

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

**METODOLOGIE E STRATEGIE DI INTERVENTO
NELLA RILEVAZIONE DI BOVINI CON INFEZIONE
PERSISTENTE DA BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS
(BVDV)**

**METHODS AND STRATEGIES FOR THE DETECTION OF
BOVINES PERSISTENTLY INFECTED BY THE BOVINE VIRAL
DIARRHEA VIRUS (BVDV)**

Tesi di Dottorato di:

Dott.ssa Chiara Piancastelli

DOTTORATO DI RICERCA 2005-2007

A mia madre e mio padre

“One love, one blood”

Capitoli	pag
<u>Abstract</u>	
1. Introduzione	1
2. Etiologia	3
3. Patogenesi	8
4. Forme cliniche	12
5. Strategie di controllo	21
5.1 Individuazione ed eliminazione degli animali PI	21
5.1.1 Ricerca Ag BVD su tutti gli animali mediante ELISA o PCR	22
5.1.2 Ricerca Ag BVD su tutti gli animali mediante PCR su pool di sangue in toto	22
5.1.3 Indagine sierologica per anticorpi verso NS2-3 su tutti i capi presenti e ricerca di Ag BVD sui soggetti sieronegativi	22
5.1.4 Ricerca Ag BVD su animali di età inferiore ai 24 mesi mediante ELISA o PCR	23
5.1.5 Ricerca Ag BVD mediante ELISA o PCR su sangue in toto o biopsia cutanea (ear notch PCR) su vitelli neonati	23
5.2 Vaccinazione	24
a) Vaccini vivi	25

b) Vaccini spenti	27
c) Vaccini innovativi	29
5.3 Vaccinazione associata ad eliminazione dei soggetti PI	30
6. Attività sperimentale	31
6.1 Diffusione del virus agente di BVD in allevamenti bovini da latte italiani	32
6.2 Rilevazione di animali PI in allevamenti da latte italiani con sierologia indicativa di attiva circolazione virale	34
6.2.1 Ricerca Ag BVD mediante PCR su pool di sangue in toto	35
6.2.2 Indagine sierologica per anticorpi verso NS2-3 su parte dei capi presenti in azienda e ricerca Ag BVD su soggetti sieronegativi mediante ELISA	46
6.2.3 Ricerca Ag BVD mediante PCR su biopsia cutanea (ear notch PCR) su vitelli neonati	49
7. Conclusioni	59
8. Bibliografia	61

ABSTRACT

BVD-MD is a disease caused by a Pestivirus (Bovine Viral Diarrhea Virus or BVDV) and characterised by respiratory and reproductive symptoms of different severity according to the byotype involved (cytopathic or non-cytopathic).

The non-cytopathic BVDV infection in pregnant heifers during the first 4 months of pregnancy leads to a state of immunotolerance; the foetus is not able to recognise the virus as not self and thus does not produce antibodies against this pathogen.

After the birth, the calf, which is defined as persistently infected or PI, is affected by a situation of viral excretion. Because of the high seroprevalence of BVDV and, since presence of PI animals is the cause of active viral circulation, the early identification of these animals is capital.

The present work aims at evaluating the BVDV diffusion among Italian farms, studying the application of different laboratory strategies and techniques for the detection of PI animals, such as the BVDV identification by whole blood pooling PCR, the identification of antibodies against NS2-3 and the research of BVDV on seronegative animals through ELISA method, and finally, a Real Time PCR on calves ear notches.

1. INTRODUZIONE

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, nei pressi della città di Ithaca.

L'animale colpito era una bovina di 4 anni, importata due anni prima dall'Inghilterra. I segni manifestati dall'animale erano riconducibili ad un episodio di classica diarrea invernale: diarrea acquosa, anoressia, calo brusco della produzione lattea ed ipertermia. Durante la notte la bovina venne a morte. Nei 10 giorni successivi a questo episodio cinque capi dello stesso allevamento morirono, manifestando la stessa sintomatologia.

Altri cinque allevamenti, ubicati nel raggio di 15 km dal primo focolaio, furono rapidamente interessati dalla malattia. Nelle aziende colpite la morbilità oscillava dal 33% all'88%, mentre la mortalità dal 4% all'8%.

Un ulteriore elemento clinico si rese a breve manifesto: la comparsa di aborti a diversi stadi di gravidanza e coinvolgente un elevato numero di bovine.

Nel giro di pochi mesi questa patologia fu poi segnalata in altre aree degli USA.

Intorno ai primi anni Sessanta fu rilevato che una quota elevata di bovini sieropositivi, in seguito ad infezione, risultava totalmente asintomatica. Nel 1953 vennero poi descritti episodi clinici della cosiddetta “Malattia delle Mucose” (MD), caratterizzata da bassa morbilità ed alta mortalità, attribuendone la genesi all'intervento di un virus diverso dallo stipite che aveva causato la diarrea virale bovina.

Alla fine degli anni Cinquanta la malattia fu segnalata anche in Europa. In Italia la prima segnalazione risale al 1966. Solo nel 1967, durante il corso del Simposio dell'American Veterinary Medical Association venne definitivamente

stabilito che il complesso Diarrea Virale Bovina - Malattia delle Mucose (BVD-MD) era riconducibile, dal punto di vista eziologico, ad un singolo agente virale.

Come riconoscimento all'originaria descrizione della malattia da parte di Olafson, Mc Callum e Fox, detto agente venne denominato *bovine virus diarrhea*.

Nel 1990 nel Nord America pervennero le prime segnalazioni di malattia grave nei giovani bovini, connotata da elevata mortalità e quadri di marcata trombocitopenia, imputata all'intervento del virus agente di BVD (BVDV). Gli studi condotti nell'ambito di detti focolai portarono all'isolamento di stipiti di BVDV accomunati da caratteristiche genotipiche e distinguibili dagli stipiti di BVDV classici. Pertanto, nell'ambito del BVDV, si è giunti alla distinzione degli stipiti classici, indicati come BVDV tipo 1, da quelli spiccatamente trombocitopenici, indicati come BVDV tipo 2.

Successivamente agli episodi statunitensi, la presenza del BVDV tipo 2 è stata segnalata anche in Europa ⁽¹¹⁾.

2. EZIOLOGIA

Il virus agente della Diarrea Virale Bovina (BVDV) è un Pestivirus appartenente alla famiglia *Flaviviridae*, che comprende il virus della peste suina classica (CSFV), il virus della border disease (BDV) e due distinti genotipi di BVDV, BVDV tipo 1 e BVDV tipo 2 ⁽³⁰⁾.

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

E' stabile, a PH compreso tra 6 e 9, mentre viene rapidamente inattivato alla temperatura di 56 °C e risulta essere labile ai comuni disinfettanti, nonché ai solventi organici ed alla tripsina ⁽³¹⁾.

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.

L'ORF viene tradotto come una poliproteina, che viene processata ad opera di proteasi cellulari e virali.

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

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

- C è una proteina relativamente conservata tra i Pestivirus e sembra che contenga una sequenza interna di segnale in grado di dirigere la traslocazione delle glicoproteine strutturali al reticolo endoplasmatico;
- E^{ms} (gp48) ha attività ribonucleasica e gli anticorpi diretti contro essa sono in grado di neutralizzare l'infettività del virus;

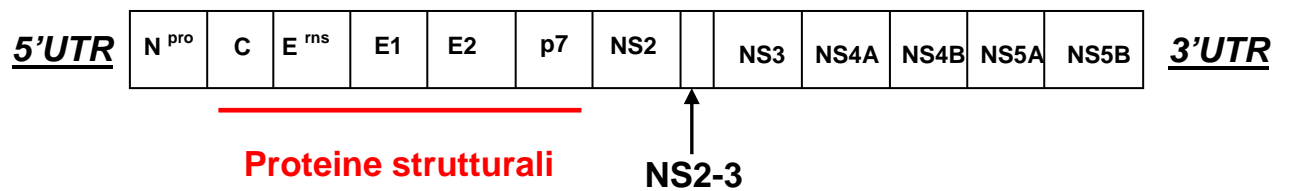
- E1 (gp25) è una glicoproteina transmembrana con funzione di ancoraggio alla cellula ospite e forma un eterodimero con E2;
- E2 (gp53-56) è la glicoproteina virale maggiore e rappresenta il principale target degli anticorpi ad attività neutralizzante.

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

- N^{pro} che ha attività di autoclivaggio dalle nascenti poliproteine;
- p7 la cui attività non è stata ancora del tutto chiarita, nonostante si pensi sia importante per la produzione del virus ma non per la replicazione dell'RNA;
- NS2 (p54) ad attività ricombinogena;
- NS3 (p80) che presenta tre attività di tipo enzimatico, essenziali per la replicazione virale, la serina proteasi, l'elicasi e la NTPasi.

NS2 e NS3 risultano ben distinte nel caso del biotipo BVDV citopatico, mentre costituiscono un complesso proteico unico, denominato NS2-3 nel caso del BVDV non citopatico;

- NS 4A (p10), verosimilmente cofattore dell'attività serina proteinasica di NS3;
- NS 4B (p30) che ha attività di ancoraggio alla membrana durante la fase di replicazione virale;
- NS 5A (p58) che fa parte del complesso di replicazione virale;
- NS 5B (p75) che rappresenta la RNA polimerasi Rna-dipendente.



Il genoma e gli antigeni virali

All'interno dei BVDV vengono identificati genotipi e biotipi ⁽²⁾. La classificazione in genotipi è basata sulla diversità rilevata nella sequenza del genoma virale.

Fino a pochi anni fa i BVDV erano suddivisi in due genotipi, il BVDV tipo 1, comprendente gli stipti classici, ed il BVDV tipo 2, nel quale sono inclusi gli stipti trombocitopenici ⁽⁹⁾.

Di recente è stata studiata la diversità genetica dei ceppi di BVDV riferita alle regioni 5' UTR e N^{pro} utilizzando la metodica PCR che ha portato alla rilevazione di una notevole variabilità tra questi, consentendo così di dividerli in quattro sottogenotipi: BVDV 1a, BVDV 1b, BVDV 2a e BVDV 2b ⁽¹⁵⁾.

In seguito ad ulteriori indagini, il numero dei genotipi è stato esteso a 11 differenti gruppi genetici di BVDV (da BVDV 1a a BVDV 1i) ⁽³⁶⁾. Ricerche più attuali hanno poi consentito di rilevare un dodicesimo genotipo, denominato BVDV 1k ⁽³⁵⁾.

All'interno dei genotipi sono state rilevate anche differenze antigeniche ⁽¹⁶⁾, che comunque non consentono una suddivisione in sierotipi ⁽¹¹⁾.

La classificazione in biotipi è basata sul comportamento del virus in coltura, in particolare sulla presenza od assenza di un visibile effetto citopatico (CPE) nelle cellule infettate.

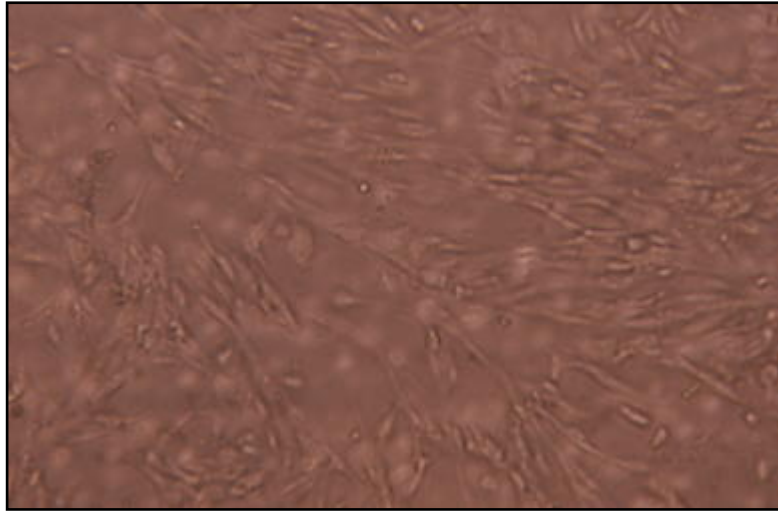


Fig. 1 CPE causato da BVDV-1 (cellule MDBK).

Foto eseguita presso la Sezione di Malattie Infettive degli Animali, Università di Medicina Veterinaria, Parma.

BVDV replica in vitro su colture cellulari di rene di vitello, di testicolo e milza e su cellule embrionali di polmone bovino (Bovine Embryo Lung cells o BEL).

Alcuni stipiti di 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 stati suddivisi in citopatici (CP) e non citopatici (NCP) ⁽²⁾.

Per molti anni si è pensato che solo il BVDV-CP fosse in grado di causare malattia, fino a quando non è stata accertata una perfetta identità antigenica tra stipiti CP e NCP omologhi, il che ha portato a riconsiderare la genesi dei BVDV-CP, concludendo che questo biotipo derivi dal BVDV-NCP attraverso una trasformazione a carattere endogeno ⁽¹⁹⁾.

La caratteristica di citopatogenicità del BVDV è correlata alla presenza della proteina non strutturale NS3 (p80). Non sono del tutto chiari 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 sia il precursore di BVDV-CP omologo in animali PI (trasformazione endogena) attraverso fenomeni di

ricombinazione, ma anche per mezzo di altri processi (delezioni o inserzioni di geni, mutazioni puntiformi) che coinvolgono la regione del genoma virale codificante per NS2-3, producendo modificazioni che generano la proteina NS3 propria di BVDV-CP⁽¹¹⁾.

3. PATOGENESI

Al fine di addivenire alla formulazione di un quadro quanto più esplicativo 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.

In linea di massima si può considerare che, a seguito dell'infezione acquisita per via digerente e/o per via respiratoria, il virus replichi a livello delle mucose, replicazione a cui consegue una fase viremica in cui il virus viene veicolato attraverso i linfociti.

Il virus può essere rilevato nel sangue dopo 2-4 ore dall'inoculazione sperimentale in vitelli sensibili e la viremia può durare fino a 14 giorni.

La presenza del virus nel buffy coat è stata dimostrata fino all'undicesimo giorno post infezione.

Una recente ricerca ⁽¹⁸⁾ ha riportato la possibilità di rilevare il BVDV in lisati di leucociti di sangue periferico aumenta dopo stimolazione *in vitro* con alte dosi di un fitogeno (fitoemoagglutinina o PHA). L'utilizzo di questa metodica ha consentito di rilevare il genoma virale post-infezione per 42 giorni.

L'identificazione del BVDV nei linfociti T CD4+ e CD8+, monociti e linfociti B ha confermato che il genoma virale era funzionalmente attivo per l'espressione virale ⁽¹⁸⁾.

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

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

L'infezione in soggetti normoergici raramente esita in malattia grave e solitamente il decorso è fausto. Nei soggetti adulti molto spesso l'infezione è asintomatica e si limita a produrre linfopenia, anche marcata, ma sempre transitoria.

Da segnalare inoltre la comparsa di forme cliniche di gravità variabile, coinvolgenti apparati diversi, tra cui quello respiratorio, dovute al concorso di agenti patogeni secondari che trovano nella compromissione immunitaria del bovino la condizione per manifestare a pieno la capacità infettante ed estrinsecare il loro potere patogeno ⁽¹¹⁾.

Nel caso in cui BVDV 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 particolarmente gravi, esacerbando i caratteri tipici della malattia.

In corso di episodi caratterizzati da sindrome emorragica la spiccata trombocitopenia osservata non sembra esitare 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 con BVDV tipo 2 di vitelli privati di colostro ha dimostrato un'evidente compromissione del midollo osseo con soppressione della produzione delle piastrine ed iperplasia dei megacariociti. La linfopenia rappresenta comunque una costante in corso di infezione da BVDV tipo 1 e tipo 2 ⁽⁶⁾.

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.

Il BVDV viene eliminato per via escretoria e secretoria, e può essere isolato in grande quantità nella saliva e nello scolo nasale e, in misura minore, nelle urine e nelle feci.

Fermo restando che animali dotati di specifica immunità risultano protetti nei confronti dell'infezione, la patogenesi dell'infezione congenita è dipendente dalla fase della gestazione in cui si verifica il contatto con il virus e dalle caratteristiche legate al virus stesso.

Il feto risulta sensibile all'infezione dopo annidamento dell'embrione e nei primi 3 mesi di gestazione l'infezione da BVDV-CP determina alterazioni fetali che risultano frequentemente esiziali, comportando l'interruzione della gravidanza ⁽¹¹⁾.

L'infezione della bovina gravida da parte di BVDV-NCP entro i primi 4 mesi di gestazione, ovvero in una fase di ontogenesi fetale in cui il sistema immunitario non è ancora attivo, esita in uno stato di immunotolleranza, vale a dire che il feto non è in grado di riconoscere il virus come estraneo all'organismo e reagire di conseguenza.

La capacità di evocare stati di infezione con carattere di persistenza e conseguente tolleranza immunitaria appare circoscritta ai soli BVDV-NCP in quanto, durante l'infezione fetale, detti stipiti non evocherebbero la produzione di interferone tipo 1 che è stato dimostrato in grado di inibire la replicazione del BVDV *in vitro* ⁽¹¹⁾.

Il fenomeno non avviene in corso di infezione da BVDV-CP e BVDV-NCP, qualora quest'ultima avvenga dopo la nascita.

Allorché il sistema immunitario si attiverà, il feto, che ha subito nei tempi e modi indicati, l'infezione da BVDV-NCP, considererà come parte integrante dell'organismo il virus e, di conseguenza, non produrrà un'attiva e specifica risposta immune.

Il risultato finale è rappresentato dalla nascita di un soggetto immunotollerante che risulterà sieronegativo ma persistentemente infetto (PI). Tale soggetto, essendo escretore persistente di virus, deve pertanto essere considerato come una continua fonte d'infezione e rappresenta il cardine per il mantenimento e la diffusione dell'infezione all'interno del gruppo.

Inoltre, animali immunotolleranti in attività riproduttiva perpetuano il fenomeno generando prole a loro volta immunotollerante ⁽¹¹⁾. 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 trascurabile.

Il destino degli animali immunotolleranti è legato all'eventualità che detti soggetti subiscano una super infezione da parte di uno stipite di BVDV omologo a quello che ha indotto lo stato di tolleranza immunitaria, ma questa volta CP.

In tal caso l'animale manifesterà la Malattia delle Mucose (MD), che nella maggior parte dei casi lo porterà a morte. Come già accennato, si ritiene che gran parte degli stipiti di BVDV-CP, isolati in corso di MD, abbia un'origine endogena. Questa convinzione deriva essenzialmente dal reperto concomitante, in animali colpiti da MD, di BVDV-CP e di BVDV-NC, antigenicamente identici.

Il grado di omologia antigenica tra lo stipite causa dell'immunotolleranza e quello superinfettante condiziona l'evoluzione clinica della MD: tanto è maggiore 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). Di norma si ritiene che i bovini immunotolleranti non sopravvivano oltre i due 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 due anni di vita.

E' infine da segnalare che infezioni contratte oltre il quarto e fino circa al sesto mese di gravidanza possono produrre alterazioni fetali riportabili a ipoplasia cerebellare ed alterazioni oculari. Oltre detto periodo si considera l'animale in grado di contrastare autonomamente l'azione del virus, pertanto si avrà un parto a termine e 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 ⁽¹¹⁾.

4. FORME CLINICHE

Il BVDV rappresenta uno spettro d'ospite ampio, essendo in grado di evocare infezione in più specie animali: bovino, ovino, suino. Le segnalazioni disponibili indicano l'esistenza di una malattia spontanea in ruminanti domestici e selvatici appartenenti a famiglie diverse: *Antilocapridae*, *Bovidae*, *Camelidae* e *Cervidae*.

Il bovino rappresenta la specie di maggior interesse per quanto riguarda i rapporti di ordine patogenetico, clinico ed epidemiologico che intercorrono con BVDV.

I quadri clinici collegati all'infezione da BVDV nel bovino sono variabili in relazione allo stipite virale infettante, alle caratteristiche dell'ospite (età, condizione immunitaria, stato gravidico) e all'intervento di fattori esogeni all'ospite, favorenti e/o scatenanti e/o complicanti l'attività patogena del virus ⁽⁷⁾.

Tradizionalmente l'inquadramento clinico della BVD prevede un distinguo in due forme principali: Diarrea Virale Bovina e Malattia delle Mucose.

Più di recente si sono manifestati quadri clinici diversi dai precedenti, riportabili a sindrome emorragica e malattia acuta a carattere mortale.

Diarrea Virale Bovina (BVD)

In seguito all'entrata di BVDV in un allevamento sieronegativo o scarsamente infetto, spesso si osservano, nel tempo, le seguenti manifestazioni: aumento del repeat breeding, aborti, nascita di vitelli malformati o scarsamente vitali, aumento della mortalità neonatale e, infine, dopo circa un anno dall'evento infettante, i primi casi di Malattia delle Mucose. Le manifestazioni sintomatologiche variano in dipendenza 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.

Questa forma si manifesta solitamente nei giovani animali di pochi mesi d'età. L'infezione può essere acquisita precocemente, nei primi giorni di vita, e anche nelle fasi terminali della gravidanza. Dopo un'incubazione di 3-5 giorni, si ha un'ipertermia febbrile bifasica, accompagnata da leucopenia più o meno marcata; tali sintomi, come pure una lieve e transitoria diminuzione della produzione latte, passano inosservati oppure non ricevono particolari attenzioni.

Gli animali sierconvertono, producendo anticorpi neutralizzanti e raggiungono il titolo più elevato circa 10 settimane post infezione.

Gli anticorpi assunti con il colostro conferiscono al vitello una protezione passiva umorale che dura 3-6 mesi ⁽¹¹⁾.

Nel vitello normoergico si osserva enterite acuta, associata a diarrea, senza caratteri patognomici. La malattia diffonde rapidamente nel gruppo (alta morbilità), l'evoluzione è di breve durata e la guarigione è spontanea (mortalità bassa o assente) in assenza di complicanze.

In considerazione dell'attività immunodepressiva di BVDV, che si estrinseca attraverso una marcata linfopenia in corrispondenza dell'infezione, non è da sottovalutare l'intervento di fattori microbici complicanti che,

nell'animale immunocompromesso, possono esercitare appieno il loro ruolo patogeno ⁽¹⁾.

Altre volte, nei vitelli più anziani, specie dopo il calo degli anticorpi colostrali, nonché nei vitelloni e negli adulti, l'esposizione al virus BVD dà luogo ad una diarrea passeggera; solo di rado si rilevano leggeri arrossamenti diffusi e piccole erosioni a carico di musello, bocca e mucosa del prepuzio e della vagina.

La morbilità è scarsa e la guarigione subentra entro le due settimane. Il BVDV è in grado, tra l'altro, di evocare una sintomatologia respiratoria primaria. Un'attività diretta sull'apparato respiratorio è stata, di recente, specificatamente ascritta a BVDV-CP tipo 1, sottogruppo 1a ⁽¹¹⁾.



Fig. 2 Sintomi associati a Diarrea Virale Bovina in soggetti adulti.



Fig. 3 Sintomi associati a Diarrea Virale Bovina nel vitello normoergico.

Una sintomatologia respiratoria è altresì riconducibile a BVDV, che promuove l'intervento di specifici patogeni respiratori favoriti, nella loro azione, da stati di immunocompromissione indotti da infezione acuta da BVDV stesso (8).

Sempre riferibile ad 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 (37).

Tuttavia, a causa dell'attuale limitatezza delle evidenze sperimentali, si ritiene prematuro correlare l'infezione da BVDV e la mastite bovina.

Malattia delle Mucose (MD)

Si manifesta solitamente in animali di età compresa tra i 6 ed i 24 mesi, assume carattere sporadico (bassa morbilità) ed esito letale (alta mortalità).

L'animale manifesta febbre, emissione di feci liquide frammiste a sangue e fibrina. Spesso si osserva tenesmo. Caratteristica è la scialorrea associata ad erosioni a narici, musello, mucose del cavo orale, spazi interdigitali e cercine coronario. La morte sopraggiunge nell'arco di 5- 7 giorni dall'esordio dei sintomi.



Fig. 4 Sintomi associati a MD in soggetti adulti

Il quadro anatomo-patologico è dominato da lesioni a carico dell'apparato digerente: lesioni erosive ed ulcerative a livello di mucosa oesofagea e abomasale, dove è interessata anche la sottomucosa, e 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. La milza appare di volume e spessore ridotti, reperto che da alcuni autori viene ritenuto caratteristico di MD ^(1; 2).

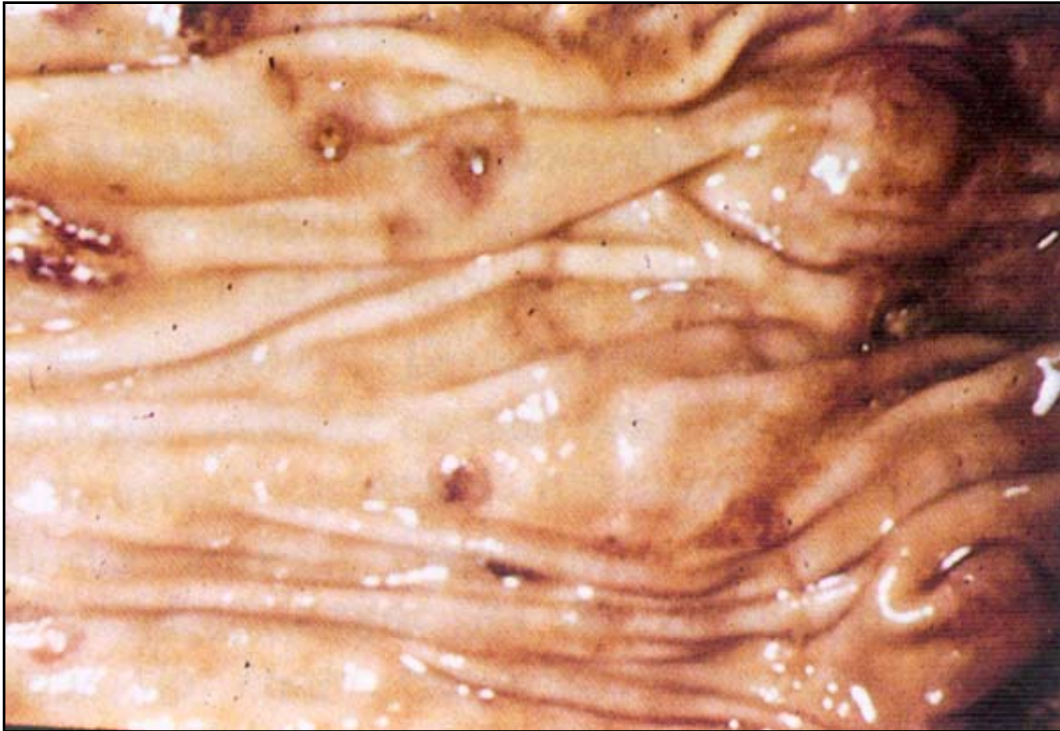


Fig. 5 Lesioni erosive ed ulcerative a carico delle placche del Peyer in un bovino colpito da MD. Foto eseguita presso la Sezione di Malattie Infettive degli Animali, Università di Medicina Veterinaria, Parma.

Di notevole importanza diagnostica sono le lesioni erosive-necrotiche a carico degli spazi interdigitali che, in casi particolarmente gravi, possono essere associati a zoppie. In alcuni casi è presente una dermatite superficiale o profonda, essudativa, purulento-necrotica, limitata alla testa e alla nuca, oppure generalizzata. In questo caso sono il più delle volte coinvolte delle infezioni batteriche secondarie. La temperatura corporea aumenta solo in un terzo dei soggetti colpiti.

Contrariamente all'infezione acuta da BVDV, in circa metà dei soggetti con Malattia delle Mucose si ha una marcata leucocitosi con spostamento a sinistra dei neutrofili, e solo in minima parte un'evidente leucopenia. Anche in questo caso, in alcuni soggetti, a seguito della diminuzione dei trombociti, subentrano dei disturbi dell'omeostasi.

La maggior parte dei vitelli persistentemente infetti si presenta alla nascita in condizioni di sviluppo normale e clinicamente sano.

Alcuni soggetti richiamano l'attenzione per lo scarso peso alla nascita. I soggetti persistentemente infetti subiscono una precoce caduta (di solito entro le prime 6 settimane di vita) degli anticorpi assunti con il colostro materno, rispetto a loro coetanei mai venuti a contatto con il virus.

Clinicamente si possono distinguere due tipi di decorso: circa la metà degli animali appare completamente normale fino alla comparsa acuta dei sintomi della Malattia delle Mucose. Per gli altri la crescita è più o meno ritardata, talvolta hanno una testa sproporzionatamente lunga e a punta (simile alla condizione di prognatismo superiore), e il pelo si presenta insolitamente ispido. Talvolta nell'ulteriore decorso si può rilevare una diarrea cronica per lo più intermittente (runting disease).

Si osservano quindi episodi intercorrenti di diarrea intervallati da periodi di remissione sintomatologica, alopecia ed ipercheratinizzazione a carattere persistente a livello di collo e lesioni podali associati a leucopenia. Gli animali colpiti da questa forma risultano provvisti di anticorpi neutralizzanti. In considerazione soprattutto della loro scarsa produttività, la loro aspettativa di vita è da ritenersi comunque ridotta.

Sindrome emorragica

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

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

A causa della trombocitopenia, che circa due settimane dopo l'infezione raggiunge i valori più critici (il numero dei trombociti durante le gravi emorragie

sistemiche scende al di sotto di 50 g/l), la diatesi emorragica si manifesta con petecchie emorragiche ed emorragie estese su cute e mucose (congiuntiva, sclera, mucose nasali, gengivali, prepuziali, vaginali). I primi segni si hanno spesso quando, dopo iniezioni o punture di insetti, continua ad essere presente una modesta fuoriuscita di sangue.

All'esame necroscopico gli animali colpiti evidenziano una diatesi emorragica diffusa a mucose e sierose con presenza di sangue non coagulato nelle cavità, tutti fenomeni riportabili ad una spiccata trombocitopenia ⁽²⁹⁾.

Tutti i casi esaminati hanno portato all'isolamento del BVDV tipo 2 NCP. L'agente risponde ai postulati di Koch, sempre attuali nel determinare il rapporto causale in corso di malattia a carattere infettivo. In particolare, l'inoculazione in vitelli sensibili del virus isolato in corso di sindrome emorragica ha riprodotto il quadro clinico. Al contrario, vitelli provvisti di immunità si sono dimostrati protetti nei confronti dell'infezione sperimentale ^(11; 13).

Forma acuta grave

Sotto questa dicitura è ricondotta una forma clinica, segnalata agli inizi degli anni Novanta in Inghilterra e successivamente in altri paesi, Nord America incluso. La malattia è caratterizzata da decorso acuto ed esito talora fatale.

Gli animali, frequentemente adulti, presentano diarrea, febbre (di tipo bifasico e che può raggiungere i 41 °C), anoressia, più o meno marcata secrezione oculo-nasale, caduta della produzione lattea nelle bovine in lattazione.

Dal terzo giorno dell'infezione si manifesta una spiccata leucopenia. Gli animali che sopravvivono in condizioni di immunosoppressione sviluppano occasionalmente una zoppicatura cronica per infezioni batteriche secondarie a carico degli unghioni o dell'articolazione interdigitale interfalangea distale. Nei

focolai osservati si è registrata una morbilità intorno al 40% ed una mortalità del 10%. La comparsa di aborto rappresenta un evento non costante, così come la presenza di lesioni a carattere ulcerativo a carico delle mucose dell'apparato gastroenterico.

L'indagine eziologica ha portato a riconoscere l'intervento del BVDV-NCP tipo 2 ^(11; 13).

5. STRATEGIE DI CONTROLLO

A dimostrazione della crescente sensibilità nei confronti del BVDV, si pone come obiettivo l'adozione di programmi di controllo atti ad eradicare l'infezione. Attualmente detti programmi investono Paesi del Nord Europa (Svezia, Norvegia, Finlandia, Danimarca) e lo scenario internazionale lascia presagire una futura, naturale estensione di iniziative volte al controllo di questa virosi. In Italia sono in atto programmi di eradicazione, a carattere obbligatorio, limitatamente alle province autonome di Trento e Bolzano.

Le caratteristiche del BVDV, la patogenesi e l'epidemiologia dell'infezione connessa forniscono i principi informatori dell'azione di controllo di questa patologia. Detta azione si baserà essenzialmente sull'applicazione di misure di profilassi diretta, in particolare sull'individuazione ed eliminazione degli animali PI, e di profilassi indiretta, che prevede il ricorso alla vaccinazione. In linea di principio esistono i presupposti per un'azione integrata di entrambi gli approcci ⁽¹¹⁾.

5.1 Individuazione ed eliminazione degli animali PI

Detta strategia può riguardare gli allevamenti in generale o essere rivolta ad allevamenti previamente individuati come problema per presenza di animali PI. In questo secondo caso l'allevamento in causa può essere identificato mediante sierologia o ricerca del virus su sangue in toto o latte di massa.

In ambito di allevamenti problema, l'individuazione di animali PI può essere eseguita mediante diverse metodiche di laboratorio.

5.1.1 Ricerca Ag BVD su tutti gli animali mediante ELISA o PCR

Questa ricerca prevede un prelievo di sangue da mantenere in provette con anticoagulante (Sodio Citrato o EDTA) da effettuare su tutti gli animali all'interno di un allevamento.

Sui suddetti campioni ematici viene poi eseguito a scelta o una tecnica ELISA o una PCR, classica o Real Time, volte alla ricerca del virus agente di BVD-MD.

5.1.2 Ricerca Ag BVD su tutti gli animali mediante PCR su pool di sangue in toto

Questa ricerca prevede un prelievo di sangue da mantenere in provette con anticoagulante (Sodio Citrato o EDTA) da effettuare su tutti gli animali all'interno di un allevamento.

Dai suddetti prelievi vengono formati dei pool ottenuti unendo uguale quantità di sangue proveniente da un numero di campioni che può variare da 10 a 20.

Sui pool viene eseguita una PCR, classica o Real Time, volta alla ricerca del virus agente di BVD-MD ⁽¹⁷⁾.

Dai pool risultati positivi si procede in seguito all'identificazione in singolo dei capi viremici mediante tecnica ELISA o PCR, classica o Real Time.

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

Questa ricerca prevede un prelievo di sangue (in provette senza anticoagulante) da effettuare su tutti gli animali all'interno di un allevamento.

Sui sieri di suddetti prelievi viene effettuata un'indagine sierologica mediante tecnica ELISA rivolta alla ricerca degli anticorpi verso NS2-3, indicativi, se presenti, di attiva circolazione virale.

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

5.1.4 Ricerca Ag BVD su animali di età inferiore ai 24 mesi mediante ELISA o PCR

Questa ricerca prevede un prelievo di sangue da mantenere in provette con anticoagulante (Sodio Citrato o EDTA) da effettuare sugli animali di età inferiore ai 24 mesi all'interno di un allevamento.

Sui suddetti campioni di sangue viene eseguito a scelta o un test ELISA o una PCR, classica o Real Time, volti alla ricerca del virus agente di BVD.

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

Questa ricerca prevede un prelievo di sangue da mantenere in provette con anticoagulante (Sodio Citrato o EDTA) o una biopsia cutanea effettuata a livello di orecchio (ear notch), da eseguire sui vitelli neonati all'interno di un'azienda ⁽³⁸⁾.

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

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

5.2 Vaccinazione

Alla strategia che prevede un approccio di tipo eradicativo diretto, basato sulla ricerca, identificazione ed eliminazione degli animali persistentemente infetti, si affianca una strategia che può essere definita conservativa o semplicemente di contenimento dell'infezione, basata sulla vaccinazione. Gli obiettivi principali della vaccinazione sono innanzitutto il controllo degli effetti patologici del virus e, nel contempo, la riduzione della prevalenza dell'infezione. 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 vitelli immunotolleranti, ha posto le basi per connotare la vaccinazione come una prospettiva eradicativa. Tuttavia, al fine di collocare l'intervento vaccinale all'interno della prospettiva eradicativa in un allevamento con presenza di animali immunotolleranti, occorre ricordare che nessun vaccino è in grado di impedire che una bovina PI generi un vitello PI⁽¹¹⁾.

In accordo con quelli che sono i canoni tipici della profilassi immunizzante, la vaccinazione nei confronti del BVDV è destinata al controllo dei sintomi connotanti la malattia, 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 riassorbimenti).

L'efficacia della vaccinazione è di norma dimostrata attraverso la valutazione dell'entità della risposta immunitaria cellulo-mediata ed umorale e, soprattutto, attraverso 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, in relazione alla possibilità di attribuire alla vaccinazione una valenza eradicativa, ricopre un ruolo fondamentale la caratteristica della protezione fetale⁽²⁷⁾.

Al momento tutti i vaccini disponibili in Italia contengono BVDV tipo 1.

I dati epidemiologici che suggeriscono una possibile presenza anche di BVDV tipo 2 hanno portato a considerare importante l'attività dei vaccini contenenti BVDV tipo 1 nel controllo dell'infezione da BVDV tipo 2. I dati disponibili indicherebbero una certa protezione crociata, con esiti talora anche assai favorevoli nel controllo dei sintomi clinici correlati all'infezione da BVDV tipo 2 ⁽²⁵⁾.

In Italia sono disponibili vaccini monovalenti BVD vivi attenuati ed inattivati, e vaccini che combinano la valenza BVDV inattivata con altri antigeni virali respiratori quali Herpesvirus Bovino 1 (BoHV-1), Virus Respiratorio Sinciziale Bovino (VRSB), Virus Parainfluenza 3 (PI3), nonché un vaccino bivalente contenente lo stipite vivo-attenuato termosensibile con la valenza VRSB.

a) Vaccini vivi

L'allestimento di vaccini commerciali consegue all'adattamento e all'attenuazione di stipiti di BVDV-CP su colture cellulari di origine bovina e suina. L'attenuazione comporta modificazioni virali per cui nel bovino la replicazione appare ridotta, così come la virulenza e l'escrezione virale dopo vaccinazione.

Alla somministrazione di un vaccino vivo-attenuato consegue un'amplificazione antigenica, derivante dalla replicazione dello stipite vaccinale; ne consegue la stimolazione di una consistente risposta umorale ed una stimolazione a carico dei linfociti T CD4 + e citotossici CD8 + ⁽¹²⁾.

Gli stipiti vaccinali vivi attenuati inducono una consistente risposta anticorpale verso le proteine non strutturali (in particolare NS2-3). La durata dell'immunità indotta questi vaccini è circa di 12 mesi (ad eccezione di quelli termosensibili, per i quali la durata è ridotta a circa 6 mesi). Ciò comporta un'attiva immunizzazione dell'animale dopo una singola somministrazione di

vaccino, eseguita per via sottocutanea o intramuscolare. La comparsa della risposta immune è rapida e nel giro di 2-3 settimane nel siero dell'animale sono rilevabili anticorpi ad attività neutralizzante. La durata degli anticorpi nel siero si ritiene possa ricalcare quanto osservato in condizioni di infezione naturale. Seppure sia stato dimostrato un ampio spettro di protezione da parte degli stipiti utilizzati nell'allestimento di vaccini verso il BVDV, il grado di protezione indotto dal vaccino risulta comunque dipendente dal grado di omologia antigenica tra lo stipite vaccinale e quello infettante ^(3; 4; 5).

Nell'utilizzo dei vaccini vivi-attenuati non va trascurata la valutazione del profilo di innocuità. I vaccini tradizionali attenuati mediante passaggi seriali, infatti, presentano alcuni rischi relativi ad una certa attitudine abortigena ed alla possibilità di ricombinazione con virus selvaggio ⁽³⁴⁾.

Inoltre occorre porre l'accento sull'utilizzo di questi vaccini in animali immunotolleranti. Al riguardo è previsto che in caso di completa omologia tra stipite vaccinale e stipite causa dello stato di immunotolleranza possa manifestarsi la forma classica della Malattia delle Mucose (MD). In caso di parziale omologia antigenica non si hanno i tipici sintomi di 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 la comparsa di anticorpi verso le proteine non strutturali ma possono essere rilevati anticorpi neutralizzanti, che rimangono comunque a basso titolo (<1:8). A differenza dei vaccini vivi-attenuati tradizionali, quelli allestiti con stipiti termosensibili si sono dimostrati sicuri nell'utilizzo anche in animali immunotolleranti e soggetti gravidi ⁽²²⁾.

b) Vaccini spenti

I vaccini spenti o inattivati sono allestiti a partire da ceppi altamente replicativi a cui segue un'inattivazione mediante diverse metodiche. Numerose sono le sostanze che hanno trovato impiego allo scopo di inattivare la virulenza del BVDV: cloroformio, formalina, beta-propiolattone. Attualmente, in considerazione dell'ottimo rapporto esistente tra attività inattivante e conservazione dell'identità antigenica, le azeridine (etilenimine) trovano larga applicazione in sede di inattivazione di formulazioni vaccinali, verso il BVDV in particolare ⁽²⁶⁾.

Al fine di promuovere l'attività immunizzante, la formulazione vaccinale richiede l'aggiunta di una sostanza ad attività adiuvante, che favorisce il richiamo di cellule della risposta immunitaria nel punto di inoculo ed un'efficace esposizione degli antigeni immunizzanti. Le più recenti formulazioni vaccinali disponibili sul mercato prevedono la presenza di due diversi stipiti di BVDV, entrambi di tipo 1; il fatto si giustifica con il tentativo di allargare la protezione indotta dal vaccino nei confronti degli stipiti circolanti.

I vaccini inattivati necessitano di due somministrazioni (vaccinazione di base e di richiamo o *priming* e *booster*) eseguite a distanza di una o due settimane l'una dall'altra, per via intramuscolare o sottocutanea, al fine di conferire una piena protezione immunitaria. La risposta immunitaria è prevalentemente umorale. In funzione della qualità e del tipo di adiuvante utilizzato, i vaccini inattivati sono comunque in grado di stimolare l'immunità cellulo-mediata. Come già indicato per i vaccini vivi-attenuati, anche quelli spenti hanno dimostrato di saper evocare un elevato grado di attività neutralizzante nei confronti dei diversi stipiti di BVDV. I vaccini inattivati risentono dell'interferenza di anticorpi passivi, di origine colostrale.

La durata della protezione normalmente indotta è di alcuni mesi, anche se sono disponibili dati che attestano un'entità ed una durata dell'immunità che può arrivare a 12 mesi ⁽²¹⁾.

Dati controversi o da ritenersi non esaustivi sono stati prodotti in ordine alla protezione fetale da parte di questi vaccini. Nella gran parte dei casi si ritiene che la protezione sia di breve durata e non sufficiente a coprire l'intero arco della gravidanza ⁽²⁸⁾.

I vaccini inattivati contro BVDV sono pressoché privi di effetti indesiderati: non inducono infezione fetale e quindi possono essere usati con sicurezza nelle bovine gravide, non inducono immunodepressione, non possono indurre ricombinazioni geniche ed il processo di inattivazione consente di controllare la presenza di eventuali contaminazioni dei terreni di coltura.

All'impiego di vaccini spenti si devono tuttavia riconoscere alcuni svantaggi tra i quali il maggior costo dell'unità di prodotto rispetto al vaccino vivo-attenuato, l'onere di eseguire una doppia somministrazione vaccinale, sporadici casi di anafilassi e reazioni infiammatorie vicino al punto di inoculo ed infine un lieve calo nella produzione latte a seguito della somministrazione del prodotto.

La somministrazione di vaccini spenti in soggetti PI non induce malattia, ma può indurre una risposta anticorpale neutralizzante a basso titolo nel caso di una distanza antigenica rilevante tra lo stipite vaccinale ed il ceppo responsabile dello stato di immunotolleranza.

c) Vaccini innovativi

L'innovazione in campo vaccinale è, in linea generale, rivolta al miglioramento delle caratteristiche di sicurezza dei vaccini, senza che ciò vada a discapito dell'efficacia. A questo si aggiunge la possibilità di poter discriminare, in presenza di vaccinazione, reazioni immunitarie indotte da stati d'infezione e reazioni indotte da vaccinazione.

Per questi motivi gli orientamenti di fondo perseguiti in ambito di innovazioni vaccinali riguardano la manipolazione del genoma virale e lo studio di nuovi presidi adiuvanti.

Per quanto riguarda le applicazioni vaccinali inerenti al BVDV, sono disponibili esperienze relative a vaccinazione DNA-mediata, attraverso l'inoculazione di un plasmide codificante per la glicoproteina E2 del BVDV ⁽²³⁾.

L'espressione di E2 è stata ottenuta attraverso l'allestimento di virus ricombinanti, utilizzando come virus vettori un adenovirus o l'herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) ^(14; 32). Quest'ultimo caso rappresenta un tentativo di sviluppare un vaccino dotato di caratteristiche poliedriche: un vaccino bivalente immunizzante verso BoHV-1 e BVDV, pur attraverso l'inoculazione di un singolo virus vaccinale e provvisto di caratteristica marker, essendo deleti dei geni codificanti per la glicoproteina E di BoHV-1.

Di interesse, specialmente in ordine alle caratteristiche di innocuità, sono le applicazioni vaccinali che prevedono l'inoculazione di singole subunità virali (quale E2); in tal caso l'efficacia del vaccino risulta strettamente dipendente dalla componente adiuvante che dovrà essere costituita da immunostimulating complex (ISCOM), in grado di esporre al sistema immunitario l'antigene vaccinale in modo ottimale ^(22; 24).

Il computo del rapporto costo/beneficio da parte dell'industria e le restrizioni di carattere legale inerenti all'immissione nell'ambiente di microrganismi geneticamente modificati rappresentano un freno allo sviluppo

dei vaccini innovativi. Ne consegue che, al momento, le suddette applicazioni vaccinali non trovano riscontro in una pronta disponibilità commerciale.

5.3 Vaccinazione associata ad eliminazione dei soggetti PI

Nei paesi e nelle regioni connotati da un elevato numero di animali, da entità produttive a carattere intensivo e da un'alta prevalenza per BVD, può risultare molto utile predisporre piani di controllo dell'infezione dove oltre all'intervento vaccinale si associ un procedimento per la ricerca di soggetti PI (da eseguire come descritto nei precedenti paragrafi) ⁽¹⁹⁾.

A questo riguardo è opportuno ricordare le eventuali interferenze tra vaccinazione e ricerca dei soggetti PI.

Una delle procedure più utilizzate è quella di procedere ad uno screening sierologico per la ricerca degli anticorpi verso le proteine non strutturali NS2-3. Questo tipo di strategia è del tutto incompatibile con l'utilizzo di vaccini vivi-attenuati, poiché è dimostrato che questi inducono un'elevata risposta anticorpale verso NS2-3 ⁽¹⁰⁾, al contrario dei vaccini inattivati che invece non inducono una significativa risposta verso NS2-3 ^(20; 33).

6. ATTIVITÀ SPERIMENTALE

A causa del continuo riscontro in Italia di allevamenti bovini con alta sieroprevalenza per BVDV, negli corso degli ultimi anni è stata posta una sempre crescente attenzione allo studio di questa patologia, essendo noti gli effetti negativi che essa può apportare agli animali e conseguentemente all'azienda stessa.

La presenza di soggetti PI all'interno degli allevamenti è causa di continua escrezione virale e risulta pertanto di primaria importanza l'identificazione repentina di questi animali al fine di limitare al massimo la trasmissione del virus.

L'attività sperimentale oggetto della presente tesi è volta a valutare la diffusione di BVDV in allevamenti da latte ubicati in diverse zone d'Italia e inoltre è stata approfondita l'applicazione di diverse strategie e metodiche di laboratorio volte alla rilevazione di animali PI.

6.1 Diffusione del virus agente di BVD in allevamenti bovini da latte italiani

Durante il percorso del dottorato di ricerca sono state studiate la diffusione dell'infezione da BVDV in allevamenti di bovini da latte non vaccinati mediante uno screening iniziale in grado di valutare la sieroprevalenza verso il virus.

La ricerca di anticorpi anti BVDV è stata eseguita mediante sieroneutralizzazione o ELISA NS2-3 (BVD/MD P80-Antikörper, Pourquier®).

Per ogni allevamento è stato sottoposto ad indagine sierologica un campione rappresentativo di animali variabile da 5 a 30 in ragione della consistenza dei singoli allevamenti.

Sono stati esaminati un totale di 1861 allevamenti italiani, di cui 1143 nel nord, 469 nel centro e 249 nel sud.

Il totale degli animali presi in esame è stato di 14786, di cui 10824 nel nord, 2816 nel centro e 1146 nel sud.

Gli allevamenti risultati positivi alla ricerca degli anticorpi contro BVDV sono stati 1032 nel nord (90%), 406 nel centro (86%) e 204 nel sud (82%).

Gli animali risultati positivi alla ricerca degli anticorpi contro BVDV sono stati 8340 nel nord (77%), 2216 nel centro (79%) e 914 nel sud (80%) (vedi tabella 1).

Tabella 1

	NORD		CENTRO		SUD		TOTALE	
	esaminati	positivi	esaminati	positivi	esaminati	positivi	esaminati	positivi
allevamenti	1143	1032(90%)	469	406(86%)	249	204(82%)	1861	1642(88%)
animali	10824	8340(77%)	2816	2216(79%)	1146	914(80%)	14786	1470(76%)

Sui soggetti sieronegativi è stata indagata la presenza del virus al fine di addivenire all'identificazione dei soggetti PI all'interno degli allevamenti con sierologia indicativa di attiva circolazione virale.

Sono stati esaminati 244 allevamenti, di cui 212 (87%) risultati positivi per la ricerca di anticorpi contro BVDV. La prevalenza media degli animali immunotolleranti all'interno di questi ultimi allevamenti è stata di 1,9 e l'età media rilevata degli animali è stata di 11 mesi (vedi tabella 2).

Tabella 2

ALLEVAMENTI		PREVALENZA			ETA' MEDIA	
esaminati	positivi	Minima	media	massima		
244	212(87%)	0,3	1,9	7,4	11 mesi	
PREVALENZA MEDIA (%) DI ANIMALI PER CLASSI DI ETA'						
< 6 MESI		6-12 MESI		13-24 MESI		> 24 MESI
3,2		2,6		1,8		0,6

A seguito di questi risultati indicativi di attiva circolazione virale nella maggior parte degli allevamenti presi in esame si è deciso di approfondire lo studio riguardante le diverse tecniche diagnostiche volte all'individuazione dei soggetti PI.

6.2 Rilevazione di animali PI in allevamenti da latte italiani con sierologia indicativa di attiva circolazione virale

Le metodiche utilizzate sono state le seguenti: PCR classica, Real Time PCR, ELISA diretta ed indiretta. In particolare verranno esposte nel dettaglio le seguenti metodiche:

- 6.2.1 Ricerca Ag BVD mediante PCR su pool di sangue in toto
- 6.2.2 Indagine sierologica “a spot” per anticorpi verso NS2-3 su parte dei capi presenti in azienda e ricerca Ag BVD su soggetti sieronegativi mediante ELISA
- 6.2.3 Ricerca Ag BVD mediante PCR su biopsia cutanea (ear notch PCR) su vitelli neonati

6.2.1 Ricerca Ag BVD mediante PCR su pool di sangue in toto

Al fine di valutare la fattibilità della strategia di controllo ed eradicazione dell'infezione da BVDV, durante il corso di dottorato di ricerca sono stati esaminati tre allevamenti di bovini da latte italiani di razza Frisona con sierologia indicativa di attiva circolazione virale.

Due allevamenti sono localizzati nel Nord Italia, uno in provincia di Parma ed uno in provincia di Cuneo, il terzo è ubicato a Roma.

Al fine di rilevare gli animali PI è stata messa a punto una metodica PCR classica da effettuare su campioni di sangue in toto.

La metodica PCR, con alcune modifiche, è essenzialmente quella precedentemente descritta da Gilbert e collaboratori ⁽¹⁷⁾. La procedura prevede l'utilizzo di primers che permettono l'amplificazione di una porzione del gene NS5B di BVDV.

Per eseguire questa metodica di PCR classica è stato utilizzato sangue in toto addizionato di Sodio Citrato o di EDTA; è consigliabile evitare l'impiego di litio eparina in quanto tossico per i globuli rossi. Il sangue è stato fatto pervenire al laboratorio entro massimo 12 ore dal prelievo.

Appena pervenuti al laboratorio, dai campioni sono stati allestiti dei pool, ottenuti unendo uguali quantità (100 µl) di sangue proveniente da un numero di campioni singoli variabile da 10 a 20.

Sui pool di sangue sono state poi eseguite le seguenti fasi:

- a) Estrazione dell'RNA
- b) Retrotrascrizione
- c) PCR
- d) PCR Multiplex

a) Estrazione dell'RNA

Questa fase risulta indispensabile poiché ai fini dell'esecuzione della metodica PCR è necessaria la presenza di un c-DNA.

- Prelevare 100 μ l di sangue da ogni pool e trasferirlo in una provetta
- Sospendere ogni pool in 1 ml di triazolo ed immediatamente agitare mediante vortex
- Porre a temperatura ambiente per 10 minuti
- Aggiungere 200 μ l di cloroformio ed agitare
- Lasciare a temperatura ambiente per 5-10 minuti
- Centrifugare a 14000 rpm per 10 minuti
- Prelevare il sovrnatante (circa 600 μ l) senza intaccare l'interfaccia
- Trasferire in una nuova provetta e diluire 1:1 con isopropanolo
- Lasciare a temperatura ambiente per 5 minuti
- Centrifugare a 14000 rpm per 10 minuti
- Eliminare il sovrnatante
- Lavare il pellet (senza risospenderlo) con 500 μ l di etanolo in acqua trattata con dietilpirocarbonato (DEPC- H₂O)
- Centrifugare per 1-2 minuti a 14000 rpm
- Eliminare il sovrnatante
- Centrifugare a 14000 rpm per eliminare le gocce adese alla provetta
- Eliminare il sovrnatante
- Risospendere in 50-60 μ l di DEPC- H₂O

b) Retrotrascrizione

Questa fase è necessaria per la formazione del c-DNA.

2 (due) μl di RNA estratto sono stati addizionati al volume finale di reazione (50 μl totali) contenente 2.5 mM MgCl_2 , PCR Buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.4], 50 mM KCl), 0.2 mM desossinucleotidi trifosfato (dNTPs, Invitrogen), 50 U di Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MuLV, Invitrogen) e 1.5 U di *Taq* DNA polimerasi (Invitrogen). La reazione di retrotrascrizione è stata effettuata alla temperatura di 37 °C per 30 minuti.

c) PCR

Sul retrotrascritto è stata quindi eseguita una prima PCR.

Due μl di c-DNA sono stati aggiunti al mix di reazione (volume finale 50 μl), contenente 2.5 mM MgCl_2 , PCR Buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.4], 50 mM KCl), 0.2 mM desossinucleotidi trifosfato (dNTPs, Invitrogen), 0.5 μM di primers (5'AAGATCCACCCTTATGA(A/G)GC3' sense A, derivato dal nucleotide 10385 al 10404 e 5'AAGAAGCCATCATC(A/C)CCACA3' antisense A, derivato dal nucleotide 11528 all'11547), 10 U di inibitori dell'RNAasi (Rnase OUT - Invitrogen) e 1.5 U di *Taq* DNA polimerasi (Invitrogen).

Il protocollo delle diverse fasi della PCR è il seguente:

- Fase di denaturazione alla temperatura di 94 °C per 5 minuti (a seguito della quale è stata addizionata la *Taq* DNA polimerasi)
- Trenta cicli di cui:
 - 30 secondi a 94°C (denaturazione)
 - 30 secondi a 50 °C (annealing)
 - 30 secondi a 72 °C (estensione)
- Fase di estensione alla temperatura di 72 °C per 15 minuti

d) PCR Multiplex

Sull'amplicon prodotto mediante la prima PCR è stata effettuata una PCR multiplex, per la rilevazione di BVDV tipo I e BVDV tipo II.

2 (due) µl dell'amplicon sono stati aggiunti al mix di reazione (volume finale 50 µl), contenente 2.5 mM MgCl₂, PCR Buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.4], 50 mM KCl), 0.2 mM desossinucleotidi trifosfato (dNTPs, Invitrogen), 0.5 µM di primers (5' TGGAGATCTTTCACACAATAGC 3' BVDV-1 specifico, derivato dal nucleotide 10758 al 10779, 5' GGGAACCTAAGAACTAAATC 3' BVDV-2 specifico, derivato dal nucleotide 10514 al 10533 e 5' GCTGTTTCACCCAGTT(A/G)TACAT 3' aspecifico, derivato dal nucleotide 11096 all'11117) e 1.5 U di *Taq* DNA polimerasi (Invitrogen).

Il protocollo della reazione di PCR Multiplex è il seguente:

- Fase di denaturazione alla temperatura di 94 °C per 5 minuti (a seguito della quale è stata addizionata la *Taq* DNA polimerasi)
- Trenta cicli di cui:
 - 30 secondi a 94°C (denaturazione)
 - 30 secondi a 50 °C (annealing)
 - 30 secondi a 72 °C (estensione)
- Fase di estensione alla temperatura di 72 °C per 15 minuti

Gli amplificati sono stati esaminati mediante tecnica di elettroforesi su gel di agarosio al 2% previa fissazione con etidio bromuro.

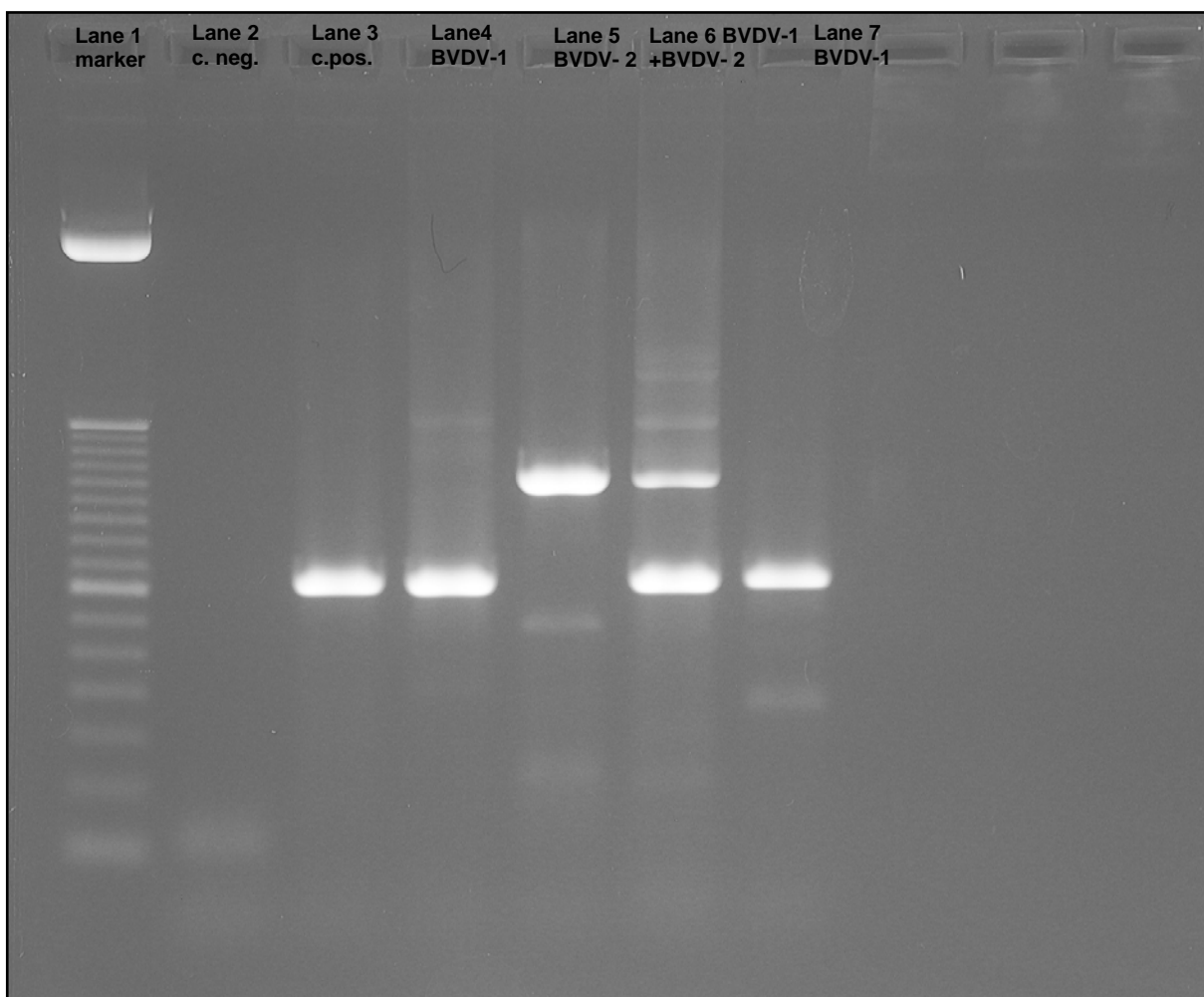


Fig. 6 Esempio di elettroforesi su gel di agarosio al 2% per la visualizzazione della PCR.

I pool di sangue risultati positivi in PCR sono stati esaminati in una seconda fase tramite ricerca diretta del virus mediante kit ELISA antigene (ELISA BVD/MD Antigen Mix, Pourquier®) o PCR su ogni singolo campione presente nel pool.

Allevamento 1

Il primo allevamento, situato in provincia di Parma, è formato da 191 bovine da latte di razza Frisona. Precedentemente questo allevamento era stato vaccinato nei confronti di BVDV mediante l'utilizzo semestrale di un vaccino inattivato a partire dai 4 mesi di età degli animali.

Essendo praticata una vaccinazione nei confronti di BVDV si è provveduto inizialmente ad un campionamento su tutte le manze e le vacche presenti in allevamento. I campioni sono stati testati per la ricerca di anticorpi verso le proteine non strutturali NS2-3, al fine di dimostrare l'attiva circolazione virale. Il 67% degli animali sottoposti a prelievo è risultato positivo alla ricerca di anticorpi anti NS2-3.

Tutti i 191 animali sono stati sottoposti alla ricerca del virus agente di BVD al fine di identificare i soggetti PI dell'allevamento.

Il sangue è stato prelevato e conservato alla temperatura di refrigerazione (+ 4 °C) in provette contenenti Sodio Citrato e fatto pervenire al laboratorio nell'arco di tre ore.

Si è subito provveduto ad allestire diversi pool, in questo caso dieci pool formati da 19 campioni ciascuno ed un pool formato da 20 campioni. Su tali pool è stata eseguita la PCR precedentemente descritta ed un pool è risultato positivo per la ricerca di BVDV-1 (vedi tabella 3).

Sui 19 campioni presenti in questo pool è stata eseguita, individualmente, una PCR. I risultati hanno evidenziato la presenza di un animale viremico; si trattava di un "free martin" di circa 15 mesi di età, tenuto in allevamento per

l'ingrasso. L'animale, risultato positivo alla ricerca di BVDV-1 ancora dopo 22 giorni è stato avviato alla macellazione.

Nessun animale è risultato positivo alla ricerca del virus BVDV-2.

Tabella 3

Ricerca antigene BVD - PCR (9 pool da 19, 1 pool da 20)				
Gruppo	N°.	N° POS.	% POS.	N° NEG.
Vacche	136	0	0,0	136
Manze 12-24 mesi	26	1	3,8	25
Manze e vitelle <12 mesi	29	0	0,0	29
Totale	191	1	0,5	190

Allevamento 2

Il secondo allevamento, situato in provincia di Cuneo, è formato da 140 bovine da latte di razza Frisona. Precedentemente questo allevamento era stato vaccinato nei confronti di BVDV mediante l'inoculazione semestrale di un vaccino inattivato a partire dai 4 mesi di età degli animali.

Essendo praticata una vaccinazione nei confronti di BVDV si è provveduto inizialmente ad un campionamento su tutte le manze e le vacche presenti in allevamento. I campioni sono stati testati per la ricerca di anticorpi verso le proteine non strutturali NS2-3. L'89% degli animali sottoposti a prelievo è risultato positivo alla ricerca di anticorpi NS2-3, anche in questo caso testimoniando uno stato di attiva circolazione virale.

Tutti i 140 animali sono stati sottoposti alla ricerca del virus agente di BVD al fine di identificare i soggetti PI dell'allevamento.

Il sangue è stato prelevato e conservato alla temperatura di refrigerazione (+ 4 °C) in provette contenenti Sodio Citrato e fatto pervenire al laboratorio nell'arco di tre ore.

Si è subito provveduto ad allestire diversi pool, in questo caso dieci pool formati da 14 campioni ciascuno.

Su tali pool è stata eseguita la metodica PCR precedentemente descritta; due pool sono risultati positivi per la ricerca di BVDV-1 (vedi tabella 4).

Tabella 4

Ricerca antigene BVD - PCR (10 pool da 14)				
Gruppo	N° POOL	N° POOL POSITIVI	% POOL POSITIVI	N° POOL NEGATIVI
Totale (140 animali)	10	2	20	8

Dopo due settimane dagli stessi 28 animali è stato riprelevato un campione di sangue su cui è stata eseguita la ricerca degli anticorpi anti NS2-3 e successivamente la ricerca del virus con kit ELISA antigene (ELISA BVD/MD Antigen Mix, Pourquier®). Tutti gli animali sono risultati nuovamente negativi alla ricerca virale e positivi agli anticorpi anti NS2-3, evidenziando perciò che la presenza di BVDV rilevato al primo controllo con PCR era legata ad una viremia di tipo transitorio in uno o più animali dei pool testati e non alla presenza di animali PI (vedi tabella 5).

Nessun animale è risultato positivo alla ricerca di BVDV-2.

Tabella 5

Ricerca BVD Antigene (Elisa) individuale sui 28 animali dei pool positivi				
Gruppo	N°	N° POS.	% POS.	N° NEG.
Animali dei pool positivi	28	0	0.0	28
Totale	28	0	0.0	28
Ricerca anticorpi NS2-3 (Elisa) individuale sui 28 animali dei pool positivi				
Gruppo	N°	N° POS. e DUBBI	% POS.	N° NEG.
Animali dei pool positivi	28	28	100.0	0
Totale	28	28	100.0	0

Allevamento 3

Il terzo allevamento, situato a Roma, è formato da 360 capi da latte di razza Frisona.

Questo allevamento è stato precedentemente sottoposto a vaccinazione nei confronti di BVD mediante l'inoculazione di un vaccino inattivato; pertanto si è provveduto ad un campionamento parziale su un numero limitato di manze e vacche. I campioni sono stati testati per la ricerca di anticorpi verso le proteine non strutturali NS2-3 e di anticorpi sieroneutralizzanti, al fine di valutare tra le altre cose anche l'efficacia vaccinale. Il 50% degli animali sottoposti a prelievo sono risultati positivi sia agli anticorpi NS2-3 che agli anticorpi sieroneutralizzanti, rilevando pertanto un'attiva circolazione virale.

Tutti i 360 animali sono stati testati per la ricerca di PI all'interno dell'allevamento.

Il sangue è stato prelevato e conservato a temperatura di refrigerazione (+ 4 °C) in provette contenenti Sodio Citrato e fatto pervenire al laboratorio nell'arco di sei ore.

Si è subito provveduto ad allestire diversi pool, in questo caso venti pool formati da 18 campioni ciascuno.

Su tali è stata eseguita la metodica PCR precedentemente descritta e sei pool sono risultati positivi per la ricerca di BVDV-1 (vedi tabella 6).

Tabella 6

	Ricerca antigene BVD – PCR (20 pool da 18)			
Gruppo	N° POOL	N° POOL POSITIVI	% POOL POSITIVI	N° POOL NEGATIVI
Totale (360 animali)	20	6	30	14

I 108 animali appartenenti ai sei pool positivi alla PCR sono stati sottoposti individualmente alla ricerca di BVDV-1 mediante kit ELISA

Antigene (ELISA BVD/MD Antigen Mix, Pourquoier®) che ha evidenziato la presenza di 17 animali positivi (vedi tabella 7).

Tabella 7

Pool positivi	Animali positivi testati singolarmente mediante ELISA antigene
1	1
2	4
3	4
4	0
5	1
6	7

Solo un pool (il numero 4), positivo in PCR, è successivamente risultato negativo dopo accertamento mediante metodica ELISA antigene.

I 20 campioni componenti il pool numero 4 sono stati nuovamente esaminati in singolo mediante metodica PCR per stabilire se la positività del pool fosse dovuta all'effettiva presenza di uno o più animali con attiva circolazione virale o fosse stata causata da un problema di contaminazione del procedimento.

I risultati di questa ulteriore prova hanno portato all'identificazione di un animale positivo per BVDV-1.

Questo risultato è stato ricondotto alla maggiore sensibilità della PCR rispetto alla metodica ELISA ⁽¹⁹⁾.

Pertanto, al termine di tutti gli esami di laboratorio sono stati individuati 18 animali positivi per BVDV-1.

Il sangue di tutti questi animali è stato riprelevato dopo 22 giorni e su di esso è stata eseguita una PCR individuale.

Tutti i campioni sono nuovamente risultati positivi per la ricerca di BVDV-1, confermando così che tali soggetti erano viremici persistenti e pertanto sono stati allontanati dall'allevamento. Nessun animale è risultato positivo alla ricerca di BVDV-2.

Concludendo, grazie alla metodica PCR precedentemente descritta su pool di sangue in toto per la ricerca di BVDV-1 e BVDV-2 sono stati individuati su un totale di 691 animali esaminati, 19 animali PI e 2 animali con viremia transitoria (vedi tabella 8).

In nessuno degli allevamenti presi in esame è stato individuato BVDV-2.

Tabella 8

	ANIMALI TESTATI	POOL +	ANIMALI +	PI	% PI	VIREMICI TRANSITORI
	191	1	1	1	0,52	0
	140	2	2	0	0	2
	360	6	18	18	5	0
TOTALE	691	9	21	19	2,74	2

6.2.2 Indagine sierologica “a spot” per anticorpi verso NS2-3 su parte dei capi presenti in azienda e ricerca Ag BVD su soggetti sieronegativi mediante ELISA

Questa indagine è stata eseguita “a spot” su parte dei capi presenti in azienda ed effettuata con le seguenti modalità:

- prelievo di sangue dagli animali interessati (provette senza anticoagulante)
- consegna del sangue entro 12 ore dal prelievo al laboratorio
- centrifugazione del sangue per 5 minuti a 2500 rpm al fine di ottenerne il siero
- ricerca anticorpi anti NS2-3 su siero di sangue (mediante kit ELISA BVD/MD P80-Antikörper, Pourquier®)
- sui soggetti risultati sieronegativi alla ricerca degli anticorpi anti NS2-3, ricerca Ag BVD su sangue in toto (mediante kit ELISA BVD/MD Antigen Mix, Pourquier®)

Gli allevamenti di bovine da latte presi in esame sono stati in totale 84, precisamente 69 nel nord, 3 nel centro e 12 nel sud Italia.

Gli animali esaminati per questa indagine sono stati in totale 780, precisamente 602 nel Nord, 33 nel Centro e 145 nel Sud Italia. Su tutti gli animali è stato eseguito un prelievo di sangue mantenuto in provette senza anticoagulante e sul siero in seguito ottenuto mediante centrifugazione sono stati eseguiti gli esami di laboratorio (vedi tabella 9).

Tabella 9

ALLEVAMENTI ESAMINATI	NORD	CENTRO	SUD
84	69	3	12
ANIMALI ESAMINATI	NORD	CENTRO	SUD
780	602	33	145

I campioni risultati sieronegativi alla ricerca di anticorpi anti NS2-3 sono stati 239 (vedi tabella 10).

Tabella 10

CAMPIONI ESAMINATI	NEGATIVI P80-120	DUBBI P80-120	POSITIVI P80-120
780	239 (30.64%)	14 (1.8%)	527 (67.56%)

Su questi campioni è stata eseguita la ricerca Ag BVD, risultata positiva per 45 campioni, dubbia per 4 e negativa per i rimanenti 190 (vedi tabella 11).

Tabella 11

SIERONEGATIVI P80-120	239
POSITIVI RICERCA Ag BVD	45 (18.8%)
DUBBI RICERCA Ag BVD	4 (1.7%)
NEGATIVI RICERCA Ag BVD	190 (79.5%)

Dai 4 soggetti risultati dubbi alla ricerca Ag BVD è stato riprelevato un campione di sangue dopo 15-20 giorni per eseguire una seconda volta la ricerca del virus. Tre animali sono risultati negativi, uno solo positivo alla ricerca di Ag BVD. Tutti gli animali risultati positivi alla ricerca del virus sono stati riesaminati mediante kit ELISA Antigene (ELISA BVD/MD Antigen Mix, Pourquier®) dopo due settimane e sono nuovamente risultati positivi.

In conclusione, mediante l'utilizzo di questa tecnica basata sulla ricerca di Ag BVD nel sangue in toto di soggetti sieronegativi per la ricerca di anticorpi anti NS2-3, sono stati rilevati 46 animali PI su un totale di 239 animali risultati sieronegativi.

Da sottolineare la presenza di due animali risultati positivi alla ricerca di anticorpi anti NS2-3 e positivi anche per la ricerca di Ag BVD.

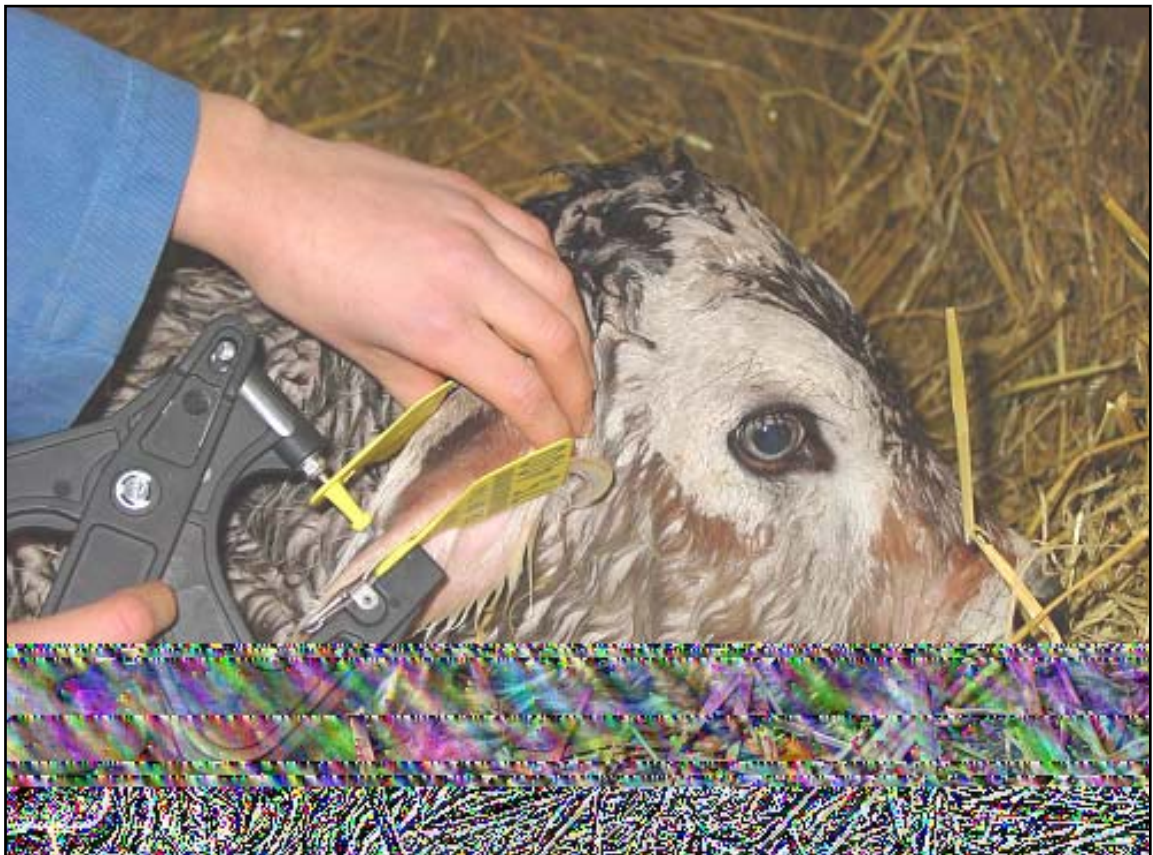
Questi animali sono stati ritestati dopo due settimane e sono risultati negativi alla ricerca di Ag BVD nel sangue, rivelando così una viremia transitoria.

6.2.3 Ricerca Ag BVD mediante PCR su biopsia cutanea (ear notch PCR) su vitelli neonati

La permanenza presso l'Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin dell'Università di Medicina Veterinaria di Monaco di Baviera (aprile-giugno 2007) ha portato a valutare un'ulteriore metodica per la determinazione di animali PI.

Questa tecnica consiste in una Real Time PCR eseguita su biopsie di tessuto auricolare prelevato da vitelli neonati (ear notches).

A Monaco di Baviera già da tre anni è in atto un piano volontario supportato da fondi pubblici che utilizza la metodica di seguito illustrata per l'identificazione dei vitelli neonati portatori di BVDV a livello tissutale.





Nei primi 5 giorni di vita del vitello viene applicata all'orecchio una targa auricolare che permette di raccogliere una piccola porzione di tessuto della sezione di 2-3 mm, avendo al suo interno un dispositivo per carotaggio simile a quello utilizzato durante il corso di una normale biopsia.

Ogni settimana arrivano al laboratorio dell'Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin una media di 100-150 campioni di tessuto, che vengono posti singolarmente entro 2 ore dalla consegna all'interno di provette contenenti una sospensione di 350 μ l totali di β -mercaptoetanololo, la cui funzione è quella di ridurre i ponti disolfuro responsabili del mantenimento della struttura molecolare, associato ad una soluzione tampone e ad una pallina di acciaio, utile per disgregare meccanicamente la porzione di tessuto auricolare durante le fasi di agitazione e di centrifugazione (vedi Fig. 6).

Le provette vengono sistemate in supporti chiusi da 96 posti (vedi Fig. 7), che vengono posizionati all'interno di un agitatore (ryboliser) per un minuto e mezzo, dopodichè vengono posti in centrifuga per tre minuti a 2000 rpm.

In seguito si procede alla formazione di pool, costituiti al massimo da 12 campioni ciascuno. Per ogni singolo soggetto sono utilizzati 50 μ l di campione precedentemente trattato, che verranno messi a loro volta in una provetta da 2 ml

contenente 500 μl totali di una soluzione formata da 490 μl di acqua demineralizzata e 10 μl di proteinasi K (la cui funzione è quella di digerire le proteine e che pertanto partecipa alla disgregazione del tessuto).

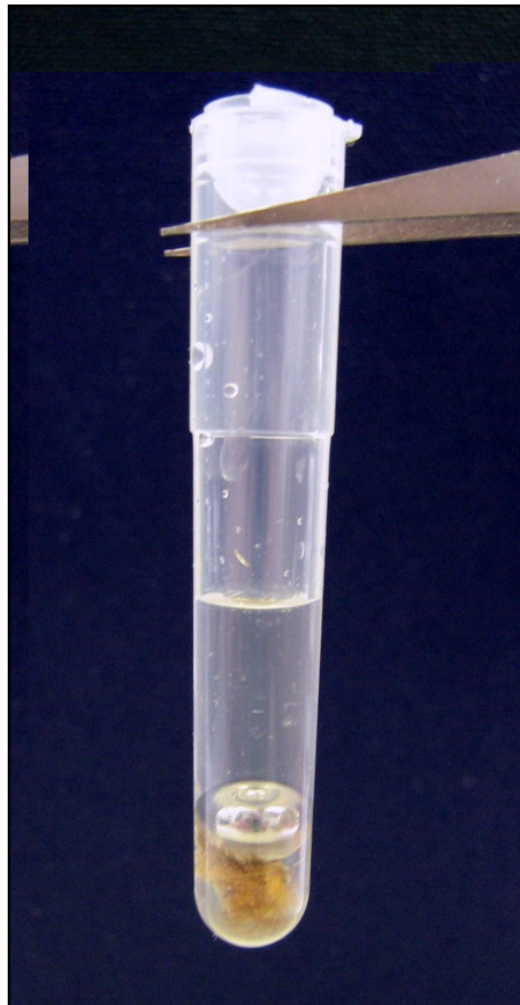


Fig. 6 Provetta contenente porzione di tessuto, β -mercaptoetanolo, soluzione tampone e pallina di acciaio.

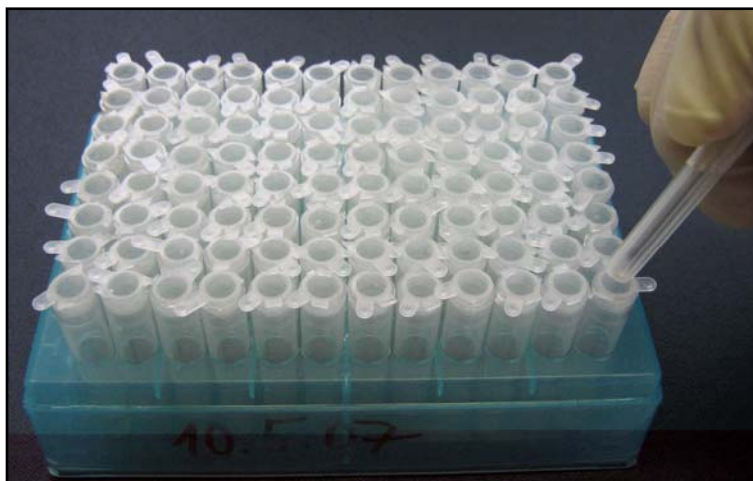


Fig. 7 Supporto di provette contenente 96 campioni di tessuto auricolare (8 pool da 12 campioni l'uno)

Il volume finale all'interno di ogni singola provetta risulta pertanto di 1100 μ l (500 μ l di acqua demineralizzata e proteinasi K piú 600 μ l totali dei singoli campioni di tessuto auricolare).

Dai pool contenuti nelle singole provette viene quindi estratto l'RNA mediante kit commerciale (RNeasy® Fibrous Tissue Handbook, Qiagen) (vedi Fig.8).

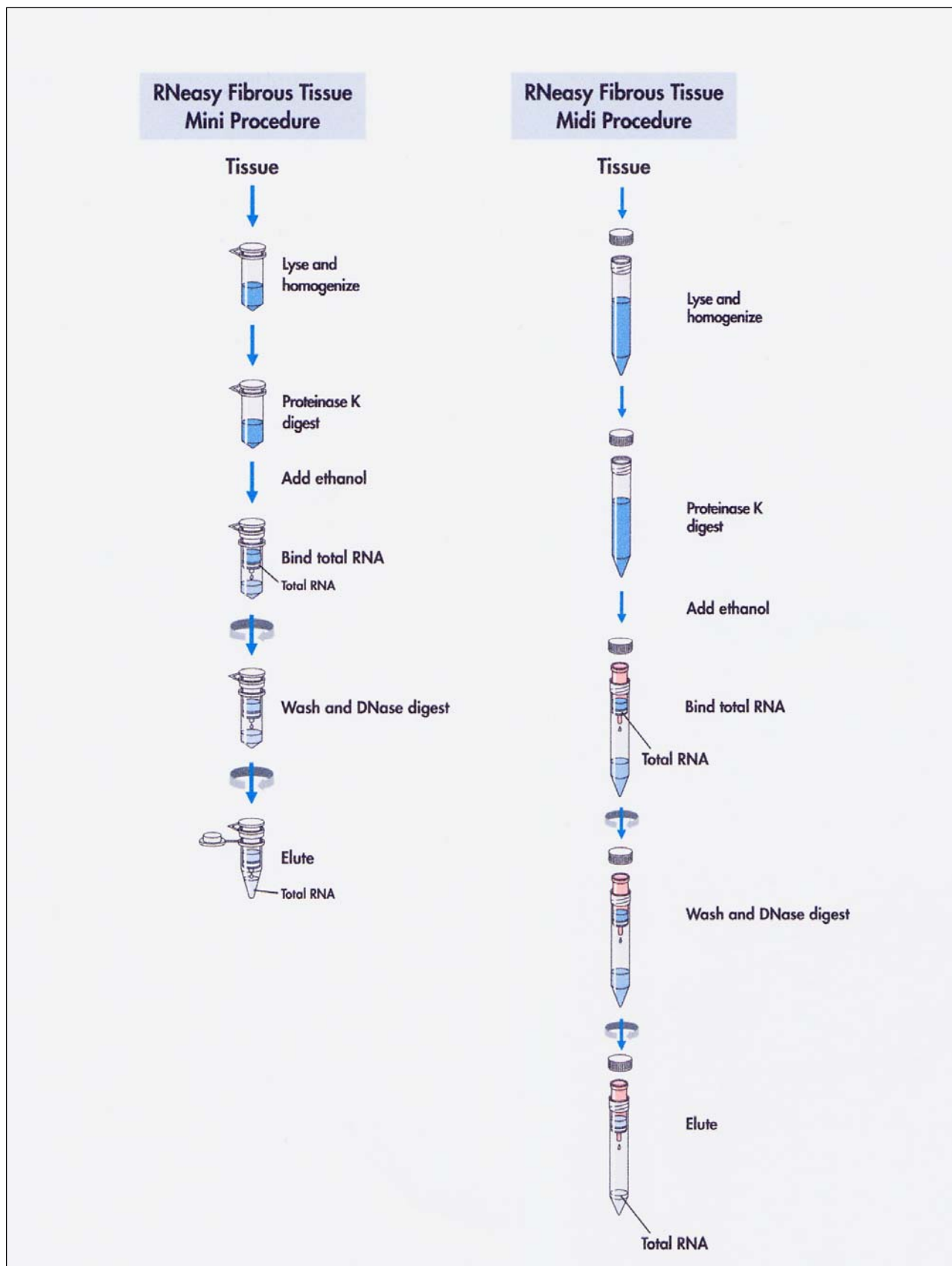


Fig. 8 Schemi di isolamento dell'RNA mediante due differenti kit Qiagen®: il primo per la purificazione di porzioni di tessuto del peso massimo di 30 mg, il secondo per la purificazione di porzioni di tessuto fino a 250 mg di peso (RNeasy Fibrous Tissue Handbook, 2006, pag.9).

ESTRAZIONE RNA

Questa fase risulta indispensabile poiché ai fini dell'esecuzione della metodica PCR è necessaria la presenza di un c-DNA.

- Aggiungere ad ogni provetta precedentemente allestita come descritto 550 μ l di etanolo (metà del volume totale)
- Mescolare la soluzione pipettando
- Trasferire 700 μ l di questa soluzione all'interno di nuove provette con filtro, senza gettare quelle iniziali
- Centrifugare a 10000 rpm per 20 secondi le provette nuove con filtro
- Eliminare il sovrantante
- Trasferire altri 700 μ l della soluzione iniziale costituita dai singoli campioni più l'etanolo nelle nuove provette con il filtro
- Centrifugare per la seconda volta a 10000 rpm per 20 secondi le provette nuove con filtro
- Aggiungere 350 μ l della prima soluzione di lavaggio contenuta nel kit (primo lavaggio)
- Centrifugare a 10000 rpm per 20 secondi le provette con filtro
- Eliminare il sovrantante
- Aggiungere 80 μ l di DNA precedentemente preparato (70 μ l di soluzione tampone contenuta nel kit più 10 μ l di DNAs)
- Incubare 15 minuti a temperatura ambiente
- Aggiungere 350 μ l della seconda soluzione di lavaggio contenuta nel kit (secondo lavaggio)
- Centrifugare a 10000 rpm per 20 secondi le provette con filtro
- Eliminare il sovrantante
- Cambiare le provette ed utilizzarne di nuove con filtro

- Aggiungere 700 µl della seconda soluzione di lavaggio contenuta nel kit (terzo lavaggio)
- Centrifugare a 10000 rpm per 20 secondi le nuove provette con filtro
- Eliminare il sovrnatante
- Aggiungere 200 µl della seconda soluzione di lavaggio contenuta nel kit (quarto lavaggio)
- Centrifugare a 14000 rpm per un minuto
- Eliminare il sovrnatante
- Sostituire la parte sottostante della provetta con un'altra provetta (es. eppendorf), mantenendo però la parte con il filtro ed aggiungere 50 µl di Elution Buffer (soluzione a base di acqua demineralizzata)
- Centrifugare a 10000 rpm per 20 secondi
- Eliminare la parte della provetta con il filtro (l'RNA in questa fase dell'isolamento è in sospensione all'interno dell'Elution Buffer)
- Chiudere la provetta e mantenere a temperatura di refrigerazione

Una volta terminata questa fase viene preparato il mix di reazione (volume finale 20 µl) ed in seguito le provette vengono posizionate all'interno della Real Time PCR, precedentemente settata ed impostata con il valore di riferimento al di sotto del quale i campioni risultano essere positivi (Threshold Cycle o Ct) fissato a 42 e numero di cicli totali pari a 42 (vedi tabelle 12a e 12b).

Se al termine della Real Time PCR un pool risulta positivo per BVDV, ogni campione appartenente al pool viene immediatamente ritestato in singolo.

Vengono messi all'interno di una provetta del volume totale di 1.5 ml, 50 μ l del campione e 240 μ l di acqua demineralizzata piú 10 μ l di proteinasi K (il volume totale è di 300 μ l).

Da ogni campione viene estratto l'RNA, seguendo la metodica precedentemente esposta ed in seguito viene eseguita singolarmente la Real Time PCR.

Tabella 12 a

Mix di reazione finale 20 μ l mix di reazione e 5 μ l RNA isolato	
Mix di reazione	
RT-PCR Master Mix	12,5 μ l
RNase-free water	5,25 μ l
RT-Mix	0,25 μ l
Primer	2 μ l primer / sonda mix

Tabella 12 b

	Primer	Sequenza dei primer 5' - 3'
Forward primer	BVD190-F	GRA GTC GTC ART GGT TCG AC
Reverse primer	ML121 /V326	TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC
Probe	TQ-Pesti	FAM-TGC YAY GTG GAC GAG GGC ATG C- BHQ1

RISULTATI

Nel periodo aprile-giugno 2007 sono stati esaminati 1149 campioni di tessuto auricolare proveniente da vitelli di età inferiore ai 5 giorni di vita. Per testarli l'analisi è stata condotta raggruppando i campioni in 94 pool e successivamente eseguendo 101 test singoli.

La Real Time PCR ha permesso l'identificazione di 19 animali con un valore di Ct nettamente inferiore a 42. Tali soggetti, ritestati dopo due settimane, sono nuovamente risultati positivi, confermando perciò la presenza di un'infezione persistente. Una volta identificati, i soggetti PI sono stati allontanati dall'azienda di appartenenza (vedi tabella 13).

Tabella 13

ANIMALI TESTATI	PI	% PI
1149	19	1,65

Dall'inizio dello studio effettuato presso l'Institut für Medizinische Microbiologie Infektions- und Seuchenmedizin, nell'intero triennio, sono stati esaminati un totale di 10612 campioni.

Per testarli si è ritenuto opportuno creare 901 pool, 379 subpool e successivamente eseguire 1187 test singoli.

Dei 1187 campioni testati in singolo 788 sono risultati negativi e 399 positivi.

Dei 399 campioni risultati positivi, 197 avevano un valore di Ct nettamente inferiore a 42; questi animali sono stati ritestati dopo due settimane al fine di ottenere la conferma di una viremia persistente e sono risultati nuovamente positivi (Ct inferiore a 42); per questa ragione sono stati allontanati dalle aziende di appartenenza.

Gli altri 202 animali risultati positivi si sono confermati invece viremici transitori, negativizzandosi al secondo prelievo di sangue, due settimane più tardi (vedi tabella 14).

La metodica di Real Time PCR ha presentato una sensibilità del 100%, ed una specificità del 96,5%.

Tabella 14

CAMPIONI ESAMINATI	ANIMALI PI	%	VIREMICI TRANSITORI	%	PERIODO
10612	197	1,86	202	1,99	3 anni

7. CONCLUSIONI

Il virus agente della Diarrea Virale Bovina-Malattia delle Mucose (BVDV) è largamente diffuso negli allevamenti di bovine da latte italiani. I dati disponibili confermano l'elevata circolazione virale, con una sieroprevalenza dell'87% tra gli allevamenti presi in esame come già esposto nella prima parte della trattazione.

Il livello di sieropositività risulta maggiormente influenzato dalla presenza di soggetti PI all'interno dell'allevamento.

Risulta pertanto di primaria importanza identificare e procedere all'eliminazione tempestiva di questi soggetti, essendo nota la continua escrezione virale talora associata a totale mancanza di sintomi clinici. Detta assenza sintomatologica favorisce l'attiva circolazione del virus e la trasmissione dell'infezione.

Poiché nel caso dei bovini da latte attualmente la carriera dell'animale è molto breve (nell'area padana in media si considerano 2,4 lattazioni pro capite) ed il numero dei soggetti per azienda tende sempre più ad aumentare, è bene limitare la ricerca dei PI ai giovani animali (al di sotto dei 2 anni di vita). Risulta quindi preferibile operare a livello generazionale e non su tutto l'effettivo dell'allevamento, fatto che comporterebbe un aggravio di costi, non sempre sostenibili.

Quanto precede non vale nel caso dell'allevamento linea vacca-vitello (razze Chianina, Romagnola, Marchigiana ecc...) in cui gli animali hanno una carriera riproduttiva che si attesta intorno ai 10-12 anni. In tal caso la ricerca dei soggetti PI deve essere eseguita su tutto l'effettivo e non solo limitatamente ai soggetti al di sotto dei 2 anni di vita.

Considerando il rapporto costo-beneficio delle diverse metodiche esaminate e volte all'identificazione dei soggetti PI, certamente la PCR o la Real Time PCR garantiscono i risultati migliori in termini di affidabilità e sensibilità.

Dal punto di vista della fattibilità delle differenti strategie, l'approccio che prevede la ricerca degli animali PI mediante PCR in pool di sangue seguita da PCR individuale sui soggetti appartenenti al/ai pool positivi, si è dimostrato pratico, economico e di semplice esecuzione.

La ear notch PCR è sicuramente la metodica più sensibile, tuttavia risulta essere alquanto costosa applicata in campo, se ne configura piuttosto l'applicazione nel contesto di attività di ricerca o in piani di sovvenzioni qual è il caso della Baviera.

Posto che le strategie di controllo proposte per gli allevamenti da latte riguardano l'individuazione degli animali PI limitatamente alla rimonta, la ricerca dell'Ag BVD mediante tecnica ELISA sui soggetti risultati sieronegativi per la ricerca di anticorpi anti NS2-3 non risulta idonea in quanto è ritenuto subire l'interferenza degli anticorpi materni.

Ciò ne pregiudica l'applicazione in animali di età inferiori a 6 mesi. Inoltre i dati disponibili indicano la necessità di procedere all'esecuzione del test ELISA antigene entro 12 / 24 ore dal prelievo di sangue. Tempi di latenza maggiori hanno portato a compromettere l'attendibilità del test. Sulla scorta dell'esperienza maturata si ritiene che la PCR su pool di sangue si configuri come la metodologia "ideale" per la ricerca degli animali PI soprattutto nel contesto del piano di eradicazione a livello di allevamento. L'introduzione della Real Time PCR non può che essere ritenuta un evento migliorativo nel contesto della metodica PCR. Ciò che va sottolineato è il costo della strumentazione Real Time che inevitabilmente va fatto gravare sul costo unitario del test in ragione del computo e dell'ammortamento della strumentazione.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Baker J. Bovine viral diarrhea virus: a review. *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 190 (11): 1449-1458, 1987.
2. Baker J. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*; 11 (3): 425-443, 1995.
3. Bolin S. Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*; 11 (3): 615-625, 1995.
4. Bolin S. In Kirkbridge C (ed), *Laboratory diagnosis of Livestock Abortion*. Ames, Iowa State University. Press; 121-128, 1990.
5. Bolin S. Littledike E.T., Ridpath J.F. Serological detection and practical consequence of antigenic diversity among bovine viral diarrhoea virus in a vaccinated herd. *American Journal of Veterinary Research*; 52 (7): 1033-1037, 1991.
6. Broes A., Wellemans G., Dheedene J. Syndrome hémorragique chez des bovines infectés par le virus de la diarrhée virale bovine (BVD/MD). *Annales de Médecine Vétérinaire*; 137: 33–38, 1992.
7. Brownlie J., Clarke M. C., Howard C. J. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Veterinary Record*; 114: 535- 536, 1984.
8. Caldow GL, Edwards S, Peters AR, Nixon P, Ibata G, Sayers R. Associations between viral infections and respiratory disease in artificially reared calves. *Veterinary Record*; 133: 85-89, 1993.
9. Carmen S., Van Dreumel T., Ridpath J., Hazlett M., Alves D., Dubovi E., Tremblay R., Bolin S., Godkin A., Anderson N., Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*; 1: 27-35, 1993-1995.

10. Cavirani S., Taddei S., Cabassi C. S., Galvani G., Luzzago C., Toni F., Malanca E. Risposta anticorpale verso BVDV Tipi 1, 2 e NS2-3 in manze trattate con vaccini vivi attenuati e inattivati; *Obiettivi e Documenti Veterinari Anno XXIV*; 4:21-25, 2005.
11. Cavirani S. La diarrea virale del bovino - Il virus. *UTET Divisioni periodici*; 3-6, 2002.
12. Chase C, Elmowalid G, Yousif A. The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*; 20 (1): 95-114, 2004.
13. David G. P., Crawshaw T. R., Gunning R. F., Hibberd R. C., Lloyd G. M., Marsh P. R. Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. *Veterinary Record*; 134: 468-472, 1994.
14. Elahi S. M., Shen S. H., Harpin S., Talbot B. G., Elazhary Y. Investigation of the immunological properties of the bovine viral diarrhea virus protein NS3 expressed by an adenovirus vector in mice. *Archives of Virology*; 144 (6): 1057-70, 1999.
15. Flores E. F., Ridpath J. F., Weiblen R., Vogel F. S., Gil L. H., Phylogenetic analysis of Brazilian bovine diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Research*; 87 (1): 51-60, 2002.
16. Fulton W. R., Ridpath J. F., Confer A.W., Saliki T. J., Burge L. J., Payton M. E., Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals*; 31: 89-95, 2003.
17. Gilbert S. A., Burton K. M., Prins S. E., and Deregt D. Typing of Bovine Viral Diarrhoea Viruses Directly from Blood of Persistently Infected Cattle by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*; 37 (6): 2020-2023, 1999.
18. Gorgoza L. M., Moran P. E., Larghi. J. L., Segui E., Lissarrague C., Saracco M., Braun M., Esteban E. N. Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) harboring seropositive cattle. *Second European Symposium on: BVDV Control. Porto – Portugal October*; 18: 20-22, 2004.

19. Goyal S. M., Ridpath J. F. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control, Blackwell Publishing, 2005.
20. Graham D. A., German A., Mawhinney K., Goodall E. A. Antibody response of naïve cattle to two inactivated bovine viral diarrhoea vaccines, measured by indirect and blocking ELISAs and virus neutralization. *Veterinary Record*; 152: 795-800, 2003.
21. Harpin S., Talbot B., Mbikay M., Elazhary Y., Immune response to vaccination with DNA encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein gp 53 (E2). *FEMS Microbiology Letters*; 146(2): 229-34, 1997.
22. Kamstrup S., Roensholt L., Jensen M. H., Dalsgaard K. Production of a highly immunogenic subunit ISCOM vaccine against Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Vaccine*; 17 (9-10): 1057-64, 1999.
23. Kelling C. L. Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*; 20 (1): 115-129, 2004.
24. Lobmann M. S., Charlier P., Klaassen C. L., Zygraich N. Safety of a temperature-sensitive vaccine strain of bovine viral diarrhoea virus in pregnant cows. *American Journal of Veterinary Research*; 47: 557-560, 1986.
25. Makosckey B., Jansenn M. G. J., Vrijenhoek M. P., Korsten J. H. M., Marel P. V. D. An inactivated bovine virus diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2. *Vaccine*; 19: 3261-3268, 2001.
26. Mc Clurkin A. W., Coria M. Selected isolates of bovine viral diarrhoea (BVD) virus propagated on bovine turbinate cells: virus titer and soluble antigen production as factors in immunogenicity of killed BVD virus. *Archives of Virology*; 58 (2), 119-125, 1978.
27. Patel J., Didlick S., Quinton J. Variation in immunogenicity of ruminant pestivirus as determined by the neutralization assay. *The Veterinary Journal*; 169: 468-472, 2005.

28. Patel J., Williams J. Proceedings 20th World Buiatric Congress, pp. 1023, 1998.
29. Pellegrin C., Van Der Hurk J., Lecomnte J., Tijssen P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortality. *Virology*; 203: 260-268, 1994.
30. Ridpath J. F., Bolin S. R., Dubovi E. J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*; 205: 66-74, 1994.
31. Scatozza F., Buonavoglia C., Trattato di Malattie Infettive degli Animali, Seconda Edizione, UTET; 709-730, 1988.
32. Schmitt J., Becher P., Thiel H. J., Keil G. M., Expression of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E2 by bovine herpesvirus-1 from a synthetic ORF and incorporation of E2 into recombinant virions. *The Journal of General Virology*; 80: 2839-2848, 1999.
33. Valla G, Panero V. 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, 2002.
34. Van Oirschot J., Brusche C., Van Rijn P., Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Veterinary Microbiology*, 64: 169-183, 1999.
35. Vilcek S., Durkovic B., Kolesarova M., Paton D. J., Mishra N., Mahony T. Proceedings of the Second European Symposium on: BVDV control. Porto-Portugal, 20-22; 15, October 2004.
36. Vilcek S., Paton D. J., Durkovic B., Strojny L., Ibata G., Moussa A., Loitsch A., Rossmanith W., Vega S., Scicluna M. T., Paifi V., Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Archives of Virology*; 146: 99-115, 2001.
37. Waage S. Influence of new infection with bovine virus diarrhoea virus on udder health in Norwegian dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*; 43 (2): 123-135, 2000.

38. Wolf G. 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, 2004.