

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE VETERINARIE**

Ciclo XXIX

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H3

Settore Scientifico disciplinare: VET/05

**Diagnosi diretta e indiretta dell'infezione
da Herpesvirus 1 in bufali del Sud Italia**

Presentata da: Dott.ssa Annarosaria Marullo

Coordinatore Dottorato

prof. Arcangelo Gentile

Supervisore

prof. Santino Prosperi

Co-supervisore

prof.ssa Luisa De Martino

Esame finale anno 2018

*Ma sapete ...
la Felicità la si può trovare
anche negli attimi più tenebrosi
se solo uno
si ricorda di accendere la luce.*

(HP3)

INDICE

ABSTRACT	5
-----------------------	----------

PARTE PRIMA	11
--------------------------	-----------

INTRODUZIONE.....	12
IL BUFALO. Patrimonio, origini, diffusione.....	14
HERPESVIRUS.....	17
- Generalità.....	17
- Proprietà chimico-fisiche.....	18
- Coltivazione dei virus.....	18
- Virione.....	19
- Genoma e Replicazione virale.....	21
BoHV-1 (<i>Bovine Herpesvirus type 1</i>).....	24
- Storia.....	24
- Sottotipi.....	24
- Trasmissione.....	25
- Infezione.....	26
- Latenza e Riattivazione virale.....	27
- Percorso realistico di infezione latente.....	29
- Ganglio Trigemino (TG).....	31
- Risposta Immunitaria (RI).....	34
- Patologie.....	35
- Forma respiratoria – IBR.....	35
- Forma genitale – IPV e IPB.....	37
- Aborto.....	38
- Infezione neonatale sistemica.....	38
BoHV-1 nel Bufalo.....	39
BuHV-1 (<i>Bubaline Herpesvirus type 1</i>).....	40
- Storia e peculiarità.....	40
CORRELAZIONE e DIVERSITA' tra BoHV-1 e BuHV-1.....	41
DIAGNOSI DIRETTA e INDIRETTA.....	43
PROFILASSI, RISANAMENTO, ERADICAZIONE.....	45
- Misure di profilassi.....	46
- Profilassi DIRETTA: PIANO BIOSICUREZZA.....	46
- Profilassi INDIRETTA: PIANO VACCINALE.....	49
STRESS OSSIDATIVO (SO).....	51

PARTE SECONDA..... 52

SCOPO DEL LAVORO	53
MATERIALE E METODI	54
- Raccolta campioni: gangli trigeminali (TGs).....	54
- Raccolta campioni: sangue/siero.....	60
- Raccolta campioni: tamponi nasali (TN) e tamponi vaginali (TV).....	62
- Colture cellulari.....	63
- Omogenato di ganglio trigeminale (TG) e infezione.....	64
- Estrazione DNA virale.....	66
- PCR.....	68
- Analisi elettroforetica.....	69
- Real-Time PCR.....	70
- ELISA test.....	71
- Sieroneutralizzazione (SN) test e cross-SN.....	78
- Stress ossidativo (SO) test.....	80
RISULTATI	82
DISCUSSIONE	87
BIBLIOGRAFIA	90
RINGRAZIAMENTI	94

ABSTRACT

Il bufalo mediterraneo (*Bubalus bubalis*), chiamato dagli anglosassoni *water buffalo*, è l'ospite primario e *reservoir* di *Bubaline Herpesvirus type 1* (BuHV-1), patogeno originariamente isolato in Australia dal prepuzio di un maschio bufalino [St. George and Philpott, 1972] e più recentemente nel sud Italia dopo riattivazione farmacologica in una bufala [De Carlo *et al.*, 2004]. Nella specie bufalina è noto che circola anche *Bovine Herpesvirus type 1* (BoHV-1) [Peschev and Christova, 2000; De Carlo *et al.*, 2004; Scicluna *et al.*, 2007 e 2010].

BoHV-1 e BuHV-1 appartengono entrambi alla sottofamiglia degli *α -herpesvirinae*, e pur essendo altamente correlati tra di loro, l'analisi filogenetica li classifica come patogeni diversi [Nogarol *et al.*, 2014; De Carlo and Martucciello, 2014]. Sequenze di virus specifiche sono state messe in evidenza anche da feti abortiti [Amoroso *et al.*, 2013].

Questi due Herpesvirus 1 inducono patologie altamente trasmissibili a carico dell'apparato respiratorio (Rinotracheite Infettiva Bovina, IBR) e riproduttore (Vulvovaginite Pustolosa, IPV, nelle femmine; Balanopostite, IPB, nei maschi), ma il contagio avviene anche in modo indiretto per via diaplacentare e per contatto con secrezioni infette.

Oltre al bufalo mediterraneo italiano, la specie animale di interesse zootecnico più sensibile all'infezione eterologa da Herpesvirus 1 è *Bos taurus* (bovino domestico) [Homan and Easterday, 1980; De Regge *et al.*, 2006].

In letteratura è noto che questi virus erpetici 1 inducono nella specie bovina una sintomatologia clinica conclamata, diversamente nella specie bufalina è quasi sempre subclinica.

Sono patogeni capaci di stabilire latenza nei gangli craniali (in particolare nei trigeminali) e/o sacrali, e questo meccanismo consente loro di persistere nell'animale infetto per tempi indefiniti sotto forma di "infezione silente" [Homan and Easterday, 1980; Rock *et al.*, 1992; Winkler *et al.*, 2000 and 2002; Perez *et al.*, 2005; De Regge *et al.*, 2006] e di potersi poi riattivare in condizioni di stress endogeni o esogeni.

Ciò rappresenta un problema sul piano della patologia e dell'epidemiologia in quanto si verifica un'aggiuntiva disseminazione del virus nell'ambiente esterno e rappresenta così un'ulteriore contagio per gli animali sani.

I due patogeni compromettendo la via aerogena e la via venerea del bufalo inducono sia danni sanitari diretti (malattia subclinica/clinica) che indiretti (economici: ipofertilità/infertilità, calo della produzione latte, aborto, encefaliti, spese veterinarie, etc.) [Marullo *et al.*, 2015].

Nel presente progetto di ricerca lo scopo principale è stato quello eseguire una diagnosi di infezione da Herpesvirus 1 (BoHV-1 e BuHV-1), mediante modalità diretta e indiretta, su campioni di bufalo prelevati nel sud Italia, in particolare nella regione Campania, e valutarne l'effettiva efficienza, sensibilità, specificità, potere discriminante.

Ciò affinché nella stesura di piani di risanamento futuri per la specie bufalina si faccia attenzione alla scelta dei test diagnostici, in modo da individuare quelli più performanti per raggiungere l'obiettivo.

La diagnosi diretta, che mette in evidenza gli antigeni virali, è stata eseguita su materiale prelevato *in vivo* (tamponi nasali e vaginali effettuati in allevamenti della provincia di Caserta) e *post-mortem* (gangli del trigemino prelevati nei macelli di Avellino, Salerno e Caserta) mediante isolamento virale, PCR, Real-Time PCR.

La diagnosi indiretta, che rileva la presenza degli anticorpi anti-BoHV-1 e anti-BuHV-1, è stata effettuata su sieri prelevati in aziende casertane e nei suddetti macelli. Gli anticorpi sono stati individuati con metodiche immunoenzimatiche (ELISA), e con prove di sieroneutralizzazione virale (SN).

In particolare è stato condotto uno studio preliminare di confronto tra metodi diagnostici sierologici per la ricerca di anticorpi anti-herpesvirus 1 nei bufali [De Carlo and Martucciello, 2014; Bertolotti *et al.*, 2015]. Gli obiettivi principali sono stati due:

1 – confrontare i risultati ottenuti, dall'analisi di sieri bufalini, con l'utilizzo di kit ELISA presenti in commercio e prove di SN;

2 – valutare, nei sieri di bufalo, la capacità discriminante sia delle prove immunoenzimatiche che della SN nei confronti di anticorpi anti-BoHV-1 e anti-BuHV-1.

Altro scopo del progetto di ricerca è stato quello di utilizzare parte dei sieri e dei gangli trigeminali di bufalo, risultati positivi a Herpesvirus 1 (BoHV-1 e BuHV-1) mediante le prove sierologiche, per valutare lo stato di Stress Ossidativo (SO) attraverso il rapporto tra d-ROMs test, che valuta la concentrazione dei ROS (radicali liberi); e l'anti-ROMs test, che valuta la capacità difensiva della barriera antiossidante.

I virus, compresi gli Herpes, possono alterare l'equilibrio ossidativo o aumentando la formazione dei RL o inibendo la sintesi di enzimi coinvolti nella difesa ossidativa all'interno delle cellule ospiti. Di recente è stato accertato che i bovini contagiati da herpes bovino (BoHV-1) presentano più SO ed una difesa antiossidante molto bassa [Durgut *et al.*, 2013].

I risultati delle prove di isolamento virale e di PCR hanno dato esito negativo coi protocolli standard utilizzati; invece, 2/50 TGs e 4/28 tamponi hanno dato una debole positività con la Real-Time PCR. Le prove sierologiche utilizzate hanno messo in evidenza che i kit ELISA della ditta IN3 sono più performanti nel discriminare gli herpes-1 (BoHV-1 e BuHV-1) nei soggetti appartenenti alla specie bufalina; i kit ELISA della ditta IDEXX sembrano comunque restare più performanti per la specie bovina.

La prova di cross-SN ha mostrato una capacità discriminante verso il ceppo omologo di almeno 2 diluizioni nel 65% dei bufali testati. Per quanto riguarda lo *status ossidativo* (SO) il pattern di ossidanti e barriera antiossidante è alterato nei TGs bufalini infetti da herpesvirus 1 rispetto a quelli controllo; nei sieri, invece BuHV-1 e BoHV-1 hanno indotto un significativo aumento dello stato di SO.

In conclusione, in base ai risultati ottenuti, possiamo ritenere che questo lavoro sia servito a fare un passo avanti nella valutazione della reale efficienza, sensibilità, specificità, potere discriminante delle varie tecniche diagnostiche attualmente disponibili in commercio nei confronti degli herpes 1 di bufalo.

ABSTRACT

The Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*), called by the English *water buffalo*, is the primary host and reservoir of *Bubaline Herpesvirus type 1* (BuHV-1), pathogen originally isolated in Australia from the foreskin of a male buffalo [St. George and Philpott, 1972] and more recently in southern Italy after pharmacological reactivation in a female buffalo [De Carlo *et al.*, 2004]. In the buffalo species it is also known that Bovine Herpesvirus type 1 (BoHV-1) also circulates [Peschev and Christova, 2000; De Carlo *et al.*, 2004; Scicluna *et al.*, 2007 and 2010].

BoHV-1 and BuHV-1 both belong to the subfamily of α -herpesvirinae, and although they are highly correlated with each other, phylogenetic analysis classifies them as different pathogens [Nogarol *et al.*, 2014; De Carlo and Martucciello, 2014]. Specific virus sequences have also been highlighted by aborted fetuses [Amoroso *et al.*, 2013].

These two Herpesviruses 1 induce highly transmissible diseases of the respiratory system (Bovine Infectious Rhinotracheitis, IBR) and reproducer (Vulvovaginitis Pustolosa, IPV, in females, Balanoposthitis, IPB, in males), but the infection also occurs indirectly via diaplacental and by contact with infected secretions.

In addition to the Italian Mediterranean buffalo, the animal species of zootechnical interest most sensitive to Herpesvirus 1 heterologous infection is *Bos taurus* (domestic cattle) [Homan and Easterday, 1980; De Regge *et al.*, 2006].

In the literature it is known that the herpetic viruses 1 induce in the bovine species a complete clinical symptomatology, differently in the buffalo species it is almost always subclinical.

They are pathogens capable of establishing latency in cranial (especially trigeminal) and/or sacral ganglia, and this mechanism allows them to persist in the infected animal for indefinite times in the form of "*silent infection*" [Homan and Easterday, 1980; Rock *et al.*, 1992; Winkler *et al.*, 2000 and 2002; Perez *et al.*, 2005; De Regge *et al.*, 2006] and then be able to reactivate in endogenous or exogenous stress conditions. This represents a problem in terms of pathology and epidemiology as there is an additional dissemination of the virus in the external environment and thus represents a further contagion for healthy animals.

The two pathogens compromising the airway pathway and the venereal pathway of the buffalo induce both direct medical (subclinical /clinical) and indirect (economic: hypofertility/infertility, loss of milk production, abortion, encephalitis, veterinary costs, etc.) damage [Marullo *et al.*, 2015].

In the present research project the main purpose was to perform a diagnosis of Herpesvirus 1 infection (BoHV-1 and BuHV-1), using direct and indirect methods, on buffalo samples taken in southern Italy, particularly in the Campania region, and evaluate its effective efficiency, sensitivity, specificity, discriminating power.

This is so that in drafting plans for future remediation for the buffalo species, pay attention to the choice of diagnostic tests, so as to identify the most performing to achieve the goal.

The direct diagnosis, which highlights the viral antigens, was performed on material taken in vivo (nasal and vaginal swabs carried out in breeding farms in the province of Caserta) and post-mortem (trigeminal ganglions taken in the slaughterhouses of Avellino, Salerno and Caserta) by viral isolation, PCR, Real-Time PCR.

The indirect diagnosis, which detects the presence of anti-BoHV-1 and anti-BuHV-1 antibodies, was carried out on sera taken in casertanian companies and in the abovementioned slaughterhouses. The antibodies have been identified by enzyme immunoassays (ELISA), and by tests of viral serum neutralization (SN).

In particular, a preliminary study was conducted to compare serological diagnostic methods for the detection of anti-herpesvirus 1 antibodies in buffalo [De Carlo and Martucciello, 2014; Bertolotti *et al.*, 2015]. The main objectives were two:

- 1 - compare the results obtained, from the analysis of buffalo sera, with the use of ELISA kits available on the market and SN tests;
- 2 - evaluate, in buffalo sera, the discriminating ability of both the enzyme immunoassay and the SN against anti-BoHV-1 and anti-BuHV-1 antibodies.

Another aim of the research project was to use part of the serum and trigeminal ganglia of buffalo, positive results in Herpesvirus 1 (BoHV-1 and BuHV-1) by means of serological tests, to evaluate the state of Oxidative Stress (SO) through the relationship between d-ROMs test, which evaluates the concentration of ROS (free radicals); and the anti-ROMs test, which assesses the defensive capacity of the antioxidant barrier.

Viruses, including Herpes, can alter oxidative balance or increase RL formation or inhibit the synthesis of enzymes involved in oxidative defense within host cells. Recently it has been found that cattle infected with bovine herpes (BoHV-1) have more SO and very low antioxidant defense [Durgut *et al.*, 2013].

The results of viral isolation and PCR tests gave a negative result with the standard protocols used; instead, 2/50 TGs and 4/28 swabs gave a weak positivity with Real-Time PCR. The serological tests used have shown that the IN3 ELISA kits are more effective in discriminating herpes 1 (BoHV-1 and BuHV-1) in subjects belonging to the buffalo species; the IDEXX ELISA kits, however, seem to remain more efficient for the bovine species. The cross-SN test showed a discriminating ability towards the homologous strain of at least 2 dilutions in 65% of the tested buffaloes. As regards *oxidative status* (SO), the oxidants and antioxidant barrier pattern is altered in the buffalo TGs infected with herpesvirus 1 compared to the control; in sera, however, BuHV-1 and BoHV-1 induced a significant increase of the status of SO.

In conclusion, based on the results obtained, we can consider that this work has served to make a step forward in the assessment of the real efficiency, sensitivity, specificity, discriminating power of the various diagnostic techniques currently available on the market against herpes 1 of buffalo.

PARTE PRIMA

INTRODUZIONE

In Italia il bufalo river (*Bubalus bubalis*), in particolare la nostra bufala Mediterranea Italiana, rappresenta una risorsa rilevante sia dal punto di vista zootecnico che economico, e ciò in relazione alla produzione di mozzarella di bufala campana DOP (il cui latte eccelle per contenuto in grasso e proteine rispetto a quello vaccino), di ricotta, di formaggi, e di carne (sebbene quest'ultima con una percentuale minore).

Questa specie è allevata principalmente in Italia meridionale, con una popolazione di circa 388.000 capi (dati Banca Dati Nazionale, BDN, 12/2016), dove non è raro che conviva insieme alla specie bovina all'interno di una stessa azienda.

Bufali e bovini (*Bos taurus*) sono specie strettamente correlate tra di loro visto che appartengono alla stessa famiglia *Bovidae*, eppure non sono classificati nel medesimo genere, e ciò a sottolineare che nonostante tutto presentano delle differenze che li caratterizzano, per cui le conclusioni ottenute da ricerche condotte sui bovini non possono essere traslate nei bufali senza effettuare le appropriate verifiche. Ne è prova, per esempio, uno studio di Montagnaro *e coll.* (2008) che riporta differenze di sensibilità e specificità ai test sierologici per la brucellosi tra bovini e bufali. Inoltre, se si riporta questo discorso ad un livello microscopico e ci si riferisce agli Herpes 1, in particolare a *Bubaline herpesvirus 1* (BuHV-1) e *Bovine herpesvirus 1* (BoHV-1), il concetto non cambia, ovvero nonostante si tratti di virus antigeneticamente e geneticamente correlati l'analisi filogenetica li identifica come patogeni diversi [Nogarol *et al.*, 2014; De Carlo and Martucciello, 2014].

I membri della famiglia *Herpesviridae* sono DNA virus che mostrano uno spettacolare successo evolutivo. Il nome herpesvirus, derivato dal greco ερπειν (herpein), "strisciare", si riferisce alle lesioni caratteristiche causate da due herpesvirus umani comuni: il virus herpes simplex (HSV) e l'herpesvirus varicella zoster (VZV).

Questa famiglia di virus comprende quasi duecento virus isolati da ospiti diversi come i molluschi, pesci, anfibi, rettili, uccelli e mammiferi [Roizman and Pellet, 2001]. In natura, la maggior parte dei virus erpetici sono strettamente associati con una singola specie-ospite e quasi tutti gli ospiti di origine animale supportano adeguatamente l'infezione di almeno un tipo di herpesvirus [Davison *et al.*, 2002]. La suscettibilità degli ospiti ai diversi virus erpetici col passare degli anni è un po' mutata, infatti oggi è nota che sia la specie bufalina che quella bovina sono risultati sensibili alle infezioni eterologhe da BoHV-1 e BuHV-1 [De Carlo and Martucciello, 2014], e ciò significa che hanno subito un processo di "adattamento" per garantirsi una maggiore percentuale di sopravvivenza nell'ambiente, nonostante utilizzino a questo scopo già l'infezione latente.

La famiglia Herpesviridae è suddivisa in tre sottofamiglie, chiamate *alfa-*, *beta-* e *gamma-*herpesvirinae. La sottofamiglia *Alpha-* (caratterizzata da una grande gamma di animali-ospiti) contiene quattro generi: *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardiviruses* e *Iltoviruses*.

Tra gli alphaherpesvirus che infettano i ruminanti, si ritrovano sia il BoHV-1 che il BuHV-1, agenti patogeni del bestiame che causano principalmente patologie a carico dell'apparato respiratorio (Rinotracheite Infettiva del Bovino, IBR) e riproduttivo (Vulvovaginite Pustolosa Infettiva, IPV nelle femmine; Balanopostite, IPB, nei maschi). Il contagio avvenendo per via orizzontale e verticale [Pastoret *et al.*, 1982] provoca negli animali sia danni sanitari diretti (malattia clinica o subclinica) che indiretti (ipofertilità/infertilità, calo della produzione latte, aborto, encefaliti, spese veterinarie, etc.). Ciò spiega perché l'IBR/IPV rappresenti una malattia di grande rilevanza economica in molte parti del mondo e soprattutto in Europa, sia nei Paesi in cui questa infezione è stata debellata che in quelli in cui il controllo è attualmente o sarà intrapreso [Thiry *et al.*, 1999]. Considerando che la presenza di IBR nel nostro territorio può avere implicazioni negative nell'ambito della commercializzazione e movimentazione degli animali sieropositivi tra una zona e l'altra, e ancor di più in ambito internazionale [Purpari *et al.*, 2005; De Carlo and Martucciello, 2014] (diversi Paesi hanno attuato piani di eradicazione ed esigono un certificato rilasciato da Enti autorizzati - IZZSS - che attesti la sieronegatività a IBR), si rende necessaria la conoscenza della presenza di herpesvirus negli allevamenti bufalini. Inoltre la sieronegatività a IBR è richiesta soprattutto per i tori destinati ai centri di riproduzione (si ha una riduzione del numero di stalle dalle quali è possibile prelevare soggetti, con un'evidente rischio di forte riduzione della variabilità e del miglioramento genetico) e quindi bisogna adottare misure di routine per il controllo dell'infezione, partendo dalle misure di profilassi diretta (PIANO DI BIOSICUREZZA) fino ad arrivare a quella indiretta (PIANO VACCINALE).

In molti Paesi europei (eccezione fatta per Svizzera, Austria, Svezia, Norvegia, Finlandia, Danimarca, alcune aree della Baviera considerate indenni IBR) e in alcune regioni italiane (Trentino, Lombardia, Piemonte, Veneto, Friuli, Lazio, Campania; eccetto Bolzano e Trento reputate indenni IBR dall'UE) esistono già specifici piani di risanamento/eradicazione della malattia su base obbligatoria o volontaria [Purpari *et al.*, 2005] che sono indirizzati in modo particolare al comparto bovino, e non sempre estesi a quello bufalino.

Indagini epidemiologiche, attualmente disponibili, condotte su alcuni territori italiani, confermano la diffusione di questi virus nei bufali [Scicluna *et al.*, 2007; De Carlo and Martucciello, 2014], ma si tratta ancora di dati incompleti. Ciò rende importante quantificare il reale impatto economico che la malattia determina in una popolazione infetta, chiarire il ruolo patogeno che gli herpesvirus rivestono, valutare la funzione di serbatoio, di diffusore che il bufalo rappresenta, e soprattutto scegliere i test diagnostici più performanti (in materia di efficienza, sensibilità, specificità) per raggiungere l'obiettivo di risanamento/eradicazione nei vari allevamenti zootecnici.

IL BUFALO

Patrimonio, origini, diffusione

La popolazione bufalina mondiale ammonta a circa 190 milioni di capi distribuiti in tutti i continenti: quasi il 96% in Asia (concentrati maggiormente in India, Cina e Pakistan), circa il 2% in Africa (con la consistenza maggiore in Egitto) e il resto tra l'Europa (soprattutto Italia, Romania, Turchia) e l'America Latina (Brasile, Venezuela, Colombia e Argentina) [FAO, 2010]. Negli ultimi 10 anni, il numero di capi è aumentato di 20 milioni con un tasso di crescita pari al 12.5%.

Il bufalo asiatico (*Bubalus bubalis* L., detto dagli anglosassoni “*water buffalo*”) (Fig.1) è classificato in due gruppi: Swamp (67%; numero di cromosomi: 48) e River (33%; numero di cromosomi: 50). Al gruppo River (*bufalo d'acqua*) fanno capo numerose razze, tra cui la “bufala Mediterranea”, che è diffusa in Egitto, Medio Oriente, Sud America e in Europa dove il patrimonio bufalino complessivo è di circa 480.000 capi e il cui 84% è situato in Italia [fonti FAO].

La razza allevata nel nostro Paese è oggi indicata con la denominazione “Bufala Mediterranea Italiana”. Diverse sono le ipotesi della sua comparsa in Italia, eppure molti sono concordi nell'affermare che sia avvenuta durante le invasioni longobarde con Agilulfo nel 568 a.C., e solo tra il XII e il XIII secolo questa specie assunse una certa importanza nella realtà economica e sociale del nostro Paese, in quanto veniva utilizzata per lo sfruttamento dei terreni paludosi e malsani, senza contare che si trattava di un animale forte, resistente alle malattie, in grado di trasformare le risorse foraggere degli acquitrini in un prodotto pregiato, e richiedeva poche cure. Tutto ciò avvenne là dove i bovini (nonostante gli elevati costi di strutture, manutenzione e impegno che richiedevano) facevano registrare elevati tassi di mortalità e non erano quindi in grado di produrre reddito (da qui nasce il detto napoletano: *'a vacca pe' bellezza e 'a bufala pe' ricchezza*).

L'evoluzione storica dell'attività economica che ruotava attorno al settore bufalino è andata avanti anche nel 1300, con la commercializzazione dei derivati del suo latte (latticini) e di carni destinate solitamente al mercato di Napoli e Salerno; e nel 1400, anno in cui incominciò ad attirare l'attenzione degli imprenditori, che trasformarono l'allevamento da libero a semilibero, e in alcuni casi a stallino. Ciò dimostra che il crescente interesse per questa specie e per i suoi prodotti aveva fatto incrementare il patrimonio in meno di 20 anni. Senza contare che la presenza del bufalo in alcune zone dell'Italia meridionale era legata alle caratteristiche orografiche del terreno e alla sua particolare adattabilità a condizioni climatiche avverse, come il clima caldo-umido delle aree palustri.

Nel nostro Paese il suo incremento numerico, inoltre, è stato incoraggiato non solo dalle favorevoli condizioni di mercato, ma anche dalla maggiore attenzione alla rimonta, che negli anni passati, a causa della scarsa cura prestata alle bufale durante la gestazione avanzata e al vitello nei primi giorni di vita, è stata falciata dalle malattie neonatali, dal barbone e dalle verminosi.

Ora ben si comprende come il patrimonio bufalino italiano sia andato incontro ad una continua espansione passando da una consistenza pari a 12.000 capi del primo dopoguerra (1947) a circa 388.000 stimati nel dicembre 2016 [dati Banca Dati Nazionale, BDN]; questi sono dati registrati in uno spaccato di storia zootecnica contraddistinto frequentemente da periodi di crisi, in cui ci sono stati imprenditori, che remando controcorrente, hanno creduto in una specie simbolo di arretratezza e di latifondo.

Oggi, in Italia, sono due le regioni che detengono ben il 92% della popolazione di *Bubalus bubalis* (bufalo domestico), ovvero Campania (74,22%) e Lazio (17,62%).

In particolare, in Campania (dove si contano 287.763 capi nel 2016) il numero maggiore di animali si localizza in provincia di Caserta (Tab.1).

I fattori che hanno contribuito sicuramente alla crescita delle aziende bufaline nel nostro Paese (dal 1947 al 2016) sono stati principalmente due. Il primo è l'aumento del consumo della *Mozzarella di Bufala Campana* (noto formaggio a "pasta filata fresca", e riconosciuta a marchio D.O.C. nel 1993 e D.O.P. nel 1996), della ricotta e del formaggio; il secondo è che il latte di bufala non è soggetto a limitazioni previste invece dalla Comunità Europea (CE) nel 1984 per il latte bovino/vaccino [Proto, 1993; Zicarelli, 1990].

Ai fini zootecnici la specie bufalina viene oggi (2017) considerata a duplice attitudine, sebbene la produzione del latte rappresenti il carattere sicuramente prevalente, della produzione lorda vendibile (PLV) nazionale, rispetto a quella della carne.

province Campania		N°capi Bufalini
Avellino	AV	556
Benevento	BN	1.464
Napoli	NA	3.255
Salerno	SA	89.386
Caserta	CE	193.120

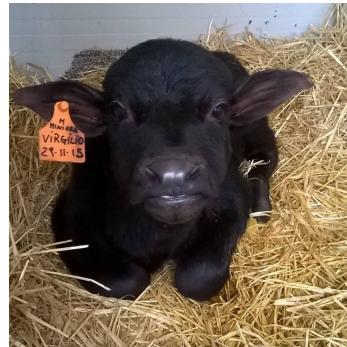
Tab.1 Distribuzione della popolazione bufalina in Campania all'01/12/2016 [dati BDN].



Toro bufalino (riproduttore casertano al centro genetico Chiacchierini-2016)



Bufala pluripara



Bufalotti

Fig.1 *Bubalus bubalis*. Dal passato (foto in bianco e nero) ai giorni nostri (foto a colori).

HERPESVIRUS

Generalità.

Gli Herpesvirus (HV) sono virus a DNA duplex con simmetria icosaedrica che appartengono alla Famiglia *Herpesviridae*, la quale è suddivisa in più Sottofamiglie:

Alphaherpesvirinae, contraddistinta dalle seguenti caratteristiche:

- 1) spettro d'ospite ampio;
- 2) ciclo replicativo rapido;
- 3) propagazione attiva in colture cellulari;
- 4) distruzione delle cellule ospiti, comparsa di un effetto citopatico (ECP) in 12-24 ore, e formazione di corpi inclusi, ovvero inclusi intranucleari di tipo A di Cowdry;
- 5) sede di latenza (*infezione silente*): i gangli nervosi sensoriali (*craniali*, come i trigeminali e glossofaringei; e *sacrali*);
- 6) comprendono: *Herpes Simplex*, *BHV-1*, *virus Malattia di Aujeszky*, *virus Varicella-Zoster*; *virus Esantema coitale*, *Herpesvirus canino (CHV)*, *virus Rinotracheite virale infettiva felina*, etc.

Betaherpesvirinae, comprende le seguenti caratteristiche:

- 1) spettro d'ospite medio;
- 2) ciclo replicativo lento;
- 3) selettività cellulare: fibroblasti;
- 4) sedi di latenza: cellule linforeticolari, endotelio ed epitelio di ghiandole a secrezione esterna (gh. salivari) e tubuli renali;
- 5) comprendono: *Cytomegalovirus del bovino e del cavallo*, *virus Rinite a corpi inclusi del suino*, *Muromegalovirus*, *Roseolovirus*, *Herpesvirus umano 6 e 7*, etc.

Gammaherpesvirinae, caratterizzata da:

- 1) spettro d'ospite medio/basso;
- 2) ciclo replicativo lento;
- 3) selettività cellulare: linfoidi;
- 4) sedi di latenza: cellule linfoidi;
- 5) comprendono: *virus Epstein-Barr*, *Herpesvirus umano 8 (HHV-8)*, etc.

In particolare BoHV-1 e BuHV-1 sono Alphaherpesvirus appartenenti al genere *Varicellovirus*.

Proprietà chimico-fisiche.

Gli HV sono resistenti in natura. L'inattivazione delle particelle virali dipende dalle condizioni ambientali, quali luce, umidità, pH e sostanza che contiene il virus.

A 4°C, sono stabili per 1 mese, mentre sono inattivati a 56°C per 21 minuti.

Diversamente a 37°C e a 22°C resistono rispettivamente per 10 e 50 giorni.

Sono sensibili a solventi organici, come cloroformio, etere, acetone, alcool, e a specifici disinfettanti.

Sono relativamente stabili a pH 7.0 [Griffin *et al.*, 1958], specialmente se sono mantenuti a temperatura di refrigerazione.

Gli HV sono inattivati con: 0,5% di NaOH; 0,01% di HgCl₂; 1% di clorurato di calce; 1% derivati fenolici; 1% di sali quaternari di ammonio; 10% reattivo di Lugol. La formalina al 5% inattiva i virus in 1 minuto.

Coltivazione dei virus.

Analogamente a quanto si verifica "*in vivo*", anche "*in vitro*" questi patogeni possono replicare sia su un'ampia gamma di colture tissutali di origine bovina (cute embrionale, rene, surrene, timo, tiroide, pancreas, testicolo, polmone e linfonodi) che su quelle di agnello, capra, cavallo, suino e coniglio. La replicazione è associata all'effetto citopatico (ECP) (Fig.2). I virus producono placche e sono responsabili della formazione di inclusi intranucleari di tipo A di Cowdry (Fig.3).

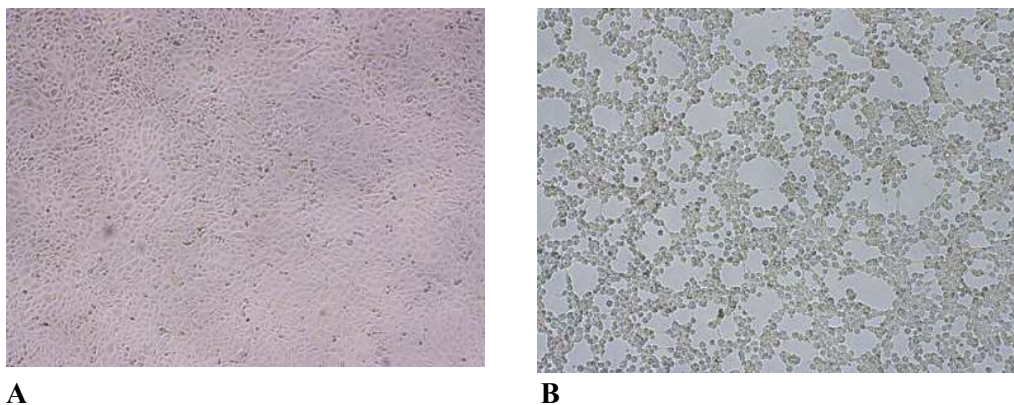


Fig.2 Effetto citopatico (ECP) a 24 ore post-semina (immagine B; microscopio ottico; Foto IZSUM).
Controllo Negativo colture cellulari (immagine A; mcroscopio ottico; Foto IZSUM)

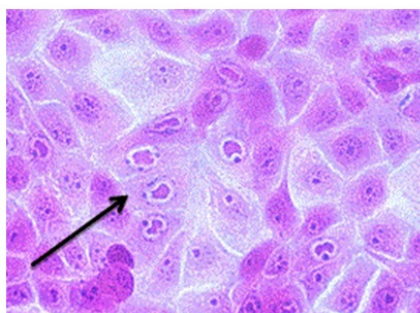


Fig.3 Inclusioni intranucleari di tipo A di Cowdry (microscopio ottico; Foto IZSUM).

Virione.

Il virione maturo ha dimensioni di 120-300 nm di diametro, presenta una struttura interna caratterizzata da un *core* contenente il genoma virale, e codifica per 70 proteine (di cui 33 strutturali e più di 15 non strutturali); è protetto da un *nucleocapside* a simmetria icosaedrica di 100-110 nm di diametro, composto da 150 esameri e 12 pentameri. Questa struttura è circondata a sua volta da uno strato proteico *tegumentario* e da un doppio strato lipidico che costituisce l'*envelope*, dal quale si stagliano un gran numero di *glicoproteine virali* di superficie, tra cui gB, gE, gD, che danno origine a proiezioni denominate "spikes", le quali presentano un importante ruolo nella patogenesi e nell'immunità (Fig.4,5,6,7) [Thiry *et al.*, 2006].

Negli HV la trascrizione dell'acido desossiribonucleico in RNAm, l'espressione dei geni virali e l'assemblaggio avvengono nel nucleo.

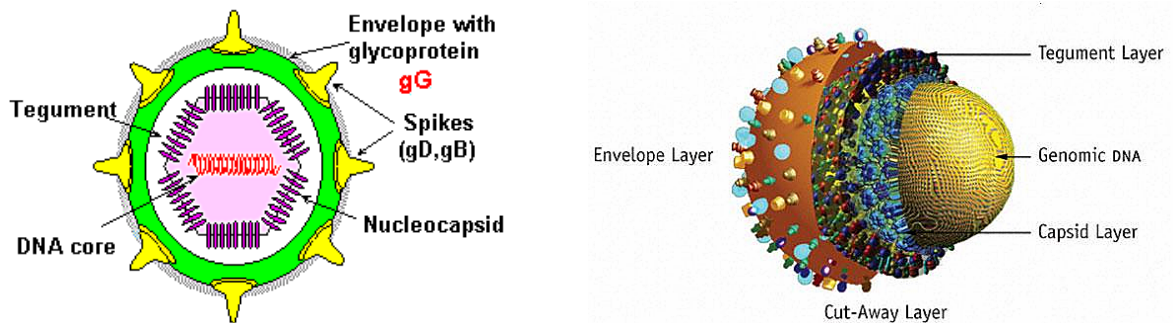


Fig.4 Rappresentazione schematica (a sx) e tridimensionale (a dx) di un Herpesvirus.

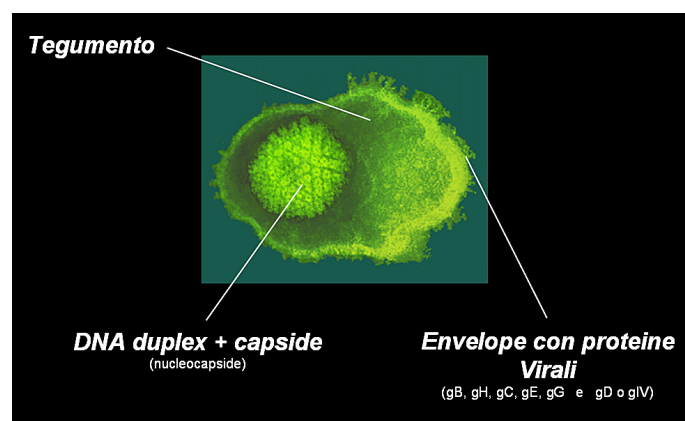


Fig.5 BHV-1 al microscopio elettronico a trasmissione.

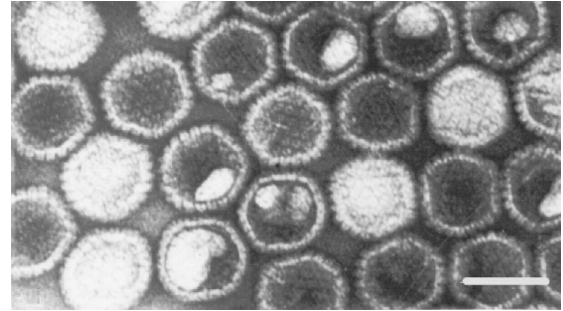
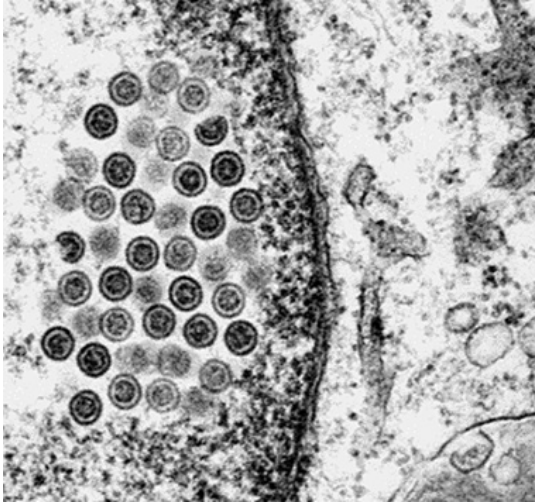


Fig.6 HV assemblati nel nucleo (immagine a sinistra). Si apprezza l'acquisizione dell'envelope da parte del virione, che avviene a spese della lamina interna della membrana nucleare.

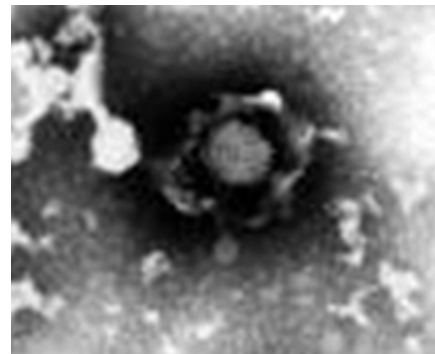
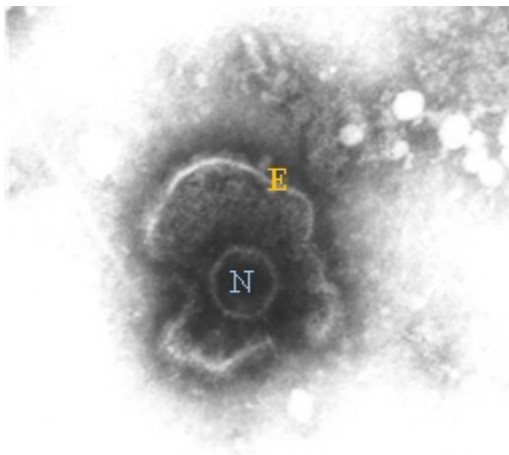


Fig.7 Particella virale del virus erpetico del bovino tipo 1 (BoHV-1; immagine a sinistra) e virus erpetico del bufalo tipo 1 (BuHV-1; immagine a destra) al microscopio elettronico. **E**, envelope; **N**, nucleocapside (core; Foto IZSUM).

Genoma e Replicazione.

Il genoma virale consiste in un doppio filamento di DNA lineare (approssimativamente di 140 kb), organizzato in un'Unità Lunga (UL) e un'Unità Corta (US), legate da due sequenze invertite ripetute chiamate *Internal Repeat* (IR) e *Terminal Repeat* (TR).

Il genoma include 10 geni che codificano per altrettante glicoproteine (Fig.8).

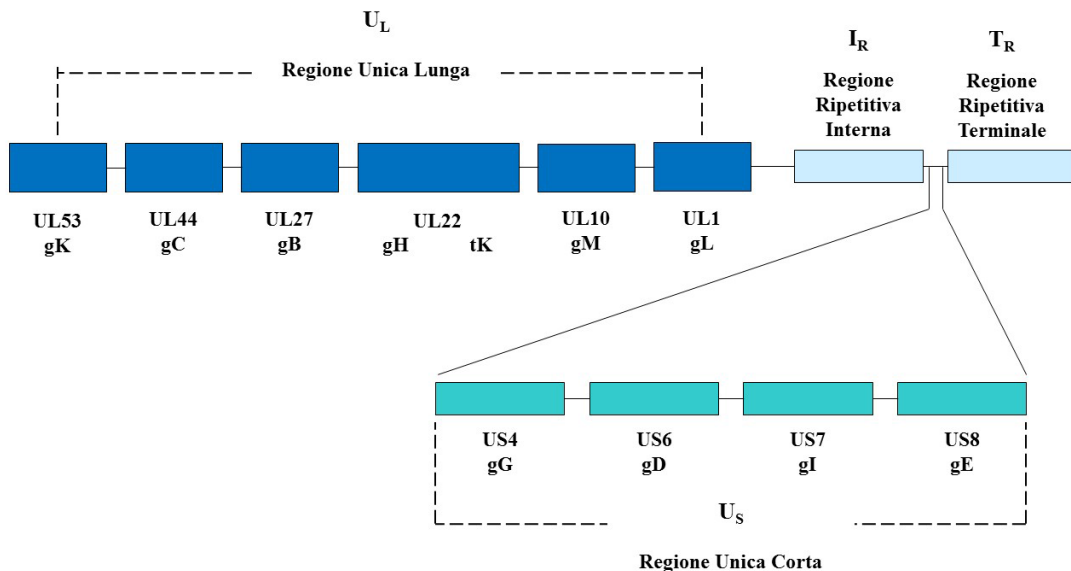


Fig.8 Rappresentazione schematica della struttura del genoma di un AlphaHerpesvirus. Sono raffigurate le regioni codificanti per le glicoproteine gK, gC, gB, gH, gM, gL, gG, gD, gI, gE.

Il meccanismo di internalizzazione (Fig.9) nella cellula ospite inizia con il legame tra il proteoglicano eparansolfato della superficie cellulare e la gC o gB virale. Fa seguito una specifica interazione con uno dei recettori cellulari chiamati “HVEM” (*Herpes Virus Entry Mediators*), collegati al fattore di crescita dei nervi e al tumor necrosis factor. Questo legame coinvolge la gD e dà inizio alla fusione delle due membrane attraverso l'interazione di altri componenti cellulari e virali.

L'ingresso si completa quando avviene la fusione dell'envelope virale con la membrana cellulare attraverso l'interazione delle glicoproteine gD, gB e l'eterodimero formato da gH e gL. Una volta penetrate nel citosol della cellula ospite, le particelle virali migrano attraverso i pori nucleari utilizzando i meccanismi di trasporto della cellula ospite, probabilmente mediati da proteine del tegumento virale o componenti superficiali del capsido stesso. Solo il DNA virale con qualche proteina del tegumento, come alfa-TIF, entra nel nucleo, mentre le proteine tegumentarie vengono disperse nel citosol delle cellule infette, dove possono avere ruoli importanti nelle prime fasi dell'infezione, essendo le prime ad interagire con l'ambiente intracellulare (Fig.10).

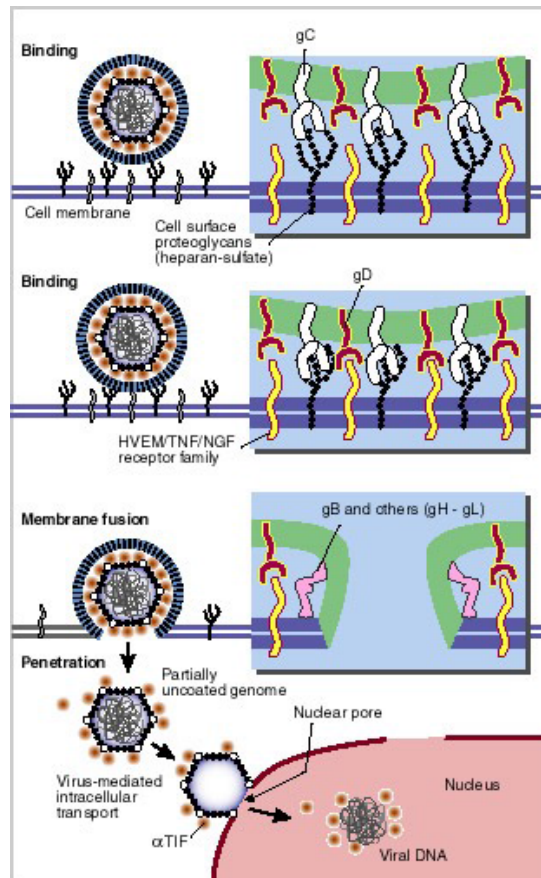


Fig.9 Rappresentazione grafica del meccanismo di internalizzazione nella cellula ospite (foto tratta dal sito: <http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv4f.html>).

La proteina tegumentaria VP8 è la più abbondante e si localizza nel nucleo subito dopo l'infezione grazie ad un segnale di localizzazione nucleare. La proteina tegumentaria VHS (*Virion Host Shut-off*), codificata dall'UL41, determina una rapida interruzione della sintesi di proteine cellulari nelle cellule infette. Un'altra importante proteina è la VP16 (*Virion Protein 16*), conosciuta come α -TIF (*Transinducing factor of alpha genes* – Fattore di transinduzione di geni alpha), responsabile dell'inizio dell'espressione genetica del virus, tramite la transattivazione dei geni IE (Immediate Early) o geni alpha. E' possibile infatti distinguere l'espressione genetica virale in più fasi temporali: IE, i cui geni α sono essenziali per avviare la trascrizione virale; Early (E) o geni β , per la replicazione virale; Late (L) o fase $\beta\gamma/\gamma$, per l'espressione di una grande quantità di proteine strutturali, essenziali per la sintesi di una nuova progenie virale. L'assemblaggio dei virioni è un processo complicato che prevede un iniziale assemblaggio delle proteine dello scheletro del capsido a formare un'impalcatura per la costituzione di una prima particella virale all'interno del nucleo. Durante la maturazione, l'impalcatura proteica più profonda viene sostituita dall'interno del capsido, mentre il DNA viene impacchettato [Muylkens *et al.*, 2007]. Il capsido maturo attraversa la membrana nucleare tramite un doppio invaginamento della stessa, nel quale lega temporaneamente le glicoproteine. Il capsido all'interno del nucleo è circondato da un primario tegumento proteico, che viene perso attraversando la membrana nucleare.

Il capsidone citoplasmatico è associato a numerose proteine del tegumento, come alfa-TIF e VHS, fondamentali per la costituzione dell'envelope. Esso si forma dalla membrana della vescicola di esocitosi, che contiene tutte le glicoproteine ad esso associate.

Dopo aver infettato la cellula, il virus può procedere con un'infezione produttiva o instaurare un'infezione latente, raggiungendo i neuroni dei gangli regionali per via assonale o tramite viremia. Il DNA virale, che entra attraverso i pori nucleari, si "circolarizza" (*forma episomiale*) sul DNA cellulare dell'ospite (senza integrarsi col genoma cellula-ospite) grazie a enzimi "*cellular DNA repair*" che agiscono su sequenze "a", oppure rimane lineare grazie all'azione di un IE della proteina ICP0 (*Infected Cell Polypeptide*), che inibisce "*cellular DNA repair*". Durante la latenza (*infezione "silente"*) gli antigeni virali non vengono espressi, il virus non può essere isolato, ma il genoma resta vitale all'interno dei nuclei delle cellule ospiti (per cui evidenziabile tramite la PCR). Le cellule con infezione latente non vengono distrutte, il patogeno non si replica e non trascrive proteine, ad eccezione delle proteine-LAT (*trascrizione associata alla latenza*). L'induzione dell'espressione di ICP0 determina poi la riattivazione dell'HV. In ogni caso la latenza si instaura al termine della replicazione riproduttiva.

La virulenza di un ceppo è strettamente associata alle glicoproteine dell'envelope:

- mutanti deficitarie in gC presentano infettività sensibilmente ridotta, anche se la funzione viene in parte recuperata da gB;
- in assenza di gE l'infezione dei tessuti ha una durata inferiore, in quanto gE è coinvolta nel meccanismo di espulsione dei virioni dalla cellula ospite [Patel and Didlick, 2008].

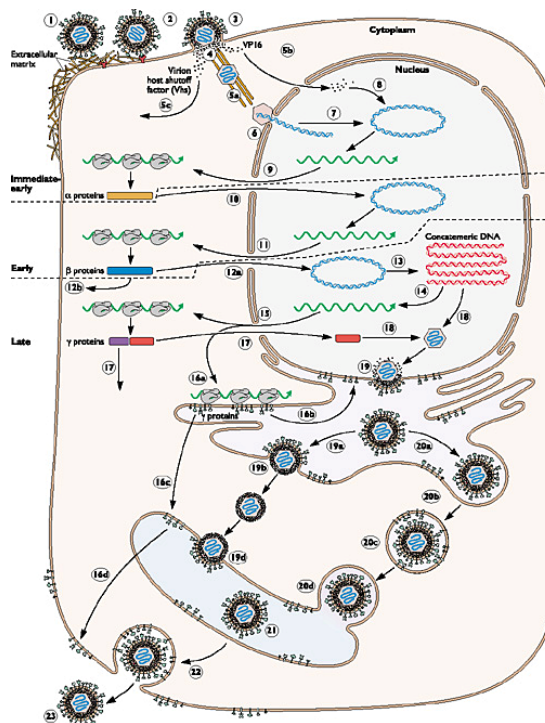


Fig.10 Schema del ciclo di replicazione di un virus erpetico in una cellula-ospite

BoHV-1 **(*Bovine Herpesvirus type 1; detto virus IBR/IPV*)**

Storia. Il primo riscontro del virus può essere ricondotto al XIX secolo nella forma dell'Esantema Vescicolare Coitale. L'eziologia virale è stata dimostrata nel 1928 da Reisinger e Reimann. Fino agli anni '50 le manifestazioni della patologia erano confinate agli organi genitali, come la Vulvovaginite Pustolosa Infettiva (IPV) nelle femmine e la Balanopostite Pustolosa Infettiva (IPB) nei maschi. Agli inizi del 1970 si sono riscontrate le prime forme respiratorie in allevamenti del Nord America, ciò si spiega ammettendo che la *plasticità biologica* del virus, primariamente patogeno per l'apparato genitale, sia riuscito in un secondo momento ad adattarsi anche all'apparato respiratorio, così da indurre delle forme cliniche miste.

Nell'infezione naturale, i siti di penetrazione del BoHV-1 sono la mucosa respiratoria e genitale, ove il virus si moltiplica inducendo necrosi cellulare. Questa forma più grave di infezione, la Rinotracheite Infettiva del Bovino (IBR), si è diffusa rapidamente anche in Europa a causa dell'importazione di capi contagiati, con lo sviluppo dell'allevamento intensivo sia da latte che da carne [Muylkens *et al.*, 2007]. Ai giorni nostri questo virus ha una distribuzione mondiale. È responsabile, soprattutto grazie all'IBR, di una considerevole perdita economica dovuta ad una riduzione nella produzione di latte, perdita di peso e aborto. Il largo spettro di sintomi clinici include scolo nasale e vaginale muco purulento, febbre, inappetenza, malessere generale, congiuntivite, enterite, encefalite, etc. [Muylkens *et al.*, 2007]. Il virus è sensibile a molti disinfettanti, sopravvive nell'ambiente esterno per 30 giorni in inverno e per 5-9 giorni in estate; nei mangimi può resistere per tempi molto lunghi; è stabile a temperature inferiori ai -65°C, dopo 1 anno a -20°C la sua stabilità diminuisce; può sopravvivere nei contenitori di stoccaggio del seme. A +4°C viene lentamente inattivato e completamente inattivato in 30 minuti a +65°C. Il patogeno è stabile ad un pH tra 6 e 9 (stesso pH dell'apparato respiratorio e del tratto genitale).

Ad oggi si conosce un solo tipo antigenico di BoHV-1, tuttavia sono stati caratterizzati i seguenti **sottotipi**:

1. **BoHV-1.1** (responsabile di forme respiratorie)
2. **BoHV-1.2:** (responsabile di forme genitali nelle femmine e nei maschi)
 - **BoHV-1.2a** (responsabile di Rinotracheite, Aborto)
 - **BoHV-1.2b** (responsabile di Infezione genitale)
3. **BoHV-1.3.** (Agente Neuropatogeno nei vitelli; responsabile di Encefaliti, e attualmente classificato come BHV-5).

Il BoHV-1.1 e il BoHV-1.2a sono responsabili principalmente di forme respiratorie e causano IBR, associata a febbre, riduzione della produzione di latte e aborti. Le infezioni con questi sottotipi hanno un esito lieve.

Gli isolati BoHV-1.2a, inoltre, causano aborto, a differenza degli stipiti BoHV-1.2b.

Gli stipiti BoHV-1.1 sono molto più virulenti rispetto ai sottotipi BoHV-1.2b.

BoHV-1.3 sono stati isolati da vitelli venuti a morte in corso di encefaliti e da feti abortiti [fonti IZSUM].

Nonostante le diverse forme patologiche associate all'infezione da BoHV-1, dal punto di vista antigenico i vari sottotipi di virus sono molto simili; questa varietà di forme rende problematica la distinzione dei diversi ceppi. Un aiuto significativo è fornito dal DNA fingerprinting (detto anche *impronta del DNA*; si tratta di una metodica che permette di identificare i DNA provenienti da individui diversi), e dalla digestione mediante endonucleasi di restrizione [Engels *et al.*, 1981; Metzler *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1991]. Il DNA dei ceppi di tipo BoHV-1 possiede un profilo elettroforetico simile al ceppo virale di referenza *Cooper*.

In letteratura è noto che i vitelli infettati sperimentalmente per via nasale con BoHV-1.2 hanno mostrato segni clinici respiratori [Edwards *et al.*, 1991; Spilki *et al.*, 2004] e sono stati in grado di trasmettere l'infezione del tratto aereo in vitelli di controllo [Smith *et al.*, 1980; Edwards *et al.*, 1991]. Al contrario, lesioni del tratto riproduttivo in manze sono state osservate dopo l'inoculazione intrauterina con BoHV-1.1 [Miller *et al.*, 1984]. Sottotipi 1.1 e 1.2a sono stati associati a malattie gravi tra cui infezioni fetali e aborto [Miller *et al.*, 1991]. Il sottotipo 1.2b non è stato associato con interruzione della gravidanza [Edwards *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1995; Whetstone *et al.*, 1989].

La **trasmissione** di questo patogeno si verifica per contatto diretto attraverso la via aerogena (*contatto naso a naso, aerosolizzazione di goccioline emesse con tosse e starnuti, secreti mucosi nasali ed oculari*) o venerea (monta: *secreti mucosi vaginali, sperma infetto; placente* [notevole diffusione del virus tramite i cotiledoni placentari], *feti abortiti*), per contatto con abiti, stivali, guanti, strumenti di allevamento contaminati da secrezioni infette.; o ancora per contatto indiretto attraverso la via diaplacentare (*al momento del parto, attraverso l'assunzione di colostro e per emotrasfusione*), tramite embryo-transfer, attraverso materiale seminale (in quanto il virus è in grado di passare nel seme e permanervi per lungo termine in seguito ad infezione balano-prepuziale e testicolare oppure durante la fase di viremia; inoltre il virus resiste molto bene al congelamento del seme e l'escrezione virale può essere intermittente, per l'alternanza di fasi di latenza e di riattivazione).

La principale fonte di contagio è costituita dagli animali infetti sintomatici, dove l'escrezione virale nei soggetti affetti da rinotracheite e da vulvovaginite pustolosa perdura per 1-2 settimane, mentre nel caso di balanopostite pustolosa l'escrezione si protrae per 2-3 settimane.

La disseminazione avviene però anche a causa di animali malati a-sintomatici (detti *portatori latenti* o *serbatoi*), mediante infezione con stipiti a bassa virulenza, infezione a basse cariche virali, re-infezioni in seguito ad un calo dell'immunità, riattivazione dallo stato di latenza.

Infezione. Al momento dell'infezione naturale, la disseminazione del patogeno nell'organismo-ospite segue tre differenti vie: il sangue, il sistema nervoso e la trasmissione *da cellula a cellula* (Fig.11) [Pastoret *et al.*, 1986]. Il virus si moltiplica intensamente a livello delle cellule epiteliali della mucosa respiratoria (tratto anteriore) o della mucosa genitale. Segue poi una fase di viremia, con distribuzione a utero, placenta, feto, ovaie e testicoli, che porta ad aborto e infezione neonatale sistemica; intestino, dove determina enteriti letali nei vitelli; SNC, con l'insorgenza di meningoencefaliti nei vitelli. Successivamente, il virus si distribuisce alle congiuntive e raggiunge il ganglio trigemino e/o glossofaringeo tramite trasporto neuronale assonale retrogrado, dove può determinare latenza [Garanzini, 1999]. Si trasmette anche da una cellula all'altra per contiguità, senza fase extracellulare, rimanendo così al riparo dall'attacco degli anticorpi; questa evenienza pare si verifichi quando si ha riattivazione in animali portatori di virus latente, ma in possesso di solida immunità specifica. Caratteristica fondamentale degli Herpes, come anche di BoHV-1, è la loro "plasticità biologica", avendo localizzazioni molto varie e inducendo differenti sindromi. Spesso una stessa infezione ha comportamento diverso in base al momento produttivo del soggetto o al tipo di allevamento cui è sottoposto.

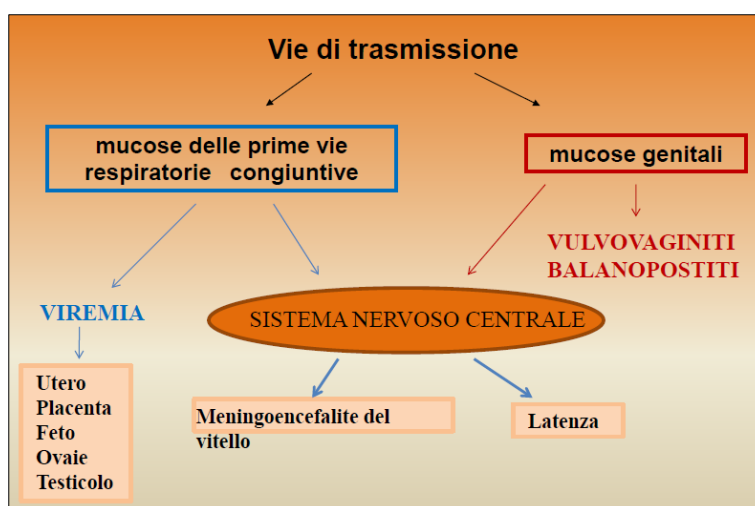


Fig.11 Patogenesi BoHV-1.

Latenza e riattivazione virale. Gli Herpes, e in particolare i membri della Sottofamiglia α -Herpesvirinae come BoHV-1, sono capaci di provocare infezioni che, dopo l'esaurimento della fase clinica, perdurano nell'organismo-ospite per moltissimi anni o anche per tutta la vita.

La chiave di lettura dell'epidemiologia delle infezioni da BoHV-1 è data dallo stato latente dei virus [Pastoret *et al.*, 1986; Thiry *et al.*, 1985] che, come ben si è compreso in letteratura, rappresenta il più importante meccanismo di resistenza e di conservazione in natura di questi patogeni.

La latenza è definita come un'infezione virale persistente nell'organismo, caratterizzata dalla presenza del genoma virale in assenza del virus infettante; quindi,

il virus blocca la sua replicazione, non forma nuovi virioni, nè dà lesioni cellulari o stimolazione immunitaria, e i livelli di trascrizione e traduzione sono ridotti. Durante infezione latente il DNA virale “circola rizza” e rimane nel nucleo sotto forma *episomiale*, non integrato con il genoma cellulare dell'animale-ospite; benché sia stato ipotizzato che possa essere presente anche sotto forma di plasmidi extra-cromosomici. Questa fase di ‘dormienza’ virale, qual è la latenza per il BHV-1, si instaura a seguito della regressione sintomatologia del soggetto, quando una quota di virus, presente nel sito di infezione, sfugge al sistema difensivo dell'ospite (che in genere determina l'*apparente* guarigione clinica) e, attraverso gli assoni dei neuroni sensitivi raggiunge i cosiddetti “siti di latenza”, rappresentati dai gangli regionali, cranici o spinali, dove rimane in forma “inerte”.

Durante la latenza, l'herpesvirus bovino è rilevabile nei gangli nervosi sensoriali trigeminali o sacrali, se l'infezione è rispettivamente di origine respiratoria o genitale.

Bisogna considerare però che, in una popolazione con forte prevalenza di infezione da BoHV-1, alcuni animali portatori latenti non presentano un titolo anticorpale rilevabile; infatti, sono dei ‘falsi negativi’ che non possono essere individuati, e che costituiscono un serio e subdolo rischio per gli animali vicini.

Da qui l'equazione: “animale sieronegativo = animale indenne”, anche se non è scontata in tutti i casi. La presenza di animali ‘serbatoi’ latenti è l'elemento essenziale per la persistenza del virus in seno ad una popolazione. Questi individui potranno infettare i soggetti sani dell'allevamento nel caso di una riattivazione accompagnata da una riescrezione.

Il significato epidemiologico della latenza è, dunque, quello di permettere il mantenimento dell'infezione in un gruppo di animali, senza l'apporto esogeno del virus.

Lo stato latente può essere interrotto e il virus, prima in stato di quiescenza, riprende a moltiplicarsi nell'organismo; tale fenomeno è definito *riattivazione virale* [Sheffy and Davies, 1972; Davies and Carmichael, 1973].

Quest'ultima è causata da condizioni di stress endogeni od esogeni (parto, assunzione di colostro da parte del vitello, allevamenti super affollati, trasporto dell'animale in altri allevamenti o al macello, vaccinazioni, super infezione da parte di altri virus, parassitosi, trattamenti con glicocorticoidi come desametasone, forti emozioni, e così via) (da Fig.1A a Fig.12A).

La riattivazione virale conduce generalmente ad una nuova disseminazione del patogeno con pochi o, addirittura, nessun segno clinico della malattia. Una sua conseguenza diretta (e talvolta la sola rilevabile) consiste in una stimolazione dell'attività specifica, che provoca un aumento del titolo anticorpale ed un'eliminazione intermittente di virus nell'ambiente esterno, o ancora, in regioni di latenza, può ricondursi ad un aumento dei glicocorticoidi endogeni, che inducono nell'organismo fenomeni immunodepressivi e sono in grado di agire direttamente a livello di cellule infette. E' bene chiarire che la riattivazione non è necessariamente accompagnata da una diffusione del virus infettante, ma anche da particelle non infettanti, che comunque innescano un *effetto booster*, una reazione a livello di immunità umorale o cellulo-mediata. Il tasso di riescrezione del patogeno è influenzato in maniera determinante dall'immunità specifica dell'animale che esercita un controllo sui livelli di disseminazione.

Diversi glicocorticoidi (prednisolone, desametasone, flumetazone) possono indurre una riattivazione accompagnata da una riescrezione del virus; a titolo di esempio, in bufali portatori latenti l'iniezione di desametasone, alla dose di 0,1 mg/kg/di per 3-5 giorni si è rivelata una tecnica frequentemente usata [Pinto O. *et al.*, 2000; Pinto C. *et al.*, 2000].

Si comprende inoltre che al fenomeno del ripristino del patogeno infettante è legato il rischio di epidemia, che può perpetuarsi all'interno dell'allevamento, però le conseguenze di una riemersione di BoHV-1 sono meno gravi se paragonate a quelle indotte dall'infezione primaria.

Percorso realistico dell'instaurazione di infezione latente

da parte di BoHV-1 e riattivazione del patogeno con conseguente riescrezione virale nell'ambiente esterno.

La modalità di infezione è la medesima sia per il bovino che per il bufalo.

[Immagini *Copywrite Marullo A.- 2009*].

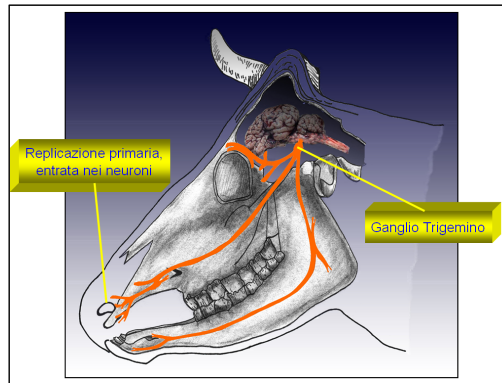


Fig.1A Riassumendo:

Dopo replicazione primaria (INFEZIONE RESPIRATORIA) a livello delle mucose nasali, il BoHV-1 contamina i nervi periferici che risale per via retrograda.

Giunge al nervo trigemino per installarsi nel ganglio omonimo. In questa sede realizza la LATENZA.

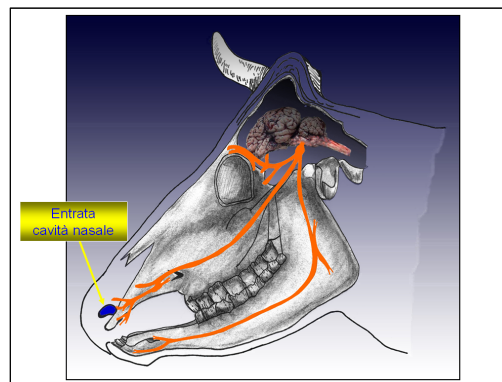


Fig.2A Dopo contagio respiratorio (per es., "naso a naso") il virus (parte blu) penetra a livello delle mucose nasali e qui si moltiplica.

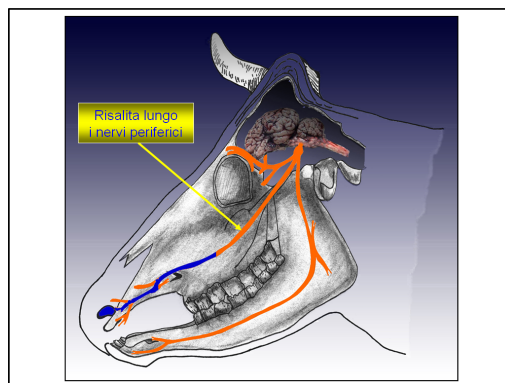


Fig.3A L'agente infettivo contamina i nervi periferici e comincia la risalita di questi ultimi.

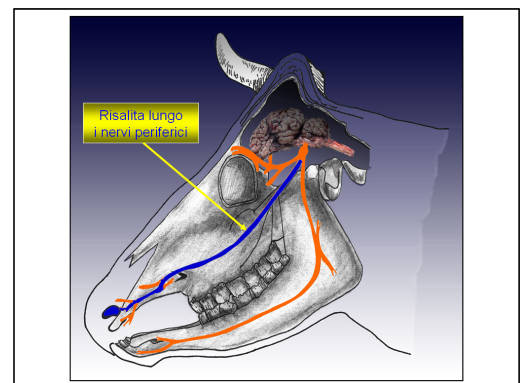


Fig.4A Fino ad approssimarsi al ganglio trigemino (TG – Trigeminal Ganglia).

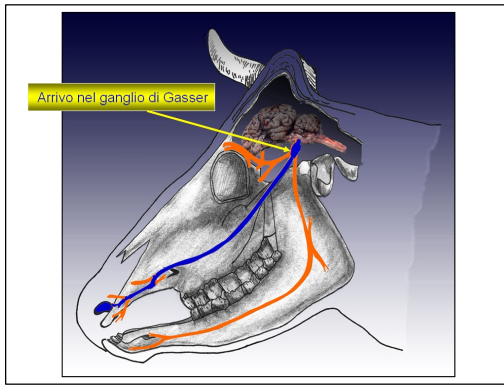


Fig.5A Il patogeno contamina nervo e TG.

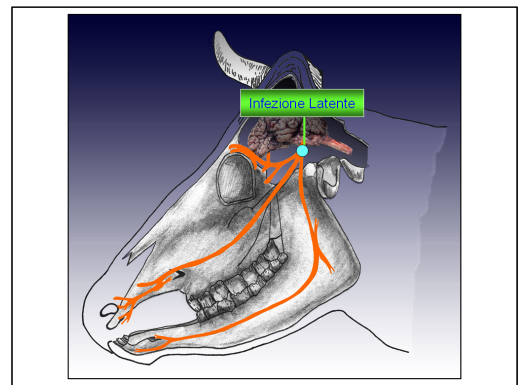


Fig.6A Nel TG instaura la LATENZA (sfera celeste).

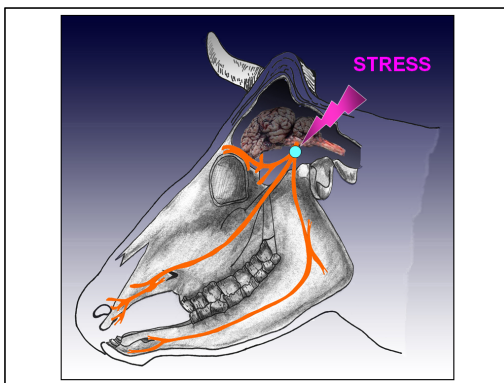


Fig.7A Durante la fase di infezione latente si possono verificare delle condizioni di stress o traumi.

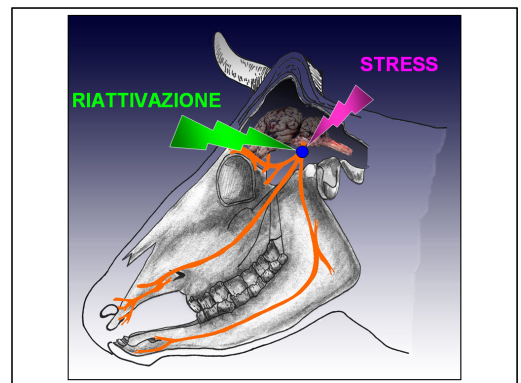


Fig.8A Tali fattori possono indurre una riattivazione virale (sfera blu).

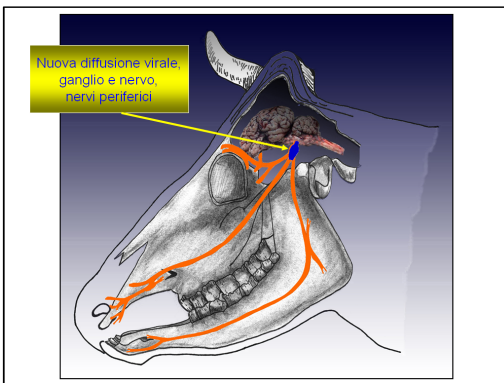


Fig.9A BoHV-1 riprende a diffondersi.

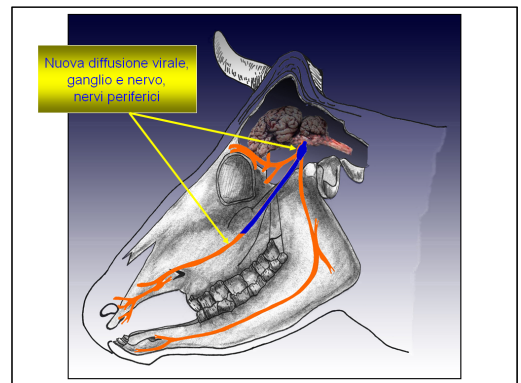


Fig.10A Il virus si diffonde nuovamente nel nervo e TG, poi ridiscende i nervi periferici.

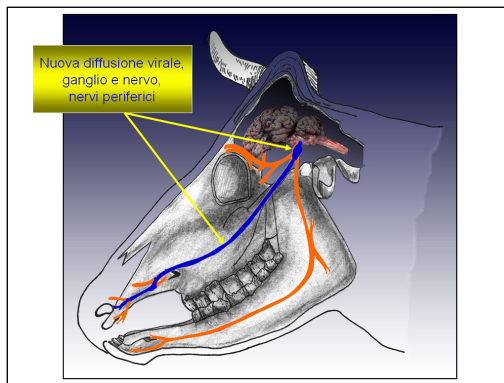


Fig.11A Fino a tornare nelle mucose nasali.

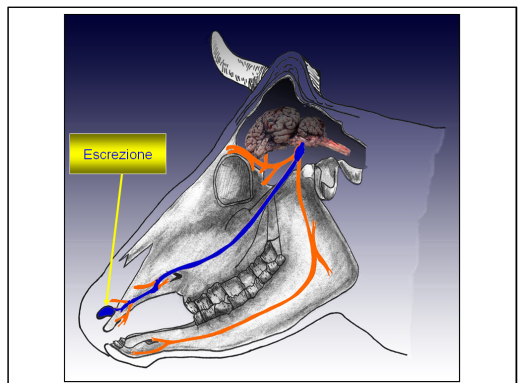


Fig.12A Qui il virus replica. Nuova ESCREZIONE.

Ganglio Trigemiale (Trigeminal Ganglion, TG). Nell'infezione respiratoria, avvenuta per contatto diretto con le secrezioni nasali dell'animale infetto, l'herpes penetra nell'organismo ospite sano attraverso le vie aerogene, per esempio le cavità nasali, e qui nelle cellule epiteliali della mucosa respiratoria si moltiplica (replicazione primaria). Successivamente contamina i nervi periferici che risale per via retrograda, fino a giunge nel ganglio del trigemino (TG) ove entra in uno stato latente (Fig.12,13).

Come è noto in letteratura, il sistema nervoso periferico (SNP) è costituito dai nervi periferici (cranici e spinali), associati ai gangli *sensitivi* (afferenti) e *motori* (efferenti), che connettono le strutture centrali ai recettori sensoriali e agli effettori.

Dall'encefalo originano 12 paia di *nervi cranici*, e la maggior parte di questi si staccano dal tronco encefalico, più precisamente dalla sua superficie lateroventrale. Tali nervi lasciano la scatola cranica per raggiungere la loro destinazione utilizzando speciali fori o discontinuità della base ossea. Dal romboencefalo si stacca il quinto paio di nervi cranici (V), *trigemino*; nervo "misto" con contingenti di fibre sia somatiche che viscerali di natura effetrice e sensitiva.

Il nervo trigemino ha un notevole calibro e si trova tra il ponte e le piramidi; da esso si diparte il ganglio omonimo, detto *ganglio del trigemino* o *semilunare* o *di Gasser*, disposto nella parte rostrale del foro lacero (Fig.14).

Il TG è un organo relativamente voluminoso con diametro maggiore di 2,5 cm orientato in senso rostroaborale. Dal margine rostrale originano i tronchi destinati alla periferia: oftalmico, mascellare e mandibolare.

I 3 nervi (oftalmico, mascellare e mandibolare), derivati dalle fibre sensitive del ganglio, decorrono per un breve tratto affiancati, quindi, si separano (da qui il nome "trigemino") e vanno a distribuirsi alla cute della faccia, all'occhio, alle cavità nasale ed orale, invece le fibre motorie provvedono all'innervazione di alcuni dei muscoli della porzione viscerale della testa, i masticatori (Fig.15) [Pelagalli and Botte, 1989; Bortolami and Callegari; 2000].

La localizzazione del trigemino è la stessa sia nel bovino che nel bufalo.

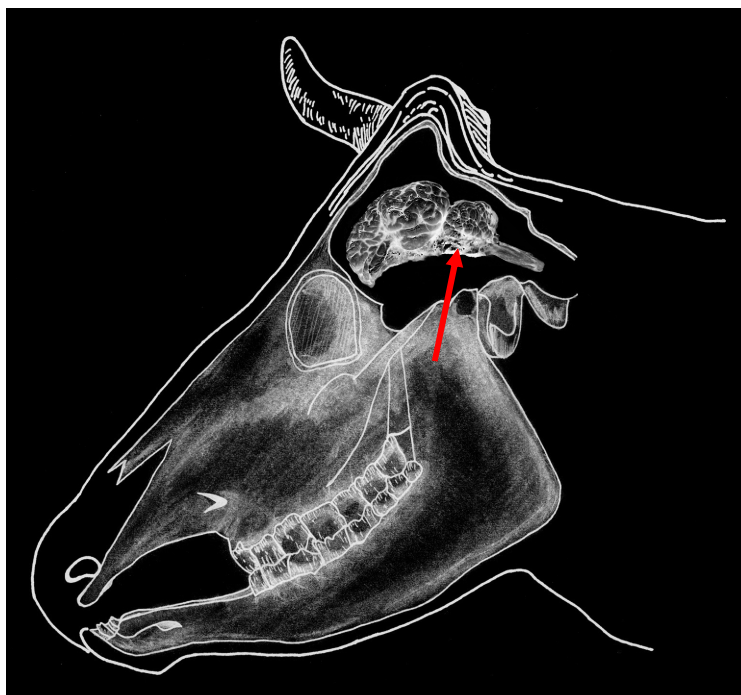


Fig.12 Immagine in negativo della testa di bovino.
La freccia rossa indica la posizione del ganglio trigemino.

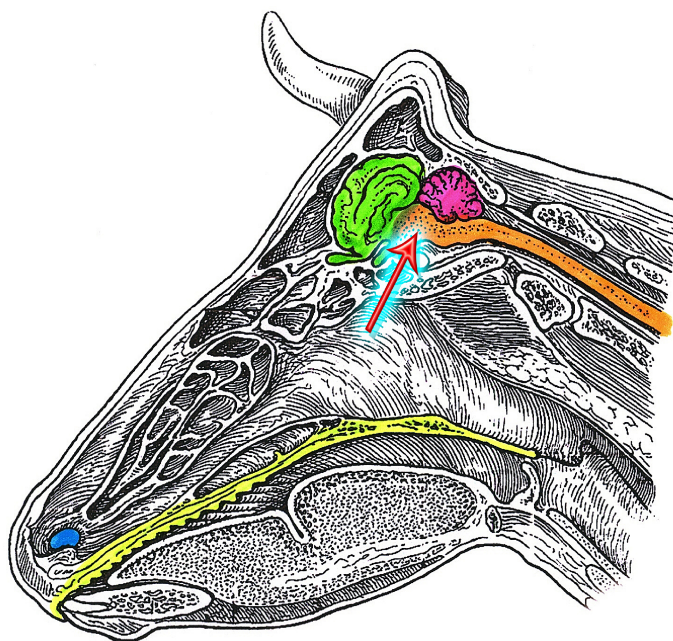


Fig.13 Sezione sagittale della testa bovina. Veduta laterale sx.
La freccia rossa indica la localizzazione del TG.

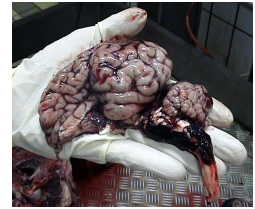
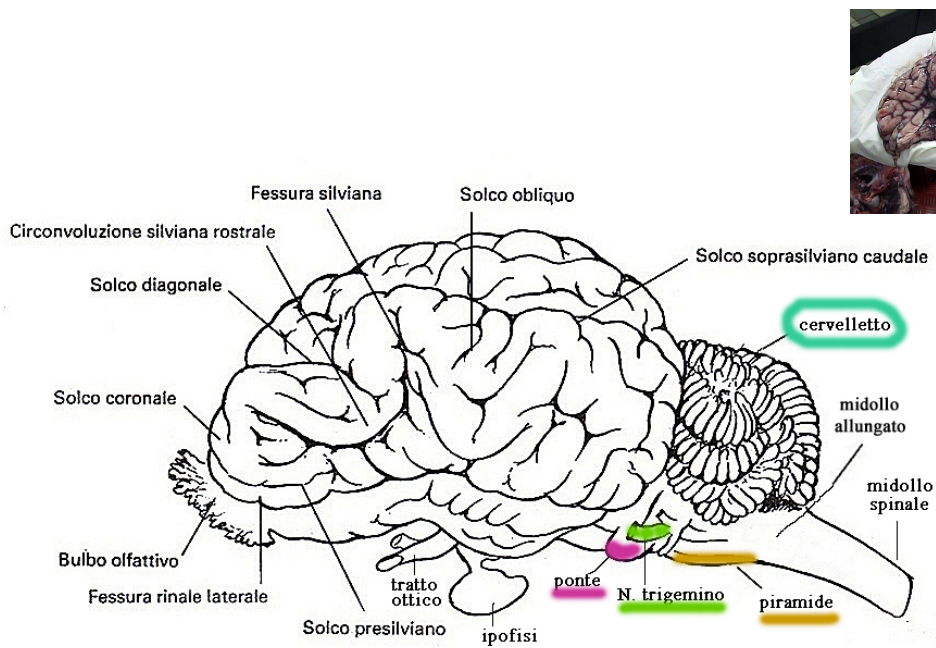


Fig.14 Encefalo bovino. Veduta laterale sx.
 In verde si può apprezzare il trigemino posizionato tra il ponte (in viola) e la piramide (in giallo). Foto in alto a dx, encefalo appena prelevato.

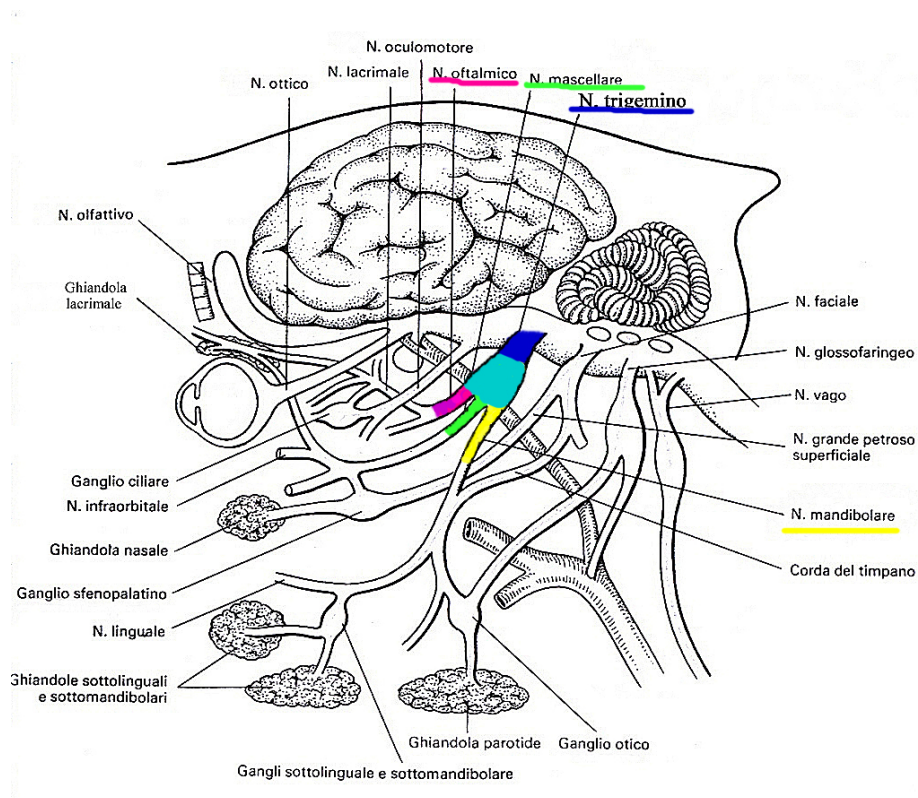


Fig.15 Schema della distribuzione della componente nervosa vegetativa dei nervi cranici destinati all'innervazione della testa. Componente parasimpatica.
 In blu il nervo trigemino, in celeste il TG, in rosa il nervo oftalmico, in verde il nervo mascellare, ed infine in giallo il nervo mandibolare.

Risposta immunitaria (RI). A seguito dell'infezione primaria, le reazioni infiammatorie e cellulari non-specifiche sono la prima risposta alla infezione da BoHV-1. Alcuni dei meccanismi non-specifici sono *costitutivi* (esempio l'attivazione del complemento), mentre altri (la produzione di interferone IFN), sono *indotti* dalla replicazione del virus. La produzione delle prime citochine porta al reclutamento e all'attivazione di diverse cellule come i macrofagi, neutrofilii polimorfonucleati e grandi linfociti granulari (che agiscono come cellule Natural Killer nei bovini). Questi effettori migliorano la prima ondata antivirale secernendo citochine nell'epitelio infettato e uccidendo le cellule infettate dal virus [Campos *et al.*, 1986 e 1989]. Le cellule immunitarie non-specifiche attivate sono anche essenziali per l'avvio e la regolazione della risposta immunitaria specifica per BoHV-1 [Babiuk *et al.*, 1994; Denis *et al.*, 1994].

L'immunità cellulare specifica viene rilevata dal 5° giorno post infezione (post-infection, p.i.) e raggiunge un picco a 7-10 giorni p.i. Generalmente coincide con la guarigione dalle manifestazioni cliniche [Babiuk *et al.*, 1994]. Specifici linfociti T helper mediano la lisi delle cellule infettate attivando macrofagi e le cellule NK attraverso la secrezione di IFN γ e IL2 e promuovendo la proliferazione di linfociti T citotossici .

L'immunità umorale specifica diviene rilevabile dal giorno 10 p.i. Anche se gli anticorpi sembrano essere meno importanti nella guarigione dell'infezione primaria, probabilmente partecipano a debellare l'infezione neutralizzando le particelle virali extracellulari libere e mediando la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente. D'altra parte la risposta anticorpale è una risorsa fondamentale nella prevenzione delle infezioni secondarie nel limitare le conseguenze della riattivazione [Babiuk *et al.*, 1994]. Inoltre l'immunità passiva offerta da anticorpi colostrali è pienamente efficace a proteggere i vitelli neonati nei confronti delle forme neonatali sistemiche letali di infezione da BoHV-1 [Mechor *et al.*, 1987]. La risposta anticorpale compare quindi in 7-14 giorni dall'infezione primaria, con la produzione di anticorpi circolanti:

- IgM, prodotte nella prima fase dell'infezione e durante gli eventuali episodi di riattivazione;
- IgG, anticorpi “di memoria”, che compaiono in un secondo momento, e che in particolare permangono più a lungo nelle infezioni respiratorie rispetto alle infezioni genitali.

Gli anticorpi persistono per anni, con fluttuazione dei titoli anticorpali per *effetti booster* causati da reinfezione e riattivazioni di infezioni latenti. Gli anticorpi materni sono trasferiti al vitello per via colostrale ed hanno una vita media di circa 3 settimane, anche se è possibile riscontarli in animali fino a 9 mesi di vita [Mechor *et al.*, 1987; OIE Terrestrial Manual, 2017].

Patologie. A seconda del ceppo virale e della via di infezione, la patologia può manifestarsi clinicamente in due forme principali:

- RESPIRATORIA: Rinotracheite Infettiva Bovina (IBR);
- GENITALE: Vulvovaginite Pustolosa (IPV) nella femmina o Balanopostite nel maschio (IPB).

Nella forma respiratoria (IBR – *Infectious Bovine Rhinotracheitis*) [Madin *et al.*, 1956] il virus BoHV-1 ha un'elevata affinità per le mucose respiratorie dove determina un'intensa reazione infiammatoria, causando seri danni a carico delle cellule ciliate dell'epitelio. Dopo 48 ore, l'animale presenta ipertermia (40,5-41,5°C), con un picco intorno al 3-4° giorno, associata ad apatia, dispnea, diminuzione dell'appetito, diminuzione del peso corporeo, ipersalivazione, ipersecrezione nasale, dapprima sierosa e poi mucopurulenta (Fig.16). Negli allevamenti da latte è possibile osservare una riduzione della produzione del latte (*ipogalassia nelle lattifere*). Spesso è presente congiuntivite unilaterale o bilaterale con profusa lacrimazione.

Le cavità nasali appaiono dilatate, iperemiche e presentano lesioni pustolose confluenti; la secrezione diviene sempre più densa e filante, di colore biancastro e, nelle fasi avanzate, tende ad assumere una colorazione rossastra per la presenza di tracce di sangue.

La mucosa tracheale (Fig.17) nelle fasi iniziali evidenzia iperemia della stessa e della sottomucosa (Foto 5), mentre in fasi successive risulta tappezzata di ulcere che, confluendo, danno luogo alla formazione di pseudomembrane ed emorragie (Foto 6). L'animale respira a bocca aperta, presenta arti anteriori divaricati, testa estesa sul collo, tosse e starnuti.

Nel caso in cui non intervengano complicazioni batteriche o virali, i sintomi, dopo aver raggiunto la loro massima espressione alla fine della prima settimana, incominciano a regredire; viceversa, in presenza di germi o virus di irruzione secondaria, l'animale muore per l'insorgenza di una grave forma di broncopolmonite.

La morbilità può variare dal 20% al 100%, mentre la mortalità può arrivare fino ad un massimo del 10%.

Strettamente associate alla malattia respiratoria sono la forma abortigena (Foto 7) e la meningoencefalica (Foto 8).

La prima colpisce bovine al 4-5° mese di gestazione, provocando morte fetale a causa della formazione di lesioni necrotiche a livello placentare, mentre la seconda porta a morte i vitelli di 4-6 mesi di età.

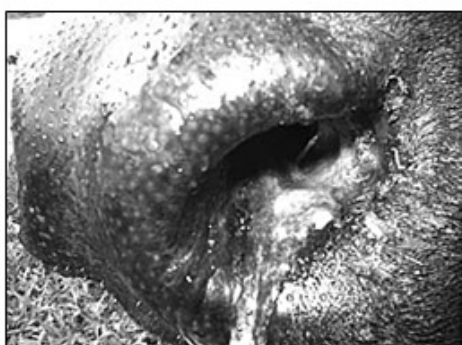


Fig.16 Segni clinici evidenti dovuti a IBR: scolo nasale muco-purulento, mucose nasali arrossate e con ulcerazioni (foto IZSUM in alto e in basso a sx).



Fig.17 IBR: Essudato muco-purulento e necrosi superficiale della mucosa tracheale (foto in alto a sx).
Tracheite mucosa (iperemia della mucosa e sottomucosa; foto in alto a dx IZSUM).
Tracheite emorragica (edema della mucosa e sottomucosa; foto in basso centro - IZSUM).

Nella forma genitale (IPV – *Infectious Pustular Vulvovaginitis*, nelle femmine; IPB – *Infectious Pustular Balanopostitis*, nei maschi). Il periodo d'incubazione è di 24-72 ore ed è seguito dalla comparsa di febbre, di tipo ondulante, della durata di alcuni giorni. Nella femmina la vulva si presenta tumefatta ed imbrattata di materiale denso che aderisce tenacemente alle labbra. Gli animali infetti di solito tengono la coda sollevata ed eseguono ripetuti tentativi di urinare che risultano sempre molto dolorosi. Nei casi lievi di malattia, la mucosa della vulva appare infiammata e risulta cosparsa di pustole (Foto 9) di dimensioni ridotte, di colore biancastro (Foto 10). La mucosa vaginale è congesta e presenta una certa quantità di essudato di colore giallastro. Nei casi più gravi le pustole presenti sulla mucosa vulvare tendono a confluire fra di loro dando origine ad una sorta di placche sopraelevate di colore giallastro e si osservano emorragie associate a grossi depositi di essudato vaginale (Fig.18). Dopo alcuni giorni il materiale necrotico superficiale viene eliminato residuando nella mucosa ampie zone di disepitelizzazione. La guarigione clinica si realizza in un tempo variabile da 10 a 14 giorni, anche se l'essudato vaginale può persistere per alcune settimane.



Fig.18 IBR: Evidenti pustole a livello della mucosa vulvare (a sx).
Mucosa vaginale con pustole di colore biancastro (a dx).
(foto IZSUM).

Nel maschio, nei casi lievi, è visibile una congestione della mucosa del prepuzio e del glande che permane per 2-3 giorni, fino a regressione completa dei sintomi. Nei casi più gravi, compaiono pustole che successivamente si rompono, residuando in ulcere crateriformi. La guarigione avviene in circa 2 settimane.

Nel maschio il virus viene eliminato dalle secrezioni prepuziali in maniera continua o intermittente, a seconda se si tratta di infezione primaria o di riattivazione virale, favorendo il contagio diretto e la subdola diffusione all'interno dell'allevamento. Anche una debole escrezione di virus attraverso lo sperma è pericolosa, poiché la dose minima infettante per un bufalo è molto bassa ($10^{-3.2}$ TCID₅₀, dose infettante in coltura di tessuto).

La trasmissione si verifica principalmente per via genitale, sia con la monta naturale, che tutt'oggi è adoperata nei programmi di selezione genetica dell'allevamento bufalino, sia attraverso la fecondazione artificiale (F.A.), con seme diluito e congelato di maschi infetti o, semplicemente, per l'utilizzo di vagine artificiali contaminate.

L'infezione in genere perdura in un allevamento infetto per 10-16 giorni.

Aborto. L'inoculazione endouterina di BHV-1 provoca metrite di modesta entità e infertilità temporanea. Il meccanismo dell'interruzione precoce di gravidanza con riassorbimento embrionale e ritorno in estro ritardato, è riconducibile ad un'azione diretta e/o indiretta del virus. In particolare, esso può provocare necrosi del corpo luteo ed abbassamento del tasso ormonale di progesterone a livelli non compatibili con la prosecuzione della gravidanza oppure agire direttamente sull'embrione. Inoltre, nella fase acuta dell'infezione, sintomi di ordine generale, come la febbre, ugualmente risulterebbero non compatibili per lo sviluppo embrionale. L'aborto consegue alla fase viremica dell'infezione.

Nell'infezione spontanea, l'aborto prevale nell'ultimo trimestre della gravidanza, ma in realtà può verificarsi in qualunque periodo della stessa. Il feto edematoso, autolitico, viene espulso 2-3 giorni dopo la morte e presenta necrosi ed infiltrazione della placenta (Fig.19).

Non c'è ritenzione placentare, né tanto meno sequele irreparabili nella carriera riproduttiva della femmina. Se l'infezione fetale sopraggiunge nella fase tardiva della gestazione si può osservare nascita di bufalotti scarsamente vitali.



Fig.19 IBR: Aborto bovino al 5° mese di gestazione (Foto IZSUM).

Infezione neonatale sistemica. L'infezione si instaura negli ultimi giorni di gravidanza o nei primissimi giorni di vita del vitello ed è caratterizzata da sintomi respiratori e gastroenterici con una mortalità elevata. Nel caso di ceppi neurotropi si instaura un'encefalite con incoordinazione, eccitamento, opistotono, cecità e morte in 3 giorni.

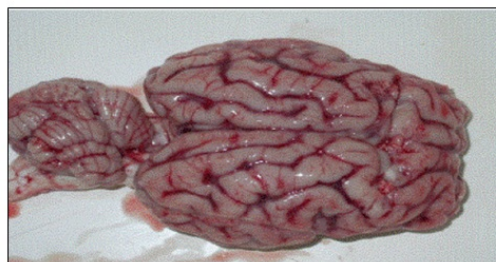


Fig.20 IBR: Meningoencefalite nel vitello (Foto IZSUM).

BoHV-1 nel BUFALO

Sebbene in natura la maggior parte degli Alpha-herpesvirus siano specie-specifici, in letteratura è descritta la capacità di tali virus erpetici di infettare anche altre specie animali. Soggetti quali capre, pecore, cervi e renne sono stati infettati con successo con BoHV-1 in condizioni sperimentali [Thiry *et al.*, 2007].

La suscettibilità del bufalo d'acqua all'infezione da BoHV-1 è stata dimostrata sia sierologicamente che virologicamente da Scicluna *e coll.* (2010), tramite l'inoculazione di bufali di 5 mesi con un ceppo di campo isolato da bovini. Nonostante la presenza di questo virus nel bufalo non sia associata ai gravi segni clinici che si è soliti osservare nelle infezioni bovine, si è dimostrata l'importanza di questa specie nel ruolo di *reservoir* di BoHV-1, specialmente nei casi in cui bovini e bufali vengano allevati insieme in una stessa azienda zootecnica [Scicluna *et al.*, 2010]. L'infezione naturale da BoHV-1 nel bufalo è stata documentata per la prima volta da Fusco *e coll.* in uno studio condotto tra il 2011 e il 2012 su 65 capi bufalini affetti da patologie ascrivibili all'azione dell'herpes, ovvero rinotracheite, aborto e morte neonatale. Tramite PCR e pirosequenziamento è stato possibile isolare e identificare il BoHV-1 [Viscardi *et al.*, 2015] in tamponi cervicali e vaginali di animali che avevano abortito e nei casi di morte neonatale, escludendo tutti gli altri patogeni investigati (*Bovine viral diarrhoea virus*, *Bovine coronavirus*, *Schmallemberg virus*, *Bluetongue virus*, *Border disease virus*, *Chlamydophila species*, *Coxiella burnetii*, *Leptospira species*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Ovine herpesvirus-2*). Questi risultati hanno indicato una maggiore gravità dell'infezione naturale rispetto a quella osservata in condizioni sperimentali da Scicluna *e coll.* (2010), probabilmente legata ai numerosi fattori naturali che possono intervenire in un'infezione, quali la virulenza del ceppo virale, fattori di resistenza dell'ospite, l'età degli animali e le possibili infezioni batteriche concomitanti. Anche in questo studio è stato messo in evidenza il grande interesse che il bufalo può assumere per la diffusione del BoHV-1, e la necessità quindi di includerlo nei piani di eradicazione, soprattutto nell'Italia meridionale [Fusco *et al.*, 2015].

BuHV-1 **(*Bubaline Herpesvirus type 1*)**

Storia e peculiarità. Fino a poco tempo fa il BuHV-1 è stato considerato un Herpesvirus *specie-specifico* del bufalo d'acqua, ma successivamente grazie alla sua "plasticità biologica" è stato capace di "adattarsi" e di infettare anche altre specie animali, tra cui (com'è noto in letteratura) quella bovina. Prove virologiche sulla suscettibilità dei bufali al BuHV-1 sono state descritte in uno studio sperimentale di riattivazione farmacologica in animali naturalmente contagiati [De Carlo et al., 2004]; inoltre prove di infezioni da herpes bufalino nella popolazione di *Bubalus bubalis* sono state dimostrate sierologicamente [Scicluna et al., 2007]. Recentemente Maidana e coll. (2014) hanno isolato e caratterizzato dal punto di vista molecolare diversi ceppi di BuHV-1 in bufali argentini.

Questo patogeno è stato isolato per la prima volta nel 1971 in Australia dal prepuzio di un toro bufalino [St George and Philpott, 1972] e solo molti anni dopo nel sud Italia in seguito a riattivazione eseguita da De Carlo e coll. (2004). Il BuHV-1 è stato prevalentemente associato a malattie subcliniche nel bufalo (St George and Philpott, 1972; Thiry et al., 2007; Scicluna et al., 2010). Tuttavia risultati recenti dimostrano anche casi in cui le infezioni da herpes bufalino nei bufali abbiano dato gravi difficoltà respiratorie, evidenti soprattutto in annutoli e caratterizzate da tosse, starnuti, rantoli, ipersecrezione nasale e congiuntivale, ipertermia al di sopra dei 41°C, inappetenza, depressione del sensorio, letargia. In alcuni soggetti si sono riscontrati sintomi enterici (diarrea), e un soggetto ha mostrato arruffamento del pelo [Petrini et al., 2012]. Ulteriori studi effettuati su feti abortiti provenienti da allevamenti dell'Italia meridionale hanno permesso di identificare un ceppo Mediterraneo particolarmente virulento di BuHV-1, in grado di determinare aborto nelle bufale, con una omologia del 99% (601 nucleotidi su 609) rispetto al ceppo b6, analizzata sulla similarità della sequenza nucleotidica per la gE [Amoroso et al., 2013].

CORRELAZIONE e DIVERSITA' tra BoHV-1 e BuHV-1

BoHV-1 ha una stretta relazione antigenica e genetica con gli AlphaHerpesvirus di altri ruminanti, come il virus erpetico del bovino tipo 5 (BoHV-5), in grado di provocare meningo-encefalite nel vitello; il virus erpetico del bufalo tipo 1 (BuHV-1), responsabile di infezioni subcliniche in *Bubalus bubalis*; il virus erpetico della capra tipo 1 (CpHV-1), il quale induce malattia sistemica nei giovani animali e aborto nelle femmine gravide; il virus erpetico del cervo tipo 1 (CvHV-1) responsabile di congiuntiviti nel cervo; il virus erpetico del cervo tipo 2 (CvHV-2) e il virus erpetico dell'alce tipo 1 (AlHV-1), responsabili di infezioni genitali subcliniche rispettivamente nel cervo e nell'alce [Thiry *et al.*, 2006].

In letteratura è noto che sia la specie bufalina che quella bovina sono sensibili alle infezioni eterologhe da BoHV-1 e BuHV-1 [De Carlo and Martucciello, 2014].

BoHV-1 e BuHV-1 nonostante appartengano, quindi, alla stessa sottofamiglia *α-herpesvirinae*, e pur essendo altamente correlati tra di loro (con un'identità di sequenza nucleotidica del 96.6% per glicoproteina B, gB, e dell'86.5% per la glicoproteina E, gE) (Fig.21), l'analisi filogenetica li classifica come patogeni diversi (Fig.22) [Ros and Belàk, 2002; De Carlo *et al.*, 2004; Thiry *et al.*, 2007b; Nogarol *et al.*, 2014; De Carlo and Martucciello, 2014]. Tutto ciò, quindi presenta delle implicazioni per i programmi di diagnosi e di risanamento/eradicazione, per cui si ritiene opportuno che vengano utilizzati test diagnostici performanti soprattutto per quanto riguarda la discriminazione tra anticorpi anti-BoHV-1 e anti-BuHV-1 nel bufalo.

	UL27	Nucleotide similarity									
		BoHV-1 Lam (1.1)	BoHV-1 K22 (1.2)	BoHV-5 NS69	BuHV-1 b6	CpHV-1 Ba-1	CvHV-1 Banf. 82	CvHV-2 Salla 82	ElkHV-1	CvHV-1 Anlier	SuHV-1 Becker
Amino acid similarity	BoHV-1 Lam (1.1)		99	95.9	96.6	87.8	94.8	92.3	94.5	94.8	75.4
	BoHV-1 K22 (1.2)	100		95.7	96.1	87.8	94.5	92.1	94.5	94.5	75.2
	BoHV-5 NS69	97.9	97.9		98.6	88.5	96.3	93.6	95.9	96.1	76.3
	BuHV-1 b6	97.2	97.2	99.3		88.9	96.8	93.6	96.6	96.8	76.5
	CpHV-1 Ba-1	88.5	88.5	88.5	87.8		88	88.7	88.2	87.8	75.6
	CvHV-1 Banf. 82	94.5	94.5	95.2	95.9	87.8		95	99.3	99.3	76.5
	CvHV-2 Salla 82	91.8	91.8	91.8	91.8	88.5	94.5		95.2	94.3	77.7
	ElkHV-1	94.5	94.5	94.5	94.5	88.5	98.6	95.9		98.8	75.9
	CvHV-1 Anlier	94.5	94.5	95.2	95.2	86.4	98.6	93.2	97.2		75.9
	SuHV-1 Becker	70.9	70.9	70.2	70.2	71.6	69.5	70.2	68.9	68.2	

Fig.21 Similarità nelle sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche di UL27 (gB) tra gli alphaherpesvirus dei ruminanti (immagine tratta dalla pubblicazione di Thiry *et al.*, 2007).

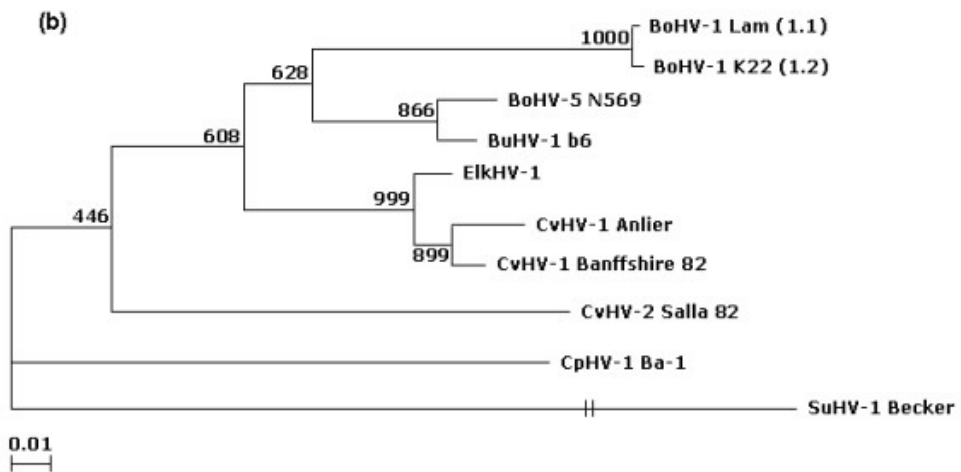
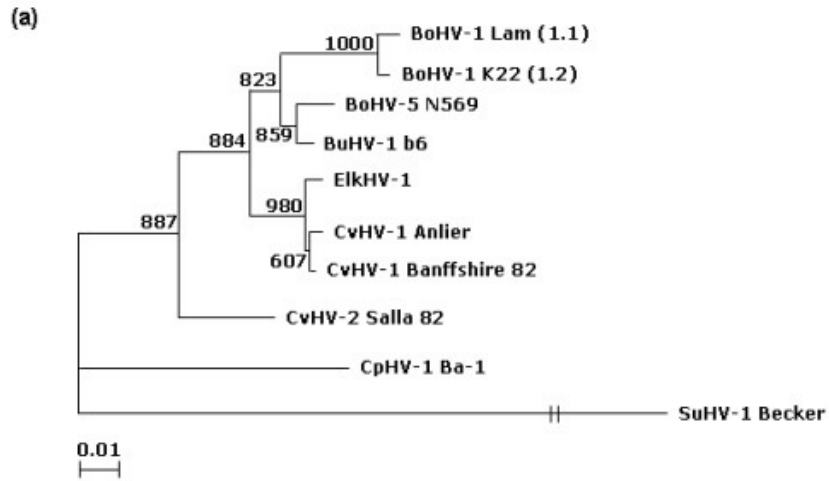


Fig.22 Albero filogenetico dedotto dalle sequenze nucleotidiche delle di UL27- gB (a) ed US8 – gE (b) degli alphherpesvirus dei ruminanti (immagine tratta dalla pubblicazione di Thiry *et al.*, 2007).

DIAGNOSI DIRETTA E INDIRETTA

La diagnosi per il rilevamento di HV-1 bovino e bufalino deriva da dati anamnestici e anatomico-clinici, ma esige sempre prove di laboratorio per una convalida certa, in quanto si tratta di virus causanti patologie che manifestano larghe somiglianze con altre affezioni dei bovini e dei bufali (quali per esempio: *Bovine Viral Diarrhoea virus*, *Bovine coronavirus*, *Schmallenberg virus*, *Bluetongue virus*, *Border Disease virus*, *Chlamydomphila species*, *Coxiella burnetii*, *Leptospira species*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Ovine herpesvirus-2*), a livello respiratorio e in sede genitale.

La diagnosi può avvenire attraverso:

- metodi DIRETTI:
 - Isolamento virale (o indagini virologiche)
 - PCR (in particolare PCR gE selettiva)
 - Real-Time PCR
 - Immunofluorescenza diretta (IFD)
 - Microscopia elettronica

eseguiti su tamponi nasali e vaginali prelevati in fase acuta, congiuntivali, lavaggi prepuziali, feti abortiti, cotiledoni placentari, materiale seminale;

- metodi INDIRETTI:
 - Saggi Immunoenzimatici (ELISA test: ELISA ricombinante per la ricerca di anticorpi anti-gE oltre ad anti-gB)
 - Prove di Sieroneutralizzazione (SN test)

eseguiti su sangue, sieri, latte.

Le diagnosi sono effettuate secondo le procedure dell'*OIE Terrestrial Manual 2010* (Chapter 2.4.13 – Infectious bovine rhinotracheitis/Infectious pustular vulvovaginitis).

Il BoHV-1 si isola e si identifica nel materiale prelevato durante le fasi febbrili della malattia, mediante immunofluorescenza e/o prove immunoenzimatiche. Per le tessuto-culture si usano cellule di origine renale bovina (MDBK – Madin Darby Bovine Kidney) o suina [Cabasso *et al.*, 1957; Schwarz *et al.*, 1957]; in esse la rapidità di crescita e l'effetto citopatico (ECP) facilitano il diagnostico, che potrà essere ulteriormente confermato da prove di sieroneutralizzazione o da immunofluorescenza.

Le indagini virologiche in genere prevedono tempi relativamente lunghi di esecuzione (da una a tre settimane a seconda del numero dei passaggi seriali in coltura) e costi elevati. L'isolamento virale, inoltre, presenta serie difficoltà nella diagnosi delle infezioni subcliniche o asintomatiche (*infezioni latenti*), in quanto esse non determinano massiva escrezione del virus.

La presenza del patogeno durante la sua forma latente non è, quindi, rilevabile attraverso le tecniche virologiche tradizionali, ma richiede metodologie specifiche la cui messa a punto è relativamente recente; a tal proposito parliamo di: PCR, Real-Time PCR, sonde molecolari (*probe*), co-colture, etc. Ai fini della diagnosi indiretta, o sierologica, è essenziale l'esame del doppio campione di siero, prelevato rispettivamente in fase acuta e convalescente, per rilevare un incremento significativo del titolo anticorpale nel tempo compreso fra esordio della malattia e la convalescenza (2-3 settimane). Le tecniche utilizzate a tal riguardo sono la *sieroneutralizzazione* (per visualizzare anticorpi anti-BHV-1) e l'*ELISA*, ma esse, ancora una volta, non risolvono il problema relativo alla diagnostica di laboratorio attuata in casi di infezioni latenti e/o asintomatiche. Infatti, in questi frangenti si può ottenere un responso che possiamo definire "falsamente negativo" alle indagini sierologiche, quindi, che non esclude il rischio di escrezione temporanea o intermittente del virus. Tale circostanza solleva evidenti problemi di ordine epidemiologico. Ricerche più recenti riguardano tuttavia la messa a punto e l'affidabilità di prove immunoenzimatiche (ELISA) in micro- e macro-metodo per visualizzare sia gli anticorpi che l'antigene virale.

L'inoculazione intradermica di sospensione inattivate di virus omologo è molto usata in campo diagnostico per la facilità con cui può evidenziare una latenza virale in soggetti asintomatici o addirittura sieronegativi. La reattività cutanea consente anche il riconoscimento dei vitelli passivamente immunizzati da quelli infetti da ceppo di campo. La notevole diffusione della presenza di anticorpi anti-BHV-1 e la molteplicità delle forme patologiche da BHV-1 ci impediscono di mettere in relazione la sieropositività con gli eventi patologici in atto o trascorsi. Solo se si avessero a disposizione dei test per le analisi dell'isotipo di anticorpi presenti nel siero, un unico prelievo potrebbe assumere significato diagnostico, essendo la presenza di IgG1 e IgM, specifiche nel sangue, caratteristica di un'infezione primaria recente, mentre quella di IgG1 e IgG2 caratteristica di una riattivazione dell'infezione.

PROFILASSI, RISANAMENTO, ERADICAZIONE

Dal momento che l'IBR/IPV/IPB induce negli animali sia danni sanitari diretti (malattia clinica/subclinica) che indiretti (ipofertilità/infertilità, calo della produzione latte, aborto, encefaliti, spese veterinarie, etc.), si spiega perché sia diventato un problema di grande rilevanza economica in molte parti del mondo e soprattutto in Europa, sia nei Paesi in cui questa infezione è stata debellata che in quelli in cui il controllo è attualmente o sarà intrapreso [Thiry *et al.*, 1999]. Considerando che la presenza di IBR nel nostro territorio può avere implicazioni negative nell'ambito della commercializzazione e movimentazione degli animali sieropositivi tra una zona e l'altra, e ancor di più in ambito internazionale [Purpari *et al.*, 2005; De Carlo and Martucciello, 2014] (diversi Paesi hanno attuato piani di eradicazione ed esigono un certificato rilasciato da Enti autorizzati - IZZSS - che attesti la sieronegatività a IBR), si rende necessaria la conoscenza della presenza di herpes negli allevamenti bufalini. Inoltre la sieronegatività a IBR è richiesta soprattutto per i tori destinati ai centri di riproduzione e quindi bisogna adottare misure di routine per il controllo dell'infezione, partendo dalle misure di profilassi diretta (PIANO DI BIOSICUREZZA) fino ad arrivare a quella indiretta (PIANO VACCINALE).

In molti Paesi europei (eccezione fatta per Svizzera, Austria, Svezia, Norvegia, Finlandia, Danimarca, alcune aree della Baviera considerate indenni IBR) e in alcune regioni italiane (Trentino, Lombardia, Piemonte, Veneto, Friuli, Lazio, Campania; eccetto Bolzano e Trento reputate indenni IBR dall'UE) esistono già specifici piani di risanamento/eradicazione della malattia su base obbligatoria o volontaria [Purpari *et al.*, 2005] che sono indirizzati in modo particolare al comparto bovino, e non sempre estesi a quello bufalino.

Indagini epidemiologiche, attualmente disponibili, condotte su alcuni territori italiani, confermano la diffusione di questi virus nei bufali [Scicluna *et al.*, 2007; De Carlo and Martucciello, 2014; Marullo *et al.*, 2015], ma si tratta ancora di dati incompleti. Ciò rende importante quantificare il reale impatto economico che la malattia determina in una popolazione infetta, chiarire il ruolo patogeno che gli herpesvirus rivestono, valutare la funzione di serbatoio, di diffusore che il bufalo rappresenta, e soprattutto scegliere i test diagnostici più performanti (in materia di efficienza, sensibilità, specificità, costi, discriminazione virale) per raggiungere l'obiettivo di risanamento/eradicazione nei vari allevamenti zootecnici bufalini.

Linee guida per l'attuazione della prima fase del piano di risanamento/eradicazione IBR in allevamenti bufalini [Marullo *et al.*, 2015]:

Misure di profilassi diretta e indiretta.

Presso gli allevamenti soggetti a piani di risanamento/eradicazione dall'IBR si adottano misure di profilassi diretta e, qualora necessario, indiretta, con la finalità di evitare il rischio di introduzione dell'agente eziologico in azienda e la sua trasmissione all'interno della mandria. Tali misure di prevenzione vengono attuate anche in caso di allevamenti sospetti infetti e positivi all'IBR per favorire una più rapida e duratura eliminazione del virus dall'allevamento.

Il risanamento di un intero allevamento (soprattutto se grande) sieropositivo a IBR comporta un lavoro di diversi anni di intervento.

Il piano di risanamento si rivolge ad allevamenti bufalini ufficialmente indenni da tubercolosi, brucellosi e leucosi bovina enzootica.

Un piano di risanamento da IBR si effettua dopo un sopralluogo scrupoloso di tutto l'allevamento, l'acquisizione di tutte le informazioni relative all'azienda (tutti i reparti di allevamento e di produzione per rilevare i punti critici strutturali), alla sua gestione (rilevare i punti critici di gestione che possono esporre l'allevamento a rischio introduzione del virus dall'esterno e/o di trasmissione dell'infezione all'interno della mandria), alla situazione sanitaria pregressa ed attuale (registri anagrafe, del farmaco, eventuali vaccini effettuati, etc.) e alle prospettive aziendali a medio e lungo termine, per consentire la predisposizione di un programma efficace sotto il profilo sanitario, economicamente sostenibile, condiviso da tutte le parti coinvolte (allevatori, veterinario libero professionista aziendale, addetti ai lavori).

Un piano di risanamento deve avere come riferimento un capo progetto (in genere è il veterinario aziendale coadiuvato da terzi esperti, come Università, ASL, etc.) che segua costantemente la programmazione, la verifica dell'efficacia e dell'efficienza del piano, e individui delle opportune soluzioni in caso di problemi. Tutti gli interventi che vengono effettuati per il piano di risanamento/eradicazione devono essere annotati in un apposito registro.

A) Profilassi DIRETTA: PIANO DI BIOSICUREZZA

Le misure di profilassi diretta raggruppano tutti gli interventi di lotta per impedire l'introduzione del virus, eliminarlo dall'ambiente e prevenirne la circolazione.

L'adozione di tali misure precauzionali condiziona in maniera rilevante l'efficacia e i tempi di realizzazione del piano aziendale di controllo/eradicazione della malattia ed il conseguimento dell'obiettivo.

L'applicazione di un piano aziendale di biosicurezza è modulato sulla base delle caratteristiche dell'allevamento e della situazione epidemiologica rilevata, in accordo con il responsabile dell'allevamento ed il veterinario aziendale.

Biosicurezza esterna.

Il piano di biosicurezza aziendale si basa sul principio dell' "allevamento protetto" e prevede procedure specifiche volte a minimizzare il rischio di introduzione dell'infezione dall'esterno.

Le misure di biosicurezza esterna comprendono:

- quarantena e accertamenti diagnostici per i capi di nuova introduzione;
 - i nuovi capi introdotti in allevamento è bene che provengano da allevamenti indenni o ufficialmente indenni da IBR, e tale indennità sia accompagnata da certificato sanitario di scorta;
 - qualora gli animali, che vengono introdotti, provengano da allevamenti non indenni/ufficialmente indenni da BHV-1 è necessario che siano stati sottoposti nell'allevamento di origine a test sierologico con esito favorevole (animali sieronegativi) nei trenta giorni precedenti l'introduzione;
- E' inoltre necessario che siano isolati dal resto dell'allevamento di destinazione per almeno trenta giorni, durante i quali devono essere eseguite due prove sierologiche con esito favorevole (animali sieronegativi) distanziate di ventuno giorni;
- i capi risultati infetti (dopo test sierologico) devono essere confinati in un gruppo allevato separatamente o eliminati qualora le percentuali di positività e l'economia aziendale lo consentano;
 - prevenzione e accertamenti in occasione di contatti esterni a rischio (fiere, mercati, pascoli, etc.). Vengono isolati per trenta giorni dal resto dell'allevamento e sottoposti a controllo sierologico (due prove a distanza di ventuno giorni) tutti gli animali che in occasione di fiere, mercati, trasferimenti in altre strutture, siano venuti in contatto con animali di allevamenti non indenni/ufficialmente indenni da BHV-1;
 - misure strutturali e funzionali volte a impedire l'ingresso del virus nell'allevamento;
 - misure volte ad evitare contatti a rischio con altri allevamenti per il tramite di persone, mezzi e strumenti;
 - utilizzare solo femmine nutrici sierologicamente negative;
 - negli allevamenti promiscui, in assenza di qualsiasi piano di controllo aziendale, le bufale devono essere allevate separatamente;
 - viene utilizzato per la fecondazione artificiale solo seme raccolto da tori negativi alla ricerca di anticorpi totali anti-BHV-1;
 - vengono utilizzati embrioni ottenuti da donatrici appartenenti ad allevamenti indenni/ufficialmente indenni da BHV-1;
 - commercializzare soggetti da riproduzione sieronegativi;

- dopo scambio di capi, anche temporaneo (ad esempio per l'alpeggio) con altri Paesi comunitari e terzi, quarantena per trenta giorni e due screening sierologici a distanza di ventuno giorni l'uno dall'altro per escludere infezione da IBR;
- utilizzare tori bufalini (risultati sieronegativi ad ELISA test) per rimonta interna esclusivamente con bufale risultate sieronegative a test sierologici;
- se si intende far ammettere i tori bufalini ai **centri genetici e di riproduzione** eseguire gli accertamenti sierologici (tramite sieroneutralizzazione e/o ELISA test) per la diagnosi di IBR prima dell'isolamento di trenta giorni necessario per l'accesso al centro.

I centri genetici possono applicare protocolli di accesso più restrittivi, per garantire l'indennità da IBR degli animali e dell'intera struttura.

In caso di allevamenti dove siano presenti animali sospetti infetti e positivi all'IBR si procede effettuando una scrupolosa indagine siero-epidemiologica (ELISA test per la ricerca di anticorpi totali nei confronti del virus BHV-1, ed ELISA test per la ricerca di anticorpi anti-glicoproteine E per differenziare infezioni da BoHV-1 e BuHV-1) di tutti gli animali dell'allevamento per avere un quadro chiaro sull'entità dell'infezione e decidere in seguito il piano aziendale di risanamento più appropriato da attuare insieme all'allevatore e al veterinario aziendale.

La periodicità dei controlli sierologici negli allevamenti infetti è di norma annuale, salvo esigenze particolari debitamente motivate.

Le spese dello screening sierologico sono a carico dell'allevatore.

Biosicurezza interna.

Il piano di biosicurezza contempla la presenza di requisiti aziendali (strutturali e di gestione) finalizzati a ridurre il rischio di trasmissione dell'infezione all'interno dell'allevamento, correlato alla presenza in allevamento di capi positivi e al fenomeno della latenza.

Le procedure di biosicurezza interna prevedono:

- l'identificazione, l'eventuale vaccinazione e la riforma anticipata dei soggetti positivi. L'isolamento e la successiva eliminazione dei capi positivi risultano, ovviamente, le misure più efficaci ai fini dell'estinzione dell'infezione nell'allevamento; non sono tuttavia sempre praticabili, soprattutto nelle fasi iniziali del piano di risanamento/eradicazione. Si devono adottare pertanto misure alternative, integrate con interventi di profilassi indiretta, concordate in base alla situazione di ciascun allevamento e sottoposte a periodica verifica della loro efficacia;
- la pulizia e la disinfezione delle strutture di allevamento dell'azienda zootecnica e annesse (il virus è poco resistente ed è sensibile ai comuni disinfettanti);

- la corretta gestione aziendale relativamente alla tutela del benessere animale, con la finalità di evitare situazioni di stress che comportino episodi di riattivazione dell'infezione latente, con escrezione del virus e diffusione del contagio;
- l'esclusione o, qualora necessario, l'effettuazione sotto stretto controllo, degli interventi farmacologici che favoriscono la riattivazione dell'infezione dallo stato di latenza, in collaborazione con il veterinario aziendale;
- dotare di indumenti e calzari monouso o esclusivi chiunque entri in allevamento ed in particolar modo i tecnici ed altri operatori del settore che frequentano altre aziende (veterinari, mangimisti, controllori APA, commercianti, etc.);
- limitare la circolazione degli automezzi all'interno della propria azienda (trasporto latte, animali, mangimi) e individuare zone o percorsi specifici da far rispettare;
- evitare contatti diretti e indiretti con altri allevamenti (evitare di frequentare altri allevamenti o farlo utilizzando calzari e camici monouso, evitare di utilizzare attrezzatura impiegata in altre aziende zootecniche);
- garantire una corretta alimentazione ed un buono stato di nutrizione degli animali;
- utilizzare *colostro IBR free* proveniente da madri sieronegative o disponibile in commercio.

B) Profilassi INDIRETTA: PIANO VACCINALE

Le misure di profilassi indiretta rappresentano uno strumento utile di integrazione alla profilassi diretta, in presenza di un rischio di trasmissione dell'infezione in allevamento o di reinfezione dall'esterno.

La necessità di un programma aziendale di vaccinazione viene valutata, in collaborazione con il veterinario buiatra e con il responsabile dell'allevamento, sulla base:

- delle informazioni relative alla situazione sanitaria e all'anamnesi di allevamento (infezioni pregresse, piani vaccinali già attuati, prevalenza annuale, prevalenza puntuale al momento delle prove, eventuale segnalazione di sintomatologia, etc.);
- dei dati disponibili relativi alla situazione sanitaria degli allevamenti e del territorio limitrofo;
- dell'individuazione dei fattori di rischio di trasmissione dell'infezione all'interno della mandria e/o di introduzione del virus dall'esterno;
- della programmazione aziendale per quanto riguarda i tempi di eliminazione dei capi positivi, le modalità di gestione dell'allevamento, le risorse disponibili e, in generale, i vincoli e le possibilità per il conseguimento dello status sanitario di risanamento.

In Italia, come in diversi altri Paesi, il vaccino è utilizzato su animali sani, sieronegativi, per prevenire la malattia clinica e quindi evitare che i soggetti vengano contagiati dall'herpes di campo; invece, in altri Paesi si usa un protocollo "alternativo", che consiste nel vaccinare animali sieropositivi in modo che ci sia una regressione sintomatologica della malattia, ma soprattutto per impedire la riescrezione del patogeno da parte di animali serbatoi latenti, e ciò permetterebbe una pacifica convivenza tra animali sieropositivi e quelli sieronegativi.

La scelta del vaccino e del relativo schema vaccinale deve tenere conto della valutazione complessiva di cui sopra e delle caratteristiche dei prodotti disponibili in commercio, e deve essere concordata con il veterinario aziendale e con il responsabile dell'allevamento, per una totale condivisione degli obiettivi e una consapevole responsabilità nell'attuazione del piano di vaccinazione.

Le spese di acquisto dei vaccini e di vaccinazione sono a carico dell'allevatore, che si avvale, per l'effettuazione, del veterinario aziendale.

Numerosi tipi di vaccini sono stati proposti per il controllo dell'IBR/IPV, ma sebbene siano risultati efficaci al problema della diffusione dell'antigene virale, non erano privi di inconvenienti e di innocuità.

I vaccini attualmente disponibili hanno dei limiti di azione notevoli, infatti, proteggono efficacemente l'animale contro i sintomi clinici della malattia inducendo quindi un'*apparente* guarigione, ma non sono in grado di evitare né l'instaurazione dell'infezione latente del patogeno né una riescrezione indotta da un eventuale trattamento con desametazone, senza contare poi che quando la diffusione del virus si realizza per mezzo di ponti intercellulari [Christian *et al.*, 1971] si esclude che intervenga l'immunità umorale (anticorpi).

All'orizzonte delle tecniche d'immunizzazione si profilano nuovi vaccini, capaci di differenziare sierologicamente gli animali vaccinati da quelli infettati con virus selvaggio: ciò permette di individuare i soggetti portatori del virus di campo ed eliminarli, rendendo possibile un programma di eradicazione della malattia. Questi vaccini di nuova generazione sono: vaccini deleti o "marcati" (vaccini *marker*), vaccini subunitari, ricombinanti, con impiego di DNA plasmidico.

Oggi il vaccino più comunemente usato contro il BHV-1 è quello *gE-deleto* o *marker-gE*. Il virus contiene tutte le proteine strutturali tranne la gE. Conferisce buona protezione, ma risulta meno efficace del gE-vivo nel proteggere dalle forme cliniche.

STRESS OSSIDATIVO

In condizioni normali ogni cellula produce radicali liberi (RL) tramite vari processi (per esempio reazioni enzimatiche, difesa immunitaria, radiazioni ionizzanti, etc.). I RL sono specie reattive che quando controllate assolvono a molte funzioni fondamentali dell'organismo, però sono anche uno dei meccanismi di danno cellulare. I RL più diffusi e pericolosi sono quelli dell'ossigeno, come i ROS (specie reattive dell'ossigeno) e i ROM (metaboliti reattivi dell'ossigeno); questi hanno la capacità di ossidare/danneggiare componenti fondamentali della cellula come DNA, lipidi, proteine. Sono tollerati dall'organismo in piccole quantità e vengono inattivati da agenti antiossidanti, però quando la loro produzione aumenta troppo si genera stress ossidativo (SO).

Gli herpesvirus possono attivare meccanismi di SO all'interno delle cellule [Mathew *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2011] quando la produzione in eccesso di ossidanti non può essere contrastata da meccanismi di difesa antiossidante, e ciò porta a cambiamenti patologici [Lykkesfeldt and Svendsen, 2007], tra cui invecchiamento cellulare, formazioni neoplastiche, immunosoppressione, malattie degenerative, problemi riproduttivi, mastite negli animali da allevamento [Cardoso *et al.*, 2010].

Negli ultimi anni lo SO è stato ritenuto un fattore importante nella patogenesi e nello sviluppo delle malattie; quindi, misurare l'attività dei RL nei campioni di siero e nei gangli trigeminali rappresenta il modo migliore per studiare l'associazione tra lo stato di SO e le malattie infettive, tra cui quelle erpetiche indotte da BoHV-1 e BuHV-1 nel bufalo.

Recentemente è stato dimostrato che i bovini infetti da BoHV-1 sembravano avere più SO e bassa difesa antiossidante [Durgut *et al.*, 2013].

PARTE SECONDA

SCOPO DEL LAVORO

Nel presente progetto di ricerca lo scopo principale è stato quello eseguire una diagnosi di infezione da Herpesvirus 1 (BoHV-1 e BuHV-1), mediante modalità diretta e indiretta, su campioni di bufalo prelevati nel sud Italia, in particolare nella regione Campania, e valutarne l'effettiva efficienza, sensibilità, specificità, potere discriminante. Ciò affinché nella stesura di piani di risanamento futuri per la specie bufalina si faccia attenzione alla scelta dei test diagnostici, in modo da individuare quelli più performanti per raggiungere l'obiettivo.

Tutti i bufali presi in esame non sono stati mai vaccinati contro IBR/IPV.

La diagnosi diretta, che mette in evidenza gli antigeni virali, è stata eseguita su materiale prelevato *in vivo* (tamponi nasali e vaginali effettuati in allevamenti della provincia di Caserta) e *post-mortem* (gangli del trigemino prelevati nei macelli di Avellino, Salerno e Caserta) mediante isolamento virale, PCR, Real-Time PCR.

La diagnosi indiretta, che rileva la presenza degli anticorpi anti-BoHV-1 e anti-BuHV-1, è stata effettuata su sieri prelevati in aziende casertane e nei suddetti macelli. Gli anticorpi sono stati individuati con metodiche immunoenzimatiche ELISA, e con prove di sieroneutralizzazione virale (SN).

In particolare è stato condotto uno studio preliminare di confronto tra metodi diagnostici sierologici per la ricerca di anticorpi anti-herpesvirus 1 nei bufali [De Carlo and Martucciello, 2014; Bertolotti *et al.*, 2015]. Gli obiettivi principali sono stati due:

- 1 – confrontare i risultati ottenuti, dall'analisi di sieri bufalini, con l'utilizzo di kit ELISA presenti in commercio e prove di SN;
- 2 – valutare, nei sieri di bufalo, la capacità discriminante sia delle prove immunoenzimatiche che della SN nei confronti di anticorpi anti-BoHV-1 e anti-BuHV-1.

Altro scopo del progetto di ricerca è stato quello di utilizzare parte dei sieri e dei gangli trigeminali di bufalo, risultati positivi a Herpesvirus 1 (BoHV-1 e BuHV-1) mediante le prove sierologiche, per valutare lo stato di Stress Ossidativo (SO) attraverso il rapporto tra d-ROMs test, che valuta la concentrazione dei ROS (radicali liberi, RL); e l'anti-ROMs test, che valuta la capacità difensiva della barriera antiossidante. E' stata valutata l'associazione tra infezione da alfa herpesvirus 1 e ROMs nelle bufale mediterranee italiane (*Bubalus bubalis*).

I virus, compresi gli Herpes, possono alterare l'equilibrio ossidativo o aumentando la formazione dei RL o inibendo la sintesi di enzimi coinvolti nella difesa ossidativa all'interno delle cellule ospiti. Di recente è stato accertato che i bovini contagiati da herpes bovino (BoHV-1) presentano più SO ed una difesa antiossidante molto bassa [Durgut *et al.*, 2013].

MATERIALI E METODI

Raccolta campioni: gangli trigeminali (TGs).

Negli anni 2014 e 2015 nei macelli di Salerno, Avellino e Caserta (regione Campania) sono stati collezionati 50 gangli del trigemino (25 destri e 25 sinistri) da bufale e tori di età compresa tra 24 mesi e 8 anni.

Prelievo TGs: durante la prima fase di macellazione del bufalo (quindi dopo uccisione con proiettile captivo), si procede con il taglio della testa dal corpo del soggetto. Segue un taglio sagittale (effettuato da un addetto abile) al centro del cranio (tra le corna) con una sega elettrica per mezzene; questa modalità di esecuzione consente di aprire la testa dell'animale in modo netto, e permette il recupero preciso di entrambi i gangli (dx e sx).

Successivamente, con molta delicatezza si spostano (senza reciderli) cervello e cervelletto. A questo punto dal tronco encefalico si possono ben vedere i gangli che vi dipartono e si vanno ad immettere nei rispettivi fori laceri. Infine con l'ausilio di un bisturi e delle forbicine a punte ricurve si effettuano i prelievi dei campioni in esame (Fig.23, 24, 25, 26, 27).

La procedura di asportazione dei TGs è la medesima sia nei bovini che nei bufali, l'unica differenza che vi si può attribuire sta nel tempo di apertura della testa, ovvero visto che i bufali presentano una calotta cranica spessa circa tre volte quella di un bovino il taglio è più laborioso.

I tessuti nervosi appena asportati sono stati posti in tubi falcon da 15 ml e trasportati in condizioni di refrigerazione, per poi essere congelati a -80°C.

I gangli, sede di latenza, sono stati utilizzati per prove di isolamento virale da herpesvirus 1, per prove di biologia molecolare e per la valutazione dello stato di stress ossidativo (SO).



a



b



c



d

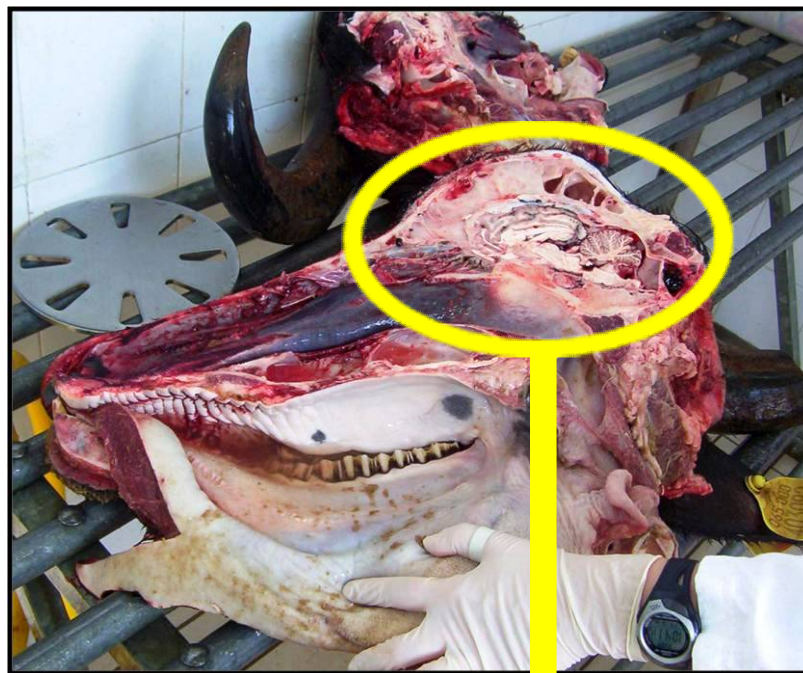


e

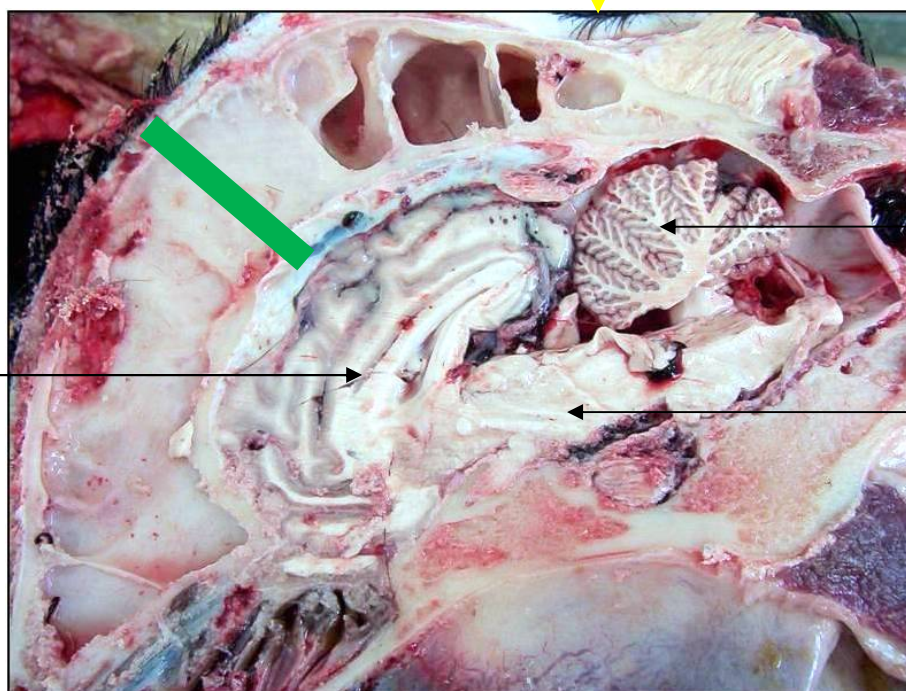


f

Fig.23 Prelievo Ganglio Trigemiale (prima parte):
a, Bufala (pluripara) sieropositiva a BuHV-1 e BoHV-1; **b e c**, animale macellato e taglio della testa;
d, e, f, con una sega elettrica si fa un taglio sagittale tra le corna,
in modo che la testa venga aperta in due parti come una mela.
[Prelievo eseguito nel macello di Salerno].



g

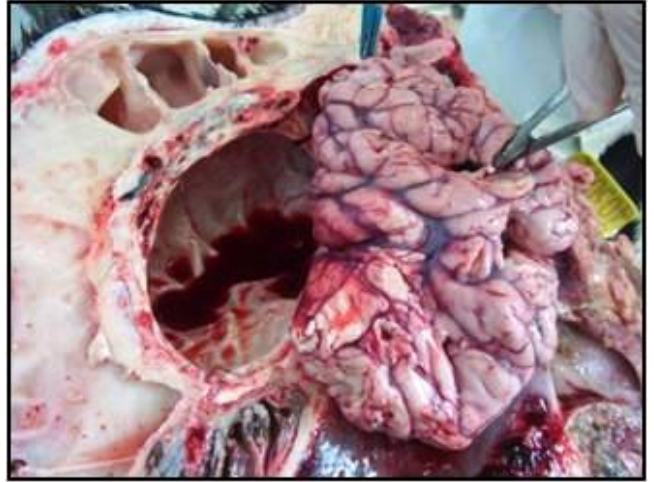


h

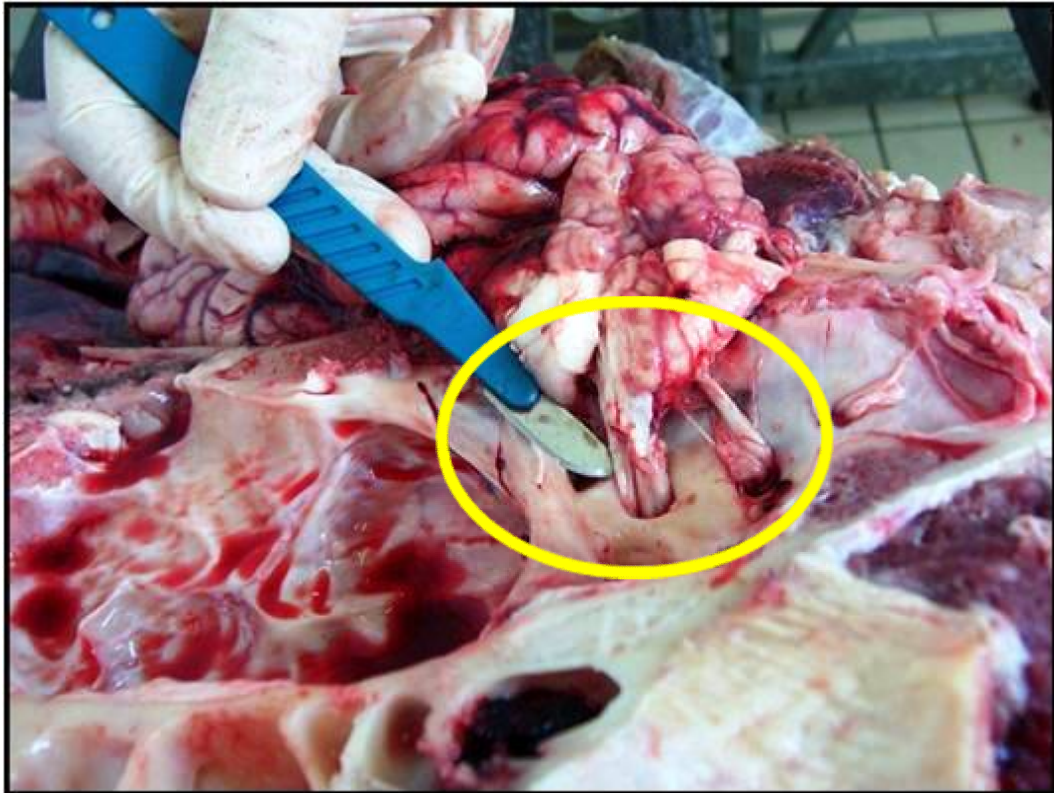
Fig.24 Prelievo Ganglio Trigemiale (seconda parte):
g, sezione sagittale dx della testa di bufalo; **h**, cervello, cervelletto e tronco encefalico.
 La freccia nera-*tronco encefalico* indica la posizione da cui dipartono il nervo e ganglio trigemino.
 La linea verde indica lo spessore importante della calotta cranica bufalina.
 [Prelievo eseguito nel macello di Salerno].



i



l



m

Fig.25 Prelievo Ganglio Trigemiale (terza parte):
i, l, con un bisturi e una forcicina a punte ricurve delicatamente si spostano (senza reciderli) cervello e cervelletto;
m, la lama del bisturi indica il TG (dx) che fuoriesce dal foro più craniale (foro lacero) mentre è ancora attaccato al tronco encefalico.
[Prelievo eseguito nel macello di Salerno].

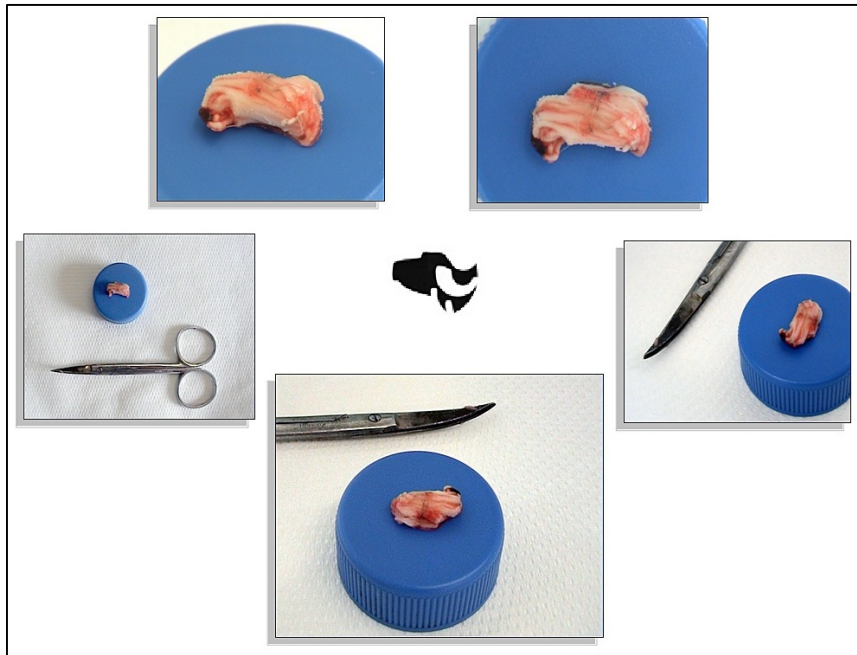


n

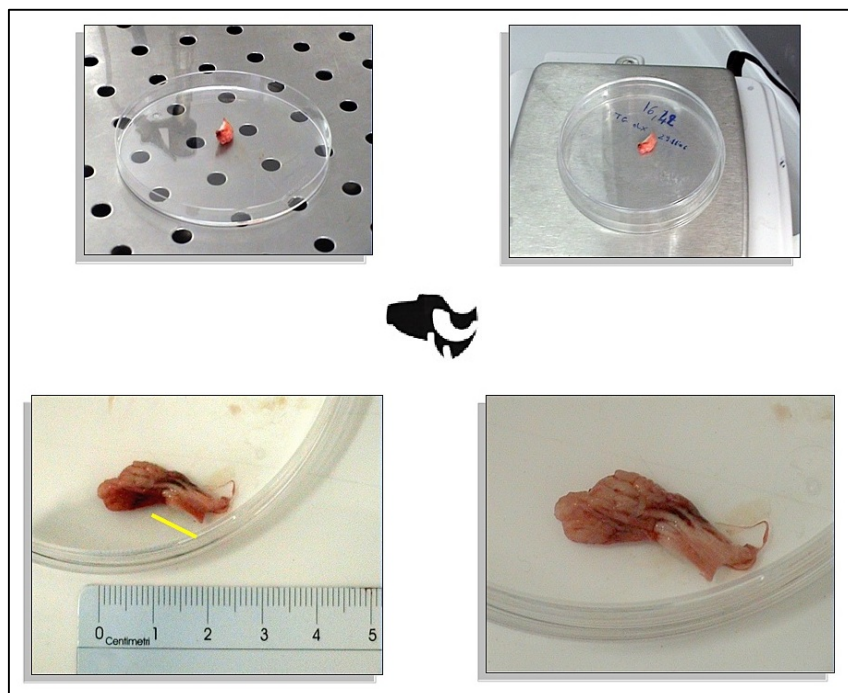


o

Fig.26 Prelievo Ganglio Trigemiale (quarta parte):
n, o, ganglio del trigemino (dx).
[Prelievo eseguito nel macello di Salerno]



p



q

Fig.27 Prelievo Ganglio Trigemiale (quinta parte):
p, ganglio del trigemino (dx); **q**, ganglio del trigemino (sx).
 [p, prelievo eseguito nel macello di Caserta; q, prelievo eseguito nel macello di Avellino].

Raccolta campioni: sangue/siero.

Durante il periodo gennaio 2014 e maggio 2016 sono stati collezionati 421 sieri (provenienti da bufale e tori di età compresa tra i 6 mesi e i 15 anni): 21 campioni sono stati presi nei macelli di Salerno, Avellino, Caserta durante la fase di iugulazione degli animali; e 400 dalla coda di soggetti allevati in 16 differenti aziende (ad indirizzo produttivo latte) della provincia di Caserta (regione Campania) i cui proprietari hanno dato il consenso informato a poter eseguire i prelievi.

Tutte le aziende testate non avevano mai effettuato trattamenti vaccinali nei confronti del virus erpetico.

In questo lavoro è stato eseguito un campionamento *di convenienza*.

Il sangue degli animali è stato prelevato con aghi gialli 20G assemblati ad un supporto *holder standard* e raccolto in provette sterili sottovuoto (Fig.28, 29).

Successivamente, in laboratorio, le provette sono state centrifugate a 2000 rpm x 5 min; i sieri ottenuti sono stati utilizzati per test diagnostici: ELISA, sieroneutralizzazione (SN), valutazione dello stato di stress ossidativo (SO).

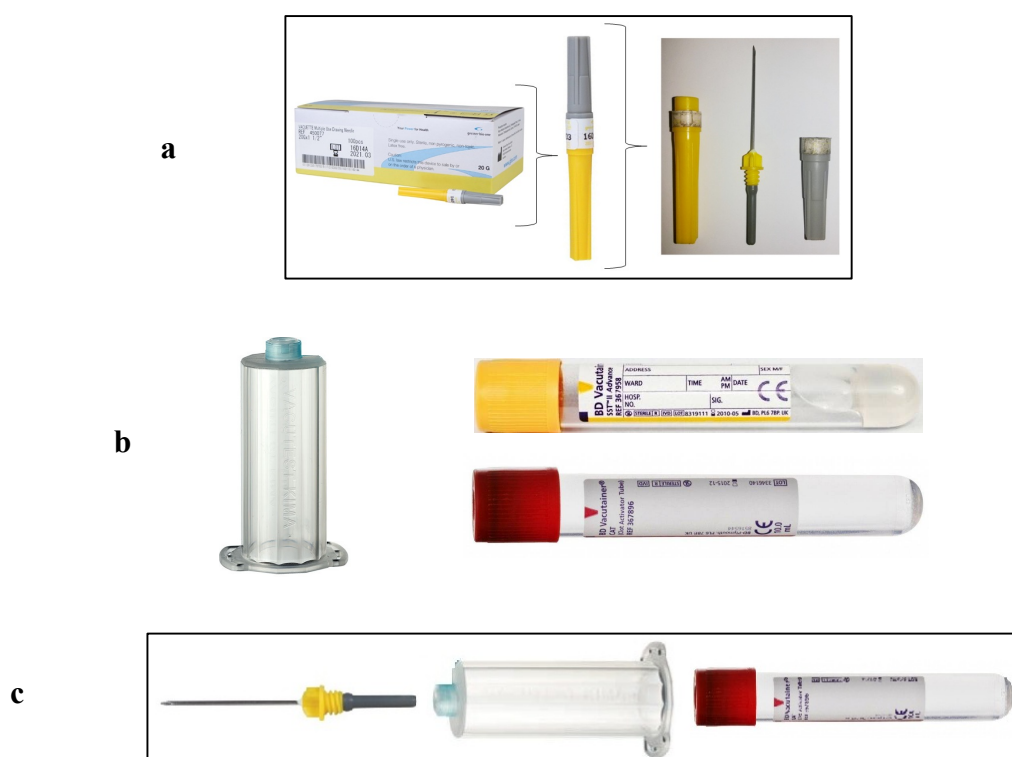


Fig.28 Set prelievo ematico utilizzato in questa ricerca.

a, VACUETTE® aghi gialli per prelievo multiplo 20G x 1", sterili, latex-free, 0.9 x 25 mm (REF 450077); **b (sx)**, VACUETTE® camicia monouso porta provette (*holder standard*) in polipropilene trasparente con filettatura (lunghezza 6cm x diametro 18mm); **b (dx)**, provette BD Vacutainer: tappo rosso (REF VS367896), tubo in plastica per siero (lunghezza 100 mm x diametro 16 mm); tappo giallo (REF VS367954 SST II Advance), tubo in plastica per siero con gel separatore a base acrilica (lunghezza 100 mm x diametro 16 mm); **c**, schema montaggio set prelievo ematico.

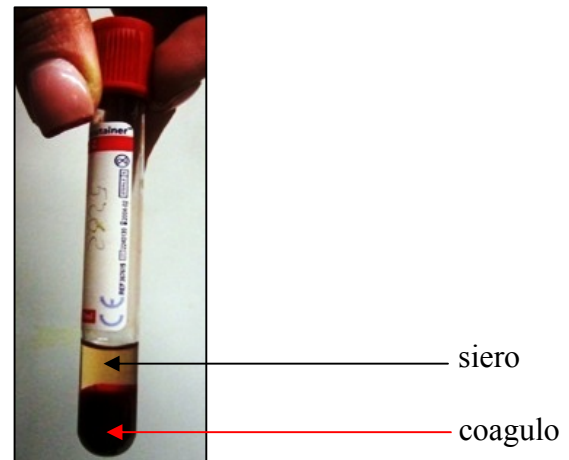
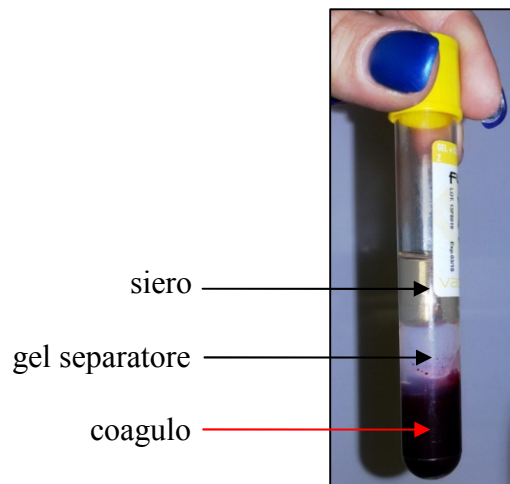


Fig.29 Modalità di esecuzione prelievo sangue
dalla coda di un bufalo tenuto fermo con una corda (foto in alto e al centro);
provetta BD Vacutainer per siero (tappo rosso; siero ottenuto per centrifugazione o per decantazione) (foto in basso a dx);
provetta BD Vacutainer con gel separatore per siero (tappo giallo) (foto in basso a sx).
[Prelievi ematici, nelle foto sopra, effettuati in un allevamento casertano].

Raccolta campioni: tamponi nasali (TN) e tamponi vaginali (TV).

Negli allevamenti della provincia di Caserta (regione Campania), nel periodo gennaio 2014 e maggio 2016, insieme ai prelievi di sangue, da 14 soggetti bufalini (di età compresa tra i 24 mesi e i 15 anni) che presentavano un leggero scolo mucoso nasale e/o vaginale (uno dei sintomi clinici di infezione tipico dell'IBR/IPV) è stato effettuato sia un tampone nasale che uno vaginale (Fig.30), per un totale di 28 campioni.

I tamponi sono stati trasportati in tubi falcon da 15 ml immersi in terreno colturale DMEM supplementato da antibiotico (penicillina-streptomina) al 10%, e collocati a temperatura di refrigerazione; subito dopo congelati a -80°C.

In laboratorio tutti i tamponi sono stati scongelati e centrifugati a 8000 rpm x 10 min alla temperatura di 5°C.

I surnatanti ottenuti sono stati utilizzati per la ricerca dei herpes 1 attraverso prove di isolamento virale su colture cellulari MDBK (cellule renali bovine), ed è stata valutata la presenza o assenza di effetto citopatico (ECP). Il pellettato è stato utilizzato per l'estrazione del DNA con kit apposito. Sui tamponi sono state effettuate anche prove di biologia molecolare.



TN



TV

Fig.30 Tamponi nasali e vaginali di bufali [Foto scattate in un allevamento casertano].

Colture cellulari.

In questo studio per allestire le prove di isolamento virale sono state utilizzate cellule di rene bovino (MDBK – Madin Darby Bovine Kidney) coltivate in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplementato da: 5% di siero fetale bovino (SFB) precedentemente scomplementato (alla temperatura di 56°C x 30 sec), 1% di L-Glutamina, 1% di antibiotico PEN-STREP (100 U/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina), 0,1% di Sodio piruvato, 0,1% di Tilosina.

Le cellule MDBK sono state fatte crescere alla temperatura di 37°C in atmosfera modificata al 5% di CO₂ (Fig.31).

Questa linea cellulare è stata conservata incontaminata da micoplasmi e dal virus della Diarrea Virale (BVDV).

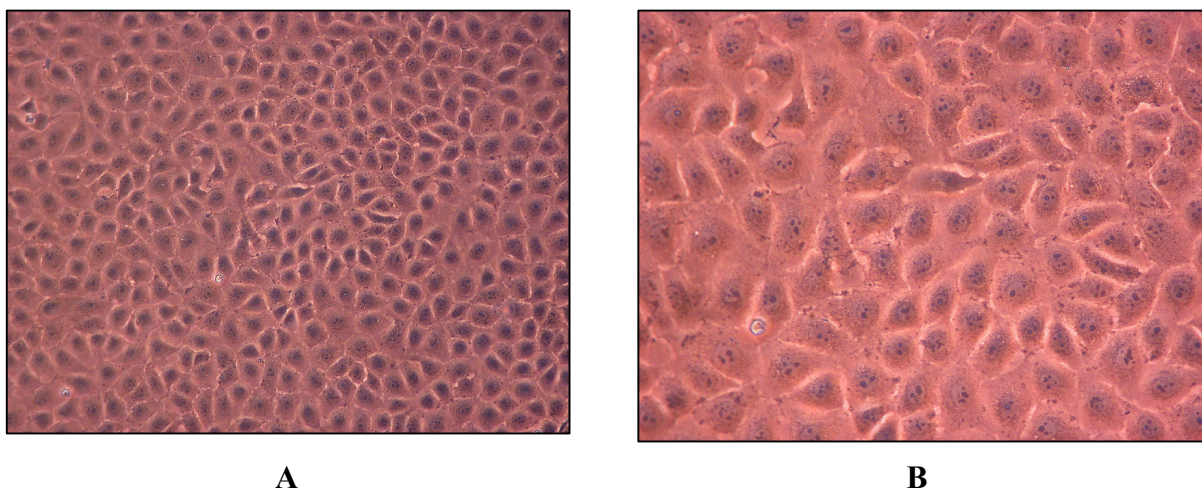


Fig.31 Cellule MDBK al microscopio ottico invertito coltivate nei laboratori della sez. Malattie Infettive del Dip. Medicina Veterinaria e Produzioni Animali dell'Uni. Federico II di Napoli.
A, ingrandimento cellule 20X; **B**, ingrandimento cellule 40X.

Omogenato di ganglio trigeminale (TG) e infezione.

Per le prove di isolamento virale, di una parte dei gangli del trigemino raccolti, sono stati fatti degli omogenati e con questi sono state infettate cellule MDBK a confluenza.

Dopo il prelievo, il TG è stato pesato (circa 0,10g) e, sotto cappa, sminuzzato in modo accurato con una lama di bisturi sterile. Il campione, quindi, è stato posto in un falcon da 50 ml con 5 ml di terreno DMEM. Il falcon è stato messo a sua volta in un bagno di ghiaccio in modo da non surriscaldare il campione durante il trattamento con l'omogeneizzatore. Si sono effettuati più cicli di omogeneizzazione. Successivamente si è proceduto con 3 cicli di congelamento e scongelamento a -80°C ; dopo l'ultimo scongelamento il campione è stato centrifugato per 10 min a 3500 rpm a 4°C , per consentire la rottura delle cellule neuronali e l'eventuale fuoriuscita del virus latente qualora presente. Il surnatante è stato trasferito in una eppendorf sterile da 2 ml ed è stato aggiunto antibiotico PEN-STREP (penicillina-streptomicina) al 10%. L'eppendorf è stata lasciata a temperatura ambiente per 30 min, in modo che l'antibiotico agisse. Da una fiaschetta a confluenza di cellule MDBK è stato allontanato tutto il terreno di coltura supplementato, ed è stato inoculato 1 ml di surnatante di omogenato trigeminale e posto su un piano oscillante a 37°C x 1 h. In fine, sono stati aggiunti 4 ml di terreno DMEM completo (supplementato da: 1% L-Glutamina, 1% antibiotico PEN-STREP, 0.1% Sodio piruvato, 0.1% Tilosina) e 5% di siero fetale bovino (SFB); a questo punto è stato incubato a 37°C . Ai tempi di 24h-48h-72h post-infezione è stato verificata la presenza o assenza di effetto citopatico (ECP) (Fig.32).



Fig.32 Fasi del processo di omogeneizzazione TG.

a, b, c, d, e, f: il TG bufalino in una piastra Petri viene pesato e sminuzzato con un bisturi.
g, h, i: il TG sminuzzato viene messo in un falcon 50ml con HBSS; **j, k, l:** viene omogeneizzato e si apprezza la separazione del surnatante (in rosso) e del pellettato (rosa); **m, n:** si centrifuga; **o, p:** il surnatante viene messo in provetta;
q, r: fiaschetta con monostrato MDBK, privo di terreno di coltura, inoculato col surnatante; **r(2):** monostrato MDBK a confluenza nella fiaschetta r (foto al microscopio ottico invertito); **s:** fiaschette di MDBK infettate col surnatante e poste su un piatto oscillante a 37°C; **t, u:** terreno completo DMEM (in rosso) e SFB (in giallo);
v: fiaschetta con MDBK infettate col surnatante di TG (e DMEM con SFB) posta successivamente in incubatore a 37°C.

Estrazione DNA virale.

Il DNA dei campioni in esame è stato estratto utilizzando il kit commerciale *GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep* (Sigma-Aldrich), e sono state seguite le procedure dettate dal suo protocollo. *GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep* Kit si avvale dell'avanzata tecnologia di una membrana di gel-silice in grado di purificare, in maniera rapida ed efficiente, il DNA cellulare e/o virale, rimuovendo contaminanti come proteine, enzimi inibitori, cationi bivalenti che interferirebbero con la purezza dell'estratto; inoltre elimina la necessità di utilizzare costose resine, precipitazione di alcool e sostanze organiche pericolose (composti come fenolo e cloroformio).

Ciascun campione di ganglio trigeminale bufalino è stato tagliuzzato in pezzetti da 25 mg e successivamente in pezzi ancora più piccoli (questo per rendere più efficiente la lisi); è stato trasferito in un tubo da microcentrifuga da 2 ml e diluito in una soluzione costituita da: 180 µl di soluzione di lisi per tessuto e 20 µl di proteinasi K (enzima).

Successivamente è stato miscelato su un vortex. Dopo un'incubazione di 4 h a 55°C, per ottenere una digestione completa, l'estrazione è proceduta con l'aggiunta di 200 µl di soluzione di lisi seguita da una rimescolazione (per avere una soluzione più omogenea) e, quindi, con un'incubazione a 70°C per 10 min. Dopo l'aggiunta di 200 µl di etanolo (96-100%) il contenuto della mix è stato mescolato col vortex e trasferito in colonnine (*spin column*) munite di membrana al gel di silice, raccolte in tubi da 2 ml. E' stata effettuata una centrifugazione a 6500 rpm x 1 min, e la colonnina è stata trasferita in un nuovo tubo da 2 ml. A questo punto sono state effettuate due serie di lavaggi: il primo versando sulla membrana 500 µl di Wash Solution e centrifugando a 6500 rpm x 1 min; dopo aver trasferito la colonnina in un nuovo tubo da 2 ml è stato eseguito il secondo lavaggio con 500 µl di Wash Solution e un'altra centrifugazione a 6500 rpm x 1 min per asciugare la colonnina.

Quest'ultimo passaggio ha assicurato che nessun residuo di etanolo fosse trasmesso alla successiva fase di eluizione. La colonnina contenente la membrana è stata trasferita in un nuovo tubo da 2 ml, e sono stati aggiunti 200 µl di Elution Solution (fase di eluizione); quindi, è stata eseguita un'ultima centrifugazione a 16000 rpm x 3 min che ha permesso la caduta del DNA e del liquido di eluizione sulla base del tubo da 2 ml (Fig.33).

L'Eluato DNA di 200 µl ottenuto è stato poi conservato a -20°C fino all'utilizzo.

La concentrazione del DNA (espressa in µg/ml) è stata misurata mediante l'uso di un biofotometro (*Biophotometer Eppendorf*) che ha permesso anche di stimare, per ciascun campione di DNA, il rapporto A260/A280 o rapporto di assorbanza, grazie al quale si ricavava una stima del grado di purezza del DNA estratto, rilevando eventuali contaminanti, come le proteine che assorbono raggi UV. Il rapporto ottimale di A260/A280 è considerato tra 1.6 – 1.9 (secondo il protocollo di estrazione Sigma-Aldrich), e quello dei campioni in esame rientrava appena in questo range.

Anche l'estrazione di DNA dai tamponi nasali e vaginali bufalini ha seguito le apposite fasi del protocollo del kit *GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep* (Sigma-Aldrich) (Fig.33).

GENELUTE MAMMALIAN GENOMIC DNA KIT

Cultured Cells or Tissue

1 Release DNA from cultured cells, tissues (including rodent tails), fresh whole blood or white blood cells

A. Cultured cells

- Pellet up to 5×10^6 cells. Discard medium.
- Resuspend cells in 200 μ l resuspension solution.
- Optional:* Add 20 μ l RNase. Mix & incubate at RT, 2 min.
- Add 20 μ l Proteinase K & 200 μ l lysis solution to cell suspension. Vortex or pipet to mix.
- Incubate at 70 °C, 10 min. Proceed to section 2.

B. Mammalian Tissues

- Mince up to 25 mg tissue on ice. Transfer to 1.5-2 ml microcentrifuge tube.
- Add 180 μ l lysis solution for tissue & 20 μ l Proteinase K. Vortex or insert to mix.
- Incubate at 55 °C until fully digested (2-4 h).
- Optional:* Add 20 μ l RNase. Mix & incubate at RT, 2 min.
- Add 200 μ l lysis solution. Vortex or pipet to mix. Incubate at 70 °C, 10 min. Proceed to section 2.

C. Rodent tails

- Cut two (mouse) or one (rat) 0.5-0.6 cm pieces from tip of tail on ice. Transfer to 1.5-2 ml microcentrifuge tube.
- Add 180 μ l Lysis Solution for Tissue & 20 μ l Proteinase K. Mix by vortexing. Ensure that tail is fully submerged.
- Incubate at 55°C until fully digested (3-6 h). Vortex briefly.
- Optional:* Add 20 μ l RNase. Mix & incubate at RT, 2 min.
- Add 200 μ l Lysis Solution; do not mix. Immediately proceed to section 2.

D. Fresh whole blood

- Collect whole blood in an anticoagulant tube & equilibrate to RT.
- Place 20 μ l of Proteinase K in a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add up to 200 μ l of whole blood (or blood + Resuspension Solution to 200 μ l).
- Optional:* Add 20 μ l RNase. Mix & incubate at RT, 2 min.
- Add 200 μ l of lysis solution. Vortex or pipet to mix. Incubate at 55°C, 10 min. Proceed to section 2.

Pure DNA

SIGMA-ALDRICH®

Order/ Customer Service Phone 1-800-325-3010 Fax 1-800-325-5952 Technical Service 1-800-325-5832
World Headquarters 3050 Spruce St., St. Louis MO 63103 (314)771-5750 www.sigma-aldrich.com

GENELUTE MAMMALIAN GENOMIC DNA KIT

Cultured Cells or Tissue

1 Release DNA from cultured cells, tissues (including rodent tails), fresh whole blood or white blood cells (continued)

E. White blood cells (WBC)

- Prepare WBCs from 500 μ l of whole blood/ prep. See Appendix in Technical Bulletin for an ammonium chloride lysis procedure.
- Resuspend pellet thoroughly in 200 μ l of Resuspension Solution. Add 20 μ l of Proteinase K & vortex briefly.
- Optional:* Add 20 μ l RNase. Mix & incubate at RT, 2 min.
- Add 200 μ l of lysis solution. Vortex or pipet to mix. Incubate at 55°C, 10 min. Proceed to section 2.

2 Bind DNA to column

- Add 200 μ l ethanol. Vortex or invert to mix.
- Transfer to binding column. Spin $\geq 6,500 \times g$, 1 min.

3 Wash to remove contaminants

- Transfer column to new collection tube. Add 500 μ l Wash Solution to column. Spin at $\geq 6,500 \times g$, 1 min. **Note:** Ethanol must be added to Wash Solution concentrate before first use.
- Transfer column to new collection tube. Add second 500 μ l Wash Solution to column.
- Spin at $\geq 12,000 \times g$ for 3 min. to dry column.

4 Elute purified DNA

- Transfer column to new collection tube.
- Add 200 μ l Elution Solution. Spin at $\geq 6,500 \times g$, 1 min.
- Optional:* Repeat elution in same or new tube.

Pure DNA

SIGMA-ALDRICH®

Order/ Customer Service Phone 1-800-325-3010 Fax 1-800-325-5952 Technical Service 1-800-325-5832
World Headquarters 3050 Spruce St., St. Louis MO 63103 (314)771-5750 www.sigma-aldrich.com

Fig.33 Protocollo estrazione DNA (Kit Sigma-Aldrich).

PCR

L'amplificazione in PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reazione a catena della polimerasi) è stata eseguita usando la *Gene Amp PCR system 9700* (Applied Biosystems®) con Invitrogen™ *Taq* DNA Polymerase (enzima termostabile che sintetizza il DNA da modelli a filamento singolo in presenza di dNTP e un primer; cod.10342-020), e sequenze di primers specifiche per i geni:

- gB (443 bp) e gE (624 bp) di BoHV-1 [Thiry *et al.*, 2007]:
 - Forward primer gB: (CR30F): 5'-TCGAARGCCGAGTACCTGCG-3';
 - Reverse primer gB: (CR31R): 5'-CCAGTCCCAGGCRACCGTCAC-3';
 - Forward primer gE: (914F): 5'-CGARACSTGCATCTTYCAC-3';
 - Reverse primer gE: (1538R): 5'-GGSTCGTTGTYGGM-3';
- gE (571 bp) di BuHV-1 [Petrini *et al.*, 2012]:
 - Forward primer gE: (gEF2): 5'-CGAGACGTGCATCTTCCAC-3';
 - Reverse primer gE: (gER2): 5'-GGGTTGAGGATGTCGTAGGT-3'.

I primers sono stati disegnati mediante software Primer Premier 6 sulla base della sequenza della gE di BuHV-1 depositata in GenBank (EF624469.1).

I profili termici di reazione eseguiti sono stati due:

1) denaturazione iniziale a 94°C per 3 min, seguita da 35 cicli di: 94°C x 45 sec (denature), 55°C x 30 sec (annealing), 72°C x 90 sec (extend), 72°C x 10 min (final extension).

2) denaturazione iniziale a 95°C per 15 min, seguita da 35 cicli di: 95°C x 1 min (denature), 57°C x 1 min (annealing), 72°C x 1 min (extend), 72°C x 7 min (final extension).

La mix di reazione (25 µL totali) della PCR includeva: 2.5 µL di 10X PCR Buffer, 0.75 µL di 50 mM MgCl₂, 0.5 µL di 10 mM dNTP Mix, 1.25 µL di 10 µM Forward primer, 1.25 µL di 10 µM Reverse primer, 0.1 µL di Taq DNA Polymerase (5U/µL), 13.65 µL di DNase RNase free water, 5 µL di template DNA.

Per assicurare la validità dei risultati ad ogni esperimento di PCR sono stati aggiunti controlli positivi (ceppi di referenza: BoHV-1 *ceppo Cooper* e BuHV-1 *ceppo Metzler*) e negativi.

Grazie alla PCR anche piccolissime quantità di virus, non rilevate con la tecnica di isolamento virale possono essere, invece, individuate dopo l'amplificazione elettiva *in vitro*. Lavori scientifici come quello di Van Engeburg *e coll.* (1993), di De Gee *e coll.* (1996), di Smits *e coll.* (2000) hanno ribadito, a tal merito, che un altro vantaggio offerto dalla PCR era quello di poter rilevare il DNA del BHV-1 durante un'infezione per un periodo di tempo più lungo se comparato all'isolamento virale.

Analisi elettroforetica

I prodotti della PCR sono stati separati per mezzo di Elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% in TBE buffer 0,5X (Tris - acido borico - EDTA), colorato con 3 μ l di Bromuro di etidio (Sigma). E' stato usato un Ladder (1,5 μ l) in base 100, e il colorante Blu Juls per evidenziare i diversi frammenti di DNA campione. Al termine della corsa, gli amplificati sono stati osservati al transilluminatore (o lampada a raggi UV) (Fig.34). Le immagini sono state fotografate con una *Polaroid® MP-4 Land Camera* (Polaroid® Corporation, Cambridge, USA).



Fig.34 Caricamento di una camera elettroforetica col DNA campione colorato (foto a sx).
Lettura del gel, dopo corsa elettroforetica, su lampada UV (foto a dx).

Real-Time PCR

E' una tecnica di biologia molecolare, molto più sensibile della PCR classica, che simultaneamente amplifica (prevede essenzialmente gli step di una PCR) e quantifica (aggiunge composti, come fluorocromi, la cui fluorescenza emessa ad ogni ciclo di reazione è proporzionale alla quantità di amplificato) il DNA target; in pratica dopo ogni turno di amplificazione il DNA è quantificato.

In questo studio l'amplificazione di herpesvirus 1 (BoHV-1 e BuHV-1) in Real-Time PCR è stata eseguita come descritto nell'*OIE Terrestrial Manual 2010* (Chapter 2.4.13 – Infectious bovine rhinotracheitis/Infectious pustular vulvovaginitis) ed è stato utilizzato il termociclatore *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®). Ogni campione conteneva un volume totale di 25 µl della Mix di reazione Real-Time PCR composta da: 12.5 µl di Quantitect Multiplex PCR NoRox PCR Master Mix (Qiagen), 3.5 µl di Dnase RNase free water, 1µl di primer gB-F 4.5 µM, 1µl di primer gB-R 4.5 µM, 1µl di sonda FAM 3 µM (probe), 1µl di Beta Actin-Mix 200 µl tot (5 µl 1030-F + 5 µl 1135-R + 2.5 µl ACT1081-VIC; tutti ex 100 µM), 5µl di DNA templato.

Le sequenze di primers utilizzate [secondo manuale OIE 2010] sono state:

- gB-F: 5'-TGT-GGA-CCT-AAA-CCT-CAC-GGT-3' (position 57499–57519 GenBank®, accession AJ004801)
- gB-R: 5'-GTA-GTC-GAG-CAG-ACC-CGT-GTC-3' (position 57595–57575 GenBank®, accession AJ004801)
- Probe: 5'-FAM-AGG-ACC-GCG-AGT-TCT-TGC-CGC-TAMRA-3' (position 57525–57545 GenBank®, accession AJ004801).

Il profilo termico di reazione eseguito è stato il seguente: denaturazione iniziale a 95°C x 15 min, seguita da 45 cicli di: 95°C x 15 sec (denaturazione), 60°C x 45 sec (annealing).

Per assicurare la validità dei risultati ad ogni esperimento di Real-Time PCR sono stati aggiunti i controlli positivi (ceppi di referenza: *Cooper* BoHV-1 e *Metzler* BuHV-1) e i negativi NTC.

I risultati sono stati elaborati dal *7500 Software v2.0 Applied Biosystems®* (in dotazione) in tempo reale, e infine salvati nel database di un Laptop computer.

ELISA test

Per la diagnosi indiretta da Herpesvirus 1 (HV-1) nei bufali sono stati impiegati i test sierologici ELISA (acronimo di *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) [Kramps *et al.*, 1993 e 2004].

Gli ELISA, utilizzati in questo studio, avevano lo scopo di ricercare anticorpi anti-BoHV-1 (anticorpi specifici per le glicoproteine B ed E dell'herpesvirus bovino) e anti-BuHV-1 (anticorpi specifici per la glicoproteina E dell'herpesvirus bufalino) nei sieri bufalini raccolti avendo a disposizione antigeni specifici (gB-BoHV-1, gE-BoHV-1, gE-BuHV-1) a cui legarsi.

Il principio di un ELISA indiretto si basa sul legame degli anticorpi specifici presenti nel siero-campione all'antigene immobilizzato sul fondo dei pozzetti di una piastra a 96-wells. Si forma così il *complesso antigene-anticorpo*. Successivamente un 2° anticorpo marcato con enzima (detto *anti-anticorpo*) legherà il *complesso antigene-anticorpo*; infine viene aggiunto un substrato/cromogeno dell'enzima legato al 2° anticorpo. Lo sviluppo del colore indica la presenza degli anticorpi che si voleva saggiare, visto che l'enzima usato agisce sul substrato modificandolo in maniera che assorba la luce e risulti colorato. L'intensità della colorazione è misurabile grazie allo spettrofotometro.

Il blocking ELISA (o ELISA competitivo), invece, coinvolge l'uso del coniugato anticorpo-enzima, con l'antigene immobilizzato sulla fase solida. La reazione di competizione avviene fra l'antigene immobilizzato e quello libero in soluzione come standard o proveniente dal campione, nei confronti dell'anticorpo marcato presente in concentrazione fissa e in difetto. La misura del prodotto della reazione enzimatica sarà indirettamente proporzionale alla concentrazione di antigene presente nel campione.

In questa ricerca sono stati utilizzati quattro diversi kit ELISA in commercio provenienti da due case farmaceutiche:

- 1) IBR gB X3 test IDEXX laboratories (Cod. 99-41299) [blocking ELISA];
- 2) IBR gE Ab test IDEXX laboratories (Cod. 99-09537) [blocking ELISA];
- 3) Eradikit BuHV-1 gE IN3 diagnostic (Cod. 2848-2) [ELISA indiretto];
- 4) Eradikit Discrimination BoHV-1/BuHV-1 gE IN3 diagnostic (Cod. 2628-2) [ELISA indiretto].

Sulla base dei test IDEXX IBR-gB [specificità = 99%; sensibilità = 99%; valori ottenuti da ricerche IDEXX, 2001] e IBR-gE [specificità = 99,83%; sensibilità = 98%; ricerche IDEXX, 2001] (utilizzati in combinazione) lo *status* dell'infezione era il seguente: gB(-)/gE(-) animale negativo, gB(+)/gE(+) animale positivo a BoHV-1, gB(+)/gE(-) animale positivo a BuHV-1 [Sciocluna *et al.*, 2007].

Sulla base del test IN3 BuHV-1 gE (che si basa sulla ricerca di anticorpi verso la glicoproteina E di BuHV1 nei ruminanti) [specificità = 98%; sensibilità = 99%; ricerche IN3, 2014] gli animali risultavano positivi o negativi al virus erpetico bufalino.

Sulla base del test IN3 Discrimination BoHV-1/BuHV-1 gE (che rappresenta l'unica soluzione diagnostica, attuale, in grado di discriminare efficacemente le due infezioni nella specie bufalina) [sensibilità = 99%; ricerche IN3, 2014] gli animali potevano risultare o positivi a BoHV-1, o positivi a BuHV-1, o coinfecti da entrambi i ceppi eterologhi (Bo e Bu). Questa prova sierologica, discriminante i ceppi di HV-1, è in genere utilizzata solo dopo aver accertato che i soggetti esaminati siano IBR positivi.

Protocollo IDEXX IBR gB X3 test:

- portare tutti i reagenti e i sieri-campione alla temperatura di 18°-25°C;;
- dispensare 50 µl di controllo negativo nel pozzetto adibito;
- dispensare 50 µl di controllo positivo nel pozzetto adibito;
- dispensare 50 µl di ogni siero-campione nel pozzetto assegnato;
- mixare delicatamente il contenuto dei pozzetti e coprire la piastra con un coperchio apposito per evitare l'evaporazione del contenuto;
- incubare a 37°C x 2 h (lontano da fonti di luce) oppure overnight (12-18 h) alla temperatura di 2-8°C (in genere in refrigerazione a 4°C);
- aspirare tutto il liquido dai pozzetti;
- effettuare 5 lavaggi con 300 µl di Wash Solution (ricostituita). Aspirare il liquido ad ogni fase, e nell'ultima asciugare con carta assorbente;
- dispensare 100 µl di coniugato IBR-gB HRPO in ogni pozzetto;
- incubare a temperatura ambiente (18°-25°C) x 1 h (lontano da fonti di luce);
- aspirare tutto il liquido dai pozzetti;
- effettuare 5 lavaggi con 300 µl di Wash Solution (ricostituita). Aspirare il liquido ad ogni fase, e nell'ultima asciugare con carta assorbente;
- dispensare 100 µl di substrato Solution TMB in ogni pozzetto;
- incubare a temperatura ambiente (18°-25°C) x 10 min (lontano da fonti di luce);
- dispensare 100 µl di Stop Solution in ogni pozzetto per fermare la reazione;
- lettura della piastra allo spettrofotometro (misurare l'assorbanza dei campioni e dei controlli a 450 nm);
- Interpretazione dei risultati: se la percentuale del campione è $\leq 45\%$ l'animale è classificato come IBR negativo; se è $>45\%$ e $<55\%$ è un *sospetto infetto*; se $>55\%$ è IBR positivo.

Protocollo IDEXX IBR gE Ab test:

- portare tutti i reagenti e i sieri-campione alla temperatura di 18°-26°C;
- diluire (1:2) i sieri-campione e i controlli col Sample Diluent;
- dispensare il controllo negativo in 2 pozzetti A1 e A2 (100µl di volume totale);
- dispensare il controllo positivo in 2 pozzetti A3 e A4 (100µl di volume totale);
- dispensare 100 µl di ogni siero-campione nel pozzetto assegnato;
- mixare delicatamente il contenuto dei pozzetti e coprire la piastra con un coperchio apposito per evitare l'evaporazione del contenuto;
- incubare overnight (12-24 h) alla temperatura di 18°-26°C (lontano da fonti di luce);
- aspirare tutto il liquido dai pozzetti;
- effettuare 5 lavaggi con 300 µl di Wash Solution (ricostituita). Aspirare il liquido ad ogni fase, e nell'ultima asciugare con carta assorbente;
- dispensare 100 µl di Conjugate in ogni pozzetto;
- incubare a temperatura ambiente (18°-26°C) x 30 min (lontano da fonti di luce);
- aspirare tutto il liquido dai pozzetti;
- effettuare 5 lavaggi con 300 µl di Wash Solution (ricostituita). Aspirare il liquido ad ogni fase, e nell'ultima asciugare con carta assorbente;
- dispensare 100 µl di substrato Solution TMB in ogni pozzetto;
- incubare a temperatura ambiente (18°-26°C) x 15 min (lontano da fonti di luce);
- dispensare 100 µl di Stop Solution in ogni pozzetto per fermare la reazione;
- lettura della piastra allo spettrofotometro (misurare l'assorbanza dei campioni e dei controlli a 650 nm);
- Interpretazione dei risultati: se il valore del campione è >0.70 l'animale è classificato come negativo; se è >0.60 e <0.70 è un *sospetto infetto*; se ≤ 0.60 è positivo agli anticorpi contro la glicoproteina E (gE) di BoHV-1.

Protocollo IN3 Eradikit BuHV-1 gE:

- portare tutti i reagenti e i sieri-campione a temperatura ambiente (18°-26°C);
- dispensare 190 µl di di tampone di diluizione siero in ogni pozzetto;
- aggiungere 10 µl di siero di controllo negativo nel pozzetto A1;
- aggiungere 10 µl di siero di controllo positivo BuHV-1 nel pozzetto B1;
- aggiungere 10 µl di ogni siero-campione nel pozzetto assegnato (seguire lo schema di seguito):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CNeg	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87
B	CPos	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88
C	S1*	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	S89
D	S2*	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	S90
E	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S91
F	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S92
G	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85	S93
H	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86	S94

- coprire la piastra con un coperchio apposito per evitare l'evaporazione del contenuto;
- incubare la piastra a temperatura ambiente x 60 min;
- aspirare tutto il liquido dai pozzetti;
- effettuare 3 lavaggi con 300 µl di Wash Solution (ricostituita). Aggiungere il tampone di lavaggio e attendere 30 sec. Svuotare la piastra energicamente per capovolgimento; nell'ultima fase, dopo aver allontanato il liquido, tamponare con carta assorbente;
- diluire al momento (per una piastra) 120 µl di coniugato concentrato 100X in 11,88 ml di tampone di diluizione coniugato;
- aggiungere 100 µl di coniugato diluito in ogni pozzetto;
- incubare la piastra a temperatura ambiente x 45 min;
- effettuare 3 lavaggi con 300 µl di Wash Solution (ricostituita). Aggiungere il tampone di lavaggio e attendere 30 sec. Svuotare la piastra energicamente per capovolgimento; nell'ultima fase, dopo aver allontanato il liquido, tamponare con carta assorbente;
- aggiungere 100 µl di substrato in ogni pozzetto;
- incubare la piastra a temperatura ambiente x 15 min;
- bloccare la reazione colorimetrica aggiungendo 100 µl di Stop Solution in ogni pozzetto;
- lettura della piastra allo spettrofotometro (misurare l'assorbanza dei campioni e dei controlli a 450 nm);
- Interpretazione dei risultati: i sieri con reattività $\geq 40\%$ sono considerati positivi, quelli con reattività $\leq 30\%$ negativi, e quelli il cui valore è tra il 30% e il 40% sono *sospetti infetti/dubbi*.

N.B. Le piastre sono sensibilizzate con antigene ricombinante di *Bubaline Herpesvirus 1*, e viene aggiunto l'anticorpo secondario anti-IgG di bufalo marcato con perossidasi.

Protocollo IN3 Eradikit Discrimination BoHV-1/BuHV-1 gE:

- portare tutti i reagenti e i sieri-campione a temperatura ambiente (18°-26°C);
- dispensare 190 µl di di tampone di diluizione siero in ogni pozzetto;
- aggiungere 10 µl di siero di controllo positivo BoHV-1 nel pozzetto A1 e A2;
- aggiungere 10 µl di siero di controllo positivo BuHV-1 nel pozzetto B1 e B2;
- aggiungere 10 µl di ogni siero-campione nel pozzetto assegnato (seguire lo schema seguente):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Bo</i> A	HB1BO	HB2BO	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
<i>Bu</i> B	HB1BU	HB2BU	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
C	S1*	S1*	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
D	S2*	S2*	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42
E	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35	S43	S43
F	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36	S44	S44
G	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37	S45	S45
H	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38	S46	S46
Ag	BoHV1	BuHV1	BoHV1	BuHV1	BoHV1	BuHV1	BoHV1	BuHV1	BoHV1	BuHV1	BoHV1	BuHV1

- coprire la piastra con un coperchio apposito per evitare l'evaporazione del contenuto;
- incubare la piastra a temperatura ambiente x 60 min;
- diluire il tampone di lavaggio 1:2 con acqua pura (precisamente per una piastra, 10 ml di soluzione concentrata e 190 ml di acqua)
- aspirare tutto il liquido dai pozzetti;
- effettuare 3 lavaggi con 300 µl di Wash Solution (ricostituita). Aggiungere il tampone di lavaggio e attendere 30 sec. Svuotare la piastra energicamente per capovolgimento; nell'ultima fase, dopo aver allontanato il liquido, tamponare con carta assorbente;
- diluire al momento (per una piastra) 120 µl di coniugato concentrato 100X in 11,88 ml di tampone di diluizione coniugato;
- aggiungere 100 µl di coniugato diluito in ogni pozzetto;
- incubare la piastra a temperatura ambiente x 45 min;
- effettuare 3 lavaggi con 300 µl di Wash Solution (ricostituita). Aggiungere il tampone di lavaggio e attendere 30 sec. Svuotare la piastra energicamente per capovolgimento; nell'ultima fase, dopo aver allontanato il liquido, tamponare con carta assorbente;
- aggiungere 100 µl di substrato in ogni pozzetto;
- incubare la piastra a temperatura ambiente x 15 min;
- bloccare la reazione colorimetrica aggiungendo 100 µl di Stop Solution in ogni pozzetto;
- lettura della piastra allo spettrofotometro (misurare l'assorbanza dei campioni e dei controlli a 450 nm);

- Interpretazione dei risultati: l'antigene verso cui il siero mostra la maggiore reattività indica l'infezione circolante. Per l'identificazione analitica si procede come segue: a) la reattività del campione è $>0,5$ in almeno un pozzetto; b) l'assorbanza del pozzetto più reattivo è $>40\%$ rispetto alla reattività dello stesso campione nell'altro pozzetto; c) se entrambe le condizioni in a) e b) sono soddisfatte, il pozzetto che mostra la maggiore reattività indica il virus circolante. Altrimenti, la caratterizzazione rimane indeterminata (ad esempio, nel caso di *confezioni*). Il maggior potere discriminante si ottiene con assorbanze comprese tra 0,5 e 2,5. Per la validazione, la densità ottica dei controlli positivi verso l'antigene omologo deve essere $>0,5$ e maggiore del 40% rispetto all'antigene eterologo.

N.B. Le piastre sono sensibilizzate con antigene ricombinante di *Bovine Herpesvirus 1* (file dispari della piastra – in rosso) e *Bubaline Herpesvirus 1* (file pari della piastra – in azzurro), e viene aggiunto l'anticorpo secondario anti-IgG di bufalo marcato con perossidasi.

Sieroneutralizzazione (SN) test e cross-SN

Dopo i test ELISA, sui sieri bufalini raccolti sono state effettuate prove di SN comparativa [Bitsch, 1978] utilizzando i ceppi di referenza *Cooper* BoHV-1 e *Metzler* BuHV-1.

La SN è un metodo diagnostico ampiamente utilizzato e molto sensibile che in questo studio è servito per rilevare la presenza di anticorpi anti-BoHV-1 e anti-BuHV-1.

La neutralizzazione dell'attività infettante dei virus si evidenzia attraverso l'assenza di effetto citopatico (ECP) sul substrato cellulare sensibile impiegato. In pratica, in micropiastre a 96-wells si aggiungono quantità standard di cellule MDBK a quantità standard di virus precedentemente messo a contatto con diluizioni scalari di siero in esame. Si osservano, quindi, le cellule per diversi giorni e si definisce il titolo anticorpale (del siero campionato) in relazione alla più alta diluizione dello stesso siero, capace di neutralizzare l'ECP dell'herpes.

La procedura di SN utilizzata è stata eseguita come descritta nel Manuale OIE 2010.

Il protocollo per la piastra di lavoro ha previsto i seguenti step (Fig. 35):

- inattivare i sieri da testare in bagno termostatico a 56°C per 30 min;
- dispensare 25 µl di terreno E-MEM antibiotato nei pozzetti delle colonne da 4 a 12;
- dispensare 25 µl di siero-campione in doppio (per ogni campione in esame, quindi 50 µl totali) nei pozzetti delle colonne da 1 a 12;
- prelevare 25 µl di siero dalla colonna 4 e diluire in base 2 fino alla colonna 12, spipettando almeno tre volte ed eliminando gli ultimi 25 µl;
- aggiungere 25 µl di virus (100 DITC₅₀/25 µl) in tutti i pozzetti ad eccezione di quello della colonna 1;
- dispensare 25 µl di una sospensione di cellule MDBK (10^4 - 10^5 cellule/ml) in ogni pozzetto della piastra;
- incubare in termostato con il 5% di CO₂ per 72-120 h;
- lettura dei risultati al microscopio ottico invertito per la valutazione dell'effetto citopatico (ECP).

Validare il test controllando: la titolazione virale (che dovrebbe dare un valore di 100 TCID₅₀ con un range accettabile di 30-300 TCID₅₀), il siero di controllo e i pozzetti delle cellule controllo. Il siero di controllo positivo deve fornire un titolo di ± 1 diluizione doppia ($\pm 0,3$ unità log₁₀) dal suo valore target. Il siero positivo debole deve essere positivo. Il siero negativo non deve dare neutralizzazione (equivalente a una diluizione finale di 1:2 nella fase di neutralizzazione). Nei pozzetti di controllo cellulare, i monostrati devono essere intatti.

I risultati del siero test sono espressi come il reciproco della diluizione del siero che ha neutralizzato il virus nel 50% dei pozzetti. Se il 50% dei pozzetti con siero non diluito neutralizza il virus, il titolo (diluizione iniziale) viene letto come 1 (1: 2 usando la convenzione di diluizione finale). Se tutto il non diluito e il 50% dei pozzetti con siero diluito 1:2 neutralizza il virus, il titolo (diluizione iniziale) è 2 (diluizione finale 1:4). Per i risultati qualitativi, qualsiasi neutralizzazione con titolo 1 o superiore (convenzione di diluizione iniziale) è considerata positiva. Se si osserva citotossicità nei pozzetti di controllo, il campione è considerato tossico (nessun risultato) a meno che non si osservi la neutralizzazione del virus senza citotossicità a diluizioni più elevate, quindi, un titolo può essere letto senza ambiguità. Quando la citotossicità di un siero interferisce con l'interpretazione dell'attività neutralizzante del campione, cambiando il mezzo nei pozzetti delle due o più basse diluizioni (16-24 h dopo l'aggiunta di cellule) si possono rimuovere gli effetti citotossici.

In questa ricerca la prova di cross-SN (o SN incrociata o SN comparativa) è stata utilizzata per valutare una possibile capacità discriminante tra virus antigenicamente correlati quali sono il BoHV-1 e il BuHV-1.

N° piastra	RD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1°	○	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
B	"	○	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
C	2°	○	○	○	○	○	○	∅	∅	∅	∅	∅	∅
D	"	○	○	○	○	○	○	∅	∅	∅	∅	∅	∅
E	3°	○	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
F	"	○	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
G	4°	○	○	○	○	○	○	○	○	∅	∅	∅	∅
H	"	○	○	○	○	○	○	○	○	∅	∅	∅	∅
	Ctrl.ss	1:2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	

Fig.35 Schema piastra di lavoro per SN (esempio di lettura piastra).

RD: numero dei sieri-campioni in doppio da saggiare (es. posizioni A e B: stesso siero num. 1°); **Ctrl.ss:** controllo cellule;

figura **○**: indica nessun effetto citopatico (ECP); figura **∅**: indica ECP;

i rapporti da **1:2** a **1:1024** : indicano i titoli anticorpali di ogni siero-campione.

Il titolo **1:2**, per una questione di validità dei risultati, si ripete in quadruplo nelle colonne 2 e 3.

Stress Ossidativo (SO) test

In uno studio preliminare è stata valutata l'associazione tra infezione da alfa herpesvirus 1 e ROMs nelle bufale mediterranee italiane (*Bubalus bubalis*).

Sono stati utilizzati parti di ganglio del trigemino e una serie di sieri, i quali tramite prove sierologiche sono risultati Herpesvirus-1-positivi.

Il valore dello *status ossidante* (o meglio conosciuto come SO) è stato calcolato attraverso il rapporto tra d-ROMs test, che valuta la concentrazione dei ROS (radicali liberi, RL); e l'anti-ROMs test, che valuta, invece, la capacità difensiva della barriera antiossidante. Inoltre per determinare i livelli di ossidanti nel tessuto cerebrale, in esame, è stato usato anche il Lipotiss test.

Tutti i saggi sono stati eseguiti utilizzando il sistema analitico integrato dedicato *FREE Carpe Diem* (Diacron International srl).

Per l'analisi statistica i risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (SD). I livelli di SO sono stati confrontati utilizzando *Analisi della varianza a una via* (ANOVA). Il livello di significatività selezionato è stato $p < 0,05$. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando *SPSS II 11.0 per pacchetto software Windows* (SPSS Japan Inc., Tokyo, Giappone).

Il d-ROMs test (Diacron International srl) è una prova spettrofotometrica che consente di determinare, in un campione biologico (come siero, tessuto, etc.), la concentrazione degli idroperossidi ($\bullet\text{R-OOH}$), generati nelle cellule dall'attacco ossidativo dei ROS su svariati substrati biochimici (glicidi, lipidi, amminoacidi, proteine, nucleotidi, etc.). Attraverso questo test gli idroperossidi del campione dopo aver reagito con un apposito cromogeno sviluppano un derivato colorato (dal rosa al rosso) rilevabile e quantificabile per via fotometrica. In pratica alla base del d-ROMs test vi è il principio della reazione di Fenton, secondo cui un metallo di transizione in forma ionica (es. ferro o rame) catalizza la scissione di un idroperossido ($\bullet\text{R-OOH}$), generando nuove specie radicaliche, l'idroperossile ($\bullet\text{R-OO}$) o l'alcossile ($\bullet\text{R-O}$), a seconda che, rispettivamente, lo ione catalizzante si ossidi (Fe^{2+} , Fe^{3+} o Cu^+ , Cu^{2+}) oppure si riduca (Fe^{3+} , Fe^{2+} o Cu^{2+} , Cu^+). Se ad una soluzione contenente idroperossidi e tracce di un metallo di transizione in forma ionica si aggiunge una sostanza il cui potenziale di ossidazione è tale che i radicali generati dalla decomposizione degli idroperossidi stessi (alcossili e perossili) possano strappare ad essa l'elettrone necessario per raggiungere la propria stabilità, tale sostanza sarà a sua volta radicalizzata, come previsto dalla seconda fase delle reazioni radicaliche a catena (*reazione di trasferimento del sito radicalico*). E' ovvio che se la sostanza in questione ha la proprietà ottica di cambiare colore nel momento in cui viene ossidata ed è sufficientemente stabile in questa forma, sarà possibile, con le opportune tecniche spettrofotometriche, risalirne alla concentrazione, che risulterà direttamente proporzionale a quella delle specie radicaliche generate *in vitro* e, in definitiva, a quella degli idroperossidi inizialmente presenti nel campione analizzato.

Nel d-ROMs test, dunque, gli idroperossidi contenuti in un campione biologico generano radicali idroperossilici ed alcossilici. In pratica, un'aliquota di siero (per es.) viene diluita in una soluzione tampone (acetato) a pH 4.8.

In queste condizioni, il ferro ionico dapprima legato alle sieroproteine, si rende disponibile in forma libera catalizzando la scissione degli idroperossidi, inizialmente presenti nel campione, in radicali idroperossilici ed alcossilici. A questa soluzione viene, quindi, aggiunta una sostanza-cromogeno (N,N-dietil-parafenilendiammina) che ha la proprietà di cambiare colore nel momento in cui viene ossidata [Iorio and Diacron International, 2003]. Questa sostanza ha la proprietà di lasciarsi ossidare dai radicali idroperossilici ed alcossilici, trasformandosi in una forma cationica colorata in rosa, anch'essa radicalica, ma abbastanza stabile da consentirne la determinazione quantitativa per via fotometrica, nelle condizioni di lavoro previste (lunghezza d'onda 505 o 546) [Alberti *et al.*, 2000]. La concentrazione del complesso colorato sarà direttamente correlata con il livello di idroperossidi inizialmente presenti nel campione da analizzare. I risultati del d-ROMs test vengono espressi in unità Carratelli (inventore e brevettatore della prova) o U CARR (dove 1 U CARR equivale a 0.08 mg H₂O₂/dL). L'intensità di colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione dei ROMs fino a 505 U CARR, secondo la legge di Lambert-Beer [Iorio and Diacron International, 2003].

L'anti-ROMs test (Diacron International srl) è una prova spettrofotometrica che misura la capacità che hanno gli antiossidanti (per es. Vitamina A, Vitamina C detta *acido ascorbico*, Vitamina E detta *α-tocoferolo*, β-carotene, glutatione contenente *cisteina*, melatonina, etc.) del campione biologico ad opporsi alla produzione dei radicali liberi (RL) in termini di *capacità ferro-riducente*; in pratica riducono il *ferro-ferrico* a *ferro-ferroso*, che reagendo con alpha-alpha-dipiridile dà luogo ad un colore viola-rossastro. L'intensità del colore aumenta proporzionalmente alla quantità di ferro ridotto dagli antiossidanti presenti nel campione, ed è espressa in microEquivalenti/L (μEq/L) [Osservatorio Internazionale dello Stress Ossidativo, 2013].

Lipotiss test (o detto *LIPO tissue test*) (MC040, Diacron International srl) è una prova spettrofotometrica che determina gli ossidanti nei tessuti; si calcola, quindi, il livello del lipoperossido con un metodo basato sulla capacità del perossido di ossidare Fe²⁺ in Fe³⁺; il Fe³⁺ si lega al tiocianato sviluppando un complesso colorato, misurato fotometricamente. L'incremento in assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione dei lipoperossidi presenti nel campione, e viene espressa come nanoEquivalenti di idroperossidi/g tessuto [Takemori *et al.*, 2013].

I campioni (200 mg) sono stati omogeneizzati in 0,5 ml di acqua distillata, centrifugati (5 min a 15000 g) e lavati due volte con acqua distillata. Dopo aver rimosso il surnatante, sono stati aggiunti 0,5 ml della miscela di indicatori (R1), miscelati (5 min) e centrifugati (5 min a 1400 g). Successivamente sono stati aggiunti 0,25 ml di surnatante e 10 μl di Fe²⁺ (reagente R2, diluito 1:4 con R1). Dopo incubazione (5 min a 37°C), la densità ottica è stata letta a λ = 505 nm [Terraneo *et al.*, 2017].

RISULTATI

DIAGNOSI DIRETTA: isolamento virale, PCR, Real-Time PCR.

Le prove di isolamento virale effettuate inoculando gli omogenati di ganglio del trigemino ed i tamponi nasali e vaginali su monostrati di MDKB a confluenza, e osservati per almeno cinque giorni consecutivi al microscopio ottico invertito, non hanno dato nessun effetto citopatico (ECP). Per un'ulteriore conferma le fiaschette sono state sottoposte a fasi alternate di congelamento e scongelamento, e il criolisato così ottenuto è stato usato per infettare nuovi monostrati cellulari. Questo procedimento è stato eseguito per tre volte. L'osservazione dei monostrati infettati ha continuato a dare esito negativo, nonostante le prove sierologiche effettuate siano risultate positive a Herpesvirus-1. Come controllo negativo una fiaschetta di MDBK non infettata è stata sempre aggiunta in ogni esperimento per validare la prova.

Le prove di PCR, utilizzando coppie di primers specifiche per il BoHV-1 codificanti per la glicoproteina B (gB) e la glicoproteina E (gE) usate nello studio di Thiry *e coll.* (2007), e le coppie di primers specifiche per il BuHV-1 codificanti la gE usate nello studio di Petrini *e coll.* (2012), hanno dato esito negativo.

Con la prova Real-Time PCR, reputata molto più sensibile della PCR classica, solo 2 su 50 dei gangli trigeminali e solo 4 dei tamponi raccolti sono risultati positivi a IBR.

L'intensità della positività è stata comunque molto debole.

DIAGNOSI INDIRETTA: ELISA test, sieroneutralizzazione (SN) test e cross-SN.

I risultati dei 421 sieri bufalini esaminati (Tabella 1) ottenuti tramite l'utilizzo dei kit della casa farmaceutica IDEXX (usati in combinazione) sono stati i seguenti: 57 soggetti (13,54%) sono risultati negativi IBR, 269 soggetti (63,90%) sono risultati positivi al BoHV-1 (profilo reattivo gB+/gE+), 95 (22,56%) al BuHV-1 (profilo reattivo gB+/gE-). Col kit Eradikit Discrimination BoHV-1/BuHV-1 della ditta IN3: 87 soggetti (20,66%) sono risultati positivi a BoHV-1, 208 (49,41%) positivi al BuHV-1, 84 (19,95%) coinfezioni, 42 (9,98%) *non-caratterizzati*. Col kit ELISA Eradikit BuHV-1 IN3: 52 soggetti (12,35%) sono risultati negativi, e 369 (87,65%) positivi a BuHV-1.

In questo lavoro su 194 dei 421 sieri bufalini raccolti, dal momento vi erano a disposizione ancora quantità sufficienti di ogni campione, è stato eseguito, in particolare, uno studio preliminare di confronto sui 4 diversi kit ELISA e prove di sieroneutralizzazione (SN) comparativa per la ricerca di anticorpi anti-BoHV-1 e anti-BuHV-1. La Tabella 2 illustra gli esiti dei 194 sieri bufalini esaminati. In dettaglio, i risultati ottenuti tramite l'utilizzo dei kit della ditta IDEXX (usati in combinazione) sono stati i seguenti: 20 animali (10,31%) sono risultati negativi IBR, 147 animali (75,77%) sono risultati positivi al BoHV-1 (profilo reattivo gB+/gE+), 27 (13,92%) al BuHV-1 (profilo reattivo gB+/gE-). In merito al test Eradikit Discrimination BoHV-1/BuHV-1 della ditta IN3: 25 animali (12,9%) sono risultati positivi a BoHV-1, 134 (69,07%) positivi al BuHV-1, 22 (11,34%) coinfezioni, 13 (6,70%) *non caratterizzati*. I risultati ottenuti mediante l'utilizzo del kit ELISA indiretto Eradikit BuHV-1 IN3 sono stati i seguenti: 20 (10,31%) negativi, 174 (89,69%) positivi a BuHV-1. Infine la prova di SN ha fornito i seguenti esiti: 179 campioni (92,27%) risultarono positivi a *herpesvirus 1*, e 15 (7,73%) negativi. È stato osservato, inoltre, che la prova di cross-SN ha mostrato una capacità discriminante verso il ceppo omologo di almeno 2 diluizioni in 125 animali, dei quali 50 (40%) risultavano infetti a BoHV-1 e 75 (60%) infetti a BuHV-1.

Nella Tabella 3 si illustra il grado di accordo tra i test diagnostici, calcolato tramite il test *K di Cohen*. L'analisi statistica indica un accordo buono, valore di $k = 0.781$, quando sono stati confrontati i risultati del kit ELISA indiretto Eradikit BuHV-1 IN3 (G) con quelli della prova cross-SN che utilizzava il ceppo BuHV-1 (E). Un accordo modesto (K tra 0.254 e 0.403) è stato riscontrato dal confronto dei seguenti kit: IN3 Eradikit Discrimination BuHV-1 (F) con il test SN con ceppo BuHV-1 (E), IN3 Eradikit Discrimination BuHV-1 (F) con il kit IN3 Eradikit BuHV-1 (G) e il kit IDEXX (profilo reattivo gB+/gE+) (A) con la prova SN con ceppo BoHV-1 (B).

ELISA		
IDEXX gB-gE	Eradikit BuHV-1 IN3 diagnostic	Eradikit Discrimination BoHV-1/BuHV-1 IN3 diagnostic
NEG. → 57 (13,54%)	NEG. → 52 (12,35%)	n.c. → 42 (9,98%)
POS. Bo → 269 (63,90%)		POS. Bo → 87 (20,66%)
POS. Bu → 95 (22,56%)	POS. Bu → 369 (87,65%)	POS. Bu → 208 (49,41%)
		POS. indet.(coinfezione) → 84 (19,95%)

Tab.1 Confronto 4 kit ELISA.

421 sieri di bufalo saggiati.

POS.: positivo IBR; **POS.Bo:** positivo al virus BoHV-1; **POS.Bu:** positivo al virus BuHV-1;

POS.indet.(coinfezione): indeterminato-positivo a coinfezione;

NEG.: negativo IBR; **n.c.:** risultato *non caratterizzato*, ma da considerarsi negativo.

SN		
NEG. → 15 (7,73%)		
POS. → 179 (92,27%)	discriminante → 125 (69,83%)	> Bu → 75 (60,00%)
	coinfezione → 54 (30,17%)	> Bo → 50 (40,00%)
ELISA		
IDEXX gB-gE	Eradikit BuHV-1 IN3 diagnostic	Eradikit Discrimination BoHV-1/BuHV-1 IN3 diagnostic
NEG. → 20 (10,31%)	NEG. → 20 (10,31%)	n.c. → 13 (6,70%)
POS. Bo → 147 (75,77%)		POS. Bo → 25 (12,89%)
POS. Bu → 27 (13,92%)	POS. Bu → 174 (89,69%)	POS. Bu → 134 (69,07%)
		POS. indet.(coinfezione) → 22 (11,34%)

Tab.2 Confronto dei 4 kit diagnostici ELISA e della SN comparativa

per la ricerca di anticorpi anti-BoHV-1 e anti-BuHV-1.

194 sieri di bufalo saggiati.

POS.: positivo IBR; **POS.Bo:** positivo al virus BoHV-1; **POS.Bu:** positivo al virus BuHV-1;

POS.indet.(coinfezione): indeterminato-positivo a coinfezione;

NEG.: negativo IBR; **n.c.:** risultato *non caratterizzato*, ma da considerarsi negativo.

Confronto test	N°campioni	K valore
A vs B	194	0,403
A vs C	194	0,090
D vs E	194	0,027
D vs F	194	0,038
D vs G	194	0,023
C vs B	194	0,026
F vs E	194	0,254
F vs G	194	0,261
G vs E	194	0,781

Tab.3 Confronto dei 4 test diagnostici ELISA e delle SN

contro gli anticorpi anti-BoHV-1 e anti-BuHV-1 mediante il calcolo del **K di Cohen**.

194 sieri di bufalo saggiati.

A=IDEXX (profilo reattivo gB+/gE+); B=SN(Bo)=sieroneutralizzazione utilizzando il virus BoHV-1; C=test IN3 Discriminante per il virus BoHV-1; D=IDEXX (profilo reattivo gB+/gE-); E=SN(Bu)=sieroneutralizzazione utilizzando il virus BuHV-1; F=test IN3 Discriminante per il virus BuHV-1; G=test IN3 specifico per il virus BuHV-1.

Potere dell'accordo: k < 0.2 = insufficiente; k fra 0.2 e 0.4 = modesto; k fra 0.41 e 0.61 = moderato;

k fra 0.61 e 0.80 = buono; k > 0.80 = eccellente.

ALTRA DIAGNOSI: Stress ossidativo (SO) test.

Sieri: in questo lavoro preliminare sono stati presi in esame 19 bufali di età > 5 anni, perché considerati a maggior rischio di infezione.

La presenza di anticorpi anti-BuHV-1 e anti-BoHV-1 è stata rilevata nei sieri attraverso saggio immunoenzimatico ELISA. Precisamente sono stati utilizzati, in uso combinato, i kit IBR-gB e IBR-gE blocking ELISA (IDEXX). Lo screening dei campioni ci ha permesso di selezionare tre gruppi di animali: il *gruppo 1* (n = 5) era costituito da bufali sieropositivi a BuHV-1; il *gruppo 2* (n = 8) era costituito da bufali sieropositivi a BoHV-1; e il *gruppo 3* (n = 6) era costituito da bufali sieronegativi sia a BuHV-1 che a BoHV-1 (o IBR-negativi).

Lo *status ossidativo* (SO) è stato valutato utilizzando il test dei composti derivati dai metaboliti reattivi dell'ossigeno (d-ROMs test; Diacron) e il test dell'attività antiossidante (anti-ROMs test; Diacron) mediante procedure spettrofotometriche.

I livelli dell'indice di stress ossidativo (Osi, *Oxidative Stress index*) sono stati calcolati utilizzando la seguente formula: **Osi = (d-ROMs/anti-ROMs)×100** [Abuelo *et al.*, 2013].

Come mostrato nella Tabella 4, i risultati indicano un aumento significativo di d-ROMs in animali sieropositivi a BuHV-1 (*gruppo 1*) (p <0,05) e in quelli sieropositivi a BoHV-1 (*gruppo 2*) (p <0,05); diverso in animali sieronegativi (*gruppo 3*) (p <0,01).

Un aumento, sebbene non significativo, è stato evidenziato negli animali sieropositivi di BoHV-1 (*gruppo 2*) rispetto agli animali sieronegativi di controllo (*gruppo 3*).

Non è stata rilevata alcuna differenza significativa quando i valori dei *gruppi 1 e 2* sono stati confrontati con il *gruppo-controllo 3* (Tabella 4).

L'Osi era significativamente più alto (p <0,05) nel *gruppo 1* rispetto al *gruppo-controllo 3*, mentre nessuna differenza significativa è stata rilevata tra il *gruppo 2* e il *gruppo-controllo 3* (Tabella 4).

Gruppo animali	d-ROMs (U CARR)	anti-ROMs (μEq/L)	Osi (unità arbitraria)
	media (SD)	media (SD)	media (SD)
1	86.25 (±13.45)	318.00 (±71.86)	29.78 (±9.20)
2	64.63 (±12.36)	287.50 (±70.62)	22.88 (±3.43)
3	55.33 (±10.73)	300.83 (±80.69)	19.37 (±6.20)

Tab.4 Valori medi di SO nei gruppi animali studiati.

Gruppo animali: *gruppo 1*: animali sieropositivi a BuHV-1; *gruppo 2*: animali sieropositivi a BoHV-1;

gruppo 3: animali-controllo sieronegativi IBR;

U CARR = 0.08 mg perossido di idrogeno/dL;

Osi = (Oxidative Stress index) calcolato come segue: (d-ROMs/anti-ROMs)×100;

media (SD) = media ± deviazione standard.

Gangli trigeminali (TGs): in questo studio iniziale sono stati esaminati 15 tessuti di TG provenienti da 15 soggetti bufalini scelti nella categoria di età > 5 anni, perché considerati a maggior rischio di infezione.

La presenza di anticorpi contro BuHV-1 e BoHV-1 è stata studiata in 15 sieri mediante i kit IBR-gB e IBR-gE blocking ELISA (IDEXX). I risultati dei test sierologici hanno mostrato che il 40% dei campioni testati era positivo al BoHV-1, mentre il 33,3% risultava positivo al BuHV-1. Inoltre il 26,7% era negativo a BoHV-1 e BuHV-1 (profilo reattivo gB-/gE-).

Lo SO è stato valutato mediante i test della ditta Diacron, d-ROMs e anti-ROMs. Sono stati utilizzati, inoltre, anche TGs di bufali sieropositivi e sieronegativi per misurare la concentrazione di perossidi lipidici utilizzando il Lipotiss test. E' stata rilevata in TGs di animali sieropositivi a BuHV-1 una significativa riduzione dei valori di d-ROMs ($p < 0,001$) così come di anti-ROMs ($p < 0,001$) rispetto a quelli in TGs di animali sieronegativi. Mentre i TGs di animali sieropositivi a BoHV-1 avevano valori di d-ROMs significativamente più alti ($p < 0,001$) e valori inferiori di anti-ROMs ($p < 0,001$) rispetto a quelli dei TGs di animali sieronegativi. Inoltre, i risultati del Lipotiss test hanno mostrato che i campioni di entrambi gli animali sieropositivi a BuHV-1 e a BoHV-1 erano significativamente più bassi ($p < 0,001$; $p < 0,01$) rispetto a quelli degli animali sieronegativi.

DISCUSSIONE

Per la diagnosi indiretta, sebbene lo studio preliminare abbia riguardato solo 16 allevamenti bufalini della regione Campania (distretto Caserta e province) il numero di animali testati è stato sufficiente per poter concludere che il test Eradikit BuHV-1 IN3 è il più adatto da utilizzare se desideriamo effettuare una diagnosi di infezione da BuHV-1 in bufali tramite un test ELISA specifico, veloce e di facile esecuzione. Sulla base dei nostri risultati i campioni individuati *non-caratterizzati*, con il kit Eradikit Discrimination BoHV-1/BuHV-1 IN3 e risultati come negativi alla prova cross-SN con entrambi i ceppi BoHV-1 e BuHV-1, potrebbero essere categorizzati come *negativi*. Infatti si tratta di campioni con valori di densità ottica (OD) non validi, ovvero con valori al di sotto della soglia minima richiesta per la caratterizzazione del ceppo virale in esame.

Gli ELISA blocking IDEXX e l'Eradikit Discrimination BoHV-1/BuHV-1 IN3 sebbene siano stati validati dalle ditte produttrici sia per i bovini che per i bufali, quelli dell'IDEXX sembrano comunque restare più performanti per la specie bovina. Attualmente, però, per la determinazione della sola positività o negatività a IBR in bufali e bovini è utilizzata l'ELISA blocking IBR-gB IDEXX, visto che saggia la glicoproteina B comune a tutti gli Herpes, e visto che si tratta di un test meno costoso.

La prova di cross-SN ha mostrato una capacità discriminante verso il ceppo omologo di almeno 2 diluizioni nel 65% dei bufali testati. Questo dato non ha confermato quanto dichiarato in studi precedenti, nei quali gli autori hanno riferito che nel bufalo la prova di virus neutralizzazione (SN) non presentava alcun potere discriminante [Thiry *et al.*, 2008; Bertolotti *et al.*, 2013; Suavet *et al.*, 2016], dato che non risultava essere in grado di differenziare, in caso di positività, anticorpi evocati dal ceppo BuHV-1 piuttosto che dal ceppo BoHV-1 [De Carlo and Martucciello, 2014].

Se si conta che la cross-SN nei confronti di BoHV-1 e CpHV-1, quindi di virus provenienti da specie diverse tra loro, abbia dato una discriminazione tra 4 e 5 diluizioni [Thiry *et al.*, 2008; Bertolotti *et al.*, 2013; Suavet *et al.*, 2016], in questa ricerca aver ottenuto una capacità discriminante di 2, tra ceppi appartenenti a due specie zootecniche molto simili tra loro, è un buon risultato. La SN comparativa resta una prova sierologica sensibile, ma pur sempre più laboriosa e più costosa se paragonata ai saggi ELISA attualmente disponibili in commercio.

Le prove diagnostiche ELISA e SN sono state utilizzate in questo lavoro giacché capaci di rilevare la presenza di anticorpi contro BoHV-1 e BuHV-1 nella specie bufalina (ovvero per accertarsi se c'è stata l'esposizione a HV-1), non solo da animali con una sintomatologia clinica evidente (come scolo mucoso nasale, vaginale, oculare, etc.), ma anche in soggetti che non presentano sintomi e che sono stati catalogati come portatori *silenti* della malattia IBR/IPV.

Invece le prove di isolamento virale, di PCR e meno di Real-Time PCR non sono state in grado di dare una positività in animali sierologicamente classificati come herpes-1-infetti.

Poiché la latenza dei virus rappresenta un *sequel* normale dell'infezione da Herpesvirus 1 (HV-1), l'identificazione di animali sierologicamente positivi fornisce un indicatore utile e affidabile dello stato di infezione, e dà un quadro di quella che può essere l'epidemiologia in un determinato distretto territoriale. Qualunque soggetto con anticorpi del virus è considerato un *portatore/serbatoio*, nonché un potenziale espellente intermittente del patogeno nell'ambiente circostante su bufali sierologicamente sani.

Le uniche eccezioni sono i vitelli che hanno acquisito anticorpi colostrali passivi dalla loro madre, e ruminanti non infetti vaccinati con vaccini inattivati. Esiste anche il rischio che i vitelli infetti, sotto copertura di immunità materna, possano diventare sierologicamente negativi durante il trasporto di un'infezione latente riattivabile [Lemaire *et al.*, 2000].

Grazie alla prova ELISA, gli animali sani vaccinati con vaccini marker gE-deleti possono essere discriminati dagli animali infetti da virus di campo mediante una reazione sierologica negativa per gE. Altra cosa importante da sottolineare è che solo 14 su 421 dei bufali testati presentasse una leggera sintomatologia (scoli mucosi), e ciò lo si può attribuire al fatto che *Bubalus bubalis*, secondo letteratura, è un animale molto resistente alle malattie (a differenza del bovino) e ciò rende ancora più importante avere la possibilità di utilizzare delle prove diagnostiche efficaci per rilevare la presenza di infezione dovuta ai patogeni in questione.

Per la diagnosi diretta, invece, i nostri risultati ci inducono a pensare che la riattivazione del virus *in vitro* (dai TGs e dai tamponi) non sia stata possibile utilizzando protocolli standard, e che, quindi, siano necessarie delle modifiche procedurali; storia valida anche per la PCR e la Real-Time PCR.

Un'altra possibilità da prendere in considerazione è che la vitalità del patogeno presente nel tessuto nervoso, dopo la morte del soggetto, sia funzione del tempo, e quindi bisogna ridurre i tempi di utilizzo dei campioni per allestire la procedura di isolamento virale. Tuttavia è da tener presente che la presenza di DNA virale in assenza di infettività adempie alla richiesta biologica di definire un'infezione latente.

Per quanto riguarda lo *status ossidativo* (SO) i nostri risultati preliminari suggeriscono che il pattern di ossidanti e barriera antiossidante è alterato nei TGs bufalini latente-infetti rispetto a quelli controllo non infettati; inoltre, la presenza di BuHV-1 sembra indurre un peggioramento dei livelli di ROMs. Nei sieri, invece, gli herpes BuHV-1 e BoHV-1 hanno indotto un significativo aumento dello stato di SO, che sembrerebbe confermare quanto già noto nel bovino [Durgut *et al.*, 2013]. Tuttavia, ulteriori ricerche sull'equilibrio ossidativo e antiossidante, sia nei TGs che nei sieri, necessitano per capire meglio la fisiopatologia delle infezioni indotte dai suddetti herpes in *Bubalus bubalis*.

In conclusione, in base ai risultati ottenuti, possiamo ritenere che questo lavoro sia servito a fare un passo avanti nella valutazione della reale efficienza, sensibilità, specificità, potere discriminante delle varie tecniche diagnostiche attualmente disponibili in commercio sia per identificare i soggetti IBR-negativi in cui vi è assenza della patologia (ciò per scopi di commercio internazionale e/o riproduttivo); sia per discriminare, in caso di positività, i ceppi di HV-1 (BoHV-1 e BuHV-1)

che circolano ed avere così un quadro sempre più chiaro di quelle che sono l'epidemiologia e la fisiopatologia di questi herpes nella specie bufalina; sia per la scelta di prove di laboratorio più performanti da utilizzare in piani futuri di risanamento, eradicazione, sorveglianza per *Bubalus bubalis*; e sia per scopi di ricerca, per esempio la valutazione della risposta anticorpale dopo vaccinazione, *challenge infection*, etc.

BIBLIOGRAFIA

1. Abuelo A.,Hernandez J.,Benedito J.L.,Castillo C.(2013). Oxidative stress index (OSi) as a new tool to assess redox status in dairy cattle during the transition period. *J.Animal*; 7:1374-1378.
2. Alberti A.,Benaglia M.,Macciantelli D.(2000). Mechanistic studies of radical-based processes. Use and misuse of EPR spectroscopy. *J.Org.Lett.*;2:1553-1555.
3. Amoroso M.G.,Corrado F.,De Carlo E.,Lucibelli M.G.,Martucciello A.,Guarino A.,Galiero G.(2013). Bubaline herpesvirus 1 associated with abortion in a Mediterranean water buffalo. *Res. Vet. Sci.*;94, 813–816.
4. Babiuk L.A.,Potter A.A.(1994). Veterinary vaccines. *Biotechnol Adv.*;12(3):489-523.
5. Banca Dati Nazionale (BDN) dell'anagrafe zootecnica istituita dal Ministero della Salute presso il CSN dell'IZS Abruzzo e Molise (fonti IZSM, 2017).
6. Bertolotti L.,Muratore E.,Nogarol C.,Caruso C.,Lucchese L.,Profiti M.,Anfossi L.,Masoero L.,Nardelli S.,Rosati S.(2015).Development and validation of an indirect ELISA as a confirmatory test for surveillance of infectious bovine rhinotracheitis in vaccinated herds.*BMC Veterinary Research*;11:300.
7. Bertolotti L.,Rosamilia A.,Profiti M.,Brocchi E.,Masoero L.,Franceschi V.,Tempesta M.,Donofrio G.,Rosati S.(2013). Characterization of caprine herpesvirus 1 (CpHV-1) glycoprotein E and glycoprotein I ectodomains expressed in mammalian cells. *J.Veterinary Microbiology*;164:222-228.
8. Bitsch V. (1978). The P37/24 modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus serum neutralization test. *Acta.Vet.Scand.*;19:497-505.
9. Bortolami R.,Callegari E.(2000). Neurologia ed estesiologia degli animali domestici. Cap. 8: 159-165.
10. Cabasso V.J.,Brown R.G.,Cox H.R.(1957). Infectious bovine rhinotracheitis (IBR). I. Propagation of virus in cancer cells of human origin (HeLa). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*;95: 471-476.
11. Campos M.,Ohmann H.B.,Hutchings D.,Rapin N.,Babiuk L.A.,Lawman M.J.(1989). Role of interferon-gamma in inducing cytotoxicity of peripheral blood mononuclear leukocytes to bovine herpesvirus type 1 (BHV-1)-infected cells. *Cell. Immunol.*;120:259–269.
12. Campos M.,Rossi C.R.,(1986). Cytotoxicity of bovine lymphocytes after treatment with lymphokines. *Am. J. Vet. Res.*;47:1524–1528.
13. Cardoso T.C.,Ferrari H.F.,Garcia A.F.,Bregano L.C.,Andrade A.L.,Nogueira A.H.C.(2010). Immunohistochemical approach to the pathogenesis of clinical cases of bovine herpesvirus type 5 infections. *Diagn.Pathol*;5:1–8.
14. Christian R.T.,Ludovici P.P.,Jeter W.S.(1971). Cell-to-cell transmission of herpes simplex virus in primary human amnion cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*;Vol.138(3):1109-1115.
15. Davies D.H.,Carmichael L.E.(1973). Role of cell-mediated immunity in the recovery of cattle from primary and recurrent infections with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Infect.Immun.*;8(4):510-8.
16. Davison A.J.(2002). Evolution of the herpesviruses. *Vet.Microbiol.*;86:69–88.
17. De Carlo E.,Martucciello A.(2014). Herpesvirus. La diagnosi nella specie bufalina: stato dell'arte. *Rivista ANASB La Bufala Mediterranea Italiana*, anno IX, n.3 e 4:19-21.
18. De Carlo E.,Re G.N.,Letteriello R.,Del Vecchio V.,Giordanelli M.P.,Magnino S.,Fabbi M., Bazzocchi C.,Bandi C.,Galiero G.(2004). Molecular characterisation of a field strain of bubaline herpesvirus isolated from buffaloes (*Bubalus bubalis*) after pharmacological reactivation. *Vet.Rec.*;Vol.154 (no6):171-174.
19. De Gee L.W.,Wagter L.H.A.,Hage J.J.(1996). The use of a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Microbiology*;53:163-168.
20. De Regge N.,Nauwynck H.J.,Geenen K.,Krummenacher C.,Cohen G.H.,Eisenberg R.J., Mettenleiter T.C.,Favoreel H.W.(2006). Alpha-herpesvirus glycoprotein D interaction with sensory neurons triggers formation of varicosities that serve as virus exit sites. *J.Cell.Biol.*;17;174(2):267-75.
21. Denis M.,Splitter G.,Pastoret P.P.,Babiuk L.A.(1994). Infectious bovine rhinotracheitis (bovine herpesvirus 1): helper T cells, cytotoxic T cells and NK cells. CRC Press, Boca Raton; p.:157-172.
22. Durgut R.,Ataseven V.S.,Sağkan-Öztürk A.,Öztürk O.H.(2013). Evaluation of total oxidative stress and total antioxidant status in cows with natural bovine herpesvirus-1 infection. *J.ANIM.SCI.*;91:3408-3412.
23. Edwards S.,Newman R.H.,White H.(1991). The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relationship to viral genotype. *Br.Vet.J.*;147:216–231.
24. Edwards S.,White H.,Nixon P.(1990). A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the UK. *Vet. Microbiol.*;22:213–223.
25. Engels M.,Steck F.,Wyler R.(1981). Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Arch.Virol.*;67:169–174.
26. FAO fonti (www.fao.org).
27. Fusco G.,Amoroso M.G.,Gesualdi Montesano N.,Viscardi M.(2015). Development of a pyrosequencing assay for the typing of alphaherpesviruses. *MethodsX*;2:47-52.

28. Fusco G., Amoroso M.G., Aprea G., Veneziano V., Guarino A., Galiero G. (2015). First report of natural BoHV-1 infection in water buffalo. *Veterinary Record*;177(6):152-153.
29. Garanzini A. (1999). Infezione da virus IBR-IPV. *Rivista MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA*;N.21:5-7.
30. Griffin T.P., Howells W.V., Crandell R.A., Maurer F.D. (1958). Stability of the virus of infectious bovine rhinotracheitis. *Am.J.Vet.Res.*;19:990-992.
31. Homan E.J., Easterday B.C. (1980). Isolation of bovine herpesvirus-1 from trigeminal ganglia of clinically normal cattle. *Am.J.Vet.Res.*;41(8):1212-3.
32. IDEXX ricerche (2001) (http://www.idexx.it/pdf/it_it/livestock-poultry/ibr-ge-ab-test-sheet.pdf).
33. Iorio E.L., Diacron International (2003). d-ROMs Test e Stress Ossidativo (<http://www.d-roms.com/documents/d-ROMs%20Rev1.pdf>).
34. Lemaire M., Weynants V., Godfroid J., Schynts F., Meyer G., Letesson J.J., Thiry E. (2000). Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J.Clin.Microbiol.*;3(5):1885-1894.
35. Lykkesfeldt J., Svendsen O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *Vet.J.*;173:502-511.
36. Madin S.H., York C.J., McKercher D.G. (1956). Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. *Science*;124:721-722.
37. Marullo A., Ciaramella R., Nocera F.P., Fiorito F., Montagnaro S., Pagnini U., De Martino L., Prospero S., Iovane G. (2015). Studio preliminare sulla prevalenza di herpesvirus 1, in *Bubalus bubalis*, nella regione Campania. *J.Italian Association for Buiatrics*:1-5.
38. Mathew S.S., Bryant P.W., Burch A.D. (2010). Accumulation of oxidized proteins in Herpesvirus infected cells. *Biol.Med.*;49:383-391.
39. Mechor G.D., Rousseaux C.G., Radostits O.M., Babiuk L.A., Petrie L. (1987). Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. *Can.J.Vet.Res.*;51:452-459.
40. Metzler A.E., Matile H., Gassmann U., Engels M., Wyler R. (1985). European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch.Virol.*;85:57-69.
41. Miller J.M., Whetstone C.A., Van der Maaten M.J. (1991). Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am.J.Vet.Res.*;52:458-461.
42. Miller J.M., Van der Maaten M.J. (1984). Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am.J.Vet.Res.*;45:790-794.
43. Montagnaro S., Longo M., Mallardo K., Pisanelli G., De Martino L., Fusco G., Baldi L., Pagnini U., Iovane G. (2008). Evaluation of a fluorescence polarization assay for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Vet.Immunol.Immunopathol.*;125(1-2):135-42.
44. Muykens B., Thiry J., Kirten P., Schynts F., Thiry E. (2007). Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet.Res.*;38:181-209.
45. Nogarol C., Bertolotti L., De Carlo E., Masoero L., Caruso C., Profiti M., Martucciello A., Galiero G., Cordioli P., Lelli D., Nardelli S., Ingravalle F., Rosati S. (2014). Expression and antigenic characterization of bubaline herpesvirus 1 (BuHV1) glycoprotein E and its potential application in the epidemiology and control of alphaherpesvirus infections in Mediterranean water buffalo. *J.Virol. Methods*;207:16-21.
46. OIE Terrestrial Manual (2010 e 2017) (<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>).
47. Osservatorio Internazionale dello Stress Ossidativo (2013) (file:///C:/Users/Utente/Desktop/2013%20REPORT%20STRESS%20OSSIDATIVO_GARGANO.pdf).
48. Pastoret P.P., Thiry E., Thomas R. (1986). Logical description of Bovine herpesvirus type 1 latent infection. *J.Gen.Virol.*;67:885-897.
49. Pastoret P.P., Thiry E., Brochier B., Derboven G. (1982). Bovine herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. *Ann.Rech.Vét.*;13:221-235.
50. Patel J.R., Didlick S. (2008). Epidemiology, disease and control of infections in ruminants by herpesviruses – An overview. *J.South African Veterinary Association*;79(1):8-14. (En.). JAS Biologicals Limited, The Centre for Veterinary Science, Madingley Road, Cambridge, CB3 0ES, UK.
51. Pelagalli G.V., Botte V. (1989). *Anatomia Veterinaria sistematica e comparata*. Edi-Ermes.
52. Perez S., Inman M., Doster A., Jones C. (2005). Latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 promotes virus growth and reactivation from latency in tonsils of infected calves. *J.Clin. Microbiol.*;43:393-401.
53. Peshev R., Christova L. (2000). Study of Bovine herpes virus 1 spreading among buffalo herds in Bulgaria. *Acta.Virol.*;44:229-230.

54. Petrini S., Amoroso M.G., Perugini G., Gianfelici P., Corrado F., Bazzucchi M., Paniccià M., Casciari C., Fortunati M., Giammarioli M., Fisichella S., De Mia G.M., Galiero G., Cenci T. (2012). Rilievo del Bubaline herpesvirus 1 (BuHV-1) in un allevamento di bufali nel centro Italia. *Large Animals Review*;18:113-116.
55. Pinto C., Cirone F., Greco G., Pagnini U., Iovane G. (2000). Re-activation of BHV-4 natural infection in Mediterranean Buffalo (*Bubalus bubalus*). *Proceedings of the 5th International Congress of the European Society of Veterinary Virology Brescia Italy 23-27 August*.
56. Pinto O., Pagnini U., De Martino L., Giugno G.R., Iovane G. (2000). Sulla diffusione di BHV-4 in allevamenti bufalini. *Nota I: indagine siero epidemiologica 'Bubalus bubalis' marzo*:57-60.
57. Proto V. (1993). L'alimentazione della bufala.
58. Purpari G., Alimena G., Di Marco P., Cascone G., Tumino G., Guercio A. (2005). Valutazione della prevalenza di IBR e BVD nella regione Sicilia: modello sperimentale. *J.Ita.Assoc.Buiatr., Congresso S.I.B.*:vol.37:111-115.
59. Rock D., Lokensgard J., Lewis T., Kutish G. (1992). Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. *J. Virol.*;66:2484-2490.
60. Roizman B., Pellett P.E. (2001). The family Herpes- viridae: A brief introduction, in: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*, 4th ed., Lippincott Williams and Wilkins publishers, Philadelphia;pp.:2381–2398.
61. Ros C., Belák S. (2002). Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Virus Gene*;24:99–105.
62. Schwarz A.J., York C.J., Zirbel L.W., Estela L.A. (1957). Modification of infectious bovine rhinotracheitis virus in tissue culture and development of a vaccine. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*; 96(2):453-8.
63. Scicluna M.T., Caprioli A., Saralli G., Manna G., Barone A., Cersini A., Cardeti G., Condoleo R.U., Autorino G.L. (2010). Should the domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) be considered in the epidemiology of Bovine Herpesvirus 1 infection?. *Vet.Microb.*;143:81-88.
64. Scicluna M.T., Saralli G., Bruni G., Sala M., Cocumelli C., Caciolo D., Condoleo R.U., Autorino G.L. (2007). Epidemiological situation of Herpesvirus infections in buffalo herds: Bubaline Herpesvirus 1 or Bovine Herpesvirus 1?. *Ital.J.Anim.Sci.*;6:845-849.
65. Sheffy B.E., Davies D.H. (1972). Reactivation of a bovine herpesvirus after corticosteroid treatment. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*;Vol.140(3):974-976.
66. Smith G.A., Young P.L., Reed K.C. (1995). Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots. *Arch.Virol.*;140:599–603.
67. Smith V.W., Coakley W., Maker D. (1980). Transmission of a genital isolate of bovine herpesvirus 1 to calves by the respiratory route. *Aust.Vet.J.*;56:302–304.
68. Smits C.B., Van Maanen C., Glas R.D., De Gee A.L.W., Dijkstrab T., Van Oirschot J.T., Rijsewijk F.A.M. (2000). Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. *J.Virological Methods*;85:65-73.
69. Spilki F.R., Esteves P.A., de Lima M., Franco A.C., Chiminazzo C., Flores E.F., Weiblen R., Driemeier D., Roehle P.M. (2004). Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). *Pesquisa Veterinaria Brasileira*;24:43-49.
70. St. George T.D., Philpott M. (1972). Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from the prepuce of water buffalo bulls in Australia. *Aust.Vet.J.*;48:126.
71. Suavet F., Champion J.L., Bartolini L., Bernou M., Alzieu J.P., Brugidou R., Darnatigues S., Reynaud G., Perrin C., Adam G., Thiery R., Duquesne V. (2016). First description of infection of Caprine Herpesvirus 1 (CpHV-1) in goats in mainland France. *J.Pathogens*;5,17:1-13.
72. Takemori K., Murakami T., Komatani T., Ito H. (2013). Possible involvement of oxidative stress as a causative factor in blood-brain barrier dysfunction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J.Microvasc.Res.*;90:169-72.
73. Terraneo L., Paroni R., Bianciardi P., Giallongo T., Carelli S., Gorio A., Samaja M. (2017). Brain adaptation to hypoxia and hyperoxia in mice. *J.Redox Biol.*;11:12-20.
74. Thiry J., Saegerman C., Chartier C., Mercier P., Keuser V., Thiry E. (2008). Serological evidence of caprine herpesvirus 1 infection in Mediterranean France. *J.Veterinary Microbiology*;128:261-268.
75. Thiry J.L., Widén F., Grégoire F., Linden A., Belák S., Thiry E. (2007). Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. *BMC Vet.Res.*;3:26.
76. Thiry J., Widén F., Grégoire F., Linden A., Belák S., Thiry E. (2007b). Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a freeranging red deer. *BMC Vet.Res.*;3:26
77. Thiry E., Muylkens B., Meurens F., Gogev S., Thiry J., Vanderplasschen A., Schynts F. (2006). Recombination in the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. *Vet.Microbiol.*;113:171–177.
78. Thiry E., Lemaire M., Schynts F., Meyer G., Dispas M., Gogev S. (1999). Les conséquences de l'infection des bovins par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Point Vét.*;199:279–285.
79. Thiry E., Brochier B., Saliki J., Pirak M., Pastoret P.P. (1985). Excretion and reexcretion of thermosensitive and wild-type strains of infectious bovine rhinotracheitis virus after co-infection or two successive infections. *Vet.Microbiol.*;10:371-380.

80. Van Engelenburg F.A.C., Maes R.K., Van Oirschot F.A.M.R. (1993). Development of a Rapid and Sensitive Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Bovine Herpesvirus Type 1 in Bovine Semen. *J. Clinical Microbiology*; p.:3129-3135.
81. Whetstone C., Miller J., Bortner D., Van der Maaten M. (1989). Changes in the restriction endonuclease patterns of four modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV) vaccines after one passage in host animal. *Vaccine*; 7(6):527-32.
82. Winkler M.T., Doster A., Sur J.H., Jones C. (2002). Analysis of bovine trigeminal ganglia following infection with bovine herpesvirus 1. *Vet. Microb.*; 86:139-155.
83. Winkler M.T., Schang L.S., Doster A., Holt T., Jones C. (2000). Analysis of cyclins in trigeminal ganglia of calves infected with bovine herpesvirus-1. *J. Gen. Virol.*; 81:2993-2998.
84. Ye F., Zhou F., Bedolla R.G., Jones T., Lei X., Kang T., Guadalupe M., Gao S.J. (2011). Reactive oxygen species hydrogen peroxide mediates Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reactivation from latency. *PLoS Pathog*; 7:1-14.
85. Zicarelli L. (1990). Considerazioni sull'allevamento bufalino. Salerno, ERSAC.

RINGRAZIAMENTI SPECIALI

Il presente progetto di ricerca è stato svolto anche in collaborazione con l'**Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (IZSM) di Portici (NA)**, grazie alla gentilissima concessione della Dirigente di Dipartimento U.O.C. Virologia – Sez. Sanità Animale, la **dott.ssa Giovanna Fusco** che ha messo a disposizione il suo team e i suoi laboratori, nonché i nuovi kit ELISA specifici per la specie bufalina: Eradikit BuHV-1 gE IN3 diagnostic ed Eradikit Discrimination BoHV-1/BuHV-1 gE IN3 diagnostic, tutto il materiale e le strumentazioni per effettuare sia le prove di biologia molecolare Real-Time PCR sia le prove di sieroneutralizzazione con i ceppi di referenza *Cooper* BoHV-1 e *Metzler* BuHV-1.



RINGRAZIAMENTI

Per prima cosa è doveroso dire che per me questo è stato un viaggio voluto, meritato e inaspettato al tempo stesso, lungo 4 anni e mezzo, fatto di grande impegno, di soddisfazioni, gioie, ansie, dolori, un'enormità di sacrifici (il cielo solo sa quanti), di enormi delusioni, sconforti, ottimi risultati, pianti interminabili, SORRISI INFINITI...e soprattutto di PERSONE MERAVIGLIOSE vecchie e nuove che mi hanno accompagnato, che tutt'ora porto nel cuore ogni giorno...che mi hanno CUSTODITO, GUIDATO, AIUTATO, INSEGNATO, INCORAGGIATO, AMATO PER LA DONNA CHE SONO, visto in me ciò che io stessa ero e non vedevo, tirato fuori I MIEI TALENTI PIÙ SEGRETI e insegnato ad usarli PER SUPERARMI in ogni passo della mia vita.

GRAZIE di cuore a TUTTI VOI... viventi e angeli del paradiso.

- Il primo ringraziamento in assoluto va a **mio fratello Sabatino**, senza il quale io oggi non sarei arrivata qui, senza il quale io oggi non sarei qui; tutto quello che ho fatto nella mia vita è stato per lui, colui che ho sempre protetto a spada tratta nonostante tutto e nonostante tutti. Colui che ho cresciuto per tanto tempo. Mi ha aiutato davvero in tutti i modi possibili, e ha anche “abbastanza” sopportato le mie *lamentele pazze* in questi anni.
E' e sarà per sempre la vita mia. GRAZIE!
- Questi miei ringraziamenti li dedico anche **a mio padre**, che mi ha aiutato e guidato dal cielo insieme ai miei nonni: Maria, Sabato, Aniello, Concetta, a tutti i miei cuccioli; e **a mia madre**, che nonostante la sua grave malattia, qualche volta ancora sa sorriderci.
- GRAZIE al mio compagno per la vita, **Rufyo**, che mi sta sempre attaccato *come una cozza*. Lui che da quando è arrivato nella mia famiglia (proprio nel mio primo anno di PhD), come un dolce *dono*, mi ha cambiato la vita in meglio. Lui che ogni mattina appena mi sveglio mi dà un bacio e lui che quando vado a dormire mi dà calore. Lui che mi abbraccia ogni volta che lo sgrido dopo una marachella. Lui l'amore puro e sincero. Lui l'amore mio.
- **Ringrazio di cuore i miei TUTOR: la prof.ssa Luisa De Martino** (Dip. Medicina Veterinaria e Produzioni Animali di Napoli) senza il grande aiuto della quale non avrei mai potuto iniziare questa avventura e né fare una proficua e lunga esperienza all'IZSM di Portici (NA); e il **prof. Santino Prospero** (Dip. Scienze Mediche Veterinaria di Bologna) che mi ha presa come dottoranda sotto la sua ala e mi ha seguita supportandomi durante tutto il mio percorso.....GRAZIE!
- Ringrazio il **prof. Giuseppe Iovane, il prof. Luigi Zicarelli, il prof. Ugo Pagnini, il prof. Sante Roperto, il dott. Geppi Pisanelli (USA) e la dott.ssa Maria Elena Pero (USA)** per tutto l'aiuto che mi hanno dato.
- GRAZIE infinite anche ai miei coordinatori di dottorato di Bologna, **i prof.ri Carlo Tamanini (prima) e Arcangelo Gentile (dopo)** i quali sono stati sempre velocissimi e disponibilissimi a chiarirmi ogni dubbio durante il mio percorso di PhD e ad aiutarmi quando necessario. E ringrazio anche il **dott. Luca Cartoceti** (tecnico Scient. ed elaborazione dati) grazie al quale sono state possibili le dirette streaming di tutti i seminari di PhD della DIMEVET di Bologna per noi dottorandi fuori sede.
- Un ringraziamento speciale va al **dott. Raffaele Ciaramella**, il mio maestro, il buiatra più bello, affascinante, di classe, esperto, dolce, sorridente, divertente, intelligente del mondo ... e soprattutto con un gran cuore. Lui che mi ha insegnato un'enormità di cose sia nel lavoro che nella vita privata. Lui che è stato sempre pronto ad aiutarmi e ad ascoltarmi, lui la persona con cui è stato fantastico lavorare e ridere a crepapelle. Lui che la prima volta che l'ho conosciuto mi ha detto: *Stai attenta, non correre con la macchina in queste zone che gli autovelox ti fanno la foto, ed io: Maestro non vi preoccupate, io sorrido sempre! XDDDDDDDDGRAZIE!*

- Un sentito ringraziamento va a **tutti gli allevatori delle aziende bufaline di Caserta e province** che mi hanno permesso di raccogliere un enorme quantitativo di campioni per la mia ricerca ... senza il vostro aiuto non avrei potuto iniziare e finire il mio lavoro: a **Enrico e Fabio Migliaccio** (i vostri sforzi, quelli di tutti i vostri collaboratori, quelli del dott. Raffaele Ciaramella ed i miei sono riusciti a far entrare il vostro toro, *il famoso H66 o meglio OBELIX MIG*, nel cento tori Chiacchierini nel 2016.....mi avete commissionato un lavoro importante, avete avuto fiducia in me, nella mia professionalità e nella professione che ho sempre svolto con passione....GRAZIE, per me è stato davvero un onore), a **Corso**, a **Brandi**, a **Costanzo**, a **Crispino**, a **Volturno**, a **Colombiano**, a **Vitale**, a **Pallini**, a **La Racca**, a **Izzo**, a **De Matteo**, a **Di Rienzo**, a **Iovino**, a **Lanna**, a **Petrella** (piwawa), a **Petrella**, a **D'Aniello**, a **Schiavone**, a **Salzillo**.
- Ringrazio anche i **dott.ri: Claudio Paoella** (Direttore Sanitario del macello di Pompei, NA), **Gioia** (ex-Direttore Sanitario del macello di Nocera Superiore, SA), **A. Cozza** (Direttore Sanitario dell'ex-macello di Battipaglia, SA), **Nicolino Rossi** (Direttore Sanitario del macello di Avellino), **Giovanni Chirico** (Direttore Sanitario del macello di Caserta) che mi hanno supportato nei macelli durante i prelievi e sono stati davvero gentilissimi e disponibilissimi.
- Un caro e affettuoso ringraziamento va alla **prof.ssa Caterina Arpentì**, che mi ha sempre trattata come una figlia, lei che è stata sempre una persona forte e caparbia (nonostante i suoi problemi), un grande esempio da seguire, lei che si prefissava sempre mete ambiziose e che ha sempre raggiunto nel più eccellente dei modi possibili, lei che appena ho vinto il dottorato mi disse *Ti regalo la mia scrivania, ogni persona a cui l'ho data è diventata qualcuno di molto importante nella vita, e tu sarai una di loro!* Non ho mai dimenticato queste parole, è stato un onore sedermi per tutto questo tempo, e mi impegnerò a fare molta strada nella mia vita, ... GRAZIE prof.ssa, vi voglio bene!
- GRAZIE infinite alla **dott.ssa Filomena (Milena) Fiorito** (prima Dip. Medicina e Produzioni Animali di Napoli e poi IZSM, sez. Chimica), grande ricercatrice, persona dolce, intelligente, altruista, e con un gran cuore senza l'ENORME aiuto della quale oggi non mi sarei potuta dottorare.
- Voglio ringraziare di cuore la mia collega e amica, donna schietta-forte-sincera, la **dott. Giovanna Elvira Granato**, che da quando la conosco mi ha sempre spinto a fare meglio in ogni cosa mi veniva davanti seppure difficile e impossibile, mi ha spronata a non mollare, a resistere, perché alla fine avrei vinto io, avrei raggiunto in pieno il mio obiettivo...bhè aveva ragione... Le auguro di essere sempre felice insieme al marito Frank e alla piccola Maria Laura, e di ottenere tutto ciò che desidera nella vita.....GRAZIEEEEEEEEE Giovy!
- Ringrazio tantissimo le **prof.sse Francesca Ciani e Simona Tafuri** con le quali, con tanto entusiasmo e buone aspettative, mi sono buttata in un nuovo progetto *stress ossidativo nei sieri e nei TGs bufalini*. Grazie alla vostra professionalità, esperienza, disponibilità e buon umore abbiamo ottenuto degli eccellenti risultati....siete fantastiche.
- Ringrazio tantissimo il **dott. Domenico (Mimmo) Russo** (DVM, PhD Field Technical Advisor – MSD Animal Health) grazie al quale sono riuscita a mettere a punto la standardizzazione della tecnica di prelievo dei gangli trigeminali di bovino e bufalo; una persona speciale, estremamente colta e intelligente, umile e tanto altruista. Ho imparato molto grazie a te.
- Voglio ringraziare anche il **prof. Veeramani Maharajan** (scomparso di recente) del CNR - *Institute of Cybernetics* di Pozzuoli, per tutto l'aiuto ed il supporto che mi ha dato durante il mio PhD.
- Grazie di cuore al meraviglioso **tecnico** del nostro laboratorio di Malattie Infettive, Dip. Medicina Veterinaria e Produzioni Animali (NA), **Gaetano Vitagliano**, che mi ha donato sempre un sorriso e una parola buona soprattutto nei momenti poco felici di questo mio percorso. Lui che mi ha ascoltata, consigliata e aiutata sempre, soprattutto ha sopportato tuuuuuutte le mie lamentele.....GRAZIE, siete una persona fantastica, vi auguro il meglio nella vita!

- Ringrazio tutta la mia sez. di Malattie Infettive del Dip. Medicina Veterinaria e Produzioni Animali di Napoli, soprattutto: la **dott.ssa Francesca Paola Nocera** (per aver ascoltato pazientemente ed educatamente tutte le mie lamentele, ed essere stata sempre disponibile, grazie), la **dott.ssa Serena Montagnaro** (per essere stata schietta e sincera, mi ha inaspettatamente aperto la mente per affrontare la vita con un'altra ottica, grazie), la **dott.ssa Maria Valeria Puzio** (ci siamo *lamentate* a vicenda e ci siamo supportate XDDDD, thanks), il **dott. e le dott.sse Giuseppe Albero, Giovanna Bifulco, Valentina Longobardi** (per averci dato il materiale di cui necessitavamo quando non potevamo averlo, grazie, siete stati sempre gentilissimi e disponibili....noi quando potevamo abbiamo ricambiato però XD; grazie a Giovanna per avermi accompagnato al macello di Caserta per fare i prelievi dei TGs, esperienza in sua compagnia proficua professionalmente e personalmente), il **dott. Gennaro Altamura** (per essere sempre stato gentilissimo, disponibile, educato durante il lavoro in laboratorio), il **tecnico Salvatore Monnolo** (per le volte che mi ha aiutato a recuperare materiale per i miei esperimenti che noi in laboratorio non avevamo), la **Sig.ra Lucia** (addetta alle pulizie) e il **tecnico di lab. (di Caserta) Antonio** (che mi hanno ascoltata e incoraggiata sempre....GRAZIE di cuore ho imparato tanto da voi), la **dott.ssa Sandra Nizza** (per ogni parola di incoraggiamento che mi ha dedicato), gli **informatici Sergio e Giuseppe Marzatico**, le **dott.sse Roberta Simonetti** (grazie per tutte le nostre belle chiacchierate, è sempre un piacere stare in tua compagnia, ti auguro il meglio per la tua vita e la tua felicità), **Eleonora Masturzo, Rita** (dell'ospedale vet. *Frullone* di Napoli), **Monica Russo**. Inoltre ringrazio tanto per il supporto morale e tutte le chiacchierate produttive fatte coi custodi-guardie giurate del Dip. MVPA di Napoli: il **Sig. Gaetano** e il **Sig. Enzo**.
- Un grazie lo voglio rivolgere anche alle vecchie colleghe e amiche del lab. di Malattie Infettive Veterinarie di Napoli che sono sempre nel mio cuore: le **dott.sse Patrizia Ioime e Family, Bruna Facello e Family, Karina Mallardo e Family, dott. Raffaele Frondoso e Family**.
- Ringrazio tanto anche la mia collega la **dott.ssa Antonietta (Antonella) Cantiello** che durante questo periodo di PhD ho riscoperto come amica schietta, poi la **dott.ssa Concetta Avallone** sempre gentile e disponibile, il **dott. Roberto Brun** con il quale sono andata a fare i famosi prelievi di TGs bufalino nel macello di Avellino (ho inaspettatamente imparato tante cose da te), e infine le mie colleghe di corso che durante il periodo di dottorato ho ritrovato con tanto affetto, le **dott.sse Concettina (Titti) Fezza, Emanuela Parlato, Chiara Caso, la dott.ssa Chiara Di Gennaro** (esperta, professionale, caparbia, intelligente, disponibile, gentile e piena di vita).
- Un grazie va anche ai **prof.ri Bianca Gasparrini e Giuseppe Campanile** del Dip Medicina Veterinaria e Produzioni Animali di Napoli per il gentile aiuto che mi hanno offerto.
- Ringrazio di cuore la **Dirigente-Capo di Dipartimento Sanità Animale U.O.C. virologia dell'IZSM di Portici (NA)**, la **dott.ssa Giovanna Fusco**, che davvero mi ha accolto amorevolmente e mi ha dato la possibilità di imparare tantissime cose nei laboratori di virologia, sierologia, biologia molecolare dell'IZSM. Una persona forte, caparbia, capace, dolce, empatica, intelligente, gentile, onesta che mi ha incoraggiata, aiutata durante tutto il mio percorso accademico di PhD e mi ha dato anche la grande possibilità di partecipare al congresso S.I.Di.L.V. 2016 a Verona con una comunicazione orale sulla mia ricerca, è stata un'esperienza bellissima. GRAZIE di tutto!
- Voglio ringraziare immensamente la **dott.ssa Flora Alfano (IZSM, Dip. Sanità Animale U.O.C. virologia)**, che per me più che una collega è diventata una cara amica. E' una persona eccezionale, eccellente ricercatrice, intelligente, bella, umile, altruista che mi ha incoraggiata, ascoltata, guidata coi suoi ottimi consigli e aiutata *in un modo speciale tutto suo* che mi ha toccato il cuore nel profondo. Le auguro di essere sempre allegra e felice, di non perdere mai e poi mai QUEL SUO MERAVIGLIOSO SORRISO che scalda l'anima a ogni persona, e le auguro di continuare una vita piena di tutto quello che desidera insieme alle persone che amaGRAZIE veramente e sinceramente!
- Ringrazio con tutto il cuore i **dottori (tecnici e amministrativi) dell'IZSM Dip. Sanità Animale U.O.C. virologia: Giuseppe (Pino) Carlino, Domenico Giudice (DEL Giudice) e Gioacchino (Jek) Scognamiglio** con i quali è stato un piacere lavorare tra battute e sorrisi, loro che mi hanno ascoltato, aiutato, guidato e consigliato sempre sinceramente.....siete delle persone FANTASTICHE, vi auguro una vita piena del meglio del meglio del meglio che si possa mai avere.....GRAZIE!
- Grazie infinite al **Dirigente dott. Giuseppe Aprea (IZSM e in seguito IZS Caporale)** per avermi aiutata nelle mie ricerche in laboratorio con tanta umiltà, pazienza e passione per il suo lavoro. Persona sincera, schietta, intelligente, buona, allegra, che stimo molto. Gli auguro ogni bene nella vita.

- Voglio ringraziare con immenso affetto tutto il team (tecnici e dottori) dell'IZSM di Portici (NA), Dip. Sanità Animale U.O.C. virologia, che mi ha supportata, insegnato e aiutata nel mio lavoro in laboratorio per tanto tempo: in primis ringrazio la **dott.ssa Anna Maria Pugliese** (per la sierologia; ho imparato tanto da te, grazie), il **dott. Sergio Brandi** (per la virologia; sempre disponibile, e molto professionale nel lavoro; soprattutto grazie per le innumerevoli SN e le infezioni), le **dott.sse Martina Levante, Rosa Loporchio, Luisa Marati, Loredana Cozzolino** e **Antonella Colaiacolo** (per tutte le volte che abbiamo riso, scherzato e lavorato insieme, grazie per il vostro prezioso aiuto), i **dott.ri Vincenzo (Enzo) Piccini** e **Giorgina Iengo** (l'allegria ed il canto appassionato del laboratorio), il **dott. Maurizio Viscardi** (l'ho fatto penare con PCR, Real-Time PCR, sequenziamento e pyrosequenziamento; grazie per la pazienza e la disponibilità), e tutto il resto della squadra: la **Dirigente Maria Grazia Amoroso**, la **Dirigente Mariapaola Valentino**, le **dott.sse** e i **dott.ri: Anna Balestrieri, Barbara Cioffi, Denise Di Concilio, Federica Boccia, Maria Teresa** (non so il cognome XD), **Bruno Pagliuso, Roberto Iannone**. Grazie anche alle guardie giurate: **Gennaro** e **Alessandro** che appena mettevo piede all'IZSM mi salutavano con un sorrisone e una bella parola per cominciare al meglio la giornata. Ringrazio anche gli statisti dell'Osservatorio Epidemiologico dell'IZSM per aver lavorato sulle analisi statistiche che hanno completato la mia ricerca di PhD: il **dott. Vincenzo Caligiuri**, e le **dott.sse Roberta Pellicanò** e **Roberta Brunetti**.
- Grazie anche a tutti i miei colleghi della Clinica Veterinaria Laterza di Napoli (dove per tutto il periodo di dottorato ho lavorato facendo i turni di notte) che mi hanno accompagnato in questo mio periodo di ricerca e da loro ho imparato tante cose: **Antonella Ioele, dott. Bruno Laterza** (chirurgo ortopedico primario e proprietario della struttura), e **tutti i dott.ri/dott.sse/infermiere/segretarie/adetti alle pulizie: Italo Sgambato, Michela Oreste, Alessandra, Marianna Marzocchella, Alberta Vicenzo, Alfonso Ambrosino, Mario Bosco, Lucia Raiola, Paola Esposito Corcione, Maria Marinsalti e Francesca, Valentina Torre, Brunella Esposito, Gaetano Coccia, Donatella De Simone, Antonietta (Antonietti) Vitiello, Fabio Valentini, Serena Barisano, Alessandro Addeo, Sara Di Sarno, Nita Farina, Simona Aveta, Claudia, Andrea Campanile, Anna Pudia, la Trio, Rosa Galluccio, Giampaolo Crispino, Asang, Stefania, Rita, Nausica, Renato, Roberta, Maurizio Saccone, Manuel, Oreste** (con il quale era bello chiacchierare e confrontarsi mentre ci prendevamo un caffè e un cornetto alle 7 di mattina quando io avevo quasi finito il turno di notte. Persona astuta, decisa e con un'intelligenza spiccata ... da te ho inaspettatamente imparato davvero tantissime cose ... grazie). Dedico un ringraziamento a **tutti gli animali che ho accudito** (visto guarire o visto *addormentare e addormentarsi*) e a **tutti i loro padroni** che hanno lasciato una traccia dentro di me.
- Un caro ringraziamento va anche ai colleghi di mio padre, i **poliziotti/Ispettori di Polizia Saverio Abate** e **Gennaro Arnese** che in questo mio percorso hanno avuto sempre una parola di incoraggiamento da darmi e mi hanno sempre augurato il meglio per la mia vita.
- GRAZIE di cuore all'**Ing. Lucia Ianni**, mia cara amica, che mi ha sempre supportata, ascoltata, guidata e incoraggiata in tutti questi anni che la conosco. Grande persona, di un'intelligenza pazzesca (fuori dal comune), dolce, buona, e TANTO altruista. Davvero le auguro ogni bene e amore in questa vita, perché se lo merita tutto.
- Voglio ringraziare tanto una mia cara amica di vecchia data, **Connie De Gregorio**, che mi ha supportata e incoraggiata tanto in questo percorso, che ha ascoltato tuuuuuutte le mie lamentele e che per farmi tranquillizzare mi faceva sempre il thè caldo col limone (appena colto) e i pasticcini, e quando questi finivano mi preparava i dolci. Lo ha sempre saputo che io vado presa per la gola XDDDDDDDD GRAZIE!
- Un affettuoso e sentito ringraziamento va alla mia amica **Sabrina Mortillaro**, educatrice cinofila di Napoli, buona, bella, umile, forte e tanto altruista...lei che nonostante dica che non è vero davvero mi ha dato tanto. Lei che si è fatta personalmente carico di spese ingenti per far operare una cagnolina fantastica del canile (Gilda) così da donarle una vita serena e dignitosa, e che poi ha adottato nonostante avesse già tanti pelosi in casa. Lei che si è fatta altro carico per far star bene ogni cane del rifugio *La Fenice* e non solo. SEI ECCEZIONALE, ti auguro una vita felice, piena di amore e di ogni cosa che desideri..... GRAZIE!
- Un grazie ENORME e di CUORE lo rivolgo ai miei amici, quelli che anche da lontano, mi hanno incoraggiata e consigliata per il meglio in questi anni: **Max Cimato** (Direttore dell'Accademia Italiana del Fumetto *You Comix* di Caserta e Visual Artist/Art Director del social network satirico *Facciabuco - gemello pazzogotino*) e **students, Dario Maria Roberto Piedimonte** (Creative Designer dello Studio d'Arte Grafica e Pubblicitaria OIRAD) e **Family**, e **Paolo Franco** (collaboratore della *You Comix - pazzogotino*).

- Dedico un caro ringraziamento anche ad **Antonella Avola**, la mia futura cognata, e a **tutta la sua bella Famiglia** (il **Sig. Antonio** e la **Sig.ra Maddalena, Cinzia e Alfonso** e i **loro bambini Antonio e Rosalia, Rosaria e Catello** e il **loro piccolo Gaetano, Salvatore**) che hanno accolto mio fratello, la mia vita, come un altro figlio, e hanno accolto me, mia madre e il nostro Rufyo con piacere, umiltà, sorrisi, bene e calore. Benvenuti nella nostra particolare Famiglia ... che sia l'inizio di una felice e unita vita insieme!
- GRAZIE ad una persona *speciale*, gentile, buona, allegra, bella, umile e molto altruista, *la farmacista Annamaria Carmando*. Ci ha fatto sicuramente incontrare la divina provvidenza, e senza l'aiuto della quale probabilmente non mi sarei dottorata. Lei che da quando ci siamo conosciute ci ha fatto sentire *in famiglia* (quella vera e autentica, quella che non avevamo mai avuto), le battute della quale ci hanno fatto ridere a crepapelle, e il suo sostegno, le sue preghiere, la sua complicità, i suoi sorrisi ci hanno colpito l'anima.....GRAZIE di tutto. Le auguro che ogni sogno che porta nel cuore si realizzi presto, così sorride ancora di più XDDDDDDDD
- Grazie di cuore anche ai nostri **nuovi vicini** per averci accolto col sorriso nella casa nuova: **Cris, Veronica, Simone, Valentina e il piccolo Cris, Sig.ra Maria** (delle papere) e **Family, sig.ra Rosa e Family, sig.ra Rosaria, Francesca e Family, Marianna e Family, Genoveffa e Family, mast'Antonio e Family**, insomma a tutti.
- Un grazie di cuore per TUTTO (per ogni cosa bella che in questi anni di PhD mi avete lasciato dentro e che porto con me nella mia vita) lo voglio rivolgere a: **mia cugina Annarita** (mio pezzo di cuore) ed **Emanuele e la piccola Mia, la mia Michela** (Micci – suor Michela Ester, francescana alcantarina) e **Family, zia Gina e zio Michele e Nello e Sebi, zia Adele e zio Gaetano e Giacinto e Gerardo e Gianluca, zia Elena e zio Vittorio e Pasqualino, zio Antonio e zia Marinella e Barbara e Francesca, zia Rosanna e zio Gabriele e zia Carmelina e zio Gennaro e Luigi ed Elena, Elena e Lello e Chiara e Ludovica, mio cugino Alessandro e Martina e mia nipotina Beatrice** (persone eccezionali), **zio Catello e zia Flora, Eraldo e Daniele e Silvia, zia Geppina e Family, zia Enza e zio Mario e Antonello e Leopoldo e Tommaso e Ciro e le loro Family, Sabina e Family, zia Giovanna e Family, Francesca e Jonathan e i loro cuccioli e zia Carmela e zio Tonino** (di Brescia), **zia Maria e tutta la sua big Family ('e ret o' puzzal), tutti i miei parenti di Lettere e Casola di Napoli** (tra cui **zio Camillo e zia Giovanna e Family, zio Salvatore e zia Carmela e zia Assunta e Caterina e il piccolo Giovanni e Family, zia Filomena e zia Assunta e zio Clemente e Concetta e la sua big Family), zia Caterina** (Titina) e **marito e Alfonso e Gennaro, Marianeve e Family, Michela e Paola e Francesca e zia Anna** (Nannuzza, di Rieti) e **zio Carmine ed i fidanzati, Elio** (fisioterapista) e **Family, Peppe Coppola e Antonella e le loro Family, Vincenzo** (sbirro) e **Family, Rossella e Serena e Sig.ra Lina e marito e Iacopo e Giovanni, Maria Virginia** (Mavy) e **Family, Valentina Catania e Daisy e Francesco, Mena, Irma e Family, Simona e Family, Ida e Family, Fabio e tutta la sua Family, tutta la Connie's Family, veterinario Angelo Di Ruocco e Family, dott. Carmine Russo** (buiatra di Francolise), **dott. Federico Conte** (buiatra di Caserta), **dott. Francesco Palazzo** (*il ciuffo*) (buiatra di Caserta), **dott. D'Abbraccio** (buiatra campano), **Carmine Taminto** (il mio migliore amico ... il solo che ha saputo leggermi dentro quando ne avevo più bisogno), **mia cugina Vittoria Lauritano e tutta la sua Family** (tra cui **zia Cristina e zio Antonio, Lina, Nunzia, Gina, Maria e le loro Family), dott.ssa Celeste Mascolo e Family, Michela Cinque e Family, Gaetano Desio, Claudio De Martinis e Family, dott.ssa Serena del Bo, dott.ssa Marianna** (piccola Lab.), **dott.ssa Mariapaola Chegai** (buiatra di Caserta), **le proprietarie del B&B Santi Numi** di Reggio Emilia, **Sig.ra Adele e Family D'Angelo** (della libreria Veterinaria di Napoli), **on'Vittorio e Casimiro e Concetta e Family del Bar giù via Lamma, Roberta Traverso** (scrittrice e autrice del libro *Angelus Qui Elegit Infernum*), **Sig. Franco e Sig.ra Maria** (fiorai del cimitero), **Mimmo e le figlie e la moglie** (fiorai del cimitero), **Carolina Mirello** (per avermi aiutata, confortata e guidata quando sembrava che non ci fosse più una via di uscita), **Sig.ra Antonucci** (amministrativa *in pensione* responsabile dell'ufficio segreteria don Bosco di Medicina Veterinaria di Napoli....ricordo ogni parola sincera, buona, di esempio e di incoraggiamento che mi avete dato ... non ho dimenticato il vostro bel sorriso ... GRAZIE di cuore), **Barbara Di Marzo e il Sig. Nicola e la Sig.ra Rosaria e la sorella Manuela e la nipotina Gaia, Ciro Nastro e sua moglie Anna e i suoi figli Leda e Raffaele** (siete DI CUORE, siete MERAUVIGLIOSI, vi auguro ogni bene nella vostra vita), **al mio maestro Salvatore Nastro** (campione mondiale di karate...grazie per ogni parola che mi avete rivolto per farmi crescere e per rincuorarmi) e **tutti i miei compagni di karate per la vita** (tra cui **Romina, Antonella, Veronica, Amanda, Antonio P., Giulia e Ciro L. e la figlia Federica, Ciro Massa e il padre Lallo e il fratello, il maestro Fotino e Lallo e il figlio, e il maestro Cesare Baldini e la moglie e il figlio Salvatore e moglie ed il piccolo Cesare, Amelia), TUTTO** quello che è stato il **mio gruppo di RnS** (non dimenticherò MAI tutto quello che voi con umiltà e sincerità e bene avete fatto per me e la mia Famiglia in un momento di dolore profondo GRAZIE DI CUORE), **tutti i membri e cari amici della Polizia di Stato** di mio padre (lui adorava la sua professione e vi adorava, eravate per lui bene, conforto, sorrisi, allegria e speranza ... GRAZIE!), **Carmelina** (master), **Carmen Medaglia** (amica eccezionale, forte e sincera di EIPASS), **Angelica Monte e marito** (CASS di HP florin), **Felice Rao** (Felix Felicis di HP florin), **Cynthia Bones e Anna Bolena**

(di HP florin), **Dario Miraglia** (amico di corso dell'Uni. di C/mare), tutti i miei **compagni di corso dell'Uni e tutti i miei prof.ri e prof.sse**, **Ciro Longobardi** (Mila&Shiro), **Mariarosaria Chierchia e Tania Cesarano** (amiche di liceo) e **le loro Family**, avv. **Lella Cesarano**, avv. **Benvenuto e Family**, dott.ssa **Paola Curto** (IDEXX), **Elena Sarno e Family**, **Emma** (lab.) e **Pasquale e la piccola Giovanna, Floriana e Paolo e le loro Family**, **Franco Palladio e all Family**, **tutti i miei colleghi di lab. di Malattie Infettive**, **Maria Pia C. Loffredo tutto il gruppo ARI Stabia di mio padre** (in particolare **Assunta, Poldino, Pasquale GDO, Gennarone, LIA, Vollono, Iole e Nicola e le figlie, etc.**), **Maria Laura e Orazio Abate** (figli del poliziotto Saverio Abate, caro amico di papà), **Maria Ruggiero, Martina Crociati** (mia compagna durante le prove per entrare nel PhD a Bologna), **Mena Marinaro** (STPA), **Maria Di Filippo e Maria Luisa Tamma e Giorgia e Sara e Cristina Rossetti e Massimo Cibelli e Peppe Sodano e Vanessa Baldi e le loro Family** (mie/i care/i amiche/i di corso all'Uni.), **dott. Raffaele Nocera e Antonio e Rocco e le loro Family** (IRIS srl e LINFA CREATIVA), **Olimpia e tutta la sua Family, Claudia** (*Oplà Tattoo*), **tutto l'IZSM, Rosario** (lab.), **Rossella** (lirica) e **Family, Simona Sasso e Family, Tina Coppola e Family, Fiorella Balzamo e Molly e Twin e Pasticcia e Lalla e tutte/i** (master cake design), **don Luigi e don Nino e don Antonio, Ing. Francesco Scarfato** (mio caro amico), **Rossella Vingiani e Family** (persona umile e speciale), **dott. Nicola Pietraroia e Sig.ra Silvia e Clementina e Dante** (per ogni parola buona e per ogni insegnamento che mi avete dato....GRAZIE).

- E infine....ringrazio **me stessa** che, nonostante i pronostici fossero come al solito in mio sfavore (per la serie: *se non è difficile e impossibile non mi piace*), con FORZA, VOLONTA', ALTRUISMO e UMILTA' ho raggiunto un altro importante obiettivo ...
oggi finisce un periodo duro e impegnativo, ma contemporaneamente si apre *un bel portone bianco* che mi porterà in un'altra avventura della mia vita, quindi ...
**Annarosaria SORRIDI e SII FELICE finalmente in tutto quello che farai
accompagnata da tutte le persone a cui tieni davvero.
SEMPRE.**

Storia Semplice.....con un finale semplice.

Morali della storia semplice:

- ***Mai giudicare una persona dal primo abito, perché il secondo ti mette con la faccia a terra;***
- ***La pochezza d'animo è la madre delle rane con la bocca larga.***

Una combriccola di amiche di scuola si rivede dopo 20 anni dal Diploma in un caffè.

1°amica: Oh, sapete io sono diventata un Ingegnere molto rinomato nel nostro Paese.

2°amica: Ah, io invece sono diventata una stilista di successo. E' fantastico fare la vita che faccio.

3°amica: Uhm, io invece sono una General Manager di un'enorme azienda, guadagno tantissimo e giro il mondo.

4°amica: Sono un chirurgo plastico, da me vengono Vip su Vip.

5°amica: Io sono diventata una scrittrice straordinaria, i miei libri vanno a ruba.

Mentre tutte parlucchiavano tra di loro una si accorge che la 6°amica non ha detto nulla, allora le chiede espressamente cosa aveva creato in 20 anni.

Le altre si mettono in ascolto con un mezzo sorrisino.

*La 6°amica timida e un po' impacciata: Io, io ... io, ehm, io faccio la **“SENZA-SOLDI” PROFESSIONISTA.***

Una grassa e sonora risata risuona per tutta la stanza.

Le amiche: Bravissima, sapevamo già che non valevi niente.

La 6°amica, rossa in viso, passa in rassegna tutte con lo sguardo e risponde con molta umiltà: precisamente io insegno alle persone che hanno pochissimi soldi a cavarsela, insomma faccio vedere loro come sopravvivere dignitosamente in questa vita che non ha considerazione per quelli che non hanno una raccomandazione o una conoscenza giusta.....E per la cronaca, visto che sono l'unica nell'universo che fa questo MESTIERE, IO sono la REGINA DEL “NIENTE”, UNICA NEL SUO GENERE a differenza vostra, che siete un Ingegnere di successo qualunque, un chirurgo qualunque, una stilista qualunque, una scrittrice qualunque, una manager qualunque.

La 6°amica con tutta la fierezza che le esce dal cuore, si alza, gira sui tacchi e va via soddisfatta.

Dietro di lei è calato il silenzio mentre i 5 caffè sul tavolo ancora fumavano.

(by A.M. 2018)