

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

DIPARTIMENTO DI SALUTE ANIMALE

SEZIONE DI MALATTIE INFETTIVE DEGLI ANIMALI

DOTTORATO DI RICERCA IN SALUTE ANIMALE

XX° CICLO

**STRATEGIE DI CONTROLLO DELL'INFEZIONE
DA VIRUS DELLA DIARRREA VIRALE DEL
BOVINO (BVDV) IN CONDIZIONI DI CAMPO**

**CONTROL STRATEGIES OF BOVINE VIRUS
DIARRHEA VIRUS (BVDV) INFECTION IN FIELD
CONDITIONS**

Tesi di Dottorato di:

Dr. Giorgio Valla

DOTTORATO DI RICERCA 2005-2007

INDICE

1.	Introduzione	4
2.	Cenni storici	5
3.	Il virus	7
4.	Patogenesi	10
5.	Quadri clinici	16
5.1.	Diarrea virale del bovino	16
5.2.	Malattia delle mucose	18
5.3.	Sindrome emorragica	21
5.4.	Trattamento dell'infezione da BVDV	22
6.	BVDV e comparto riproduttivo	22
6.1.	Effetti della BVDV sulla fertilità del toro	23
6.2.	Turbe riproduttive nella femmina	23
6.2.1	Alterazioni a carico dell'apparato riproduttivo	23
6.2.2.	Mortalità embrionale	24
6.2.3.	Aborto	25
6.3.	Malformazioni fetali	25
6.4.	Mortalità neonatale	26
6.5.	BVDV e tecnologie riproduttive	26
6.6.	Materiale seminale	27
6.7.	Apparato genitale femminile	28
7.	BVDV e risposta immunitaria	28
8.	Diagnosi	29
8.1.	Diagnosi clinica	29
8.2.	Diagnosi di laboratorio	30
8.2.1	Diagnosi indiretta	30
8.2.1.	Diagnosi diretta	33
8.3.	Interpretazione dei dati sierologici	38
9.	Dati epidemiologici	41
10.	Strategie di controllo	44
10.1.	Profilassi diretta	45
10.1.1.	Individuazione dell'allevamento infetto	45
10.1.2.	Individuazione degli animali con infezione persistente	48
10.1.3.	Monitoraggio aziendale	50

10.2.	Profilassi indiretta	51
10.2.1.	Tipologie di vaccini	52
10.2.2.	Vaccini e protezione fetale	54
10.2.3.	La vaccinazione associata alla ricerca degli animali PI	56
11.	Fattori critici nella gestione di un piano	57
11.1.	Organizzazione del piano	57
11.2.	Vitelli maschi destinati all'ingrasso	58
11.3.	Allevamenti con strutture separate	58
11.4.	Acquisto di animali e partecipazione a mostre e fiere	59
11.5.	Monitoraggio del latte di massa	59
11.6.	Viremia intermittente in animali PI	60
11.7.	Rimozione tardiva dei soggetti PI	60
11.8.	Corretta applicazione delle misure di biosicurezza	61
12.	Attività sperimentale: esperienze di controllo in campo	62
12.1.	Valutazione della sieroprevalenza iniziale	63
12.2.	Ricerca ed identificazione degli animali persistentemente infetti	64
12.3.	Applicazione di un protocollo vaccinale nei confronti di BVD	71
12.4.	Monitoraggio dei nuovi nati	72
13.	Discussione e conclusioni	78
14.	Bibliografia	81

1. INTRODUZIONE

Il “Bovine Viral Diarrea Virus” (BVDV) è riconosciuto come agente eziologico di patologie a carico del sistema riproduttivo, respiratorio, gastrointestinale, circolatorio, immunologico, linfatico, muscoloscheletrico, tegumentario e nervoso centrale. Uno dei punti critici dell'infezione, con importanti ricadute per quanto riguarda la prevenzione ed il controllo dell'infezione, è la patogenesi del BVDV ed in particolare l'esistenza ed il ruolo degli animali cosiddetti “persistentemente infetti” (PI). Rapidi progressi nell'area nella diagnostica hanno consentito di predisporre protocolli integrati volti ad identificare i soggetti persistentemente infetti (PI).

Attualmente lo sforzo scientifico è costantemente rivolto all'ulteriore affinamento della conoscenza delle peculiari caratteristiche, genetiche e biologiche, del virus, all'ulteriore approfondimento della patogenesi e dei quadri clinici legati all'infezione dei diversi biotipi e genotipi, alla raccolta di dati epidemiologici, al miglioramento degli strumenti diagnostici, alla definizione di interventi mirati di prevenzione e controllo della malattia e della possibile eradicazione della BVD su base aziendale, locale o territoriale (aree o Paesi).

Nel corso dell'ultimo decennio la consapevolezza della necessità di controllare e, se possibile, eradicare l'infezione è aumentata in modo significativo. Nei Paesi Scandinavi, sono stati ottenuti buoni risultati attraverso misure di controllo della BVD che prevedono l'identificazione e rimozione degli animali persistentemente infetti (PI) ed una regolamentazione restrittiva sulla movimentazione degli animali. Una volta che è stato raggiunto lo status di indennità, in questi Paesi è applicato un continuo monitoraggio sierologico allo scopo di rilevare in tempi rapidi un'eventuale nuova circolazione del virus.

Questo approccio eradicativo ha dimostrato di non essere facilmente realizzabile, e destinato ad un elevato rischio di fallimento, in Paesi o Regioni caratterizzate da un'elevata densità della popolazione bovina, da allevamenti di medie-grandi dimensioni e da un elevato interscambio di soggetti da riproduzione e/o da ingrasso. Questi fattori costituiscono un elevato rischio di introduzione del virus. Inoltre è stato evidenziato che, almeno in popolazioni bovine di una certa dimensione (in allevamenti della consistenza superiore ai 100 capi/azienda), la sola eliminazione degli animali PI non preclude in assoluto la circolazione virale (legata alla viremia transitoria ed all'infezione di lunga durata dei leucociti), che rimane presente ed attiva nella mandria anche in assenza di soggetti PI. In queste condizioni un piano di controllo efficace della BVD può e deve prevedere anche l'adozione di un adeguato

protocollo vaccinale, rivolto in particolare alla prevenzione dell'infezione transplacentare.

Scopo della presente tesi è la valutazione della fattibilità in condizioni di campo dell'applicazione della strategia di controllo ed eradicazione che si basa su un approccio vaccinale associato alla ricerca e rimozione degli animali persistentemente infetti (PI).

2. CENNI STORICI

Il primo focolaio nel bovino di “una nuova malattia apparentemente trasmissibile”, in seguito denominata “diarrea virale bovina” (BVD), fu osservato nel marzo del 1946 nello stato di New York (USA), nei pressi della città di Ithaca (Olafson R. e *Coll.*, 1946). L'animale colpito era una bovina di 4 anni, importata circa 2 anni prima dall'Inghilterra. I segni clinici manifestati dall'animale nell'immediato erano stati ricondotti a un episodio di classica diarrea invernale: diarrea acquosa, anoressia, brusca e grave caduta della produzione lattea, tutte associate a ipertermia. Nei 10 giorni successivi a questo episodio, 5 capi dello stesso allevamento morirono, manifestando analoga sintomatologia. All'indagine necroscopica, fu rilevata la presenza di lesioni a carattere erosiva in sede oro-esofaringea. Altri cinque allevamenti, ubicati nel raggio di 15 km dal primo focolaio, furono interessati in rapida successione dalla malattia. Nel corso di interventi terapeutici trasfusionali eseguiti sugli animali di uno degli allevamenti infetti, le indagini ematologiche evidenziarono una marcata leucopenia in soggetti emo-donatori ed emoriceventi, comunque apparentemente sani: veniva in tale modo evidenziato un carattere fondamentale carattere della BVD, e cioè l'immunodepressione. Negli allevamenti colpiti la morbilità oscillava dal 33 all'88% e la mortalità dal 4 all'8%: elevata morbilità e contenuta mortalità furono considerati un altro carattere peculiare dell'infezione.

Un ulteriore elemento clinico correlato alla malattia si palesò a breve, con la comparsa di aborto a diversi stadi di gravidanza in un elevato numero di bovine. La malattia nel giro di pochi mesi fu segnalata in altre aree degli USA, con prevalenze più elevate in Indiana e Iowa. Una quota elevata dei bovini sieropositivi, in seguito a infezione, risultava completamente a sintomatica.

Il virus BVD originale isolato da Olafson-Fox, andò perso, ma altri due stipiti furono successivamente isolati in corso di episodi di BVD verificatisi nello Stato di New York, denominati BVD-NY1 e BVD-NY2. Tali stipiti furono utilizzati nel corso

d'infezioni sperimentali su animali di specie diverse e per studi sulla patogenesi e sulla struttura antigenica del virus. Nel 1953, Ramsey e Chivers descrissero episodi clinici di quella che era stata definita come "malattia delle mucose" (MD), caratterizzata da bassa morbilità ed elevata mortalità, attribuendone la genesi all'intervento di un virus diverso dallo stipite di referenza BVD-NY1. L'osservazione fu reiterata nel 1956 da Pritchard, Taylor, Moses e Doyle che descrissero una forma clinica assimilabile alla MD e indicata come Indiana VD, riconducendola ancora una volta all'intervento di un virus diverso da BVD-NY1. In seguito a tali osservazioni nacque una disputa scientifica in ordine alla paternità eziologica univoca o distinta delle diverse forme cliniche indicate, controversia che si protrasse per molti anni fino a che, nel 1960, fu isolato uno stipite di BVDV citopatico (C24V) da una manza in Oregon (Gillespie JH e Coll, 1960). In seguito fu dimostrata una correlazione con i ceppi non citopatogeni isolati mediante test di protezione crociata *in vivo* sul bovino ed *in vitro*, mediante test di sieroneutralizzazione (Gillespie JH e Coll, 1961).

Il complesso delle evidenze sperimentali portò a stabilire inequivocabilmente che la BVD doveva essere considerata un'unica malattia temperante BVD-NY, Indiana VD e MD, caratterizzata da variazioni di ordine clinico, patogenetico e immunologico, dipendenti dal biotipo virale e dall'ospite. I diversi biotipi virali, senza alcuna eccezione, erano in grado di produrre protezione crociata nel vitello. Inoltre, l'isolamento contestuale di BVDV- CP e BVDV-NCP nello stesso focolaio evidenziò che entrambi i biotipi potevano indurre casi di BVD e MD.

Nel 1967, nel corso del Simposio dell'American Veterinary Medical Association, un Comitato *ad hoc* stabilì definitivamente che il complesso BVD-MD era riconducibile, dal punto di vista eziologico, a un singolo agente virale. In segno di riconoscimento dell'originaria descrizione della malattia da parte di Olafson, McCallum e Fox, detto agente fu denominato *bovine virus diarrhea*. Dalla fine degli anni Cinquanta (Stober M, 1959), la malattia è stata ripetutamente segnalata anche in Europa. In Italia, la prima segnalazione risale al 1966 (Castrucci G. e Coll, 1966).

Per quanto attiene i risvolti più propriamente tassonomici del BVDV, nel corso degli anni si è assistito a significativi cambiamenti. Fino al 1973 il virus fu classificato come appartenente alla famiglia *Togaviridae*. In quell'anno fu coniato il termine *Pestivirus* e nel 1976 fu codificato il genere *Pestivirus*, appartenente alla famiglia *Togaviridae*, e comprendente il BVDV. Nel 1991, sulla scorta di evidenze di carattere genomico e delle caratteristiche di replicazione, il BVDV è stato collocato, insieme agli altri virus appartenenti al genere *Pestivirus*, nella famiglia *Flaviviridae*, dove ha trovato, almeno per il momento, una stabile collocazione tassonomica.

Quando la malattia sembrava definitivamente inquadrata dal punto di vista clinico ed eziopatogenetico, nel 1990, dal Nord America, pervengono le prime segnalazioni, che si succedono poi con frequenza crescente, di episodi di malattia grave in giovani bovini, connotati da elevata mortalità e quadri di marcata trombocitopenia, imputati all'intervento del BVDV (Corapi W e Coll, 1990). Gli studi condotti nell'ambito di detti focolai hanno portato all'isolamento di stipiti di BVDV accomunati da caratteristiche genotipiche e distinguibili dagli stipiti di BVDV classici. Pertanto, nell'ambito del BVDV, si è addivenuti alla distinzione degli stipiti classici, indicati come BVDV tipo 1, da quelli trombocitopenici, indicati come BVDV tipo 2. In gran parte, i ceppi BVDV tipo 2, associati a malattia grave nel bovino, sono risultati essere NCP, in ciò smentendo definitivamente l'assunto che vedeva, nella citopatogenicità un carattere biotipico *in vitro* associato al potere patogeno del BVDV *in vivo*. Indagini retrospettive, condotte di recente su stipiti isolati nel corso degli ultimi vent'anni, hanno dimostrato che stipiti di BVDV, identificati ora come BVDV tipo 2, circolavano negli USA già prima del 1981 (Fulton RW e Coll, 2000). In successione agli episodi statunitensi, la presenza di BVDV tipo 2 è stata segnalata anche in Europa associata a malattia grave, a esito mortale, in bovini anche adulti, non necessariamente accompagnata da quadri trombocitopenici (David G e Coll, 1994).

3. IL VIRUS

I Pestivirus sono stati di recente ri-classificati come un genere separato all'interno della famiglia *Flaviviridae* (Wengler GD e Coll, 1995). Il virus della Diarrea Virale del Bovino (BVDV) è un Pestivirus. Sulla base di delle differenze antigeniche rilevate su un panel di 76 monoclonali (Edwards S e Coll, 1995), i Pestivirus sono stati suddivisi in differenti 4 gruppi:

- Gruppo 1: BVDV-1 like virus (ospite principale: bovino)
- Gruppo 2: Virus della Peste Suina Classica (Classical Swine Fever Virus o Hog Cholera Virus) (ospite principale: suino)
- Gruppo 3: Virus della Border Disease (ospite principale: ovino)
- Gruppo 4: altri virus

I Pestivirus sono dotati di un envelope del diametro di 40-60 nm, contenente un singolo filamento di RNA e quattro proteine strutturali. Il BVDV è un virus stabile a pH compreso tra 6 e 9, viene rapidamente inattivato a 56°C, è labile ai solventi organici e alla tripsina nonché ai disinfettanti di uso. Il genoma del BVDV è costituito da RNA

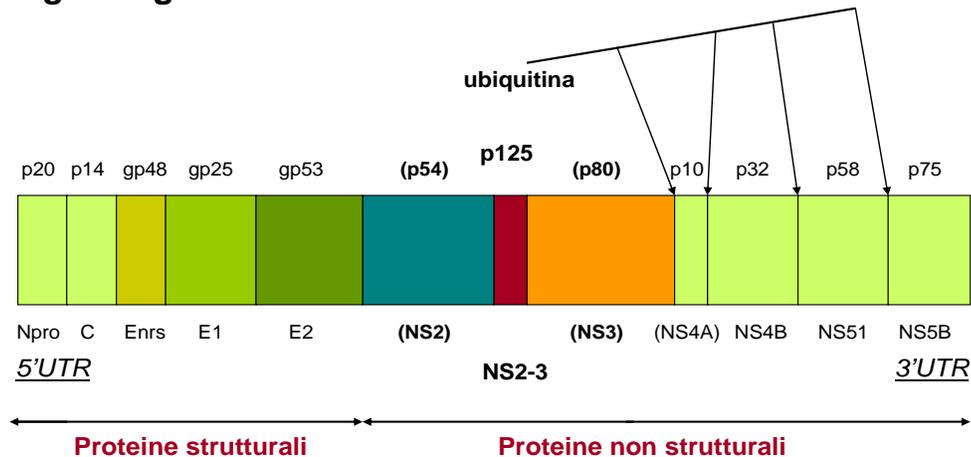
a singolo filamento e polarità positiva, con un'estensione di 12,3 kb, contenente un solo *open reading frame* (ORF) fiancheggiato da due *untranslated regions* (UTR), denominate 5'UTR e 3' UTR; la regione 5' UTR risulta altamente conservata ed è coinvolta nel processo di replicazione genomica, con funzione di innesco della traduzione del genoma virale. Il BVDV (Figura 1) consta di quattro proteine strutturali, una proteina capsidica (C) e tre glicoproteine dell'envelope (E):

- la E^{ms} (gp48), è provvista di attività RNasica e gli anticorpi diretti verso tale glicoproteina possono neutralizzare l'infettività virale;
- la E1 (gp25), è una glicoproteina transmembrana e forma un eterodimero con E2;
- E2 (gp53-56), è la glicoproteina virale maggiore e rappresenta il target principale degli anticorpi ad attività neutralizzante.

BVDV annovera, inoltre, proteine non strutturali coinvolte nel processo di replicazione virale:

- la proteina N^{pro} (amino-terminal proteinase), che è una proteasi responsabile del suo clivaggio autocatalitico dalle nascenti poliproteine;
- la proteina p7, spesso fusa con la proteina E2, che si presume si estrinsechi funzionalmente in fase di assemblaggio e maturazione dei virioni;
- la proteina NS2 (p54), la quale sembra avere un ruolo ricombinogeno;
- la proteina NS3 (p80), la quale è una proteina multifunzionale e presenta tre attività di tipo enzimatico essenziali per la replicazione virale: la serina proteasi, RNA elicasi e NPTasi. Queste proteine NS2 e NS3, risultano ben distinte nel caso del biotipo BVDV citopatico (BVDV-CP), mentre vanno a costituire un complesso proteico unico, denominato NS2-3 (p125), nel caso del biotipo BVDV non citopatico (BVDV-NCP);
- la proteina NS4A (p10), che appare agire come cofattore dell'attività serina proteasica di NS3;
- la proteina NS4B (p32), che si ipotizza intervenga come ancoraggio di membrana per il complesso replicativi virale;
- la proteina NS5A (p58), il cui ruolo non è del tutto noto;
- la proteina NS5B (p75), che rappresenta la RNA polimerasi RNA-dipendente.

Fig. 1: Il genoma di BVDV



All'interno dei BVDV sono stati identificati differenti biotipi e genotipi (Baker, 1995). La classificazione in genotipi è basata sulla diversità rilevata nella sequenza del genoma virale, rivelata da analisi filogenetiche (Couvreur e Coll., 2002; Letellier e Coll., 1999; Nagai e Coll., 2001; Ridpath and Bolin, 1998; Ridpath e Coll. 1994, 2000; Vilcek e Coll., 2001; Wolfmeyer e Coll., 1997). Fino a pochi anni fa i BVDV erano suddivisi in due genotipi, il BVDV 1 ed il BVDV 2 (Ridpath e Coll., 1994). Di recente, la diversità genetica dei ceppi di BVDV isolati è stata intensamente studiata utilizzando la metodica PCR a rapida sequenziazione accoppiata ad un'analisi filogenetica assistita da un supporto informatico. Le parti del genoma virale maggiormente utilizzate nella ricerca sono la regione 5'-nontraslata (5' - UTR), e le regioni codificanti la Npro e la E2. E' stato rilevato che esiste una notevole variabilità, che ha consentito di suddividere i ceppi BVDV in quattro sottogenotipi BVDV 1a, BVDV 1b, BVDV 2a e BVDV 2b (Flores e Coll. 2002; Ridpath e Coll. 1998).

In seguito ad ulteriori indagini, il numero di genotipi è stato esteso a 11 differenti gruppi genetici di BVDV (da BVDV-1a a BVDV 1i) (Vilcek e Coll. 2001). Ricerche più recenti hanno consentito di identificare un 12° genotipo, denominato BVDV-1k (Vilcek e Coll, 2004). Le differenze genotipiche sono inoltre supportate da differenze nel profilo antigenico (Ridpath e Coll., 1994; Vilcek e Coll., 2001), differenze che comunque non consentono una suddivisione in sierotipi (Cavirani S. 2002).

La classificazione in biotipi è basata su un carattere che è legato dalle caratteristiche antigeniche del virus e dal profilo di patogenicità sull'animale, e si

basa piuttosto sul comportamento del virus in coltura, in particolare sull'assenza o presenza di un visibile effetto citopatico (CPE) nelle cellule infette.

BVDV replica in vitro su colture cellulari di rene di vitello, di testicolo, milza e su cellule embrionali di polmone bovino (BEL o Bovine Embryo Lung cells). Alcuni BVDV inducono degenerazione cellulare con un marcato CPE, caratterizzato da vacuolizzazione del citoplasma delle cellule infette.

Sulla base di questo comportamento biologico, i BVDV sono suddivisi in citopatici (CP) e non citopatici (NCP) (Baker, 1995). Per molto tempo si è ritenuto che solo il BVDV-CP fosse in grado di causare la malattia; oggi questo assunto è stato smentito da evidenze sperimentali. Inoltre è stata accertata una perfetta identità antigenica tra stipti CP e NCP omologhi. Questo fatto ha portato a riconsiderare la genesi dei BVDV-CP, portando a concludere che il BVDV-CP possa originare dal BVDV-NCP attraverso una trasformazione a carattere endogeno.

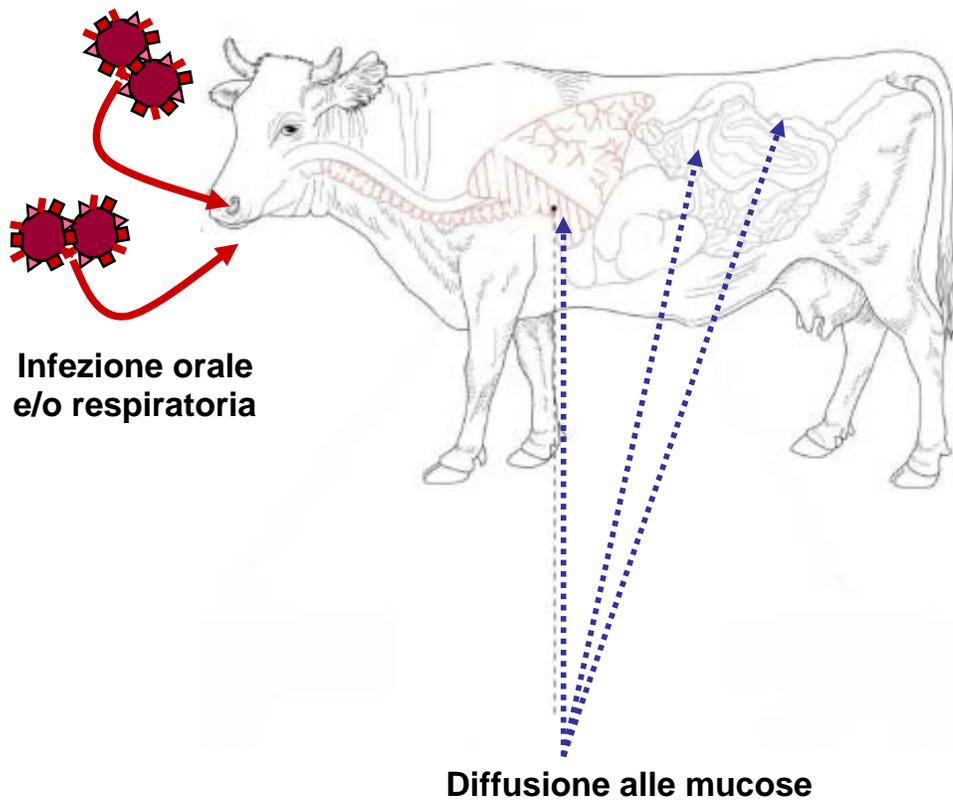
Giustificazioni del fenomeno vanno ricercate negli elementi relativi alle caratteristiche genomiche del virus. La caratteristica di citopatogenicità del BVDV è correlata alla presenza della proteina non strutturale NS3 (p80), che rappresenta la proteina marker dei ceppi BVDV-CP. Non sono stati del tutto chiariti i meccanismi che fanno sì che questa proteina origini da NS2-3 (p125), che è caratteristica dei BVDV-NCP. E' stato ipotizzato che il BVDV-NCP possa agire come precursore di BVDV-CP omologo in animali PI (trasformazione endogena) attraverso fenomeni di ricombinazione, ma anche per mezzo di altri processi (inserzioni di geni, delezioni o mutazioni puntiformi) che coinvolgono la regione del genoma virale codificante per NS2-3, producendo modificazioni che generano la proteina NS3 propria di BVDV-CP (Cavirani S. 2002).

4. PATOGENESI

Nella formulazione di un quadro il più possibile organico ed esplicativo della patogenesi dell'infezione da BVDV, dovranno essere tenute in considerazione le caratteristiche genotipiche (tipo 1 e tipo 2) e biotipiche (CP e NCP) del virus e lo stato dell'ospite.

A seguito dell'infezione acquisita per via digerente e/o respiratoria (Figura 2), il virus replica a livello delle mucose, replicazione cui consegue una fase viremica nella quale il virus è veicolato per mezzo dei linfociti. Il virus può essere ritrovato nel sangue 2-4 ore dopo l'inoculazione sperimentale in vitelli sensibili e la viremia può durare fino a 14 giorni.

Figura 2



Una recente ricerca (Gorgoza L.M, 2004) dimostra che la stimolazione in vitro con alte dosi di un mitogeno (fitoemoagglutinina o PHA) aumenta la possibilità di identificare l'antigene BVDV in lisati di leucociti del sangue periferico. L'utilizzo di questa metodica ha consentito di rilevare il genoma virale post infezione per 42 giorni post infezione (Crawford A. e Coll, 2005). L'identificazione dell'antigene BVDV nei linfociti T CD4+ e CD8+, monociti e linfociti B ha confermato che il genoma virale era funzionalmente attivo per l'espressione virale. Questa osservazione non è priva di conseguenze dal punto di vista epidemiologico, aumentando significativamente la durata dello stato d'infezione dei soggetti colpiti.

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 (Figura 3).

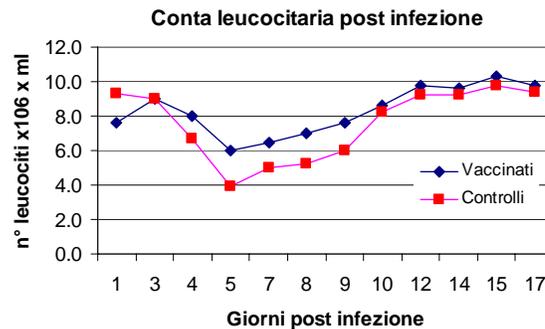
Figura 3



Nigrelli e Rosignoli (IZS MN)

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 (Figura 4)

Figura 4



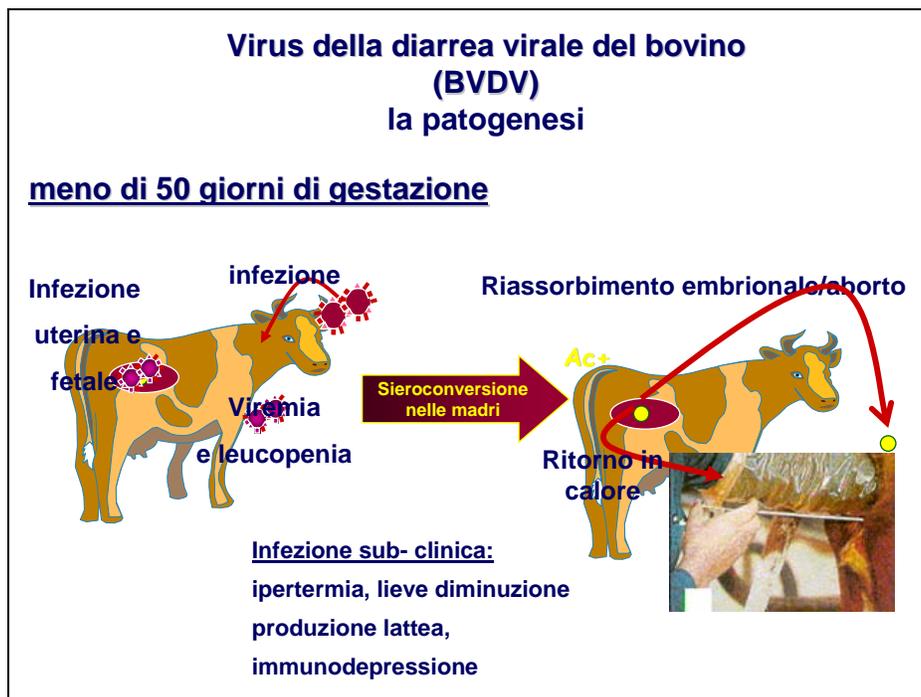
L'infezione in soggetti normoergici raramente esita in malattia grave e solitamente il decorso è fausto. Nei soggetti adulti, molto spesso l'infezione è asintomatica e si limita a produrre una linfopenia, anche marcata, ma sempre transitoria. Da segnalare, inoltre, la comparsa di forme cliniche di gravità assai 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 in grande quantità nella saliva e nello scolo nasale ed, in misura minore, nelle urine e nelle feci. Allo stato d'infezione consegue una 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.

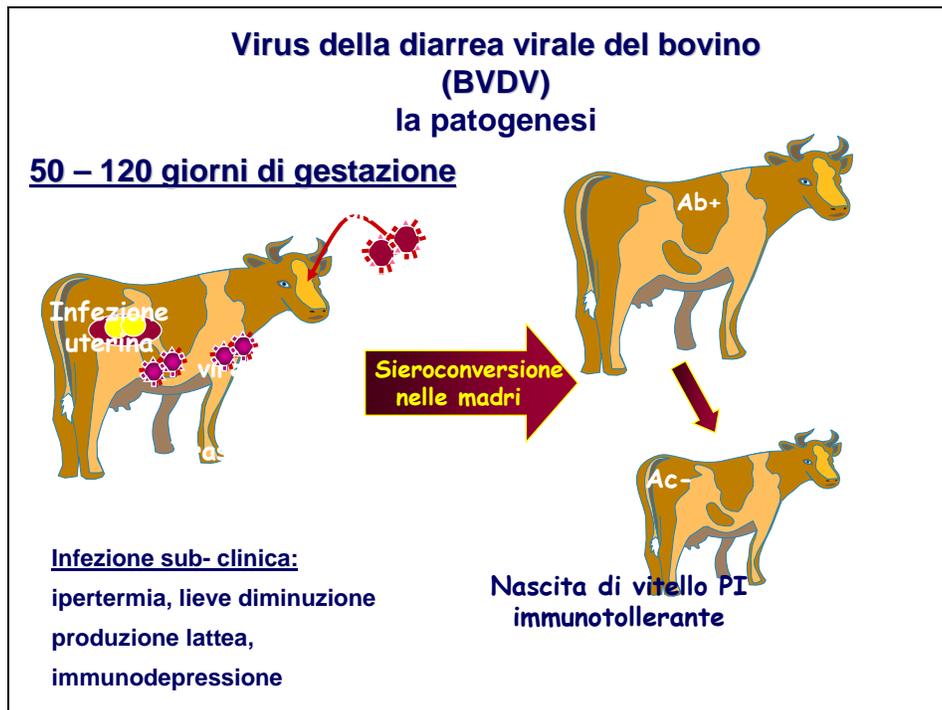
Fermo restando il concetto che animali dotati di specifica immunità risultano protetti nei confronti dell'infezione, e che sia possibile l'istaurarsi di un certo grado di protezione fetale negli animali gravidi provvisti di immunità acquisita naturalmente o indotta da vaccinazione, la patogenesi dell'infezione congenita è dipendente dalla fase della gestazione in cui si verifica l'infezione e dalle caratteristiche legate al virus. Il feto risulta sensibile all'infezione dopo l'annidamento dell'embrione. Nei primi 3 mesi di gestazione, l'infezione da BVDV determina alterazioni fetali che risultano frequentemente esiziali, comportando l'interruzione della gravidanza (Figura 5).

Figura 5



L'infezione della bovina gravida da parte di BVDV-NCP, entro i primi 4 mesi di gestazione, ovvero in una fase dell'ontogenesi fetale in cui il sistema immunitario non ha ancora completato il suo sviluppo e quindi non è ancora del tutto attivo, può esitare nell'induzione di uno stato di immunotolleranza (Figura 6).

Figura 6



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. La capacità di evocare stati di infezione con carattere di persistenza e conseguente tolleranza immunitaria appare circoscritta ai soli BVDV-NCP: ciò sembra essere in relazione al fatto che, durante l'infezione fetale, detti stipiti non sarebbero in grado di evocare la produzione di interferone di tipo 1 che è stato dimostrato in grado di inibire la replicazione del BVDV *in vitro*.

Il risultato finale è la nascita di un vitello, immunotollerante che risulterà sieronegativo e infetto, viremico persistente (PI). Tali soggetti, essendo escretori persistenti del virus, devono pertanto essere considerati come una continua fonte d'infezione e rappresentano il cardine per il mantenimento e la diffusione dell'infezione nel gruppo.

Inoltre, eventuali animali immunotolleranti in attività riproduttiva perpetuano il fenomeno, generando progenie a loro volta immunotollerante.

Un carattere insito al fenomeno dell'immunotolleranza si riferisce al fatto che la tolleranza da parte del sistema immunitario sarà circoscritta allo stipite virale causa dell'evento, la qual cosa, in virtù della variabilità antigenica propria del BVDV, non è un fattore trascurabile.

Il destino degli animali immunotolleranti è legato all'eventualità che detti soggetti subiscano una "superinfezione" da parte di uno stipite di BVDV omologo a quello che ha indotto lo stato di tolleranza immunitaria, questa volta con caratteristiche di citopatogenicità (CP). In tal caso l'animale manifesterà sintomi tipici della MD che lo porterà a morte. Oggi si sia portati a ritenere che gran parte degli stipiti di BVDV-CP, isolati in corso di MD, abbia invece un'origine endogena. Questa convinzione deriva principalmente dal reperto concomitante, in animali colpiti da MD, di BVDV-NCP e BVDV-CP, antigenicamente identici (Bolin SR e Coll, 1985).

Il grado di omologia antigenica tra lo stipite causa dell'immunotolleranza e quello superinfettante condiziona l'evoluzione clinica della MD: tanto maggiore è il grado di omologia tra i due stipiti, tanto più grave sarà la malattia. In ciò trova giustificazione il rilievo di forme di MD a carattere cronico (*runting disease*) (Figura 7).

Figura 7



Di norma si ritiene che bovini immunotolleranti non sopravvivano oltre i 2 anni. Il dato, seppur tendenzialmente accettabile, trova comunque smentita nella pratica di allevamento dove non è evento raro il reperto di animali PI ben oltre i 2 anni di vita.

Al fine di completare l'exkursus temporale in ordine all'infezione congenita da BVDV, è da segnalare che infezioni contratte oltre il quarto e fino a circa il sesto mese di gravidanza possono produrre alterazioni fetali riportabili ad episodi di ipoplasia cerebellare e ad alterazioni oculari. Trascorso questo periodo si ritiene che l'animale

sia in grado di contrastare autonomamente l'azione del virus, pertanto si avrà un parto a termine. L'unico segno di avvenuto contatto con il virus durante la vita fetale sarà rappresentato dal rilievo di anticorpi sierici specifici, già prima dell'assunzione del colostro (Barber R e Coll, 1986). Il fenomeno della nascita di soggetti immunotolleranti non avviene in corso d'infezione da BVDV-CP e BVDV-NCP, qualora quest'ultima avvenga dopo la nascita (Doll K e Coll, 2004).

5. QUADRI CLINICI

Il BVDV presenta uno spettro d'ospite ampio, ed è in grado di evocare infezione in differenti specie animali, domestiche (bovino, ovino, suino), ma anche selvatiche (*Antilocapridae*, *Bovidae*, *Camelidae* e *Cervidae*). I quadri clinici correlati all'infezione da BVDV nel bovino variano in relazione allo stadio virale **infettante**, alle caratteristiche dell'ospite (età, condizione immunitaria, stato gravidico) e all'intervento di fattori esterni all'ospite, che possono favorire, scatenare e/o complicare l'attività patogena del virus (Brownlie J e Coll. 1984). Tradizionalmente, l'inquadramento clinico della BVD prevede due principali forme: diarrea virale del bovino e malattia delle mucose. Più di recente si sono manifestati quadri clinici diversi dai precedenti, riportabili ad una sindrome emorragica acuta a carattere trombocitopenico spesso con esito mortale.

5.1. Diarrea virale del bovino

In seguito all'entrata del virus BVD in un allevamento sieronegativo o con una limitata sieroprevalenza (e quindi un elevato numero di soggetti "sensibili" all'infezione) si possono rilevare, in tempi diversi, le seguenti manifestazioni cliniche:

- Aumento del repeat breeding (con ritorni in calore prevalentemente "fuori ciclo").
- Aborti (prevalentemente tra il 4° ed il 6° mese di gestazione).
- Nascita di vitelli malformati o scarsamente vitali.
- Aumentata mortalità neonatale.
- Infine, dopo circa un anno dall'evento infettante, i primi casi di malattia delle mucose.

Le manifestazioni sintomatologiche variano in funzione della fase riproduttiva delle bovine al momento dell'infezione. Il 70-90% delle infezioni post natali da virus BVD in animali immunocompetenti decorre in forma clinicamente silente.

Dopo un periodo di incubazione di circa 3-5 giorni, si riscontra ipertermia febbrile bifasica, accompagnata da leucopenia più o meno marcata. Tali sintomi, come pure

una lieve e transitoria diminuzione delle produzioni di latte, passano spesso inosservati. Gli animali sieronegativi o con basso titolo anticorpale sieroconvertono in seguito all'infezione, con la produzione di anticorpi neutralizzanti che raggiungono il titolo massio circa 10 settimane post infezione. Gli anticorpi assunti col colostro conferiscono al vitello una protezione umorale che può durare 3-6 mesi.

In assenza di una sufficiente immunità colostrale, infezioni da BVDV in vitelli giovani, in sinergismo con altri virus eteropatici, possono provocare una sindrome diarroica. I soggetti mostrano dapprima il quadro di una diarrea neonatale, di solito, senza evidenti segni clinici a livello delle mucose. Questo quadro enterico della malattia è causato in prima istanza da altri agenti enteropatogeni (Rotavirus, Coronavirus, *E. coli* e *Cryptosporidi*), ma l'immunosoppressione indotta dal BVDV può favorire un aggravamento della malattia con gravi perdite. In vitelli più anziani, specie dopo l'esaurimento dell'immunità colostrale, nonché nei vitelloni e negli adulti, l'esposizione acuta al virus BVD può dare luogo a una diarrea transitoria con esiti non gravi. Di rado si rilevano (Figure 8 e 9) leggeri o intensi arrossamenti diffusi e piccole erosioni sul musello, sulla bocca e sulla mucosa del prepuzio e della vagina.

Figura 8



Figura 9



Nigrelli (IZS MN)

Negli animali adulti la morbilità è scarsa e la guarigione avviene entro due settimane. Anche negli animali adulti, in considerazione dell'attività immunodepressiva del BVDV, che si estrinseca attraverso una marcata linfopenia in corrispondenza dell'infezione, non è da sottovalutare l'effetto favorente l'azione di fattori microbici complicanti che, nell'animale immunocompromesso, possono estrinsecare pienamente il loro potere patogeno (Baker J, 1987).

Il BVDV è in grado, tra l'altro, di evocare una sintomatologia respiratoria primaria e l'intervento di specifici patogeni respiratori (Caldow GL e Coll, 1993; Fulton R e Coll, 2000).

Un'attività diretta sull'apparato respiratorio è stata, di recente ascritta in modo specifico a BVDV-CP tipo 1, sottogruppo 1a. Sempre riferibile a un quadro immunodepressivo, seppur transitorio indotto da BVDV, è un tendenziale aumento, di mastiti in allevamenti di bovine da latte interessate da una concomitante esposizione all'infezione virale. Tuttavia, stante l'attuale limitatezza delle evidenze sperimentali, si ritiene prematuro correlare infezione da BVDV e mastite bovina.

5.2. Malattia delle mucose

Si manifesta prevalentemente in animali di età compresa tra i 6 e i 24 mesi, e assume carattere sporadico (bassa morbilità) ed esito mortale (alta mortalità) ed è strettamente correlata allo stato di infezione persistente (animali immunotolleranti PI).

I soggetti persistentemente infetti (PI) mostrano una precoce caduta (di solito entro le prime 6 settimane di vita) degli anticorpi BVD assunti con il colostro materno, rispetto ai loro coetanei esenti da virus. La maggior parte dei vitelli persistentemente infetti si presentano alla nascita in condizioni di sviluppo normale e clinicamente sani. Alcuni soggetti richiamano l'attenzione per lo scarso peso alla nascita e per una crescita stentata (Figure 10, 11 e 12)

Figura 10



Bussacchini, 2006

Figura 11



Bussacchini, 2006

Figura 12



Bussacchini, 2006

In ogni caso, la maggioranza dei vitelli PI appaiono completamente normali fino alla comparsa acuta dei sintomi della Malattia delle mucose. Nei soggetti con crescita più o meno ritardata, talvolta si riscontra una testa sproporzionatamente lunga e a punta (simile al prognatismo superiore), e il pelo si presenta insolitamente ispido. Uno dei sintomi principali della malattia delle mucose, è costituito da fenomeni infiammatorio-erosivi- ulcerativi della mucosa, a carico del cavo orale (specie ai margini delle gengive, al palato, agli angoli della bocca, del prepuzio e della vulva). Spesso sono rilevabili solo degli arrossamenti irregolari, a macchie o diffusi delle mucose (Figura 13), che si presentano ruvide solo dopo un'attenta osservazione con l'aiuto di una sorgente luminosa. Alterazioni di tipo infiammatorio a livello di narici e naso (Figura 14) sono relativamente più rare (circa nel 30% dei casi).

Figura 13



Figura 14



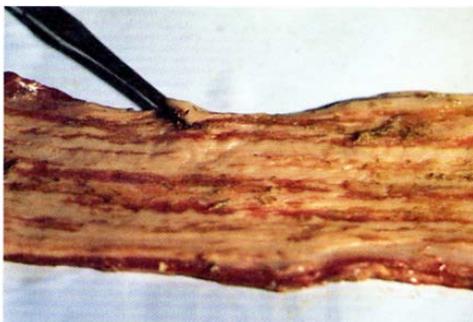
Lo stadio di maggiore gravità della Malattia delle mucose è caratterizzato da diarrea più o meno profusa, occasionalmente frammista a muco, fibrina o sangue. In alcuni casi, la consistenza delle feci invece è normale oppure solida, oppure si trovano nel retto solo dei coaguli di sangue, muco oppure frammenti di fibrina, fatto che,

collegato al tenesmo frequentemente presente, può essere scambiato con un ileo paralitico.

Di notevole importanza diagnostica sono le lesioni erosive-necrotiche a carico degli spazi interdigitali (raramente alla corona) che, in casi particolarmente gravi, possono essere associate a zoppie. In alcuni casi, è presente una dermatite superficiale o profonda, essudativa, purulenta-necrotica, limitata alla testa e alla nuca oppure generalizzata. In questi casi sono probabilmente coinvolte delle infezioni batteriche secondarie. Contrariamente a quanto accade nell'infezione acuta da BVDV, in alcuni soggetti colpiti da Malattia delle Mucose si ha una marcata leucocitosi con spostamento a sinistra dei neutrofili, e solo in minima parte un'evidente leucopenia. Anche dopo la comparsa delle alterazioni a livello della mucosa e dei sintomi diarroici, il decorso clinico della malattia delle mucose può variare da caso a caso. Nella maggioranza dei casi i soggetti muoiono nel giro di 1-3 settimane, dopo rapido peggioramento dello stato generale, sospensione dell'assunzione di alimenti e crescente disidratazione.

Il quadro anatomo- patologico è dominato da lesioni all'apparato digerente: lesioni erosive e ulcerative alla mucosa oesofagea, a carico dell'abomaso, dove è interessata la sottomucosa, a livello enterico, con particolare coinvolgimento delle placche del Peyer e della porzione prossimale del colon, a testimonianza del tropismo del BVDV per il tessuto linfoide (Figure 15 e 16)

Figura 15



Nigrelli (IZS MN)

Figura 16



Nigrelli (IZS MN)

La milza appare di volume e spessore ridotti, reperto che da alcuni è ritenuto caratteristico della MD. In taluni casi, rari, si può rilevare una forma di MD a carattere *cronico (runting disease)*. Si osservano episodi ricorrenti di diarrea intervallati da periodi di remissione sintomatologia, alopecia e ipercheratinizzazione al collo a carattere persistente e lesioni podali associati a leucopenia. (Barber DM e Coll, 1986).

5.3. Sindrome emorragica

Segnalata in corso di episodi acuti di BVDV, colpisce in prevalenza giovani animali, ma è stata riscontrata anche in animali adulti. Il decorso è grave e la malattia è pressoché costantemente a esito letale.

A causa della marcata trombocitopenia, che circa due settimane dopo l'infezione raggiunge i valori più critici (il numero di trombociti durante le gravi emorragie sistemiche va nettamente al di sotto di 50 g/l), la diatesi emorragica si manifesta con petecchie emorragiche ed emorragie estese su cute e mucose (congiuntivite, sclere, mucose nasali, gengive, prepuzio e vagina) ed epistassi. I primi segni si hanno spesso quando dopo iniezioni, o punture di insetti, continua a fuoriuscire del sangue. Spesso, oltre a questi sintomi compare una diarrea sanguinolenta. La febbre, presente all'inizio, a questo punto nella maggior parte dei casi è già scomparsa.

Quanto ai tassi di mortalità si riscontra una notevole variabilità: in soggetti non curati i valori sono compresi tra il 50-70%, mentre in caso di adeguata terapia, molti pazienti possono essere salvati. Il processo di guarigione va di pari passo con la crescita del numero di trombociti (a volte rimangono bassi fino a 6 settimane dopo l'infezione) e con la comparsa nel siero di anticorpi neutralizzanti.

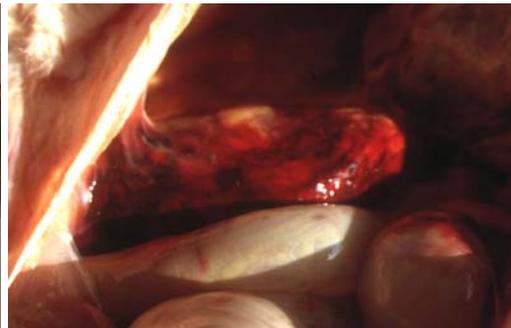
All'esame necroscopico gli animali colpiti evidenziano una diatesi emorragica diffusa a livello delle mucose e sierose, con presenza di sangue non coagulato nelle cavità, tutti fenomeni riportabili a una spiccata trombocitopenia (Pellerin C e Coll, 1994) (Figure 17 e 18)

Figura 17



Nigrelli (IZS MN)

Figura 18



Nigrelli (IZS MN)

Tutti i casi esaminati hanno portato all'isolamento del BVDV tipo 2 NCP. L'agente risponde ai noti 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, i vitelli provvisti di immunità si sono dimostrati protetti nei confronti dell'infezione sperimentale (Corapi WV e Coll, 1989; Corapi WV e Coll, 1990).

5.4. Trattamento dell'infezione da BVDV

Per quanto riguarda gli animali persistentemente infetti è superflua qualsiasi terapia. Una modica diarrea causata dall'infezione post natale da BVDV, guarisce generalmente da sola, eventualmente col sostegno di terapie sintomatiche. In corso di diarrea profusa è necessario compensare le perdite massive di liquidi ed elettroliti con l'apporto di soluzioni idonee, con qualità sufficiente di elettroliti, per via endovenosa o anche orale, se gli animali sono in grado di bere. Per la prevenzione delle infezioni batteriche secondarie è opportuna la somministrazione di antibiotici sistemici e l'utilizzo di antinfiammatori non steroidei. Controindicati, per il potenziale effetto immunosoppressore, sono i corticosteroidi. In pazienti con sindrome emorragica, le misure più importanti da prendere sono le trasfusioni di sangue eventualmente ripetute, allo scopo di apportare non solo le cellule del sangue, inclusi i trombociti, ma anche, nel caso in cui l'animale donatore sia sieropositivo, anticorpi specifici per BVD.

6. BVDV E COMPARTO RIPRODUTTIVO

Il BVDV oltre ad essere associato a patologie che colpiscono diversi apparati come il respiratorio, il neurologico, l'immunologico è in grado di causare danni a carico dell'apparato riproduttivo. Le perdite economiche possono essere consistenti. Turbe riproduttive che si ritenevano associate all'infezione da BVDV sono state descritte da Olafson (Olafson R e Coll. 1946), nel primo caso accertato di BVDV. Bovine gravide hanno mostrato aborto entro 3 mesi dall'infezione. Da quel momento, è parso sempre più evidente, che il BVDV può indurre una vasta gamma di turbe riproduttive che dipendono principalmente dal periodo di gestazione in cui avviene l'infezione e dal ceppo virale infettante.

6.1. Effetti del BVDV sulla fertilità del toro

Il virus è stato isolato nel seme di tori PI in corso d'infezione acuta da BVDV. In tori infettati sperimentalmente con un ceppo non-citopatico, il virus è stato isolato dal seme a partire dal 7° fino al 14° giorno post infezione, con un titolo variabile da 5 a

75 TCID₅₀/ ml. Studi immunistochemici su tessuti prelevati da questi tori, hanno fatto ipotizzare che il virus replica unicamente nelle vescicole seminali e nella prostata (Niskanen e Coll. 2002). Risultati simili sono stati riscontrati in tori infettati sperimentalmente con un ceppo BVDV citopatico. Il volume di seme raccolto diminuisce in modo significativo, così come la concentrazione degli spermatozoi. Inoltre, aumenta il tasso di mortalità degli spermatozoi. Le anomalie si protraggono per oltre 1 mese dall'infezione. I tubuli seminiferi subiscono un processo degenerativo-necrotico: si osservano edema dei testicoli e infiltrazione linfocitaria delle ghiandole accessorie. Le alterazioni sono reversibili, ma per il pieno recupero riproduttivo del toro occorre attendere oltre 2 mesi (Kirkland PD e Coll, 1991).

I soggetti PI possono raggiungere la piena maturità sessuale ed essere quindi adibiti all'attività riproduttiva (Luzzago C e Coll, 1999). I tori viremici persistenti, risultano costantemente escretori di virus anche con l'eiaculato (in tori PI è stata riscontrata un titolo di virus che variava da 10.000 a 10.000.000 TCID₅₀/ml di seme), con altrettanto ovvie ricadute di carattere epidemiologico (Kirkland P e Coll, 1994; Kirkland P e Coll, 1997). Nel caso di tori PI la qualità del seme appare assai variabile: in alcuni soggetti sono state osservate anomalie riconducibili a scarsa motilità e ridotta concentrazione degli spermatozoi, che presentano un avvizzimento (collasso) della testa, in altri non sono state rilevate alterazioni di sorta, perlomeno sulla base degli abituali criteri di valutazione dello spermogramma (Kirkland P e Coll, 1991; Meyerling A e Coll, 1988). L'utilizzo di seme da tori PI per la fecondazione *in vitro* determina una significativa riduzione del tasso di sviluppo fino allo stadio di blastocisti, ma il tasso di fecondazione non sembra essere compromesso (Bielanski A e Coll, 1994a).

6.2. Turbe riproduttive nella femmina

Il BVDV è accreditato di uno specifico ruolo patogenetico nel determinismo della patologia riproduttiva ed influisce negativamente in diverse fasi che vanno dal concepimento alla nascita del vitello.

6.2.1. Alterazioni a carico dell'apparato riproduttivo

Il virus replica attivamente nelle cellule dell'epitelio follicolare ed è presente ad alto titolo nel fluido follicolare. Il BVDV è in grado di indurre ooforite interstiziale diffusa, interferendo con lo sviluppo del follicolo, l'ovulazione e la formazione del corpo luteo. Conseguentemente all'infezione acuta, il diametro massimo e il ritmo di sviluppo del follicolo dominante anovulatorio e ovulatorio sono significativamente ridotti. La

popolazione dei follicoli subordinati risulta anch'essa limitata. Osservazioni condotte in seguito a infezione sperimentale di bovine sieronegative con BVDV-NCP hanno evidenziato, 4-9 giorni dopo l'estro, una significativa diminuzione del livello plasmatico di estradiolo, ma la concentrazione di progesterone plasmatici e prostaglandine F2-alfa (PGF2 α) è risultata nella norma nei 15 giorni successivi all'estro. Inoltre esistono fondati elementi per ritenere che le anomalie ovulatorie possano essere correlate a un aumento del livello di cortisolo durante la fase viremica, in grado di deprimere la liberazione di LH. Appare pertanto logico aspettarsi una diminuzione del numero dei corpi lutei, mentre è oggetto di opinioni discordanti la presenza di alterazioni relative al diametro e al ritmo di crescita degli stessi.

Nel caso di bovine PI, le ovaie presentano un numero significativamente ridotto di follicoli terminali, preovulatori ed un aumento di quelli atresici rispetto a soggetti non PI. Inoltre, nel fluido follicolare di animali infetti sono stati rilevati anticorpi neutralizzanti specifici ad alto titolo.

Le alterazioni indotte dal virus in ambito ovarico comportano quindi una riduzione della fertilità. Al riguardo non esistono dati univoci: dati recenti indicano che in presenza d'infezioni da BVDV la percentuale di ritorni in calore aumenta del 2-4% (Fourichon C e Coll. 2005). Si può stimare che, nel caso d'infezioni acute verificatesi nell'arco dei 15 giorni che precedono la fecondazione, si assista a una riduzione del tasso di gestazioni variabile dal 20 al 60% (Houe H e Coll, 1993). Il danno risulta consistente allorché in un gruppo di bovine sieronegative, pienamente sensibili all'infezione, è introdotto un animale PI in grado di infettare pressoché in contemporanea gli animali conviventi. In seguito all'infezione da BVDV, le manifestazioni del calore possono risultare silenti e anche la risposta a trattamenti di superovulazione risulta compromessa, fatto che esita in una diminuzione significativa di embrioni raccolti (Bielanski A e Coll, 1994b). La diminuzione della fertilità è di durata variabile, si stima nell'ordine di mesi, e comunque il ritorno a valori di fertilità pre-infezione è legato all'instaurarsi di un'immunità di popolazione. L'azione del virus non si limita all'ovaio, ma interessa salpinge, endometrio e placenta. La circolazione di BVDV in allevamento esita, in alcune situazioni, in un aumento delle ritenzioni placentari.

6.2.2. Mortalità embrionale

Il BVDV influisce negativamente sullo sviluppo embrionale in virtù di meccanismi patogenetici diversi. Il virus è in grado non solo di compromettere il tasso di

fecondazione degli oociti ovulati, ma ha effetti deleteri diretti sull'embrione. Lo sviluppo di quest'ultimo può essere ostacolato da un ambiente uterino non fisiologico in seguito alla presenza di infiltrazioni di linfociti e plasmacellule a carico dell'endometrio, conseguenti all'infezione virale. (Bielanski A e Coll, 1994b).

La contaminazione uterina e dell'embrione può avvenire in seguito a viremia dopo infezione oronasale o per infezione endouterina conseguente a inseminazione con seme contaminato. Le conseguenze sull'embrione non sembrano condizionate dalle modalità d'ingresso del virus (Whitmore e Coll, 1981).

6.2.3. Aborto

L'associazione causale diretta tra infezione da BVDV e aborto è stata riconosciuta fin dal rilievo dei primi focolai di malattia. Il BVDV non si limita a provocare aborto circoscritto al primo trimestre di gravidanza; al virus sono anche imputabili aborti tardivi, sino al terzo trimestre di gestazione. In corsi di episodi di infezione acuta da BVDV, l'incidenza di aborto aumenta di circa 2,5 volte rispetto ai valori usualmente attesi. L'aborto si verifica in un periodo compreso fra i 9 e i 90 giorni post-infezione: il virus contamina direttamente il feto per via transplacentare o provoca una placentite che, se grave, pregiudica la funzionalità degli scambi materno - fetali fino a determinare la morte del feto.

Nel feto, le sedi elettive di localizzazione del virus sono rappresentate dai leucociti epatici e dal polmone. Nella gran parte dei casi, il feto non presenta lesioni macroscopiche specifiche. Istologicamente si rileva atrofia timica, deplezione del tessuto linfoide del tubo digerente, polmonite, necrosi miocardica e ipomielinizzazione. In feti di oltre 6 mesi può evidenziarsi epatomegalia, liquido ascetico sartiato di sangue e dilatazione cardiaca (Bolin SR e Coll, 1990).

6.3. Malformazioni fetali

Il BVDV mostra un tropismo spiccato per il sistema nervoso centrale; ippocampo e corteccia cerebrale sono i siti d'elezione. Allorché l'infezione transplacentare si verifica tra i 90 e i 150 giorni di gestazione, il BVDV agisce sulle cellule staminali con conseguenze devastanti quali idroanencefalia, ipoplasia cerebellare, ipomielinogenesi. L'infezione, in questo periodo, coincide con gli stadi finali dell'organogenesi del sistema nervoso centrale, e può indurre la nascita di vitelli deboli, atassici o dall'andatura barcollante. La compromissione dell'occhio, derivante da atrofia e displasia retinica, cataratta, microftalmia, aggrava il quadro clinico nel

neonato. Considerato il tropismo virale, a questi quadri si possono associare aplasia timica, ipoplasia polmonare, alterazioni muscolo-scheletriche (brachignatismo, rachide corto e tozzo, artrogrifosi, torcicollo, opistotono) e della cute (ipotricosi, alopecia, irsutismo) (Bielefeld-Ohmann H , 1982) (Figure 19 e 20).

Figura 19



Nigrelli (IZS MN)

Figura 20



Nigrelli (IZS MN)

6.4. Mortalità neonatale

Il fenomeno riguarda prevalentemente gli animali con malformazioni e risulterà tanto più acuto in relazione all'entità delle malformazioni virus-indotte. Si ritiene comunque che il BVDV sia implicato in circa il 60% dei casi di vitelli disvitali. La mortalità neonatale può colpire anche vitelli PI. In questi soggetti si rileva spesso un ritardo di crescita intrauterina che ha pesanti riflessi sulla loro vitalità. Questi animali possono presentare un'iperemia generalizzata della mucosa boccale, più marcata a livello del bordo gengivale, e un'espulsione ritardata del meconio. Valutando le conseguenze di carattere epidemiologico ed economico, derivanti dalla permanenza in allevamento degli animali PI apparentemente sani dal punto di vista clinico, la morte precoce di detti soggetti deve essere considerata un evento favorevole e per tanto auspicabile.

6.5. BVDV e tecnologie riproduttive

Le tecnologie riproduttive, che prevedono il trapianto di embrioni prodotti *in vivo* dopo superovulazione (*embryo transfer, ET*) oppure ottenuti con fecondazione *in vitro* (IVF) di oociti prelevati al macello mediante raccolta ecoguidata, hanno imposto l'acquisizione di elementi sperimentali atti a valutare il rischio sanitario connesso. Sono state sollevate molte domande riguardo al possibile rischio di propagazione del

BVDV, con la raccolta e la coltura di oociti ed il trasferimento degli embrioni. Le possibili fonti di infezione investigate sono:

- Gli oociti e gli stessi embrioni
- Le linee cellulari utilizzate per la coltura degli oociti e degli embrioni
- Le sostanze di origine bovina utilizzate nei mezzi di coltura (ad esempio il siero fetale di bovino).

L' International Embryo Transfer Society (IETS) effettua un monitoraggio continuo degli aspetti epidemiologici collegati all'Embryo Transfer e ad altre metodiche. Ad intervalli regolari sono emanate linee guida per il controllo e la prevenzione della trasmissione di malattie infettive attraverso il seme e gli embrioni trapiantati. L' IETS ha definito protocolli che prevedono il lavaggio ed il trattamento con tripsina atto a rimuovere in modo soddisfacente la maggior parte dei patogeni bovini dalla superficie della zona pellucida integra e dagli embrioni raccolti in vivo. In condizioni sperimentali, il lavaggio si è dimostrato efficace nel rimuovere il BVDV dagli embrioni, mentre il trattamento con tripsina si è dimostrato attivo nella rimozione dell'envelope virale.

Esistono quindi elementi oggettivi che consentono di accreditare all'ET notevoli potenzialità per quanto attiene alle garanzie sanitarie legate alla possibile diffusione di agenti microbici.

6.6. Materiale seminale

Come già indicato in precedenza, animali con infezione acuta da BVDV risultano eliminatori di virus attraverso il seme. Il fatto assume proporzioni assai più ragguardevoli nel caso degli animali PI nel cui seme sono state riscontrate concentrazioni virali 100 volte superiori a quelle riscontrate nel sangue (Kirkland PD e Coll, 1997). Non esiste un'opinione univoca circa la capacità del BVDV di penetrare nella testa dello spermatozoo, ma è certo che il virus replica a livello di cellule epiteliali spermatiche (Wellemans G e Coll, 1987), e con buona probabilità infetta le cellule del Sertoli e la replicazione risulta particolarmente attiva nelle vescichette seminali, senza che ciò comporti alcun riscontro patologico. Ciò comunque implica la presenza di virus ad alto titolo nella componente plasmatica del seme, associato alle cellule ematiche ivi presenti, e la possibile adesione dello stesso alla superficie degli spermatozoi.

6.7. Apparato genitale femminile

Le cellule di origine epiteliale di ovaio e ovidotto sono sede di attiva replicazione virale in situazioni di infezione sia transitoria sia persistente. IL virus è presente nell'utero (Brock KE e Coll, 1995), nell'ovidotto (Bielanski A e Coll, 1993), nel liquido follicolare, nelle cellule del corpo luteo, della corticale ovarica, della granulosa, dello stroma (Booth PJ e Coll, 1999) e nell'ocita stesso.

L'ocita può essere pertanto contaminato dal BVDV già prima dell'ovulazione per contiguità con il tessuto ovarico o con il liquido follicolare infetti e anche dopo l'ovulazione a causa del virus presente nelle cellule oviduttali infette. In bovine PI è stato dimostrato che non tutti gli oociti sono infetti, e che è possibile ottenere progenie indenni a seguito di trapianto embrionale da donatrici PI. Per quanto attiene all'ovulo fecondato, si possono verificare infezioni al momento o dopo l'annidamento in utero, a seguito di infezioni a carico della mucosa uterina. In merito alla trasmissione materno-fetale del BVDV, vale quanto osservato in bovine PI: si rileva un'elevata presenza del virus nell'epitelio endometriale e nei placentomi. Nel contesto placentare la maggior quota virale è stata rilevata a carico delle membrane fetali intercotiledonali (Fredriksen B e Coll, 1999). Inoltre, da rilevazioni comparative è emersa una maggior presenza d'infezione tra le cellule della mucosa uterina di bovine PI gravide rispetto a bovine, sempre PI ma non gravide, fatto che ha indotto a ritenere che la gravidanza rappresenti un fattore favorente la replicazione virale.

7. BVDV e RISPOSTA IMMUNITARIA

Il sistema immunitario del bovino reagisce all'infezione da BVDV, o ad un'eventuale vaccinazione, con una risposta sia umorale che cellulo-mediata. Nel colostro di bovine positive per BVDV è stata dimostrata solo un'immunità di tipo umorale. Nei soggetti non PI, in funzione della quantità/qualità del colostro ingerito, gli anticorpi colostrali possono permanere fino a 8 mesi di vita. Gli anticorpi umorali compaiono circa 3 settimane post infezione, e possono durare per molto tempo (fino a due anni), nel caso d'infezione acuta di soggetti immunocompetenti, e possono essere classificati in due distinti gruppi funzionali:

- Anticorpi verso le glicoproteine virali di struttura (in particolare E2 e gp53), che bloccano l'infettività del virus ed hanno attività neutralizzante il virus. Questi anticorpi, dimostrano una reattività crociata, anche se presentano una maggiore attività neutralizzante verso lo stipe omologo (Patel J e Coll, 2005).

- Anticorpi verso le proteine non strutturali, in particolare la proteina NS2-3; questa proteina è essenziale per la replicazione intracellulare del virus ed è antigenicamente conservata nell'ambito di tutti i *pestivirus*. Questi anticorpi non hanno attività neutralizzante, ma indicano l'avvenuta infezione. Inoltre, dato che è dimostrato che i soggetti PI non possono sviluppare una consistente risposta anticorpale specifica verso questa proteina, la ricerca degli anticorpi verso NS2-3 consente di discriminare soggetti infetti immunotolleranti (che risultano negativi per NS2-3, ma sono viremici), da soggetti immunocompetenti che hanno contratto l'infezione. Gli animali non PI, che contraggono l'infezione, svilupperanno una specifica risposta verso NS2-3, ma, trascorso il breve periodo durante il quale è possibile rilevare la viremia transitoria, risulteranno negativi alla ricerca del virus.

8. DIAGNOSI

8.1. Diagnosi clinica

Data la molteplicità dei quadri clinici del complesso BVD/MD, nella maggior parte dei casi, non è possibile formulare una diagnosi eziologica unicamente attraverso i rilievi clinici. Come diagnosi differenziale bisogna prendere in considerazione numerose altre patologie. Malformazioni del SNC molto simili a quelle conseguenti all'infezione intrauterina BVDV si trovano fra l'altro nell'idrocefalo interno, malattia ad eziologia genetica, e nella dismielinogenesi, patologia ereditaria che compare nei vitelli di razza Brown-Swiss e nei relativi incroci. Nei Paesi dell'Europa meridionale, ma non solo, occorre prendere in considerazione anche altre infezioni da virus, specialmente Blue Tongue, malattia di AKABANE e WESSELBRON Disease. La minore crescita e lo scarso sviluppo possono anche dipendere da cause genetiche (nanismo e sindrome della condrodiplosia), da un'insufficienza nutrizionale, da errori alimentari o da malattie croniche (soprattutto broncopolmonite o endoparassitosi). Per quanto riguarda la diarrea, occorre distinguere le diarree su base alimentare dalle eteropatiche infettive, soprattutto salmonellosi, coccidiosi, gastroenteriti parassitarie e dissenteria invernale. In tali malattie, tuttavia, non si riscontrano alterazioni né a livello delle mucose apparenti né negli spazi interdigitali. Contrariamente alla Malattia delle mucose, nella Febbre Catarrale Maligna tutte le mucose della testa (specialmente quelle nasali e dei semi paranasali) sono colpite. Inoltre, la malattia è caratterizzata primariamente soprattutto da cheratocongiuntivite e da encefalite non purulenta. Nella Stomatite papulosa, le alterazioni della mucosa sono, di norma, più circoscritte. L'Afta epizootica porta alla tipica formazione di afte e nella Rinotracheite

infettiva bovina le alterazioni evidenti si limitano alle vie respiratorie. Le lesioni alle mucose orali, che si presentano simili a quelle causate dalla malattia delle Mucose, si possono instaurare anche in seguito a causticazioni. Le malattie primarie a carico degli unghioni (specialmente la dermatite digitale e interdigitale) sono, a differenza della Malattia delle Mucose, limitate esclusivamente a tale ambito. Diatesi emorragiche, su base trombocitopenica si hanno anche in corso di avvelenamenti cronici da furazolidone, di avvelenamenti acuti da felce. Dopo l'ingestione di rodenticidi a base di cumarinici, in corso di micotossicosi si ha la riduzione dei fattori plasmatici della coagulazione.

8.2. Diagnosi di laboratorio

Le indagini di laboratorio rappresentano il cardine fondamentale per ottenere una diagnosi di certezza, e possono essere applicate sia al fine di investigare i singoli casi clinici, sia al fine di ottenere informazioni epidemiologiche utili a definire un piano di controllo della malattia e dell'infezione. Come per le altre malattie infettive, anche per BVDV sono applicabili due fondamentali approcci diagnostici:

- Diagnosi indiretta, rivolta alla ricerca di anticorpi specifici per BVDV nel siero di sangue e/o nel latte;
- Diagnosi diretta, tendente alla ricerca della presenza del virus in sé o, con alcune metodiche, del RNA virale.

8.2.1. Diagnosi indiretta: ricerca anticorpale

Per la ricerca di anticorpi verso BVDV, sono utilizzati differenti test sierologici: la sieroneutralizzazione, l'immunodiffusione in agar gel, la fissazione del complemento, immunoperossidasi, immunofluorescenza indiretta, western blotting e alcune varianti del test "enzime linked immunosorbent assays (ELISAs) (Saliki JT, Dubovi EJ, 2004; Sanvik T, 2005) Nella routine diagnostica, sono due le metodiche dietologiche normalmente utilizzate, e precisamente il test di sieroneutralizzazione e l'ELISA.

Il test di sieroneutralizzazione è un metodo biologico in vitro, che consente di quantificare l'effetto inibitorio sulla replicazione virale, in tessuto colture, indotto dagli anticorpi specifici neutralizzanti che compaiono in seguito ad infezione o/a vaccinazione. Gli anticorpi misurati dal test di sieroneutralizzazione sono diretti prevalentemente verso le proteine strutturali neutralizzanti ed in particolare la proteina E2 (Sanvik T, 2005). Il livello dei titoli anticorpali rilevati dipende dallo stipite virale utilizzato nel corso del test e dal suo grado di vicinanza antigenica e dalle

differenze genomiche con il ceppo di BVDV che ha indotto la risposta anticorpale. I ceppi di riferimento maggiormente utilizzati, sono il ceppo NADL e il ceppo Oregon C24V, i quali sono entrambi BVDV Tipo1a. Se gli stipiti di campo differiscono in modo sostanziale da questi ceppi (Fulton WR e Coll, 2003), è opportuno utilizzare, come ceppi infettanti nel corso del test di sieroneutralizzazione, gli isolati di campo al fine di aumentare la sensibilità del test. In alcuni casi può essere opportuno l'utilizzo, come antigene, un BVDV Tipo 2, che ben rappresenta la popolazione di BVDV antigenicamente più distante dai BVDV Tipo 1. Sono stati pubblicati differenti protocolli di esecuzione del test di sieroneutralizzazione; si può fare comunque riferimento principale a quello pubblicato dal "Office International des Epizooties (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2004".

Quando è ben eseguito e ben standardizzato, il test di sieroneutralizzazione risulta essere dotato di elevata sensibilità e specificità. I lati negativi fanno riferimento al tempo necessario per l'esecuzione (circa 4-5 giorni per l'esecuzione completa del test), alla necessità di laboratori molto ben attrezzati soprattutto per il rischio di contaminazione legato all'utilizzo di agenti infettanti ed alla gestione delle linee di coltura cellulare e, non ultimo, al costo abbastanza elevato. Il test è eseguito in piastre *microtitre* a 96 pozzetti, in cui diluizioni seriali del siero in esame sono cimentate con uno stipite di BVDV-CP. La miscela siero-virus è aggiunta ad un substrato costituito da cellule di una linea sensibile allo stesso virus. Dopo incubazione per circa 3-4 giorni, il test è letto ed il titolo di anticorpi neutralizzanti presenti nel siero in esame è rappresentato dalla più alta diluizione in grado di neutralizzare l'effetto citopatico indotto dal virus. Il titolo è espresso con un valore che rappresenta la diluizione effettuata (ad esempio 1:32 o 1:256) o con un valore logaritmico (ad esempio 1.5 o 2.4) (Tabella 1)

Tabella 1

N° Diluizioni	Valore SN	Titolo SN espresso come		
		diluizione	log 2	log 10
1	1:2	2	1	0.3
2	1:4	4	2	0.6
3	1:8	8	3	0.9
4	1:16	16	4	1.2
5	1:32	32	5	1.5
6	1:64	64	6	1.8
7	1:128	128	7	2.1
8	1:256	256	8	2.4
9	1:512	512	9	2.7
10	1:1024	1024	10	3.0
11	1:2048	2048	11	3.3
12	1:4096	4096	12	3.6

Nell'esame di un elevato numero di campioni di siero l'uso del metodo "ELISA" presenta alcuni vantaggi rispetto al test di sieroneutralizzazione. E' un test che non richiede l'utilizzo di colture cellulari e di virus infettanti, fornisce risultati in tempi rapidi (alcune ore), è relativamente poco costoso e di facile esecuzione, è possibile eseguirlo in modo automatico, e non richiede laboratori particolarmente attrezzati. Inoltre, è applicabile sia sul siero o sul plasma che sul latte e può fornire valutazioni quantitative del livello anticorpale senza ricorrere a diluizioni seriali del campione.

Alcuni kit ELISA utilizzano come antigene il BVDV raccolto da colture cellulari: in questo caso gli anticorpi rilevati saranno diretti quindi verso l'intero spettro di proteine immunogene codificate dal virus (*anticorpi totali*)

L'uso di anticorpi monoclonali (MAB), ha consentito di mettere a punto test ELISA competitivi e consente di rilevare anticorpi diretti verso specifiche proteine virali ed in particolare verso le proteine non strutturali NS2-3 o NS3.

Questa metodica è basata sul principio della competizione tra gli anticorpi presenti nel siero dei bovini sottoposti a test ed anticorpi monoclonali anti P80 accoppiati all'enzima Perossidasi e può essere suddivisa in quattro fasi operative:

- 1) La proteina P80 è adesa alle pareti dei pozzetti di una piastra micotitre per mezzo di specifici anticorpi monoclonali.
- 2) I campioni da analizzare sono sottoposti a diluizione ed incubati nei pozzetti. Se nel campione sono presenti anticorpi specifici, essi formano complessi anticorpi-P80.
- 3) Dopo lavaggio anticorpi monoclonali specifici (diretti verso un differente epitopo della proteina p80) coniugati all'enzima perossidasi sono incubati nei pozzetti. In presenza di specifici anticorpi BVDV nei sieri testati, la proteina P80 viene "mascherata" ed il coniugato non può legarsi all'epitopo corrispondente. Al contrario nei campioni negativi il coniugato può legarsi alla P80.
- 4) Dopo un ulteriore lavaggio è aggiunto un substrato enzimatico. Se il coniugato risulta essere fissato ai pozzetti, trasformerà il substrato da blu a giallo. L'intensità del colore darà l'interpretazione del livello di anticorpi anti P80 presenti nei campioni in esame.

Nei soggetti PI il quadro normale è quello della negatività sierologica totale; essi non sono in grado di produrre anticorpi verso il virus che ha indotto lo stato di immunotolleranza. Tuttavia se esposti a stipiti virali diversi dal ceppo che ha indotto lo stato di immunotolleranza, tramite infezione o vaccinazione (Bolin SR e Coll, 1991) o per mutazioni del ceppo endogeno (Collins ME e Coll, 1999), i capi PI

comunque reagiscono producendo anticorpi verso le proteine strutturali (mai verso le proteine non-strutturali).

Nel caso di una forma acuta d'infezione, si può convenientemente procedere alla raccolta di un secondo prelievo di siero (convalescente) a distanza di almeno 21 giorni di distanza dal primo prelievo effettuato nella fase acuta d'infezione (tecnica del doppio prelievo), al fine di valutare l'eventuale sierconversione, con aumento significativo del titolo anticorpale tra il primo ed il secondo prelievo (passaggio da negativo a positivo, o incremento di almeno 4 volte del titolo).

8.2.2. Diagnosi diretta: rilevazione del virus

La dimostrazione diretta della presenza del virus ha un'estrema importanza, non solo in quanto consente l'individuazione dei soggetti PI, ma anche perché, in considerazione della variabilità genomica e biotipica del BVDV, l'identificazione del tipo di virus consente di acquisire notevoli informazioni di carattere epidemiologico.

Il BVDV non è un virus particolarmente labile, tuttavia occorre sempre seguire una corretta procedura di raccolta, conservazione e spedizione al laboratorio del materiale patologico o diagnostico al fine di avere una buona probabilità di successo nell'individuazione del patogeno. Nel corso di un episodio acuto da BVDV occorre procedere alla raccolta di un tampone nasale e di un campione di feci; le secrezioni nasali e le feci sono campioni idonei alla ricerca del virus. Per un breve tempo, 7-10 giorni, il virus è reperibile a livello ematico (viremia transitoria). Nel caso di soggetti deceduti con un sospetto di BVD occorre inviare al laboratorio campioni di milza, polmone, rene e del tratto intestinale interessato da eventuali lesioni. E' opportuno procedere ad un tampone intestinale. E' fondamentale che i prelievi siano eseguiti nel modo più asettico possibile, al fine di evitare possibili e frequenti contaminazioni, e che siano inviati al laboratorio, refrigerati, e con sollecitudine.

Isolamento virale

L'isolamento virale è effettuato su tessuto-colture cellulari. Sono stati definiti diversi protocolli di isolamento, utilizzando diverse linee cellulari, vari periodi di incubazione e differenti numeri di passaggi seriali. I titoli di BVD ottenuti in colture cellulari risultano influenzati dall'attitudine replicativa degli stipiti isolati e dal substrato utilizzato. I substrati che si sono dimostrati maggiormente adatti all'isolamento sono le colture primarie di rene bovino, le cellule di turbinati e di testicolo sempre di bovino. Occorre sempre porre grande attenzione al siero fetale impiegato come

supplemento del terreno di coltura, al fine di evitare le contaminazioni, sempre possibili, di BVDV-NCP. L'isolamento da campioni ematici richiede l'inoculazione del substrato cellulare con una quota di emosiero o, ancora meglio, attraverso cocoltura della frazione leucocitaria. I BVDV-CP sono identificati in conseguenza dell'effetto citopatico indotto. L'identificazione di questi stipiti è effettuata tramite valutazione dei caratteri morfologici e fisico-chimici, e attraverso test di virus neutralizzazione con sieri iperimmuni, che, se condotti con diversi sieri, possono consentire di rilevare differenze antigeniche tra gli stipiti isolati.

Identificazione dell'antigene virale

I test che rilevano la presenza dell'antigene virale fanno affidamento sull'esistenza nel campione in esame degli antigeni codificati dal genoma del BVDV; quindi a differenza delle metodiche di isolamento o della tecnica PCR, che prevedono l'amplificazione della carica virale, la sensibilità di queste metodiche dipende dalla quantità di antigene virale presente nel campione e dalla conservazione dell'integrità antigenica del virus. La presenza del BVDV (sia CP che NCP) in tessuti o organi di soggetti venuti a morte o contenuto nel sangue (in particolare nella frazione leucocitaria) di bovini infetti in fase acuta, di bovini con viremia transitoria o persistente (animali PI) è rilevata mediante l'utilizzo di anticorpi specifici marcati con fluorocromi (immunofluorescenza diretta) o con enzimi (immunoperossidasi).

Per la ricerca dell'antigene virale nel sangue o da estratti tissutali, sono disponibili numerosi kit ELISA del commercio, allestiti grazie alla disponibilità di anticorpi monoclonali verso antigeni virali altamente conservati quali le proteine NS3, E2 e E^{ms}. L'affinarsi delle metodiche ha consentito di utilizzare i test ELISA per la ricerca antigene oltre che sul sangue *in toto* e sulla frazione leucocitaria ematica, anche sul siero. In generale, i test ELISA antigene hanno dimostrato una buona praticità d'uso, associata a valori di sensibilità e specificità, con valori compresi tra il 95 ed il 100% (Sanvick T e Coll, 1995; Brinkhof J, e Coll, 1996) Tuttavia alcuni kit commerciali hanno mostrato livelli inferiori di sensibilità (Graham e Coll, 1998). Il test ELISA per la ricerca della proteina NS3 è idoneo per la ricerca del virus in estratti d'organo o in leucociti (ottenuti da sangue trattato con anticoagulante), ma è meno sensibile quando si utilizza il siero di sangue, dove questa proteina è scarsamente presente. La necessità di dover separare i leucociti fa della ricerca della NS3 sui leucociti una procedura poco pratica nel corso di piani di controllo su larga scala, con la necessità di testare molti campioni (Schelp C e Coll, 2003) ma garantisce comunque una buona copertura diagnostica, essendo rivolto verso la proteina meglio conservata fra

i ceppi BVD (Sandvik T, 2005). Il test ELISA per la ricerca della glicoproteina E^{nrs} è il più utilizzato nell'ambito dei grandi piani di risanamento in quanto utilizzabile sul siero di sangue, matrice nella quale E^{nrs} è presente in abbondanza. E' inoltre idoneo, con piccole modifiche procedurali, per l'analisi di frammenti di cute nel corso di biopsie cutanee (Kuhne S e Coll, 1999). In generale, i test ELISA antigene hanno i vantaggi già evidenziato per i kit ELISA anticorpo rispetto al test di sieroneutralizzazione; inoltre la ricerca antigene con il metodo ELISA presenta il vantaggio di poter essere eseguito in parallelo con la ricerca di anticorpi ELISA utilizzando la stessa strumentazione. Il test ELISA antigene è stato utilizzato con successo anche nella ricerca dell'antigene virale nella milza, polmone, rene e fegato di animali PI (Shannon e Coll, 1991). In considerazione del fatto che è stata dimostrata una persistente presenza di virus nei cheratociti e nell'epitelio pilifero di animali PI, l'antigene BVDV può essere rilevato in sezioni di tessuti provenienti da biopsie cutanee con indagini immunoistochimiche (Thur e Coll, 1996; Brodersen BW, 2004). In uno studio recente la biopsia cutanea è indicata come una valida alternativa ai metodi di rilevazione del RNA virale (RT-PCR) nella ricerca di animali PI. Nelle prove di validazione della metodica, gli Autori hanno dimostrato che la ricerca dei soggetti PI con questo metodo è scarsamente influenzata dalla presenza di anticorpi colostrali in giovani vitelli (Schopf K e Coll, 2005).

Identificazione del RNA virale

La conoscenza della sequenza nucleotidica dei *Pestivirus*, incluso il BVDV, oltre a costituire la base per la comprensione del comportamento biologico di questi virus, ha consentito l'applicazione di tecniche diagnostiche basate sulle conoscenze di biologia molecolare. Sono state messe a punto sonde genomiche per la rilevazione del virus senza comunque determinare un significativo passo avanti rispetto ad altre tecniche diagnostiche. Le nuove metodiche di amplificazione di tratti del genoma virale tramite PCR hanno costituito un significativo avanzamento sia nel campo diagnostico che nella caratterizzazione genomica dei vari stipiti di BVDV. L'esecuzione del test prevede 4 fasi: estrazione del RNA, trascrizione inversa del RNA con formazione di una copia di DNA complementare all'RNA del BVDV (cDNA), processo di amplificazione genica (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*, RT-PCR), che, per ottenere un maggior livello di sensibilità del test, prevede l'utilizzo di *primer* specifici per le regioni genomiche del BVDV maggiormente conservate (in particolare le sequenze nucleotidiche riferibili a 5' UTR e al gene NS3), ed infine l'identificazione dei prodotti amplificati. Nei primi protocolli utilizzati, queste fasi erano

condotte separatamente, con un notevole impegno di tempo e con un elevato rischio di contaminazione dei campioni. Di recente i test RT-PCR combinano in un'unica fase le ultime tre fasi del processo; eliminando la necessità di utilizzare il gel elettroforetico, il rischio di trascinarsi dell'eventuale contaminazione con DNA amplificati in precedenza e di avere dei risultati falsamente positivi è molto ridotto (McGoldrick e Coll, 1999). L'utilizzo separato di differenti *primers* e sonde, consente la discriminazione tra BVDV-1 e BVDV-2 nello stesso campione (Letellier C e Coll, 2003). Anche se la reazione RT-PCR di per sé ha dimostrato di essere una metodica precisa ed affidabile, la scelta del protocollo di estrazione del RNA e la scelta del tipo di anticoagulante utilizzato nella raccolta dei campioni di sangue influenzano le performance globali del test (Willems e Coll, 1993). L'EDTA si è dimostrato essere un anticoagulante migliore dell'eparina per una buona estrazione del RNA. I costi di questa metodica sono relativamente alti, e una corretta esecuzione del test richiede personale esperto. I maggiori vantaggi della RT-PCR, in particolare nella procedura che prevede una doppia amplificazione genica sequenziale, sono un'elevata sensibilità, anche in presenza di anticorpi neutralizzanti o di sostanze citotossiche nel materiale in esame. Ciò è molto importante nel caso della ricerca di soggetti PI di giovane età, dove sono presenti elevati livelli di anticorpi materni o nel caso del monitoraggio del siero fetale bovino impiegato per il mantenimento delle colture cellulari, dove coesistono virus a basso titolo e anticorpi. Inoltre la RT-PCR misura la concentrazione virale in modo accurato e consente l'identificazione dei bovini PI già al primo prelievo, in virtù dei loro elevati titoli virali nel sangue (Gaede W e Coll, 2004).

Nella diagnosi della BVD i materiali in esame per l'applicazione della RT-PCR sono gli organi sedi di lesione, ma in particolare il sangue *in toto*, le frazioni ematiche, il plasma ed il siero di sangue. La RT-PCR è una metodica ideale per la ricerca del genoma virale nel latte di massa, in particolare nelle cellule somatiche (Drew T.W e Coll, 2000), e nel sangue in pool di più campioni (Munoz-Zanzi e Coll. 2000).

Dal punto di vista applicativo per quanto riguarda l'esecuzione del test, occorre considerare come l'RNA virale sia stato rilevato in campioni ematici conservati a temperatura ambiente fino a 24 ore dal prelievo e a 4°C fino a 72 ore. L'eventuale emolisi interferisce negativamente sulla ricerca del RNA. Quindi la qualità del campione e la tempistica di consegna al laboratorio del materiale stesso sono fattori fondamentali per la buona riuscita dell'identificazione del RNA virale mediante RT-PCR. La sensibilità di isolamento della PCR è sicuramente superiore a quello dei test ELISA, in quanto il virus BVD è amplificato prima di procedere alla sua ricerca.

Tuttavia, va sottolineato il fatto che tale differenza di sensibilità è più evidente nei bovini immunocompetenti con infezione acuta in atto (Graham DA e Coll, 1998).

Nei capi PI invece, dove le concentrazioni virali sono 100-1000 volte più elevate (Gaede W e Coll, 2004; Sandvik T, 2005), anche i test ELISA, purché la metodica sia eseguita sulle matrici idonee, assicurano una sensibilità sufficiente, e raggiunge nelle condizioni migliori il 95%; questi test hanno comunque un limite obiettivo nel livello della viremia che, anche nei soggetti PI, non è costante nel tempo (Cavirani S e Coll, 2000; Brock KV e Coll, 2001). Il problema della sensibilità si ripropone nel caso di campioni collettivi (pool di sieri/latte di massa), nei quali il ricorso alla PCR diventa necessario.

Tutti i test sopra elencati soffrono inoltre, in modo variabile, di un certo limite di sensibilità nella ricerca dei soggetti PI nei primi mesi di vita. Lo stimolo immunitario esercitato dal virus BVD di origine fetale fa sì che le bovine arrivino al parto con un titolo anticorpale così elevato che può essere considerato predittivo per identificare bovine gravide portatrici di feti PI (Lindberg A e Coll, 2001).

Il vitello PI riceve quindi per via colostrale un carico elevato di anticorpi colostrali, i quali nei primissimi giorni di vita possono portare ad una rapida scomparsa sia delle proteine virali nel sangue sia dei leucociti infetti circolanti: non solo quindi le prove ELISA, ma anche l'isolamento virale e, in una certa misura, anche la PCR, possono risultare transitoriamente negativi.

Tale "effetto finestra" non si osserva in maniera costante, essendo dipendente dalla capacità che il ceppo virale ha di moltiplicarsi, dal livello più meno elevato dell'immunità acquisita con il colostro, dalla matrice (leucociti/siero) e dalla metodica utilizzata (ELISA o PCR) per le analisi (Wolf G e Coll, 2004; Zimmer e Coll, 2004).

In sintesi.

Durata massima (dalla nascita) del periodo "finestra" nel siero di sangue

- a) PCR: alcune settimane
- b) ELISA^{nrs}: due mesi

Durata massima (dalla nascita) del periodo "finestra" nei leucociti

- a) PCR: nessun periodo finestra (campioni esaminati in singolo, non in pool)
- b) ELISA^{nrs}: tre mesi (riducibili a due se i leucociti sono separati dal plasma subito dopo il prelievo, quando sono ancora vivi e con membrana impermeabile agli anticorpi circolanti).

Dati preliminari disponibili, da confermarsi ulteriormente, indicano l'assenza del "periodo finestra" se l'ELISA^{nrs} è condotta su frammenti biotici di cute auricolare (Kuhne S e Coll, 1999).

8.3. Interpretazione dei dati sierologici

Nel caso dell'infezione da BVDV è fondamentale poter distinguere, a livello sierologico, gli animali immunocompetenti dai soggetti immunotolleranti persistentemente infetti (PI). La condizione di immunotolleranza di norma si caratterizza per la presenza della viremia persistente in assenza di una reazione anticorpale. Sfortunatamente, almeno per quanto attiene gli anticorpi neutralizzanti, la negatività non è in assoluto indice di infezione persistente; i soggetti negativi alla sieroneutralizzazione devono necessariamente essere testati per la presenza della viremia al fine di determinare lo stato di immunotolleranza o, quanto meno, essere testati per la ricerca di anticorpi verso le proteine non strutturali (NS2-3 o p80-120).

D'altro canto, alcuni soggetti immunotolleranti infettati o sottoposti a vaccinazione (Lobman M.S, e coll, 1986) possono risultare positivi, ancorché a titoli bassi, alla ricerca di anticorpi sieroneutralizzanti. I soggetti PI, di norma, risultano invece negativi alla ricerca di anticorpi verso le proteine non strutturali (NS3 e NS2-3). Ciò consente di indirizzare la ricerca del virus, e la conseguente verifica dello stato di immunotolleranza, verso i soggetti che risultano negativi verso NS2-3. Nella ricerca dei soggetti PI occorre prendere in considerazione le problematiche connesse agli anticorpi passivi di origine colostrale esposti in precedenza. E' stato dimostrato che gli anticorpi passivi possono ridurre o bloccare l'infettività virale ed impedire l'identificazione dell'antigene virale per un periodo che può arrivare fino ai tre mesi di vita (Palfi V e Coll. 1993). Dal punto di vista del controllo dell'infezione è importante distinguere gli animali risultati sieropositivi in conseguenza della viremia transitoria legata ad un'infezione in corso, dai soggetti PI. L'eventuale positività virologica evidenziata, va quindi confermata da un successivo test effettuato ad almeno 15 giorni di distanza dal primo.

L'efficacia dei diversi metodi diagnostici nel rilevare la presenza del virus o del RNA virale, varia in funzione dei differenti metodi. Una particolare categoria di soggetti PI sono i feti ancora vitali all'interno delle bovine infette; questi risultano, almeno prima della nascita, del tutto inaccessibili alla ricerca del virus (Lindberg e Coll, 2002), Inoltre, rappresentano un grande rischio epidemiologico, in particolare se si tratta di manze, o di vacche gravide, acquistate introdotte in allevamenti non infetti. E' quindi buona norma effettuare il monitoraggio tempestivo dei vitelli, nati in allevamento, provenienti da bovine acquistate.

Un fattore critico nella ricerca degli animali PI è che il metodo utilizzato sia in grado di identificare tutti i ceppi di campo di BVDV appartenenti ai diversi biotipi (tipo 1 e tipo 2), ed ai diversi gruppi sottotipi genetici. La diversità antigenica tra i vari ceppi, che

risiede principalmente nella glicoproteina maggiore dell'envelope E2 (gp53), può indurre una notevole variabilità dei titoli virus neutralizzanti negli antisieri testati con differenti antigeni (Couvreur e Coll. 2002 @; Patel e Coll., 2005).

I test sierologici possono dare differenti risultati in funzione dell'età dei soggetti testati. Ad esempio un vitello neonato non infetto risulterà negativo ad un campione di sangue pre-colostrale, e sarà positivo se il vitello assumerà il colostro da una vacca positiva; lo stesso vitello diventerà ancora negativo all'età di circa 6-8 mesi di vita. Una particolare situazione, si verifica nelle bovine immunocompetenti che portano in utero feti PI vitali, nel corso dell'ultimo trimestre di gestazione. Il rilascio continuo di virus da parte del feto in crescita induce un continuo booster immunologico, che esita in uno stato di iperimmunità con elevati livelli anticorpali negli ultimi 2 mesi di gestazione. Questa situazione, è stata suggerita come un possibile indicatore diagnostico della presenza di un feto PI in bovine con elevati livelli di anticorpi (Lindberg e Coll, 2001).

Il livello di anticorpi indotto dai vaccini è in funzione del tipo di vaccino e dello schema vaccinale utilizzato. I vaccini vivi attenuati inducono un livello di anticorpi neutralizzanti molto simile a quello indotto dall'infezione naturale, inclusa una risposta verso NS2-3 non distinguibile da quella indotta dall'infezione. La proteina non strutturale NS2-3 è altamente immunogenica ed è antigenicamente conservata; inoltre il fatto che questa proteina venga espressa in fase di replicazione virale anche nel citoplasma delle cellule infette, fa di questa proteina il target ideale per la ricerca di animali che abbiano avuto un contatto con il virus. Tra le proteine strutturali, la E^{nrs} mostra una minor diversità antigenica rispetto la E2, ed è secreta dalle cellule infette. Il RNA virale può essere identificato in quasi tutti i materiali patologici. Occorre avere cura di utilizzare "primers" o sonde in grado di scoprire entrambi i biotipi BVDV Tipo 1 e BVDV Tipo 2, includendo tutti i più importanti sottogruppi genetici del virus. In pratica, questo significa che la ricerca va indirizzata verso parte della regione 5'-UTR del genoma virale, nelle quali sono localizzate le regioni gnomiche meglio conservate.

Nella tabella seguente, sono riassunti i quadri anticorpali e virologici ematici verso BVDV che si possono osservare in una popolazione infetta, non sottoposta ad alcun trattamento vaccinale (Tabella 2):

Tabella 2 - Quadri anticorpali e virologici in soggetti non vaccinati

Categoria animali	Anticorpi SN	Anticorpi NS2-3	Virus	Status
non infetti	-	-	-	NON INFETTO
infezione acuta	-	-	-/+	viremia transitoria
post infezione	+	+	-	INFETTO
immunità passiva	+	+	-	positività per 5-9 mesi dalla nascita
immunotolleranti PI	-/+	-	+	viremia persistente
PI da madri immuni	+	+	-/+	+ per 4-10 settimane dalla nascita
gravidati con vitello PI	+/++	+	-	Alti titoli SN ultimi 2/3 mesi di gestazione
tori immuni	+	+	-	seme raramente positivo

Cavirani S. 2002 (modificata)

Nella tabella seguente sono riportati i quadri sierologici riscontrabili nella diagnostica BVD, in riferimento allo stato di immunotolleranza (Tabella 3):

Tabella 3

ANIMALE	STATO	ANTICORPI	ANTICORPI NON
		STRUTTURALI	STRUTTURALI
Immunocompetente	Non infetto/non vaccinato	NEG	NEG
	Infetto	POS	POS
	Vaccinato con vaccino attenuato	POS	POS/NEG (1)
	Vaccinato con vaccino inattivato	POS	POS/NEG (2)
Immunotollerante (nato da madre)	≤ 2 mesi di età	POS	POS
	3 - 6 mesi di età	NEG	POS
Immunocompetente	> 6/8 mesi di età	NEG	NEG
	> 6 mesi di età + superinfezione (3)	POS	NEG

Nardelli S. 2006

Legenda

- (1) positivo/negativo in funzione del ceppo vaccinale (gli stipti termosensibili non inducono una significativa e rilevabile risposta verso le proteine non strutturali (Cavirani S e Coll, 2005).
- (2) positivo/negativo in funzione della quantità di proteina NS2-3 contenuta nel vaccino e del numero di immunizzazioni subite (Graham e Coll, 2003; Valla G e Coll, 2002; Arias P e Coll, 2004)
- (3) superinfezione: esposizione del bovino PI a ceppi BVD antigenicamente diversi da quello endogeno, di origine esterna (vaccinazione, infezione) o interna (mutazione).

9. DATI EPIDEMIOLOGICI

L'infezione da BVDV è ampiamente diffusa in tutto il mondo. Il virus è eliminato nell'ambiente da animali infetti in modo transitorio, in conseguenza dell'infezione acuta (per un periodo che può arrivare alle 2 settimane) o da animali persistentemente infetti (immunotolleranti PI), soggetti che hanno contratto l'infezione acuta in fase fetale, per via transplacentare. Questi animali eliminano una grande quantità di virus e rappresentano la maggiore fonte d'infezione in un allevamento infetto, ma non l'unica.

E' stato dimostrato, infatti, che l'infezione da BVDV può perpetuarsi in allevamento anche in assenza di soggetti PI grandi eliminatori attraverso il probabile ruolo della viremia transitoria (Moen A e Coll, 2005 – Valla G e Coll, 2006). Il virus può essere introdotto in un allevamento non infetto attraverso l'introduzione di soggetti PI con viremia persistente, di soggetti in fase d'infezione acuta anche asintomatica (viremia transitoria), e/o di animali gravidi con feti PI. Il contatto di animali sensibili (soprattutto se gravidi) con soggetti eliminatori nel corso di trasporto, mostre, mercati o pascolo costituisce un reale pericolo per gli allevamenti indenni. Il virus può essere inoltre veicolato da altre specie animali, ed in particolare da piccoli ruminanti (ovini e caprini) e ruminanti selvatici.

Da non trascurare è la possibilità di trasmissione tramite il seme di tori infetti, anche attraverso la fecondazione artificiale (Meyling A e Coll, 1988 – Schlafer DH e Coll, 1990). Per quanto riguarda la possibile trasmissione di BVDV nel corso della pratica dell'Embryo Transfer (ET), l'International Embryo Transfer Society (IETS) ha definito i protocolli da seguire al fine di ridurre/annullare il rischio di trasmissione.

La diffusione dell'infezione da BVDV può essere definita attraverso la valutazione della prevalenza di animali infetti (% di animali positivi sierologicamente sul totale del gruppo) in una determinata popolazione (mandria, regione, Paese), oppure attraverso la valutazione della prevalenza degli animali persistentemente infetti (PI).

Per quanto attiene la valutazione della prevalenza anticorpale occorre considerare che i titoli anticorpali subiscono un decremento lento (Brownlie J e Coll, 1987), e quindi sono una valida indicazione per valutare l'avvenuta infezione anche a distanza di tempo. Un eventuale intervento vaccinale, soprattutto con vaccini vivi modificati ed in particolare nei soggetti adulti plurivaccinati, interferisce non poco con la corretta valutazione epidemiologica effettuata tramite i rilievi sierologici.

La valutazione della prevalenza dell'infezione attraverso la valutazione del numero di animali PI in un determinato gruppo, soffre del fatto che alcuni feti PI possono andare incontro ad aborto, e altri soggetti PI possono venire a morte poco dopo la nascita. Il

numero di animali PI in un determinato gruppo non è quindi pienamente indicativo della reale prevalenza dell'infezione, dato che la maggior parte delle infezioni acute non necessariamente esita nella nascita di soggetti PI.

I dati disponibili riportano un'elevata diffusione della sieropositività per BVDV, con prevalenze che variano dal 20 all'80% in funzione delle aree geografiche considerate (Alenius S e Coll, 1996; Sandvik T, 2004; Hult L e Coll, 2005; Joly A e Coll, 2005; Ribeiro JN e Coll, 2005). Per quanto riguarda la situazione italiana, dati che si riferiscono ad allevamenti da latte di varie regioni, gran parte dei quali riferivano un'anamnesi di disordini riproduttivi, riportano valori compresi tra il 30 ed il 90%, con una maggior percentuale di positività nelle bovine adulte pluripare (Cavirani S e Coll, 1992 – Pozzi P e Coll, 1999). L'infezione da BVDV risulta essere diffusa anche nell'allevamento bufalino Italiano, dove circa l'80% degli allevamenti ed il 20% degli animali testati presentavano anticorpi verso BVDV (Cavirani S e Coll, 1995)

Dati più recenti confermano l'elevata diffusione dell'infezione negli allevamenti da latte del Nord Italia, con una prevalenza del 71% in allevamenti non sottoposti a vaccinazione (Frigerio M e Coll, 2003). Indagini volte a determinare il genotipo di BVDV isolati in Italia nel corso di indagini condotte tra il 1998 ed il 1999, hanno dimostrato l'assoluta prevalenza del BVDV Tipo 1 (Falcone E e Coll, 2001).

Il BVDV Tipo 2 è stato sospettato di aver causato una sindrome emorragica in un allevamento del Nord Italia (Luzzago C e Coll, 1999), ed inoltre studi di caratterizzazione genomica effettuata su BVDV isolati da piccoli ruminanti, hanno dimostrato la presenza di 7 ceppi di BVDV Tipo 2 sul totale di 9 isolati. Studi retrospettivi hanno dimostrato che il BVDV Tipo 2 risulta circolare in Italia fino dagli anni 90 (Fratelli A e Coll, 2001) Ricerche relative alla presenza di soggetti PI all'interno delle mandrie, indicano valori oscillanti tra lo 0,1% ed il 2% (Houe H, 1995). Un quarto degli animali PI identificati aveva un'età inferiore ai 6 mesi di vita, la maggior parte (50%) aveva un'età compresa tra i 6 ed i 14 mesi; il restante 25% aveva un'età superiore ai 15 mesi di età (Houe H, 1993).

Questo dato mette in evidenza che una notevole parte dei soggetti PI raggiunge la pubertà ed inizia l'attività riproduttiva con conseguenze immaginabili sulla progenie. Indagini effettuate in accordo al protocollo di ricerca di soggetti PI nei vitelli inviati al Centro Genetico A.N.A.F.I. di Cremona, riportano, nel periodo compreso tra il 1996 ed il 2002, l'identificazione di 14 torelli PI (0,5%) su 2956 soggetti esaminati. In 25 (31%) degli 81 gruppi considerati è stata rilevata sieroconversione per BVDV; in 9 di questi gruppi è stata dimostrata la presenza di almeno un soggetto immunotollerante (PI).

E' comunque importante rilevare che in due gruppi è stata rilevata la presenza di soggetti con viremia transitoria (Brianzi M e Coll, 2003). Dati ottenuti nel corso di un'indagine epidemiologica effettuata su allevamenti dal latte del Veneto, hanno evidenziato anticorpi verso NS2-3 nel 49% dei soggetti testati; lo 0.4% dei soggetti è evidenziato viremia persistente a due prelievi a distanza di almeno 3 settimane (animali PI) (Nardelli S e Coll, 2004). Il BVDV può indurre aborto tra il 42° ed il 260 ° giorno di gestazione. Indagini recenti effettuate in Veneto, volte ad evidenziare una possibile causa infettiva di aborto nella bovina da latte, hanno consentito di identificare il BVDV nel 4,9% dei feti analizzati con il metodo della RT-PCR, mentre il 51.5% dei capi testati presentavano anticorpi verso BVDV (Barberio A e Coll, 2006). Nella situazione Italiana, valutando gli aspetti epidemiologici, non si può trascurare la tipica situazione che connota l'allevamento intensivo del bovino da carne.

La problematica dell'infezione da BVDV non è considerata prioritaria in questo comparto zootecnico, in quanto nell'allevamento da carne italiano viene a mancare, quasi del tutto, la componente delle bovine in attività riproduttiva; quindi vengono meno molti degli aspetti negativi (cioè tutti i danni all'apparato riproduttivo) legati all'infezione da BVDV. Inoltre occorre ricordare come è del tutto poco frequente il riscontro di segni clinici chiaramente riferibili all'azione patogena del virus.

Tutto questo non significa che il BVDV non circoli negli allevamenti, e che alla presenza del virus non corrisponde la comparsa di patologia, in particolare legata all'effetto immunodepressivo tipico del virus favorente l'azione di altri patogeni batterici e/o virali. Indagini epidemiologiche condotte negli allevamenti intensivi italiani hanno evidenziato una prevalenza globale del 95%, e circa l'80% degli animali, non vaccinati sottoposti a test, è risultato positivo per BVDV. Il BVDV è stato identificato come agente causale nell'ambito di sindromi enteriche, soprattutto in animali di età inferiore ai 6 mesi di vita, e di sindromi respiratorie in animali di età superiore.

La circolazione del BVDV nell'allevamento intensivo da carne è legato alla presenza di soggetti PI nei soggetti all'ingrasso sia di provenienza nazionale che estera (Howard C e Coll. 1986). Indagini destinate alla ricerca di animali PI all'interno di gruppi di bovini da carne, hanno evidenziato una percentuale di animali PI pari al 1% (Cavirani S. e Coll 2000). Inoltre, non va trascurato il fatto che gli animali introdotti negli allevamenti da ingrasso italiani provengono da un gran numero di Paesi (Irlanda, Francia, Belgio, Austria, Polonia, Repubblica Ceca, Ungheria, Romania e altri) e che il virus BVD è connotato da un'estrema variabilità, fattori che aumentano il rischio di introduzione nel territorio nazionale di nuovi stipti virali.

10. STRATEGIE DI CONTROLLO

I primi tentativi di controllo dell'infezione da BVDV sono stati indirizzati al contenimento delle perdite economiche connesse all'infezione stessa attraverso la pratica vaccinale. L'importanza di eliminare gli animali persistentemente infetti (PI) da BVDV è stata riconosciuta solo nei primi anni '90, in concomitanza con l'implementazione dei primi progetti di eradicazione attivati, a livello nazionale, nei paesi scandinavi. Questi programmi di eradicazione si basavano sull'identificazione degli allevamenti con infezione attiva da BVD, sull'eliminazione dei soggetti PI, su limitazioni agli spostamenti degli animali ed altre misure di profilassi diretta.

L'esecuzione di uno screening sierologico di massa, previsto da questi piani, è stato reso possibile dallo sviluppo e miglioramento delle metodiche diagnostiche. La ricerca degli animali PI è stata facilitata dalla disponibilità di test ELISA per la ricerca dell'antigene e dalle tecniche di amplificazione genica (PCR). Nell'ambito dell'applicazione di questi piani, la vaccinazione era rigorosamente vietata ed erano previsti interventi su base privata o statale (Lindberg A e *Coll*, 1999). Questi programmi hanno consentito di procedere con successo all'eradicazione dell'infezione nei Paesi Scandinavi (Sandvik, 2004).

Nel nostro paese, la Provincia Autonoma di Bolzano ha introdotto l'obbligatorietà del controllo di BVD per tutti gli allevamenti bovini da latte nell'ottobre 1999, e la riduzione della circolazione virale è testimoniata dal decremento di soggetti PI dall'1,1% (1999-2000) allo 0,26% (2001-2002). Altri piani di controllo sono stati avviati dalla provincia di Trento e dalla regione Friuli Venezia-Giulia, e a livello di area-test nelle provincie di Lecco e Como. In generale, nella situazione Italiana non è previsto, per la maggior parte del territorio, ed, in particolare, nelle aree a maggiore vocazione zootecnica quali la bassa Lombardia, il Veneto, l'Emilia Romagna ed il Piemonte, alcun piano organizzato per il controllo e l'eradicazione dell'infezione da BVDV.

Nel contesto Italiano, a livello del singolo allevamento, sono possibili tre approcci:

1. Profilassi diretta, il cui punto cardine è la ricerca, identificazione e rimozione dei soggetti immunotolleranti PI, in associazione a strette misure di biosicurezza.
2. Profilassi indiretta, che si basa sul ricorso alla vaccinazione sistematica verso BVDV.
3. Integrazione tra profilassi diretta ed indiretta, attraverso l'applicazione dei due punti precedenti.

10.1. Profilassi diretta

Il ricorso a quest'approccio prevede il riconoscimento del ruolo centrale nell'epidemiologia del BVDV svolto dagli animali immunotolleranti PI, e quindi la loro ricerca, identificazione ed eliminazione dalla mandria. Si distinguono tre fasi operative:

- individuazione dell'allevamento infetto;
- ricerca, individuazione ed allontanamento dei soggetti PI;
- monitoraggio aziendale dell'allevamento risanato

10.1.1. Individuazione dell'allevamento infetto

Per allevamento infetto si intende un allevamento nel quale si è evidenziata un'attiva circolazione da BVDV, imputabile o meno alla probabile presenza di animali PI. Il sospetto della presenza in un allevamento di soggetti PI può essere avanzato in seguito al rilievo di sintomi tipici di MD (evento abbastanza raro), alla presenza di situazioni di ipofertilità (ritorni in calore, riassorbimenti embrionali) e/o aborti, o all'evidenza di ricorrenti sindromi respiratorie e/o gastroenteriche in particolare nei giovani vitelli (Nardelli S, 2006).

La verifica dell'eventuale circolazione virale si basa sull'assunto che gli animali PI, eliminando in modo più o meno costante elevate quantità di virus, determinano una quasi totale sieropositivizzazione dell'intero effettivo o almeno del gruppo in cui sono presenti i soggetti PI. Quest'ultima situazione è tipica degli allevamenti in cui la rimonta (vitelli e manze) è alloggiata separatamente dagli animali in attività riproduttiva.

L'ingresso in allevamento di soggetti immunocompetenti infetti in modo acuto (viremia transitoria), esita in casi relativamente isolati di infezioni secondarie, che possono dare luogo, nel caso in cui bovine gravide "a rischio" (cioè nel periodo di gestazione nel quale è possibile l'instaurarsi dell'immunotolleranza) siano infettate, alla nascita di nuovi soggetti PI.

Nel caso dell'introduzione/acquisto di soggetti PI o di bovine (manze o vacche) gravide di un feto PI il livello di sieropositivizzazione ed i livelli anticorpali saranno molto elevati.

L'indagine sierologica con il metodo ELISA per anticorpi (normalmente è utilizzato il test ELISA per la ricerca di anticorpi verso NS2-3) può essere condotta sia sul sangue (siero e plasma), sia sul latte. Possono essere sottoposti a test:

- tutti i soggetti dell'allevamento
- un numero limitato e selezionato di animali (*spot test*)

Il primo approccio presenta ovviamente il vantaggio di fornire un quadro quanto mai accurato della reale prevalenza dell'infezione, ma risulta oneroso sia per quanto riguarda l'aspetto economico che quello operativo.

Per quanto riguarda gli *spot test* sono state definite elaborazioni statistiche che, in considerazione della notevole quantità di virus eliminato da questi soggetti, indicano come esista una buona probabilità di rilevare un'elevata sieroprevalenza in un gruppo dove è presente anche un solo animale PI, (Houe H e Coll, 1995).

Il rilievo di una sieropositività in giovani vitelli, una volta esaurita l'immunità di tipo colostrale, risulta un chiaro segno di circolazione virale riferibile alla possibile presenza di soggetti PI.

La scelta dei soggetti da sottoporre a test, nell'ambito dell'approccio *spot*, va eseguita tenendo conto alcuni punti fermi:

- gli animali testati devono essere nati in allevamento, al fine di non alterare il quadro globale dell'allevamento oggetto di valutazione.
- è opportuno includere nel campionamento un certo numero di animali di età compresa tra 6 e 12 mesi di vita (in quanto testimoni della recente storia infettiva della mandria), di animali di età compresa tra i 15 e 36 mesi di vita, e di animali adulti in lattazione e in asciutta.
- gli animali sottoposti ad esame dovranno essere rappresentativi delle diverse strutture aziendali, nel caso di allevamenti di grandi dimensioni, ripartiti in diversi capannoni; è stato infatti accertato che la velocità di diffusione dell'infezione è influenzata dal livello di separazione tra i diversi gruppi aziendali (Viet AF e Coll, 2004).

In accordo con le indicazioni fornite dalla statistica il numero di animali da sottoporre a test è in funzione della dimensione del campione (o dei campioni) da esaminare. Nella tabella seguente è riportato un possibile atto a definire il numero di animali da prelevare (Tabella 4):

Tabella 4

Dimensione della popolazione	Prevalenza attesa			
	2%	5%	10%	20%
10	10	10	10	8
50	48	35	22	12
100	78	45	25	13
500	129	56	28	14

In una stalla di 100 capi, sottoponendo a test 13 animali avremo il 95% di probabilità di trovare una prevalenza superiore al 20%. Il rilievo di una prevalenza anticorpale superiore al 20% è più che sufficiente per evidenziare la presenza dell'infezione in un gruppo in cui si sospetta sia presente un soggetto PI.

L'interpretazione dell'indagine sierologica può essere condizionata da un'eventuale profilassi vaccinale, che non consente una corretta valutazione della sieroprevalenza. In particolare, ciò accade nel caso dell'utilizzo di vaccini vivi attenuati, che inducono non solo alti livelli anticorpali neutralizzanti, ma anche elevati livelli di anticorpi verso le proteine non strutturali (NS2-3) (Cavirani S e Coll, 2005).

I vaccini inattivati, al contrario, inducono una risposta prevalentemente rivolta verso le proteine strutturali, evocando una scarsa o nulla risposta anticorpale verso le proteine non strutturali (Graham DA e Coll, 2003 - Valla G e Coll, 2002 - Arias, P e Coll, 2004); in tale modo i vaccini inattivati inducono una risposta anticorpale differenziabile da quella indotta dall'infezione naturale, almeno negli animali che hanno ricevuto un numero limitato di vaccinazioni.

Dall'analisi dei risultati possono emergere differenti situazioni:

- Totale negatività dei campioni esaminati per anticorpi verso NS2-3, o una bassa percentuale di sieroprevalenza (<20%). Questo risultato indica l'assenza di soggetti PI nel gruppo in esame.
- Positività elevate (\geq al 80%), indicano la probabile presenza nel gruppo in esame di uno o più soggetti PI. Nel caso in cui l'elevata positività è concentrata in uno solo (o più di uno) dei gruppi esaminati, questi sono indiziati della presenza di animali PI.
- Una % di positività intermedia (media sieroprevalenza). Questo dato risulta di difficile interpretazione. In alcuni casi ci si può trovare di fronte ad un certo numero di capi "falsi positivi", ed in particolare quando i campioni di siero appena prelevati non sono sottoposti né ad inattivazione né a congelamento (Mars MH e Coll, 2005). Inoltre, occorre anche tenere conto, come accennato in precedenza, che è stata accertata la possibilità di rilevare elevati livelli di circolazione virale anche in assenza di soggetti PI (Moen A e Coll, 2005 – Valla G e Coll, 2006), e che ci si trovi di fronte a contatti occasionali con bovini infetti in modo acuto (viremia transitoria).

Una volta che è stato individuato l'allevamento infetto si può procedere alla ricerca ed individuazione dei soggetti PI e alla predisposizione di un'eventuale programma di vaccinazione.

10.1.2. Individuazione degli animali con infezione persistente

Una volta che è stato formulato il sospetto clinico, confermato dall'evidenza sierologica, della presenza d'infezione da BVDV, si può procedere alla ricerca dei soggetti viremici, potenzialmente PI. In linea teorica, in considerazione della condizione immunitaria propria degli animali PI, derivante dall'incapacità di produrre anticorpi verso antigeni comuni a tutti i BVDV, quali quelli diretti verso le proteine non strutturali NS2-3, tutti i soggetti che risultano negativi alla ricerca anticorpale verso NS2-3 possono essere dei potenziali animali PI.

E' quindi possibile concentrare la ricerca dei soggetti PI sugli animali che sono risultati negativi allo screening sierologico effettuato con il metodo "ELISA" anticorpi per NS2-3. L'esperienza desunta dalla letteratura e dalla pratica, considerata la ridotta aspettativa di vita che connota i soggetti PI (Houe H e Coll, 1993) suggerisce che la maggior parte dei soggetti PI si concentra nella categoria degli animali d'età inferiore ai due anni di vita, ai quali occorre dedicare una particolare attenzione, ancorché non in via esclusiva. Tuttavia, indagini italiane, effettuate nel corso della prima fase del piano d'eradicazione della BVD nella Provincia di Bolzano (autunno 1999-maggio 2000) hanno evidenziato che il 25% dei 700 bovini PI identificati e rimossi aveva più di due anni (Stifter E. (2006) Ufficio Veterinario Provinciale, Bolzano. Comunicazione personale).

Una particolare attenzione va rivolta agli animali molto giovani (d'età inferiore ai 2 mesi di vita), per la possibile falsa negatività del test virologico a causa dell'effetto finestra descritto in precedenza. In tale fascia d'età diventa utile il ricorso alla PCR eseguita su singoli campioni. Si può inoltre ricorrere alla PCR eseguita su frammenti di cute auricolare prelevati tramite biopsia cutanea.

Una volta che è stato accertato lo stato viremico, questo dovrà essere confermato al fine di comprovare lo stato di viremia persistente e quindi di immunotolleranza, ed escludere uno stato di viremia transitoria in seguito ad un'infezione acuta. Si procederà quindi ad un test di conferma della viremia una volta che siano trascorse almeno 2-3 settimane dal primo accertamento, periodo in cui va ragionevolmente ad esaurimento lo stato di viremia transitoria (Sandvik T e Coll, 1997). Nel test di conferma può essere utilizzata la ricerca di anticorpi verso le proteine strutturali o non strutturali, che evidenziano l'avvenuta sieroconversione che sarà presente nei

soggetti immunocompetenti, che erano viremici in seguito ad infezione transitoria, e assente in quelli PI. Utilizzando la PCR esiste la possibilità di rilevare soggetti falsamente positivi in quanto la positività virologica può persistere per un periodo di tempo superiore alle tre settimane (Crawford A e Coll, 2005).

In caso di positività confermata al secondo prelievo, l'animale va definitivamente considerato come PI, e, quindi, va eliminato.

Nel caso di accertamento, al secondo prelievo, di uno stato di negatività virologica associato ad un permanere dello stato di negatività verso gli anticorpi NS2-3 si dovranno ripetere le analisi volte ad escludere con certezza lo stato di immunotolleranza.

La ricerca dei soggetti PI sconta i limiti obiettivi di sensibilità dei test per la ricerca dell'antigene virale BVD effettuato con il metodo ELISA, e le oscillazioni della viremia che si riscontrano nei soggetti persistentemente infetti (Brock KW e Coll, 2001) e che possono fare scendere i titoli viremici al di sotto della soglia di sensibilità dei test.

La PCR presenta più elevati livelli di sensibilità e offre maggiori garanzie. Questa metodica può essere applicata su tutti i soggetti presenti in allevamento o, al fine di contenere i costi, può essere eseguita in "pool" di alcuni campioni (gruppi di 15-20 animali). Una volta che sia stato identificato un pool positivo si procede all'esecuzione della PCR in pool ridotti (di 5 campioni) o direttamente sui campioni individuali appartenenti al/ai pool positivi. I soggetti positivi potenzialmente PI devono essere riconfermati viremici e devono mostrare quindi assenza di sieroconversione.

Schematizzando, tenendo conto delle considerazioni sopra espresse, può essere adottato, nella pratica, i seguenti protocolli di lavoro per la ricerca ed identificazione dei soggetti PI (Tabella 5):

Tabella 5

Fase	Procedura da attivare
1	PCR in pool o su tutti i capi aziendali
2	PCR individuale sui capi del o dei pool positivi.
3	Dopo 3 settimane, conferma dello stato viremico dei soggetti positivi alla PCR in fase 2, mediante ricerca BVD antigene e/o verifica della presenza di anticorpi verso le proteine non strutturali NS2-3.
4	Eliminazione dei soggetti viremici persistenti (PI), positivi alla ricerca virale e negativi agli anticorpi BVD NS2-3.

10.1.3. Monitoraggio aziendale

Un allevamento va considerato potenzialmente risanato nel momento in cui sono stati individuati ed eliminati tutti gli animali immunotolleranti PI, e sia stata accertata assenza di circolazione del virus. Raggiunto questo obiettivo, nel caso in cui era praticato un intervento vaccinale, questo potrebbe essere considerato non più necessario.

L'interruzione della pratica vaccinale tuttavia è auspicabile unicamente in allevamenti di piccole dimensioni che si trovano in aree con una bassa prevalenza dell'infezione da BVDV. Negli allevamenti di grandi dimensioni, dove la trasmissione dell'infezione da animale infetto transitoriamente ad animale sano gioca un ruolo importante nell'indurre il rischio di nascita di nuovi animali PI, il mantenimento della pratica vaccinale risulta essere una scelta opportuna.

In ogni caso andranno messe in atto alcune procedure volte al monitoraggio dell'allevamento e dovranno essere applicate stringenti misure di biosicurezza al fine di limitare e se possibile azzerare il rischio di una nuova introduzione del virus.

Tutti i vitelli che nascono in stalla, almeno per l'anno successivo all'individuazione ed eliminazione dell'ultimo vitello PI, devono essere controllati per la ricerca dei virus in quanto tra i nuovi nati possono nascondersi uno o più vitelli PI. Il periodo minimo di un anno è calcolato sommando i nove mesi della gravidanza ad un periodo di cautela che può essere fissato in un minimo di tre mesi, ma che può essere anche ragionevolmente più ampio.

Particolare attenzione deve essere posta agli animali introdotti in allevamento: tutti gli animali acquistati dovranno essere sottoposti a ricerca dell'antigene su base individuale (con ELISA antigene E^{nrs} o PCR). Nel caso di acquisti di bovine gravide è indispensabile sottoporre a test anche i neonati.

La ricerca virologica sui nuovi nati può essere effettuata con:

- ELISA antigene E^{nrs}, su campioni di sangue precolostrale (questa soluzione evita la permanenza di potenziali vitelli PI in allevamento) o dopo il compimento del 60° giorno di età.
- PCR su leucociti individuali o PCR su frammenti di cute auricolare entro il 2° mese di vita.

Negli allevamenti nei quali sono stati rimossi i soggetti PI, al fine di rilevare con tempestività un'eventuale nuova circolazione virale, è necessario programmare controlli sierologici periodici. Questi, tenendo conto della componente relativa ai costi delle analisi e all'impegno necessario alla gestione del monitoraggio, possono essere eseguiti attraverso:

- a) il controllo periodico (semestrale o annuale) di tutti i capi in allevamento.
- b) un controllo a spot su un numero di campioni significativi delle varie entità di allevamento, includendo sempre un campione di manzette e manze.
- c) test sul latte di massa nelle bovine in lattazione.

10.2. Profilassi indiretta

Alla strategia (profilassi diretta) che prevede un approccio di tipo eradicativo, basato sulla ricerca, identificazione ed eliminazione degli animali persistentemente infetti (PI), che è stata ampiamente applicata nei Paesi Scandinavi, si affianca una strategia basata sulla vaccinazione.

Gli obiettivi principali della vaccinazione sono il controllo degli effetti patologici dell'infezione e, nel contempo, la riduzione della prevalenza dell'infezione stessa. Negli ultimi 5-6 anni, la disponibilità di vaccini o di programmi vaccinali che si presentano con la caratteristica di una dimostrata protezione fetale, atta a prevenire la nascita di nuovi vitelli immunotolleranti (PI), ha posto le basi per connotare la vaccinazione di una prospettiva eradicativa.

Tuttavia, al fine di collocare correttamente l'intervento vaccinale all'interno della prospettiva eradicativa in un allevamento con presenza di animali PI, occorre ricordare che nessun vaccino è in grado di impedire che una bovina PI generi un vitello PI. Appare quindi non illogico indicare che l'approccio vaccinale debba avere una prospettiva eradicativa di medio-lungo periodo, a meno che questa non sia associata alla profilassi diretta.

In accordo a quelli che sono i canoni tipici della profilassi immunizzante, la vaccinazione nei confronti del BVDV è destinata al controllo dei sintomi connotanti l'infezione, ed in particolare la viremia, con conseguente disseminazione del virus ad organi ed apparati, l'immunodepressione, la patologia gastroenterica e respiratoria, la sindrome trombocitopenica e le turbe riproduttive (infertilità, aborto e riassorbimento).

Inoltre, è importante l'ottenimento della riduzione dell'entità e durata dell'escrezione virale post infezione, che può consentire un impedimento alla diffusione dell'infezione e di conseguenza una riduzione della prevalenza (Van Oirschot J e Coll, 1999).

L'efficacia della vaccinazione è di norma dimostrata attraverso la valutazione dell'entità della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata, e, soprattutto, l'attitudine del vaccino a ridurre i sintomi clinici e l'entità e la durata dell'escrezione virale conseguente ad un'infezione artificiale (challenge).

Attualmente, proprio in relazione alla possibilità di attribuire alla vaccinazione una valenza eradicativa, ricopre un ruolo fondamentale la caratteristica del conferimento della

protezione fetale (Patel J e Coll, 2002). In ragione della documentata variabilità che connota i ceppi di BVDV isolati esistono fondati elementi per ritenere che le differenze antigeniche esistenti tra i diversi genotipi siano tali da far sorgere il dubbio che la protezione crociata risulti parziale o che possa essere ridotta l'entità e la durata della protezione immunitaria qualora gli animali vaccinati sono infettati con uno stipite eterologo, antigenicamente lontano dal ceppo vaccinale (Fulton R e Coll, 2003 – Ridpath J, 2005). Sono tuttavia disponibili dati che attestano un elevato spettro di cross-reattività immunitaria conferita dagli stipiti vaccinali rispetto ai ceppi selvaggi (Patel J e Coll, 2005).

10.2.1. Tipologie di vaccini

Attualmente tutti i vaccini disponibili in Italia contengono il solo BVDV tipo 1. I dati epidemiologici, che indicano una possibile presenza sul territorio Italiano anche del BVDV Tipo 2, ha portato a considerare l'attività dei vaccini contenenti BVDV Tipo 1 nel controllo dell'infezione da BVDV Tipo 2. I dati disponibili indicano che esiste una certa protezione crociata, con esiti talora anche assai favorevoli nel controllo dei sintomi clinici correlati all'infezione da BVDV Tipo 2 (Makoschey B e Coll, 2001). In generale, le proteine virali maggiormente dotate di attività immunogena siano quelle strutturali, ovvero espresse a livello dell'envelope virale, ed in particolare E^{nrs}, E2 e E1, le quali peraltro sono dotate di una tendenziale variabilità. A quantificare il fenomeno per via indiretta, vale l'evidenza che il titolo anticorpale neutralizzante può variare da 10 a 100 volte in ragione del grado di omologia-eterogeneità antigenica tra lo stipite test e quello infettante/vaccinale (Bolin S e Coll, 2004 – Patel J e Coll, 2005 – Makoschey B e Coll, 2006a).

In Italia sono disponibili vaccini monovalenti BVD vivi attenuati ed inattivati, e vaccini che combinano la valenza BVD inattivata con altri antigeni virali respiratori (BoHV-1, VRSB e PI3), nonché un vaccino bivalente contenente lo stipite vivo-attenuato termosensibile con la valenza VRSB.

Vaccini vivi-attenuati

Il primo vaccino BVDV contenente uno stipite NCP è stato ottenuto nei primi anni 60 attenuando la valenza originale del virus mediante passaggi seriali sul coniglio.

L'allestimento di vaccini attenuati oggetto di commercializzazione è stato conseguenza dell'adattamento ed attenuazione di stipiti BVDV-CP su colture cellulari di origine bovina e suina.

L'attenuazione, ottenuta in modo classico per passaggi seriali, comporta la riduzione della replicazione dello stipite vaccinale, così come della virulenza e dell'escrezione del virus vaccinale post vaccinazione. Alla somministrazione del vaccino vivo-attenuato consegue l'amplificazione antigenica che induce la stimolazione di una consistente risposta umorale ed una stimolazione a carico dei linfociti T CD4+ e citotossici CD8+ (Chase C e Coll, 2004). Gli stipiti vaccinali vivi attenuati, in quanto attivamente oggetto di replicazione, inducono una consistente risposta anticorpale verso le proteine non strutturali (in particolare NS2-3). La durata dell'immunità indotta dai vaccini vivi è indicata dai produttori in circa 12 mesi (fanno eccezione gli stipiti termosensibili, per i quali la durata indicata è ridotta a 6 mesi). Nell'utilizzo dei vaccini vivi-attenuati non va trascurato il profilo di innocuità. E' stato riportato che i vaccini tradizionali (ad attenuazione con passaggi seriali) presentano alcuni rischi relativi ad una certa attitudine abortigena ed alla possibilità di ricombinazione con virus selvaggio (Van Oirschot J e Coll, 1999).

Occorre inoltre porre l'accento anche sull'uso di vaccini vivi attenuati in animali PI. A questo riguardo, è stato ipotizzato che, in caso di una completa omologia tra lo stipite vaccinale e quello responsabile dello stato di immunotolleranza, possa manifestarsi la forma clinica tipica della Malattia delle Mucose (MD). In caso di parziale omologia antigenica, non si hanno i tipici sintomi da MD, ma si possono avere forme cliniche di lieve entità o croniche (*runting disease*). Infine, a fronte di un alto grado di eterologia antigenica, non si osservano manifestazioni cliniche evidenti e non si ha comunque la comparsa di anticorpi verso le proteine non strutturali NS2-3, ma possono essere rilevati anticorpi neutralizzanti, comunque a basso titolo ($\leq 1:8$). A differenza dei vaccini vivi-attenuati tradizionali, i vaccini allestiti con stipiti termo-sensibili si sono dimostrati sicuri nell'utilizzo anche in animali gravidi ed in soggetti PI (Lomban MS e Coll, 1986)

Vaccini inattivati

I vaccini inattivati sono allestiti a partire da ceppi altamente replicativi, che in seguito sono inattivati con varie metodiche. Al fine della conservazione di un buon livello di immunogenicità è necessario che le procedure di inattivazione siano conservative per quanto attiene le proteine immunogene del BVDV. L'utilizzo delle azeridine (etilenimine) ha consentito di ottenere vaccini con un elevato tasso di conservazione

dell'identità antigenica. Per promuovere una consistente e duratura attività immunizzante, la formulazione vaccinale a base di antigeni inattivati richiede l'aggiunta di sostanze ad attività adiuvante, che favoriscono il richiamo di cellule della risposta immunitaria nel punto di inoculo ed un'efficace esposizione degli antigeni immunizzanti. Per il conferimento di una piena protezione immunitaria, i vaccini inattivati necessitano di due vaccinazioni (vaccinazione di base e richiamo). La risposta immunitaria che si ottiene è prevalentemente di tipo umorale; l'intensità dell'immunità cellulo-mediata indotta (prevalentemente attraverso la stimolazione dell'immunità cellulo-mediata anticorpo dipendente, veicolata dalla stimolazione dei linfociti helper CD4⁺) è in relazione principalmente al tipo di adiuvante utilizzato. La durata della protezione normalmente indotta è di alcuni mesi, con vaccinazioni di richiamo a cadenza semestrale, anche se sono disponibili dati che attestano un'entità ed una durata dell'immunità che può arrivare a 12 mesi (Kelling C, 2004 – Makoschey B e Coll, 2006b).

I vaccini inattivati in genere, e quelli BVDV non fanno eccezione, sono pressoché privi di effetti indesiderati:

- non inducono infezione fetale, e quindi possono essere utilizzati con sicurezza nelle bovine gravide;
- non inducono immunodepressione;
- non possono indurre ricombinazione geniche;
- il processo di inattivazione consente di controllare la presenza di eventuali contaminazioni dei terreni di coltura.

I vaccini inattivati, non sono comunque totalmente assenti problematiche legate a reazioni infiammatorie al punto di inoculo, ad un possibile calo di latte nelle bovine in produzione e, sia pure rari a casi, a episodi di anafilassi. La somministrazione di vaccini inattivati in soggetti PI non induce malattia, ma può indurre una risposta anticorpale neutralizzante a basso titolo del caso di una distanza antigenica rilevante tra lo stivite vaccinale ed il ceppo responsabile dello stato di immunotolleranza.

10.2.2. Vaccini e protezione fetale

Come accennato in precedenza, un punto cardine nell'utilizzo della vaccinazione BVD in piani di controllo con valenza di tipo eradicativo è la necessità di utilizzare vaccini, o applicare piani vaccinali, con dimostrata attitudine nel proteggere il feto

dall'infezione transplacentare. Al momento sul territorio italiano risultano autorizzati due presidi immunizzanti inattivati che hanno ricevuto Autorizzazione Ministeriale (AIC) a riportare nelle indicazioni incluse nel foglietto illustrativo l'indicazione della protezione fetale. I protocolli tesi a dimostrare l'efficacia dei due vaccini prevedono una doppia vaccinazione di base ed un'infezione sperimentale effettuata a distanza di 6 mesi dalla vaccinazione di richiamo. Nei protocolli sperimentali, per quanto riguarda l'infezione artificiale, in un caso è stata utilizzata l'inoculazione del virus patogeno per via nasale ed intravenosa. Nel secondo caso si è proceduto all'applicazione di un protocollo d'infezione naturale, basato sull'introduzione del gruppo di animali sensibili (vaccinati e di controllo) di soggetti immunotolleranti PI eliminatori del virus patogeno (Patel JR e Coll, 2002). In entrambi i casi i vaccini hanno conferito una piena protezione verso l'infezione fetale per almeno 6 mesi. Per quanto attiene i piani vaccinali, va considerato che sono previsti, al fine di mantenere elevato il livello di immunità indotta dalla vaccinazione, richiami ogni 6-12 mesi. Non va trascurata la possibilità, proposta da un produttore vaccinale, di praticare, in seguito alla vaccinazione di base, interventi vaccinali di richiamo su base individuale, prima di ogni successiva gravidanza. Il razionale di quest'indicazione risiede nell'indurre un booster consistente prima di ri-iniziare l'attività riproduttiva, al fine di limitare i danni sull'attività riproduttive e proteggere il prodotto del concepimento per tutta la durata del rischio infezione fetale e successiva possibile nascita di nuovi animali PI. Questo tipo di approccio si è dimostrato, in condizioni di campo, di migliorare le "performance" riproduttive delle bovine sottoposte a questo regime vaccinale (Toni F e Coll, 2004). Nell'ambito dei piani di controllo implementati in Germania è stato proposto ed utilizzato un piano di vaccinazione (denominato two-step) che prevede l'uso di un vaccino inattivato BVDV Tipo 1 come vaccinazione di base, seguito da una vaccinazione con un vaccino vivo attenuato, contenente sempre uno stivite BVDV Tipo 1, effettuata 4 settimane dopo (Moennig V e Coll, 2005). La necessità di mantenere un'adeguata pressione immunizzante (vaccinazioni ripetute almeno semestralmente), al fine di conferire una buona protezione verso l'infezione fetale è confermata da osservazioni effettuate nel Regno Unito che riportano la nascita di vitelli PI in allevamenti sottoposti a vaccinazione con due differenti vaccini inattivati del commercio; lo schema di rivaccinazione applicato negli allevamenti oggetti di studio era impostato su richiamo annuale (Graham DA e Coll, 2004)

Al contrario l'utilizzo di un vaccino inattivato del commercio somministrato con richiami ogni 6 mesi, ha dimostrato in condizioni di campo di prevenire la nascita di

nuovi vitelli PI in un allevamento con dimostrata circolazione virale legata alla presenza di soggetti immunotolleranti PI (Valla G e Coll, 2006).

10.2.3. La vaccinazione associata alla ricerca degli animali PI

Nei Paesi e nelle Regioni che sono connotate da un elevato numero di animali, da entità produttive a carattere intensivo e da un'elevata prevalenza per BVD può risultare utile predisporre piani di controllo dell'infezione ove, oltre all'intervento vaccinale, si procede alla ricerca dei soggetti PI. A questo riguardo è opportuno discutere e approfondire le eventuali interferenze tra vaccinazione e ricerca dei soggetti PI. Una delle procedure più utilizzate, nei piani di controllo è di procedere ad uno monitoraggio sierologico su tutti i capi, o a campione, per la ricerca degli anticorpi verso le proteine non strutturali NS2-3 allo scopo di valutare la sieroprevalenza da BVDV. Questo tipo di strategia è del tutto incompatibile con l'utilizzo dei vaccini vivi-attenuati: è dimostrato, infatti, che i vaccini vivi inducono un'elevata risposta anticorpale verso NS2-3 (Cavirani S e Coll, 2005), e quindi non consentono la distinzione degli animali vaccinati da quelli che contraggono l'infezione.

Al contrario i vaccini inattivati non inducono, di norma, una significativa risposta verso NS2-3 (Graham e Coll, 2003 - Valla G e Coll, 2002 - Arias P e Coll, 2004), e possono essere considerati, almeno in certe condizioni, come vaccini marker (Makoschey B e Coll, 2006c). In ogni caso è opportuno usare una certa cautela nell'assimilare i vaccini BVD inattivati ai vaccini BoHV-1 marker gE⁻ utilizzati nei piani di controllo dell'IBR. Infatti, la mancata induzione di una risposta anticorpale verso NS2-3, si basa essenzialmente sul comportamento biologico del vaccino, e non sulla delezione genetica come accade per i vaccini IBR o su di una specifica tecnica produttiva volta a garantire l'assenza di antigeni NS2-3 nella preparazione vaccinale.

I vaccini inattivati sono allestiti a partire da ceppi virulenti coltivati su tessuto-culture: non è improbabile che una quota parte di proteine non strutturali siano espresse durante la fase replicativa e quindi entrino a fare parte in quantità variabile del contenuto antigenico del vaccino (il contenuto può variare nei diversi lotti produttivi). Quindi si può ipotizzare che dopo ripetute vaccinazioni, si possa rilevare una certa positività verso NS2-3 anche in assenza d'infezione naturale. Nella gestione di un piano di controllo, appare cautelativo attribuire una valenza "marker" ai vaccini inattivati BVD unicamente negli animali relativamente giovani (ad esempio al di sotto dei 2-3 anni di vita) sottoposti ad un numero limitato di vaccinazioni.

11. FATTORI CRITICI NELLA GESTIONE DI UN PIANO

Il punto cardine del controllo e della possibile eradicazione dell'infezione da BVD, è la ricerca, identificazione ed eliminazione dei soggetti PI eventualmente presenti in allevamento (Lindberg A e Coll, 1999 – Lindberg A e Coll, 2005). Una volta che tutti i soggetti PI sono stati identificati e rimossi, è fondamentale impedire che il virus possa essere reintrodotta in allevamento e vada ad infettare bovine gravide nei primi stadi di gestazione, con la conseguente nascita di nuovi soggetti PI. La strategia di profilassi diretta (identificazione e rimozione degli animali PI) ha portato all'eradicazione dell'infezione in alcuni Paesi Scandinavi (Alenius S e Coll, 1996 – Hult L e Coll, 2004 – Nyberg O e Coll, 2004 – Rikula U e Coll, 2004).

In altri Paesi Europei, connotati da alti livelli di prevalenza dell'infezione e da allevamenti di medie e grandi dimensioni, quali Belgio, Olanda e Italia, non è stato possibile applicare lo stesso tipo di approccio. Alcuni Autori hanno ipotizzato come il virus possa circolare attivamente anche in assenza di animali persistentemente infetti PI (Barber DM e Coll, 1986 – Moerland A e Coll, 1993 - Moen A e Coll, 2005). Nel corso di un piano volontario applicato in Olanda (avente le stesse caratteristiche dei piani Scandinavi), il 10-20% degli allevatori che avevano raggiunto uno status di indennità da BVDV hanno dovuto perdere la qualifica in ragione di re-infezioni (Verhoef M, 2004).

Tuttavia, prima di concludere che in assoluto il BVDV possa permanere con elevati livelli di rischio d'infezione anche dopo la completa rimozione degli animali PI, occorre valutare e prendere in considerazione i fattori critici che riguardano le procedure di ricerca degli animali PI ed i fattori di rischio che richiedono strette misure di biosicurezza, soprattutto in Paesi o Regioni con alta prevalenza d'infezione (Letellier C e Coll, 2005 – Van Schaij G e Coll, 2002). In ogni caso, il controllo ed eradicazione della BVD non è un'operazione di facile esecuzione e raggiungibile in breve tempo, ed è una strada piena di rischi.

Di seguito, sono presi in considerazione i punti critici principali di un piano di controllo ed eradicazione della BVD.

11.1. Organizzazione del piano

La corretta implementazione di un piano di controllo ed eradicazione, necessita che tutte le procedure diagnostiche e di biosicurezza previste siano attentamente seguite e registrate per tutta la durata del piano stesso. Si deve essere sicuri che nessun animale sfugga alla ricerca dei soggetti PI, e che, una volta identificati e rimossi

questi animali, si proceda alla ricerca di eventuali vitelli PI almeno per un anno. Quindi, va attuato un monitoraggio periodico ad intervalli regolari (normalmente ogni 6 mesi), includendo un campione significativo di giovani animali. Nel caso in cui si applichi il monitoraggio del latte di massa questo, in considerazione del relativo costo e della praticità d'esecuzione, può essere effettuato con cadenze più strette (ad esempio su base trimestrale).

In considerazione dell'impegno necessario, è importante che l'Allevatore sia adeguatamente istruito sulle procedure di sua competenza, che il Veterinario di allevamento sia coinvolto nell'esecuzione e nella gestione del piano.

11.2. Vitelli maschi destinati all'ingrasso

In molti allevamenti di bovine da latte i vitelli maschi sono di norma allontanati rapidamente dall'allevamento stesso e sono destinati ad essere allevati in specifiche strutture di allevamento da carne a carattere intensivo. In molti casi questi animali non sono sottoposti a controlli sierologici e/o virologici, e quindi alcuni soggetti PI possono sfuggire alla ricerca. Inoltre è opportuno ricordare che l'escrezione virale in soggetti PI con elevato livello di MDA risulta soppressa in modo consistente per tutta la durata di permanenza degli anticorpi materni (Baker J, 1987). Il contatto di un eventuale vitello PI con il resto della mandria è, nel caso dei vitelli maschi destinato all'ingrasso, di breve durata. Si può dire quindi che questi vitelli non rappresentino un rischio maggiore d'infezione (Lindberg A e Coll, 2005).

Tuttavia dato che l'eventuale infezione non può essere esclusa a priori, sarebbe cautelativo ed opportuno includere anche questi animali nella lista dei soggetti da sottoporre a monitoraggio e ricerca dei soggetti PI, a meno che gli stessi non siano allontanati immediatamente dopo la nascita o immediatamente separati dalle vitelle femmine destinate alla rimonta, alloggiandoli in ricoveri a loro destinati in modo esclusivo.

11.3. Allevamenti con strutture separate

Alcuni allevamenti (soprattutto di grandi dimensioni, ma non solo) sono costituiti da strutture separate, dove sono allevate le manze o i vitelli destinati all'ingrasso. In altre situazioni, alcuni animali sono mantenuti per alcuni mesi al pascolo. In un piano di controllo, al fine da minimizzare il rischio d'infezione, sarebbe corretto considerare, dal punto di vista sanitario, le strutture come entità differenti, cioè come differenti allevamenti. Nella gestione del monitoraggio sierologico, va tenuto conto degli

spostamenti degli animali tra le varie strutture, e dei potenziali vettori passivi d'infezione (strumentazione, mezzi di trasporto, personale) (Niskanen R e Coll, 2003).

11.4. Acquisto di animali e partecipazioni a mostre

L'acquisto di animali e la reintroduzione in allevamento di soggetti inviati a mostre o fiere, è uno dei principali rischi di introdurre l'infezione da BVDV in un allevamento non infetto. Tutti gli animali introdotti o reintrodotti in un allevamento indenne da BVDV, devono essere sottoposti a ricerche del virus al fine di evidenziare un eventuale stato viremico da viremia persistente o transitoria. Nel corso dell'attesa del responso diagnostico, gli animali devono essere sottoposti a quarantena, e solo nel momento in cui si è certi dell'assenza d'infezione i soggetti possono essere messi a contatto con gli animali dell'allevamento.

Particolare attenzione deve essere posta nei confronti delle bovine gravide acquistate ed introdotte in allevamento: infatti, non è impossibile che il vitello in utero abbia contratto l'infezione per via trans-placentare ed abbia sviluppato lo stato di immunotolleranza. Al momento dell'introduzione di una bovina gravida questa deve essere testata per la ricerca di anticorpi non strutturali, e, in caso di negatività, per la ricerca del virus. Tutti i vitelli nati da bovine acquistate, devono essere sottoposti a monitoraggio pre-colostrale dello stato sierologico e virologico (inclusi i vitelli nati con parto cesareo).

Se non è possibile testare i campioni pre-colostrali, si deve comunque procedere al monitoraggio individuale dei neonati. In considerazione del periodo finestra, variabile in funzione delle metodiche utilizzate da un minimo di alcune settimane (per la PCR sul sangue) fino a circa due mesi (per il test ELISA antigene per la proteina E^{nrs} che può dare luogo a risultati "falsamente" negativi, sarebbe opportuno utilizzare la PCR su leucociti o su frammenti biotici, metodiche che sembrano non essere influenzate dall'influenza di alti livelli di anticorpi colostrali.

E' comunque opportuno ricordare che i vitelli PI che hanno ricevuto alti livelli di MDA sono relativamente pericolosi; ciò nonostante se fosse possibile, sarebbe opportuna la segregazione dei neonati fino ad un esito positivo del monitoraggio.

11.5. Monitoraggio del latte di massa

Negli allevamenti da latte nei quali si è proceduto all'identificazione ed eliminazione degli animali PI, una procedura di monitoraggio prevista è quella di sottoporre a test il

latte di massa con PCR, mentre i nuovi vitelli sono sottoposti a test con PCR sul sangue in pool o con Elisa antigene. Un fattore critico da tenere in considerazione è che il latte di massa dà indicazioni unicamente sugli animali che hanno prodotto latte nel giorno della raccolta del campione. Sono quindi escluse le bovine sotto trattamento antibiotico, e ovviamente le bovine in asciutta: questi animali devono essere testati individualmente in una fase successiva.

Non è superfluo ricordare che nessun animale adulto deve sfuggire al monitoraggio, basandosi sull'errata convinzione che gli animali PI non hanno chance di diventare adulti.

11.6. Viremia intermittente in animali PI

Gli animali PI eliminano quantità elevate di virus in modo persistente. Tuttavia, esistono evidenze di un calo transitorio della viremia. Oltre alla situazione descritta in precedenza, che riguarda la presenza di anticorpi materni, il fenomeno si può verificare anche quando un animale PI viene in contatto con uno stipse BVDV eterologo, rispetto a quello che ha indotto lo stato di immunotolleranza. Quest'infezione induce anticorpi neutralizzanti che vanno ad interagire con il ceppo virale responsabile di viremia persistente.

La viremia è temporaneamente ridotta fintantoché gli anticorpi permangono a livelli elevati (Brock K e Coll, 2001). La riduzione della viremia può condizionare negativamente la possibilità di identificare tutti i soggetti PI con serie conseguenze sull'efficacia del piano (Thurmond M, 2005).

11.7. Rimozione ritardata dei soggetti PI

In alcuni casi l'allevatore può essere riluttante ad eliminare un animale che, ancorché immunotollerante, appare clinicamente sano (in particolare se si tratta di una buona lattifera). Questa evenienza ha conseguenze molto negative, soprattutto se l'allevamento non è sottoposto a vaccinazione. Nel caso di una ritardata rimozione di un soggetto PI, va ricordato che il periodo di un anno, durante il quale vanno controllati per la ricerca di un'eventuale viremia persistente tutti i nuovi nati, decorre dal momento in cui l'ultimo animale PI è allontanato e non da quando è stato individuato. La pratica della vaccinazione si è dimostrata efficace, in condizioni di campo, nel prevenire la nascita di nuovi soggetti PI in un allevamento nel quale i soggetti immunotolleranti, identificati nel corso di un piano di controllo aziendale, non erano stati immediatamente allontanati (Valla G e Coll, 2006).

11.8. Corretta applicazione delle misure di biosicurezza

La fonte potenziale di re-infezione di allevamenti indenni, o risanati, da BVDV è il contatto con animali infetti eliminatori del virus e quindi in un allevamento a ciclo chiuso ciò si riferisce essenzialmente all'acquisto di animali o alla partecipazione a mostre e fiere. Un ulteriore potenziale rischio d'infezione è legato ai mezzi di trasporto che entrano in allevamento, ed in particolare quelli sui quali possono essere presenti animali provenienti da altri allevamenti. E' buona norma quindi, che i mezzi di trasporto, durante le operazioni di carico e/o scarico, non entrino in contatto con gli animali dell'allevamento. Tuttavia, l'infezione può essere introdotta anche tramite le persone, considerando che anche i capelli sono stati sospettati di essere in grado di essere contaminati dal BVDV (Bachofen C e Coll, 2004). I visitatori dell'allevamento dovrebbero indossare sempre indumenti o calzature monouso. Anche il Veterinario deve ovviamente rispettare queste norme di buon comportamento. Meglio ancora, dovrebbe indossare abiti da lavoro e stivali che rimangono in allevamento, così come è buona norma l'uso di siringhe e aghi monouso. E' stata segnalata la inoltre possibilità di trasmettere l'infezione attraverso farmaci con flaconi multiuso (ad esempio gli anestetici locali) utilizzati in differenti allevamenti (Katholm J, 2004 - Niskanen R. e Coll, 2004). I vaccini vivi attenuati possono essere contaminati da stipiti BVDV-NCP (Barkema H e Coll, 2001). Il BVDV può essere introdotto in allevamento attraverso seme congelato infetto (Kirkland P e Coll, 1994 - Meyling A e Coll, 1988) (Schlafer D e Coll, 1990). Ad oggi, questo rischio è praticamente assente in considerazione del fatto che nei centri di produzione di materiale seminale sono adottati stretti protocolli volti ad identificare ed escludere i soggetti PI.

Nel corso dell'implementazione di un piano di controllo ed eradicazione su base volontaria nelle provincie di Lecco e di Como, è stata valutata la sieroprevalenza in funzione di alcuni fattori di rischio (Tabella 6)

Tabella 6

Analisi dei fattori di rischio	
Fattore di rischio	% di positività
Acquisti di animali nell'anno precedente lo screening	84
Acquisti di animali da più di un anno prima dello screening	70
Nessun acquisto	22
Aziende che praticano l'alpeggio	54
Aziende che non praticano l'alpeggio	25
Aziende che partecipano alle mostre	29
Aziende che non partecipano alle mostre	20

12. ATTIVITA' SPERIMENTALE: ESPERIENZE DI CONTROLLO IN CAMPO

La fattibilità della strategia di controllo dell'infezione da BVDV basata sulla ricerca, identificazione e rimozione degli animali immunotolleranti persistentemente infetti (PI), associata alla profilassi immunizzante connotata dalla caratteristica di prevenzione dell'infezione transplacentare e della conseguente nascita di nuovi soggetti PI è stata verificata in condizioni di campo. Sono stati presi in considerazione sei allevamenti di bovine da latte di razza frisona. Cinque allevamenti sono situati nel nord Italia ed uno in centro Italia, per un effettivo totale di 1.332 animali. In tre di questi era praticata una vaccinazione nei confronti di BVD, mentre negli altri tre non era stato praticato in passato alcun intervento immunizzante. (Tabella 7).

Tabella 7

Allevamento	Prov.	N° capi presenti all'inizio studio	Vaccinazione pregressa
A	PC	282	NO
B	LT	58	NO
C	UD	472	NO
D	PR-1	189	Vivo attenuato TS
E	CN	140	Inattivato
F	PR-2	191	Inattivato
TOTALE		1332	

Il protocollo applicato (Tabella 8) prevede le seguenti fasi:

- Valutazione iniziale della sieroprevalenza per BVD.
- Ricerca, identificazione e rimozione degli animali persistentemente infetti (PI).
- Applicazione di un protocollo vaccinale nei confronti di BVDV.
- Monitoraggio dei nuovi nati al fine di rilevare l'eventuale nascita di nuovi soggetti immunotolleranti (PI).

Tabella 8

Allevamento	Prov.	Screening iniziale	Vaccinazione	Ricerca animali PI	Monitoraggio		Durata studio
A	PC	Tutti i soggetti testati per anticorpi NS2-3 (ELISA)	Vaccinazione semestrale con vacino BVD inattivato	ELISA Antigene su tutti i capi Ns2-3 negativi	ELISA Antigene su tutti i nuovi nati ogni mese	PCR individuale su tutti i capi a fine studio	3 anni
B	LT			PCR su tutti i capi in pool da 20	PCR in pool dai nuovi nati	PCR sul latte di massa ogni 4 mesi	2 anni
C	UD			ELISA Antigene su tutti i capi	PCR individuale precolostrale sui neonati	2,5 anni	
D	PR 1			PCR su tutti i capi in pool da 21	PCR in pool nei nuovi nati	1 anno	
E	CN			PCR su tutti i capi in pool da 14	PCR in pool nei nuovi nati	1 anno	
F	PR 2			PCR su tutti i capi in pool da 18-19	PCR in pool nei nuovi nati	1,5 anni	

12.1. Valutazione della sieroprevalenza per BVD all'inizio dello studio

All'inizio dello studio, al fine di valutare la sieroprevalenza verso BVD, è stato effettuato uno screening sierologico, sulla totalità dei capi presenti, per la ricerca di anticorpi verso le proteine non strutturali NS2-3. I dati sono riportati nella tabella n°9. La sieroprevalenza totale all'inizio dello studio era pari al 76,5%.

Tabella 9

Allevamento	Anticorpi BVD NS2-3 (ELISA)			
	n° di animali	n° +	% +	n° -
A	282	182	64.5	100
B	58	14	24.1	44
C	472	404	85.6	68
D	189	166	87.8	23
E	140	125	89.3	15
F	191	128	67.0	63
Totale	1332	1019	76.5	313

Negli allevamenti che erano stati sottoposti a vaccinazione (D, E e F) la percentuale globale di animali positivi per BVD è risultata del 81,4%, mentre in quelli dove non era praticata alcun intervento immunizzante (A, B e C) la sieroprevalenza globale è del 58,1%. La percentuale più bassa (24,1%) è stata rilevata nell'allevamento A.

12.2. Ricerca ed identificazione degli animali persistentemente infetti (PI)

Nel corso dello studio, sono state implementate diverse strategie di ricerca ed identificazione degli animali PI, allo scopo di valutarne l'efficacia e la praticità d'esecuzione:

- Nell'allevamento (A) tutti gli animali di età superiore ai tre mesi di vita, risultati negativi all'iniziale screening per la valutazione degli anticorpi BVD NS2-3, sono stati testati individualmente per la ricerca dell'antigene BVD (Elisa antigene). I soggetti che all'inizio dello studio avevano un'età inferiore ai tre mesi di età, sono stati sottoposti, su base individuale a ricerca antigene (ELISA antigene) al raggiungimento dell'età di 3-4 mesi di vita, periodo nel quale il livello di anticorpi colostrali si era ragionevolmente ridotto e quindi non in grado di interferire con la ricerca dell'antigene BVD
- Nell' allevamento C tutti gli animali di età superiore ai tre mesi di vita sono stati testati per la ricerca dell'antigene BVD (ELISA antigene), a prescindere dallo stato sierologico verso NS2-3. I soggetti che all'inizio dello studio avevano un'età inferiore ai tre mesi di età, sono stati sottoposti, su base individuale a ricerca antigene (sia con ELISA antigene che con PCR) al raggiungimento dell'età di 3-4 mesi di vita, periodo nel quale il livello di anticorpi colostrali si era ragionevolmente ridotto e quindi non in grado di interferire con la ricerca dell'antigene BVD.
- Negli allevamenti B, D, E e F, tutti i soggetti presenti in allevamento all'inizio dello studio sono stati sottoposti a ricerca del virus BVD mediante PCR, eseguita in pool di dimensioni variabili da un minimo di 14 animali per pool ad un massimo di 21 animali. Tutti i soggetti viremici al primo controllo, o appartenenti ad un pool positivo a PCR, sono stati sottoposti individualmente alla ricerca antigene BVD (ELISA antigene), a distanza di 28 giorni dal primo prelievo: gli animali viremici anche al secondo controllo sono stati considerati animali persistentemente infetti (PI) e quindi immunotolleranti.

I risultati della ricerca e identificazione dei soggetti PI, sono riportati e discussi di seguito:

ALLEVAMENTO A

I risultati relativi alla ricerca degli anticorpi BVD NS2-3 (ELISA) effettuata sui soggetti presenti in allevamento all'inizio dello studio sono riportati nella tabella n°10. La sieroprevalenza osservata nelle diverse categorie di animali varia da un minimo del 47.4% a valori massimi del 82.7 e 97.8% osservati negli animali di età compresa tra i 5 ed i 30 mesi di vita.

Tabella 10

Allevamento A	INIZIO STUDIO (Ottobre 2004)		
	n°	+	%
Gruppo			
Vacche	137	65	47.4
Vacche in asciutta	24	13	54.2
Manze > 12 mesi	46	45	97.8
Manzette 5-12 mesi	52	43	82.7
Vitelli (<5 mesi)	23	16	69.6
Tori	0	0	0
Totale	282	182	64.5

La ricerca del virus BVD effettuata mediante la metodica ELISA antigene su tutti gli animali di età superiore ai tre mesi di età negativi per BVD NS2-3 ha consentito l'identificazione di tre soggetti viremici (Figure 23 e 24). Questi animali sono stati confermati viremici persistenti (PI) dopo un secondo controllo effettuato a distanza di 30 giorni. Quindi dei 282 animali presenti all'inizio dello studio la percentuale di animali PI identificati è stata del 1,1%. E' interessante notare tutti gli animali PI identificati appartenevano ad uno dei due gruppi nei quali era stata rilevata la sieroprevalenza più elevata (manze di età compresa tra 5 e 12 mesi), a conferma dell'elevato livello di escrezione del virus da parte dei soggetti PI. Per motivi sperimentali, i tre animali non sono stati rimossi immediatamente, e sono stati tenuti in allevamento ancora per circa 12 mesi, effettuando in tale modo una sorta d'infezione naturale in considerazione della notevole quantità di virus escreto dai soggetti PI. Tutti i soggetti di età inferiore ai 3 mesi di vita all'inizio dello studio, sono stati testati in seguito per la ricerca antigene, al raggiungimento dell'età di 3 mesi di vita: nessuno di questi soggetti è risultato viremico persistente.

Figura 23



Figura 24



ALLEVAMENTO B

I 58 animali presenti in allevamento all'inizio dello studio sono stati sottoposti a ricerca dell'antigene BVD mediante PCR in pool da 20 animali ciascuno. Tutti i pool testati sono risultati negativi. Di conseguenza non sono stati evidenziati animali viremici persistenti (Tabella 11).

Tabella 11

Test				
Ricerca antigene BVD - PCR (58 in pool da 20)				
Gruppo	n° pool	n° pool +	% pool +	n° pool -
Totale	3	0	0.0	3

ALLEVAMENTO C

All'inizio dello studio, tutti gli animali presenti in allevamento sono stati testati per la ricerca degli anticorpi BVD NS2-3. Il tasso di sieroprevalenza era del 85,6% (Tabella 12), con valori compresi tra il 100% riscontrato nelle vitelle e l'89% delle manze.

Tabella 12

Test				
Elisa NS2-3				
Gruppo	n°	n° +	% +	n° -
Vitelle <4	38	38	100.0	0
Manzette 5-12 mesi	73	63	86.3	10
Manze > 12 mesi	89	79	88.8	10
Vacche	272	262	96.3	10
Totale	472	404	85.6	68

Tutti gli animali di età superiore ai tre mesi di età sono stati sottoposti individualmente a ricerca del virus BVD mediante la metodica ELISA antigene. Dieci animali dei 472 testati (2,1%), appartenenti al gruppo di età 4 - 8 mesi, sono risultati positivi e sono stati quindi identificati come sospetti animali immunotolleranti persistentemente infetti (PI) (Tabella 13).

Tabella 13

Test				
Ricerca antigene BVD – ELISA (primo controllo)				
Gruppo	n°	n° +	% +	n° -
Totale	472	10	2.1	462

Al fine di confermare lo stato viremico, i dieci animali positivi sono stati controllati nuovamente per la ricerca del virus sia con la metodica ELISA antigene che con PCR, a distanza di 21 giorni dal primo controllo (Tabella 14). Entrambi i metodi hanno confermato lo stato di viremia persistente in tutti gli animali testati.

I dieci soggetti PI sono stati rimossi immediatamente dall'allevamento.

Tabella 14

n° aziendale	età in mesi	16.09.2005	07.10.2005	
		Ag ELISA	Ag ELISA	PCR
034637	4	+	+	+
22410	5	+	+	+
22412	5	+	+	+
22416	5	+	+	+
22420	5	+	+	+
22422	5	+	+	+
764821	6	+	+	+
764827	6	+	+	+
764831	6	+	+	+
768082	8	+	+	+

Tutti i soggetti che all'inizio dello studio avevano un'età inferiore ai 3 mesi di vita sono stati testati in seguito (ELISA antigene) con esito negativo, al raggiungimento dell'età di 3 mesi di vita. Quindi, lo screening iniziale ha consentito di identificare 10 animali PI sui 472 animali presenti in allevamento, pari al 2,1%. Questi animali sono stati immediatamente rimossi dall'allevamento ed avviati alla macellazione.

ALLEVAMENTO D

Tutti i 189 animali presenti in allevamento all'inizio dello studio, sono stati testati con PCR, in pool da 21 campioni per ogni pool, per la ricerca del virus BVD. Tre pool sono risultati positivi (Tabella 15).

Tabella 15

Test				
Ricerca antigene BVD - PCR (189 in pool da 21)				
Gruppo	n° pool	n° pool +	% pool +	n° pool -
Totale	9	3	33.3	6

I 63 animali appartenenti ai pool positivi sono stati testati singolarmente per la ricerca dell'antigene BVD con ELISA antigene. Dieci animali erano positivi (Tabella 16).

Tabella 16

Test				
Ricerca antigene BVD (Elisa) individuale sui 63 animali dei pool +				
Gruppo	n°	n° +	% +	n° -
Animali dei pool +	63	10	15.9	53
Totale	63	10	15.9	53

I dieci animali viremici sono stati controllati nuovamente dopo circa 45 giorni al fine di confermare lo stato di viremia persistente (ricerca antigene BVD con metodo ELISA); inoltre gli animali sono stati testati per gli anticorpi BVD NS2-3 per valutare la presenza di anticorpi NS2-3. Cinque dei 10 animali erano ancora viremici e sono stati quindi identificati come animali persistentemente infetti (PI). Gli altri 5 animali non sono risultati viremici (Tabella 17) e presentavano anticorpi verso le proteine NS2-3 del virus BVD, dimostrando che la viremia rilevata al primo controllo era di tipo transitorio.

Tabella 17

Ricerca antigene BVD - Elisa su 10 animali +				
Gruppo	n°	n° +	% +	n° -
Totale	10	5	50.0	5

In totale all'inizio dello studio nell'allevamento D 5 animali PI dei 189 animali dell'allevamento (2,6%) sono risultati essere animali PI. Gli animali una volta identificati, sono stati avviati alla macellazione.

ALLEVAMENTO E

Tutti i 140 animali presenti in allevamento all'inizio dello studio, sono stati testati con PCR, in pool da 14 campioni. Due pool sono risultati positivi (Tabella 18).

Tabella 18

Test				
Ricerca antigene BVD - PCR in pool da 14				
Gruppo	n° pool	n° pool +	% pool +	n° pool -
Totale (140 animali)	10	2	20.0	8

I 28 animali appartenenti ai due pool PCR positivi sono stati testati singolarmente a ricerca degli anticorpi BVD NS2-3 e a ricerca del virus con ELISA antigene dopo 15 giorni. Tutti gli animali sono risultati negativi alla ricerca dell'antigene virale (Tabella 19) e positivi agli anticorpi NS2-3, facendo ritenere che la viremia rilevata al primo controllo con PCR potesse essere legata a un'infezione di tipo di tipo transitorio in uno o più animali dei pool testati.

Tabella 19

Test				
Ricerca antigene BVD (Elisa) individuale sui 28 animali dei pool +				
Gruppo	n°	n° +	% +	n° -
Animali dei pool +	28	0	0.0	28
Totale	28	0	0.0	28

Quindi nell'allevamento E, all'inizio dello studio, non sono stati rilevati animali PI.

ALLEVAMENTO F

Tutti i 191 animali presenti in allevamento all'inizio dello studio, sono stati testati con PCR, in pool (9 pool da 19 animali e uno da 20), per la ricerca del virus BVD. Un pool è risultato positivo (Tabella 20).

Tabella 20

Ricerca antigene BVD - PCR (10 pool da 18-19 animali)			
n° pool testati	n° +	% +	n° -
10	1	10.0	9

Gli animali del pool positivo sono stati testati, su base individuale, con PCR dopo 22 giorni. I risultati (Tabella 21) hanno evidenziato la presenza di un animale viremico, con presenza di BVDV tipo 1. L'animale in oggetto è risultato essere un soggetto "free martin" di circa 15 mesi di età, che era stato destinato all'ingrasso. L'animale è stato tempestivamente avviato alla macellazione.

Tabella 21

Ricerca antigene BVD		04.10.06	
n° aziendale	età in mesi	PCR	Tipo
134	12	-	
135	12	-	
136	12	-	
137	13	-	
138	13	-	
139	13	-	
140	14	-	
141	14	-	
142	15	-	
143	15	+	BVDV tipo 1
144	15	-	
145	16	-	
146	16	-	
147	18	-	
148	20	-	
149	20	-	
150	21	-	
151	22	-	

Quindi nell'allevamento F, all'inizio dello studio, è stato rilevato 1 animale PI sui 191 testati, pari allo 0,5%.

In conclusione, tra i 1332 animali testati all'inizio dello studio sono stati identificati 19 animali PI, pari ad una percentuale del 1,4% (Tabella 22). In due delle sei stalle incluse nello studio le indagini effettuate non hanno evidenziato la presenza di soggetti immunotolleranti.

Tabella 22

Allevamento	Prov.	N° capi presenti all'inizio studio	Capi testati per ricerca PI	n° animali PI inizio studio	%
A	PC	282	282	3	1.1
B	LT	58	58	0	0.0
C	UD	472	472	10	2.1
D	PR-1	189	189	5	2.6
E	CN	140	140	0	0.0
F	PR-2	191	191	1	0.5
TOTALE		1332	1332	19	1.4

12.3. Applicazione di un protocollo vaccinale nei confronti di BVDV.

In tutti gli allevamenti oggetti dello studio, è stato applicato il seguente piano di vaccinazione, utilizzando un vaccino BVD inattivato del commercio:

Tutti gli animali di età superiore ai 4 mesi di vita

1. Vaccino BVD inattivato (2 ml per via intramuscolare).
2. *Dopo 28 giorni.* Richiamo con lo stesso vaccino (2 ml per via intramuscolare), su tutti gli animali negli allevamenti nei quali gli animali non erano stati vaccinati in precedenza (Allevamenti A, B e C), e solo nei soggetti mai vaccinati in precedenza per BVD negli allevamenti nei quali già si praticava un trattamento immunizzante.

Manze e vacche: ogni 6 mesi

1. Vaccino BVD inattivato (2 ml per via intramuscolare).
2. *Dopo 28 giorni.* Richiamo con lo stesso vaccino (2 ml per via intramuscolare), nei soggetti mai vaccinati in precedenza per BVD

12.4. Monitoraggio dei nuovi nati

In tutti gli allevamenti oggetti di studio si è proceduto al monitoraggio dei nuovi nati al fine di identificare l'eventuale nascita di nuovi soggetti immunotolleranti persistentemente infetti (PI).

La durata del monitoraggio variava da un minimo di 1 anno, negli allevamenti D e E, ad un massimo di tre anni (allevamento A). Nella tabella n°23, sono riportati il tipo di procedura operativa utilizzata e la durata del monitoraggio ed.

- Nell'allevamento A, il controllo sui nuovi nati è stato effettuato su base mensile mediante ricerca dell'antigene virale (ELISA antigene). Al termine dello studio, tutti i soggetti presenti in allevamento sono stati testati singolarmente con PCR.
- Nell'allevamento B si è proceduto con la ricerca dell'antigene virale mediante PCR sul latte di massa, effettuato su base quadrimestrale. Tutti i soggetti in allevamento sono stati sottoposti a PCR in pool al termine dello studio.
- Nell'allevamento C il controllo è stato effettuato su base individuale mediante ricerca antigene (ELISA antigene) su campioni di sangue pre-colostrale.
- Negli allevamenti D, E e F il controllo per la ricerca dei soggetti PI è stato effettuato su campioni testati in pool con PCR.

Tabella 23

Allevamento	Prov.	Monitoraggio		Durata studio
A	PC	ELISA Antigene su tutti i nuovi nati ogni mese	PCR individuale su tutti i capi a fine studio	3 anni
B	LT	PCR sul latte di massa ogni 4 mesi	PCR in pool su tutti i capi al termine dello studio	2 anni
C	UD	PCR individuale precolostrale sui neonati con ELISA antigene		2,5 anni
D	PR -1	PCR in pool dai nuovi nati		1 anno
E	CN	PCR in pool dai nuovi nati		1 anno
F	PR -2	PCR in pool su tutti i nuovi nati		1,5 anni

ALLEVAMENTO A

Nel corso dei tre anni di osservazione, la risposta anticorpale verso BVD NS2-3, è stata monitorata su tutti i capi in allevamento, su base semestrale. La ricerca dei soggetti immunotolleranti è stata eseguita, sui nuovi nati, attraverso la ricerca dell'antigene BVD (ELISA antigene). Al termine dello studio (Ottobre 2007), tutti i 327 animali presenti in allevamento sono stati sottoposti a ricerca dell'antigene virale BVD mediante PCR in pool da 18-20 animali ciascuno. I risultati relativi all'andamento anticorpale per NS2-3 sono riportati nella tabella n°24 ed, in forma grafica, nel grafico 1, e quelli relativi alla ricerca antigene nelle tabelle n°25 e 26.

Tabella 24 – Anticorpi BVD NS2-3

GRUPPO	Ottobre 2004			Aprile 2005			Ottobre 2005			Aprile 2006			Ottobre 2006			Aprile 2007		
	n°	+	%	n°	+	%	n°	+	%	n°	+	%	N°	+	%	n°	+	%
VACCHE	137	65	47	130	74	57	131	73	56	161	60	37	164	96	58	160	97	61
VACCHE ASCIUTTE	24	13	54	34	15	44	37	20	54	43	21	49	26	14	54	38	18	47
MANZE 5-12 MESI	46	45	98	71	68	96	26	25	96	30	27	90	31	14	45	29	19	66
MANZE >5 MESI	52	43	83	43	40	93	86	77	89	82	58	71	81	71	88	78	70	90
VITELLE	23	16	70	18	12	67	33	13	39	23	4	17	10	5	50	23	13	57
TORI	0	0	0.0	0	0	0.0	6	3	0.0	3	2	0.0	6	4	0.0	0	0	0.0
TOTALE	282	182	64	296	209	71	319	211	66	342	172	50	318	204	64	328	217	66

Grafico 1 – % di animali positivi per anticorpi BVD NS2-3

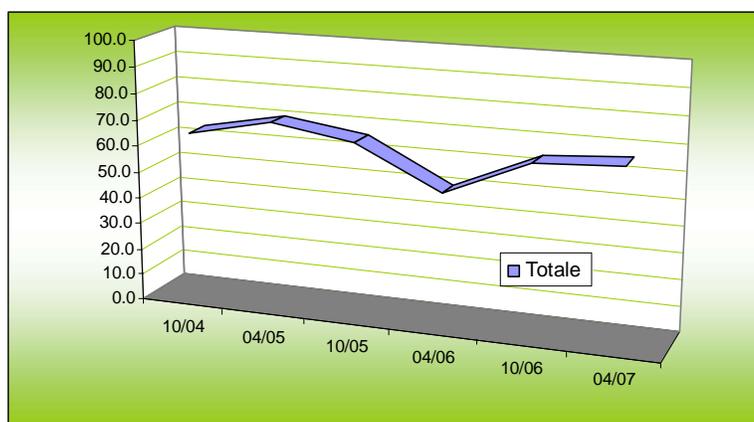


Tabella 25 – n° di animali positivi alla ricerca antigene virale BVD con ELISA E

GRUPPO	Ottobre 2004			Aprile 2005			Ottobre 2005			Aprile 2006			Ottobre 2006			Aprile 2007		
	n°	+	%	n°	+	%	n°	+	%	n°	+	%	n°	+	%	n°	+	%
TOTALE	282	0	0	296	0	0	319	0	0	342	0	0	318	0	0	328	0	0

Tabella 26 – n° di pool positivi alla ricerca antigene virale BVD con PCR

PCR in pool				
Data	n° pool	n° animali	pool positivi	pool negativi
Ottobre 2007	17	328	0	17
			0%	100%

Dai dati ottenuti si rileva che:

- Nel corso dello studio, e al termine dello stesso, non sono stati individuati nuovi soggetti immunotolleranti PI.
- La percentuale di soggetti positivi alla ricerca anticorpale per NS2-3 non è mai scesa al di sotto del 50% del totale.

ALLEVAMENTO B

In questo allevamento, in considerazione della bassa sieroprevalenza rilevata all'inizio dello studio (24,1%), si è proceduto, nel corso dei due anni di osservazione, al monitoraggio della circolazione virale mediante la ricerca dell'antigene virale BVD con PCR sul latte di massa su base quadrimestrale. Al termine dello studio è stata effettuata la ricerca del virus BVD in pool su tutti i capi presenti al termine dello studio. I risultati sono riportati nelle tabella 27.

Tabella 27 – n° di pool positivi alla ricerca antigene virale BVD con PCR.

Data	n°animali presenti	PCR	
		Latte di massa	Pool da 15
feb-06	58	Negativo	<i>non eseguito</i>
giu-06	58	Negativo	<i>non eseguito</i>
ott-06	60	Negativo	<i>non eseguito</i>
feb-07	62	Negativo	<i>non eseguito</i>
giu-07	61	Negativo	<i>non eseguito</i>
ott-07	60	<i>non eseguito</i>	Negativo

Nel corso dello studio non è stata evidenziata circolazione virale attiva nelle bovine in lattazione e non sono stati evidenziati, al termine dello studio, animali viremici persistenti (PI):

ALLEVAMENTO C

Nell'allevamento C il monitoraggio, per la ricerca degli animali PI, si è basato sulla ricerca del virus BVD sul siero pre-colostrale in tutti i nuovi nati, maschi e femmine,

utilizzando il test ELISA antigenico. Nel corso dei due anni e mezzo di durata dello studio, è stato identificato un solo soggetto viremico nei due anni di osservazione (Tabella 28). Si trattava di un vitello nato da una bovina di origine austriaca acquistata, che non era stata sottoposta a vaccinazione verso BVD nella stalla di provenienza. Quindi nel corso dello studio, nessun animale PI è nato da bovine sottoposte a regolare vaccinazione per BVD.

Tabella 28 – n° di sieri-plecolostrali testati per la ricerca antigenica virale BVD

Anno	Test			
	Ricerca antigenica BVD – ELISA			
	n° nuovi nati	n° +	% +	n° -
2006	316	1	0.3	315
2007	294	0	0.0	294
Totale	610	1	0.2	609

ALLEVAMENTO D

Nel corso dello studio sono state sottoposte a ricerca dell'antigene BVD, mediante PCR in pool, un totale di 50 vitelle femmine. I risultati riportati nella tabella n°29: nessuno degli animali testati è risultato viremico persistente (PI).

Tabella n°31 – vitelle testate con PCR in pool.

Data	Test			
	Ricerca antigenica BVD - PCR in pool da 12-13 sui nuovi nati			
	n° nuovi nati	n° +	% +	n° -
Totale 2007	50	0	0.00	0

ALLEVAMENTO E

In questo allevamento, 40 vitelle nuove nate sono state testate in due fasi, la prima nel maggio 2007 e la seconda alla fine di settembre del 2007 per la ricerca dell'antigene BVD mediante PCR in pool. Nel corso del primo monitoraggio sono state testate 28 vitelle in due pool da 14 animali per pool. Uno dei due pool è risultato positivo. Il pool positivo è stato nuovamente testato in tre pool, due da 5 e uno da 4 animali. Uno dei pool (di 5 animali) è risultato positivo: i cinque animali sono stati quindi sottoposti a ricerca degli anticorpi per BVD NS2-3, due volte a distanza di 43 giorni tra un prelievo e l'altro (Tabella n° 32).

Tabella n°32 – Ricerca anticorpi NS2-3 con metodo ELISA

		Test			
		Ricerca anticorpi NS2-3 individuale sui 5 animali del pool +			
	Animale	n°	n° +	% +	n° -
1° prelievo	15	1	0	0.0	1
	16	1	1	100.0	0
	17	1	1	100.0	0
	18	1	0	0.0	1
	19	1	1	100.0	0
	Totale	5	3	60.0	2
		Test			
		Ricerca anticorpi NS2-3 individuale sui 5 animali del pool +			
	Animale	n°	n° +	% +	n° -
2° prelievo	15	1	1	100.0	0
	16	1	1	100.0	0
	17	1	1	100.0	0
	18	1	1	100.0	0
	19	1	1	100.0	0
	Totale	5	5	100.0	0

Al primo prelievo due animali su 5 erano positivi per BVD NS2-3. I tre animali negativi hanno sierconvertito dopo 43 giorni; in conclusione la viremia rilevata era da ascrivere alla circolazione del virus BVD correlata ad una viremia di tipo transitorio. Un secondo monitoraggio effettuato sul secondo gruppo di nuovi nati è stato condotto nel mese di settembre 2007. Sono state controllate altre 12 vitelle in un unico pool. Il pool è risultato positivo. I dodici animali sono stati quindi testati singolarmente per la ricerca del virus BVD con PCR e per la valutazione della risposta anticorpale verso NS2-3 con metodo ELISA anticorpi. I risultati sono riportati nelle tabelle n°33 e 34.

Tabella n°33 – vitelle testate con PCR individuale e ricerca anticorpi BVD NS2-3.

		Test			
		Ricerca anticorpi NS2-3 individuale sul pool + dei nuovi nati			
	Animale	n°	n° +	% +	n° -
	1	1	1	100.0	0
	2	1	1	100.0	0
	3	1	1	100.0	0
	4	1	1	100.0	0
	5	1	1	100.0	0
	6	1	1	100.0	0
	7	1	1	100.0	0
	8	1	0	0.0	1
	9	1	1	100.0	0
	10	1	1	100.0	0
	11	1	1	100.0	0
	12	1	1	100.0	0
	Totale	12	11	91.7	1

Tabella n°34 – vitelle testate con PCR individuale e ricerca anticorpi BVD NS2-3.

Test				
Ricerca virus BVD PCR sul pool + dei nuovi nati				
Animale	n°	n° +	% +	n° -
1	1	0	0.0	1
2	1	0	0.0	1
3	1	0	0.0	1
4	1	0	0.0	1
5	1	0	0.0	1
6	1	0	0.0	1
7	1	0	0.0	1
8	1	1	100.0	0
9	1	0	0.0	1
10	1	0	0.0	1
11	1	0	0.0	1
12	1	0	0.0	1
Totale	12	1	8.3	11

L'animale n° 8 è risultato positivo alla ricerca virale ed è risultato negativo alla ricerca anticorpale per NS2-3. L'animale, dell'età di circa 8 mesi, è stato riconfermato viremico (quindi PI) a distanza di circa 1 mese sempre mediante PCR.

In seguito al rilievo del soggetto PI, si è proceduto alla verifica dello stato virologico della madre del vitello PI. La bovina in oggetto (una primipara) è risultata, in seguito a due controlli consecutivi effettuati con PCR, essere persistentemente infetta (PI). Questo soggetto apparteneva al pool di animali rilevato positivo per PCR all'inizio dello studio; tuttavia i soggetti erano trovati non viremici al test di conferma effettuato a distanza di 1 mese. Occorre rilevare che per la riconferma dello stato di viremia è stato utilizzato il metodo ELISA antigene e non la PCR. In conclusione, nell'allevamento E, uno dei 40 animali nuovi nati testati, è risultato viremico persistente ed era figlio di una bovina PI non rilevata alla ricerca dei soggetti PI effettuata ad inizio studio.

ALLEVAMENTO F

Nel corso dello studio, al fine di evidenziare l'eventuale nascita di soggetti viremici persistenti (immunotolleranti), sono state sottoposte a ricerca dell'antigene BVD, mediante PCR in pool da 20 animali, cinquantanove vitelle nuove nate: nessuno dei campioni testati per PCR ha mostrato positività e quindi viremia.

In conclusione, nel corso dello studio, sono stati sottoposti a ricerca dei soggetti viremici persistenti (immunotolleranti) un totale di 831 animali, e sono stati identificati due animali immunotolleranti viremici persistenti PI,

Allevamento	Prov.	Monitoraggio nel corso dello studio		
		n° animali testati	n° animali PI	% di animali PI
A	PC	328	0	0
B	LT	60	0	0
C	UD	610	1 (*)	0.16
E	PR -1	50	0	0
F	CN	40	1 (**)	2.50
G	PR -2	59	0	0
Totale		1147	2	0.17

(*) L'animale PI identificato è nato da una bovina di origine austriaca acquistata, e che non era stata sottoposta a vaccinazione nella stalla di provenienza.

(**) Il soggetto PI era figlio di una manza PI non identificata nel corso dello screening iniziale effettuato all'inizio dello studio.

13. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

BVDV è ampiamente diffuso negli allevamenti di bovine da latte italiani ed i dati ottenuti nel corso dello studio confermano l'elevata circolazione del virus, con valori che si attestano intorno all'80%. Questo dato è in linea con quelli rilevati nel corso di altre ricerche epidemiologiche. La pratica della vaccinazione può influenzare la valutazione della sieroprevalenza. Tuttavia va considerato che, negli animali che sono stati oggetto del presente studio, sono stati oggetto di ricerca gli anticorpi diretti verso le proteine non strutturali NS2-3 del virus BVDV. Questi anticorpi sono indotti dall'attiva replicazione del virus. In tre dei sei allevamenti considerati era stato applicato un piano vaccinale nei confronti di BVD e sono stati utilizzati due tipologie di vaccini, e precisamente un vaccino inattivato ed un vaccino vivo attenuato allestito con un ceppo virale termospecifico (ts). Nel corso di prove di campo effettuate utilizzando anche i due vaccini in oggetto, è emerso che i vaccini inattivati non inducono una risposta anticorpale rilevabile verso le proteine non strutturali, almeno dopo un numero limitato di vaccinazioni, mentre i vaccini ts inducono un livello comunque scarso di questi anticorpi. Quindi la positività rilevata negli allevamenti vaccinati oggetto di studio deve essere ricondotta, in ogni caso, ad una probabile attiva circolazione del virus di campo.

I dati ottenuti suggeriscono che il livello di sieropositività è maggiormente influenzato dalla presenza o assenza dei soggetti PI all'interno dell'allevamento/gruppo considerato, piuttosto che dall'avvenuta vaccinazione. Infatti, nell'unico allevamento nel quale non sono stati rilevati animali PI, la percentuale di animali positivi era significativamente inferiore, con un valore pari al 24,1%, a quella osservata negli allevamenti nei quali era presente almeno un animale PI. In questi allevamenti le percentuali erano comprese tra il 64.5% e l'89.3%. Inoltre, dove si è proceduto alla ricerca degli anticorpi nei confronti delle proteine non strutturali NS2-3 su tutti gli animali presenti in allevamento, i tassi di sieroprevalenza più elevati sono stati rilevati nei gruppi nei quali erano presenti soggetti PI, forti eliminatori del virus BVD. E' stato quindi confermato il ruolo fondamentale svolto dai soggetti PI nel diffondere l'infezione all'interno dell'allevamento infetto.

A livello Europeo, sono stati proposti differenti approcci operativi per il controllo ed eradicazione dell'infezione da BVDV. In alcuni Paesi, in particolare dell'area scandinava, ma non solo, è stata proposta ed applicata con successo una strategia che prevede, in associazione a misure di biosicurezza e sorveglianza destinate ad impedire l'ingresso di animali eliminatori del virus, unicamente la ricerca sistematica, identificazione e rimozione degli animali persistentemente infetti (PI). In questi piani non è previsto il ricorso all'utilizzo di presidi immunizzanti verso BVD.

In altri Paesi, quali l'Olanda ed il Belgio, connotati da un'alta sieroprevalenza, ma soprattutto da una maggiore dimensione media degli allevamenti, la strategia basata sulla sola ricerca e rimozione dei soggetti PI non si è dimostrata adeguata e sufficiente a garantire il controllo dell'infezione. I risultati di prove sperimentali condotte in condizioni di campo hanno evidenziato che negli allevamenti di media e grande dimensione, nei quali si era proceduto alla rimozione dei soggetti PI senza ricorso alla pratica vaccinale, il virus circola attivamente, con la conseguente nascita di nuovi soggetti PI, anche in assenza di animali PI. Questo fatto va messo in relazione alla viremia di tipo transitorio che connota l'infezione da BVDV, che può essere anche di lunga durata, ed al numero di animali sensibili all'infezione, presenti in allevamento. L'adozione di piani vaccinali, atti a prevenire i danni correlati all'infezione e ad impedire la trasmissione del virus per via transplacentare, hanno dimostrato di costituire un utile strumento per un adeguato controllo dell'infezione da BVD. Nel presente studio si è quindi deciso di attuare un piano di controllo nel quale la ricerca, identificazione e rimozione dei soggetti PI è associata all'adozione della vaccinazione verso BVD, senza peraltro trascurare il ruolo svolto dalla profilassi diretta e dalle misure di biosicurezza.

Le diverse strategie utilizzate nella ricerca dei soggetti PI hanno consentito l'identificazione, nei 6 allevamenti controllati, di un totale 19 animali, pari al 1,4% del totale dei soggetti testati, valore che risulta in linea con i dati percentuali desunti dalla letteratura relativi alla presenza di soggetti PI in allevamenti di bovine da latte.

Dal punto di vista della fattibilità delle diverse strategie, l'approccio che prevede la ricerca degli animali PI mediante PCR in pool è risulta pratico, di semplice esecuzione e sostenibile dal punto di vista economico. Il controllo sistematico dei nuovi nati attraverso la verifica dello stato viremico nel sangue di vitelli neonati prelevato prima dell'assunzione del colostro, anche se risulta maggiormente efficace nell'identificazione precoce dei soggetti PI, non è di pratica esecuzione nella normale pratica di allevamento.

Il monitoraggio degli allevamenti effettuato nel corso dello studio, ha evidenziato la nascita di solo due soggetti PI. Il primo era un vitello nato da una bovina gravida acquistata, risultata non immunotollerante al controllo all'ingresso in allevamento, ma che ospitava un vitello PI. La metodica applicata in questo caso, contemporanea la ricerca dell'antigene BVD nel siero pre-colostrale su tutti i nuovi nati, ha consentito la tempestiva identificazione e rimozione del soggetto PI. E' stata quindi confermata l'utilità di questa misura e l'opportunità di procedere al controllo individuale dei nuovi nati almeno nelle bovine acquistate. La nascita del secondo vitello PI, ha messo in evidenza una carenza della procedura applicata nella fase di ricerca ed identificazione dei soggetti PI. Infatti, il vitello era figlio di una manza che apparteneva ad un pool risultato positivo a PCR nel corso dello screening iniziale. Gli animali del pool positivo erano stati poi ricontrollati utilizzando non la PCR, ma la metodica ELISA antigene, ed erano risultati negativi a questo test di conferma. Lo stesso animale è risultato in seguito positivo a due controlli consecutivi eseguiti, mediante PCR, al momento dell'identificazione del vitello PI. Appare evidente che la ricerca antigene con ELISA presenta un livello di sensibilità ridotta rispetto alla PCR. Il livello di protezione nei confronti dell'infezione fetale indotta dalla vaccinazione è risultato elevato. Infatti, nessun animale PI è stato generato da bovine, non PI, sottoposte a vaccinazione semestrale con il vaccino BVD inattivato utilizzato nel corso dello studio. I due vitelli PI identificati sono stati generati il primo da una bovina non vaccinata e il secondo da una bovina che era già immunotollerante al momento dell'inizio della pratica vaccinale.

In conclusione, i dati ottenuti indicano che la strategia di controllo combinata che prevede la ricerca, identificazione e rimozione dei soggetti PI, associata all'implementazione di un protocollo vaccinale connotato da protezione nei confronti dell'infezione transplacentare, risulta praticabile ed efficace in condizioni di campo.

14. BIBLIOGRAFIA

1. Alenius S, Lindberg A, Larson B (1996) A national approach to the control of bovine viral diarrhoea virus. Third ESVV symposium on pestivirus infections. Lelystad, The Netherlands, 19-20 September.
2. Arias, P, Santos L, Alvarez M (2004) Evaluation of the antibody response induced in naïve cattle by an inactivated bovine viral diarrhoea vaccine. Proceedings 23rd World Buiatrics Congress Vol.3, p12.
3. Bachofen C, Stalder H, Schaller P, Strasser M, Peterhans E (2004) Bovine viral diarrhoea virus: a Pestivirus shed via the skin? Poster presentation on: Second European Symposium on BVD control, October 22-24 Porto, 74
4. Baker J (1987) Bovine viral diarrhoea virus: a review. *J Am Vet Med Assoc*; **190**: 1449-1458.
5. Baker J (1995) The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*; **11**: 425-443.
6. Barber DM, Nettleton PF, Herring JA (1986) Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec*; **117**: 459-464.
7. Barberio A, Pozzato N, Ceglie L, Nardelli S, Dalvit P, Vicenzoni G (2006) Indagine sugli aborti infettivi della vacca da latte nella Regione Veneto. *Buatria. Journal of the Italian Association for Buiatrics* 1/6: 19-27.
8. Barkema H, Bartels C, Wuijckhuise L van, Hesselink J, Holzauer M, Weber M, Franken P, Kock P, Bruschke C, Zimmer G (2001) Outbreak of bovine virus diarrhoea on Dutch dairy farms induced by a bovine herpesvirus 1 marker vaccine contaminated with bovine virus diarrhoea virus Type 2. *Tijdschr Diergeneeskde*; **126**:158-165
9. Bielanski A, Loewen KS, Del Campo MR, Sirard MA, Willadsen S (1993) Isolation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in association with the in-vitro production of bovine embryos. *Theriogen*; **40**: 531-538.
10. Bielanski A, Jordan L (1994a) In vitro fertilization of bovine oocytes with semen from bulls persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Anim Reproduct Sci*; **35**: 183-189.
11. Bielanski A, Loewen K (1994b) In vitro fertilization of ova from cows experimentally infected with a non-cytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus. *Anim Reproduct Sci*; **35**: 215-221.

12. Bielefeld-Ohmann H (1982) Experimental fetal infection with bovine viral diarrhoea virus. II. Morphological reactions and distribution of viral antigen. *Can J Comp Med*; **46**: 363-369.
13. Bolin SR, Litteledike ET, Ridpath JF (1985) Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res*: **46**: 573-576.
14. Bolin SR (1990) In Kirkbridge: laboratory diagnosis of Livestock Abortion, Ames, Iowa State University. Press: 121-128.
15. Bolin SR, Litteledike ET, Ridpath JF (1991) Serological detection and practical consequence of antigenic diversity among bovine viral diarrhoea virus in a vaccinated herd. *Am J Vet Res*; **52**:1033-1037
16. Bolin S, Grooms D (2004) Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. *Vet. Clin. Food Anim*; **20**:51-68
17. Booth PJ, Collins ME, Jenner L, Prentice H, Ross J, Badsberg JH, Brownlie J (1999) Association of non-cytopathogenic BVDV with ovine blastocysts: effects of washing, duration of viral exposure and degree of blastocyst expansion. *Vet Rec*; **144**, 150-152.
18. Brianzi M, Olzi E, Cordioli P, Cavirani S (2003) Rilevazione di bovini immunotolleranti per *Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV)* presso il centro genetico A.N.A.F.I. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, Vol. XXXV; 181-187
19. Brinkhof J, Zimmer G, Westenbrink F (1996) Comparative study on four enzyme-linked immunosorbent assays and a cocultivation assay for the detection of antigens associated with the bovine viral diarrhoea virus in persistently infected cattle. *Vet Microbiol*; **50**: 1-6.
20. Brock K, Redman D, Vickers M, Irvine N (1991) Quantitation of bovine viral diarrhoea virus in embryo transfer fluids collected from a persistently infected heifer. *J Vet Diagn Invest*; **3**:99-100
21. Brock KV (1995) Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*; **11**: 549-561.
22. Brock KV, Lapin DR, Skrade DR (1997) Embryo transfer from donor cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Theriogen*; **47**: 837-844.
23. Brock KV, Grooms DL, Ridpath J, Bolin SR (2001) Changes in level of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:22-26).

24. Brodersen BW (2004) Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*; **20**: 85-93.
25. Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ (1984) Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec*; **114**: 535-536.
26. Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ, Pocock DH (1987) Pathogenesis and epidemiology of bovine viral diarrhoea virus infection in cattle. *Ann Rech Vet*; **18**: 157-177.
27. Caldow GL, Edwards S, Peters AR, Nixon P, Ibata G, Sayers R (1993) Associations between viral infections and respiratory disease in artificially reared calves. *Vet Rec*; **133**: 85-89.
28. Cavarani S, Luini M, Allegri G, Fabbi L, Bottarelli E, Flamini C (1992) Un decennio di ricerche sierologiche sulla diffusione di bovine Herpesvirus 1 (BHV-1), bovine viral diarrhoea (BVDV) e bovid Herpesvirus 4 (BHV-4) in allevamenti bovini con turbe della fertilità. *Sel. Vet.* XXXIII; 459-466
29. Cavarani S, Allegri G, Foni E, Chiocco D, Boldini M, Cavalca M, Flamini CF (1995) Indagine sierologica sulla diffusione di virus diversi in allevamenti di bufale da latte del nord Italia. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, Vol. XXVI; 243-251
30. Cavarani S, Foni E, Cabassi CS, Donofrio G (2000) Rilevazione di antigene BVDV mediante ELISA e immunofluorescenza su colture cellulari. *Sel Vet*; 189-194.
31. Cavarani S. (2002) La diarrea virale del bovino -Il virus. *UTET Divisioni periodici*; 3-6.
32. Cavarani S, Taddei S, Cabassi CS, Galvani G, Luzzago C, Toni F, Malanca E (2005) Risposta anticorpale verso BVDV Tipi 1, 2 e NS23 in manze trattate con vaccini vivi attenuati e inattivati *Obiettivi e Documenti Veterinari Anno XXIV*; 4:21-25),
33. Castrucci G. e coll. (1966) *Boll. Ist. Sieroter. Milan.* **45**:533.
34. Chase C, Elmowalid G, Yousif A (2004). The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. *Vet Clin Food Anim Pract*; **20**:95-114
35. Collins ME, Desport M, Brownlie J (1999) Bovine viral diarrhoea virus quasiespecies during persistent infection. *Virology*; **259**:85-98,
36. Corapi WV, Elliot RD, French TW, Dubovi EJ (1989) Severe thrombocytopenia in young calves infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*; **62**: 3934-3943.

37. Corapi WV, Elliot RD, French TW, Arthur DG, Bezek DM, Dubovi EJ (1990) Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *JAVMA*; **196**: 590-596.
38. Couvreur A, Letellier C, Collard A, Quenon P, Dehan P, Harners C, Pastoret PP, Kerkhofs P (2002) Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus isolated from Belgium. *Virus Res*; **85**: 17-28.
39. Crawford A., Thomas C., Heaney J., Collins M. Brownlie J. Persistence of BVDV in white blood cells following acute infection of calves. 6th ESVV Pestivirus Symposium, Thun, Switzerland, September 2005, **37**.
40. David GP, Crawshaw TR, Gunning RF, Hibberd RC, Lloyd GM, Marsh PR (1994) Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. *Vet Rec*; **134**: 468-472.
41. Doll K, Moennig V (2004) Complesso della diarrea virale bovina/malattia delle mucose. *Medicina interna e chirurgia del bovino*, Stober M, PVI: 572-581.
42. Drew TW, Yapp F, Paton DJ (2000) The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. *Vet. Microbiol*; **64**:145-154.
43. Edwards, S, Paton, D (1995) Antigenic differences among pestivirus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **11**, 563-577.
44. Falcone E, Cordioli P, Sala G, Tarantino M, Tollis M (2001) Genotyping of BVDV isolated in North Italy. *Vet. Res. Com*; **25**:161-167
45. Flores EF, Ridpath JF, Weiblen R, Vogel FS, Gil LH (2002) Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res*; **87**, 51-60.
46. Fourichon C. Baeudeau F. Bareille N. Seegers N. (2005) Quantification of economic losses consecutive to infection of dairy herd with bovine viral diarrhoea virus. *Prev. Vet. Med.* **72**, 177-181.
47. Fray MD, Mann GE, Clarke MC, Charleston B (1999) Bovine viral diarrhoea virus: its effects on estradiol, progesterone and prostaglandin secretion in the cow. *Teriogen*; **51**: 1533-1546.
48. Fredriksen B, Press CM, Loken T, Odegaard SA (1999) Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Microbiol*; **64**: 109-122.
49. Frigerio M, Luzzago C, Zecconi A (2003) La gestione sanitaria degli allevamenti bovini: indicatori di rischio nel controllo dell'infezione da BVDV. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, Vol. XXXV; 189-194.

50. Fulton RW, Saliki JT, Confer AW, Burge LJ, d'Offay JM, Helman RG, Bolin SR, Ridpath JF, Payton ME (2000) Bovine viral diarrhoea virus cytopathic and non cytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. *J Vet Diagn Invest* **12**: 33-38.
51. Fulton WR, Ridpath JF, Confer AW, Saliki TJ, Burge LJ, Payton ME (2003) Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals*; **31**:89-95
52. Gaede W, Gehrman B, Kenkies S, Mewes L, Pollandt G, Krippner S, Ewert B (2004) Eradication program for BVD in Saxony-Anhalt (Germany). Second Symposium on BVDV Control, Porto, Portugal, October 20-22, Abstracts:98.
53. Galik PK, Givens MD, Stringfellow DA, Bishop MD (2001) Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and anti-BVDV antibodies in sample of pooled bovine follicular fluid. *Theriogen*; **55**: 367.
54. Gillespie JH, Baker JA, McEntee K (1960) A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. *Cornell Vet*; **50**: 73-79.
55. Gillespie JH, Coggins L, Thompson J, Baker JA (1961) Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhoea and mucosal disease. *Cornell Vet*; **51**: 155-159.
56. Gorgoza L.M., Moran P.E., Larghi. J.L, Segui E., Lissarrague C., Saracco M., Braun M., Esteban E.N. (2004) Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) harboring seropositive cattle. Second European Symposium on: BVDV Control. Porto – Portugal October; **18**; 20-22.
57. Graham DA, McLaren IE, German A (1998) Evaluation of the suitability of a commercial bovine viral diarrhoea virus antigen capture ELISA for diagnostic testing. *Vet J*; **156**: 149-154.
58. Graham DA, German A, Mawhinney K, Goodall EA (2003) Antibody response of naïve cattle to two inactivated bovine viral diarrhoea vaccines, measured by indirect and blocking ELISAs and virus neutralization. *Vet Rec*; **152**:795-800.
59. Graham DA, Calvert V, Mooney J, Crawford J, Clery D (2004). Birth of persistently infected calves in two herds using inactivated BVDV vaccines. Second European Symposium on: BVDV Control. Porto, Abstract: 86.
60. Grooms DL, Ward LA, Brock KV (1996) Morphologic changes and immunohistochemical detection of viral antigen in ovaries from cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res*; **57**: 830-833.

61. Houe H (1992) Age distribution of animals persistently infected with bovine virus diarrhoea virus in twenty-two Danish dairy herds. *Can J Vet Res*; **56**: 194-198.
62. Houe H (1992b) Serological analysis of a small herd sample to predict presence or absence of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea (BVDV) in dairy herds. *Res Vet Sci*; **53**: 320-323.
63. Houe H (1993) Survivorship of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Prev Vet Med*; **15**:275-283.
64. Houe H (1995) Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **11**:521-547.
65. Howard CJ, Brownlie J, Thomas LH (1986) Prevalence of bovine viral diarrhoea virus viraemia in cattle in UK. *Vet Rec*; **119**: 628-629.
66. Hult L, Lindberg A (2004) BVD-eradication in Sweden-the goal in sight. Second European Symposium on BVD control, October 22-24 Porto, 38
67. Hult L, Lindberg A (2005) Experiences from BVDV control in Sweden. *Prev Vet Med*; **72**: 143-148.
68. Katholm J. (2004) Experience with clearing herds for BVDV infections. In: proceedings of Second European Symposium on BVD control, October 22-24 Porto, 56
69. Kelling C (2004) Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccine. *Vet Clin Food Anim*; **20**:115-129
70. Kirkland PD, Richards SG, Rothwell JT, Stanley DF (1991) Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet Rec*; **128**: 587-590.
71. Kirkland PD, Makintosh S, Moyle A (1994) The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. *Vet Rec*; **135**: 527-529.
72. Kirkland P. e coll. (1996) – Proc. Intern. Symp. Bovine Viral Diarrhoea Virus, pp. 98-107
73. Kirkland PD, McGovan MR, Makintosh SG, Moyle A (1997) Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus. *Vet Rec*; **140**: 124-127.
74. Kuhne S, Schroeder K, Holmquist G, Wolf G, Corner S, Brem G, Ballagi A (1999) Detection of bovine viral diarrhoea virus infected cattle – testing tissue samples derived from era tagging using an ^{Erns} capture ELISA. *J Vet Med B*; **52**:272-277
75. Joly A, Fourichin C, Beaudeau F (2005) Description and first results of a BVDV control scheme in Brittany (western France). *Prev Vet Med*; **72**: 209-213.

76. Letellier C, Kerkhofs P, Wellemans G, Vanopdenbosch E (1999) Detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus by reverse transcription-polymerase chain reaction of the untranslated region. *Vet Microbiol*; **64**: 155-167.
77. Letellier C, Kerkhofs P (2003) Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. *J Virol Methods*; **114**: 21-27.
78. Letellier C, De Meulemeester I, Lomba M, Mijten E, Kerkhofs P (2005) Detection of BVDV persistently infected animals in Belgium: evaluation of the strategy implemented. *Prev Vet Med*; **72**: 121-125
79. Lindberg A, Alenius S (1999) Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet Microbiol*; **64**: 197-222.
80. Lindberg A., Groenendaal H, Alenius S, Emanuelson U (2001) Validation of a test for dams carrying foetuses persistently infected with bovine viral diarrhoea virus based on the determination of antibody levels in pregnancy. *Preventive Veterinary Medicine* 51:199-214.
81. Lindberg A, Houe H (2005) Characteristics in the epidemiology of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. *Prev Vet Med*; **72**:55-73
82. Lobmann MS, Charlier P, Klaassen CL, Zygraich N (1986) Safety of a temperature-sensitive vaccine strain of bovine viral diarrhoea virus in pregnant cows. *Am J Vet Res* **47**: 557-560.
83. Luzzago C, Zecconi A, Casula A, Bianconi R, Ruffo G (1999) Indagine a seguito di un focolaio di diarrea virale bovina caratterizzato da sintomatologia emorragica. *Sel Vet*: 377-386.
84. Makoschey B, Jansenn MGJ, Vrijenhoek MP, Korsten JHM, Marel PVD (2001) An inactivated bovine virus diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2. *Vaccine*; **19**:3261-3268.
85. Makoschey B, Brunner R, Ankcorn R (2006a) Cross reaction varies considerably between different BVDV vaccines. Abstracts of the 24th World Buiatric Congress. *Poster session n°1*, PSI-064.
86. Makoschey B, Shilleto RW, Williams S, Patel J (2006b) Efficacy of an inactivated Bovine Virus Diarrhoea Vaccine 12 months after vaccination. Abstracts of the 24th World Buiatric Congress. *Poster session n°1*, PSI-065.
87. Makoschey B, Alvarez M, Santos L, Sonnemans D, Franken P, Mars M (2006c) Potential to use a conventional inactivated Bovine Viral Diarrhoea Vaccine as marker vaccine. Abstracts of the 24th World Buiatric Congress. *Poster session n°1*, PSI-072.
88. Mars MH, Van Maanen C (2005) Diagnostic assays applied in BVDV control in the Netherlands. *Prev. Vet. Med*; **72**:43-48

89. McGoldrick A, Bensaude E, Iyata G, Sharp G, Paton DJ (1999) Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestivirus RNA with fluorescent probes. *J Virol Methods*; **79**:85-95.
90. McGovan MR, Kirkland PD (1995) Early reproductive losses due to bovine pestivirus infection. *Brit Vet J*; **151**: 263-270.
91. Meyerling A, Jensen AM (1988) Transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently infected bull. *Vet Microbiol*; **17**: 97-105.
92. Moen A., Sol J., Sampimon O (2005) Indication of transmission of BVDV in the absence of persistently infected animals. *Prev. Vet. Med.* **72**, 93-98.
93. Moennig V, Eicken K, Flebbe U, Frey HR, Grummer B, Haas L, Greiser-Wilke I, Liess B (2005) Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). *Prev Vet Med*; **72**: 109-114
94. Moerman A, Straver P, De Jong M (1993) A long term epidemiological study of bovine virus diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. *Vet Rec*; **132**:622-626.
95. Munoz-Zanzi CA, Johnson WO, Thurmond MC, Hietala SK (2000) Pooled-sample testing as a herd screening tool for detection of bovine viral diarrhoea virus persistently infected cattle. *J Vet Diagn Invest*; **12**: 195-203.
96. Nagai M, Ito T, Sugita S, Sakoda Y, Mori M, Murakami T, Ozawa T, Yamada N, Akashi H (2001) Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhoea virus in Japan. *Arch Virol*; **146**:685-696.
97. Nardelli S, Martini M, Cassini R, Ceglie L, Drigo M, Mondin A, Casotto D, Pesavento A (2004) Indagine sull'allevamento da BVDV in allevamenti del Veneto. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, Vol. XXXVI; 155-160.
98. Nardelli S (2006) La diagnosi applicata al controllo della malattia: l'esempio BVD. *Buiatria. Journal of the Italian Association for Buiatrics* 1/6: 163-173
99. Niskanen R (1993) Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Vet Rec*; **133**: 341-344.
100. Niskanen R, Alenius S, Belak K, Baule C, Voges H, Gustafsson H (2002) Insemination of susceptible heifers with semen from a non-viraemic bull with persistent bovine viral diarrhoea virus infection localized in the testes. *Reprod Domestic Ann*: **37**:171-175.
101. Niskanen R, Lindberg A (2003) Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *Vet J*; **165**:125-130

102. Nyberg O, Osteras O, Plym Forshell K, (2004) Eradication of BVDV infection in Norwegian Cattle 1992-2003 – a success story. Second European Symposium on BVD control, October 22-24 Porto, 40
103. Olafson R, MacCallum AD, Fox FH (1946) An apparently new transmissible disease of cattle. Proc. Soc Exp. Biol. (NY); **36**: 205-217.
104. Palfi V, Houe H, Philipsen J (1993) Studies on the decline of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) maternal antibodies and detectability of BVDV in persistently infected cows. Acta Vet Scand; **34**: 105-107.
105. Patel, J.R., Shilleto, R.W., Williams, J. Alexander, D.C.S (2002) Prevention of transplacental infection of bovine foetus by bovine viral diarrhoea virus through vaccination. Archives of Virology; **147**:2453-2463
106. Patel J, Didlick S, Quinton J (2005) Variation in immunogenicity of ruminant pestivirus as determined by the neutralization assay. The Veterinary Journal **169**: 468-472.
107. Pozzi P, Leone M, Doncecchi O, Minelli G, Antonelli F, Boni L, Cocchi T (1999) Indagine seriologica nei confronti di antigeni responsabili di turbe riproduttive nella bovina: un anno di osservazioni in allevamenti da latte in Italia. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, Vol. XXXI; 267-275.
108. Pratelli A, Martella V, Cirone F, Buonavoglia D, Elia G, Tempesta M, Buonavoglia C (2001) Genomic characterisation of pestivirus isolated from lambs and kids in southern Italy; **94**: 81-85.
109. Ribeiro JN, Pereira A, Souza J, Madeira H, Barbosa A, Afonso C (2005) Estimated BVDV prevalence, contact and vaccine use in dairy herds in Northern Portugal. Prev Vet Med; **72**: 81-85.
110. Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ (1994) Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. Virology; **205**:66-74.
111. Ridpath JF, Bolin SR (1998) Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. Moll Cell Probes; **12**:101-106.
112. Ridpath J. (2005) Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: Impact of biotype and genotype on U.S. control programs. Preventive Veterinary Medicine; **72**:17-30
113. Rikula U, Aaltonen I, Ruoho O (2004) BVD control in Finland 1998-2003 based on annual screening. Second European Symposium on BVD control, October 22-24 Porto, 35
114. Rossi C, Bridgman C, Kiesel G (1980) Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum. Am J Vet Res; **41**:1680-1681

115. Saliki JT, Dubovi EJ (2004) Laboratory diagnosis of BVDV infections. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*; **20**: 69-83.
116. Sandvik T, Krogsrud J (1995) Evaluation of an antigen-capture ELISA for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle blood samples. *J Vet Diagn Invest*; **7**: 65-71.
117. Sandvik T, Fredriksen B, Lken T (1997) Level of viral antigen in blood leucocytes from cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus; *J Vet Med B*; **31**:127-131
118. Sanvik T (2004) Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. *Vet Clin Morth Am Food Anim Pract*; **20**: 151-169.
119. Sandvik T (2005) Selection and use of laboratory diagnostic assay in BVD control programmes. *Pre Vet Med*; **72**: 3-16.
120. Schelp C, Greiser-Wilke I (2003) BVD-Diagnostik: ein Überblick. *Berl. Munch. Tierarztl Wschr.*, 116:227-233).
121. Schlafer DH, Gillespie JH, Foote RH, Quick S, Pennow NN, Schiff EI, Allen SE, Powers PA, Hall CE, Voss H (1990) Experimental transmission of bovine viral diseases by insemination with contaminated semen or during embryo transfer. *Dtsch. Tierarztl Wochenschr* 1990; 97:68-72.
122. Schopf K, Dunser M, Matt M, Schweighardt H (2005) Eradication of Pestivirus infection in Tyrol's cattle – ear notch sampling as a long term perspective. 6th ESVV Pestivirus Symposium, Thun, Switzerland, September; T5-5, 45
123. Shannon AD, Richards SG, Kirkland PD, Moyle A (1991) An antigen capture ELISA detects pestivirus antigens in blood and tissues of immunotolerant carrier cattle. *J Virol Methods*; **34**: 1-12.
124. Stober M (1959) Malattie infettive dei bronchi e polmoni; virus della diarrea virale bovina. *Medicina interna e chirurgia del bovino*. PVI:319.
125. Toni F, Guazzetti S, Valla G, Grigoletto L., Cavarani S (2003) Influenza su parametri riproduttivi in bovine da latte trattate nel post-partum con un vaccino inattivato verso Bovine Viral Diarrea virus (BVDV). *Atti della Società Italiana di Buiatria. Vol. XXXV*. 175-180.
126. Thur B, Zlinszky K, Ehrensperger F (1996) Immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea in skin biopsies: a reliable and fast diagnostic tool. *Zentralbl Veterinarmed*; **43**: 163-166.
127. Thurmond M. in: Goyal S., Ridpath J. (2005) *Bovine Viral Diarrhoea Virus, Diagnosis, Management, and Control*. Blackwell Publishing; 96-97)

128. Valla G, Panero V (2002) Risposta anticorpale verso la proteina non strutturale NS2-3 (p80-125) indotta dalla vaccinazione con un vaccino inattivato del commercio. Atti del 4° Congresso Multisala SIVAR: 117.
129. Valla G, Intini M, Cammi F, Cavanna L, Capra D, Calza L, Cammi G, Munoz Bielsa J, Makoschey B, Bussacchini M (2006) Control of BVDV infection through identification and removal of persistently infected (PI) animals and vaccination with an inactivated BVDV vaccine. Abstracts of the 24th World Buiatric Congress. *Poster session n°1*, PSI-017.
130. Van Oirschot J, Brusche C, van Rijn P (1999) Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea; *Vet Microbiol*, **64**:169-183.
131. Van Schaik G, Schukken Y, Nielen M, Dijkhuizen A, Barkema W, Benedictus G. (2002) Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: a cohort study. *Prev Vet Med*; **54**:279-289
132. Verhoef M (2004) Experiences with the use of vaccines in BVDV-control. Second European Symposium on BVD control, October 22-24 Porto, 55
133. Viet AF, Fourichon C, Seegers H, Jacob C, Guihenneuc-Jouyaux C (2004) Influence de la structuration du troupeau en lots sur la propagation du virus de la Diarrhéé Virale Bovine (BVDV) en élevage bovin laitier. *Revue Méd Vet.* **3**:132-140
134. Vilcek S, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossmanith W, Vega S, Scicluna MT, Palfi V (2001) Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol*; **146**: 99-115.
135. Vilcek, S., Durkovic, B, Kolesarova, M, Paton, D.J., Mishra, N & Mahony, T. (2004) Proceedings of the Second European Symposium on: BVDV control. Porto-Portugal, Ottobre; **15**; 20-22.
136. Wellemans G, Van Opdenbosch E (1987) Demonstration of BVD virus (Bovine diarrhoea virus) in many cell lines. *Ann Rech Vet*; **18**: 99-102.
137. Willems M, Moshage H, Nevens F, Fevery J, Yap SH (1993) Plasma collected from heparinized blood is not suitable for HCV-RNA detection by conventional RT-PCR assay. *J Virol Methods*; **42**: 127-130.
138. Wengler GD, Bradley MS, Collet F, Heinz RW, Schlesinger RW, Strass JH (1995) Flaviviridae: 415-427. *In* Murphy e *Coll.* Virus Taxonomy. Sixth report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag. New York. N.Y.
139. Whitmore HL, Zemjanis R, Olson J (1981) Effect of bovine viral diarrhoea virus on conception in cattle. *J Am Vet Med Assoc*; **178**; 1065-1067.

140. 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.
141. Wolfmeyer A, Wolf A, Beer M, Strube W, Hehnen HR, Schmeer N, Kaaden OR (1997) Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. Arch Virol; **142**: 2049-2057.
142. Zimmer GM, Van Maanen C, De Goey I, Brinkhof J, Wentink GH (2004) The effect of maternal antibodies on the detection of bovine virus diarrhea virus in peripheral blood. Vet. Microbiol. **100**:145-149.