

Infezione da *Ovine herpesvirus tipo 2* in allevamenti ovini in Umbria



ORIANA RAFFAELE¹, EMILIA DEL ROSSI¹, LORENZO CASTELLI²,
STEFANO PIGNANI², STEFANO PETRINI³, MARIA TERESA MANDARA¹,
MARIA LUISA MARENZONI¹

¹ Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia

² Associazione Regionale Allevatori Umbria

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche "Togo Rosati"

RIASSUNTO

Ovine gammaherpesvirus 2 (OvHV-2) è un gammaherpesvirus che causa un'infezione asintomatica nella pecora e una malattia sistemica molto grave in altre specie di ruminanti e nel maiale, denominata febbre catarrale maligna (FCM). Il controllo dell'infezione nella pecora risulta essere un fattore chiave nel contenimento della FCM. Inoltre non può essere escluso un ruolo di questo virus nella patologia ovina. Scopo del presente studio è stato quello di indagare la presenza di OvHV-2 negli allevamenti ovini in Umbria e di comprendere la relazione di alcuni fattori di rischio dell'infezione individuati negli allevamenti controllati. Sono stati analizzati, tramite nested PCR, 50 tamponi nasali prelevati rispettivamente da 39 pecore e da 11 capre, provenienti da 9 diverse aziende, per ricercare la presenza del DNA di OvHV-2. La specie, l'età, l'attitudine produttiva, la promiscuità con specie diverse (bovini e/o capre) e l'effetto del singolo allevamento sono stati valutati come possibili fattori di rischio dell'infezione mediante analisi statistica univariabile e multivariabile. Ventinove su 39 (74,4%) pecore e 3 su 11 (27,3%) capre sono risultate positive. I fattori di rischio presi in considerazione si sono dimostrati significativi nell'analisi univariabile, ma solo l'effetto dell'allevamento è rimasto statisticamente significativo nell'analisi multivariabile. Probabilmente il singolo allevamento contiene al suo interno altre variabili in grado di spiegare una modificazione nella prevalenza dell'infezione da OvHV-2. In futuro dovranno essere esaminati altri fattori tipici di ciascun allevamento al fine di comprendere meglio l'epidemiologia dell'infezione.

PAROLE CHIAVE

Ovine gammaherpesvirus 2, Regione Umbria, pecora, PCR, allevamento ovino.

INTRODUZIONE

Ovine gammaherpesvirus 2 (OvHV-2) è un gammaherpesvirus che causa un'infezione pressoché asintomatica nelle pecore, mentre è associato a forme cliniche, anche molto gravi, in specie affini ma non completamente permissive. In quest'ultimo caso la malattia è conosciuta come febbre catarrale maligna (FCM). Nonostante siano stati fatti passi avanti nelle conoscenze della patogenesi, ancora si è lontani dal capire il reale meccanismo che è alla base sia dell'infezione nella pecora sia della FCM nelle specie affini suscettibili. Si pensa che la trasmissione di OvHV-2 avvenga prevalentemente tramite la via inalatoria^{1,2}, ma anche la via venerea è stata ritenuta possibile, in particolare da parte dell'ariete, condizione che potrebbe determinare una stagionalità dell'infezione³. Il sito di replicazione primaria del virus negli ovini è rappresentato dal polmone⁴, mentre la successiva fase di latenza è localizzata nei linfociti^{1,5}. Per quanto riguarda la malattia nelle specie secondarie, sembra che l'evento chiave nel determinismo della FCM sia una disregolazione delle cellule T, determinata dal virus^{6,7}.

La FCM ha una manifestazione clinica abbastanza variabile. Esiste una forma classica, acuta, costituita da una sindrome caratterizzata da linfoproliferazione sistemica, vasculite e lesioni infiammatorie distribuite in molti tessuti, e che presenta un tasso di letalità del 50-70%⁸. Esistono inoltre forme croniche, che possono esitare in guarigione parziale o completa, e anche infezioni asintomatiche, che probabilmente non vengono diagnosticate^{9,10}. Questa stessa malattia, in realtà, può essere causata da diversi gammaherpesvirus del genere *Macavirus*: oltre a OvHV-2, anche alcelaphine herpesvirus-1 (AIHV-1), caprine herpesvirus-2 (CpHV-2), ibex malignant catarrhal fever virus, alcelaphine herpes virus-2-like e un virus di origine ancora non definita, che ha causato la malattia nel cervo dalla coda bianca, sono stati associati a forme cliniche di FCM in diverse specie animali. Tutti questi virus, oltre a infettare in maniera asintomatica il rispettivo ospite primario (pecore, gnu, capre, ibex, alce, etc.), sono in grado di infettare specie affini, ma secondarie, dove causano appunto la FCM. Tra le specie più colpite da FCM vi sono i bovini, i bufali, il bisonte americano, varie specie di cervidi, nonché altri ruminanti selvatici, ma anche i suini^{11,12}. Alcune specie di animali sono considerate altamente suscettibili^{11,12}. La FCM si manifesta con depressione, anoressia, febbre alta, linfadenopatia, congiuntivite, opacità corneale, infiammazione, ulcerazione ed essudazione del tratto respiratorio e digestivo superiore, diarrea e deficit neurologici, fino ad arri-

Corresponding Author:

Maria Luisa Marenzoni (marialuisa.marenzoni@unipg.it).

vare alla morte dell'animale colpito^{11,12}. Le possibilità terapeutiche sono pressoché nulle, per cui l'infezione grave è quasi invariabilmente letale. Il virus è difficilmente isolabile¹³ e questo ha contribuito all'incapacità di sviluppare un vaccino, ragion per cui non è possibile effettuare neanche una profilassi indiretta. Al contempo le diagnosi differenziali che occorre considerare in questi casi includono malattie quali l'afte epizootica, la diarrea virale bovina, la rinotracheite infettiva bovina, la cheratocongiuntivite infettiva da herpesvirus, la cheratocongiuntivite infettiva da *Moraxella bovis*, la stomatite papulosa e la blue tongue, che prevedono anche l'adozione di misure sanitarie di prevenzione restrittive, quali sequestro dell'allevamento infetto, blocco delle movimentazioni, abbattimenti, etc.

In Italia, a parte i casi registrati nei giardini zoologici^{14,15}, dove la possibilità che la specie di virus coinvolto sia più ampia, i virus che maggiormente vengono associati alla FCM sono OvHV-2 e CpHV-2. Gli episodi di FCM segnalati nel nostro territorio sono relativamente rari, occasionalmente con andamento epidemico, ma in generale probabilmente sottodiagnosticati. Generalmente questi casi sono riconducibili a situazioni di allevamenti promiscui di bovini/ovini o bovini/ovini/caprini^{16,17,18} o bufali/bovini/ovini¹⁹. In uno studio effettuato in Italia si è arrivati alla conclusione che la FCM, nella sua forma associata alle pecore, ossia da OvHV-2, è da considerare una malattia endemica²⁰. Tuttavia, non esistono dati che indichino quale sia la reale prevalenza di infezione da OvHV-2 in Italia e anche a livello internazionale sono poche le indicazioni a tal proposito. La Tabella 1 riassume le prevalenze riportate per OvHV-2 nel mondo.

Tra i fattori di rischio indicati per l'infezione da OvHV-2 compaiono l'età delle pecore (gli agnelli di età compresa tra i 6 e i 9 mesi diffondono il virus molto più frequentemente e più intensamente degli adulti), gli allevamenti promiscui (bovini/ovini, bovini/ovini/caprini e bufali/bovini/ovini), la densità degli animali in allevamento (maggiore è la densità, mag-

giore è il rischio di contagio per gli animali suscettibili), la pratica della transumanza (maggiore probabilità di contatto diretto tra animali infetti e suscettibili), i fattori climatici, la presenza di vettori e il livello di stress dovuto alle variazioni climatiche o alle pratiche di management^{10,12,16,17,18,19,21,22,23,24}. Non rientrerebbero invece tra i possibili fattori di rischio la razza e il sesso, né l'attitudine dell'allevamento (latte, carne o misto)^{22,25}.

Per tale motivo è importante conoscere se e quanto questi virus circolano negli allevamenti ovis e caprini del territorio e i fattori che possono influenzare la loro diffusione, che costituiscono il punto chiave per contenere l'infezione.

Scopo del presente studio è stato quello di valutare la presenza di OvHV-2, potenziale trigger di FCM, in allevamenti ovis del territorio umbro e verificare se alcuni fattori di rischio sono presenti nei nostri allevamenti al fine di aumentare le conoscenze sull'epidemiologia di questa infezione nel territorio.

MATERIALI E METODI

Nel periodo ottobre 2016 - febbraio 2017 sono stati prelevati, previo consenso informato degli allevatori, dei tamponi nasali (TN) da pecore in quanto considerati un campione indicativo della possibilità di trasmissione del virus, che avviene principalmente per via inalatoria, a seguito di contatto ravvicinato.

Gli allevamenti testati sono stati selezionati in quanto iscritti all'Associazione Regionale Allevatori (ARA) dell'Umbria e considerati rappresentativi della realtà produttiva ovina e caprina locale. Gli elementi che sono stati registrati al momento del prelievo erano il codice identificativo del soggetto campionato; la razza; l'età; il sesso; l'attitudine produttiva; la consistenza numerica dell'allevamento; la tipologia di allevamento (intensivo, semi-intensivo, estensivo); il numero ap-

Tabella 1 - Prevalenza dell'infezione da OvHV-2 riportata in precedenti studi nel mondo.

Area geografica	Test applicato	Prevalenza OvHV-2	Bibliografia
INDIA (Regione del Kashmir)	PCR da sangue	pecore: 84,4% (28/33) agnelli: 95,2% (20/21) capre: 61,5% (16/26)	Wani et al., 2006 ⁸
INDIA (Regione del Karnataka)	PCR da sangue	pecore: 24,44% (87/356)	Premkrishnan et al., 2015 ²¹
KENYA	PCR da sangue	pecore: 90,4% (161/178)	Mirangi et al., 1997 ³⁰
PORTOGALLO	PCR da sangue	pecore (allevamento monospecifico): 81,3% (65/80) allevamento solo bovini (allevamento monospecifico): 0% (0/18) pecore (allevamento misto bovini-pecore): 70,5% (31/44) bovini (allevamento misto bovini-pecore): 7,4% (2/27)	Cortez et al., 2008 ¹⁰
USA	PCR da sangue CI-ELISA ⁵	pecore: 99% (143/144) pecore (non associate a casi di FCM nel bovino): 53% (282/531) pecore (associate a casi clinici di FCM nel bovino): 59% (88/149) capre: 61% (177/291)	Li et al., 1996 ²⁵
SUD AFRICA	PCR da sangue	pecore: 75,3% (130/170)	Bremer et al., 2010 ²²
TURCHIA	PCR da sangue	pecore: 62,7% (37/59)	Kalayci et al., 2015 ³¹
GERMANIA	PCR da sangue CI-ELISA ⁵	pecore: 100% (20/20) pecore: 72% (36/50)	Frolich et al., 1998 ⁴⁰
GIAPPONE	SN*	pecore: 37,6% (56/154) capre: 40% (2/5)	Giangaspero et al., 2013 ⁴¹

⁵CI-ELISA: competitive inhibition ELISA; *SN: sieroneutralizzazione.

prossimativo di movimentazioni in entrata o in uscita dall'allevamento; l'ubicazione dell'allevamento; la densità degli animali nell'allevamento; l'effettuazione della pratica della transumanza; la gestione delle rimonte e l'età di separazione degli agnelli dalle madri; infine, se l'allevamento era promiscuo con caprini, bovini o altri ruminanti.

Da ogni allevamento sono stati campionati almeno 5 animali fino a un massimo di 10.

I TN sono stati effettuati utilizzando tamponi di cotone che sono stati strofinati all'interno delle narici delle pecore e successivamente posti in 500 µl di tampone fosfato salino (PBS).

Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto partendo da 200 µl del liquido di sospensione del tampone nasale, utilizzando un kit commerciale, secondo le indicazioni del produttore (QIAamp DNA Mini kit, Qiagen).

Protocolli di PCR

Al fine di identificare OvHV-2 sono stati utilizzati inizialmente tre protocolli di PCR. Il primo era un protocollo di PCR in grado di identificare tutti i membri della famiglia Herpesviridae, avendo come gene target un frammento della DNA polimerasi comune a tutti gli herpesvirus²⁶. In parallelo, nelle prime fasi, sono stati utilizzati due ulteriori protocolli di PCR OvHV-2-specifici, secondo quanto indicato dalla World Organisation for Animal Health (OIE)^{27,28,29}. I protocolli di PCR sono stati sottoposti a un settaggio iniziale, tramite PCR a gradiente, che ha valutato temperature comprese tra 53 e 66°C per verificare se il profilo termico indicato nei protocolli pubblicati fosse quello ottimale o se la temperatura di annealing dei primer andasse modificata per ottenere un protocollo più sensibile. Le temperature di annealing sono state verificate tramite diluizioni seriali del controllo positivo (DNA di OvHV-2 sequenziato). I tre diversi protocolli di PCR sono stati poi comparati tramite diluizioni seriali del controllo positivo per valutare la diversa sensibilità. Ogni set di reazione allestito aveva un controllo positivo (DNA di OvHV-2 precedentemente sequenziato) e un controllo negativo (senza DNA di OvHV-2).

Analisi statistica

La stima della prevalenza dell'infezione da OvHV-2 è stata definita come proporzione di animali positivi alla PCR da TN sul totale degli animali testati.

Le variabili indipendenti registrate al momento del prelievo e considerate potenziali fattori di rischio per l'infezione (specie, età, allevamento, attitudine produttiva, promiscuità tra specie) sono state analizzate separatamente per accertare la possibile relazione tra potenziale fattore di rischio e infezione da OvHV-2. L'età è stata analizzata categorizzandola in due gruppi: soggetti di età > di 1 anno oppure > di 2 anni. Il test F di Fisher o il test χ^2 sono stati utilizzati secondo il metodo più appropriato ai dati in studio. Variabili che sono risultate con una probabilità (P) $\leq 0,20$ nel modello univariabile sono state incluse nel modello multivariabile, inserendo manualmente le variabili ed eliminandole con la modalità backward. La stima dell'Odds Ratio (OR) e dei corrispondenti intervalli di confidenza al 95% (95% CI) è stata ottenuta tramite regressione logistica. I dati sono stati analizzati tramite il software R, version 2.8.1 (R, Development Core Team 2007). Un valore di $P < 0,05$ è stato considerato significativo.

RISULTATI

Scelta del protocollo di PCR

Dai risultati ottenuti con la PCR a gradiente, le temperature indicate nei protocolli pubblicati da Baxter et al. (1993)²⁸ e Flach et al. (2002)²⁹ non rappresentavano le migliori e quindi sono state utilizzate nuove temperature di annealing, come indicato nella Tabella 2.

Il protocollo più sensibile è risultato quello descritto da Flach et al., 2002²⁹, che è stato utilizzato per eseguire le analisi su tutti i soggetti.

Prevalenza e analisi dei fattori di rischio

In totale sono stati campionati 50 animali, di cui 39 pecore e 11 capre. Sette animali erano sotto l'anno di età, 23 di età compresa tra 1 e 2 anni e 20 di età superiore ai 2 anni. Nel periodo dell'anno in cui è stato effettuato il campionamento non erano presenti soggetti di 6-9 mesi di età, che rappresentano la fascia di età più suscettibile all'infezione.

Gli allevamenti avevano caratteristiche uniformi per quanto riguarda la densità degli animali (conforme alle indicazioni del Decreto Legislativo 26 marzo 2001, n. 146, recante l'Attuazione della direttiva 98/58/CE sulla protezione degli animali negli allevamenti, GU n. 95 del 24-04-2001), la transumanza (che non era praticata da nessun allevamento), la separazione degli agnelli dalle madri (che avveniva a circa 30 giorni di vita) e l'introduzione delle rimonte nel gruppo degli adulti (che avveniva dopo il primo parto, a circa 15 mesi di età).

Gli allevamenti erano tutti di tipo semiestensivo, ad eccezione di uno intensivo e uno estensivo. L'attitudine produttiva era da latte per sei aziende e da carne per tre. La consistenza numerica degli allevamenti variava da 70 a 1200 capi, con un valore medio di 471 animali e una mediana di 460. Solo un'azienda aveva una consistenza inferiore ai 100 capi.

Il numero di movimentazioni era basso per tutte le aziende, da considerarsi occasionale, sebbene in alcuni casi una singola movimentazione poteva consistere anche nell'acquisizione di circa 100 nuovi soggetti. Tutti gli allevamenti erano ubicati vicino ad altri allevamenti, riserve naturali o zone di ripopolamento, in cui erano comunque presenti altri ruminanti selvatici o domestici.

Quattro aziende allevavano esclusivamente ovini, due avevano sia pecore che capre, due anche capre e bovini e una era promiscua con bovini. In genere erano associate pecore da carne e bovini da ingrasso. Un allevamento prima promiscuo con pecore e capre ha inserito i bovini da ingrasso nel periodo successivo allo studio.

La prevalenza totale dell'infezione riscontrata da TN era del 64% (32/50). La Tabella 3 riporta le prevalenze ottenute, considerando le singole variabili esaminate nell'analisi statistica. All'analisi univariabile sono risultati significativi tutti i fattori indagati, ossia la specie (pecora vs capra), l'età superiore a 1 anno o superiore a 2 anni, l'allevamento, l'attitudine (latte vs carne), la promiscuità tra specie. L'unico fattore che invece è risultato significativo anche nell'analisi multivariabile è l'allevamento, che ha ottenuto un OR=0.55, CI 95%: 0.38-0.79, P=0.02. Pertanto, l'allevamento risulta un fattore più determinante rispetto agli altri, perché probabilmente assorbe in un unico parametro tutte le altre variazioni considerate.

Tabella 2 - Primer utilizzati nello studio.

Nome primer	Gene target	Tipo di PCR	Sequenza primer	Lunghezza bp	Bibliografia	Temperatura di annealing indicata sul manuale OIE ²⁷ (°C)	Temperatura di annealing utilizzata nello studio (°C)
DFA (F)	DNA polimerasi degli herpesvirus	convenzionale	5'-GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC-3'	725 (DFA+KG1)	VanDevanter et al., 1996 ²⁶	46	46
ILK (F)	DNA polimerasi degli herpesvirus		5'-TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA-3'				
KG1 (R)	DNA polimerasi degli herpesvirus		5'-GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT-3'	470 (ILK+KG1)			
TGV (FN)	DNA polimerasi degli herpesvirus	nested	5'-TGTAACCTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNGT-3'	225	VanDevanter et al., 1996 ²⁶	46	46
IYG (RN)	DNA polimerasi degli herpesvirus		5'-CACAGAGTCGTRTCNCCRTADAT-3'				
556 (F; FN)	DNA polimerasi dell'OvHV-2 e AIHV-1	convenzionale	5'AGTCTGGGTATATGAATCCAGATGGCTCTC-3'	422	Baxter et al., 1993 ²⁸	60	66
755 (R)	DNA polimerasi dell'OvHV-2 e AIHV-1		5'-AAGATAAGCACCAGTTATGCATCTGATAAA-3'				
555 (RN)	DNA polimerasi dell'OvHV-2 e AIHV-1	nested	5'-TTCTGGGGTAGTGGCGAGCGAAGGCTTC-3'	238	Baxter et al., 1993 ²⁸	60	66
POL1 (F)	DNA polimerasi dell'OvHV-2 e AIHV-1	convenzionale	5'-GGC(CT)CA(CT)AA(CT)CTATGCTACTCCAC-3'	386	Flach et al., 2002 ²⁹	60	54
POL2 (R; RN)	DNA polimerasi dell'OvHV-2 e AIHV-1		5'-ATT(AG)TCCACAAACTGTTTGT-3'				
OHVPol (FN)	DNA polimerasi dell'OvHV-2 e AIHV-1	seminested	5'-AAAACTCAGGGCCATTCTG-3'	172	Flach et al., 2002 ²⁹	60	54

F: forward; R: reverse; FN: forward protocollo nested; RN: reverse protocollo nested.

DISCUSSIONE

Tutti i 9 allevamenti testati sono risultati positivi all'infezione da OvHV-2 con almeno un soggetto positivo, confermando l'ampia diffusione del virus negli allevamenti ovis e ovini/caprini del territorio, condizione che era stata ipotizzata

sulla base dei dati internazionali. Sebbene esistano molte differenze tra gli studi di prevalenza per quanto riguarda test applicato, matrice biologica analizzata e area geografica, si può affermare che la prevalenza ottenuta nello studio è sovrapponibile a quelle riscontrate precedentemente a livello internazionale^{8,10,21,22,25,30,31}.

Tabella 3 - Risultati dell'analisi univariabile e multivariabile dei fattori associati ad una variazione nella prevalenza dell'infezione da OvHV-2.

Fattore	Categoria	Prevalenza	Analisi univariabile		Analisi multivariabile	
			P	OR	95% IC	P
SPECIE	pecore capre	74.4% (29/39) 27.3% (3/11)	0.01	0.0	0.0	0.9
ETÀ	≤ 1 anno > 1 anno	100% (7/7) 58.1% (25/43)	0.04	0.0	0.0	0.9
	≤ 2 anni > 2 anni	83.3% (25/30) 35% (7/20)	0.01	0.0	0.0	0.9
ATTITUDINE PRODUTTIVA	da latte da carne	83.3% (25/30) 35% (7/20)	< 0.0001	0.06	0.001-5.67	0.23
PROMISCUITÀ	solo pecore capre bovini capre-bovini	90% (18/20) 70% (7/10) 40% (2/5) 33.3% (5/15)	0.004	2.39	0.3-20.7	0.42
ALLEVAMENTO	azienda 1 azienda 2 azienda 3 azienda 4 azienda 5 azienda 6 azienda 7 azienda 8 azienda 9	80% (4/5) 100% (5/5) 100% (5/5) 100% (5/5) 80% (4/5) 40% (2/5) 40% (4/10) 40% (2/5) 20% (1/5)	0.02	0.55	0.38-0.79	0.001

Inoltre, seppur non statisticamente significativa nel modello multivariabile, la tendenza ad avere un'alta prevalenza nei soggetti più giovani, indicata dalla bibliografia, è confermata²⁵. Sono state fatte invece osservazioni differenti per quanto riguarda le altre variabili analizzate. La maggior prevalenza ottenuta nelle pecore rispetto alle capre appare giustificata dal fatto che gli ovini sono gli ospiti primari del virus^{12,15}. Anche l'attitudine da latte, così come l'allevamento monospecifico delle pecore, sembrano favorire una maggior prevalenza di infezione da OvHV-2; quando invece aumenta la promiscuità con capre, bovini e capre associate a bovini, la prevalenza dell'infezione nella pecora diminuisce. Tutti questi fattori però perdono di significatività quando vengono valutati nel loro insieme nell'analisi multivaribile e di fatto vengono tutti assorbiti dalla variabile allevamento. Evidentemente ci sono altri elementi intrinseci all'allevamento, che andranno ulteriormente indagati, che influiscono sull'infezione. Ad esempio è possibile che l'organizzazione di un allevamento monospecifico di pecore, magari ad attitudine latte, sia caratterizzato da situazioni in cui vi è un maggior contatto tra animali, che favorisce la trasmissione dell'infezione. Quando entrano in analisi anche le capre e soprattutto i bovini, che probabilmente comportano anche una diversa disposizione e gestione dell'allevamento, allora la prevalenza di infezione nella pecora diminuisce. Il fatto che un diverso management dell'azienda possa influenzare l'andamento dell'infezione è stato già ipotizzato in precedenza¹².

La promiscuità di specie, che comunque è il prerequisito nello sviluppo della FCM, è in ogni caso una realtà frequente negli allevamenti ovini e caprini in centro Italia: 5 dei 9 allevamenti considerati avevano promiscuità di specie allevate al loro interno; uno è diventato promiscuo con bovini successivamente allo studio e comunque tutti gli allevamenti si trovavano in prossimità di altri allevamenti o zone in cui erano presenti ruminanti selvatici o domestici. Questo è un elemento di rischio da considerare nelle realtà dell'Appennino Centrale per quanto riguarda la possibilità di occorrenza della FCM nelle diverse specie suscettibili. Tuttavia, la sola presenza di un ospite serbatoio non è considerata sufficiente per realizzare la trasmissione dell'infezione, soprattutto a specie secondarie, e probabilmente serve un contatto estremamente stretto tra di esse¹². Powers et al. 2005⁹ indicano una vicinanza di 70 metri come rischiosa per la trasmissione di OvHV-2 da ovini a bovini. Allo stesso modo, distanze di 100 metri sono state indicate efficaci per la trasmissione di AIHV-1 tra specie diverse²⁷. La separazione a lunghe distanze è ritenuta comunque un rischio quando gli ospiti sono altamente suscettibili e la concentrazione virale è alta, come nei bisonti e negli agnelli in allevamento^{11,32}. Per CpHV-2 è stata segnalata la possibilità di trasmissione fino a 5 km⁴.

Discorso a parte va fatto per la capra, che costituisce un ulteriore serbatoio dell'OvHV-2. Nel presente lavoro sono risultate positive 3 su 11 capre per la presenza di OvHV-2. Nella capra è stata riprodotta sperimentalmente l'infezione, che è risultata asintomatica³³. Tuttavia la capra ospita anche CpHV-2, che è correlato antigenicamente all'OvHV-2. Sono state segnalate anche coinfezioni con i due virus¹². CpHV-2 sembra meno patogeno rispetto a OvHV-2 ai fini della FCM^{12,34}. Questi sono alcuni dei motivi per cui è necessario avere mezzi diagnostici in grado di distinguere i due virus, anche al fine di identificare le diverse fonti di virus in caso di FCM¹². Il protocollo utilizzato nel presente studio è stato in

grado di distinguere i due virus in quanto capace di rilevare specificatamente OvHV-2²⁹. Un monitoraggio periodico del genoma di questi virus, o loro parti, con la caratterizzazione delle sequenze di virus provenienti da specie a diversa suscettibilità, differenti aree geografiche e anni, potrebbe essere utile per implementare banche dati tematiche, fondamentali in caso di epidemie per risalire all'origine dei focolai^{23,35}. Altro elemento da considerare in futuro per i prelievi è la stagione. Infatti nel presente studio il campionamento è stato condotto in un periodo limitato (ottobre-febbraio). L'allevamento ovino è già di per sé molto stagionalizzato e nel periodo preso in esame non erano presenti i soggetti di 6-9 mesi, che sono ritenuti i maggiori diffusori del virus. Inoltre, potrebbe essere ipotizzato un effetto stagionale del clima sull'infezione, potendo influire su stress, contatti, presenza o meno di pascoli, etc.

Sebbene la numerosità campionaria per allevamento del presente studio possa essere ritenuta sufficiente per la ricerca di OvHV-2¹², un'ulteriore implementazione dello studio andrà fatta sul numero di soggetti da sottoporre a prelievo all'interno dell'allevamento per aumentare la consistenza dei dati. Al momento non è stato possibile neanche effettuare un campionamento randomizzato, che invece è un assunto importante per la generalizzabilità dei risultati.

Comunque, una volta identificati i fattori di rischio per l'infezione presenti nel territorio, risulta possibile mettere in atto alcune strategie per limitare la diffusione dell'infezione, come ad esempio separare le specie suscettibili da pecore e capre infette. È stato dimostrato che è addirittura possibile costituire greggi di pecore o capre non infette da OvHV-2 o CpHV-2, separando precocemente gli agnelli o i capretti (ad esempio a una settimana, più precoce, per i capretti e 2 mesi per gli agnelli) dalle madri e dagli adulti in generale. Infatti questi virus non vengono trasmessi per via verticale (diversamente da AIHV-1) e gli agnelli risultano anche protetti nel periodo neonatale, probabilmente grazie alla presenza dell'immunità passiva materna³⁶. La separazione tra soggetti negativi e soggetti positivi va mantenuta nel tempo, creando due greggi distinti, e questo comporta che gli animali vadano periodicamente sottoposti a test per verificare il mantenimento della negatività³⁷. I metodi più utilizzati per poter diagnosticare al momento l'infezione da OvHV-2 sono il test ELISA o la sieroneutralizzazione per la sierologia e la PCR per la diagnosi diretta. Mentre la sierologia è il metodo più rapido per evidenziare l'esposizione al virus in un allevamento, la PCR è il metodo più usato per ottenere una diagnosi di certezza, identificare soggetti diffusori del virus e per poter tracciare l'origine di un focolaio tramite metodi biomolecolari²⁷.

Sempre per ridurre la possibilità di passaggio dell'infezione a specie affini, i bovini non dovrebbero pascolare negli stessi spazi dove pascolano pecore o capre o ruminanti selvatici suscettibili. Stessa condizione dovrebbe essere mantenuta negli zoo, assicurando la separazione delle specie recettive tra loro. Ridurre il più possibile i fattori stressanti per gli animali può aiutare a prevenire lo sviluppo di forme cliniche. In caso di focolaio, gli animali suscettibili dovrebbero essere subito separati dai malati e dai sospetti infetti. Va considerato però che, potendo essere molto lungo il periodo di incubazione, possono presentarsi per mesi nuovi casi di infezione. Poiché i bovini e altri ospiti accidentali sono ospiti a fondo cieco, non è necessario l'abbattimento¹¹.

CONCLUSIONI

L'infezione da OvHV-2 viene spesso studiata in funzione della FCM, mentre poco si sa del reale impatto che ha nell'allevamento ovino. Considerando che, seppur sporadicamente, in altre specie i gammaherpesvirus possono causare malattia anche nell'ospite primario⁶, ulteriori studi dovrebbero essere effettuati nella specie ovina. Questo virus andrebbe indagato in tutte le condizioni patologiche, soprattutto se a eziologia non ancora definita. Recenti studi hanno permesso di poter conoscere alcuni aspetti del meccanismo patogenetico dell'OvHV-2, ma si è lontani dalla comprensione completa dei meccanismi di infezione nella pecora e dell'insnesco della FCM in altre specie^{7,38}. Poiché non si conosce ancora del tutto l'azione che il virus svolge, pur essendo addirittura possibile eliminare l'infezione nell'ospite primario, non è detto che eliminare un'infezione comporti necessariamente dei benefici. Infatti, è stato riconosciuto come alcune infezioni, anche da herpesvirus, siano addirittura utili a stimolare l'immunità cellulare nell'ospite³⁹.

Per una infezione poco conosciuta come questa, causa anche di malattia grave e per la quale non esistono terapie specifiche, né vaccini, occorre certamente migliorarne le conoscenze e identificarne quanto meno i fattori di rischio per poter controllare l'infezione ed evitare l'iperendemia, che è il maggior pericolo nello sviluppo della FCM.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano gli allevatori che hanno dato la disponibilità a partecipare allo studio.

■ *Ovine herpesvirus 2* infection in sheep flock of the Umbria Region

SUMMARY

Ovine gammaherpesvirus 2 (OvHV-2) is a gammaherpesvirus that causes an asymptomatic infection in sheep and a severe systemic disease in other ruminants and pigs, called malignant catarrhal fever (FCM). The control of the infection in sheep is the key to avoid the FCM. Moreover, a role of this virus in the pathology of the sheep can not be excluded. Aim of the present study was to investigate the presence of OvHV-2 in sheep flocks of the Umbria Region and understand the role of some characteristics of the farms for the infection. Nasal swabs of 39 sheep and 11 goats coming from 9 different farms were investigated for the presence of the OvHV-2 DNA by nested PCR. Twenty-nine out of 39 (74.4%) sheep and 3 out of 11 (27.3%) goats were positive. The role of the species, the age of the animals, the productive attitude, the breeding mixed with cattle and/or goats, and the effect of the single farm were evaluated as risk factors for the infection by univariable and multivariable statistical analysis. All these factors resulted significant by univariable analysis, whereas only the effect of the single farm remained significant in the multivariable analysis. Probably the farm contains other variables that are able to explain variation in the prevalence of OvHV-2. Further factors specific of each farm will have to be investigated to understand the epidemiology of the infection.

KEY WORDS

Ovine gammaherpesvirus 2, Umbria Region, sheep, PCR.

Bibliografia

- Li H., Hua G., Snowden, Crawford T. B. (2001). Levels of ovine herpesvirus 2 DNA in nasal secretions and blood of sheep: implication for transmission. *Vet Microbiol*, 79: 301-310.
- Taus N.S., Traul D.L., Oaks J.L., Crawford T.B., Lewis G.S., Li H. (2005). Experimental infection of sheep with ovine herpesvirus 2 via aerosolization of nasal secretions. *J Gen Virol*, 86: 575-579.
- Hussy D., Janett F., Albini S., Stauber N., Thun R., Ackermann M. (2002). Analysis of the pathogenetic basis for shedding and transmission of ovine gamma herpesvirus 2. *J Clin Microbiol*, 40: 4700-4704.
- Li H., Cunha C.W., Davies C.J., Gailbreath K.L., Knowles D.P., Oaks J. L., Taus N. S. (2008). Ovine herpesvirus 2 replicates initially in the lung of experimentally infected sheep. *J Gen Virol*, 89: 1699-1708.
- Baxter S.I.F., Wiyono A., Pow I., Reid H.W. (1997). Identification of ovine herpesvirus 2 infection in sheep. *Arch Virol*, 142: 823-831.
- Ackermann M. (2006). Pathogenesis of Gammaherpesvirus infections. *Vet Microbiol*, 113: 211-22.
- Thonur L., Russell G., Stewart J.P., Haig D.M. (2005). Differential transcription of ovine herpesvirus 2 genes in lymphocytes from reservoir and susceptible species. *Virus Genes*, 32: 27-35.
- Wani S.A., Samanta I., Pandit F., Buchoo B.A., Peer F., Bhat M.A. (2006). Molecular epidemiology of ovine herpesvirus type 2 infection in Kashmir, India. *Vet Rec*, 159: 587-590.
- Powers J.G., VanMetre D.C., Collins J.K., Dinsmore R.P., Carman J., Patterson G., Brahmabhatt D., Callan R.J. (2005). Evaluation of ovine herpesvirus type infections as detected by competitive inhibition ELISA and polymerase chain reaction assay, in dairy cattle without clinical signs of malignant catarrhal fever. *J Am Vet Med Assoc*, 227: 606-611.
- Cortez P.P., Carvalheira J., Pauperio S., Thompson G. (2008). Prevalence of ovine herpesvirus type 2 in north-west Portugal. *Vet Rec*, 162: 282-284.
- OIE technical disease cards, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/MALIGNANT_CATHARRAL_FEVER.pdf
- Stahel A.B.J., Baggenstos R., Engels M., Friess M., Ackermann M. (2001). Two different Macavirus, ovine herpesvirus-2 and caprine herpesvirus-2, behave differently in water buffaloes than in cattle or in their respective reservoir species. *PLoS ONE*, 8, e83695.
- Mushi, E. Z., Karstad, L., Jessett, D. M. (1980). Isolation of bovine malignant catarrhal fever virus from ocular and nasal secretions of wildebeest calves. *Res Vet Sci*, 29:168-171.
- Campolo M., Lucente M.S., Mari V., Elia G., Tinelli A., Laricchiuta P., Caramelli M., Nava D., Buonavoglia C., Decaro N. (2008). Malignant catarrhal fever in a captive American bison (*Bison bison*) in Italy. *J Vet Diagn Invest*, 20: 843-6.
- Modesto P., Grattarola C., Biolatti C., Varello K., Casalone C., Mandola M.L., Caruso C., Dondo A., Gorla M., Rocca F., Decaro N., Leonardi C., Iulini B., Acutis P.L. (2015). First report of malignant catarrhal fever in a captive pudu (*Pudu pudu*). *Res Vet Sci*, 99: 212-214.
- Decaro N., Bozzo G., Tinelli A., Buonavoglia D., Magri V.M. (2003). Febbre catarrale maligna in due bovine in Sicilia. *Large Animal Review*, 1: 29-35.
- Casalnuovo F., Cacia A., Scarpino P., Gualtieri G., Gagliardi G., Caparello G. (1996). Febbre catarrale maligna dei bovini: segnalazione di 2 casi clinici negli allevamenti calabresi. *Praxis Vet*, 17: 20-22.
- Guarino A., Agrimi U., Fenizia D., Tollis M. (1993). Focolaio di Febbre catarrale maligna bovina in Italia. *Atti del XLVII congresso S.I.S.Vet.*, 29 Settembre - 2 Ottobre 1993, Riccione (RN) pp. 1949-1950.
- Martuccioli A., Marianelli C., Capuano M., Astarita S., Alfano D., Galiero, G. (2006). Indagine su un focolaio di febbre catarrale maligna nella bufala mediterranea (*bubalus bubalis*). *Large Animal Review*, 5: 21-24.
- Sconza S., Brunetti B., Gentile A., Benazzi C. (2003). La febbre catarrale maligna del bovino: una malattia trascurata? *Atti del XXXV congresso della Società Italiana di Buiatria*, pp. 219-231.
- Premkrishnan G.N., Sood R., Hemadri D., Chanu Kh.V., Khandia R., Bhat S., Dimri U., Bhatia S. (2015). Cross-sectional study indicates nearly a quarter of sheep population in Karnataka state of India is infected with ovine herpesvirus 2. *Vir Dis*, 26: 180-188.
- Bremer C.W. (2010). The prevalence of ovine herpesvirus-2 in 4 sheep breeds from different regions in South Africa. *J S Afr Vet Ass*, 81: 93-96.

23. Grattarola C., Decaro N., Amorisco F., Dondo A., Giorgi I., Varello K., Casalone C., Masoero L., Crescio M.I., Trisorio S., Peletto S., Acutis P.L. (2012). Analisi filogenetica di OvHV-2 isolati in Piemonte. XIV Congresso Nazionale SIDILV- Sorrento (NA), 24-26 Ottobre 2012.
24. Grattarola N.C., Iulini B., Zoppi S., Varello K., Dondo A., Rumello G., Baglivo T., Rondoletti M., Savini G., Amorisco F., Casalone C. (2011). Indagine su tre focolai di febbre catarrale maligna nel bovino in Piemonte. *Large Animal Review*, 17: 49-55.
25. Li H., Shen D.T., Knowles D.P., Gorham J.R., Thorne T., O'Toole D., Crawford T.B. (1996). Prevalence of antibody to malignant catarrhal fever virus in wild and domestic ruminants by competitive-inhibition ELISA. *J Wildl Dis*, 32: 437-443.
26. VanDevanter D.R., Warrener P., Bennett L., Schultz E.R., Coulter S., Garber R.L., Rose T.M. (1996). Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J Clin Microbiol*, 34: 1666-71.
27. OIE, Terrestrial Manual 2018. Malignant catarrhal fever. Chapter 3.4.13. Pp. 1173-1184. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.13_MCF.pdf
28. Baxter S.I., Pow I., Bridgen A., Reid H.W. (1993). PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. *Arch Virol*, 132: 145-159.
29. Flach E.J., Reid H., Pow I., Klemm A. (2002). Gamma-herpesvirus carrier status of captive artiodactyls. *Res. Vet Sci*, 73: 93-99.
30. Mirangi K., Kang'ee F.M. (1997). Detection of ovine herpesvirus in Kenyan sheep by polymerase chain reaction. *Vet Rec*, 41: 76-177.
31. Kalayci G., Ekmez K., Kalan M., Ozkan B., Kucukali Y. (2015). Investigation of ovine herpesvirus-1 in sheep. *ESVV05 - EPIZONE*, 2-3 September 2015, Montpellier-France.
32. Li H., Snowden G., O'Toole D.T., Crawford T.B. (1998). Transmission of ovine herpesvirus 2 in lambs. *J Clin Microbiol*, 36: 223-226.
33. Campolo M., Desario C., Lorusso E., Elia G., Nava D., Decaro N., Buonavoglia C. (2005). Infezione sperimentale di capre con herpesvirus ovino tipo 2. URL: https://www.researchgate.net/profile/Donatella_Nava/publication/242513351_infezione_sperimentale_di_capre_con_herpesvirus_ovino_tipo_2_experimental_infection_in_goats_with_ovine_herpesvirus_type_2/links/0a85e53b2961e095a9000000/infezione-sperimentale-di-capre-con-herpesvirus-ovino-tipo-2-experimental-infection-in-goats-with-ovine-herpesvirus-type-2.pdf.
34. Zhu H., Huang Q., Hu X., Chu W., Zhang J., Jiang L., Yu X., Zhang X., Cheng S. (2018). Caprine herpesvirus 2-associated malignant catarrhal fever of captive sika deer (*Cervus nippon*) in an intensive management system. *BMC Vet Res*, 14: 38.
35. Taus N.S., Herndon D., Traul D.L., Stewart J.P., Ackermann M., Li H., Knowles D.P., Lewis G.S., Brayton K.A. (2007). Comparison of ovine herpesvirus 2 genomes isolated from domestic sheep (*Ovis aries*) and a clinically affected cow (*Bos bovis*). *J Gen Virol*, 88: 40-45.
36. Li H., Snowden G., O'Toole D., Crawford T.B. (1997). Transmission of Ovine Herpesvirus 2 in lambs. *J Clin Microbiol*, 36: 223-226.
37. Li H., Snowden G., Crawford T.B. (1999). Production of malignant catarrhal fever virus-free sheep. *Vet Microbiol*, 65: 167-172.
38. Riaz A., Dry I., Levy C.S., Hopkins J., Grey F., Shaw D.J., Dalziel R.G. (2014). Ovine herpesvirus-2-encoded microRNAs target virus genes involved in virus latency. *J Gen Virol*, 95: 472-480.
39. Barton E.S., White D.W., Cathelyn J.S., Brett-McClellan K.A., Engle M., Diamond M.S., Miller V.L., Virgin H.W. (2007). Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature*, 447: 326-329.
40. Frolich K., Li H., Muller-Doblies U. (1998). Serosurvey for antibodies to Malignant Catarrhal fever associated viruses in free-living and captive cervids in Germany. *Journal of Wildlife Diseases*, 34: 777-782.
41. Giangaspero M., Savini G., Osawa T., Harasawa R. (2013). Serological survey to determine the occurrence of malignant catarrhal fever infection in the Japanese small ruminant population from northern districts. *J Vet Med Sci* 75: 815-818.