori di bootstrap sono stati determinati mediante 1.000 ripetizioni dell'analisi per valutare il livello di confidenza di ogni ramo dell'albero.

RISULTATI

L'amplificazione della porzione terminale del gene E3 e delle regioni limitrofe ha dato origine ad ampliconi delle dimensioni di 508 bp per tutti i 9 soggetti analizzati, specifici per l'adenovirus canino di tipo 1¹¹. Per sei degli otto campioni risalenti al 1961-1969 (soggetti 379/1961, 378/1962, 382/1966, 383/1966, 384/1966 e 385/1969) e per il soggetto del 2010 (313/2010) sono state ottenute sequenze nucleotidiche della lunghezza di 462 bp, che comprendevano gli ultimi 285 bp del gene E3 (corrispondenti agli ultimi 94 aminoacidi della proteina E3 più il codone di stop).

L'allineamento delle sequenze ottenute con le 12 sequenze di riferimento riportate in Tabella 2 ha consentito di calcolare le seguenti percentuali di identità. I virus identificati nei cani risalenti al 1961-1969 mostravano un'identità del 100% tra di loro, con il virus 313/2010 identificato nel 2010, con i ceppi virali identificati nelle volpi italiane nel 2011 (09-13F_JX416838 e 113-5L_JX416839), con il ceppo vaccinale GLAXO_M60937 e con il ceppo RI261_Y07760 identificato in Inghilterra nel 1996. Percentuali di identità nucleotidica inferiori al 100%, ma comunque superiori al 99%, sono

state invece riscontrate nel confronto con i restanti ceppi di riferimento di CAdV-1. La traduzione delle sequenze nucleotidiche in sequenze aminoacidiche ha permesso di evidenziare che gli ultimi 94 residui della proteina E3 sono conservati in tutte le sequenze ottenute, così come tra queste ed i ceppi di CAdV-1: 09-13F, 113-5L, RI261 e GLAXO. L'albero filogenetico, costruito con le sequenze ottenute in questo studio e con le sequenze di riferimento, mostra una chiara suddivisione delle sequenze di adenovirus canino in due cluster principali supportati da elevati valori di bootstrap: il gruppo dei CAdV-1 ed il gruppo dei CAdV-2. Tutte le sequenze di 462bp ottenute in questo studio sono raggruppate nel cluster dei CAdV-1 (Figura 2).

DISCUSSIONE

In questo studio è stata effettuata una indagine retrospettiva per valutare le differenze genetiche esistenti tra i ceppi di CAdV-1 circolanti nella popolazione canina italiana precedentemente alla diffusione del vaccino ed i ceppi virali recentemente identificati in Italia, nonché con i ceppi di riferimento disponibili nel database di GenBank. A tale scopo, sono state ottenute le sequenze nucleotidiche di una porzione del genoma, corrispondente al tratto terminale del gene E3 e regioni limitrofe, di virus identificati in campioni di fegato inclusi in paraffina: sei virus identificati in cani deceduti tra il 1961 ed il 1969 ed uno in un cane deceduto nel 2010. I campioni di fegato di altri due cani deceduti tra il 1961 ed il 1969 sono risultati positivi in PCR ma non è stato possibile sequenziarne il prodotto di amplificazione, probabilmente a causa della lunga conservazione nel tempo del DNA in paraffina e cera d'api che può aver comportato una parziale degradazione degli acidi nucleici.

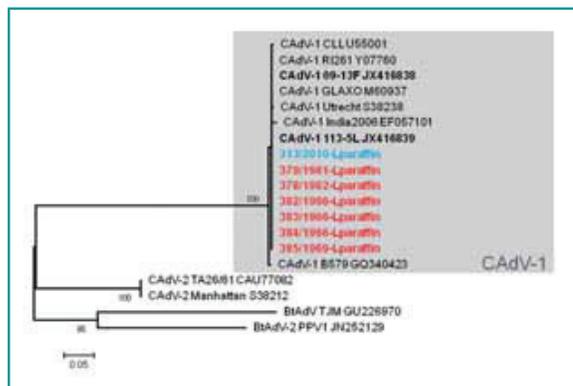


Figura 2 - Albero filogenetico costruito con le sequenze di adenovirus canino e di pipistrello.

L'albero filogenetico è stato costruito con le sequenze nucleotidiche ottenute in questo studio e con le sequenze di riferimento di CAdV-1, CAdV-2 e Bat AdV presenti nel database di GenBank. I valori di bootstrap maggiori dell'80%, calcolati su 1.000 ripetizioni, sono indicati in corrispondenza dei rispettivi rami. In rosso: sequenze ottenute da cani deceduti nel 1961-69. In blu: sequenza ottenuta dal cane deceduto nel 2010. In grassetto: virus identificati in volpi rosse italiane nel 2011.

L'analisi eseguita sulle sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche ha evidenziato una completa identità tra i sei virus identificati nei cani deceduti nel 1961-1969 e tra questi ed i virus identificati negli ultimi anni in Italia.

L'analisi eseguita sulle sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche ha evidenziato una completa identità tra i sei virus identificati nei cani deceduti nel 1961-1969 e tra questi ed i virus identificati negli ultimi anni in Italia nel cane (313/2010) e, in un precedente studio, nella volpe¹⁰. Dai risultati ottenuti si può quindi supporre che negli anni compresi tra il 1961 ed il 1969, prima della diffusione della pratica vaccinale nei confronti dell'epatite infettiva canina, circolasse in Italia un unico ceppo di CAdV-1, o ceppi molto simili tra loro, e che questo possa essere tuttora presente sul territorio nazionale sia nel cane domestico

che nella popolazione selvatica. Tale supposizione viene però fatta sulla base di una casistica limitata e di sequenze nucleotidiche relativamente ridotte (circa 500 bp), non rappresentative dell'intero genoma virale di circa 40.000 bp. Studi futuri sarebbero quindi necessari sia per incrementare la casistica attuale di cani infetti da CAdV-1 sia per valutare la variabilità di sequenza di porzioni genomiche più estese, focalizzando l'attenzione su geni teoricamente più variabili in quanto codificanti per proteine strutturali che rivestono un ruolo importante nell'infettività e nell'evocare la risposta immunitaria. Dai dati emersi viene comunque evidenziato come il CAdV-1 sia un virus geneticamente molto stabile; infatti, in un lasso di tempo di circa 50 anni, non sono state introdotte mutazioni nucleotidiche nel tratto genomico analizzato. Per avere un quadro più completo sulla scarsa variabilità genetica del CAdV-1 emersa in questo studio, in futuro sarebbe inte-

ressante includere nell'analisi stipti virali identificati recentemente in altre parti d'Italia ed in cani provenienti dall'Est Europa⁹.

La possibilità di testare con metodiche molecolari preparati istologici aventi più di 40 anni può avere importanti ripercussioni pratiche.

Inoltre, la possibilità di testare con metodiche molecolari preparati istologici aventi più di 40 anni può avere importanti ripercussioni pratiche, sia per confermare la presenza del DNA virale e svolgere indagini retrospettive su campioni raccolti prima dell'avvento delle tecniche di diagnostica biomolecolare, sia per valutare la variabilità genetica degli stessi virus e svolgere indagini di evoluzione molecolare.

PUNTI CHIAVE

- L'epatite infettiva viene oggi scarsamente considerata dai veterinari liberi professionisti ma vengono tuttora segnalati focolai di infezione.
- Indagine retrospettiva per valutare le differenze genetiche tra i ceppi di adenovirus canino di tipo 1 (CAdV-1) circolanti in Italia prima della vaccinazione ed i ceppi virali recentemente identificati.
- Il CAdV-1 è stato identificato mediante PCR in sezioni di fegato di cane incluse in paraffina, con lesioni istologiche riconducibili ad epatite infettiva.
- L'analisi eseguita sulle sequenze nucleotidiche ottenute ha evidenziato una completa identità tra i virus identificati nei cani deceduti prima del 1970 e tra questi ed i virus identificati negli ultimi anni in Italia.
- La capacità dei test molecolari di rilevare il DNA virale in preparati istologici aventi più di 40 anni ha importanti implicazioni per la diagnosi retrospettiva e per gli studi di evoluzione molecolare.

Canine adenovirus type 1 hepatitis: retrospective investigation on viral strains identified in formalin-fixed, paraffin-embedded liver

Summary

From the Seventies, widespread vaccination has allowed an effective control of the infectious canine hepatitis (ICH) caused by the canine adenovirus type 1 (CAdV-1). However, cases of ICH are still reported. To assess the genetic differences between the Italian CAdV-1 strains spreading in the dogs population before the introduction of extensive vaccination and the strains recently identified, a retrospective study was performed on sections of paraffin-embedded liver of dogs with histological lesions typically related to CAdV-1 infection. Eight dogs dead in 1961-69 and a dog dead in 2010 were selected and diagnosis of CAdV-1 infection was performed on DNA extracted from paraffin-embedded tissues by amplifying a portion of the E3 gene.

The analysis performed on the obtained nucleotide sequences and reference sequences showed a complete identity between the viruses identified in dogs dead before the 1970, and between them and viruses identified in recent years in Italy. Therefore, these results suggest that before the vaccination against ICH, a single strain of CAdV-1, or very similar strains, was circulating in Italy and that it may still be present on the national territory. This hypothesis needs to be confirmed by increasing the number of infected dogs tested and analyzing larger portions of the viral genome. In addition, the ability of molecular tests performed on old histological preparations to give positive results has important implications in the retrospective diagnosis and in the study of viral evolution.

BIBLIOGRAFIA

1. King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, *et al.* Virus taxonomy: IXth Report of the international committee on taxonomy of viruses. London: Elsevier Academic Press, 2011, pp. 125-141.
2. Knowles DP. *Adenoviridae*. In: MacLachlan NJ, Dubovi EJ. Ed. Fenner's veterinary virology, Fourth ed. Elsevier Inc., 2011, pp. 203-208.
3. Greene CE. Infectious canine hepatitis and canine acidophil cell hepatitis. In: Greene CE. Ed. Infectious diseases of the dog and cat, Fourth ed. Elsevier Inc., 2012, pp. 42-48.
4. Woods LW. Adenoviral disease. In: Williams ES, Barker IK. Ed. Infectious disease of wild mammals, Third edition. Ames: Iowa State University Press, 2001, pp.202-204.
5. Caudell D, Confer AW, Fulton RW, *et al.* Diagnosis of Infectious canine hepatitis virus (CAV-1) infection in puppies with encephalopathy. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 17:58-61, 2005.
6. Gerhold RW, Allison AB, Temple DL, *et al.* Infection canine hepatitis in a gray fox (*Urocyon cinereoargenteus*). Journal of Wildlife Diseases 43(4):734-736, 2007.
7. Thompson H, O'Keeffe AM, Lewis JCM, *et al.* Infectious canine hepatitis in red foxes (*Vulpes vulpes*) in the United Kingdom. Veterinary Records 166:111-114, 2010.
8. Decaro N, Martella V, Buonavoglia C. Canine Adenoviruses and Herpesvirus. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice 38:799-814, 2008.
9. Decaro N, Campolo M, Elia G, *et al.* Infectious canine hepatitis: An "old" disease reemerging in Italy. Research in Veterinary Science 83:269-273, 2007.
10. Balboni A, Verin R, Morandi F, *et al.* Molecular epidemiology of canine adenovirus type 1 and type2 in free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. Veterinary Microbiology, 162(2-4):551-557, 2012.
11. Hu RL, Huang G, Qiu W, *et al.* Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. Veterinary Research Communications 25:77-84, 2001.
12. Chaturvedi U, Tiwari AK, Ratta B, *et al.* Detection of canine adenoviral infections in urine and faeces by the polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods 149:260-263, 2008.
13. Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28:2731-2739, 2011.

@nmvi Oggi
 L'informazione Veterinaria On Line
 ANMVI Quotidiano dell'Associazione Nazionale Medici Veterinari Italiani

2.107.124
visite in un anno

175.593 visite mensili	40.521 visite settimanali	5.772 visite giornaliere
----------------------------------	-------------------------------------	------------------------------------

**I NUMERI NON HANNO
 BISOGNO DI COMMENTI**

Dato dal 1 agosto 2014 al 31 luglio 2015
 www.anmvioggi.it • marketing@evsrl.it