

ANALISI FILOGENETICA CONDOTTA SU CEPPI DI BOVINE DIARRHEA VIRUS (BVDV) ISOLATI IN SICILIA

Vincenza Cannella, Annalisa Guercio, Samanta Partanna, Giusi Macaluso, Giuseppa Purpari, Patrizia Di Marco, Santina Di Bella, Vincenzo Di Marco Lo Presti
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo, Italy



INTRODUZIONE

La Diarrea Virale del Bovino-Malattia delle Mucose (BVD-MD) è una malattia infettiva che colpisce i bovini, diffusa a livello mondiale. Il virus responsabile, il BVDV, appartiene al genere *Pestivirus*, famiglia *Flaviviridae*. Il genoma virale è caratterizzato dalla presenza di una lunga sequenza *ORF* codificante, fiancheggiata da due sequenze non codificanti 3' UTR e 5' UTR. Come tutti i virus ad RNA, il BVDV, presenta una elevata capacità di andare in contro a mutazioni genetiche, dando origine a numerose varianti virali. Ad oggi sono noti due principali genotipi del virus: BVDV-I e BVDV-II (1). Il primo comprende almeno 15 sottotipi, mentre ne sono stati descritti solo due per il BVDV-II (BVDV-IIa e BVDV-IIb) (2). Quest'ultimo è poco diffuso nel nostro territorio ed è responsabile di una sindrome emorragica altamente letale. Recentemente è stata anche ipotizzata la presenza, nel nostro territorio, di una terza variante, il BVDV-III (3). Dal punto di vista sintomatologico, l'infezione è spesso associata a disordini a livello riproduttivo e può esitare in aborto, malformazioni fetali o nascita di vitelli persistentemente infetti (PI).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di genotipizzare i ceppi di BVDV isolati, al fine di approfondire le conoscenze circa le varianti circolanti in Sicilia.

MATERIALI E METODI

Sono stati sequenziati ed analizzati dal punto di vista filogenetico 18 ceppi virali provenienti da animali risultati positivi ai test virologici di routine dal 2005 al 2008. I campioni da cui sono stati isolati i ceppi, comprendevano: tamponi, sangue e organi di feti abortiti.

Test virologici: Lo screening virologico è stato condotto attraverso un ELISA specifica per l'antigene virale (IDEXX HerdChek) e una RT-PCR condotta con primers, DL1 e DL4, specifici per una porzione di 290 bp della regione 5' UTR (4). Per eseguire il test biomolecolare, l'RNA virale è stato estratto con un kit commerciale (High Pure RNA isolation kit - Roche). L'isolamento virale è stato effettuato in linee cellulari di MDBK. Dopo tre passaggi cellulari la presenza del virus nel criolisato è stata confermata mediante RT-PCR.

Analisi Filogenetica: Per la caratterizzazione dei ceppi isolati, una porzione di 288 bp della regione 5'-UTR è stata amplificata mediante l'uso di una coppia di primers 324 e 326, secondo il protocollo descritto da Vilcek et al. (Fig. 1) (5)

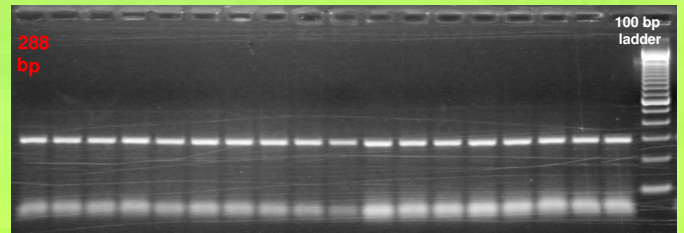


Figura 1. Prodotti di amplificazione di 288 bp, relativi ai 18 ceppi di BVDV

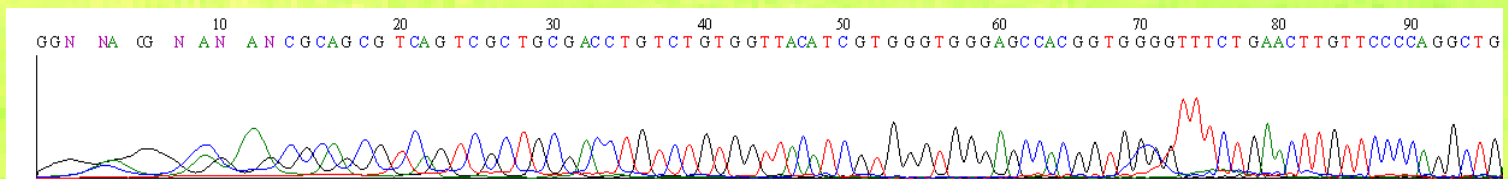


Figura 2. Sequenza di BVDV-I

Il sequenziamento della regione amplificata è stato condotto in entrambe le direzioni *Forward* e *Reverse* (Fig. 2). Le sequenze ottenute sono state allineate e comparate con altre sequenze di riferimento, disponibili in GeneBank grazie all'uso del programma Clustal W (6). Le sequenze allineate sono state, inoltre, corrette manualmente con l'uso di BioEdit ver 5.0.9. (7). L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando il software Phylip ver. 3.68, secondo il metodo Neighbour-joining e Felsenstein 84 (8), mentre l'analisi di bootstrap è stata realizzata su 1000 replicati. Infine, per verificare l'origine bovina dei ceppi, è stata condotta un'analisi di restrizione sugli amplificati di 288 bp, con l'uso dell'enzima *Ava*I (5)

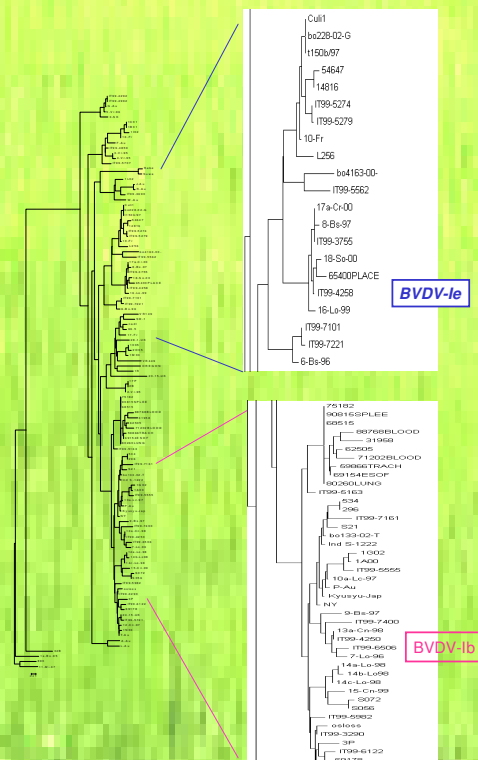


Figura 3. Albero filogenetico

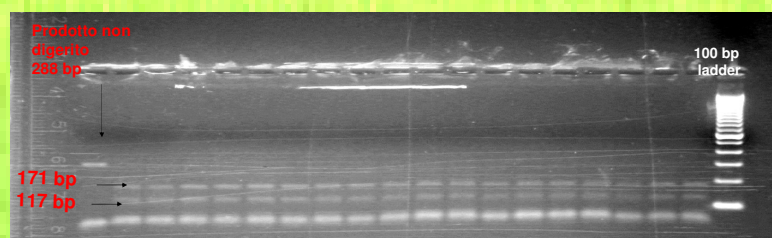


Figura 4. Digestione con l' Enzima di Restrizione *Ava* I

RISULTATI E CONCLUSIONI

L'analisi filogenetica eseguita sulla regione 5'UTR dei 18 ceppi di BVDV isolati in Sicilia, ha permesso di evidenziare la presenza di due dei sottotipi virali appartenenti al genotipo BVDV-I: il BVDV-Ie e il BVDV-Ib (Fig. 3). Nessun ceppo isolato è risultato appartenere al genotipo BVDV-II. Infine, l'analisi di restrizione ha confermato l'origine bovina di ciascun isolato, avendo prodotto i frammenti di digestione attesi, rispettivamente di 171 e 117 bp (Fig. 4). Questo lavoro descrive la caratterizzazione, su base molecolare, di ceppi di BVDV, mostrando una bassa eterogeneità tra i ceppi circolanti in Sicilia. Come è noto, l'analisi filogenetica dei ceppi virali isolati in un determinato territorio, rappresenta un valido strumento per il monitoraggio di una malattia infettiva. In questo modo è possibile evidenziare la presenza di eventuali varianti, realizzare test diagnostici specifici e applicare una profilassi vaccinale mirata.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Ridpath J.F., Bolin S.R., Dubovi E.J. "Segregation of bovine diarrhoea virus into genotypes" (1994). *Virology*, 205: 66-74.
- 2) Mishra N., Rajiukumar K., Vilcek S., Tiwari A., Satav J.S., Dubey S.C. "Molecular characterization of bovine viral diarrhoea virus type 2 isolate originating from a native Indian sheep" (2008). *Vet. Microbiol.*, 130: 88-98.
- 3) De Caro N., Mari V., Lucente M.S., Colaianni M.L., Cirone F., Losurdo M., Cordioli P., Buonavoglia C. "Virus della diarrea virale bovina tipo 3 associato a malattia respiratoria" (2010). *Atti XII Congr. Nazionale S.I.D.I.L.V.*
- 4) Kim S.G., Dubovi E.J. "A novel single one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood and follicular fluid samples" (2003). *Biol.*, 31: 103-106.
- 5) Vilcek S., Herring J.A., Nettleton P.F., Lowings J.P., Paton D.J. "Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis" (1994). *Arch. Virol.*, 136: 309-323.
- 6) Thompson J.D., Higgins G.D., Gibson T.J. "Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice" (1994). *Nucl. Acid Res.* 22: 4673-4680
- 7) Hall T.A.: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 NT" (1999). *Nucl. Acid Symp.* 41:95-98.
- 8) Felsenstein J. "Phylogenetic inference package 3.6 (alpha3)" (2001). Distributed by the author, Department of Genetics University of Washington, Seattle.