

CARATTERIZZAZIONE PRELIMINARE DI UN ALFA-HERPESVIRUS ISOLATO DA BUFALI (*BUBALUS BUBALIS*) IN ITALIA

PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF AN ALPHA-HERPESVIRUS ISOLATED FROM BUFFALOES (*BUBALUS BUBALIS*) IN ITALY

Cuteri V, Preziuso S, Marenzoni ML¹, Thiry J², Merlini A³, Thiry E², Valente C¹, Scuola di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Camerino, Matelica (MC), Italy; ¹Dipartimento di Patologia Diagnostica e Clinica Veterinaria, Università di Perugia, Perugia, Italy; ²Department of Infectious and Parasitic Diseases, University of Liège, Liège, Belgium; ³ASL Rieti, Rieti, Italy

Parole chiave: alfa-herpesvirus, bufalo, immunosoppressione, isolamento virale, PCR

Key words: alfa-herpesvirus, buffalo, immunosuppression, viral isolation, PCR

SUMMARY – In a herd with no history of vaccination against Bovine Herpesvirus-1, a group of buffaloes (*Bubalus bubalis*) resulted seropositive for anti-BoHV-1 gB antibodies and seronegative for anti-BoHV-1 gE antibodies. In order to isolate and to study the herpesvirus, two gB-positive and gE-negative buffaloes were inoculated with immunosuppressive drugs. The virus was isolated from nasal and vaginal swabs. PCR amplified a genomic sequence coding for the gB but did not amplified a sequence coding for the gE. Restriction Enzyme Analysis showed a pattern compatible with Bubaline Herpesvirus-1 but different than the previous isolate BuHV-1 b6. Further genomic studies will be aimed at better characterizing this BuHV-1 and at verifying if the isolate is naturally gE deleted.

INTRODUZIONE – In Italia l'allevamento del bufalo rappresenta un'importante settore economico in progressivo sviluppo. Come altri ruminanti, anche il bufalo è risultato sensibile all'infezione da herpesvirus. Gli isolamenti di Bubaline Herpesvirus dal bufalo sono stati finora molto limitati (1, 2). In Italia BuHV-1 è stato isolato da due bufali sieropositivi per la glicoproteina gE di BoHV-1 sottoposti a trattamento immunosoppressivo (3). Studi filogenetici hanno dimostrato che i pochi isolati di BuHV-1 disponibili sono più correlati a BoHV-5 che a BoHV-1 (3, 4). Vitelli infettati sperimentalmente con BoHV-5 sono risultati sieropositivi al test ELISA per anticorpi anti-gB di BoHV-1 e negativi al test ELISA per anticorpi anti gE di BoHV-1 (5). Sulla base di queste osservazioni è stato ipotizzato che sia possibile effettuare una distinzione sierologica tra alfa-herpesvirus eterologhi (4). Indagini sierologiche effettuate in allevamenti di bufali in Italia hanno messo in evidenza la presenza di animali con anticorpi anti-gB ma non anti-gE di BoHV-1 mediante test ELISA (6, 7). Lo scopo di questo lavoro era quello di isolare e tipizzare l'herpesvirus responsabile di questo quadro anticorpale gB+/gE- rilevato in alcuni bufali allevati in Italia.

MATERIALI E METODI – In questo studio è stato preso in considerazione un allevamento di bufali del Centro Italia in cui in precedenza erano state rilevate sieropositività per la glicoproteina gB di BoHV-1 (6). Gli stessi animali erano risultati sieronegativi per la glicoproteina gE di BoHV-1, ed è stata quindi esclusa un'infezione da BoHV-1. Considerando che nell'azienda non era mai stata praticata la vaccinazione nei confronti di BoHV-1 e che i bufali allevati non avevano alcuna possibilità di contatto con i bovini, l'ipotesi che il quadro sierologico fosse in qualche modo legato alla immunizzazione verso un ceppo gE-deleto di BoHV-1 è risultata molto improbabile. Per chiarire meglio le caratteristiche genomiche di questo virus circolante nei bufali si è voluto riattivare l'infezione latente mediante immunosoppressione farmacologica per permettere l'isolamento del virus. Per questo scopo tra gli animali risultati al test ELISA positivi per gB e negativi per gE di BoHV-1 sono stati selezionati 10 soggetti con titolo anticorpale anti-gB più elevato. I sieri di questi bufali sono stati sottoposti a prove di sieroneutralizzazione, che hanno confermato la presenza di titoli anticorpali anti-BuHV-1 almeno cinque volte superiori ai titoli anticorpali anti-BoHV-1 (6). Tra questi 10 soggetti sono stati selezionati 2 bufali tra quelli con titolo neutralizzante anti-BuHV-1 più alto. I due animali sono stati sottoposti a trattamento con inoculazione intramuscolare di desametasone 21-fosfato disodico (Desashock, Fort Dodge Animal Health S.p.A.) alla dose di 4

mg/kg una volta al giorno per 5 giorni. I soggetti sono stati mantenuti sotto stretta osservazione clinica e sottoposti a prelievo mediante tampone nasale e vaginale ogni 24 ore per 10 giorni dalla fine del trattamento. I tamponi, prelevati in doppio, sono stati impiegati per l'isolamento virale e per la PCR. Per l'isolamento virale, i tamponi sono stati immersi in terreno di trasporto MEM, sono stati filtrati con filtro da siringa da 0,45 µm e inoculati su piastra da 25 pozzetti contenente monostrato confluyente di cellule MDBK. Le piastre, incubate a 37 °C in atmosfera modificata al 5% di CO₂, sono state osservate quotidianamente per l'eventuale comparsa di effetto citopatico e, se negative al settimo giorno, sottoposte ad un ulteriore passaggio, fino ad arrivare ad un massimo di tre passaggi. Il virus cresciuto su colture cellulari è stato sottoposto ad estrazione e purificazione del DNA mediante Genomic DNA Isolation kit (Norgen Biotek Corp., Thorold, ON, Canada), seguendo le istruzioni del produttore e sospendendo il DNA in un volume finale di 100 µl. Due microlitri del DNA estratto sono stati utilizzati in nested PCR per l'amplificazione delle sequenze che codificano per le glicoproteine gB e gE (8). Il DNA virale è stato inoltre sottoposto ad analisi mediante restrizione (REA) con le endonucleasi BamHI e BstEII e visualizzato mediante elettroforesi, come descritto in precedenza (4).

RISULTATI – Dopo 4 e 5 giorni rispettivamente dall'inizio del trattamento immunodepressivo i due bufali hanno evidenziato febbre, ipersecrezione oculo-congiuntivale e nasale, tosse, dispnea e diarrea. Viste le condizioni cliniche degli animali, è stata instaurata una terapia sintomatica a cui è seguita remissione dei sintomi in 4 giorni. Il virus è stato isolato sia dai tamponi nasali che da quelli vaginali, determinando il caratteristico effetto citopatico degli herpesvirus. Il DNA estratto dalle colture cellulari che presentavano effetto citopatico è risultato positivo in PCR per la sequenza che codifica la gB, evidenziando la banda attesa di 385 pb, e negativo per la sequenza che codifica la gE.

Il DNA sottoposto ad analisi mediante restrizione enzimatica ha rivelato un profilo riconducibile a Bubaline Herpesvirus-1, ma con aspetti leggermente diversi dall'isolato di BuHV-1 b6 testato in precedenza (1, 4).

DISCUSSIONE – Questo studio preliminare ha messo in evidenza la circolazione di BuHV-1 in allevamenti bufalini Italiani. Questo isolato sembra avere alcune caratteristiche genomiche differenti rispetto al BuHV-1 b6 isolato in precedenza, ed ulteriori accertamenti sono tuttora in corso. Inoltre gli animali esaminati in questo studio non presentavano anticorpi verso la glicoproteina virale gE, a differenza di quanto precedentemente rilevato in due bufali italiani infetti da BuHV-1 (3). Il protocollo di PCR utilizzato in questo studio era stato ideato per distinguere i ceppi selvaggi di BoHV-1 da quelli privi della gE (8). Nel nostro caso questa PCR applicata al DNA del virus isolato dai bufali ha permesso di amplificare un segmento che codifica per la gB ma non un segmento che codifica per la gE. Questo potrebbe essere dovuto ad una differenza delle sequenze genomiche tra la gE di BoHV-1, utilizzata per mettere a punto la PCR (8) e quella di BuHV-1. Tuttavia, vista anche l'assenza di anticorpi anti-gE nei bufali oggetto di studio, si potrebbe ipotizzare che questo virus isolato dal bufalo sia sprovvisto della sequenza genomica che codifica per la gE, e costituisca quindi una sorta di mutante naturalmente gE deleta. Ulteriori ricerche saranno finalizzate alla tipizzazione molecolare dell'isolato, alla valutazione delle correlazioni esistenti con altri alfa-herpesvirus dei ruminanti e alla messa a punto di protocolli diagnostici differenziali. Riguardo la patogenicità di questo BuHV-1, i sintomi osservati in entrambi gli animali non possono essere esclusivamente ascrivibili al virus in quanto nei bufali era stato indotto uno stato di immunosoppressione. L'infezione sperimentale di animali sani con il BuHV-1 isolato potrebbe fornire maggiori dati riguardo la reale patogenicità del virus ed il rischio sanitario per i bufali allevati in Italia.

BIBLIOGRAFIA – (1) St George TD, Philpott M (1972) Aust Vet J, 48, 126 (2) Brake F, Studdert MJ (1985) Aust Vet J, 62, 331-4 (3) De Carlo E et al (2004) Vet Rec 154, 171-4 (4) Thiry J et al (2007) BMC Veterinary Research, 3, 26 (5) Wellenberg et al (2001) Vet Microbiol, 78, 79–84 (6) Preziuso S et al (2009) Atti FeMeSPRum, Perugia (Italy) 27-30 May (7) Scicluna MT et al (2007) Ital J Anim Sci, 6, 845-9 (8) Fuchs M et al (1999) J Clin Microbiol, 37(8), 2498-507