

INDAGINE SIEROLOGICA PER NOROVIRUS GII E GIV IN PRIMATI NON UMANI IN CATTIVITÀ



Federica Di Profio^a, Vittorio Sarchese^a, Irene Melegari^a, Andrea Palombieri^a, Ivano Massirio^b, Sandra Bermudez Sanchez^a, Klaus Gunther Friedrich^c, Federico Coccia^c, Fulvio Marsilio^a, Vito Martella^d, Barbara Di Martino^a

(a) Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo, Teramo

(b) Azienda USL di Reggio Emilia, Reggio Emilia

(c) Fondazione Bioparco, Viale del Giardino Zoologico, 00197, Roma

(d) Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Bari, Valenzano

Introduzione

I norovirus (NoV) sono attualmente riconosciuti come una delle principali cause di gastroenterite acuta di origine non batterica nell'uomo (7). Sulla base dell'analisi di sequenza nucleotidica del gene ORF2, i NoV vengono attualmente suddivisi in sette genogruppi (G) con GI, GII e GIV responsabili di gastroenterite nell'uomo (5). Le infezioni naturali sostenute da NoV enteropatogeni per l'uomo sono state occasionalmente documentate anche in primati non umani. Anticorpi nei confronti di NoV GI.1, GII.4 e GII.7 sono stati identificati in cercocebi, macachi e scimpanzé, con prevalenze comprese tra il 63% e il 92% (6). Inoltre, più recentemente l'RNA di NoV GI e GII è stato identificato nell'8,2% dei campioni fecali di macachi allevati in cattività negli Stati Uniti (4).

Obiettivo della ricerca

Scopo del presente lavoro è stato quello di eseguire un'indagine sierologica per NoV GII.4 e GIV.1 su una raccolta storica di sieri ottenuti da sette diverse specie di primati non umani ospitati presso il Bioparco di Roma.

Materiali e metodi

Nel periodo 2001-2017 sono stati collezionati 86 sieri da 62 macachi (*Macaca fuscata*), 10 mandrilli (*Mandrillus sphinx*), 6 cercocebi (*Cercocebus atys lunulatus*), 3 oranghi (*Pongo pygmaeus*), 2 gorilla (*Gorilla gorilla*), 2 scimpanzé (*Pan troglodytes*) e 1 amadiade (*Papio hamadryas*). Cinque animali avevano un'età inferiore ai 3 anni, 75 erano adulti (6-20 anni) e 6 erano anziani (>20 anni). Tutti i sieri sono stati testati mediante un kit ELISA ricombinante basato sull'impiego di VLP (virus-like particle) dei ceppi NoV Hu/NoV/GII.4/MD14512/US e Hu/NoV/GIV.1/SaintCloud/624/US, espresse con il sistema del baculovirus (1, 2, 3). Brevemente, 100 µl di ciascuna VLP (1 µg/ml) diluita in tampone carbonato-bicarbonato (pH 9,6) sono stati adsorbiti in piastre a 96 pozzetti EIA/RIA (Costar, Italy). Ciascun siero in esame è stato testato alla diluizione iniziale di 1:100. Dopo incubazione a 37°C per 1 ora e successivi lavaggi, sono state aggiunte anti-IgG umane coniugate (Sigma-Aldrich, Italy) con perossidasi (1:5000) per 30 minuti a 37 °C. Il valore di cut-off ($\geq 0,5$) è stato stabilito come la media dei valori netti delle assorbanze a 405 nm di 25 sieri di primati non umani risultati negativi in western blotting per GII.4 e GIV.1, più 2 deviazioni standard. Tutti i sieri con valori di $OD_{405} > 0,5$ alla diluizione iniziale di 1:100 sono stati diluiti per raddoppio. I titoli anticorpali sono stati calcolati ed espressi come il reciproco della più alta diluizione del siero con assorbanza positiva ($OD_{405} \geq 0,5$) per GII.4 e/o GIV.1 VLP. Il test esatto di Fisher è stato utilizzato per determinare differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) riscontrate tra le sette specie indagate e tra i diversi gruppi di età.

Bibliografia

1. Bok et al 2009. J Virol, 83:11890-11901; 2. Di Martino et al., 2014. Emerg Infect Dis, 20:1828-1832; 3. Di Martino et al., 2017. Vet Microbiol, 203:68-72; 4. Farkas, 2016. Emerg Infect Dis, 22:1272-1274. 5. Green, 2013. Fields Virology. (6th ed. pp. 583-609; 6. Jiang et al., 2004. J Med Primatol, 33:30-33; 7. Patel et al., 2008. Emerg Infect Dis, 14:1224-1231.

Risultati

Anticorpi nei confronti di NoV GII.4 e GIV.1 sono stati identificati rispettivamente nel 24,4% (21/86) e nel 23,2% (20/86) dei sieri testati. In particolare, degli 86 campioni, 8 (9,3%) possedevano anticorpi anti-GII.4 con titoli di 1:100 e 1:200 e 7 (8,1%) sieri reagivano solo con GIV.1 alla diluizione finale di 1:100. Tredici (15,1%) sieri hanno mostrato reattività per entrambi gli antigeni con titoli compresi tra 1:100 e 1:800 (Tabella 1).

Tabella 1: sieri positivi in ELISA nei confronti di IgG specifiche per GII.4 e GIV.1

NoV VLP	Diluizione siero				Totale (%)
	1:100 (%)	1:200 (%)	1:400 (%)	1:800 (%)	
GII.4	5/86 (5,8)	3/86 (3,5)	0/86 (0)	0/86 (0)	8/86 (9,3)
GIV.1	7/86 (8,1)	0/86 (0)	0/86 (0)	0/86 (0)	7/86 (8,1)
GII.4 + GIV.1	5/86 (5,8)	4 (4,7)	2 (2,3)	2 (2,3)	13 (15,1)
	7/86 (8,1)	1 (1,2)	3 (3,5)	2 (2,3)	

GII, genogruppo II; GIV, genogruppo IV; NoV, norovirus; VLP, virus-like particle

Con l'eccezione dei gorilla e dell'amadiade, tutte le specie analizzate sono risultate positive ad almeno uno dei due antigeni testati (Tabella 2), dimostrando per la prima volta la recettività dei mandrilli e degli oranghi alle infezioni da NoV.

Tabella 2: specie di primati testati per la presenza di IgG anti-NoV GII.4 e GIV.1

Primati non umani testati	Positivi IgG GII.4	Negativi IgG GII.4	Positivi IgG GIV.1	Negativi IgG GIV.1	Totale
Macaca fuscata	18(29,0%)	44 (70,9%)	12 (19,3%)	50 (80,6%)	62
Mandrillus sphinx	1 (10,0%)	9 (90,0%)	5 (50,0%)	5 (50,0%)	10
Cercocebus atys lunulatus	1 (16,6%)	5 (83,3%)	1 (16,6%)	5 (16,6%)	6
Pongo pygmaeus	1 (33,3%)	2 (66,6%)	0 (0,0%)	3 (100%)	3
Gorilla gorilla	0 (0,0%)	2 (100%)	0 (0,0%)	2 (100%)	2
Pan troglodytes	0 (0,0%)	2 (100%)	2 (100%)	0 (0,0%)	2
Papio hamadryas	0 (0,0%)	1 (100%)	0 (0,0%)	1 (100%)	1

GII, genogruppo II; GIV, genogruppo IV

Relativamente all'età, le prevalenze più alte sono state rilevate nei soggetti giovani (40% per GII.4 e 80% per GIV.1) e negli adulti (24% per GII.4 e 20% per GIV.1), mentre le più basse negli anziani (16,6%). Una differenza statisticamente significativa è stata riscontrata solo per GIV.1 tra gli animali <3 anni e il gruppo degli anziani ($P=0,008$). Analizzando le positività sierologiche rilevate per anno di campionamento, la più alta (39,3%; 11/86) è stata riscontrata nella popolazione dei macachi sottoposti a prelievo nel 2010, lasciando ipotizzare la possibile presenza di un focolaio di infezione.

Conclusioni

I risultati ottenuti nel presente studio aggiungono ulteriori evidenze sulla circolazione di NoV GII.4 nella popolazione di primati non umani. Inoltre, per la prima volta è stata rilevata la positività sierologica nei confronti di NoV GIV.1. Recentemente, nel corso di un'indagine molecolare condotta su 500 campioni fecali collezionati da macachi negli Stati Uniti, NoV GIV.1 sono stati identificati nello 0,6% dei soggetti esaminati mediante Real-Time RT-PCR (5). Tale risultato, unitamente ai dati collezionati in questa indagine, avvalorare l'ipotesi che i primati non umani possano rappresentare un'importante fonte di diffusione di ceppi NoV enteropatogeni per l'uomo.