

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in salute animale

Ciclo XXV

**VALUTAZIONE DELLA VIREMIA IN BOVINI
PERSISTENTEMENTE INFETTI DA VIRUS DELLA
DIARREA VIRALE BOVINA SOTTOPOSTI A
VACCINAZIONE**

**ASSESSMENT OF VIREMIA IN BOVINE VIRAL
DIARRHEA VIRUS PERSISTENTLY INFECTED
CATTLE FOLLOWING VACCINATION**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Paolo Martelli

Tutor:

Chiar.mo Dott. Simone Taddei

Dottorando: Christian Bosello

Sommario

Abstract	3
Introduzione.....	5
Eziologia	7
Patogenesi.....	10
Risposta immunitaria	14
Immunità innata	14
Risposta umorale.....	14
Risposta cellulo mediata	15
Risposta immunitaria degli animali persistentemente infetti	15
Forme cliniche	16
Malattia delle Mucose	16
Diarrea Virale Bovina	17
Sindrome Emorragica	18
Diagnosi.....	20
Ricerca Ag BVD su tutti gli animali mediante ELISA o RT-PCR	20
Ricerca Ag BVD su tutti gli animali mediante RT-PCR su pool di sangue in toto o su latte di massa.....	21
Indagine sierologica per anticorpi verso NS2-3 su tutti i capi presenti e ricerca di Ag BVD sui soggetti sieronegativi su sangue in toto	22
Ricerca Ag BVD mediante ELISA o RT-PCR su sangue in toto o biopsia cutanea (ear notch) su vitelli neonati.....	22
Materiali e metodi	23
Risultati e discussione	33
Conclusioni	40
Bibliografia	41

Abstract

L'infezione della bovina gravida da parte del virus della diarrea virale bovina (BVDV) può determinare la nascita di vitelli immunotolleranti e persistentemente infetti (PI), che rappresentano una importante fonte di diffusione del virus nell'allevamento e contribuiscono in maniera significativa al mantenimento di un'elevata prevalenza di infezione. La vaccinazione di animali PI con ceppi di BVDV antigenicamente diversi dal ceppo persistente può indurre la produzione di anticorpi neutralizzanti. A seguito di somministrazione di un vaccino inattivato, contenente il ceppo C86 di BVDV, è stata rilevata una transitoria riduzione, statisticamente significativa, della viremia in bovini PI. La riduzione della viremia non è stata comunque tale da pregiudicare la possibilità di rilevare gli animali PI. Inoltre, un simile andamento della viremia è stato rilevato in bovini immunotolleranti e persistentemente infetti non vaccinati.

Summary

The infection of pregnant cattle by bovine viral diarrhea virus (BVDV) can result in the birth of immunotolerant and persistently infected (PI) calves, which represent an important source of spread of the virus in the breeding and contribute significantly to the maintenance of a high prevalence of infection. The vaccination of PI animals with BVDV strains antigenically different from persistent strain can induce the production of neutralizing antibodies. Following administration of an inactivated vaccine containing the C86 strain of BVDV to PI cattle, a transient,

statistically significant, reduction of viremia was detected. However, the lowering of viremia levels is not high enough to affect the ability to detect PI animals. Moreover, a similar trend of viremia in unvaccinated immunotolerant and persistently infected animals was detected.

Introduzione

La diarrea virale bovina/malattia delle mucose (BVD/MD) è una malattia infettiva e contagiosa del bovino, sostenuta dal virus della diarrea virale bovina (BVDV), appartenente alla famiglia Flaviviridae, genere Pestivirus. Esistono due biotipi del virus: citopatogeno (CP) e non-citopatogeno (NCP). L'infezione avviene per via respiratoria o digerente. Successivamente alla fase viremica il virus diffonde agli organi linfoidi ed alla mucosa intestinale. Notevole importanza ricopre l'infezione della bovina gravida da parte di BVDV NCP tra il 30° e il 120° giorno di gravidanza, poiché ciò può determinare la nascita di vitelli immunotolleranti e persistentemente infetti (PI) a seguito di infezione transplacentare. Dal momento che gli animali PI sono escretori continui di BVDV, essi rappresentano una importante fonte di diffusione del virus nell'allevamento e contribuiscono in maniera significativa al mantenimento di un'elevata prevalenza di infezione. L'identificazione e la rimozione degli animali PI è quindi una componente essenziale dei programmi di controllo della malattia. La variabilità nel tempo della viremia negli animali PI non è stata tuttavia indagata a fondo. È riportato in letteratura che la vaccinazione per BVD di animali PI può indurre la produzione di anticorpi neutralizzanti nei confronti del virus vaccinale o di ceppi virali antigenicamente diversi dal ceppo persistente (Bolin et al., 1985; Liess et al., 1983). Inoltre, è segnalata anche la possibilità di scomparsa del virus dal siero di un animale PI, dovuta alla spontanea produzione di anticorpi virus neutralizzanti (Brock et al., 1998). Riguardo quest'ultima segnalazione, l'eventualità, durante il periodo di studio, di una esposizione non rilevata ad un ceppo antigenicamente

differente, quale ad esempio un ceppo di campo, che abbia rimosso il virus libero nel siero attraverso la produzione di anticorpi cross-reattivi, oppure il deterioramento dell'immunosoppressione sono le possibili spiegazioni che gli autori hanno dato di tale fenomeno, il quale non è tuttavia stato ulteriormente indagato. Al fine di apportare un ulteriore contributo in merito al chiarimento degli aspetti patogenetici sopra menzionati, con il presente studio sono stati valutati gli effetti della vaccinazione sui livelli di viremia in animali PI. Lo studio ha quindi valutato anche la possibile interferenza della vaccinazione con la rilevazione di animali PI nelle prime fasi post vaccinali.

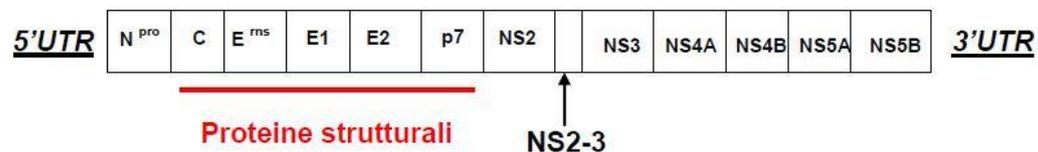
Eziologia

Il virus agente della Diarrea Virale Bovina (BVDV) è un Pestivirus appartenente alla famiglia *Flaviviridae*, e ne esistono due distinti genotipi : BVDV tipo 1 e BVDV tipo 2 (Ridpath J e coll, 1994).

E' un virus di forma sferica di 40-60 nm di diametro, provvisto di un *envelope* che racchiude il nucleocapside.

E' stabile, a PH compreso tra 6 e 9, mentre viene rapidamente inattivato alla temperatura di 56 °C e risulta essere labile ai comuni disinfettanti, nonché ai solventi organici ed alla tripsina (Scatozza F., Buonavoglia C, 1988)

Il genoma del BVDV è costituito da RNA a singolo filamento e polarità positiva.



Il genoma e gli antigeni virali

BVDV si divide anche in vari sottogenotipi all'interno dei quali esistono delle varianti ad alta e bassa virulenza. Le differenze tra i vari sottogenotipi dipendono prevalentemente dalla variabilità della glicoproteina E2. (Kalaycioglu A.T., 2007)

A seguito del processo di traduzione virale si formano proteine strutturali e non strutturali.

Tra le proteine strutturali, associate al virione maturo, vengono annoverate una proteina capsidica (C) e tre glicoproteine dell'envelope (E^{ms} , E1, E2).

-C è una proteina relativamente conservata tra i Pestivirus

- E^{ms} (gp48) ha attività ribonucleasica e gli anticorpi diretti contro essa sono in grado di neutralizzare l'infettività del virus;

-E1 (gp25) è una glicoproteina transmembrana con funzione di ancoraggio alla cellula ospite e forma un eterodimero con E2;

- E2 (gp53-56) è la glicoproteina virale maggiore e rappresenta il principale target degli anticorpi ad attività neutralizzante.

Tra le proteine non strutturali coinvolte nel processo di replicazione virale vengono annoverate:

- N^{pro} che ha attività di autoclivaggio dalle nascenti poliproteine;

- p7 la cui attività non è stata ancora del tutto chiarita, nonostante si pensi sia importante per la produzione del virus ma non per la replicazione dell'RNA;

- NS2 (p54) ad attività ricombinogena;

- NS3 (p80) che presenta tre attività di tipo enzimatico, essenziali per la replicazione virale, la serina proteasi, l'elicasi e la NTPasi.

NS2 e NS3 (Elahi S. M e coll, 1999) risultano ben distinte nel caso del biotipo BVDV citopatico, mentre costituiscono un complesso proteico unico, denominato NS2-3 nel caso del BVDV non citopatico;

- NS 4A (p10), verosimilmente cofattore dell'attività serina proteinasica di NS3;

- NS 4B (p30) che ha attività di ancoraggio alla membrana durante la fase di replicazione virale;
- NS 5A (p58) che fa parte del complesso di replicazione virale;
- NS 5B (p75) che rappresenta la RNA polimerasi Rna-dipendente.

Patogenesi

A seguito dell'infezione acquisita per via digerente e/o respiratoria, il virus replica a livello delle mucose, replicazione cui consegue una fase viremica nella quale il virus è veicolato per mezzo dei linfociti, la viremia può durare fino a 14 giorni.

Il tropismo del BVDV per il tessuto linfoide trova riscontro nelle tipiche lesioni a carattere emorragico e ulcerativo, che interessano l'apparato gastroenterico, in particolare a carico delle placche del Peyer e delle stazioni linfonodali.

L'attività del BVDV nei confronti della componente linfopoietica è inoltre testimoniata dalla linfopenia che caratterizza le fasi acute d'infezione ed è causa dello stato di immunocompromissione che assume comunque carattere transitorio.

L'infezione in soggetti normoergici raramente esita in malattia grave e solitamente il decorso è fausto.

Nei soggetti adulti, molto spesso l'infezione è asintomatica e si limita a produrre una linfopenia, anche marcata, ma sempre transitoria. Sono descritte, inoltre, forme cliniche di gravità variabile, coinvolgenti apparati diversi, fra cui quello respiratorio, dovute al concorso di agenti

patogeni secondari che trovano nella compromissione immunitaria del bovino la condizione per manifestare a pieno la loro capacità infettante ed estrinsecare il loro potere patogeno (Baker J, 1987). Nel caso in cui il ceppo di BVDV infettante sia dotato di elevata patogenicità, come si verifica negli stipiti di tipo 2 ma non solo, ovviamente il quadro clinico conseguente all'infezione può assumere connotati di particolare gravità, esacerbando i caratteri tipici della malattia. Nel corso di episodi caratterizzati da sindrome emorragica, la spiccata

trombocitopenia osservata non sembra originare da un difetto nella produzione delle piastrine indicativo di una compromissione del midollo osseo, ma piuttosto da una specifica attività periferica del virus su questa particolare frazione ematica. Al contrario, l'infezione sperimentale di vitelli privati del colostro con BVDV tipo 2, ha dimostrato un'evidente compromissione di funzionalità del midollo osseo, con soppressione della produzione di piastrine e iperplasia dei megacariociti (Baker,1987). La linfopenia rappresenta comunque una costante in corso d'infezione da BVDV tipo 1 e tipo 2. Il BVDV è eliminato per via escretoria e secretoria, e può essere isolato nella saliva, nello scolo nasale, nelle urine e nelle feci. Successivamente all'infezione consegue la produzione di anticorpi ad attività neutralizzante diretti verso le proteine strutturali e non, che si espongono al sistema immunitario durante la fase di replicazione del virus.

L'infezione durante il periodo preovulatorio causa danni transitori al follicolo e alterazioni al corpo luteo conseguente, provocando una marcata riduzione della fertilità negli animali colpiti fino alla comparsa di anticorpi siero neutralizzanti (Fray MD e Coll, 2000; McGowan e Coll, 2003)

L'infezione della bovina durante i primi 18 giorni di gravidanza non comporta particolari problemi per il feto non ancora impiantato perché il virus non è in grado di passare la zona pellucida (Moennig and Liess, 1995), mentre se l'infezione avviene tra il 19° e il 41° giorno di gravidanza, il feto subisce l'infezione attraverso i cotiledoni attraverso i quali il virus in fase viremica passa al feto, causandone spesso la morte (Carlsson e Coll., 1989; McGowan e Coll., 1993),

L'infezione di bovine tra 80° e il 150° giorno di gravidanza causa malformazioni fetali in vari distretti tra cui il sistema nervoso centrale, in base alla gravità delle lesioni possono nascere vitelli malformati o verificarsi aborti.

L'infezione della bovina gravida da parte di BVDV NCP tra il 30° e il 120° giorno di gravidanza, può determinare la nascita di vitelli immunotolleranti e persistentemente infetti (PI) a seguito di infezione transplacentare, poiché in questo periodo di gestazione il sistema immunitario del feto sarà portato a considerare il virus infettante come parte integrante dell'organismo e di conseguenza, non produrrà un'attiva e specifica risposta immune. Il feto non sarà quindi in grado di riconoscere il virus come estraneo all'organismo e di reagire con l'attivazione delle reazioni immunologiche connesse alla stimolazione degli antigeni virali. Il risultato finale è la nascita di un vitello, immunotollerante che risulterà sieronegativo e infetto, viremico persistente (PI). Tali soggetti mantengono la circolazione virale nel focolaio.

Le bovine gravide di un feto persistentemente infetto possono costituire quindi la cosiddetta "Trojan cow" per l'introduzione del virus in un allevamento. La "Trojan cow" risulterà virus-negativa e sieropositiva, quindi non differenziabile diagnosticamente da una bovina immunizzata gravida di un feto sano. È stato rilevato che le "Trojan cows" mostrano mediamente dei livelli anticorpali più elevati rispetto alle bovine immunizzate gravide di un feto sano (Lindberg, A e Coll 2002). Tale riscontro è biologicamente compatibile per la continua stimolazione immunitaria della madre da parte del feto PI. Tuttavia, i tentativi fatti per cercare di distinguere le "Trojan cows" dalle bovine immunizzate gravide di un feto sano hanno avuto uno scarso successo (Brownlie e Coll., 1998). Un

metodo alternativo per rilevare le “Trojan cows” è quello di ricercare la presenza del virus nel liquido amniotico o allantoideo prelevato mediante una centesi intrauterina. Tuttavia, il metodo, pur essendo probabilmente più sensibile rispetto alla valutazione dei titoli anticorpali, risulta essere costoso, anche a causa della necessità di sedare l’animale (Lindberg e Coll 2002).

Gli animali immunotolleranti possono manifestare la forma clinica della Malattia delle Mucose, in caso intervenga una superinfezione da BVDV citopatico con caratteristiche antigeniche omologhe a quello che ha causato la condizione di immunotolleranza. Il decorso della malattia è spesso mortale (Bolin e Coll., 1985).

Risposta immunitaria

Immunità innata

I meccanismi immunitari aspecifici ed innati, che intervengono nella fase primaria di difesa nei confronti delle infezioni, sono attivi nei confronti dell'infezione da BVDV, ma sono anche bersaglio del virus. Infatti, il BVDV può infettare le cellule del sistema immunitario innato (neutrofili, monociti, macrofagi e cellule dendritiche) alterarne la funzione fagocitaria, chemio tattica e citotossica (Potgieter LN 1995; Welsh MD e Coll 1995), e ridurre il numero di monociti attivi. Le citochine, come IL-2 e IFN, e le cellule presentanti l'antigene (monociti e macrofagi) hanno un ruolo importante nella risposta aspecifica e nella modulazione della risposta immunitaria verso BVDV.

Risposta umorale

Nella protezione nei confronti dell'infezione da BVDV risulta attiva sia l'immunità passiva di origine colostrale che l'immunità attiva conseguente a vaccinazione o infezione naturale. La risposta umorale è rilevabile a partire dalle 2-3 settimane post infezione e raggiunge il massimo livello dopo circa 10-12 settimane (Howard CJ e Coll 1992). Gli anticorpi neutralizzanti, fondamentali nei meccanismi di protezione, sono diretti verso le tre maggiori glicoproteine strutturali (gp53/E2, gp48Erns, gp25/E1). Sono stati rilevati anticorpi verso altre proteine, ma non hanno importanza nei meccanismi di protezione. Gli anticorpi sono importanti nella prevenzione della viremia post-infezione. L'infezione naturale stimola la comparsa di anticorpi anche verso le proteine non strutturali

NS3-3. Questo non avviene nei soggetti immunotolleranti e persistentemente infetti.

Risposta cellulo mediata

Il BVDV è in grado di compromettere la risposta cellulo-mediata a causa della linfopenia che provoca in seguito ad infezione. In base al tipo di virus che sostiene l'infezione si ha una riduzione della risposta cellulo-mediata dal 50 al 60% (Brodersen BW e Coll 1999; Archambault D e Coll 2000), con particolare diminuzione dei linfociti T citotossici (CD8+). La risposta cellulo-mediata indotta dai biotipi cp e ncp risulta differente. I ceppi ncp tendono a deviare la risposta verso la produzione di linfociti Th2 e di inibire la produzione di alti livelli di immunità cellulomediata sostenuta da linfociti T citotossici (Rhodes SG e Coll, 1999). Al contrario, i ceppi BVDV cp inducono un'elevata risposta cellulo-mediata, mediante una sovra-regolazione dei recettori (IL-2R) in risposta ad aumentati livelli di IL2.

Risposta immunitaria degli animali persistentemente infetti

Gli animali persistentemente infetti sono tolleranti dal punto di vista immunitario nei confronti del ceppo che ha causato lo stato di immunotolleranza, ma possono produrre una risposta attiva verso altri ceppi di BVDV eterologhi. È possibile che tali animali sviluppino una risposta anticorpale siero neutralizzante a basso titolo nel caso in cui incontrino ceppi virali antigenicamente distanti dal quello responsabile dell'immunotolleranza (Fulton RW e Coll 2003). Al contrario in tali animali è totalmente assente la produzione di anticorpi verso le proteine NS2-3, in quanto estremamente conservate in tutti i pestivirus.

Forme cliniche

Ad oggi si conoscono tre forme cliniche legate a BVDV:

- Malattia delle Mucose
- Diarrea virale
- Sindrome emorragica.

Malattia delle Mucose

Colpisce prevalentemente animali di età compresa in media tra i 6 e i 24 mesi e immunotolleranti e PI. È caratterizzata da una bassa morbilità e alta mortalità dei soggetti colpiti. I vitelli immunotolleranti e PI alla nascita non presentano alcun segno clinico particolare, se non talvolta dimensioni ridotte e inappetenza, che si traduce in crescita stentata nelle prime settimane di vita che si aggrava nei mesi successivi. La maggior parte dei vitelli non manifesta alcun sintomo sino all'insorgere della malattia. Uno dei sintomi principali della Malattia delle Mucose sono lesioni ulcerative della mucosa del cavo orale, talvolta sono rilevabili solo arrossamenti e lievi infiammazioni. Altro sintomo caratteristico è la diarrea di intensità variabile, fibrinosa o emorragica. Patognomoniche sono le lesioni necrotiche interdigitali.

Il decorso della malattia è variabile, ma la maggior parte degli animali muore in 1-3 settimane.

Il quadro anatomico-patologico presenta lesioni ulcerative a tutto l'apparato digerente, dalla mucosa della cavità orale, sottomucosa abomasale, placche del Peyer a livello intestinale.

Diarrea Virale Bovina

L'ingresso del BVDV in un allevamento indenne causa sintomi diversi correlati al tempo che passa tra l'infezione e la comparsa degli stessi.

Negli animali adulti si riscontra calo di fertilità, aumento degli aborti (tra 4° e 6° mese di gestazione), mortalità neonatale e vitelli malformati.

Dopo circa un anno dall'ingresso del virus si possono verificare episodi di Malattia delle Mucose.

L'infezione causa ipertermia, dopo un periodo di incubazione di 3-5 giorni, seguita da linfopenia.

La siero conversione si ha in 2-3 settimane e raggiungono il titolo massimo in 10 settimane. Di solito la morbilità negli adulti è scarsa e la guarigione avviene in circa due settimane. Negli animali giovani si possono verificare episodi di diarrea transitori complicati da altri patogeni a causa della linfopenia.

Sindrome Emorragica

Segnalata in corso di episodi acuti causati da BVDV, colpisce in prevalenza giovani animali ma è stata riscontrata anche in animali adulti. Il decorso è grave e la malattia è pressoché costantemente ad esito letale (la mortalità varia in funzione della tempestività delle scelte terapeutiche).

Il quadro clinico è dominato da una marcata trombocitopenia che esita in una sindrome emorragica connotata da diarrea sanguinolenta ed epistassi associata a febbre e marcata leucopenia.

A causa della trombocitopenia, che circa due settimane dopo l'infezione raggiunge i valori più critici (il numero dei trombociti durante le gravi emorragie sistemiche scende al di sotto di 50 g/l), la diatesi emorragica si manifesta con petecchie emorragiche ed emorragie estese su cute e mucose (congiuntiva, sclera, mucose nasali, gengivali, prepuziali, vaginali). I primi segni si hanno spesso quando, dopo iniezioni o punture di insetti, continua ad essere presente una modesta fuoriuscita di sangue.

All'esame necroscopico gli animali colpiti evidenziano una diatesi emorragica diffusa a mucose e sierose con presenza di sangue non coagulato nelle cavità, tutti fenomeni riportabili ad una spiccata trombocitopenia (Pellegrin C e Coll, 1994). Tutti i casi esaminati hanno portato all'isolamento del BVDV tipo 2 NCP. L'agente risponde ai postulati di Koch, sempre attuali nel determinare il rapporto causale in corso di malattia a carattere infettivo. In particolare, l'inoculazione in vitelli sensibili del virus isolato in corso di sindrome emorragica ha riprodotto il

quadro clinico. Al contrario, vitelli provvisti di immunità si sono dimostrati protetti nei confronti dell'infezione sperimentale

Diagnosi

Esistono diversi metodi per diagnosticare la presenza di animali infetti in allevamento. La ricerca può essere condotta in maniera indiretta o diretta, frequentemente, nell'animale in vita, su campioni ematici o biopsie cutanee.

Ricerca Ag BVD su tutti gli animali mediante ELISA o RT-PCR

Prevede un prelievo di sangue da mantenere in provette con anticoagulante (Sodio Citrato o EDTA) da effettuare su tutti gli animali all'interno di un allevamento. Sui suddetti campioni ematici viene poi eseguito a scelta o una tecnica ELISA o una RT-PCR, classica o Real Time, volte alla ricerca del virus agente di BVD-MD. Tali metodiche possono essere condotte anche su biopsie cutanee effettuate a livello del padiglione auricolare (ear notch), nel qual caso può essere utilizzata anche l'immunoistochimica, tecnica quest'ultima molto diffusa negli Stati Uniti d'America (Driskell and Ridpath, 2006).

Ricerca Ag BVD su tutti gli animali mediante RT-PCR su pool di sangue in toto o su latte di massa

Prevede un prelievo di sangue da mantenere in provette con anticoagulante (Sodio Citrato o EDTA) da effettuare su tutti gli animali all'interno di un allevamento o, in alternativa, l'esame del latte di massa.

I pool di sangue sono ottenuti unendo quantità di sangue equivalenti provenienti da un numero di campioni che può variare da 5 a 50 (Yan e Coll., 2011). Munoz-Zanzi e Coll. (Munoz-Zanzi e Coll 2000) hanno indicato che la strategia economicamente più proficua potrebbe essere quella di effettuare pool di 20 campioni e, per eventuali pool positivi, di analizzare dei sub-pool di 5 campioni.

Sui pool viene solitamente eseguita una RT-PCR, classica o Real Time, volta alla ricerca del virus agente di BVD-MD (Gilbert e Coll 1999). Dai pool risultati positivi si procede in seguito all'identificazione in singolo dei capi viremici mediante tecnica ELISA o RT-PCR, classica o Real Time.

L'RT-PCR può essere utilizzata anche per la rilevazione della presenza in allevamento di animali PI, attraverso l'analisi del latte di massa. È stato stimato che la dimensione massima teorica di un allevamento nel quale è possibile rilevare la presenza di un singolo animale PI è pari a 5000 vacche in mungitura (Radwan e Coll., 1995). Tuttavia, in pratica è stato riportato che la possibilità di rilevare animali PI è compresa nel seguente range: da 1 PI/132 animali sani a 2 PI/800 animali sani (Drew e Coll., 1999; Renshaw e Coll., 2000; Hill e Coll., 2010). Gli animali dell'allevamento non in lattazione dovranno necessariamente essere testati separatamente, mediante prelievo di sangue o biopsia cutanea.

Indagine sierologica per anticorpi verso NS2-3 su tutti i capi presenti e ricerca di Ag BVD sui soggetti sieronegativi su sangue in toto

Prevede un prelievo di sangue (in provette senza anticoagulante) da effettuare su tutti gli animali all'interno di un allevamento. Sui sieri di suddetti prelievi viene effettuata un'indagine sierologica mediante tecnica ELISA rivolta alla ricerca degli anticorpi verso NS2-3, indicativi, se presenti, di attiva circolazione virale.

Per gli animali risultati sieronegativi verrà richiesto un ulteriore prelievo di sangue, da mantenere questa volta in provette con anticoagulante (Sodio Citrato o EDTA), su cui verrà eseguito un altro test ELISA volto alla ricerca del virus agente di BVD-MD.

Ricerca Ag BVD mediante ELISA o RT-PCR su sangue in toto o biopsia cutanea (ear notch) su vitelli neonati

Prevede un prelievo di sangue da mantenere in provette con anticoagulante (Sodio Citrato o EDTA) o una biopsia cutanea effettuata a livello di orecchio (ear notch), da eseguire sui vitelli neonati all'interno di un'azienda (Wolf G, 2004).

Sul campione di sangue in toto viene effettuato a scelta o un test ELISA o una RT-PCR, classica o Real Time, volti alla ricerca del virus.

Sul campione biotipico viene effettuata una RT-PCR, classica o Real Time, volta alla ricerca del BVDV a livello cutaneo.

Materiali e metodi

Le bovine reclutate per lo studio state complessivamente 13, di età compresa tra 4 e 20 mesi di età, di razza frisona (12) o reggiana (1), provenienti complessivamente da 9 aziende da latte delle provincie di Parma, Reggio Emilia, Cremona, Mantova.

In dettaglio, i dati relativi agli allevamenti presso i quali sono stati reclutati gli animali sono i seguenti:

Soc. Agr. Cascina Malvasia, Pessina Cremonese (CR): 1 bovina di 7 mesi di vita

Az. Agr. Zaghen Ernesto, Sergnano (CR): 1 bovina di 12 mesi

Az. Agr. Messori Stefano, Correggio (RE): 1 bovina di 10 mesi

Az. Agr. Broletto, Albinea (RE): 1 bovina di 20 mesi

Az. Agr. Mazza Andrea, Motteggiana (MN): 2 bovine di 10 mesi e 15 mesi

Az. Agr. Montali Giorgio, Traversetolo (PR): 1 bovina di 2 mesi

Az. Agr. Mozzi Carlo, Roncole Verdi (PR): 4 bovine tra 6 e 20 mesi

Az. Agr. La Guarnera, Acqualunga Badona (CR): 2 bovine di 11 mesi

A seguito dell'identificazione, tutte le bovine reclutate sono state trasportate presso il Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie dell'Università di Parma e ricoverate nella sezione di isolamento dell'Ospedale Veterinario Universitario Didattico. Due delle bovine reclutate non hanno potuto concludere la prova, una bovina dell'azienda Mazza è morta a causa di peritonite e ascessi epatici ed una

bovina dell'azienda Mozzi è morta per enterite cronica sostenuta da coccidi. Entrambe le bovine morte sono state sottoposte a necropsia presso l'Unità di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie (già sezione di Anatomia Patologica della Facoltà di Medicina Veterinaria) dell'Università di Parma. Le restanti 9 bovine hanno portato a termine la prova secondo i tempi previsti.

Il progetto di ricerca prevedeva quindi di valutare gli effetti della vaccinazione, effettuata con vaccino BOVILIS BVD (MSD), contenente BVDV CP di tipo 1 ceppo C86 inattivato, sui livelli di viremia. A tale scopo sugli animali reclutati è stato applicato il seguente protocollo:

- Durante le prime due settimane dopo il trasporto sugli animali non sono stati effettuati interventi, escluso un prelievo per ulteriore conferma della immunotolleranza e della persistenza dell'infezione.
- Monitoraggio di viremia e titoli anticorpali sieroneutralizzanti per 14 giorni.
- Priming vaccinale con vaccino BVD inattivato (T0).
- monitoraggio della viremia e dei titoli anticorpali sieroneutralizzanti per 20 giorni
- Booster vaccinale con vaccino BVD inattivato (T20)

- Monitoraggio di viremia e titoli anticorpali siero neutralizzanti fino a (T56)
- Due degli 11 animali che hanno concluso la prova non sono stati vaccinati e sono stati utilizzati come controllo negativo. Il monitoraggio degli animali non vaccinati è stato effettuato rispettando lo stesso protocollo di campionamento utilizzato per gli animali vaccinati.

Lo stato di immunotolleranza e la persistenza di infezione nelle bovine incluse nello studio è stato preventivamente accertato e successivamente confermato mediante l'applicazione ripetuta di ELISA indiretto/sieroneutralizzazione e di una nested-multiplex-RT-PCR, rispettivamente.

ELISA indiretto

Il test utilizzato per la verifica dello stato di immunotolleranza, oltre alla prova di sieroneutralizzazione virale, è un ELISA indiretto (BVD/MD P80 - Antikörper, Pourquier), mirato alla ricerca degli anticorpi verso NS2-3 (p80), indicativi di attiva circolazione virale. Il test, è un ELISA in micropiastra di tipo competitivo.

Le micropiastre sono rivestite con proteine p80 immobilizzate nei pozzetti con un anticorpo specifico (WB103). I campioni di siero da esaminare vengono diluiti e incubati nei pozzetti. Dopo l'incubazione del campione nei pozzetti, gli anticorpi specifici verso la p80 eventualmente presenti nel siero formano immunocomplessi con la proteina p80 stessa. In seguito ad un opportuno lavaggio, viene aggiunto un anticorpo anti-p80 coniugato con perossidasi del rafano (HRP, horseradish-peroxidase). In presenza della proteina p80 già legata agli anticorpi sierici, il

legame del coniugato ai suoi epitopi target sulla micropiastra è impedito. Al contrario, in assenza di anticorpi anti-p80 specifici nel siero, il coniugato è libero di legarsi ai suoi epitopi corrispondenti immobilizzati nel pozzetto. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio e si aggiunge il substrato tetrametilbenzidina (TMB). In presenza dell'enzima, il substrato è ossidato e sviluppa una colorazione blu, che diventa gialla dopo l'aggiunta della soluzione acida di arresto. L'assorbanza alla lunghezza d'onda di 450 nm viene misurata con uno spettrofotometro. Lo sviluppo del colore è inversamente proporzionale alla quantità di anticorpi anti-p80 nel campione.

La rilevanza diagnostica del risultato è ottenuta confrontando l'assorbanza (o densità ottica) del campione con l'assorbanza media del controllo negativo.

Il test è stato eseguito su emosiero, utilizzando il protocollo indicato dal produttore.

Nested-multiplex-RT-PCR

La metodica classica di RT-PCR utilizzata è quella precedentemente descritta da Gilbert e collaboratori (Gilbert SA e Coll 1999), con alcune modifiche. La procedura prevede l'utilizzo di primers che permettono l'amplificazione di una porzione del gene NS5B di BVDV. La RT-PCR è stata effettuata su sangue prelevato in presenza di EDTA.

La procedura di amplificazione del DNA virale ha previsto le seguenti fasi:

- a) Estrazione dell'RNA
- b) Retrotrascrizione
- c) PCR (prima amplificazione)

d) PCR (Multiplex)

a) Estrazione dell'RNA:

Cento μl di sangue sono stati prelevati, trasferiti in una eppendorf, sospesi in 1 ml di triazolo (Invitrogen) ed immediatamente agitati a fondo mediante vortex .

Dopo 10 minuti di incubazione a temperatura ambiente sono stati aggiunti 200 μl di cloroformio e si è provveduto ad agitare nuovamente con vortex.

Dopo altri 10 minuti di incubazione a temperatura ambiente si è centrifugato in microfuge (MicroCL 17 centrifuge, Thermo Scientific) a 17 x g per 10 minuti.

Il sovrnatante (circa 600 μl) è stato quindi prelevato, ponendo attenzione a non prelevare l'interfaccia, trasferito in una nuova provetta e diluito 1:1 con isopropanolo.

Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, il campione è stato centrifugato a 17 x g per 10 minuti.

Il sovrnatante è stato eliminato ed il pellet è stato lavato (senza risospenderlo) con 500 μl di etanolo in acqua trattata con dietilpirocarbonato (DEPC- H₂O).

Si è quindi ricentrifugato per 1-2 minuti a 17 x g e si è eliminato il sovrnatante.

Dopo un'ulteriore brevissima centrifugazione per eliminare eventuali gocce adese alla parete della provetta, il campione è stato risospeso in 50 μl di DEPC- H₂O.

b + c) Retrotrascrizione e prima amplificazione (combinata in single step):

Nella prima fase di questo passaggio, con l'incubazione a 30°C, viene formato del c-DNA virale, quindi sul retrotrascritto, all'interno dello stesso mix di reazione,

viene eseguita una prima PCR. L'acqua presente nel mix di reazione è trattata con dietilpirocarbonato.

Due µl di RNA estratto sono stati addizionati al volume finale di reazione (50 µl totali) contenente 2.5 mM MgCl₂, PCR Buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.4], 50 mM KCl), 0.2 mM desossinucleotidi trifosfato (dNTPs, Invitrogen), 0.5 µM di primers (5'AAGATCCACCCTTATGA(A/G)GC3' sense A, derivato dal nucleotide 10385 al 10404 e 5'AAGAAGCCATCATC(A/C)CCACA3' antisense A, derivato dal nucleotide 11528 all'11547), 10 U di inibitori dell'RNAasi (Rnase OUT - Invitrogen), 50 U di Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MuLV, Invitrogen) e 1.5 U di *Taq* DNA polimerasi (Invitrogen).

Il protocollo termico delle diverse fasi della retrotrascrizione/PCR è il seguente:

- retrotrascrizione alla temperatura di 37 °C per 30 minuti.
- denaturazione alla temperatura di 94 °C per 5 minuti
- 30 secondi a 94°C (denaturazione), 30 secondi a 50°C (annealing) e 30 secondi a 72°C (estensione), per 30 cicli
- estensione finale a 72 °C per 15 minuti

d) PCR Multiplex

Sull'amplicon prodotto mediante la prima PCR è stata effettuata una PCR multiplex, che permette di genotipizzare il BVDV eventualmente presente come tipo I o tipo II.

Due µl dell'amplicon sono stati aggiunti al mix di reazione (volume finale 50 µl), contenente 2.5 mM MgCl₂, PCR Buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.4], 50 mM KCl), 0.2 mM desossinucleotidi trifosfato (dNTPs, Invitrogen), 0.5 µM di primers (5'

TGGAGATCTTTCACACAATAGC 3' BVDV-1 specifico, derivato dal nucleotide 10758 al 10779, 5' GGGAACCTAAGAACTAAATC 3' BVDV-2 specifico, derivato dal nucleotide 10514 al 10533 e 5' GCTGTTTCACCCAGTT(A/G)TACAT 3' aspecifico, derivato dal nucleotide 11096 all'11117) e 1.5 U di *Taq* DNA polimerasi (Invitrogen).

Il protocollo termico delle diverse fasi della PCR multiplex è il seguente:

- denaturazione alla temperatura di 94°C per 5 minuti
- 30 secondi a 94°C (denaturazione), 30 secondi a 50°C (annealing) e 30 secondi a 72°C (estensione), per 30 cicli
- estensione finale a 72 °C per 15 minuti

Gli amplificati sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%, in presenza di bromuro di etidio (Fig. 1).

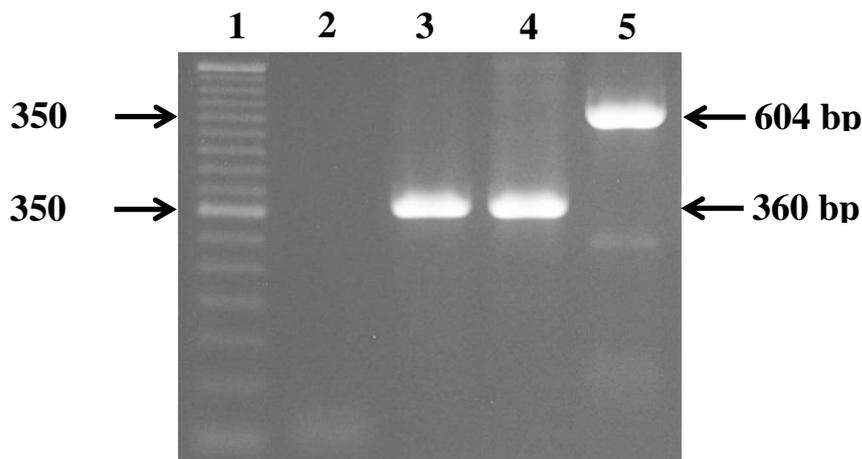


Fig 1: Immagine rappresentativa dei risultati della nested-multiplex-RT-PCR per la ricerca di BVDV. Pozzetto 1: standard molecolari; pozzetto 2: controllo negativo; pozzetto 3: controllo positivo per BVDV-1; pozzetto 4: campione positivo per BVDV-1; pozzetto 5 campione positivo per BVDV-2.

Sieroneutralizzazione

Il test di sieroneutralizzazione virale è stato effettuato sugli emosieri come segue. Venticinque microlitri di ciascun campione di siero sono stati aggiunti alla prima linea di pozzetti di micropiastre da 96 pozzetti. Venticinque microlitri di DMEM sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e, per ciascun siero testato, sono state effettuate diluizioni seriali in base 2. Sono stati inclusi sieri di controllo positivi e negativi. Venticinque microlitri di sospensione di virus contenente 100 TCID₅₀ di BVDV, ceppo NADL, sono stati aggiunti a ciascun pozzetto. Dopo 90 min di incubazione a temperatura ambiente, 50 µl di una sospensione di cellule MDBK sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e le piastre sono state incubate per 3 giorni a 37°C in atmosfera umidificata al 95% di aria-5% CO₂. La eventuale

manifestazione di attività virus-neutralizzante del siero è stata valutata, mediante microscopia ottica, con la ricerca della inibizione dell'attività citopatica del virus sul monostrato cellulare. I titoli anticorpali sieroneutralizzanti vengono espressi come reciproco della più alta diluizione del siero che inibisce completamente l'infettività virale.

Ogni campione è stato testato tre volte.

ELISA diretto

La viremia è stata valutata sui campioni di sangue mediante ELISA diretto (BVDV Ag/Serum Plus, IDEXX). L'IDEXX BVDV Ag/Serum Plus è un test immuno-enzimatico su micropiastra mirato alla rilevazione di antigeni di BVDV nel siero, plasma, sangue in toto e biopsia cutanea effettuata a livello dell'orecchio (ear notch). Anticorpi monoclonali specifici per BVDV (Erns) sono legati ai pozzetti della micropiastra ed il BVDV eventualmente presente nel campione viene catturato dagli anticorpi monoclonali. Dopo l'incubazione del campione nel pozzetto, il BVDV catturato viene rilevato da anticorpi specifici ed un coniugato con HRP. Successivamente, il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio e si aggiunge una soluzione di substrato cromogeno. In presenza di enzima, il substrato viene convertito in un prodotto che reagisce con il cromogeno per generare un colore blu. Dopo l'aggiunta della soluzione acida di arresto, viene generato un colore giallo. L'assorbanza alla lunghezza d'onda di 450 nm viene misurata con uno spettrofotometro. Il valore di assorbanza corretta dei campioni

viene calcolata utilizzando l'assorbanza ottenuta con il campione e corretta per l'assorbanza del controllo negativo.

Il test è stato eseguito su sangue in toto, prelevato in presenza di EDTA, utilizzando il protocollo indicato dal produttore. Ogni campione è stato testato almeno due volte. Per evitare distorsioni (bias), tutti i campioni di sangue temporalmente consecutivi dello stesso animale, prelevati prima e dopo la vaccinazione, sono stati testati nella stessa piastra.

Risultati e discussione

Il grafico riportato di seguito (Fig. 2) rappresenta l'andamento della viremia durante il periodo di osservazione in ognuno degli animali vaccinati coinvolti nella sperimentazione. I valori di assorbanza ottenuti e riportati nel grafico sono stati corretti per il valore del controllo negativo e, successivamente, normalizzati mediante il valore corretto del controllo positivo. I campioni sono stati valutati in duplicato o in triplicato ed i punti del grafico rappresentano i valori medi.

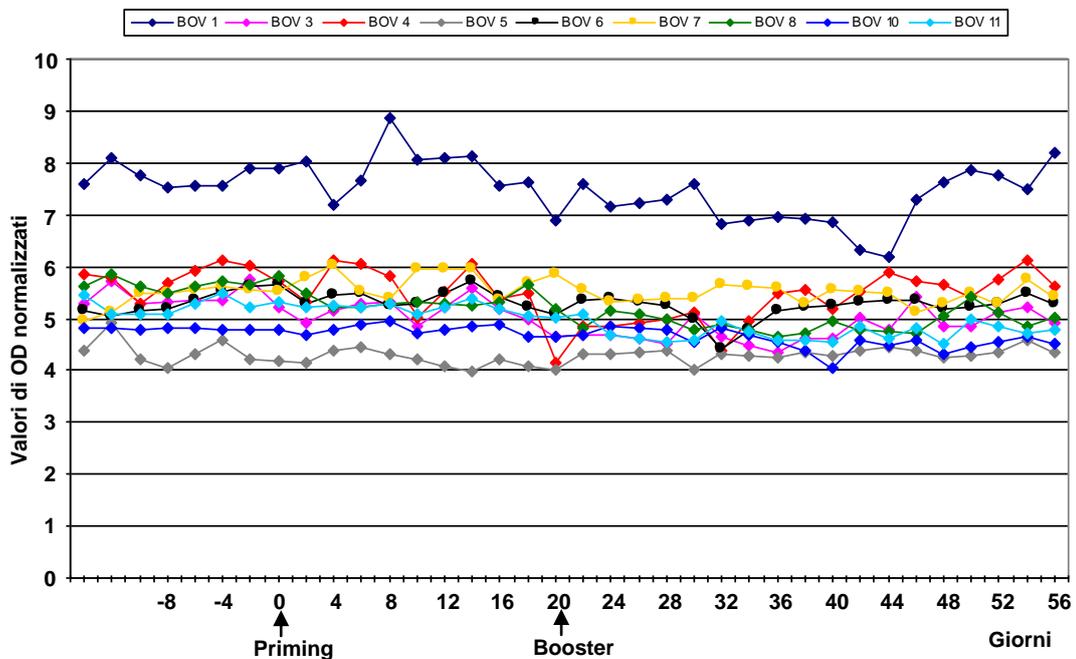


Fig. 2. Andamento della viremia nei singoli animali (bovine 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11).

I valori di OD che indicano il livello di viremia dei singoli animali restano elevati per tutto il periodo della prova. Bisogna infatti considerare che, stante la normalizzazione, il valore di OD dei controlli positivi del test è pari a 1, mentre quelli dei campioni di sangue dei singoli animali sono circa da 4 a 9 volte maggiori. Otto animali hanno livelli di viremia simili, mentre uno (BOV 1) presenta valori più elevati, nonché variazioni più marcate di viremia nel tempo. Tuttavia, anche per questo animale l'andamento complessivo della viremia non differisce sostanzialmente da quello degli altri soggetti.

Al fine di valutare meglio l'andamento globale della viremia per l'insieme degli animali testati (n=9), i dati ottenuti sono stati riportati graficamente, per ognuno dei tempi previsti per il campionamento, come valori medi dello scostamento dal valore basale medio di viremia, quest'ultimo calcolato come media dei valori di viremia pre-priming (da T-14 a T0). Per i dati di scostamento ottenuti è stato quindi calcolato il valore della deviazione standard (Fig. 3).

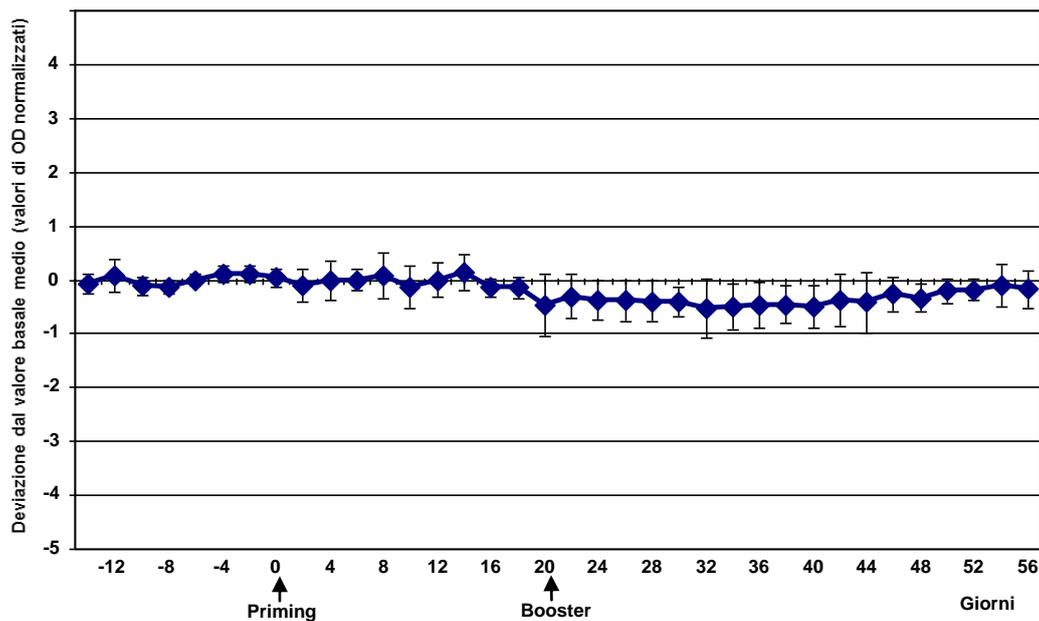


Fig. 3. Deviazioni della viremia, per l'insieme degli animali testati (n=9), rispetto al valore basale medio.

Dalla figura 3 emerge che c'è stata una riduzione della viremia, più marcata a partire dal giorno 20, per poi ritornare a valori vicini al valore basale dal giorno 54 in poi. La riduzione di viremia ottenuta è statisticamente altamente significativa ($p < 0,01$ - test t di Student) per i tempi da T20 a T52 e significativa ($p < 0,05$ - test t di Student) per i tempi T16, T18 e T56. Tuttavia, il livello di viremia rimane comunque elevato, come già evidenziato in Fig. 1. Inoltre, è da segnalare il fatto che la viremia inizia a scendere in maniera significativa ancora prima che venga effettuato il booster vaccinale. Due degli animali testati (BOV1 e BOV3) sono stati monitorati per un periodo più lungo (fino a 170 giorni post-priming) e sottoposti ad un ulteriore richiamo vaccinale. Anche in questo caso i livelli viremici non sono scesi in maniera sostanziale e l'ulteriore richiamo vaccinale non ha influito in misura significativa sulla viremia (dati non riportati).

Inoltre, è stato effettuato il monitoraggio di due vitelli immunotolleranti e persistentemente infetti non vaccinati, in veste di controllo negativo. I risultati ottenuti evidenziano un andamento della viremia analogo a quello degli animali vaccinati (Fig. 4).

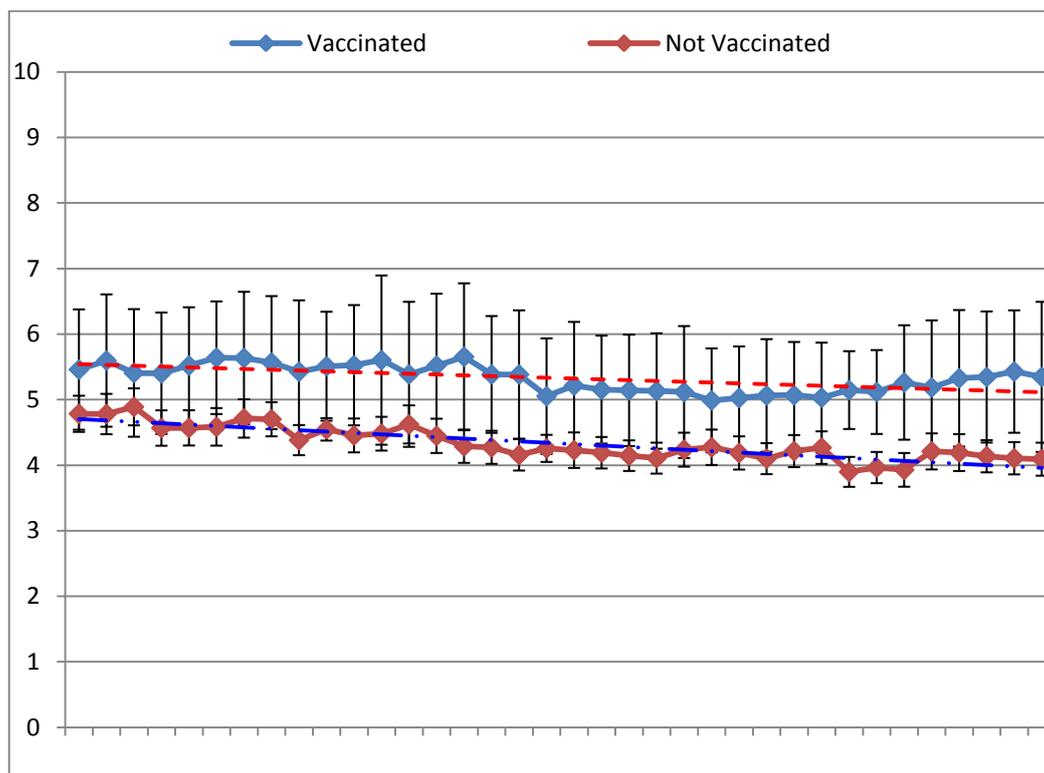


Fig 4: andamento della viremia degli animali vaccinati e non vaccinati

Le due linee corrispondono alla media dei valori di viremia dei 9 bovini vaccinati (linea azzurra) e dei 2 bovini non vaccinati (linea rossa). Per tutti gli 11 bovini sono stati rispettati gli stessi tempi di prelievo. I campioni di sangue sono stati analizzati come precedentemente illustrato.

Per quanto riguarda la risposta immunitaria umorale, gli animali si sono mantenuti sieronegativi per tutta la durata della prova. Ciò era in parte atteso, per il fatto che gli animali reclutati erano immunotolleranti nei confronti dei ceppi NCP che li infettavano. Effettivamente, la produzione di una risposta anticorpale è stata rilevata da altri autori in animali PI vaccinati contro BVDV, stante la diversità antigenica del ceppo vaccinale rispetto al virus persistentemente infettante (Bolin e Coll., 1985). Tuttavia, la vaccinazione di animali PI con vaccino vivo appare essere maggiormente efficace, in termini di produzione di anticorpi virus neutralizzanti, rispetto alla vaccinazione con vaccino spento (Bolin e Coll., 1985). Nondimeno, la vaccinazione con vaccini vivi, che contengono BVDV citopatogeno, può portare allo sviluppo di MD in caso di somministrazione ad animali PI (Bolin e Coll., 1985). Ciò è in accordo con l'assunzione che la MD possa, eventualmente in presenza di altri fattori favorenti, essere indotta in un animale PI da BVDV NCP a seguito di superinfezione con ceppo di BVDV CP antigenicamente omologo. Per tale ragione, oltre alla fondamentale necessità di non alterare i livelli di viremia nell'animale vaccinato a causa della somministrazione di virus vivo, ai fini dell'immunizzazione degli animali testati è stato utilizzato un vaccino spento.

La riduzione della viremia osservata, sia negli animali vaccinati che in quelli di controllo, non è stata tale da pregiudicare la possibilità di rilevare gli animali PI mediante ELISA. Dal momento che i piani vaccinali solitamente non prevedono l'individuazione degli animali PI dell'allevamento prima della vaccinazione, è particolarmente utile che tali animali possano essere agevolmente identificati anche dopo un eventuale trattamento vaccinale.

Tale osservazione assume importanza in relazione al fatto che è stato ormai chiarito che gli individui PI, i quali sono continui escretori del virus, sono una sorgente primaria di trasmissione dell'infezione. Tali animali possono essere individuati mediante la ricerca dell'antigene con diversi test diagnostici (RT-PCR, ELISA, immunoistochimica o isolamento virale), eccetto che nella fase immediatamente post-natale, nella quale gli antigeni virali possono essere mascherati dagli anticorpi materni (Lanyon e Coll, 2013). L'individuazione di questi animali diventa quindi un obiettivo fondamentale per l'eradicazione della malattia. A tal fine sono stati applicati piani di controllo, che prevedono l'individuazione e l'eliminazione (test and cull) degli animali PI, in molti paesi, tra cui Austria, Scozia, Paesi Bassi, Norvegia, Danimarca, Svezia, Svizzera, Slovenia, Germania, Francia, Irlanda, Finlandia ed Italia (Lanyon e Coll, 2013).

La ricerca degli animali PI nell'allevamento viene spesso condotta inizialmente su pool di campioni, solitamente da 5 a 20 campioni per pool a seconda della tecnica usata, al fine di ridurre i costi. La capacità dei test di individuare l'antigene virale nel pool è ovviamente ridotta rispetto all'analisi dei singoli campioni, a causa della prevedibile diluizione del virus. Se si fosse verificata una forte riduzione dei livelli di viremia negli animali PI a seguito di vaccinazione, ciò avrebbe potuto ridurre ulteriormente la possibilità di individuare eventuali pool positivi. Tale valutazione potrà essere condotta sui campioni raccolti. Tuttavia, possiamo già fare alcune considerazioni in merito. Nel presente lavoro i livelli di viremia sono stati valutati utilizzando la tecnica ELISA, che si è dimostrata sufficientemente sensibile ai fini dello studio. Le tecniche di RT-PCR, sia tradizionali che in real-time, sono considerate più sensibili dell'ELISA e risentono meno della presenza

di anticorpi materni colostrali (Lanyon e Coll, 2013), sono pertanto maggiormente indicate nelle strategia diagnostica in pool. Pertanto, è presumibile, in base ai risultati ottenuti, che la vaccinazione degli animali PI non influisca in maniera sostanziale sulla possibilità di individuare tali animali neanche a partire da pool di campioni, soprattutto nel caso in cui venga utilizzata la RT-PCR.

Conclusioni

A seguito di somministrazione di un vaccino inattivato, contenente un ceppo di BVDV (C86) in grado di indurre un'ampia produzione di anticorpi cross-neutralizzanti (Patel e Coll., 2004), è stata rilevata una transitoria riduzione, statisticamente significativa, della viremia in bovini PI. La riduzione della viremia non è stata comunque tale da pregiudicare la possibilità di rilevare gli animali PI. Inoltre, i titoli di viremia ottenuti negli animali controllo mostrano un andamento simile a quello degli animali vaccinati, caratterizzato da un graduale e moderato abbassamento della viremia, che rimane in ogni caso sempre ben più alta del limite di positività del test. Gli animali vaccinati non hanno peraltro prodotto anticorpi neutralizzanti contro BVDV. Il dato è compatibile con lo stato di immunotolleranza che gli animali PI da BVDV NCP presentano nei confronti del ceppo persistentemente infettante. Tuttavia, la determinazione del grado di omologia antigenica tra i ceppi di BVDV persistenti ed il ceppo vaccinale potrebbe fornire ulteriori indicazioni in merito ai risultati ottenuti. A tale fine, ulteriori indagini potranno essere svolte tramite il confronto della sequenza del gene E2 dei virus isolati nei bovini utilizzati per la prova con quella di BVDV C86, essendo E2 una glicoproteina dell'envelope che presenta epitopi importanti per la risposta immunitaria virus-neutralizzante dell'ospite.

Bibliografia

ARCHAMBAULT D, BELIVEAU C, COUTURE Y, CARMAN S, (2000). Clinical response and immune-modulation following experimental challenge of calves with type 2 noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *Vet Res*; 31:215-227.

BAKER J, (1987). Bovine viral diarrheha virus: a review. *J Am Vet Med Assoc*;190: 1449-1458

BAKER J, (1995). The clinical manifestation of bovine viral diarrhea infection. *The Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice*; 11(3): 425-443

BOLIN SR, MCCLURKIN AW, CUTLIP RC, CORIA MF (1985). Response of cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus to vaccination for bovine viral diarrhea and to subsequent challenge exposure with cytopathic bovine viral diarrhea virus. *Am J Vet Res*. 46:2467-2470

BROCK KV, GROOMS DL, RIDPATH J, BOLIN SR (1998). Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J Vet Diagn Invest*. 10:22-26

BRODERSEN BW, KELLING CL, (1999). Alteration of leukocyte populations concurrently infected with bovine respiratory syncytial virus and bovine diarrhea virus. *Viral Immunol*; 12: 323-334

BROWNLIE, J., HOOPER, L.B., THOMPSON, I., COLLINS, M.E., (1998). Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (bvdv) – the bovine pestivirus. *Clinical and diagnostic virology* 10, 141–150

DREW, T.W., YAPP, F., PATON, D.J., (1999). The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. *Veterinary Microbiology* 64, 145–154.

DRISKELL, E.A., RIDPATH, J.F. (2006). A survey of bovine viral diarrhoea virus testing in diagnostic laboratories in the United States from 2004 to 2005. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18, 600–605.

ELAHI S. M., SHEN S. H., HARPIN S., TALBOT B. G., ELAZHARY Y. (1999) Investigation of the immunological properties of the bovine viral diarrhoea virus protein NS3 expressed by an adenovirus vector in mice. *Archives of Virology*; 144 (6): 1057-70,.

FRAY MD, MANN GE, BLEACH EC,(2000). Bovine viral diarrhoea virus: its effects on ovarian function in cows. *Vet Microbial*; 77: 185-194.

FULTON WR, STEP DL, RIDPATH JF,(2003). Response of calves persistently infected with non cytopathic Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) sub type 1 after vaccination with heterologous BVDV strains in modified live vaccines and mannheimia haemolytica bacterin-toxoid. *Vaccine*; 21: 2980-2985.

GILBERT S. A., BURTON K. M., PRINS S. E., AND DEREGT D (1999). Typing of Bovine Viral Diarrhoea Viruses Directly from Blood of Persistently Infected Cattle by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*; 37 (6): 2020-2023,

HILL, F.I., REICHEL, M.P., TISDALL, D.J., (2010). Use of molecular and milk production information for the cost-effective diagnosis of bovine viral diarrhoea infection in New Zealand dairy cattle. *Veterinary Microbiology* 142, 87–89.

HOWARD CJ, CLARKE MC, SOPP P, BROWNLIE J,(1992). Immunity of Bovine viral diarrhoea virus in calves: the role of different T-cell subpopulation analyzed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopatol*; 32: 303 314.

KALAYGIOGLU A.T (2007). Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) diversity and vaccination. A review. *Veterinary Quarterly*, 29:2, 60-67

LANYON SR, HILL FI, REICHEL MP, BROWNLIE J. (2013). Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *Vet J.* pii: S1090-0233(13)00361-4. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.07.024. [Epub ahead of print]

LIESS B, FREY HR, ORBAN S, HAFEZ SM (1983). Bovine virus diarrhea (BVD)-mucosal disease: persistent BVD field virus infection in serologically selected cattle. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 90:261-266

LINDBERG, A., NISKANEN, R., GUSTAFSSON, H., BENGTTSSON, B., BAULE, C., BELAK, S., ALENIUS, S., (2002). Prenatal diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection by detection of viral RNA in fetal fluids. *The Veterinary Journal* 164, 151–155

MC GOVAN MR, KAFI M, KIRKLAND PD, (2003). Studies on the pathogenesis of bovine pestivirus induced ovaian dysfunction in superovulated dairy cattle. *Theriogeneology*; 59: 1051-1066

MUNOZ-ZANZI, C.A., JOHNSON, W.O., THURMOND, M.C., HIETALA, S.K., (2000). Pooled-sample testing as a herd-screening tool for detection of bovine viral diarrhoea virus persistently infected cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12, 195–203.

PATEL JR, DIDLICK S, QUINTON J (2005). Variation in immunogenicity of ruminant pestiviruses as determined by the neutralisation assay. *Vet J.* 169:468-472

PELLEGRIN C., VAN DER HURK J., LECOMTE J., TIJSSEN P (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortality . *Virology*; 203: 260-268,.

POTGIETER LN, (1995). Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am food Pract*; 13: 471-481

RADWAN, G.S., BROCK, K.V., HOGAN, J.S., SMITH, K.L., (1995). Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology* 44, 77–91.

RENSHAW, R.W., RAY, R., DUBOVI, E.J., (2000). Comparison of virus isolation and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk tank samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12, 184–186.

RHODES SG, COCKSEEDGE JM, COLLINS RA, MORRISON WI (1999).
Differential cytokine response of CD⁺ and CD8 T cells in response to bovine viral
diarrhea in cattle. J Gen Virol; 80: 1673-1679

RIDPATH J. F., BOLIN S. R., DUBOVI E. J(1994). Segregation of bovine viral
diarrhea virus into genotypes. Virology; 205: 66-74,.

SCATOZZA F., BUONAVOGLIA C. (1988), Trattato di Malattie Infettive degli
Animali, Seconda Edizione, UTET; 709-730,.

WELSH MD, ADAIR BM (1995). Effects of BVDV infection on alveolar
macrophage function. Vet Immunol Immunopathol; 46: 195-210

WOLF G.(2004) Diagnostik von BVDV-PI Kalbern in der kolostralen Phase:
quantitative Virusislierung, E^{ms} – und NS2/3-IFT (FACS) und RT-PCR aus
Blutproblem. AVID-Taging Proceedings, Kloster Banz, V15,

YAN, L., ZHANG, S., PACE, L., WILSON, F., WAN, H., ZHANG, M.,(2011).
Combination of reverse transcription real-time polymerase chain reaction and
antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of animals
persistently infected with Bovine viral diarrhea virus. Journal of Veterinary
Diagnostic Investigation 23, 16–25.