

## EVIDENZIAMENTO DI MAEDI VISNA VIRUS NEI LINFONODI POPLITEI DI PECORE INFETTATE PER VIA RESPIRATORIA

### DETECTION OF MAEDI VISNA VIRUS IN THE POPLITEAL LYMPH NODES OF SHEEP INFECTED BY RESPIRATORY ROUTE

Prezioso S, Magi GE, Valente C<sup>1</sup>, Cuteri V Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Camerino, Matelica (MC); <sup>1</sup>Dipartimento di Patologia Diagnostica e Clinica Veterinaria, Università di Perugia, Perugia

**Parole chiave:** Maedi Visna Virus, pecora, linfonodi poplitei, PCR, immunistochemica

**Key words:** Maedi Visna Virus, sheep, popliteal lymph nodes, PCR, immunohistochemistry

**SUMMARY** – In order to verify the presence of Maedi Visna Virus (MVV) in lymph nodes that are not tributary of the viral target organs, popliteal lymph nodes from four experimentally infected sheep have been analysed by immunohistochemistry and PCR. The sheep were infected via tracheal inoculation about three years earlier. No macroscopical and histological lesions have been found in the popliteal lymph node samples, while the viral antigen p25 and a sequence of the LTR gene of MVV have been detected respectively by immunohistochemistry and PCR. These results confirm that MVV infection is not limited to the target organs and show that the virus can replicate in popliteal lymph nodes in absence of detectable lesions.

**INTRODUZIONE** – Maedi Visna Virus (MVV) è un *Lentivirus* della famiglia *Retroviridae* che colpisce prevalentemente la pecora, provocando un'infezione cronica linfoproliferativa principalmente al polmone (Maedi), sistema nervoso centrale (Visna), mammella e articolazioni. Il virus può integrare il proprio genoma in quello della cellula ospite e l'infezione persiste per tutta la vita dell'animale nonostante la presenza di una risposta immunitaria specifica (1). Le cellule della linea monocito-macrofagica sono da sempre considerate target dell'infezione, ma il virus è stato evidenziato anche in altri tipi di cellule, come fibroblasti, cellule dendritiche, cellule epiteliali, cellule endoteliali, adipociti e cellule della microglia. (2, 3). Oltre che nel polmone, mammella, articolazione e sistema nervoso centrale, MVV è stato rilevato anche nel rene, fegato, cuore, milza, midollo osseo e terza palpebra di pecore infette (2, 4-6). In studi effettuati su pecore sperimentalmente infettate e con lesioni polmonari e mammarie, l'antigene virale p25 è stato evidenziato nei linfonodi mediastinici e mammari, indipendentemente dal grado di lesione presente negli organi drenati (5). La capacità di MVV di integrare il proprio genoma e replicare in cellule linfonodali è stata più volte evidenziata in studi di inoculazione cutanea del virus ed analisi dei linfonodi drenanti mediante tecniche di cannulazione linfatica (7). Tuttavia, ad oggi, le ricerche finalizzate a valutare la presenza di MVV in sede linfonodale sono molto limitate.

Nel presente lavoro si è voluto verificare la capacità di MVV di infettare e replicare in sede linfonodale, indipendentemente dal drenaggio di organi target del virus ed allo scopo sono stati analizzati i linfonodi poplitei di pecore infettate sperimentalmente per via respiratoria.

**MATERIALI E METODI** – Sono stati utilizzati campioni d'archivio prelevati da quattro pecore che erano state infettate sperimentalmente per via intratracheale circa tre anni prima di essere sottoposte ad esame necroscopico (5). I linfonodi poplitei erano stati suddivisi in due aliquote, la prima fissata in formalina ed inclusa in paraffina, la seconda congelata a -80°C.

I campioni in paraffina sono stati utilizzati per l'esame istopatologico previa colorazione con ematossilina-eosina e per l'esame immunistochemico. La prova immunistochemica è stata effettuata con metodo ABC-perossidasi (5), utilizzando un anticorpo monoclonale anti-p25 di MVV (VMRD Inc., Pullman, WA, USA).

I campioni congelati sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA con kit commerciale (QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen) e per l'amplificazione mediante PCR. I primer impiegati in PCR erano specifici per un segmento del gene LTR di MVV ed erano LTR-F 5'- TGA CAC AGC AAA TGT AAC CGC AAG-3' e LTR-R 5'- CCA CGT TGG GCG CCA GCT GCG AGA-3' (8). Il mix di reazione era composto da buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, DNTPs 200µM, Taq

2U (Taq PCR Core Kit, Qiagen), ciascuno dei primer 0,5µM e DNA estratto 2µl, in un volume finale di 50 µl. Il programma di amplificazione consisteva in 94°C x 5 min, [94°C x 30 sec, 58°C x 30 sec, 72°C x 40 sec] x 35 cicli, 72°C x 7 min. Il prodotto di amplificazione è stato visualizzato mediante elettroforesi in gel di agarosio al 2% previa colorazione con bromuro d'etidio.

Il controllo negativo era rappresentato da linfonodi poplitei prelevati da pecore sieronegative regolarmente macellate, che non presentavano lesioni macroscopiche né istologiche a livello di polmoni e mammella. Il controllo positivo era stato ottenuto dal polmone di una pecora infettata sperimentalmente e con lesioni polmonari riconducibili ad infezione da MVV.

Gli esami istopatologici, immunoistochimici e di PCR sono stati eseguiti in doppio cieco da operatori diversi, senza alcuna possibilità di riconoscimento tra campioni da testare e controlli positivi e negativi.

**RISULTATI** – I linfonodi poplitei delle quattro pecore sperimentalmente infettate non presentavano alcuna lesione macroscopica al momento del campionamento. L'esame istopatologico non ha evidenziato alterazioni microscopiche dei tessuti. Una forte positività immunoistochimica è stata osservata nel citoplasma di cellule morfologicamente riconducibili a macrofagi in tutti i campioni esaminati. Il numero delle cellule positive risultava piuttosto variabile nei diversi linfonodi poplitei analizzati. La PCR ha evidenziato la presenza del DNA provirale nei quattro campioni testati, ottenendo un amplificato specifico dell'ampiezza attesa. Nei controlli negativi non sono state rilevate positività o segnali aspecifici.

**DISCUSSIONE** – Nel corso degli anni vari studi hanno evidenziato la presenza di MVV non solo a livello polmonare, mammario, nervoso ed articolare, ma anche in altri organi e in diverse popolazioni cellulari (2-6). I linfonodi rappresentano un target per alcuni *Lentivirus*, come HIV e FIV, mentre sono scarse le informazioni riguardo l'infezione da MVV in queste sedi. Indagini preliminari hanno dimostrato la presenza di MVV in linfonodi mediastinici e mammari di pecore con lesioni linfoproliferative a carico di polmone e mammella. In alcuni di questi linfonodi erano evidenti quadri di reattività linfonodale di diverso grado, con iperplasia e follicoli secondari (5). Nel presente lavoro sono stati presi in considerazione i linfonodi poplitei, sede ancora inesplorata per quanto riguarda l'infezione da MVV. Il virus è stato riscontrato in tutti i campioni di linfonodi poplitei prelevati da pecore che erano state infettate sperimentalmente per via respiratoria alcuni anni prima. L'evidenziazione dell'antigene virale e del DNA provirale in queste sedi dimostra per la prima volta che anche questi organi rappresentano un target per l'infezione, in assenza di lesioni macroscopicamente e microscopicamente rilevabili. Il ruolo dei linfonodi nella patogenesi della maedi-visna rimane tuttavia da chiarire. Considerando che il DNA provirale e l'antigene virale p25 sono stati rilevati a distanza di anni dall'infezione, i linfonodi poplitei potrebbero rappresentare una delle sedi di persistenza e replicazione di MVV, sebbene siano necessari studi più approfonditi per supportare questa ipotesi. Inoltre, trattandosi di linfonodi superficiali esplorabili, se il coinvolgimento dei linfonodi poplitei si confermerà costante, questi potrebbero costituire dei siti di prelievo *in vivo* per la diagnosi diretta dell'infezione.

MVV quindi, inizialmente ritenuto confinato a specifici organi, si rivela sempre più pantropo e responsabile di un'infezione sistemica. Ulteriori studi prenderanno in considerazione altre sedi linfonodali non tributarie di organi target del virus, al fine di verificarne l'eventuale coinvolgimento nell'infezione e di identificare più accuratamente le cellule virus-positivo attraverso la loro immunofenotipizzazione.

**BIBLIOGRAFIA** – (1) Pepin M et al (1998) Vet Res, 29, 341-367. (2) Brellou GD et al (2007) J Comp Pathol, 136, 27-35. (3) Carrozza ML et al (2003) J Virol Methods, 107, 121-127. (4) Angelopoulou K et al (2006) J Comp Pathol, 134, 329-335. (5) Preziuso S et al (2003) Eur J Histochem, 47, 373-378. (6) Capucchio MT et al (2003) J Comp Pathol, 129, 37-43. (7) Bird P et al (1993) J Virol, 67, 5187-5197. (8) Extramiana AB et al (2002) Small Rumin Res, 44, 109-118.