



Quale ruolo ha il bufalo domestico nell'epidemiologia dei virus BoHV-1 e BuHV-1?????

*Scicluna¹, M. T.; Caprioli¹, A.; Manna¹, G.; Saralli¹, G.; Bruni¹,
G.; Barone¹, A.; Letizia¹, E.; Condoleo¹, R. U; Autorino¹, G. L.*

**¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della
Toscana, Via Appia Nuova 1411, 00178 Roma, Italy**



Titolo del progetto: Infezioni da herpesvirus bovini e bufalini: indagini di prevalenza negli allevamenti di bufali della regione Lazio e valutazioni preliminari sulla loro eziologia.

Responsabile Scientifico: Dr. Gian Luca Autorino - IZSLT /04 RC

Titolo del progetto: Herpesvirus bovini e bufalini: indagini sulla sensibilità delle due specie ad infezioni da virus eterologhi, messa a punto di metodi diagnostici innovativi e valutazione di aspetti produttivi in allevamenti infetti.

Responsabile Scientifico: Gian Luca Autorino - IZS LT/06 RC



Epilogo allo studio

“Experimental infection of BuHV –1 in buffaloes and its reactivation.

Scicluna M.T., *et. al.*, SIDI LV Proceedings 2006”

Obiettivo dello studio

Determinare in condizioni sperimentale il ruolo patogenetico del ceppo di riferimento

“Metzler strain” del BuHV–1 nella specie omologa e indagare sul tipo di risposta sierologica impiegando metodi diversi



Infezione avvenuta con successo in tutti i tre soggetti inoculati con **forme cliniche leggeri ad inapparenti**

Seroconversione in VNT (nessuna differenza in titolo fra il BuHV-1/BoHV-1 VNTs) e **gB Elisa***, **negatività in gE Elisa***

Risultati

* Idexx, Westbrook, Maine

Isolamento virale in tessuto coltura solo al **9° PI**, dal **tampone nasale** di un soggetto,

Il sequenziamento del virus isolato ha dimostrato **totale omologia con quello inoculato.**



BuHV-1 infezione sperimentale in vitelli bovini *

*(dati non pubblicati – in collaborazione con Dr. P. Cordioli IZSLER, Brescia, Italy)

Materiali and Metodi

Risultati



Simili a quelli ottenuti per l'infezione BuHV-1 nei bufali

Ancora - Seroconversione in VNT (nessuna differenza in titolo fra il BuHV-1/BoHV-1 VNTs) e **gB Elisa*, negatività in gE Elisa***



Epilogo allo studio

“Alphaherpesvirus infections, BoHV-1 and BuHV-1 in buffaloes (*Bubalus bubalis*): comparative analysis of various serological assays for diagnosis and epidemiological evaluations.

Scicluna M.T. *et. al.* IVVDC Proceedings 2006”

Obiettivo dello studio

Verificare la possibilità di distinguere sierologicamente le **due diverse infezioni** (BoHV-1 and BuHV-1) e valutare la loro diffusione nella popolazione bufalina usando in combinazione le Elisa gE/gB e le VNT usando il BoHV-1 and BuHV-1.



Materiali e Metodi

Basato sullo stesso principio
proposto da altri Autori (*) che
differenziano sierologicamente
l'infezione da **BoHV-1** da quella **di**
BoHV-5 (BuHV-1??) e supportata
dai risultati sperimentali da noi
ottenuti utilizzando la combinazione
delle Elisa **gB/gE**

*Wellenberg G.J. *et. al.*, Vet. Microbiol. (2001) **78**, 79-84.

Premessa:

Reattività gB_{pos}/gE_{neg} – stato di infezione BuHV-1 ???

Reattività gB_{pos}/gE_{pos} – stato di infezione BoHV-1



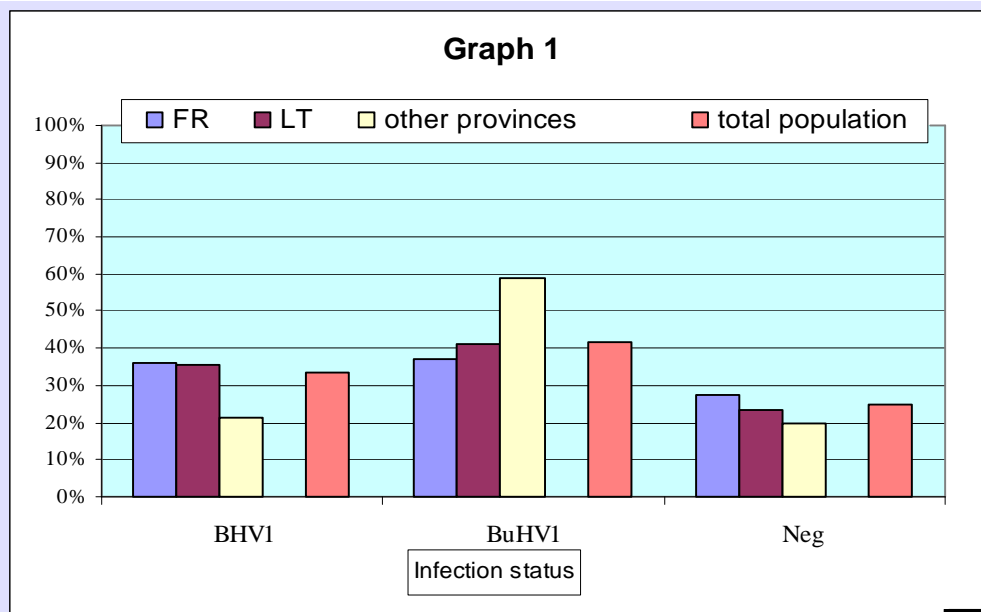


Materiali e metodi

- Popolazione in studio – **FR & LT** province del Lazio con la maggiore densità della popolazione bufalina, 30% di quella Italiana (200 000 capi)
- Definizione del campionamento - two stage cluster sampling – **prevalenza attesa > 20% negli allevamenti con maggiore di 30 capi e > 25% all'interno dell'allevamento** (precisione assoluta del 5%, livello di confidenza al 95%)
- Scelti **155 allevamenti**, che non avevano storia di vaccinazione nei confronti dell'IBR
- **Massimo di 15 campioni di sangue nella categorie degli animali con >3 anni**. Stesso criterio di campionamento per i bovini presenti nell'azienda

esaminati in **totale 1766 campioni** di sangue (1701 bufali and 65 bovini)





**Entrambi tipi di infezioni
sono stati osservati a
livello di popolazione
(Grafico 1)**

**Nessuna differenza significativa
è stata osservata per la prevalenza
stimata per i due tipi di
infezione**

(Grafico 1 & Tabella 1)

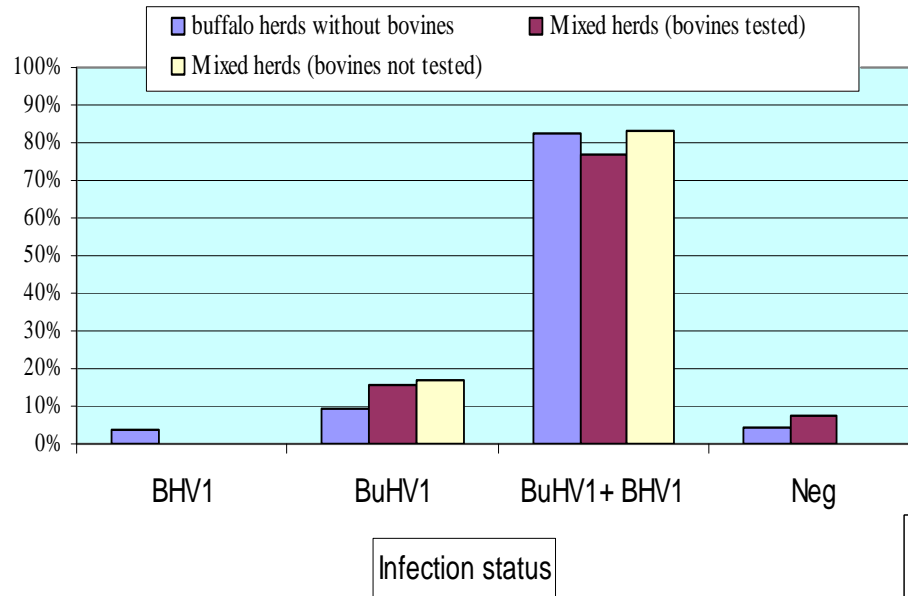
Risultati

Table 1: estimated prevalence distribution in herds with mixed infection

		% BuHV1	% BoHV1
mean		37.8	31.0
sd		25.7	24.1
median		40.0	35.0
percentiles	0.25	14.3	7.7
	0.05	40.0	35.0
	0.75	54.0	35.0
	0.95	85.2	66.2



Graph 3

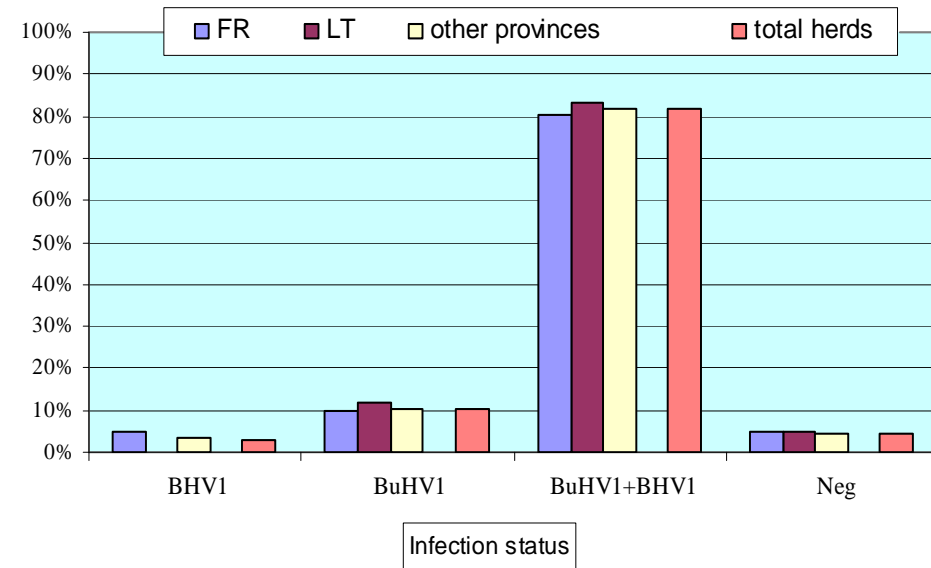


Nessuna differenza significativa osservata per la **prevalenza stimata per l'infezione da BoHV-1** per le aziende con e senza bovini (Grafico 3)

Risultati (cont'd)

A livello di azienda, **prevalenza stimata più alta** è stata per la **co-esistenza delle due infezioni all'interno degli allevamenti** (Grafico 2)

Graph 2





Trasmissione sperimentale del **BuHV-1** in **bufali e bovini** con un pattern di reattività **gB_{pos}/gE_{neg}**

Riassunto dell'epilogo



Evidenza dal campo della co-circolazione delle infezioni da **BuHV-1/BoHV-1** nella popolazione bufalina



BoHV-1 →



La trasmissione del BoHV-1
in bufali è possibile???

Quale tipo di reattività si ha
in gB/gE a tale infezione???



Disegno
sperimentale per per
l'infezione e del
BoHV-1 e la sua
riattivazione in bufali

Sette, annutoli maschi, di circa cinque mesi
di cui **uno mantenuto come controllo**
negativo

BoHV-1.1 ceppo del campo – dose
inoculata per via intranasale → 10^6 TCID₅₀,

69 PI - 0,1mg/kg/die di **desametazone** per
5 giorni (PR)

Campioni biologici prelevati durante il
periodo PI e PR - **tamponi nasali and**
rettali, plasma, leucociti e sieri

Soppressione al giorno 206 PI – raccolta
dei **gangli delle trigemini e le tonsille**

Controllo clinico giornaliero durante i periodi di
osservazione del PI (31 giorni) e PR (34 giorni)



Metodi sierologici & virologici impiegati

VNT – metodo OIE (BoHV–1) e **Elisa Competitivi gB and gE** (Idexx, Westbrook, Maine)

Real-time PCR, amplificando una area del gene della proteina gB comune a tutti gli alphaherpesvirus (Manna G. *et. al.*, SIDiLV Proceedings – 2007)

Analisi molecolare - **sequenziamento ed allineamento** di segmenti dei geni gB e gD per l'identificazione dei virus isolati

Isolamento in tessuto coltura – linee primarie (cellule polmonari di embrione) e continue (AuBEK and MDCK)



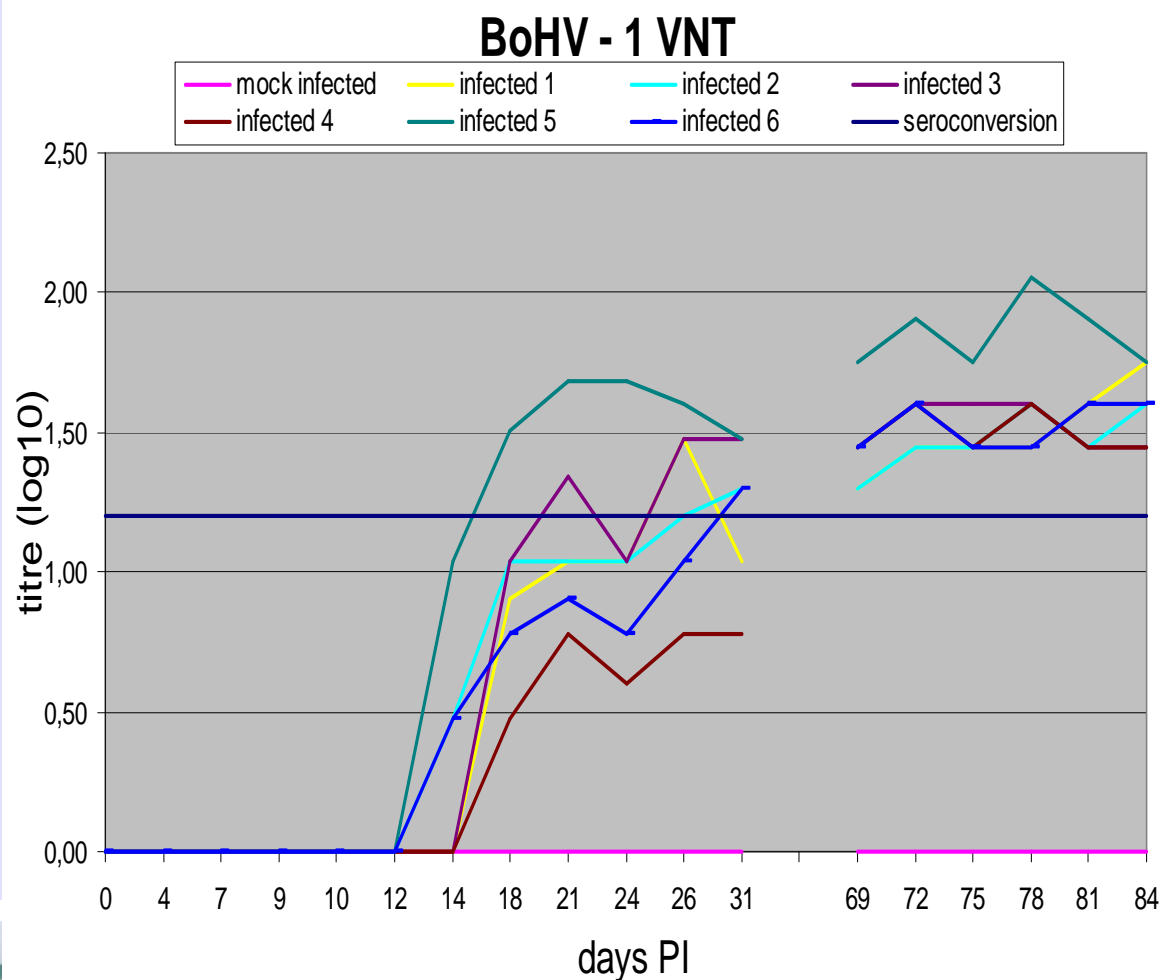
Risultati clinici

Durante tutto il periodo di osservazione (PI e PR), **ne gli animali inoculati ne il controllo negativo hanno sviluppato segni clinici riferibile all'IBR** o ad altre infezioni



Risultati sierologici in VNT

**Tutti gli animali inoculati hanno
sviluppato degli anticorpi, rilevabili
dal giorno 14 per 3 animali e dal
giorno 18 per i rimanenti**

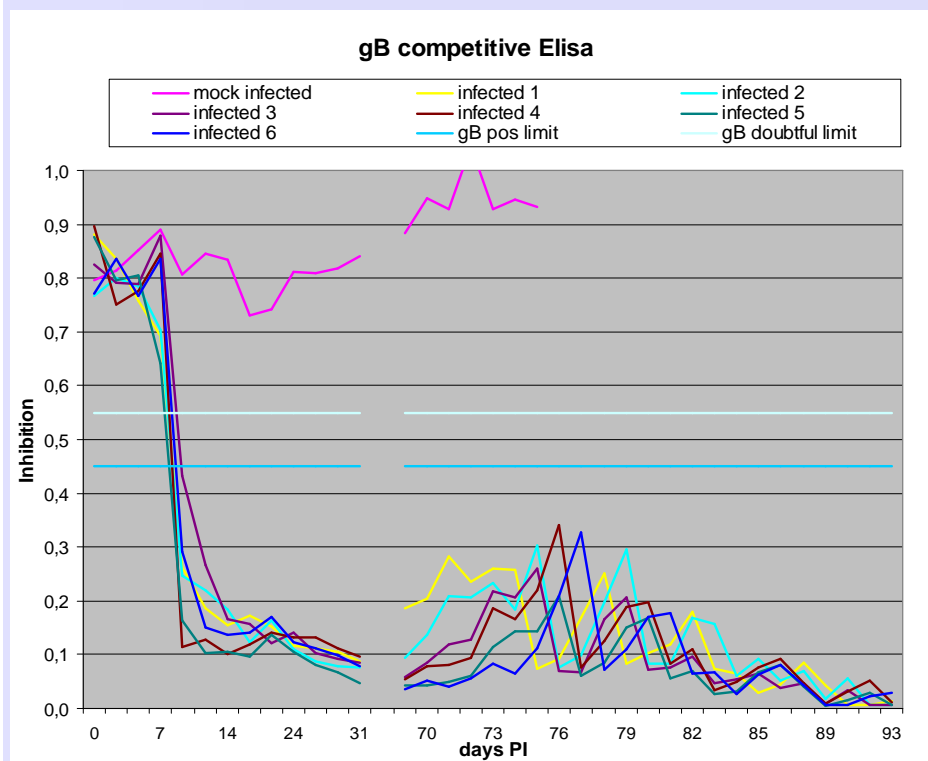


**Seroconversione in tutti
gli animali inoculati**

← **log₁₀ 1.2**

**Il controllo negativo è
non ha mai sviluppato
anticorpi durante tutto il
periodo di osservazione**

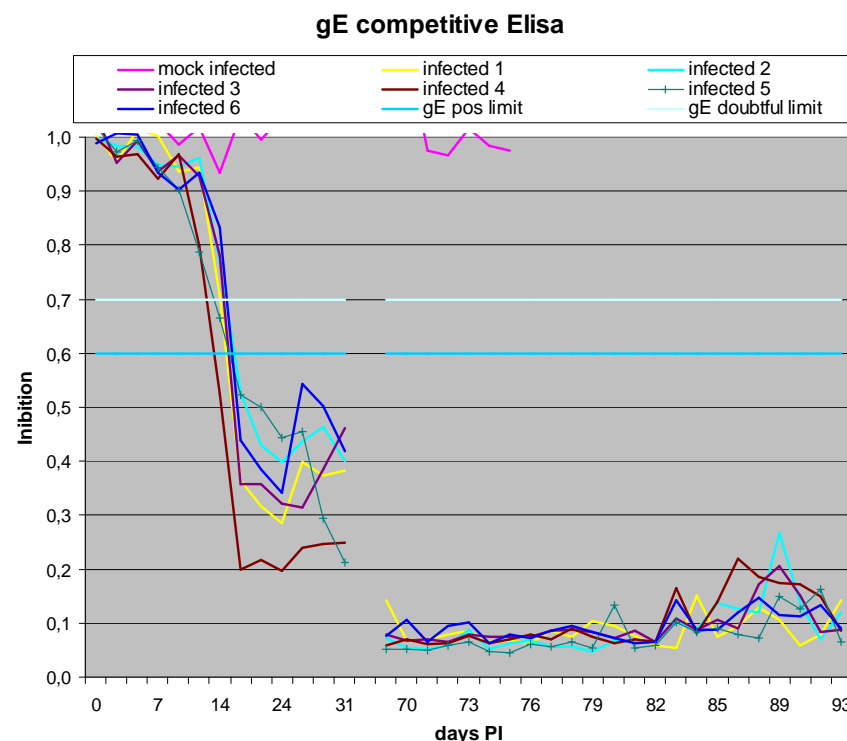
Risultati sierologici Elisa gB/gE



Come per la **VNT**, il **controllo negativo** non ha avuto nessuna reattività nelle due Elisa

Tutti gli animali infetti hanno avuto un pattern di reattività come segue - **gBpos/gEpos**

Tutti gli animali hanno avuto una reazione positiva **in gB Elisa** entro il giorno 10 **PI** mentre in **gE Elisa** tra la **14 - 18 PI**



Risultati in Rt-PCR

Tampone nasale e/o rettale positivi per tutti gli animali infetti per BuHV-1, limitati al periodo tra il **giorno 3 e 14**

Days PI	Nasal swab	Rectal swab	Plasma	Leukocytes
0	neg	neg	neg	neg
3	3, 4, 5, 7	7	neg	neg
5	7	4, 6, 7	neg	neg
7	4, 6, 7	5	neg	neg
10	7	7	neg	neg
12	5, 6, 7	6	neg	neg
14	5, 6, 7	2	neg	neg
18	neg	neg	neg	neg
21	neg	neg	neg	neg
24	neg	neg	neg	neg
26	neg	neg	neg	neg
28	neg	neg	neg	neg
31	neg	neg	neg	neg
Trigeminal ganglia	2, 4, 6	neg	neg	neg
Tonsils	neg	neg	neg	neg

Gangli del trigemini positivi solo in tre animali, mentre le tonsille sono risultati negativi per tutti gli animali

← **positività al VN**

I campioni prelevati al controllo negativo non ha avuto nessuna positività



Table 1

Detection of BoHV-1 DNA in RT-PCR and TC virus isolation in the biological samples from viral inoculated animals. Animal were numbered from 1 to 7. No. 1 is the mock infected, No. 2-7 are the virus inoculated.

Days P.I.	Nasal swabs		Rectal swabs	
	RT-PCR positive results ^a	TC results	RT-PCR positive results ^a	TC results
3	No. 3(39.03), No. 4(36.3), No. 5(34.26), No. 7(34.86)	Negative	No. 7(38.32)	Negative
5	No. 7(36.86)	Negative	No. 4(34.22), No. 6(37.69) No. 7(35.94)	4(AuBEK)
7	No. 4(28.05), No. 6(34.31), No. 7(30.45)	No. 4(in MDBK), 7(in MDBK)	No. 5 (37.6)	Negative
10	No. 7(25.27)	No. 7(in MDBK)	No. 7(43.54)	Negative
12	No. 5(37.7), No. 6(37.31), No. 7(29.31)	No. 7(in MDBK)	No. 6(38.59)	Negative
14	No. 5(34.82), No. 6(36.78), No. 7(23.42)	Negative	No. 2(38.02)	Negative
Trigeminal ganglia	No. 2(35.49), No. 4(33.1), No. 6(36.3)	Not done	Negative	Not done

Samples from the mock-infected animal and plasma, sera, leukocytes and tonsils from all the animals resulted constantly negative throughout all the experimental periods.

^a Ct values are reported in brackets.

I risultati dell'analisi genomica ha confermato l'identità della sequenza nucleotidica ottenuta dai campioni positivi in PCR ed in tessuto coltura con una identità al 100% con il virus inoculato - sottotipo BoHV-1.1

Discussione

Infezione sperimentale efficiente al 100%
i.e. BoHV-1 in bufali

Trasmissione del BoHV-1 in bufali domestici,
mediante una delle vie naturali di trasmissione
note per questo virus

Gli animali inoculati hanno **sviluppato una**
risposta sierologica significativa ed hanno avuto
almeno un campione biologico positivo in Rt-
PCR

L'evoluzione dell'infezione sperimentale può
essere definita **come locale e subclinica**

Il quadro clinico in questi animali era **meno grave**
di quello osservato nei bovino dal quale era
stato isolato con lo stesso ceppo????



Discussione (cont'd)

La riattivazione virale mediante l'immunsoppressione non ha avuto successo – dosaggio troppo basso????, un protocollo simile ha riattivato con successo il BuHV-1 in bufali

Condizione di stress insufficiente ??? , nonostante che tre animali erano latentemente infetti



Conclusioni

I risultati riportati hanno dimostrato con **successo la cross-infezione del BoHV-1 in bufali domestici**

I dati presentati sono la prima descrizione della riproduzione sperimentale dell'infezione del **BoHV-1 in bufali**, confermando la loro suscettibilità all'infezione

Questi risultati supportano anche i risultati dell'indagine **siero-epidemiologica circa la circolazione del BoHV-1 nel bufalo domestico**



Ulteriori studi per valutare se la quantità di virus **BoHV-1** escreto è capace ad infettare altri animali

Domande
ancora
aperte???

OSPITE e/o RESERVOIR??

Condurre degli studi per definire il ruolo dei bufali domestic come già avvenuto per i cervo rosso affetti da BoHV-1 (*)

*Mollema L. *et. al.* (2005) Veterinary Microbiology 111 25–34





**Concomitanza di due infezione
da alphaherpesvirus sostenuti
da BoHV-1 & BuHV-1, sia in bufali
che in bovini, devono essere
tenuti in conto, sia per la loro
diagnosi che per il loro controllo**

.....



Ringraziamenti

Prof. E. Thiry

Dr. B. Muylkens

} Facoltà di Medicina
Veterinaria -Liège,
Belgium

Dr P. Cordioli - IZSLER

Personale veterinario delle ASL delle
province di Frosinone e Latina

Personale dei laboratori di Latina &
DODMV di Roma

