



**Università di Pisa**

**Facoltà di Medicina Veterinaria**

**Dottorato in Medicina Veterinaria**

*Sviluppo e valutazione di un test di RT real time PCR per la  
identificazione di  
bovini persistentemente infetti da BVDV*

**Candidato:**

Roberto Zoccola

**Relatore:**

Maurizio Mazzei

## Indice generale

Introduzione.....	4
1.1 Diarrea Virale Bovina.....	5
1.1.1 Storia e definizione.....	5
1.1.2 Eziologia.....	6
1.1.3 Patogenesi.....	9
1.1.4 Quadri clinici.....	13
1.1.5 Distribuzione geografica e prevalenza dell'infezione.....	17
1.1.6 Epidemiologia.....	18
1.1.7 Metodi diagnostici.....	19
1.1.7.a Metodi di diagnostica indiretta.....	19
Interpretazione dei test sierologici.....	20
1.1.7b Metodi di diagnostica diretta.....	21
1.2 Strategie di controllo.....	25
1.2.1 Strategie vaccinali.....	28
Attività sperimentale .....	32
Introduzione.....	32
2.1 Materiali e metodi.....	32
2.1.1 Disegno e selezione dei primers e della sonda.....	32
2.1.2 Preparazione della curva standard.....	33
Estrazione dell'RNA virale.....	33
Retrotrascrizione.....	33
Amplificazione.....	33
Clonaggio .....	34
Trascrizione in vitro.....	36
Quantificazione dell'RNA .....	37
Preparazione della curva standard.....	37
2.1.3 Protocollo di Real Time RT PCR .....	38
2.1.4 Campionamento.....	39
Animali.....	39
Campioni.....	39
2.1.5 Lavorazione dei campioni.....	40
2.1.6 Valutazione del test e dei differenti tipi di campione.....	43
Sensibilità del test .....	43
Ripetibilità del test.....	44
Valutazione dei costi e dei tempi di lavorazione.....	44
2.2 Risultati.....	44
2.2.1 Sviluppo del saggio di Real Time RT PCR.....	44
2.2.2 Valutazione della sensibilità e della ripetibilità del test .....	45
Sensibilità su trascritto in vitro.....	45
Sensibilità su campione biologico.....	47
Ripetibilità.....	49
2.2.2 Valutazione dei differenti campioni biologici.....	50
Valutazione qualitativa.....	50
Analisi quantitativa.....	51
Valutazione qualitativa del protocollo di estrazione tramite congelamento e scongelamento.....	55
Valutazione dei costi e dei tempi di lavorazione.....	56
2.3 Conclusioni e discussione.....	57

Bibliografia.....	60
Appendice.....	67

## Introduzione

La moderna concezione industriale dell'allevamento ha posto sempre maggiore enfasi sulla necessità di ridurre al minimo gli sprechi ed i costi di produzione. In tale ottica la medicina veterinaria è chiamata ad individuare il più celermente possibile ogni patologia che possa determinare una perdita nella produttività degli animali.

La diagnosi precoce delle malattie infettive e la messa in atto di specifiche misure di controllo assolvono un ruolo cardine nella produttività degli allevamenti.

Negli ultimi decenni sono stati sviluppati numerosi test di biologia molecolare molto sensibili e specifici da utilizzare nella diagnostica delle malattie infettive. L'applicazione di queste tecniche è di fondamentale importanza per il controllo e l'eradicazione di numerose malattie infettive di interesse zootecnico.

Tra le malattie di maggior rilievo sicuramente dobbiamo includere il complesso di patologie noto come Diarrea Virale Bovina – Malattia delle Mucose (BVD-MD); malattia a diffusione cosmopolita responsabile di ridotta fertilità, malformazioni congenite, ritardi di accrescimento e decessi negli allevamenti bovini colpiti.

Un ruolo cardine per il mantenimento dell'infezione è svolto dai soggetti persistentemente infetti (PI), animali capaci di eliminare il virus per tutta la durata della loro vita.

Studi condotti recentemente in tutto il mondo hanno cercato di quantificare il danno economico arrecato dalla presenza di soggetti PI in allevamento. In Europa si stima che la presenza di un singolo soggetto PI determini una perdita nell'allevamento fra i 21 e i 135 € per capo. La perdita raggiunge i 340 € per gli stitipi ad elevata virulenza (Houe, 2003).

La precoce individuazione dei P.I. con metodi sensibili e specifici è fondamentale per il successo dei piani di controllo.

## **1.1 Diarrea Virale Bovina**

### **1.1.1 Storia e definizione**

Il primo focolaio documentato di BVD-MD risale al 1946 quando nella città di Ithaca, stato di New York, Olafson ed i suoi collaboratori descrissero alcuni casi di diarrea accompagnata da anoressia e stato febbrile che coinvolsero dapprima una bovina di 4 anni proveniente dall'Inghilterra e poi, nei giorni successivi, 5 capi dello stesso allevamento. Tutti i soggetti colpiti giunsero a morte nel giro di poche ore.

Questa nuova malattia fu presto segnalata negli allevamenti limitrofi e nel giro di alcuni mesi si diffuse in molte altre aree degli Stati Uniti. In tutti gli allevamenti colpiti la malattia presentava un'elevata morbilità, ma una mortalità inferiore al 10%. Tra i sintomi caratteristici presto si aggiunse anche l'aborto che colpiva numerose bovine a diversi stadi di gravidanza.

Nel 1953 fu descritta da Ramsey e Chivers una sindrome molto più grave, caratterizzata da ridotta morbilità, ed elevata mortalità, che a causa delle imponenti erosioni che determinava a carico delle mucose apparenti, venne denominata Malattia delle Mucose (MD). Alla fine degli anni Cinquanta la malattia fu segnalata anche in Europa ed i primi casi segnalati in Italia risalgono al 1966.

Per la prima volta nel 1967 si stabilì inequivocabilmente che la BVD e la MD erano imputabili ad un unico agente eziologico il Bovine viral diarrhea virus (BVDV) e il complesso delle sindromi fu denominato BVD-MD.

Nel 1990 negli USA furono isolati nuovi stipiti di BVDV che associavano alla sintomatologia classica di BVD-MD una forte trombocitopenia (Corapi W e coll.), ben presto ci si accorse che la mortalità che causavano questi stipiti era molto più elevata rispetto a quella determinata dagli stipiti di BVDV classici. Questi stipiti virali furono chiamati Bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2).

## 1.1.2 Eziologia

BVDV è un RNA virus a singolo filamento e polarità positiva con capsidi di forma sferica (diametro di 40-60nm), fornito di envelope.

BVDV appartenente alla famiglia *Flaviviridae*, genere *Pestivirus*.

Il genere *Pestivirus* include, oltre a BVDV1 e BVDV2, il virus della peste suina classica (CSFV) e il virus della border disease (BDV).

Il genoma di BVDV è un frammento di RNA della lunghezza di circa 12,3 Kb costituito da un unico open reading frame (ORF) e da due regioni non codificanti (UTR) situate agli estremi 5' e 3'.

La replicazione di BVDV avviene a livello citoplasmatico con l'RNA genomico che funge direttamente da mRNA. La regione 5'UTR, altamente conservata in tutti i virus del genere *Pestivirus*, è la prima coinvolta nel processo di replicazione virale avendo la funzione di innescare la traduzione.

La regione ORF viene tradotta in un'unica proteina che verrà successivamente suddivisa attraverso i meccanismi di clivaggio in 12 differenti proteine: 4 strutturali e 8 non strutturali.

Fra le proteine strutturali possiamo annoverare:

- la proteina C, appartenente al capsido virale, risulta altamente conservata nelle varie specie di *Pestivirus*, pare contenere una sequenza interna di segnale in grado di dirigere la traslocazione delle glicoproteine strutturali al reticolo endoplasmatico ;

- la proteina E<sup>RNS</sup> (gp 48), appartenente all'envelope, presenta attività ribonucleasica.

- la glicoproteina transmembrana E1 (gp 25), appartenente all'envelope, forma un eterodimero con la glicoproteina E2 ed è coinvolta nel processo di adsorbimento;

- la glicoproteina E2 (gp 53-56) è la più grande proteina virale e rappresenta il principale bersaglio per gli anticorpi neutralizzanti.

Le proteine non strutturali sintetizzate dalla regione ORF sono le seguenti:

- la proteina N<sup>PRO</sup> (amino-terminal proteinasi) presenta attività di autoclivaggio delle

neofornate poliproteine virali;

- la proteina p7 , legata alla proteina E2, sembra intervenire durante la fase di assemblaggio e di maturazione dei virioni;

- la proteina NS2 (p54) presenta attività ricombinante;

- la proteina NS3 (p80) proteina polifunzionale ad attività enzimatica, presenta al suo interno la serina proteinasi, la RNA elicasi e la NTPasi;

- la proteina NS4A (p10) probabile cofattore della proteina NS3 nell'attività serina proteinasica;

- la proteina NS4B (p30) sembra intervenire nell'ancoraggio del virione alla membrana cellulare durante la fase di replicazione;

- la proteina NS5A (p58) il cui ruolo è ancora da chiarire, ma sembra intervenire durante la replicazione;

- la proteina NS5B (p75), proteina ad attività enzimatica, è la RNA polimerasi RNA-dipendente.

La regione 3'UTR è stata suddivisa a sua volta in 3 "stem-loop" (SL I, SL II, SL III) separate da spazi singoli. SL I, SL II e la regione che li divide intervengono in alcune fasi della replicazione. SL I e la parte terminale dello spazio che la separa dalla SL II sono fondamentali per la replicazione mentre la delezione di SL II e SLII non determina impedimenti nella replicazione virale. (Pankraz, 2005)

BVDV viene inattivato in circa 30 minuti se esposto a temperature superiori a 56°C oppure se sottoposto a pH inferiori a 6 o superiori a 9; il virus è altresì inattivato dai comuni disinfettanti, dai solventi organici e dalla tripsina.

### **Classificazione**

La classificazione dei differenti stipti di BVDV avviene in base alle loro caratteristiche biologiche ed in base al loro genotipo. Per quanto riguarda le proprietà antigeniche queste sono soprattutto legate alle differenze a livello della glicoproteina di superficie E2. L'analisi antigenica condotta mediante sieroneutralizzazione ha dimostrato una marcata variabilità fra i vari stipti (Vilcek e Coll., 2001), che tuttavia non permette una suddivisione in sierotipi (Cavirani, 2002).

## **Classificazione biotipica**

La classificazione in base ai caratteri biologici (biotipica) è indipendente dal genotipo e dalle proprietà antigeniche dei vari stipti virali e si basa sulla capacità del virus di produrre effetto citopatico su substrati cellulari (CPE).

Infatti alcuni stipti di BVDV inducono degenerazione cellulare con un marcato CPE, caratterizzato da

vacuolizzazione del citoplasma delle cellule infette e vengono pertanto definiti citopatogeni (CP). Gli stipti che non danno luogo a questo fenomeno sono definiti non citopatogeni (NCP) (Baker, 1995).

Per molti anni si è ritenuto che soltanto gli stipti CP potessero essere agenti di malattia, attualmente, vista la perfetta identità antigenica tra stipti CP e NCP omologhi, si è accertato che gli stipti di BVDVCP originano da stipti di BVDVNCP (Ridpath, 2005). Ad avallare quest'ipotesi sono stati studi biomolecolari, che hanno evidenziato una differenza di organizzazione nelle proteine NS2 e NS3 dei due biotipi. Queste proteine risultano ben distinte nel biotipo CP, mentre vanno a costituire un complesso proteico unico, denominato NS2-3 (p125) nel biotipo NCP.

Non sono del tutto chiariti i meccanismi che regolano questo processo ma è stato ipotizzato che soprattutto nei soggetti PI, grandi escretori di virus del biotipo NCP, possano intervenire processi di ricombinazione, inserzione genica, delezione o mutazione puntiforme a carico della regione del genoma virale codificante per NS2-3, (Cavirani, 2002).

Gli stipti NCP rappresentano la stragrande maggioranza degli stipti isolati e pertanto possono essere considerati i normali stipti di BVDV presenti in natura.

## **Classificazione genotipica**

A partire dagli anni novanta sono stati identificati due genotipi principali, BVDV tipo 1, comprendente gli stipti classici, ed BVDV tipo 2, nel quale sono stati inclusi gli stipti trombocitopenici (Anderson, 1993).

Studi più recenti condotti con metodica PCR a livello delle regione 5' UTR e della porzione di ORF codificante per la proteina N<sup>PRO</sup>, hanno permesso di suddividere gli stipti di BVDV tipo 1 in 12 differenti sottogenotipi (da BVDV 1a a BVDV 1j più BVDV 1 deer) (Vilcek, 2001). Il riconoscimento del sottogenotipo BVDV 1k non è ancora accettato da tutti gli

Autori.; gli stipti di BVDV tipo 2 sono stati classificati in 2 diversi sottogenotipi (BVDV 2a e BVDV 2b) (Ridpath, 1998).

### **Spettro d'ospite**

Lo spettro degli animali che possono infettarsi con BVDV non è limitato al bovino, ma include piccoli ruminanti, suini e numerosi ruminanti selvatici. Indagini sierologiche hanno confermato la circolazione virale in popolazioni di ruminanti appartenenti alle famiglie *Bovidae*, *Cervidae*, *Camelidae* ed *Antilocapridae*. (Farina, 1990)

BVDV replica bene in cellule di origine bovina, ovina e caprina, colture primarie e linee cellulari (BT e MDBK).

### **1.1.3 Patogenesi**

La patogenesi delle infezioni da BVDV è abbastanza complessa. .

La risposta all' infezione e i diversi quadri clinici sono dipendenti da una serie di fattori che interagiscono tra loro:

fattori legati all'ospite, fattori legati al virus e fattori determinanti esterni.

I fattori legati all'ospite sono:

- lo stato di immunocompetenza o di immunotolleranza nei confronti di BVDV;
- lo stato immunitario nei confronti di BVDV (non immune, immune per immunità passiva di origine materna o immune per immunità attiva da infezione pregressa o vaccinale);
- l'età del soggetto e lo stato di gravidanza.

I fattori legati al virus sono:

- il genotipo virale coinvolto (BVDV 1 o BVDV 2);
- il biotipo degli stipti coinvolti (CP o NCP);

I fattori determinanti esterni sono:

- la concomitante infezione con altri patogeni;
- il grado di stress ambientale a cui il soggetto è sottoposto.

## **Infezione primaria post-natale**

Nel caso dell'infezione di un soggetto immunocompetente, ma non immune nei confronti di BVDV (infezione primaria dopo la nascita) avremo solitamente un quadro paucisintomatico o asintomatico a decorso benigno.

Il virus penetra presumibilmente attraverso la mucosa oronasale, replica a livello delle prime vie respiratorie, delle tonsille e dei linfonodi regionali dando luogo a viremia.

In questa fase troveremo il virus in circolo sia libero sia associato ai leucociti. Nei soggetti sensibili il virus può essere rinvenuto libero nel torrente circolatorio a partire da 2-4 ore dall'infezione e fino a 14 giorni dopo. Il rinvenimento del virus a livello del buffy coat può avvenire sino ad 11 giorni dall'infezione. Recenti studi hanno dimostrato che la stimolazione in vitro di lisati di leucociti del sangue periferico con alte dosi di fitoemoagglutinina (PHA) aumenta la possibilità di identificare la presenza di BVDV (Gorgoza , 2004). Attraverso questa tecnica si è potuto rilevare il genoma virale di BVDV nei linfociti T CD4+ e CD8+, monociti e linfociti B fino a 42 giorni dopo l'infezione (Crawford, 2005).

In seguito alla fase viremica il virus infetta una grande varietà di tessuti ed organi anche se manifesta uno spiccato tropismo per il tessuto linfoide.

Lesioni caratteristiche a carattere ulcerativo-necrotico possono essere riscontrate in sede intestinale a livello delle placche del Peyer e delle stazioni linfonodali.

Tra gli organi maggiormente colpiti possiamo anche elencare il timo, le ovaie ed i testicoli.

Durante la fase viremica si assiste ad una leucopenia transitoria legata al tropismo virale che determina uno stato di immunodepressione temporanea della durata di circa 4-5 giorni. L'abbassamento delle difese verso altri patogeni favorisce l'insorgenza di altre infezioni, in particolare nei soggetti più giovani e in quelli sottoposti a stress.

BVDV viene eliminato in escreti e secreti, e può essere rinvenuto in grandi quantità nella saliva e nello scolo nasale ed, in misura minore, nelle urine e nelle feci.

Nel caso in cui l'infezione avvenga ad opera di stipti ad elevata patogenicità, come si verifica con BVDV tipo 2 o con alcuni ceppi di BVDV tipo 1 (in particolare alcuni ceppi CP), ovviamente il quadro clinico conseguente all'infezione può assumere connotati particolarmente gravi, esacerbando i caratteri tipici della malattia.

Le infezioni con BVDV tipo 2 nei casi di sindrome emorragica sono caratterizzate dall'insorgenza di un' elevata trombocitopenia dovuta non ad un difetto nella produzione delle piastrine indicativo di una compromissione del midollo osseo, ma piuttosto ad una specifica attività periferica del virus su queste cellule ematiche. (Baker, 1987)

Tuttavia evidenze sperimentali hanno mostrato che, in vitelli privati del colostro infettati con BVDV2, si instaura una grave compromissione del midollo osseo con soppressione della produzione piastrinica ed iperplasia dei megacariociti (Baker, 1995).

L'infezione primaria in soggetti immunocompetenti evoca una risposta immunitaria umorale e cellulomediata che protegge l'animale per tutta la vita.

### **Infezione congenita**

Quando l'infezione colpisce bovine gravide non immuni si verifica l'infezione della placenta e il passaggio del virus al feto.

Le possibili conseguenze dell'infezione nel feto sono molteplici e dipendono dal momento della gestazione e dalle caratteristiche del virus infettante.

Se l'infezione della bovina avviene nei giorni vicini alla sua fecondazione spesso si assiste a infertilità a seguito dell'ooforite prolungata indotta dall'infezione.

Quando l'infezione avviene nel primo trimestre di gravidanza spesso si assiste a morte fetale con riassorbimento del feto, mummificazione fetale o aborto.

Se l'infezione nei primi 3 mesi avviene ad opera di uno stivite di BVDV CP le alterazioni prodotte a carico del feto conducono sempre all'interruzione della gravidanza (Cavirani, 2002).

Le infezioni che si verificano nel secondo trimestre di gravidanza (90-150 giorno), periodo nel quale si completa l'organogenesi fetale, sono frequentemente causa di alterazioni teratologiche e malformazioni a carico del sistema nervoso centrale (idroanencefalia, ipoplasia cerebellare, ipomielinogenesi), dell'occhio (atrofia e displasia retinica, cataratta e microftalmia), del tegumento (ipotricosi, alopecia, irsutismo), dell'apparato muscolo scheletrico (brachignatismo, rachide corto e tozzo, artrogrifosi, torcicollo e opistotono), degli organi linfopoietici (aplasia timica) e dell'apparato respiratorio (ipoplasia polmonare) (Bielefeld-Ohmann, 1982).

Quando l'infezione avviene negli ultimi mesi di gravidanza, dopo l'organogenesi, si assiste

alla nascita di vitelli immunocompetenti ed immuni.

Un ruolo chiave per il mantenimento dell'infezione viene assunto dai feti che si infettano fra il trentesimo e il centoventesimo giorno di gestazione.

In questo lasso di tempo si verifica lo sviluppo del sistema immunitario e l'immunocompetenza del feto viene acquisita gradualmente a partire dal centesimo giorno di gravidanza. Una conseguenza dell'infezione in questo intervallo di tempo è l'instaurarsi di immunotolleranza, a seguito della quale i feti risultano incapaci di riconoscere gli antigeni virali come estranei e di sviluppare una risposta immunitaria nei loro confronti. Pertanto, se il feto sopravviverà all'infezione e la gravidanza giungerà a termine, si assisterà alla nascita di un vitello immunotollerante e persistentemente infetto (PI).

La immunotolleranza e la conseguente infezione persistente appare circoscritta ai soli stipiti NCP in quanto, durante l'infezione fetale, detti stipiti non evocerebbero la produzione di interferone tipo 1 che, come è stato dimostrato, è in grado di inibire la replicazione di BVDV in vitro (Cavirani, 2002).

I soggetti PI saranno dei costanti eliminatori di virus attraverso, secreti, escreti e apparato tegumentario. Quando una bovina PI porta a termine una gravidanza genera inesorabilmente dei vitelli immunotolleranti e PI. (Cavirani, 2002)

Il fenomeno dell'immunotolleranza è strettamente specifico per il corredo antigenico del virus che ha infettato il vitello durante la sua vita fetale, ma non esclude lo sviluppo di una risposta immunitaria nei confronti di stipiti antigenicamente diversi con cui il soggetto può entrare in contatto durante la vita.

### **Malattia delle mucose**

La durata della vita di un soggetto immunotollerante è legata all'eventualità che subisca una super infezione ad opera di uno stipite CP omologo a quello che ha indotto lo stato di tolleranza immunitaria.

Questa super infezione può avvenire sia ad opera di un nuovo stipite CP introdotto dall'esterno (anche in forma di vaccino attenuato) sia ad opera di una mutazione del virus che ha indotto immunotolleranza, come descritto in precedenza.

Gli animali colpiti da questa super infezione andranno incontro alla sindrome chiamata

Malattia delle Mucose (MD).

Il virus super infettante replicherà in tutti i distretti dell'organismo senza incontrare resistenza e causerà lesioni gravissime che condurranno a morte l'individuo nella quasi totalità dei casi.

In tutti i soggetti colpiti da MD è possibile rinvenire la concomitante presenza di uno stipite di BVDV NCP e di uno CP. Se lo stipite CP insorto in un soggetto PI si diffonde ad altri animali PI, anche questi manifesteranno MD, a condizione che i due virus siano antigenicamente omologhi.

Il grado di omologia antigenica tra lo stipite causa dell'immunotolleranza e quello super infettante condiziona l'evoluzione clinica della MD: tanto è maggiore il grado di omologia tra i due stipiti, tanto più grave sarà la malattia.

La teoria della doppia infezione spiega perchè alcuni bovini PI possono non manifestare mai la MD e perchè altri manifestano una MD a decorso protratto, definita cronica (runting disease). Questi ultimi soggetti PI si superinfettano con stipiti CP parzialmente omologhi rispetto al virus nei cui confronti sono immunotolleranti.

Di norma si ritiene che bovini immunotolleranti non sopravvivano oltre i 2 anni, ma in allevamenti infetti non è raro il reperto di animali PI di oltre i 2 anni di vita.

### **1.1.4 Quadri clinici**

L'arrivo di BVDV in un allevamento privo di difese immunitarie è un evento che si accompagna all'insorgenza di forme patologiche con quadri clinici complessi.

Possono essere individuate tre sindromi distinte: l'infezione primaria post-natale, la Malattia delle Mucose e l'infezione intrauterina.

#### **Infezione primaria post-natale**

L'infezione primaria post-natale si presenta a sua volta in quattro modi distinti: l'infezione subclinica, la diarrea virale bovina, la forma emorragica e la forma acuta ad elevata mortalità.

**L'infezione subclinica** è l'evento più frequente nelle infezioni post-natali (circa 80% dei

casi). Solo attraverso uno scrupoloso esame clinico è possibile notare un lieve rialzo termico, abbattimento e una diminuzione della produzione lattea. La viremia perdura per circa una settimana e dopo circa 15 giorni è possibile ritrovare nel sangue anticorpi specifici.

Con il termine **Diarrea Virale Bovina** si indica la forma clinicamente manifesta. I soggetti più colpiti sono i giovani fra i 6 e i 12 mesi, ma, in base allo stato immunitario della popolazione possono risultare coinvolti anche gli adulti.

Nei soggetti normoergici, dopo un'incubazione di 3-5 giorni si assiste all'insorgenza di un'ipertermia febbrile bifasica, accompagnata da leucopenia più o meno marcata e da enterite acuta, associata a diarrea senza caratteri patognomnici. A livello anatomopatologico è possibile riscontrare edema della mucosa e sottomucosa intestinale, piccole emorragie a livello dell'ileo e del primo tratto del colon e linfadenite mesenterica.

Altri sintomi riscontrabili sono: depressione, anoressia, respirazione accelerata, riduzione della produzione lattea, scolo oculo-nasale e occasionali erosioni a carico della cavità orale responsabili di scialorrea.

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.

La sintomatologia respiratoria riscontrata è solo in parte da attribuire a BVDV (Fulton, 2000) ma, in considerazione dell'attività immunodepressiva di BVDV, è da imputarsi maggiormente all'azione di fattori microbici complicanti che, nell'animale immunocompromesso, possono estrinsecare pienamente il loro potere patogeno (Baker, 1987).

**La forma emorragica** di BVDV è una grave malattia segnalata in corso di episodi acuti di BVDV. Colpisce in prevalenza i vitelli ma è stata riscontrata anche in animali adulti.

Il decorso è rapido e la mortalità elevata (dal 10% al 40% dei casi) a seconda della rapidità dell'intervento terapeutico.

Questa forma è sostenuta da alcuni stipiti di BVDV 2 NCP e si manifesta con un quadro clinico dominato da una marcata trombocitopenia che esita in una sindrome emorragica connotata da diarrea sanguinolenta ed epistassi associata a febbre e marcata leucopenia.

Si riscontrano anche marcata depressione, sintomi respiratori ed ulcerazioni orali.

I soggetti che sopravvivono alle prime fasi della malattia manifestano, a 15 giorni dall'inizio dell'infezione (momento in cui la trombocitopenia raggiunge i suoi punti più critici), quadri di diatesi emorragica caratterizzati dalla presenza di petecchie emorragiche ed emorragie estese su cute e mucose (congiuntiva, sclera, mucose nasali, gengivali, prepuziali, vaginali). I soggetti morti con la forma emorragica di BVDV manifestano in sede autoptica quadri di diatesi emorragica diffusa a mucose e sierose con presenza di sangue non coagulato nelle cavità, lesioni emorragiche a livello di endocardio ed epicardio, dei linfonodi, della milza, della vescica e della colecisti (Pellegrin, 1994).

Con il termine di BVDV in **forma acuta grave** si indica una forma clinica, segnalata inizialmente nei primi anni novanta in Inghilterra, 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 e, a partire dal terzo giorno, marcata leucopenia. 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'agente eziologico di questa forma è un BVDV 2 NCP (Marsh, 1994).

Molti dei soggetti che sopravvivono manifestano, a causa delle infezioni batteriche concomitanti alla fase immunosoppressiva, zoppicatura cronica per lesioni a carico dell'articolazione interdigitale interfalangea distale.

### **La Malattia delle Mucose**

La Malattia delle Mucose è una patologia in forma acuta che colpisce i bovini PI prevalentemente fra i 6 ed i 24 mesi con bassa morbilità ed elevatissima mortalità.

I soggetti colpiti manifestano: depressione, anoressia, respirazione difficoltosa, febbre e diarrea profusa con feci liquide frammiste a sangue e fibrina. Spesso si osserva tenesmo. Caratteristica è la scialorrea causata da erosioni a carico di narici, musello, mucose del cavo orale. Analoghe lesioni si riscontrano a livello degli spazi interdigitali e del cerchio coronario. I soggetti colpiti giungono a morte in un periodo che può variare da una a tre settimane dall'esordio dei sintomi per la disidratazione e l'emaciazione causate dalla

diarrea. Anche in questa forma insorge una marcata leucopenia che determina l'insorgenza di infezioni secondarie.

In sede di necropsia vengono riscontrate ulcere e lesioni erosivo-necrotiche a livello di tutto il canale digerente. Tutti i tessuti linfoidi sono coinvolti, i linfonodi appaiono edematosi, le placche del Peyer necrotiche ed emorragiche. Negli ultimi tratti dell'intestino si riscontra la presenza di feci acquose di odore fetido con sangue e frammenti di mucosa in necrosi.

Come conseguenza di infezioni batteriche secondarie, spesso si osservano broncopneumonia e pleurite fibrinosa.

Nei casi di **runting disease** (MD cronica) i segni clinici che caratterizzano la forma acuta sono presenti in forma meno grave. La diarrea è intermittente ed il decorso può protrarsi per diversi mesi fino a quando l'animale muore o viene macellato.

Nei reperti anatomopatologici di runting disease sono frequentemente rinvenute lesioni eczematose, ipercheratosi ed alopecia a livello delle regioni del collo, del perineo, alla base delle corna, sul cerchio coronario e negli spazi interdigitali.

Le lesioni a livello gastroenterico sono meno accentuate.

### **Infezione intrauterina**

BVDV è in grado di interferire pesantemente con le funzioni riproduttive.

In seguito all'entrata del virus BVDV in un allevamento sieronegativo si possono rilevare un aumento dei ritorni in calore prevalentemente "fuori ciclo" se le bovine si infettano ad inizio gravidanza.

Una maggiore incidenza di aborti è caratteristica delle infezioni fra il cinquantesimo e il centesimo giorno di gestazione.

La nascita di vitelli mal formati è legata all'infezione fra il centesimo ed il centocinquantesimo giorno. I vitelli che nascono in apparenza normali da madri colpite da BVDV fra il centesimo e il centocinquantesimo giorno spesso manifestano ritardato accrescimento, difficoltà di movimento e mioclonie.

Le infezioni intrauterine con BVDV NCP fra il trentesimo e il centoventesimo giorno di gestazione possono dar luogo alla nascita di soggetti PI che, a seconda del momento

dell'infezione, possono presentare malformazioni teratologiche, essere scarsamente vitali o apparire normali.

L'ingresso del virus in allevamenti privi di difese immunitarie è frequentemente accompagnato da un aumento della mortinatalità e della mortalità neonatale.

### **1.1.5 Distribuzione geografica e prevalenza dell'infezione**

Negli Stati Uniti il numero degli isolamenti di BVDV 1 e di BVDV 2 si equivalgono mentre in Europa il 90% degli isolati è riconducibile a BVDV1 (Vilcek, 2003; Ridpath, 2005). BVDV1 è stato segnalato in tutti i Paesi europei mentre la presenza del genotipo 2 è stata confermata in Italia, Germania, Belgio, Francia, Olanda, Austria, Slovacchia e Regno Unito.

Per valutare la prevalenza di BVDV possono essere utilizzati due differenti criteri; il primo si basa sull'osservazione della sieroprevalenza in una determinata popolazione, il secondo prende in considerazione la presenza dei soggetti PI nella popolazione.

Entrambi questi metodi sono soggetti ad errore, la valutazione della sieroprevalenza è influenzata dalla vaccinazione, soprattutto con vaccini vivi attenuati mentre il mancato rinvenimento di PI non è garanzia di assenza di circolazione virale, poiché la maggior parte delle infezioni acute non necessariamente esita nella nascita di soggetti PI. (Lindberg, 2006)

La prevalenza di BVDV è estremamente variabile in funzione dell'area geografica considerata. Indagini condotte in diverse parti del mondo indicano che il numero degli allevamenti con soggetti sieropositivi oscilla tra il 20 e l'80 % a seconda del paese (Alenius, 1996; Sandvik, 2004; Hult, 2005; Joly, 2005; Ribeiro, 2005).

Indagini condotte in Europa negli ultimi 30 anni dimostrano che, ad esclusione degli stati dove si stanno attuando piani di controllo, il 50% degli allevamenti europei infetti ha almeno un bovino PI e che il 90% dei capi è esposto all'infezione nel corso della vita produttiva (Lindberg, 2006).

Nelle aree dove BVDV è endemico si riscontra una forte correlazione tra la prevalenza di BVDV e l'elevata densità degli allevamenti (Lindberg, 2006).

I tassi di sieroprevalenza negli allevamenti che hanno soggetti PI sono significativamente superiori rispetto a quelli di allevamenti nei quali non sono presenti animali PI.

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 ha un'età inferiore ai 6 mesi di vita, il (50%) ha un'età compresa tra i 6 ed i 14 mesi; il restante 25% raggiunge un'età superiore ai 15 mesi e può quindi entrare in attività riproduttiva (Houe H, 1993).

### **1.1.6 Epidemiologia**

La trasmissione di BVDV può avvenire per via verticale da una generazione all'altra o per via orizzontale. La modalità più frequente con la quale l'infezione viene introdotta in un allevamento è attraverso l'introduzione di soggetti PI apparentemente sani (generalmente manze di rimonta) o di femmine in gravidanza portatrici di un feto infetto.

I soggetti PI sono la sorgente più importante di virus e la loro presenza nelle aziende determina una diffusione rapida dell'infezione, specialmente se i contatti fra gli animali sono molto stretti.

I soggetti PI tuttavia non sono l'unica via d'introduzione del virus, è stato dimostrato che l'infezione da BVDV può giungere e diffondersi in allevamento anche in assenza di soggetti PI, attraverso animali in viremia transitoria (Moen, 2005 – Valla, 2006). Negli allevamenti di piccole dimensioni l'infezione è spesso autolimitante e può estinguersi senza alcun intervento mentre negli allevamenti di grosse dimensioni, se non vengono intraprese misure di controllo e di eradicazione, il virus può continuare a circolare per molto tempo. L'infezione primaria postnatale può svolgere un ruolo importante nella disseminazione del virus quando si mischiano animali di origine diversa e se l'infezione è associata a sintomatologia respiratoria, poiché in questo caso la trasmissione avviene prevalentemente e con maggiore efficienza mediante aerosol. Secreti ed escreti di bovini con l'infezione primaria post natale risultano infettanti durante la fase di viremia transitoria, generalmente dal 4° al 10° giorno post infezione.

Tra le modalità di introduzione, seppure meno frequenti, sono da considerare, la trasmissione iatrogena, il contatto di animali sensibili (soprattutto se gravidi) con soggetti eliminatori (sia bovini che altri ruminanti) e l'infezione di bovine sensibili con il seme di tori escretori. (Meyling, 1988 – Schlafer, 1990).

### **1.1.7 Metodi diagnostici**

A causa della molteplicità dei sintomi, diagnosticare la presenza di BVD-MD in un allevamento basandosi sui segni clinici può risultare estremamente arduo. Solo con l'ausilio di esami diagnostici di laboratorio, diretti ed indiretti, può essere fatta una diagnosi sicura

Nei piani di controllo per BVD le tecniche di diagnostica indiretta e diretta vengono utilizzate; le prime come metodo di screening per identificare allevamenti in cui è presente circolazione virale; le seconde per l'individuazione dei soggetti PI.

#### **1.1.7.a Metodi di diagnostica indiretta**

I metodi che trovano maggiore impiego per la diagnostica indiretta di BVD sono la sieroneutralizzazione e l'ELISA indiretta.

Il test di **sieroneutralizzazione** è un saggio biologico in vitro che si basa sulla proprietà del siero proveniente da animali immuni di inibire la replicazione del virus in colture cellulari.

Il protocollo di riferimento per la sieroneutralizzazione di BVDV è stato pubblicato dall'OIE (Office International des Epizooties) nel 2004.

Gli anticorpi neutralizzanti presenti nel siero dei bovini immuni sono prevalentemente rivolti nei confronti delle proteine strutturali, in particolare nei confronti della proteina E2 (Sanvik, 2005).

I ceppi di referenza maggiormente utilizzati per questo test, sono il ceppo NADL e il ceppo Oregon C24V.

Il test di sieroneutralizzazione è sensibile e specifico ma richiede alcuni giorni per

l'esecuzione, deve essere eseguito in laboratori ben attrezzati e necessita di essere adeguatamente standardizzato. Tutti questi fattori uniti alla necessità di avere degli stipiti di BVDV CP antigenicamente correlati a quelli responsabili della risposta immunitaria fanno sì che questo test sia scarsamente utilizzato nella routine diagnostica e venga utilizzato prevalentemente per validare altri test sierologici.

La metodica sierologica più utilizzata nei piani di controllo è sicuramente l'**ELISA indiretta** (enzime linked immunosorbent assays). L'ELISA indiretta è una metodica che, pur dimostrando una minore sensibilità rispetto alla sieroneutralizzazione, può essere applicata a singoli campioni, a pool di sieri, al latte di stalla, non richiede attrezzature complesse per la sua esecuzione, è economica, fornisce una risposta nel giro di poche ore e può essere automatizzata. I test ELISA indiretti sono suddivisibili in due tipologie: i test ELISA non competitivi e i test ELISA competitivi.

Uno dei test che maggiormente è impiegato per svelare la circolazione di BVDV negli allevamenti è un test ELISA competitivo capace di rilevare anticorpi verso le proteine non strutturali NS2-3 o NS3 (P80).

### **Interpretazione dei test sierologici**

I soggetti PI risultano generalmente sieronegativi o con titoli anticorpali estremamente bassi, in quanto possono sviluppare una risposta anticorpale rivolta verso le proteine strutturali quando vengono esposti a stipiti virali diversi dal ceppo che ha indotto lo stato di immunotolleranza, tramite infezione o vaccinazione (Bolin, 1991) o per mutazioni del ceppo endogeno (Collins, 1999).

In un allevamento dove non c'è mai stata circolazione virale e dove non si è mai vaccinato, tutti gli animali testati risulteranno sieronegativi. Negli allevamenti dove è avvenuta circolazione virale, in assenza di vaccinazione e senza la nascita di PI, saranno caratterizzati da una sieroprevalenza bassa (5-30%).

Negli allevamenti dove è praticata la vaccinazione con il vaccino inattivato è possibile, ricercando gli anticorpi verso la proteina non strutturale NS2-3, discriminare la positività da vaccinazione dalla positività da infezione con il virus di campo. Infatti i soggetti vaccinati con virus inattivato non sviluppano una risposta anticorpale nei confronti di questa proteina. Al contrario i soggetti vaccinati con vaccini vivi attenuati (in quanto vaccini replicativi), presentano una risposta anticorpale anche verso la proteina NS2-3.

L'interpretazione del test sierologico va relazionata all'età dei soggetti testati.

I soggetti (sia immunocompetenti che immunotolleranti) sotto i 6 mesi nati da madri sieropositive saranno sieropositivi a causa dell'immunità colostrale.

Alcuni studi (Lindberg, 2001 ) hanno proposto di utilizzare i livelli anticorpali in bovine gravide per identificare quelle potenzialmente portatrici di un feto infetto . Il rilascio continuo di virus da parte di un feto PI induce nella bovina gravida un continuo booster immunologico, che si traduce in uno stato di iperimmunità con elevati livelli anticorpali negli ultimi 2 mesi di gestazione. Testando le bovine gravide nell'ultimo trimestre di gravidanza sarebbe possibile individuare le bovine portatrici di feti PI prima della nascita del vitello.

Questa teoria non trova riscontro nella pratica a causa della variabilità individuale che caratterizza la risposta anticorpale.

### **1.1.7b Metodi di diagnostica diretta**

I metodi di diagnosi diretta sono utili per identificare i soggetti PI e per lo studio della variabilità biologica e genotipica dei vari stipiti virali circolanti.

Il virus può essere ricercato in feci, secrezioni nasali, nel latte e in vari organi (milza, polmone e rene) provenienti da soggetti con infezione transitoria o da PI. Il sangue e i suoi derivati possono risultare positivi nei soggetti con forme transitorie per tempi piuttosto brevi (7-10 giorni) mentre i campioni provenienti dai PI di età superiore ai 6 mesi presentano sempre una carica virale apprezzabile. Risultano sempre positive le biopsie cutanee di varia natura prelevate dai PI mentre quelle dei soggetti sani o con infezione transitoria sono sempre negative indipendentemente dall'età.

I metodi di diagnosi diretta sono: l'isolamento virale, la ricerca degli antigeni virali e la ricerca del genoma virale.

L'**isolamento virale** è il metodo tradizionale per la diagnosi diretta, si esegue su colture cellulari primarie (cellule di rene, di turbinati o di testicolo bovini) o in linea continua di

origine bovina (BT e MDBK). Durante la messa in coltura delle cellule che fungono da substrato per l'isolamento virale è opportuno prestare attenzione al siero fetale bovino utilizzato nel terreno di coltura, è infatti possibile che avvengano contaminazioni da parte di stipiti di BVDV NCP presenti nel siero fetale.

Per l'isolamento possono essere utilizzati diversi campioni biologici (siero, plasma, coaguli di sangue, secrezioni nasali e lacrimali, saliva, sperma e vari tessuti con preferenza per gli organi linfoidi) ma i migliori risultati si hanno partendo dalle cellule mononucleate del sangue raccolte dal sangue intero e diluite in soluzione tampone.

L'identificazione degli stipiti di BVDV CP avviene grazie all'effetto citopatico da essi indotto ma, poiché la maggioranza degli stipiti è NCP, all'esame colturale deve seguire l'impiego di tecniche che consentano l'identificazione del virus nelle cellule infette.

### **Ricerca degli antigeni virali**

I test che ricercano gli antigeni virali nei campioni biologici possono essere differenziati fra loro per il tipo di substrato su cui lavorano e per le modalità con cui viene processato il campione.

I test di **ELISA cattura** possono evidenziare la presenza degli antigeni virali nel sangue, nel siero, nel plasma, nel latte, negli escreti, in estratti tissutali e in liquidi di sospensione dove sono state immerse biopsie di cute o di organi.

La disponibilità di anticorpi monoclonali verso antigeni virali altamente conservati quali le proteine NS3, E2 e E<sup>ms</sup> ha permesso lo sviluppo di diversi kit commerciali di ELISA cattura.

La maggior parte dei test ha dimostrato buone sensibilità e specificità se impiegati sulla frazione leucocitaria del sangue ma alcuni kit hanno dato sensibilità minore se impiegati sul siero (Sanvick, 1995; Graham, 1998).

In particolare il test per la ricerca della proteina NS3, la proteina meno variabile nei vari stipiti di BVDV, è risultato idoneo per la ricerca del virus in estratti di organi linfatici o nelle sospensioni di leucociti, ma si è dimostrato meno sensibile sul siero a causa di una ridotta presenza del virus.

Il test ELISA maggiormente impiegato nei piani di controllo è quello rivolto alla ricerca della

glicoproteina E<sup>nrs</sup> in quanto utilizzabile sul siero di sangue, matrice nella quale E<sup>ms</sup> è presente in abbondanza. E' inoltre idoneo, con piccole modifiche procedurali, per la ricerca degli antigeni in soluzioni dove sono stati immersi frammenti di cute prelevati con biopsie cutanee (Kuhne, 1999, O'Toole, 2005).

Nell'interpretazione dei risultati di un' ELISA diretta sulle componenti ematiche è opportuno tenere presente sia che gli anticorpi passivi di origine colostrale potrebbero dar luogo a falsi risultati negativi (nei soggetti sotto i 6 mesi di età) sia che, nelle forme di infezione transitoria, è possibile rilevare la presenza del virus in circolo per alcuni giorni. Per aumentare l'attendibilità del risultato è opportuno testare gli animali dopo i 6 mesi di età e ripetere i test positivi un mese dopo il primo esito.

L' **Immunoistochimica** ricerca la presenza degli antigeni virali in sezioni di tessuto fissati in formalina o sezioni ottenute al criostato ed evidenziando, mediante osservazione microscopica, positività citoplasmatica cellule contenenti gli antigeni virali.

Nella diagnosi di BVD sono descritti protocolli che utilizzano biopsie cutanee prelevate dal padiglione auricolare. Il risultato dei test di immunoistochimica non è influenzato da infezioni transitorie (solo raramente nei soggetti non PI si rileva una debole positività nelle cellule dello strato spinoso dell'epidermide)(Haines, 2000) o dalla presenza di immunità colostrale, per questi motivi l'IHC è impiegata (Dubovi, 1990; Ridpath, 2002; Brodersen, 2004) sia per l'identificazione dei soggetti PI sia come test di conferma.

In numerosi studi è stato provato che IHC e isolamento virale eseguiti sugli stessi tessuti di animali PI forniscono una concordanza prossima al 100%. (Brodersen, 2004).

E' stato dimostrato che l'anticorpo monoclonale 15c5, diretto verso la proteina virale E<sup>RNS</sup> (gp 48), è capace di riconoscere un'ampia varietà di stipti di BVDV (Dubovi, 1992).

### **Ricerca del genoma virale**

A partire dai primi anni '90 (Lopez, 1991) sono state messe a punto tecniche che permettono di identificare i soggetti PI attraverso la ricerca dell' RNA virale.

Attualmente i metodi di rilevazione del genoma virale che trovano maggiore impiego sono la **reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)** e la **real time reverse**

**transcriptase polymerase chain reaction (Real Time RT-PCR).**

Questi test pur essendo estremamente sensibili, presentano svantaggi legati alla necessità di estrarre l'acido nucleico virale dal campione di partenza e all'estrema sensibilità dell' RNA stesso alla degradazione per idrolisi enzimatica.

La **RT-PCR** è un test sensibile e specifico dotato di notevole flessibilità di impiego; esso è utilizzato per svelare il genoma di BVDV in campioni individuali (Letellier, 1999) o in pool (Mars, 2005) e può essere impiegato con differenti substrati biologici: sangue, siero, latte, porzioni di organo, feti abortiti, tessuti fissati in formalina e liquido seminale (Dunser, 1999).

A causa dell'elevata variabilità genetica dei ceppi di BVDV occorre scegliere primers in regioni maggiormente conservate (5' UTR NS3) e in grado di amplificare la maggior parte degli stipti circolanti. (Vilcek, 2003).

Per aumentare la sensibilità della tecnica o per differenziare i genotipi di BVDV è possibile ricorrere alla **Nested RT-PCR**.

Nell'ultimo decennio è stata introdotta anche la tecnica di **Real Time RT-PCR** che permette non solo di identificare i campioni positivi e quelli negativi fornendo una risposta qualitativa, ma anche di misurare il numero di copie di RNA virale presenti nel campione dando una risposta di tipo quantitativo.

La **Real Time RT-PCR** utilizza termociclatori capaci di misurare la fluorescenza emessa da alcune sostanze, inserite nella mix di PCR, al termine di ogni ciclo di amplificazione.

Come nella PCR qualitativa, i processi di retrotrascrizione e di amplificazione possono avvenire in un unico passaggio (one-step), inserendo nella miscela di reazione l'RNA. Oppure può essere effettuata prima la retrotrascrizione seguita dalla reazione di PCR con cDNA (two-steps). Esistono differenti protocolli di Real Time RT-PCR: nella diagnostica di BVD vengono maggiormente impiegate le metodiche **SYBR Green** (Young, 2006) e **TaqMan** (Letellier, 2003; Baxi, 2006; Hoffmann, 2006; Marley, 2008).

La metodica SYBR Green sfrutta la capacità del SYBR Green I, un composto aromatico del gruppo delle cianine asimmetriche, di legarsi in modo aspecifico al DNA a doppia catena emettendo fluorescenza.

La Real Time RT-PCR con metodica TaqMan differisce dalla precedente poiché utilizza , anziché intercalanti del DNA, sonde ad ibridazione, specifiche per il frammento di

interesse, marcate con molecole fluorescenti.

La metodica TaqMan è più costosa, perchè richiede la produzione della sonda, ma è molto sensibile e più specifica.

## 1.2 Strategie di controllo

La profilassi diretta comprende l'individuazione degli allevamenti infetti, l'individuazione e l'allontanamento dei soggetti PI e il monitoraggio aziendale degli allevamenti risanati. La profilassi indiretta si basa sul ricorso alla vaccinazione per aumentare l'immunità di popolazione e ridurre i danni causati dalla circolazione virale.

Differenti esperienze sono state fatte a livello europeo sul controllo delle infezioni da BVD. .

Isole Shetland, Danimarca, Finlandia, Norvegia e Svezia hanno iniziato un programma di eradicazione su vasta scala a partire dal 1993-94 riuscendo ad ottenere l'indennità in 10 anni, indipendentemente dalla prevalenza da cui partivano (in Finlandia solo l'1% degli allevamenti era positivo mentre in Danimarca la positività era del 50%). Il loro piano prevedeva uno screening sierologico di massa per identificare gli allevamenti con presenza di soggetti PI, l'individuazione dei PI con metodi di diagnostica diretta e la loro eliminazione, la limitazione degli spostamenti e l'adozione di misure di biosicurezza (Larsson, 2004; Nuotio, 1999; Synge, 1999; Valle, 2005). L'Austria ha iniziato un piano simile a quello scandinavo su scala regionale nel 1997, estendendolo a tutto il territorio nel 2004 (Rossmann, 2005).

In tutti i suddetti Paesi è vietata la vaccinazione perché potrebbe interferire con il piano, mentre in tutti gli altri Paesi europei la vaccinazione è consentita; in Irlanda, Regno Unito, Olanda e Slovenia può essere utilizzato solo il vaccino spento.

Altri piani su vasta scala sono stati avviati dalla Francia in Bretagna (Joly, 2005), dall'Olanda (Moen, 2005) e dalla Germania (Moenning, 2005) mentre progetti su scala ridotta sono in corso in Galizia (Spagna) e in Grecia (Billinis, 2005).

Nel nostro paese, la Provincia Autonoma di Bolzano ha introdotto l'obbligatorietà del controllo delle infezioni da BVD basato sulla eliminazione dei soggetti PI in tutti gli

allevamenti bovini da latte nell'ottobre 1999. La riduzione della circolazione virale è testimoniata dal decremento di soggetti PI dall'1,1% (1999-2000) allo 0,26% (2001-2002) (Stifter) .

Altri piani di controllo sono stati avviati dalla provincia di Trento e dalla regione Friuli Venezia-Giulia e, a livello di aree limitate, dalle province di Lecco e Como con la partecipazione dei servizi di assistenza tecnica della Associazione Allevatori.

A partire dal 2006 anche la regione Piemonte ha promosso uno studio in alcune aree pilota mirato ad avere un quadro generale sulla prevalenza di BDV nella regione e ad ottimizzare le procedure diagnostiche.

Nel 2002 l' Unione Europea ha promosso la formazione di un network europeo con la funzione di mettere in contatto vari gruppi di ricerca al fine di inquadrare in maniera chiara il problema legato alla presenza di infezioni da BVD sul territorio. L'approccio è stato multidisciplinare ed ha coinvolto studiosi ed esperti a vari livelli. I lavori, durati 4 anni, hanno offerto interessanti spunti sulle strategie da adottare nei piani di controllo.

In base alle indicazioni del network europeo, le prime operazioni da svolgere quando si imposta un piano di controllo sulle infezioni da BVDV sono:

- 1) stabilire un'autorità con il compito di informare del problema e comprendere quale sia la sua percezione a livello del territorio e delle associazioni degli allevatori;
- 2) definire lo scopo del piano di controllo (ridurre la prevalenza nell'area, eradicare la malattia);
- 3) valutare i mezzi a disposizione per raggiungere l'obiettivo prefissato e mantenere i risultati acquisiti; (Saatkamp, 2006)

In base agli obiettivi fissati e alle risorse impiegate nel piano di controllo cambieranno le priorità, i mezzi necessari e la percezione del risultato.

Nonostante i maggiori sacrifici richiesti, si è spesso osservato che gli allevatori sono più disponibili ad accettare piani ad ampio raggio (regionale o nazionale) che coinvolgano in cooperazione le associazioni degli allevatori e i servizi pubblici veterinari.

In particolare, dall'esperienza britannica con i focolai di afta epizootica, gli allevatori hanno appreso che la biosicurezza nei confronti di un agente patogeno aumenta quando sono coinvolte più aziende (Hovi, 2005), perché, quando è in corso un piano di controllo

in un'azienda, anche le altre in contatto con essa ne traggono beneficio grazie alla riduzione del rischio di trasmissione dell'infezione.

Il network europeo ha introdotto due nuovi concetti nel controllo delle infezioni da BVDV: quello della “strategia sistematica” e quello della “strategia non sistematica”.

Alla base della strategia sistematica ci sono tre misure sanitarie chiave che devono essere tutte presenti:

- 1)l'adozione di misure di biosicurezza atte a prevenire l'introduzione o la re-introduzione del virus negli allevamenti indenni ;
- 2)l'identificazione e l'eliminazione dei soggetti PI dalle mandrie infette ;
- 3)la sorveglianza continua per identificare rapidamente eventuali nuove infezioni e l'adozione di un criterio di valutazione per monitorare i progressi fatti.

Qualora venga a mancare anche solo uno di queste misure la strategia adottata viene declassata a “non sistematica” (Lindberg, 2006).

Nelle strategia “non sistematica” rientrano tutti quegli interventi, sia di profilassi diretta che indiretta, messi in atto senza uno sforzo organizzato per raggiungere e mantenere negli allevamenti l'indennità da infezione, oppure carenti di una sorveglianza attiva che permetta di valutare i progressi fatti.

In questa categoria ricadono, ad esempio, tutti i piani di controllo che abbinano interventi vaccinali all'identificazione ed eliminazione dei PI, ma mancano dell'adozione di misure atte a prevenire la reintroduzioni del virus o di un criterio per valutare l'efficacia del piano.

Al momento attuale le aree geografiche che hanno adottato strategie sistematiche per il controllo di BVD hanno dapprima ridotto i danni legati all'infezione e successivamente sono riuscite a raggiungere l'obiettivo dell'eradicazione. Finora l'adozione di strategie “non sistematiche” ha permesso solo di raggiungere il primo dei due obiettivi.

Un ruolo cardine per il mantenimento dell'indennità raggiunta è prevenire la reintroduzione del virus.

Recenti studi hanno cercato di valutare tramite modelli stocastici quanto il rischio di introdurre animali PI sia dipendente dalle dimensioni dell'allevamento, dall'introduzione di nuovi capi per la rimonta o per l'ingrasso (introduzione di manze gravide, vitelli da ingrasso e tori) e dalla scelta di testare solo alcune categorie di animali, tutti gli animali introdotti o

nessuno di questi.

E' emerso che gli allevamenti di dimensioni maggiori che introducono animali per la rimonta sono maggiormente esposti al rischio di quelli più piccoli e di quelli che praticano la rimonta interna, che i maggiori rischi di introdurre PI nell'allevamento sono legati all'introduzione di manze gravide e secondariamente all'introduzione di vitelli da ingrasso. Testare tutti i soggetti introdotti con metodi di diagnostica diretta riduce di 200 volte il rischio di introdurre PI rispetto a non testare nessun animale. Qualora non sia possibile testare ogni singolo soggetto è fondamentale testare almeno i vitelli nati dalle manze gravide e i vitelli introdotti per l'ingrasso. (Smith, R.L., 2008)

### **1.2.1 Strategie vaccinali**

Gli obiettivi principali della vaccinazione sono il controllo delle conseguenze dell'infezione e la riduzione della sua prevalenza tramite il raggiungimento di uno stato di immunità permanente nell'allevamento, soprattutto nel gruppo dei riproduttori.

L'impiego della vaccinazione permette, nelle aree ad alta densità di allevamenti di ridurre il rischio di diffondere l'infezione nell'allevamento e di far nascere nuovi soggetti PI a fronte dell'accidentale introduzione del virus. Tuttavia la copertura vaccinale non garantisce mai la totale protezione nei confronti di tutti i possibili stipiti di BVDV ( a causa dell'estrema variabilità antigenica) e l'immunità se non stimolata da frequenti richiami tende gradualmente a decrescere.

Un ulteriore problema è legato alla possibile interferenza della vaccinazione con i test sierologici impiegati per verificare la presenza di circolazione virale nell'allevamento. L'impossibilità di praticare lo screening sierologico obbliga ad eseguire la ricerca virologica su tutti i soggetti incrementando i costi.

Il controllo dell'infezione non può essere fatto unicamente con i programmi di vaccinazione, ma la corretta scelta di un idoneo protocollo vaccinale è fondamentale per ridurre i danni nelle aree ad elevata circolazione virale.

Un vaccino efficace nei confronti di BVDV permette di controllare le conseguenze dell'infezione, riduce la durata e l'intensità della viremia e di conseguenza anche la

circolazione virale.

L'efficacia della vaccinazione è di norma dimostrata attraverso la valutazione dell'entità della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata in prove di campo e dalla capacità del vaccino di ridurre i segni clinici, l'entità e la durata dell'escrezione virale mediante prove di infezione sperimentale.

Per fornire la più elevata ed ampia protezione possibile si può ricorrere a richiami vaccinali ripetuti e/o all'impiego di vaccini contenenti stipiti virali differenti.

Attualmente la maggior parte dei vaccini disponibili contengono stipiti di BVDV tipo 1, ma da alcuni studi (Makoschey, 2001; Fairbanks, 2003) sembra che, grazie ad un certo grado di protezione crociata, possano fornire una risposta immunitaria anche verso infezioni da BVDV tipo 2.

In Italia sono disponibili vaccini monovalenti vivi attenuati ed inattivati, e vaccini che combinano stipiti di BVDV inattivati con altri antigeni di virus respiratori (BoHV-1, VRSB e PI3), nonché un vaccino bivalente contenente uno stipite termosensibile di BVDV associato ad uno stipite di VRSB.

I vaccini vivi attenuati sono economici ed evocano una forte risposta immunitaria, sono stati i primi ad entrare in commercio a partire dai primi anni 60, ma quasi subito hanno dato problemi legati alla loro scarsa innocuità. In particolare sono state osservate interferenze nella attività riproduttiva quando somministrati a bovine gravide, e descritti casi di MD quando venivano vaccinati soggetti PI. E' stato anche preso in considerazione il rischio di ricombinazione genetica con gli stipiti di campo (Van Oirschot J, 1999).

Come per tutti gli altri vaccini a virus vivo attenuato, anche in questo deve essere tenuto presente il rischio di contaminazione con altri stipiti di BVDV NCP durante le fasi di preparazione del vaccino (Vicek , 2001).

Dagli anni 1980 sono disponibili stipiti vaccinali termosensibili, più sicuri nell'utilizzo anche in animali gravidi (Lobman, 1986; Bolin, 1995 ). La durata dell'immunità indotta dai vaccini vivi è indicata dai produttori in circa 12 mesi mentre per gli stipiti termosensibili l'immunità è garantita per 6 mesi.

I vaccini inattivati, più costosi ma molto più sicuri, sono stati posti in commercio con lo scopo di ovviare i problemi causati dai vaccini attenuati.

I vaccini inattivati derivano da ceppi virali altamente replicativi (NADL, Singer e Oregon C24V) sottoposti a trattamenti con sostanze chimiche inattivanti (cloroformio, formalina, beta-propiolattone). A partire dagli anni 80 le azeridine (etilenimine) sono diventate il composto chimico d'elezione per l'inattivazione di BVDV grazie all'ottimo rapporto esistente tra la loro attività inattivante e la loro capacità di preservare l'integrità antigenica . (Mc Clurkin, 1978)

Dal momento che i vaccini inattivati evocano una risposta immunitaria prevalentemente di tipo umorale, per potenziare l'attività immunizzante e stimolare l'immunità cellulo-mediata, vengono aggiunti adiuvanti, per favorire il richiamo di cellule della risposta immunitaria nel punto di inoculo e permettere una migliore esposizione degli antigeni.

Alcuni vaccini inattivati disponibili sul mercato contengono due differenti stipiti di BVDV, entrambi di tipo 1 (spesso uno CP e l'altro NCP) con lo scopo di ampliare la protezione indotta dal vaccino nei confronti degli stipiti circolanti.

Per fornire un'adeguata copertura i vaccini inattivati necessitano che la prima inoculazione sia seguita da un richiamo effettuato dopo 3-4 settimane (priming e booster) inoltre, a causa della breve durata della risposta immunitaria, è necessario ripetere il richiamo almeno ogni 6 mesi.

E' opportuno ricordare che i vaccini, ed in particolare quelli inattivati, possono risentire dell'interferenza degli anticorpi colostrali (Bolin, 1995).

I vaccini inattivati sono privi di effetti collaterali, possono essere usati con sicurezza nelle bovine gravide, non inducono immunodepressione, non esiste il rischio di ricombinazioni genetiche ed il processo di inattivazione mette al sicuro dalla eventuale presenza di virus contaminanti.

Non esiste un programma di vaccinazione predefinito per BVD, ma bisogna adattare il protocollo vaccinale alle circostanze e agli obiettivi da raggiungere in ciascun allevamento.

Nella scelta del vaccino e del protocollo da utilizzare si dovrà tenere conto dei seguenti aspetti:

- 1) tipologia dell'allevamento (da latte o da carne, da riproduzione o da ingrasso, intensivo o estensivo);
- 2) dimensione dell'allevamento, modalità di conduzione e livello di biosicurezza;

3) età degli animali e presenza di bovine gravide.

4) situazione epidemiologica dell'allevamento .

Negli allevamenti da riproduzione dove è presente circolazione virale si devono tutelare principalmente le bovine in riproduzione.

Le manze destinate alle rimonta, dopo una prima vaccinazione fra i 6 e gli 8 mesi, devono ricevere un'iniezione di richiamo 3 - 4 settimane prima della fecondazione.

Se l'animale non è mai stato vaccinato è necessario seguire il protocollo completo di vaccinazione con ultima somministrazione non oltre le 3 settimane prima della fecondazione.

I richiami vanno ripetuti annualmente prima della fecondazione se si utilizza un vaccino attenuato e ogni 4-6 mesi se si usa un vaccino inattivato (Bolin, 1995).

Poiché in alcune bovine il livello di immunità potrebbe non essere sufficiente a proteggere il feto dall'infezione, alcuni protocolli vaccinali consigliano di ripetere più volte la vaccinazione con vaccino inattivato nel primo trimestre di gravidanza al fine di mantenere alto il livello di protezione.

Negli allevamenti da ingrasso la vaccinazione per BVDV viene eseguita per controllare l'infezione primaria post natale, controllare l'immunodepressione BVDV indotta e di conseguenza le infezioni con altri agenti responsabili di forme respiratorie. In questo caso è consigliato l'utilizzo di vaccini polivalenti vivi attenuati che devono essere somministrati ai vitelli prima del trasporto e dell'ingresso in azienda.

# Attività sperimentale

## Introduzione

Lo sviluppo di nuovi test per svelare i soggetti PI nelle aziende infette è essenziale per prevenirne la nascita di nuovi e per ridurre la carica virale nell'ambiente.

Numerose ricerche hanno dimostrato che nei PI il virus può essere rinvenuto in grandi quantità in escreti e secreti (Mars, 2005, Givens, 2003 et al.), nel sangue (Young, 2006 et al.), nello strato spinoso dell'epidermide e nei follicoli piliferi (Brodersen, 2004).

Il presente studio si è posto l'obiettivo di sviluppare un nuovo metodo per la diagnostica diretta mediante la tecnica TaqMan real-time RT-PCR applicata a diversi tipi di campioni biologici. Il test sviluppato è mirato al riconoscimento dei ceppi di BVDV presenti in Italia.

Per ciascun tipo di campione biologico sono stati valutati facilità di campionamento, sensibilità e costo nell'ottica di semplificare la fase di raccolta e di ridurre lo stress per gli animali ed i tempi di lavoro per l'operatore.

## 2.1 Materiali e metodi

### 2.1.1 Disegno e selezione dei primers e della sonda

La regione scelta per il disegno dei primers e della sonda è la 5' UTR, caratterizzata da un elevato grado di omologia nei vari genotipi di BVDV.

Sono state selezionate 38 sequenze di 5'UTR di isolati BVDV italiani reperibili su (GeneBank): 20 appartenenti al genotipo BVDV 1b, 6 al genotipo BVDV 1d, 10 al genotipo BVDV 1e, 1 al genotipo BVDV 1f e 1 al genotipo BVDV 1h (Falcone, 2003). Sono stati anche inclusi i genomi completi di BVDV1 NADL (gi9626649) e BVDV 2 (gi9629506).

Le 40 sequenze sono state allineate con il software BioEdit Sequence Alignment Editor Copyright © 1997-2007 Tom Hall ed è stata ricavata la sequenza consensus, sulla quale il software Beacon designer ® ha identificato l'amplicone.

Gli allineamenti fra i primers e la sonda possono essere visualizzati nell'appendice di questa tesi.

## **2.1.2 Preparazione della curva standard**

### **Estrazione dell'RNA virale**

L'RNA di BVDV 1a ceppo citopatico 5960 è stato estratto utilizzando il QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen).

### **Retrotrascrizione**

Cinque µl di RNA sono stati retrotrascritti con l'enzima Superscript II Reverse Transcriptase ® (Invitrogen) utilizzando il primer generico per pestivirus First-round right primer 5'-CCA TGT GCC ATG TAC AG-3' (Ridpath e Bolin, 1998).

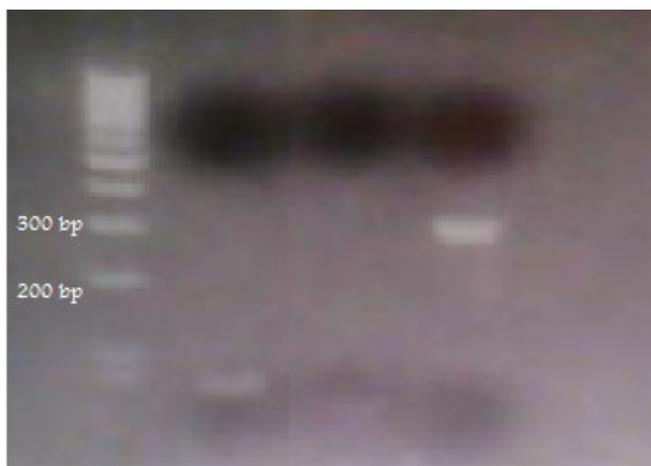
### **Amplificazione**

Il cDNA, ottenuto in seguito alla retrotrascrizione, è stato utilizzato come stampo per le reazioni di amplificazione . La reazione di polimerasi è stata eseguita utilizzando HotStarTaq PCR kit ® (Qiagen).

In questa reazione sono stati impiegati i primers First-round left primer 5'-CAT GCC CAT AGT AGG AC-3' (nt:107-123) e First-round right primer 5'-CCA TGT GCC ATG TAC AG-3' (nt:389-373) (Ridpath e Bolin, 1998) che amplificano una regione di 282 bp che comprende l'amplicone real time.

Le posizioni in questo paragrafo e nel seguito del testo si riferiscono al genoma di BVDV1 NADL (gi9626649).

L'amplicato è stato visualizzato dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2%.



*Immagine 1: Gel di agarosio al 2%. A sinistra sono visualizzate le bande del Marker Low Range (Fermentas) e a destra (line 3) si evidenzia l'amplificato di 280 bp.*

## Clonaggio

La banda di 282 bp, corrispondente al segmento amplificato atteso, è stata escissa dal gel ed il DNA è stato estratto impiegando il MiniElute Gel Extraction Kit® (Qiagen).

Per valutare la riuscita dell'estrazione e per quantificare il DNA estratto si è sottoposta un'aliquota di 1 µl di DNA a corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2%.

Il frammento è stato clonato nel vettore pCR®2.1-TOPO del kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen).

Cinque colonie batteriche trasformate con plasmide ricombinante sono state messe in coltura in mezzo LB addizionato con ampicillina 50 µg/ml ed incubate overnight a 37°C in agitazione.

Il DNA plasmidico è stato estratto utilizzando il QIAprep® Miniprep kit (Qiagen).

La presenza dell'inserito è stata confermata mediante digestione dei plasmidi con l'enzima EcoRI, che taglia a monte e a valle dell'inserito, producendo quindi la banda del vettore e la banda dell'inserito di 280 basi visualizzabile su gel. Un'ulteriore conferma è stata ottenuta mediante PCR utilizzando gli stessi primers usati per generare l'amplificato.

All'interno dei plasmidi il prodotto di PCR poteva essere presente sia in orientamento 5'-3' (senso) che in orientamento complementare (antisenso).

Per la selezione del clone da utilizzare nella trascrizione *in vitro* è stato scelto un clone plasmidico che conteneva l'inserto in orientamento antisenso in modo tale da sintetizzare un RNA senso simile all'RNA virale.

Tale clone è stato individuato mediante digestione dei plasmidi con XhoI, un enzima di restrizione che presenta un sito di taglio nel plasmide ed uno nell'inserto e genera quindi, a seconda dell'orientamento dell'inserto, i seguenti frammenti facilmente distinguibili :

- Inserto senso: frammenti di 3981 basi e di 204;
- Inserto antisenso: frammenti di 4077 basi e di 128;

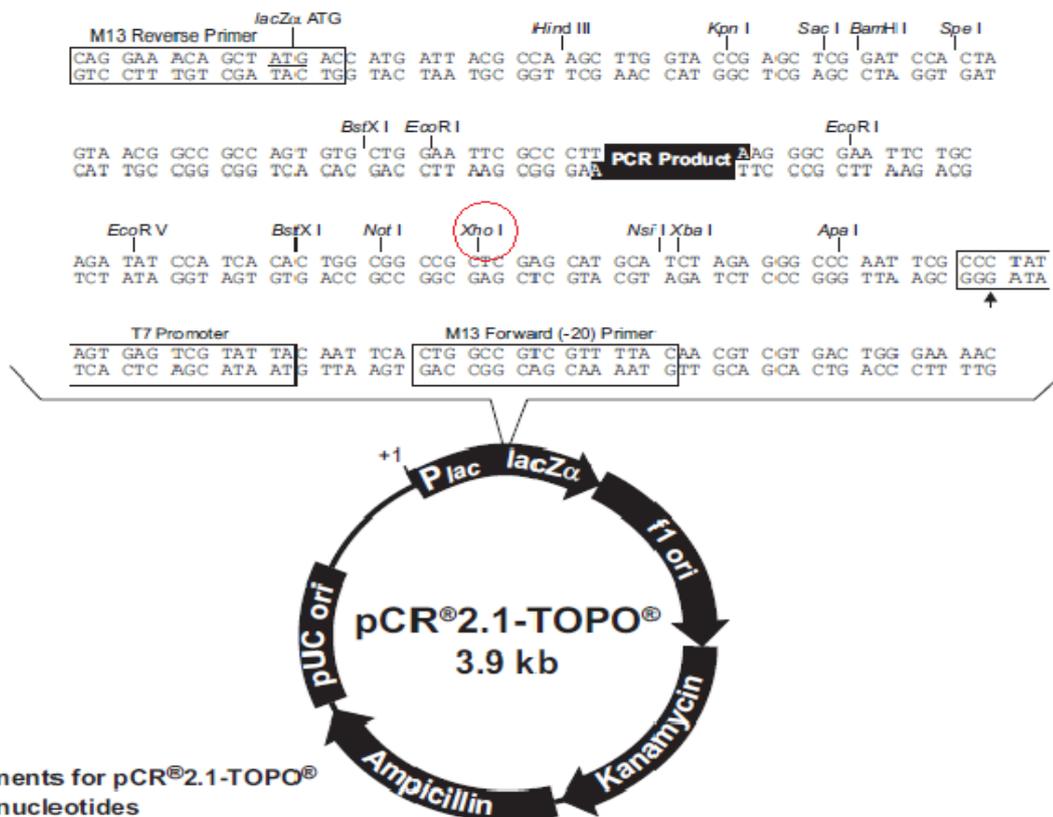


Immagine 2: Vettore Plasmidico pCR 2.1 TOPO (Invitrogen) con evidenziato in rosso il sito di taglio dell'enzima XhoI.

Il DNA plasmidico digerito con XhoI è stato sottoposto a elettroforesi in gel di agarosio al 2%. La visualizzazione con gli UV ha evidenziato che 3 cloni presentavano la banda di circa 130 basi (orientamento antisenso) e 2 cloni presentavano la banda di circa 200 basi (orientamento senso).

## Trascrizione in vitro

La trascrizione dell'RNA da utilizzare per la curva standard è stata effettuata con il MAXIscript®Kit Ambion.

Il vettore pCR®2.1-TOPO® presenta all'interno del polylinker il promoter per la RNA polimerasi T7. Per evitare la sintesi di lunghi ed eterogenei trascritti di RNA il plasmide scelto è stato linearizzato con BamHI, un enzima di restrizione che taglia a valle dell'inserito e non genera estremità coesive in 3', che potrebbero causare una sia pur scarsa trascrizione del filamento sbagliato.

Il plasmide linearizzato è servito come stampo per la sintesi di un filamento di RNA costituito da 391 basi: 69 basi comprese fra l'amplicone e il promoter T7, 280 basi di amplicone e 42 basi comprese fra l'inserito e il sito di taglio dell'enzima.

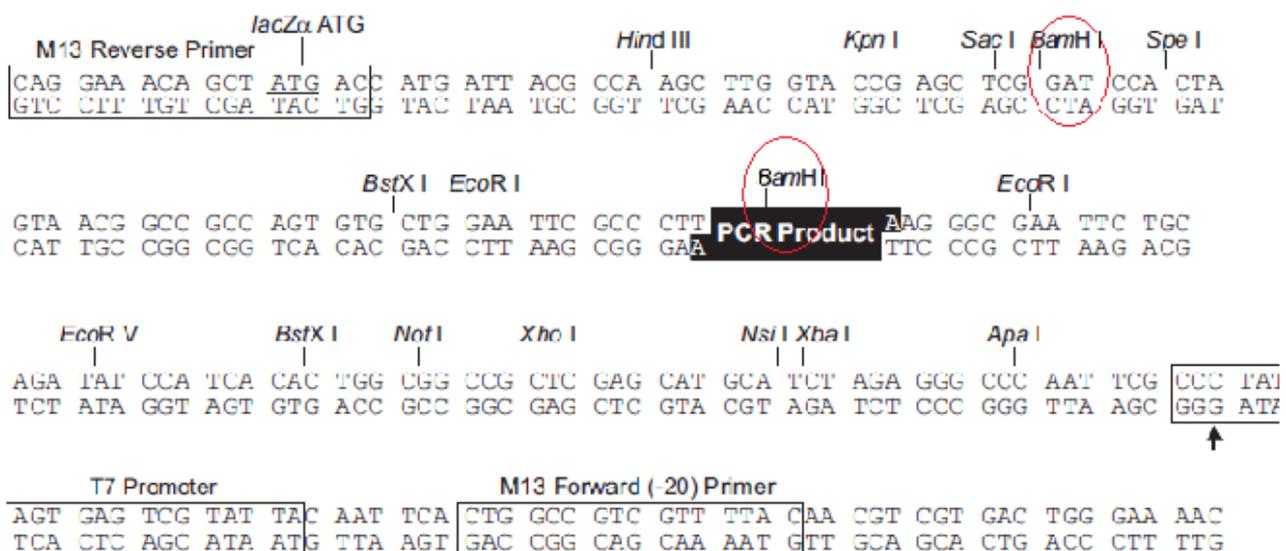


Immagine 3: Particolare del polinker interno al plasmide pCR 2.1 TOPO (Invitrogen). Evidenziati in rosso i punti di taglio dell'enzima BamHI

La reazione di trascrizione è stata seguita da un trattamento con Turbo DNase® Ambion a 37 C° per 15 minuti, per rimuovere il DNA plasmidico utilizzato come stampo.

## **Quantificazione dell'RNA**

La concentrazione del trascritto espressa in nanogrammi per microlitro (ng/μl), è stata determinata con un fluorimetro (TBS380, Turner Biosystem) utilizzando il kit RiboGreen® (Invitrogen).

## **Preparazione della curva standard**

Il numero di molecole di trascritto presenti in un microlitro è stato calcolato sulla base della concentrazione dell'RNA, della sua lunghezza e del peso medio di un ribonucleotide.

Una soluzione stock di RNA standard alla concentrazione di  $2 \times 10^8$  copie/μl è stata quindi preparata in RNA safe buffer (RSB) (Hoffmann, 2006), una soluzione che permette di mantenere integro nel tempo l'RNA.

La composizione del buffer è la seguente:

50ng/μl Carrier-RNA

0,05% Tween 20

0,05% Sodium-azide

in acqua RNase-free

La soluzione stock di RNA è stata utilizzata per preparare, mediante successive diluizioni in RSB, 5 soluzioni, contenenti rispettivamente  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$  e  $2 \times 10^2$  copie di RNA/μl. Cinque microlitri di ciascuna soluzione sono stati impiegati per generare i punti della curva standard, corrispondenti a  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  copie di trascritto.

Per ciascuna diluizione sono state preparate aliquote di 12 μl. Le aliquote e gli stock sono stati conservati a -80 C°.

### 2.1.3 Protocollo di Real Time RT PCR

I primers e la sonda sono stati suddivisi in aliquote alla concentrazione di 10 $\mu$ M e conservati a -20 C°.

Gli esperimenti di Real Time RT PCR sono stati effettuati con QuantiTect Probe RT-PCR® kit (Qiagen), che prevede una procedura "one step".

Le reazioni sono avvenute in piastre da 96 pozzetti impiegando il termocicizzatore iCycler® (BIORAD).

Ogni campione e ciascun punto della curva standard è stato testato in doppio.

La reazione avviene in 25 $\mu$ l di volume. I primer sono stati impiegati a una concentrazione finale 0,4  $\mu$ M dopo prove di ottimizzazione delle condizioni e la sonda ad una concentrazione finale 0,2 $\mu$ M.

L'RNA di ciascun campione/standard è stato aggiunto nei pozzetti nel quantitativo di 5 $\mu$ l.

Per ogni prova di Real Time RT PCR sono stati inclusi 2 campioni controlli negativi (bianco di reazione)

Il protocollo di amplificazione impiegato è stato il seguente:

50 C° per 30 minuti (fase di retrotrascrizione);

95 C° per 15 minuti (fase di attivazione della HotStarTaq DNA polimerasi);

50 cicli di 94 C° per 15s;

60 C° per 60s.

L'efficienza delle reazioni e la quantificazione del numero di copie di RNA per reazione sono ottenute dall'analisi della fluorescenza attraverso il software iCycler® Biorad.

## 2.1.4 Campionamento

Per l'applicazione del metodo su campioni biologici sono stati raccolti campioni di differenti tipologie.

### Animali

Dieci animali provenienti da quattro diversi allevamenti, tre situati nella provincia di Cuneo e uno nella provincia di Torino, sono stati classificati come PI in base a indagini condotte dalla regione Piemonte in collaborazione con l'IZS di Torino.

Dieci soggetti non PI sono stati identificati all'interno di un allevamento situato in provincia di Pisa. Nell'allevamento, dopo uno studio preliminare condotto con il Cannon test (160 capi in allevamento, sieroprevalenza presunta 30%, intervallo di confidenza 99% ), sono stati prelevati campioni di sangue da 20 bovini in età compresa tra i 6 e i 18 mesi, tutti i soggetti sono risultati sieronegativi alla ricerca di anticorpi anti NS2-3 kit ELISA BVD/MD P80-Antikörper, Pourquier® e in base a questo dato si è esclusa la presenza di circolazione virale all'interno dell'allevamento.

### Campioni

Da ciascun soggetto campionato sono stati prelevati:

- una biopsia auricolare di 8 mm di diametro, che è stata immediatamente immersa in 1 ml di soluzione PBS e congelata;
- un ciuffo di peli dalla regione dorsale del collo mediante l'utilizzo di pinze autobloccanti con la superficie interna rivestita da gomma adesiva;
- campioni di sangue sia in provette vacutainer con EDTA, sia in provette sprovviste di anticoagulante. Alcune gocce di sangue senza anticoagulante sono state fatte adsorbire su dischetti di carta FTA-Whatman®.

Il materiale prelevato è stato immediatamente refrigerato a 4 C° e portato entro 24 ore al laboratorio.

## 2.1.5 Lavorazione dei campioni

I vari campioni sono stati processati seguendo differenti protocolli.

Dal sangue senza anticoagulante è stato ricavato il siero mentre dal sangue intero con EDTA è stato ottenuto, dopo lisi degli eritrociti con cloruro di ammonio\*, un pellet di leucociti.

L'RNA virale è stato estratto da 140 µl di soluzione PBS (in cui era stata immersa la biopsia auricolare) e da 140 µl di siero secondo il protocollo QIAamp Viral RNA Mini Kit® Qiagen ad eccezione dell'eluizione finale che è avvenuta in 50µl di RSB.

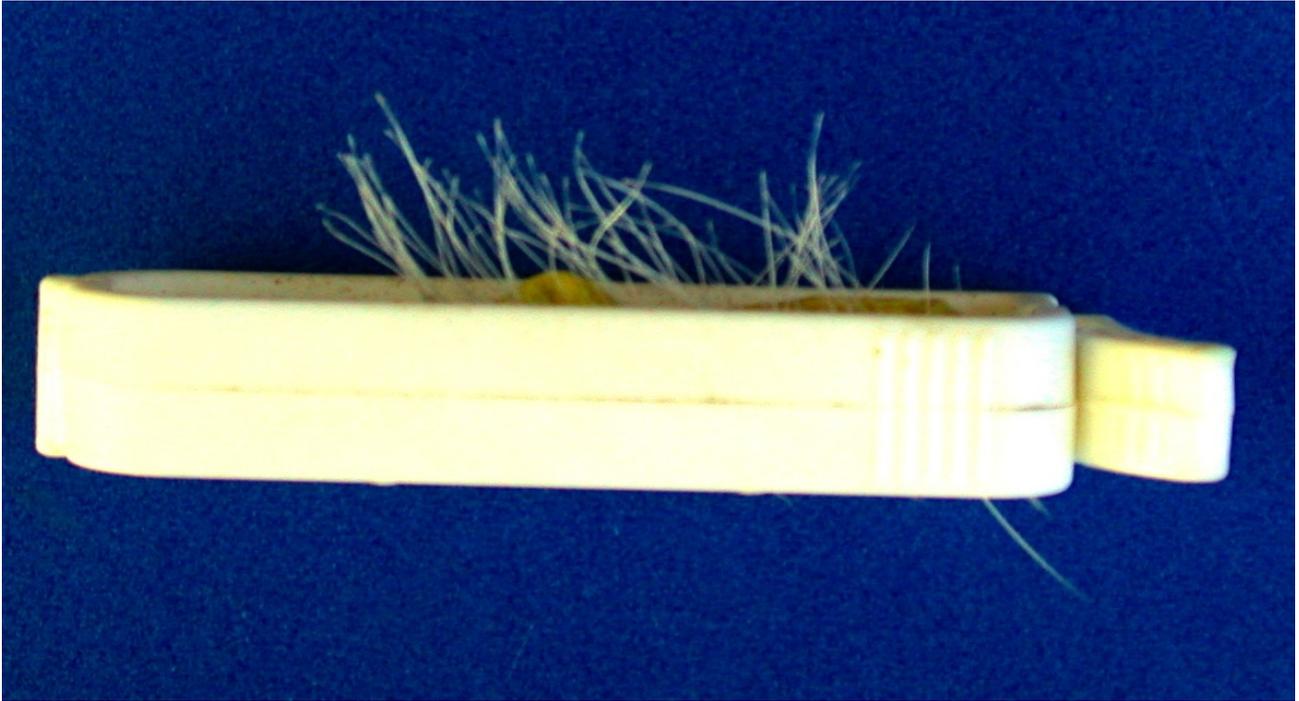
Per estrarre l'RNA dalla biopsia auricolare e dal pellet di leucociti è stato utilizzato il QIAamp RNA Mini Kit® Qiagen.

L'eluizione finale è avvenuta in 50µl di RSB.

L'estrazione di RNA da sangue adsorbito su carta FTA-Whatman ® è stata eseguita seguendo due differenti protocolli. Il primo prevedeva l'estrazione da dischetti di 2 mm di diametro prelevati con il punch-cutter contenuto nel FTA kit con il QIAamp RNA Mini Kit® Qiagen considerando i punch come porzioni di tessuto e procedendo come descritto in precedenza.

Il secondo protocollo seguito è quello consigliato dal FTA-kit Whatman ® , con la sospensione del pellet finale in 50 µl di RNA safe Buffer.

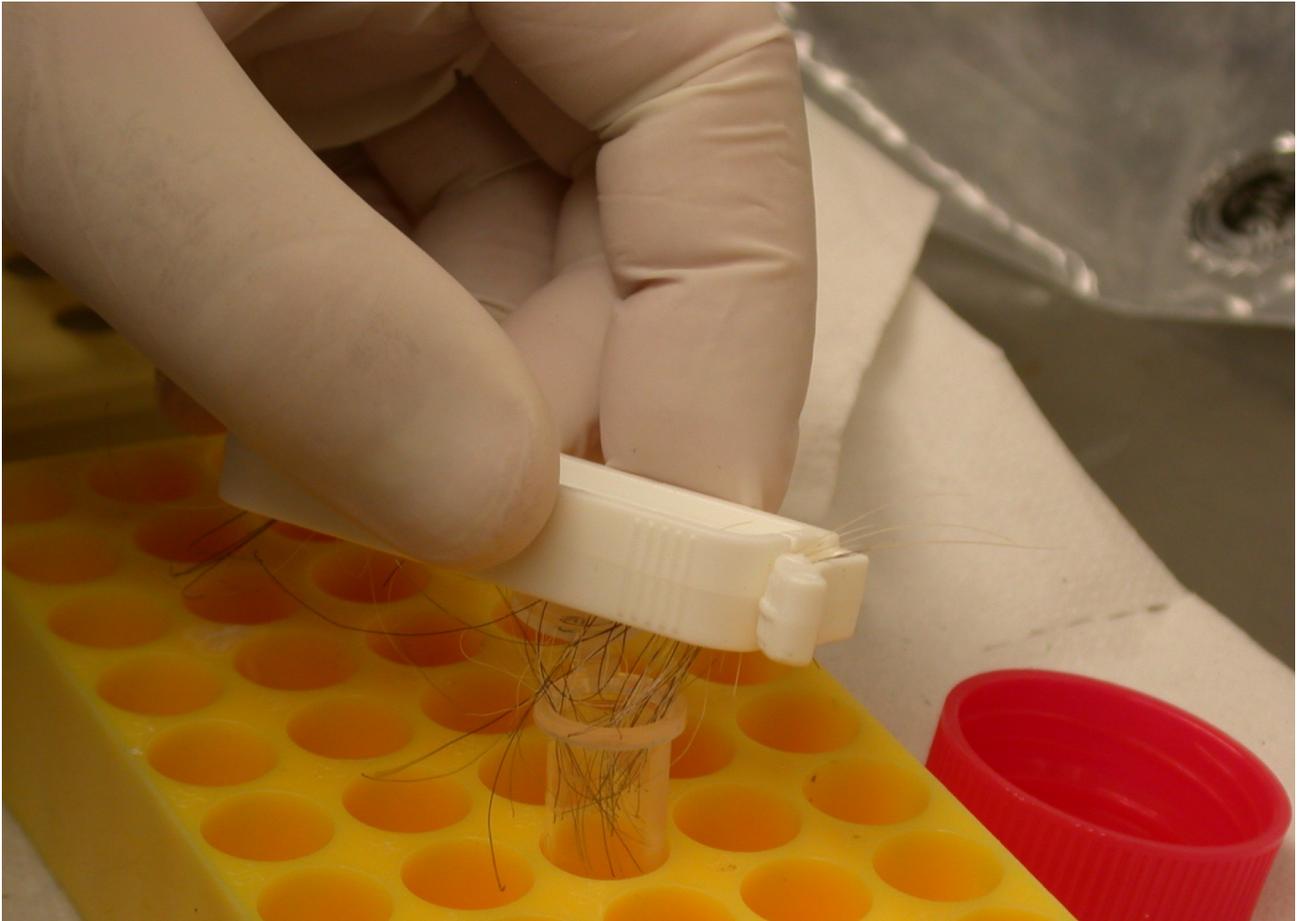
L'estrazione dai follicoli piliferi è stata eseguita con il QIAamp RNA Mini Kit® Qiagen, su venti, dieci e cinque peli. I peli sono stati prelevati dal bovino con lo strumento illustrato nell'immagine (4).



*Immagine 4: Pinza autobloccante utilizzata per la raccolta dei campioni di pelo*

I peli destinati all'estrazione sono stati inseriti in eppendorf contenente il buffer di lisi e tagliati nel punto più prossimale al follicolo.

Nella miscela di reazione della Real Time RT PCR descritta nel capitolo 2.1.3 sono stati introdotti 5 $\mu$ l di RNA proveniente da ciascun tipo di campione.



*Immagine 5: Fase di lavorazione dei campioni di pelo. La porzione prossimale del pelo con il bulbo pilifero viene introdotta in una fiala prima del taglio.*

Per ottenere l'RNA dai follicoli riducendone la manipolazione ed evitando la fase di estrazione è stato sviluppato un protocollo alternativo.

Venti follicoli piliferi sono stati tagliati secondo la procedura descritta in precedenza, immersi in 100  $\mu$ l di acqua RNase free all'interno di eppendorf da 1,5 ml e congelati a -20 C°.

Prima dell'esecuzione del test i campioni sono stati scongelati, determinando così la lisi delle cellule e la liberazione dell'RNA virale.

Dopo aver miscelato la soluzione, 10  $\mu$ l della stessa sono stati introdotti nella miscela di reazione.

Tutti i campioni sono stati esaminati con il protocollo di Real Time RT PCR descritto nel capitolo 2.1.3.

## 2.1.6 Valutazione del test e dei differenti tipi di campione

### Sensibilità del test

La sensibilità del test di Real Time RT PCR è stata valutata, oltre che sulla curva standard, su diluizioni seriali di un siero di un bovino PI e i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli di un saggio di Immunocitochimica.

Il siero proveniente da un bovino PI è stato utilizzato per preparare 5 diluizioni seriali, da  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ .

Da 140  $\mu$ l di ciascuna diluizione è stato estratto l'RNA virale con il QIAamp Viral RNA Mini Kit® (Qiagen) effettuando l'eluizione finale in 50 $\mu$ l di RSB.

La Real Time RT PCR è stata eseguita con il protocollo descritto nel capitolo 2.1.3.

Per l'esecuzione del test di immunocitochimica ogni diluizione del virus è stata utilizzata per infettare al passaggio cellule MDBK in una chamber slide da 8 pozzetti. Una chamber slide è stata utilizzata come controllo negativo. Dopo l'infezione, le cellule sono state mantenute in coltura per 2 giorni. Dopo rimozione del surnatante le cellule sono state fissate per 10 minuti con 100  $\mu$ l di una soluzione di acetone/metanolo 1:1, lasciate asciugare per 4h e reidratate per 10 minuti con soluzione fisiologica.

Le cellule fissate e reidratate sono state lavate in PBST (PBS, 0,5% di Tween20, Ph 7,4) per 5 minuti e incubate *overnight* in stufa a 37°C con anticorpo primario (15C5, by Dubovi, 1:25000).

Dopo due lavaggi in PBST si è proceduta all'incubazione con anticorpo secondario (Vector ImmPRESS, Universal, prediluted) per un'ora a temperatura ambiente.

Dopo altri 2 lavaggi in PBST è stato aggiunto il cromogeno DAB per 30min. Prima dell'osservazione dei vetrini con il microscopio ottico è stato eseguito un lavaggio finale con acqua distillata. Per ogni diluizione è stato contato il numero di pozzetti nei quali si osservava positività citoplasmatica. Il titolo virale è stato espresso in Dose Rilevabile 50 (positività al test di immunocitochimica nel 50% dei pozzetti infettati).

## **Ripetibilità del test**

Per verificare la ripetibilità del test è stato estratto l'RNA dal siero di 3 bovini PI. L'RNA estratto è stato suddiviso in aliquote monouso da 15µl congelate a -80C°.

Un'aliquota di ciascun RNA è stata testata in cinque esperimenti di Real Time RT PCR nel arco di 4 mesi. I risultati ottenuti per ciascuno dei 3 sieri nei 5 esperimenti sono stati confrontati ed è stato calcolato il coefficiente di variabilità (CV).

## **Valutazione dei costi e dei tempi di lavorazione**

La valutazione dei costi di lavorazione si basa sulla somma del costo del materiale impiegato nella fase di raccolta campioni e sul costo dei materiali e dei reagenti utilizzati nelle fasi di estrazione. Non è stato inserito il costo dei reagenti e dei materiali impiegati nell'esecuzione del test poiché rappresenta una costante.

I tempi di lavorazione sono stati calcolati considerando il tempo di raccolta dei campioni su bovini alla posta e il tempo necessario alla processazione dei campioni in laboratorio dall'arrivo del campione all'ottenimento dell'RNA .

Ad ogni parametro è stato associato un punteggio compreso fra 1 e 4. Il numero più basso è associato al minor costo/tempo di lavorazione.

## **2.2 Risultati**

### **2.2.1 Sviluppo del saggio di Real Time RT PCR**

Dalle sequenze 5' UTR esaminate tramite il software Beacon designer® sono stati selezionati i seguenti primers e sonda:

qBVDsenso: 5'-GGAGGGTAGCAACAGTGGTG-3' (nt:135-154)

qBVDantisenso: 5'- AGCGTCGAACCCACTGACGA-3' (nt:210-192).

qBVD probe: FAM-5'-TGTA CT CAGGGCTTCAGCCATCCAACGA-3'-BHQ (nt:185-158)

## 2.2.2 Valutazione della sensibilità e della ripetibilità del test

### Sensibilità su trascritto in vitro

Il saggio eseguito ripetutamente su diluizioni seriali del trascritto in vitro ha permesso di identificare diluizioni di templatato contenenti un numero di copie compreso fra  $10^7$  e  $10^3$  con una buona efficienza di reazione (87,5%).

PCR Amp/Cycle Graph

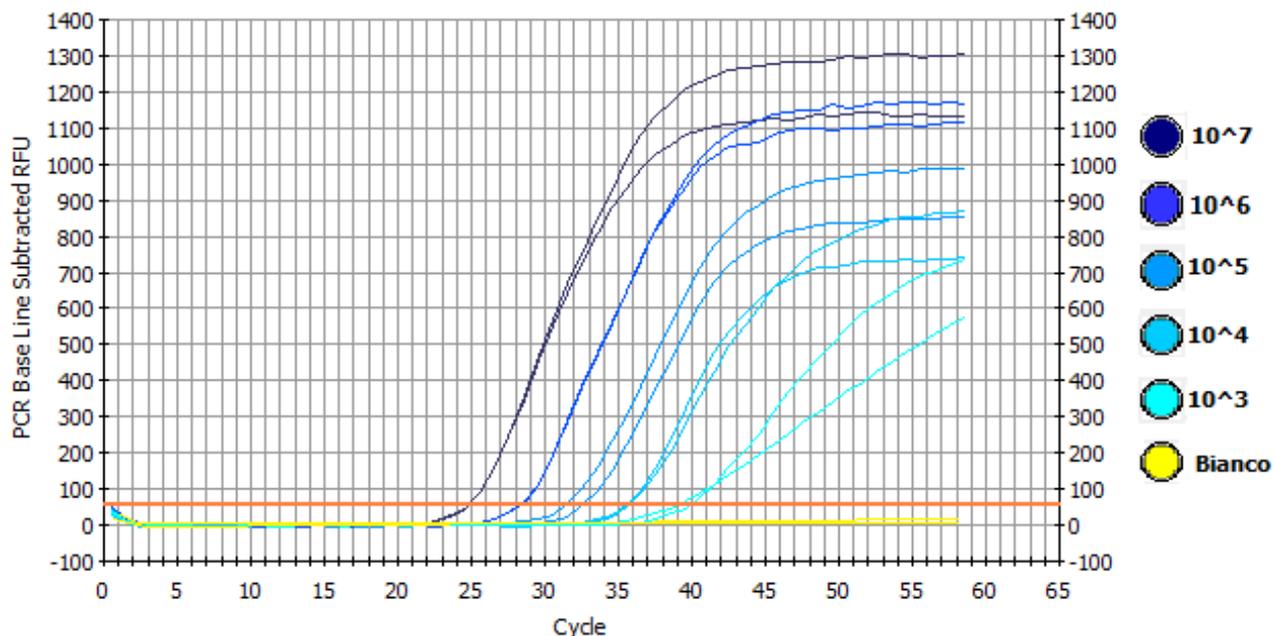


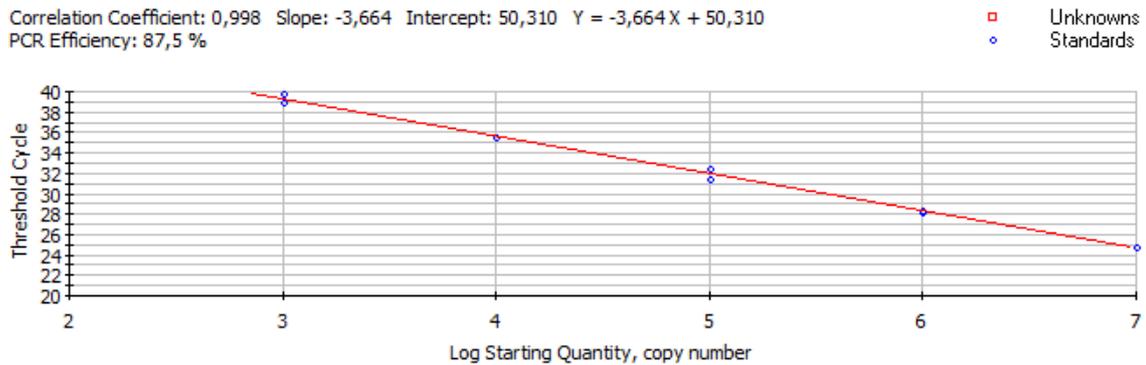
Grafico 1: Le curve indicano l'aumento di fluorescenza in base al numero di cicli di reazione. Fluorescenza rilevata con le diverse diluizioni dello standard.

## Tabella riassuntiva

Identificativo	ciclo soglia	media	DS
10 <sup>7</sup>	24,76		
10 <sup>7</sup>	24,73	24,75	0,02
10 <sup>6</sup>	28,21		
10 <sup>6</sup>	28,3	28,25	0,06
10 <sup>5</sup>	32,54		
10 <sup>5</sup>	31,39	31,97	0,81
10 <sup>4</sup>	35,52		
10 <sup>4</sup>	35,58	35,55	0,04
10 <sup>3</sup>	39		
10 <sup>3</sup>	39,85	39,42	0,60

*Tabella 1: Cicli soglia delle 2 repliche di ciascuna diluizione dell' RNA trascritto, ciclo soglia medio e deviazione standard.*

## Standard Curve Graph



*Standard 1: Coefficiente di correlazione ed efficienza relativo alle diluizioni dell'RNA trascritto.*

## Sensibilità su campione biologico

La Real Time RT PCR ha dato un risultato positivo su templati contenenti almeno  $2 \times 10^2$  copie di genoma virale, come confermato mediante analisi elettroforetica in gel di agarosio al 3%.

Il test ha dimostrato una buona efficienza di reazione, evidenziata dall'andamento sigmoide delle curve di fluorescenza, fino alla diluizione  $10^{-3}$  del siero di bovino PI selezionato (Grafico 2).

PCR Amp/Cycle Graph

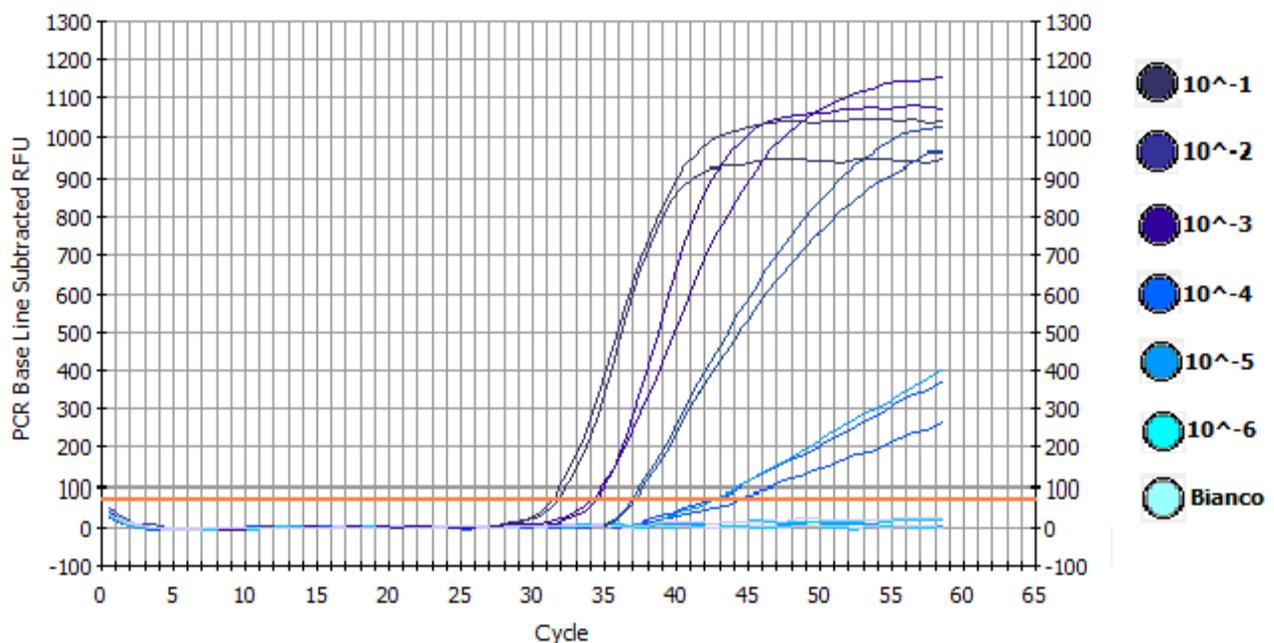


Grafico 2: Le curve indicano l'aumento di fluorescenza in base al numero di cicli di reazione. Fluorescenza rilevata con l'RNA estratto da diluizioni seriali di un siero proveniente da un PI.

## Tabella riassuntiva

Identificativo	Ciclo soglia	media	DS	Copie/reazione	media	DS
10 <sup>-6</sup>	N/A			N/A		
10 <sup>-6</sup>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
10 <sup>-5</sup>	N/A			N/A		
10 <sup>-5</sup>	41,75	N/A	N/A	216,0	108,0	N/A
10 <sup>-4</sup>	43,19			86,9		
10 <sup>-4</sup>	40,99	42,09	1,556	347,0	217,0	184,0
10 <sup>-3</sup>	38,83			1.438,0		
10 <sup>-3</sup>	38,54	38,69	0,210	1.620,0	1.529,0	128,7
10 <sup>-2</sup>	33,88			30.200,0		
10 <sup>-2</sup>	33,53	33,71	0,247	37.600,0	33.900,0	5.210,0
10 <sup>-1</sup>	31,34			149.000,0		
10 <sup>-1</sup>	30,95	31,15	0,276	191.000,0	170.000,0	29.200,0

*Tabella 2: Cicli soglia e numero di copie per reazione delle diluizioni seriali del siero di PI impiegato per valutare la sensibilità del test.*

## Standard Curve Graph

Correlation Coefficient: 0,998 Slope: -3,663 Intercept: 50,295  $Y = -3,663 X + 50,295$   
 PCR Efficiency: 87,5 %

□ Unknowns  
 ○ Standards



*Standard 2: Coefficiente di correlazione ed efficienza relativo alle diluizioni del siero di PI impiegato per valutare la sensibilità del test.*

Il titolo virale espresso in Dose Rilevabile 50 (positività al test di immunocitochimica nel 50% dei pozzetti infettati) relativo al siero del soggetto PI esaminato è risultato  $10^{-4}$ .

Pertanto dal confronto fra le due metodiche si può affermare che la Real Time RT PCR è stata in grado di identificare come positivo un campione con una titolo virale pari ad 1

Dose Rilevabile 50.

## Ripetibilità

I dati ottenuti nei 5 esperimenti hanno evidenziato una buona ripetibilità del test.

Il Coefficiente di Variabilità (C.V.) calcolato sul numero di copie per reazione è risultato compreso fra 0,1 e 0,22 (Tabella 3).

Tabella riassuntiva

codice siero	Numero di copie medio per reazione riscontrato negli esperimenti					media	DS	C.V.
	Esp. 1	Esp. 2	Esp. 3	Esp. 4	Esp. 5			
270	62.000,00	78.000,00	66.600,00	65.500,00	77.300,00	69.880,00	7297,74	0,10
413	485.000,00	715.000,00	635.000,00	581.000,00	681.000,00	619.400,00	90436,72	0,15
786	36.900,00	51.900,00	46.300,00	30.100,00	52.500,00	43.540,00	9778,96	0,22

*Tabella 3: Numero di copie rilevato per ciascuno dei 3 sieri testati nei 5 esperimenti. Per ogni siero è stato calcolato il numero di copie medio, la deviazione standard e il coefficiente di variabilità.*

## 2.2.2 Valutazione dei differenti campioni biologici

### Valutazione qualitativa

Il test eseguito sui diversi campioni biologici ha identificato correttamente i soggetti PI e i bovini non PI.

Tabella riassuntiva

	Identificativo	Copie/reazione Me	DS	Identificativo	Copie/reazione Me	DS
PI	418 siero	1.770.000	86.400	418 peli 20	3.390.000	2.450
	426 siero	2.930.000	90.000	426 peli 20	5.290.000	71.200
	427 siero	1.780.000	37.000	427 peli 20	3.285.000	1.340
	632 siero	649.000	27.900	632 peli 20	1.005.000	10.540
	920 siero	1.950.000	202.000	920 peli 20	2.110.000	7.930
	270 siero	139.000	4.300	270 peli 20	829.000	1.320
	786 siero	110.000	17.500	786 peli 20	440.000	596
	647 siero	1.130.000	5.520	647 peli 20	1.235.000	16.700
	413 siero	1.900.000	255.000	413 peli 20	3.380.000	292.000
	149 siero	75.900	3.830	149 peli 20	non testato	non testato
Non PI	464 siero	N/A	N/A	464 peli 20	N/A	N/A
	745 siero	N/A	N/A	745 peli 20	N/A	N/A
	455 siero	N/A	N/A	455 peli 20	N/A	N/A
	447 siero	N/A	N/A	447 peli 20	N/A	N/A
	748 siero	N/A	N/A	748 peli 20	N/A	N/A
	730 siero	N/A	N/A	730 peli 20	N/A	N/A
	727 siero	N/A	N/A	727 peli 20	N/A	N/A
	656 siero	N/A	N/A	656 peli 20	N/A	N/A
	680 siero	N/A	N/A	680 peli 20	N/A	N/A
	741 siero	N/A	N/A	741 peli 20	N/A	N/A

Tabella 4: Numero di copie medio per templatato e deviazione standard relativi a sieri e pelo dei 10 bovini PI e dei 10 bovini non PI.

## Analisi quantitativa

L'RNA estratto dalla biopsia auricolare è risultato il substrato biologico che ha permesso di evidenziare un maggior numero di copie di virus per reazione. Molto ricchi in RNA virale sono risultati essere anche i pellet leucocitari e il prodotto dell'estrazione da 20 bulbi piliferi.

PCR Amp/Cycle Graph

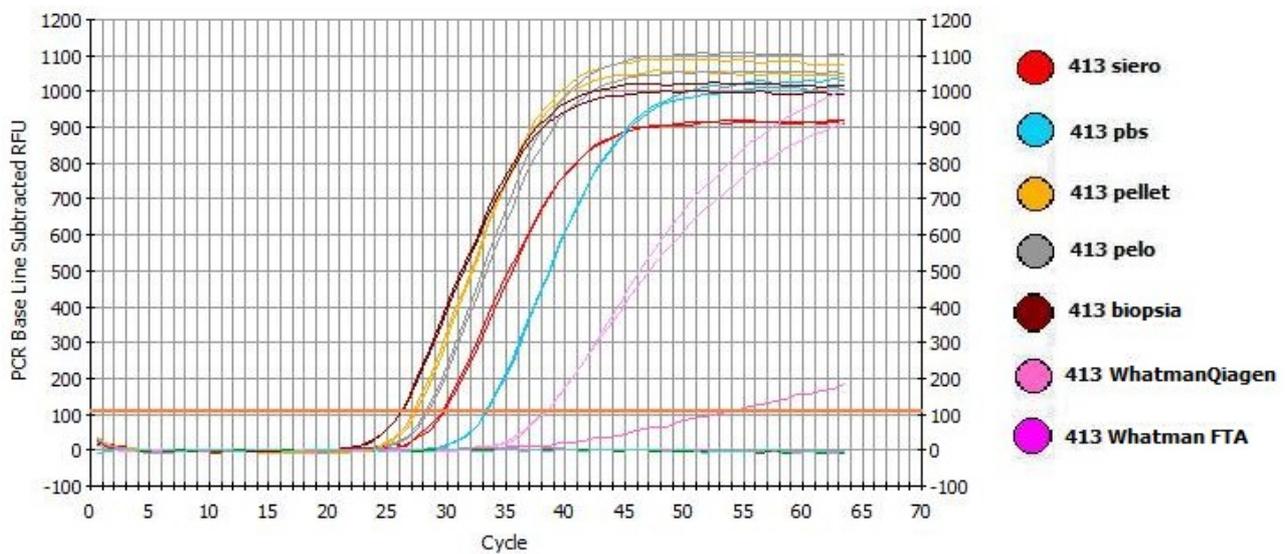


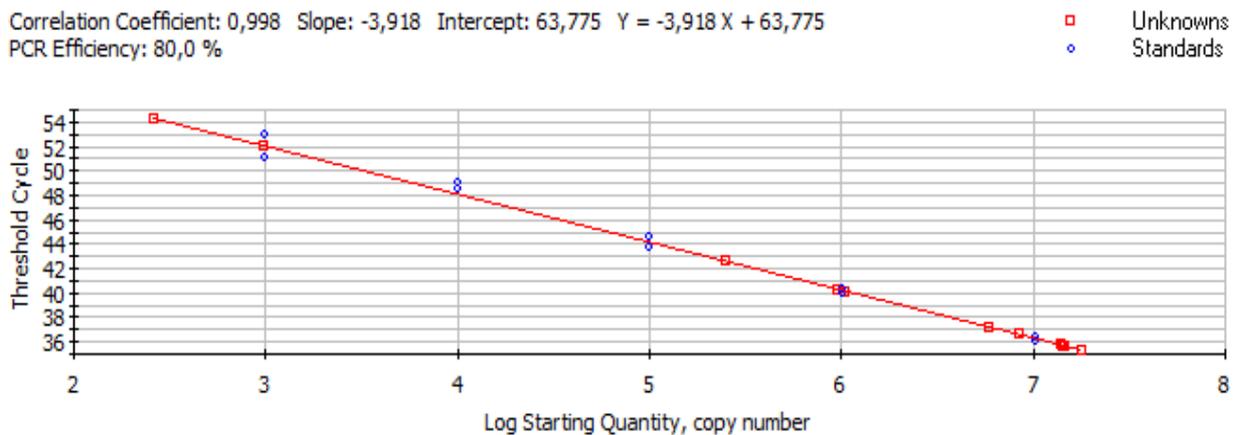
Grafico 3: Le curve indicano l'aumento di fluorescenza in base al numero di cicli di reazione. Fluorescenza rilevata con l'RNA estratto dai differenti substrati biologici dello stesso bovino PI.

## Tabella riassuntiva

Identificativo	Copie/reazione Me	DS copie	Ciclo soglia medio	DS ciclo soglia
270 biopsia auricolare	1113000,0	7.030,0	28,93	0,107
270 pbs	184000,0	11.000,0	32,16	0,102
270 pellet	831000,0	41.900,0	29,57	0,087
270 pelo	817000,0	1.070,0	29,60	0,002
270 siero	129000,0	4.170,0	32,76	0,055
270 Whatman FTA	8,7	5,1	49,41	1,070
270 Whatman Qiagen	1120,0	88,9	40,91	0,136
413 biopsia auricolare	14300000,0	220.000,0	24,69	0,026
413 pbs	209000,0	824,0	31,94	0,007
413 pellet	6270000,0	479.000,0	26,11	0,131
413 pelo	3500000,0	317.000,0	27,11	0,156
413 siero	1920000,0	271.000,0	28,14	0,242
413 Whatman FTA	68,9	N/A	45,69	N/A
413 Whatman Qiagen	14900,0	1.130,0	36,47	0,130
786 biopsia auricolare	6690000,0	1.280.000,0	26,01	0,330
786 pbs	65200,0	8.650,0	33,95	0,228
786 pellet	493000,0	1.650,0	30,47	0,006
786 pelo	425000,0	469,0	30,72	0,002
786 siero	101000,0	16.600,0	33,20	0,284
786 Whatman FTA	0,9	N/A	53,05	N/A
786 Whatman Qiagen	593,0	503,0	42,38	1,680

Tabella 5: Numero di copie di RNA virale rinvenuto nei templati dei differenti substrati biologici di 3 diversi animali

## Standard Curve Graph



Standard 3: Coefficiente di correlazione ed efficienza relativo all' esperimento su differenti substrati biologici.

Il siero e la soluzione PBS in cui è stata immersa la biopsia auricolare si sono dimostrati dei substrati idonei ad individuare i soggetti PI anche se la carica virale riscontrata è risultata inferiore a quella rinvenuta nei campioni ricchi di cellule.

Il sangue intero adsorbito su carta FTA Whatman ha permesso di evidenziare correttamente i PI solo dopo estrazione dell' RNA con il kit Qiagen. La carica virale evidenziata è risultata inferiore a quella riscontrata negli altri substrati biologici.

PCR Amp/Cycle Graph

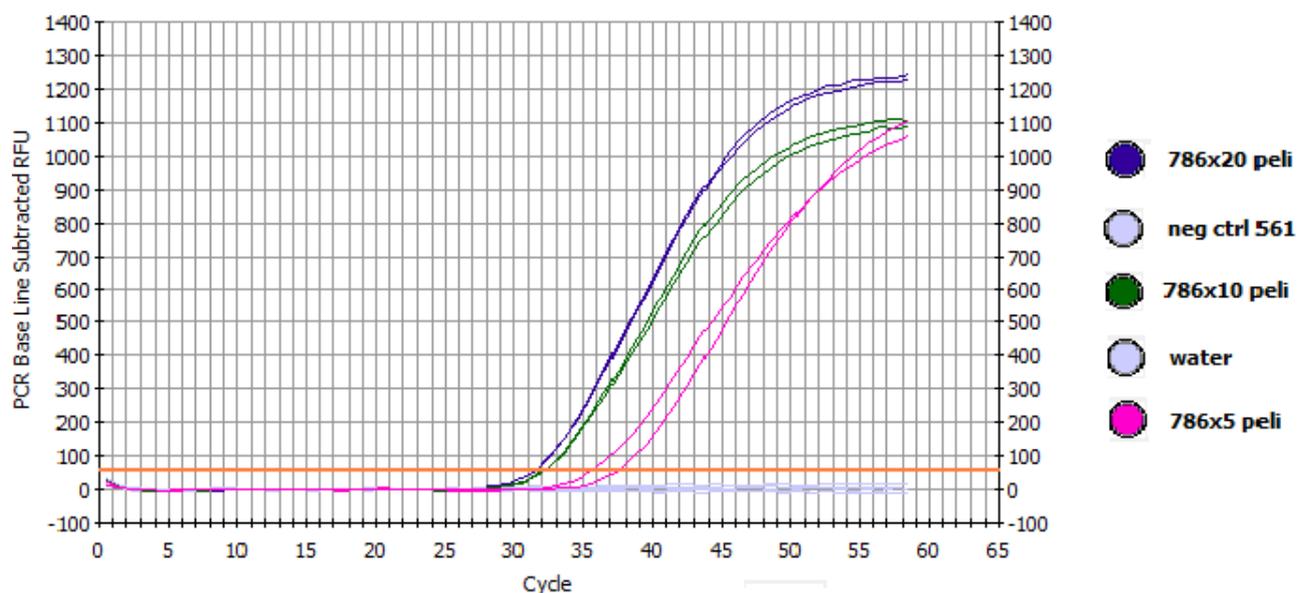


Grafico 4: Le curve indicano l'aumento di fluorescenza in base al numero di cicli di reazione. Fluorescenza registrata con l'RNA estratto da 20, 10 e 5 peli di un bovino PI

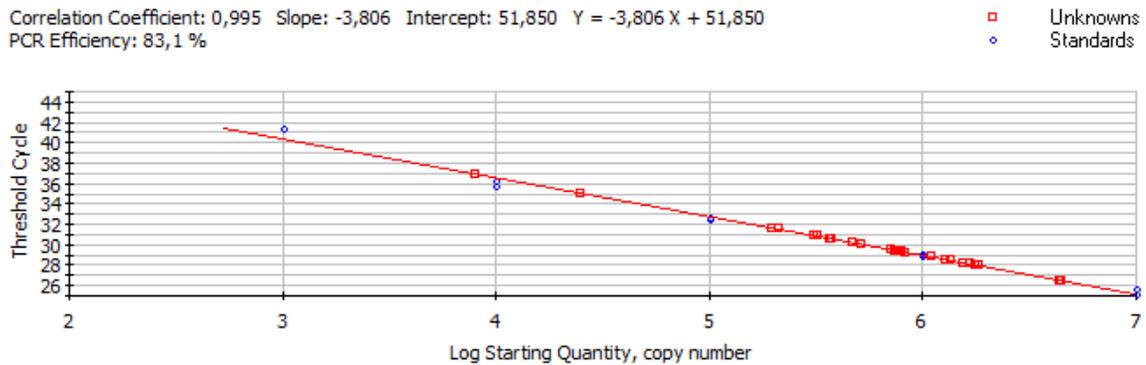
L'RNA estratto da 5, 10 e 20 bulbi piliferi ha permesso di individuare i bovini PI.

## Tabella riassuntiva

Identificativo	Numero di copie medio	DS copie	Ciclo soglia medio	Dev. Standard ciclo
270x05 peli	364.000	33.200	30,80	0,16
270x10 peli	817.000	27.100	29,38	0,06
270x20 peli	442.000	64.200	30,47	0,26
413x05 peli	765.000	26.800	29,49	0,06
413x10 peli	1.450.000	199.000	28,37	0,24
413x20 peli	1.720.000	52.200	28,06	0,05
786x05 peli	21.000	14.600	36,07	1,34
786x10 peli	222.000	10.800	31,67	0,09
786x20 peli	328.000	622	30,98	0,00

Tabella 6: Numero di copie di RNA virale ottenuto dall'estrazione da 20, 10 e 5 bulbi piliferi.

## Standard Curve Graph



Standard 4: Coefficiente di correlazione ed efficienza relativo all'esperimento su 20, 10 e 5 bulbi.

## Valutazione qualitativa del protocollo di estrazione tramite congelamento e scongelamento

Il protocollo di estrazione alternativo basato sul congelamento e scongelamento di acqua RNase free con immersi 20 bulbi piliferi ha permesso di identificare correttamente i soggetti PI.

PCR Amp/Cycle Graph

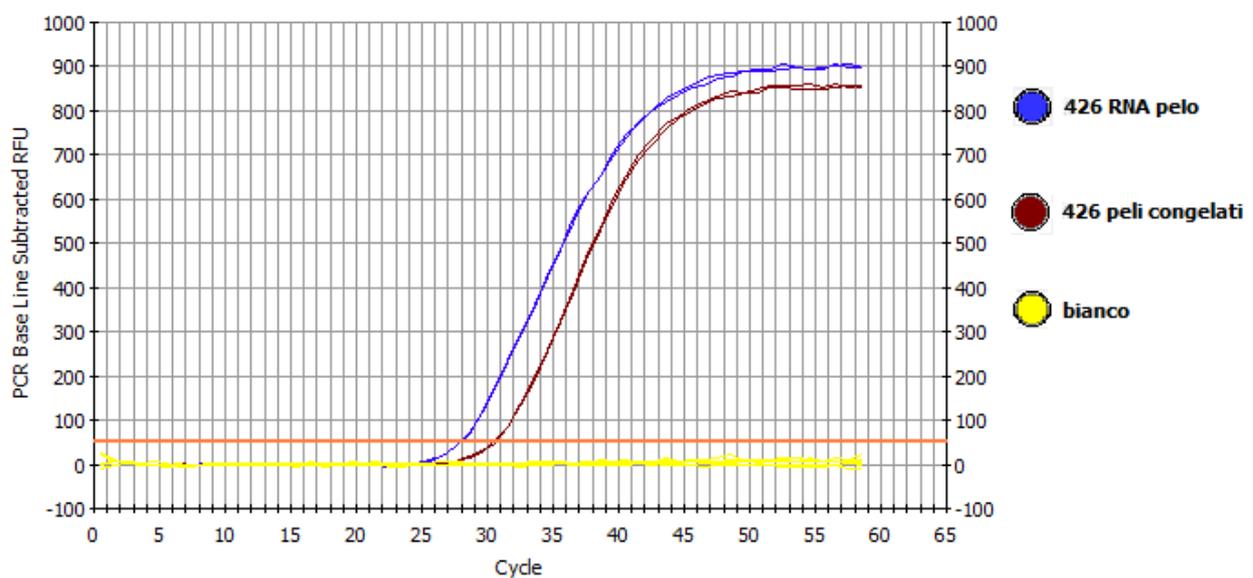
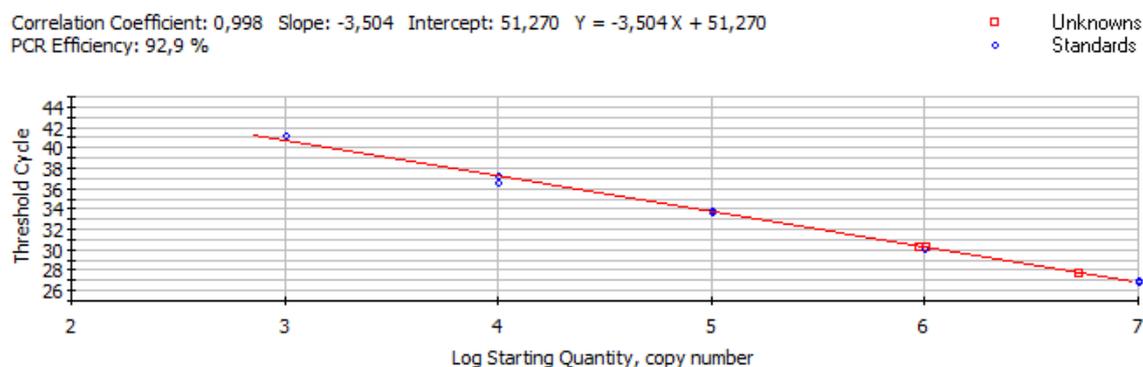


Grafico 5: Le curve indicano l'aumento di fluorescenza in base al numero di cicli di reazione. Fluorescenza registrata con l'RNA estratto da 20 peli e fluorescenza riscontrata con 10 $\mu$ l di acqua RNase free contenente il prodotto del congelamento/scongelamento di 20 bulbi piliferi di PI

## Standard Curve Graph



Standard 5: Coefficiente di correlazione ed efficienza relativo all'esperimento sui bulbi piliferi.

## Valutazione dei costi e dei tempi di lavorazione

I bulbi piliferi esaminati dopo congelamento/scongelo si sono dimostrati il substrato che ha coniugato i costi e tempi di lavorazione più bassi.

Tabella riassuntiva

tipologia di campione	FASE di RACCOLTA		FASE di ESTRAZIONE		Totali	
	Costo per campione	Tempo di lavorazione	Costo costo per campione	Tempo di lavorazione	Costi	Tempi
Biopsia auricolare	circa 0,50 €	Circa 3 minuti	Tra 4,5 e 5,5 €	Circa 50 minuti	Tra 5 e 6 €	Circa 53 minuti
Soluzione PBS	circa 0,50 €	Circa 3 minuti	Tra 5 e 5,5 €	Circa 30 minuti	Tra 5,5 e 6 €	Circa 33 minuti
Siero	Circa 0,70 €	Circa 3 minuti	Tra 5 e 5,5 €	Circa 30 minuti	Tra 5,7 e 6,2 €	Circa 33 minuti
Pellet di leucociti	Circa 0,70 €	Circa 3 minuti	Tra 4,5 e 5,5 €	Circa 40 minuti	Tra 5,2 e 6,2 €	Circa 43 minuti
Bulbi piliferi con estrazione RNA	Circa 1 €	Circa 1 minuto	Tra 4,5 e 5,5 €	Circa 50 minuti	Tra 5,5 e 6,5 €	Circa 51 minuti
Bulbi piliferi con congelamento	Circa 1 €	Circa 1 minuto	Circa 0,20 €	Circa 5 minuti	Circa 1,2 €	Circa 6 minuti
Sangue adsorbito su carta FTA Whatman	Circa 2 €	Circa 3 minuti	Tra 4,5 e 11,5 €	Circa 50 minuti	Tra 6,5 e 13,5 €	Circa 53 minuti
tipologia di campione	Punteggi analitici RACCOLTA		Punteggi analitici ESTRAZIONE		Totale	
Biopsia auricolare	1	2	2	4	9	
Soluzione PBS	1	2	3	2	8	
Siero	2	2	3	2	9	
Pellet di leucociti	2	2	2	3	9	
Bulbi piliferi con estrazione RNA	3	1	2	4	10	
Bulbi piliferi con congelamento	3	1	1	1	6	
Sangue adsorbito su carta FTA Whatman	4	2	4	4	14	

Tabella 7: Costi e tempi di lavorazione di ogni substrato biologico. Nella parte inferiore della tabella sono espressi gli indici di valutazione.

## 2.3 Conclusioni e discussione

Il protocollo di Real Time RT PCR sviluppato su sequenze 5' UTR italiane disponibili in letteratura è riuscito a rilevare il genoma virale di 4 differenti sottogenotipi di BVDV (1b, 1d, 1e e 1f) (comunicazione personale dott.ssa Ciulli, Università di Bologna) circolanti in allevamenti del Piemonte.

Il test si è dimostrato sufficientemente sensibile per identificare correttamente i PI e quantificare la carica virale. I dati relativi ai sieri e al pelo (tabella 4) dimostrano che la carica virale nei templati ottenuti da bulbi piliferi e sieri di bovini PI è risultata fra  $10^4$  e  $10^7$  per reazione.

Il test sulla sensibilità eseguito sull'RNA estratto da diluizioni seriali del siero proveniente da un bovino PI porta a concludere che la tecnica permette di identificare con una buona efficienza di reazione, fornendo un dato di tipo quantitativo, un template contenente almeno  $10^3$  copie di RNA virale. Confrontando questo dato con quello fornito dal saggio di immunocitochimica si può concludere che la sensibilità della Real Time RT PCR da noi sviluppata permette di quantificare il numero di copie di RNA estratto da una diluizione di BVDV pari a 10 volte la Dose Rilevabile 50.

La diluizione successiva del siero ( $10^{-4}$ ) ha dato un aumento della fluorescenza in entrambe le repliche evidenziata nel grafico 2 con curve dall'andamento non sigmoide e la visualizzazione del prodotto di PCR dopo elettroforesi in gel di agarosio al 3% ha permesso di evidenziare amplificati della dimensione attesa (80 bp).

L'assenza di aumento di fluorescenza nei controlli negativi e nel bianco di reazione indica che la fluorescenza registrata non è causata né da degradazione della sonda né da amplificazioni aspecifiche.

Queste osservazioni ci portano a concludere che il test sia in grado di evidenziare la presenza di RNA virale anche in templati con un numero di copie prossimo a  $10^2$ , ma con ridotta efficienza di reazione.

Il numero di copie virali riscontrate nei vari substrati biologici di soggetti PI da noi esaminati, è ampiamente superiore al limite di sensibilità dimostrato dal test. Inoltre la

sensibilità della metodica offre la possibilità di individuare un bovino PI con una diluizione di 1:1000 del campione di siero e questo apre la possibilità di impiegare la Real Time RT PCR per testare pool di campioni.

Le prove di ripetibilità eseguite in un lasso di tempo di quattro mesi hanno dimostrato che il numero di copie misurato sullo stesso template in diversi esperimenti è costante come ordine di grandezza, evidenziando l'integrità dell'RNA estratto e dell'RNA standard conservati a -80 °C in RNA safe Buffer. Il C.V. calcolato indica che l'ordine di grandezza del numero di copie di RNA virale non varia in modo tale da influenzare l'interpretazione qualitativa del risultato, permettendo di discriminare sempre correttamente i bovini PI dai non PI.

Dall'analisi dei risultati ottenuti dai vari substrati biologici emerge che il test sviluppato ha permesso di identificare correttamente i soggetti testati in differenti tipologie di campione.

Tutti i tipi di campione biologico esaminati hanno permesso di identificare correttamente gli animali PI. Il maggior numero di copie di RNA virale è stato rilevato nei substrati biologici ricchi di cellule (biopsia auricolare, pellet leucocitario e bulbi piliferi).

La biopsia auricolare si è dimostrata un materiale ricco di RNA virale, semplice da raccogliere e processabile con protocolli di estrazione collaudati. La presenza del virus in questi campioni non è influenzata da anticorpi colostrali per cui questa tecnica è ideale per una precoce individuazione dei PI anche con metodi che ricercano gli antigeni virali. La fase di raccolta, pur risultando veloce e non particolarmente invasiva, è poco apprezzata dagli allevatori a causa del possibile sanguinamento che può instaurarsi a seguito del prelievo. La possibilità di riscontrare una carica virale elevata (tabella 5) anche nella soluzione PBS in cui è stata immersa la biopsia permette di ottenere differenti substrati con lo stesso campione e di abbinare test diversi (PCR e IHC oppure ELISA cattura).

L'estrazione dell'RNA virale da pellet leucocitari e da siero si basa su procedure standardizzate e ampiamente documentate in letteratura (Letellier, 2003; Young, 2006); la carica virale è risultata sufficiente per identificare i PI.

Il test eseguito su RNA estratto da sangue intero adsorbito su carta FTA Whatman® ha permesso di individuare i PI solo quando l'estrazione è avvenuta utilizzando il kit di estrazione da tessuti Qiagen®.

La carica virale rilevata con questa tipologia di campione è risultata molto più bassa rispetto a tutti gli altri substrati; questo dato è sicuramente influenzato dalle esigue dimensioni del dischetto da cui viene estratto l'RNA (2mm di diametro) e dalla mancanza di un protocollo collaudato per la sua lavorazione. Durante la fase di raccolta la carta FTA Whatman offre il vantaggio di poter conservare i campioni a temperatura ambiente ma è necessario far asciugare il dischetto in luoghi idonei, condizione non sempre agevole da soddisfare in allevamento.

L'utilizzo dell' RNA estratto dai bulbi piliferi è risultato un metodo innovativo che ha permesso di identificare correttamente i bovini testati. In letteratura sono riportati tentativi di impiegare il pelo per l'identificazione dei PI (Hilbe, 2000) con protocolli di IHC, ma i processi di fissazione e di inclusione estremamente laboriosi hanno finito per rendere questi test poco praticati.

La raccolta dei campioni con il metodo descritto nel capitolo 2.1.5 è risultata estremamente vantaggiosa, coniugando una notevole velocità di prelievo ad un ridotto stress per gli animali.

La fase di estrazione dell' RNA dai follicoli piliferi è risultata abbastanza laboriosa a causa delle cariche elettrostatiche che portano i frammenti di pelo ad aderire alle pareti delle fiale. L'estrema leggerezza di questo tipo di campione espone inoltre al rischio di contaminare l'ambiente di lavoro. La possibilità di utilizzare un numero estremamente ridotto di bulbi piliferi per l'estrazione e l'adozione di buone pratiche di lavorazione sono sufficienti ad evitare le contaminazioni.

La possibilità di estrarre l'RNA virale dai bulbi piliferi tramite congelamento/scongelo permette sia di ridurre il costo legato all'impiego di kit commerciali per l'estrazione sia di ridurre la manipolazione dei campioni. Questo protocollo di lavorazione ha permesso di identificare correttamente i PI pur con una carica virale inferiore a quella evidenziata tramite l'estrazione con kit commerciali.

## Bibliografia

J. Baker -Bovine viral diarrhea virus: a review. -J Am Vet Med Assoc; (1987)190: 1449-1458.

J. Baker - The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection.- Vet Clin North Am Food Anim Pract; (1995) 11: 425-443.

M. Baxi, D. McRae, S. Baxi, I. Greiser-Wilke, S. Vilcek, K. Amoako, D. Deregt. - A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhea viruses - (2006) Veterinary Microbiology 116 37-44.

H. Bielefeld-Ohmann - Experimental fetal infection with bovine viral diarrhea virus. II. Morphological reactions and distribution of viral antigen.- (1982) Can J Comp Med; 46: 363-369.

C. Billinis, L. Leontides, G.S. Amiridis, V. Spyrou, P. Kostoulas, M. Sofia. - Prevalence of BVDV infection in Greek dairy herds.- (2005) Prev. vet. Med., 72 (1-2), 75-79.

S. Bolin, E.T. Litleledike, J. Ridpath - Serological detection and practical consequence of antigenic diversity among bovine viral diarrhoea virus in a vaccinated herd.- (1991) Am J Vet Res; 52:1033-1037

S. Bolin, E.T. Litleledike, J. Ridpath.- Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhea virus. - (1985) Am J Vet Res: 46: 573-576.

B.W. Brodersen. - Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhea virus infection.- (2004) Vet Clin North Am Food Anim Pract.; 20: 85-93.

S. Carman, T. Van Dreumel, J. Ridpath, M. Hazlett, D. Alves, E. Dubovi, R. Tremblay, S. Bolin, A. Godkin, N. Anderson. -Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario.- Journal of Veterinary Diagnostic Investigation; 1: 27-35, 1993-1995.

S. Cavirani. -La diarrea virale del bovino- Il virus. UTET Divisioni periodici; (2002) 3-6.

M.E. Collins, M. Desport, J. Brownlie - Bovine viral diarrhoea virus quasispecies during persistent infection.- (1999) *Virology*; 259:85-98,

W.V. Corapi, R.D. Elliot, T.w. French, D.G. Arthur, D.M. Bezek, E. J. Dubovi - Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus.- *JAVMA* ; (1990)196: 590-596.

W.V. Corapi, R.O. Donis, E.J. Dubovi -Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhea virus.- (1990) *Am J Vet Res. Sep*;51(9):1388-94

A. Crawford, C. Thomas, J. Heaney, M. Collins, J. Brownlie. - Persistence of BVDV in white blood cells following acute infection of calves.- 6th *ESVV Pestivirus Symposium*, Thun, Switzerland, September (2005), 37.

G.P. David, T.R.Crawshaw, R.F. Gunning, R. Hibberd , G. Lloyd, P. R. Marsh. -Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection.- (1994) *Vet Rec*; 134: 468-472.

E.J. Dubovi. - Genetic diversity and BVD virus.- (1992) *Comp Immunol Microbiol Infect Dis. Jul*;15(3):155-62.

K. Fairbanks, J. Schnackel, C.C. Chase. -Evaluation of a modified live virus type-1a bovine viral diarrhea virus vaccine (Singer strain) against a type-2 (strain 890) challenge.- (2003) *Vet Ther. Spring. 4*(1), 24-34.

E. Falcone, P. Cordioli, G. Sala, M. Tarantino and M. Tollis.- Genotyping of Bovine Viral Diarrhoea Viruses Isolated from Cattle in Northern Italy.- *Veterinary Research Communications*, 25 (2001) 161-167.

R. Farina R., F. Scatozza F. -*Trattato di malattie infettive degli animali*.- (1998) Ed. UTET, Torino.

R. Fulton, J.T. Saliki, A.W. Confer, L. Burge, J.M. d'Offay, R.G. Helman, S. Bolin, J. Ridpath, M.E. Payton. - Bovine viral diarrhea virus cytopathic and non cytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. - (2000) *J Vet Diagn Invest* 12: 33-38.

M.D. Givens, A.M. Heath, R.L. Carson, K.V. Brock, M.S.D. Edens, J.G.W. Wenzel, D.A. Stringfellow. - Analytical sensitivity of assays used for detection of bovine viral diarrhea virus in semen samples from the Southeastern United States- *Veterinary*

*Microbiology* 96 (2003) 145-155.

L.M. Gorgoza, P.E. Moran, J. L. Larghi, E. Segui, C. Lissarrague, M. Saracco, M. Braun, E. N. Esteban. - *Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) harboring seropositive cattle. Second European Symposium on: BVDV Control.*- (2004) Porto - Portugal; 18: 20-22.

D.A. Graham, I.E. McLaren, A. German. - *Evaluation of the suitability of a commercial bovine viral diarrhoea virus antigen capture ELISA for diagnostic testing.*- (1998)*Vet J*; 156: 149-154.

M. Hilbe, K. Zlinszky, F. Ehrensperger. - *Demonstration of Bovine Viral Diarrhoea (BVD) virus in hair root sheaths.* - (2000) *European Journal of Veterinary Pathology*, Vol 6, N.1.

B. Hoffmann, K. Depner, H. Schirrmeier, M. Beer. - *A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses* - *Journal of Virological Methods* 136 (2006) 200-209.

H. Houe. - *Survivorship of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus.*- (1993) *Prev Vet Med*; 15:275-283.

H. Houe. - *Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus.* - (1995) *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 11:521-547.

H. Houe - *Economic impact of BVDV infection in dairies.* *Biologicals*, 31 (2),(2003), 137-143.

H. Houe, A. Lindberg, V. Moennig.- *REVIEW ARTICLE- Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe.* -*Journal of Veterinary Diagnostic Invest*, 18 (2006) 427-436.

M. Hovi, A. McLeod, G. Gunn - *Assessing UK farmer attitudes to biosecurity on sheep and cattle farms.* - (2005) *Res.vet.Sci.*, 78 (suppl. 1), 24.

L. Hult, A. Lindberg. - *Experiences from BVDV control in Sweden.*- (2005) *Prev Vet Med*; 72: 143-148.

S. Kuhne, K.Schroeder, G. Holmquist, G. Wolf G, S. Corner, G. Brem, A. Ballagi. - *Detection of bovine viral diarrhoea virus infected cattle testing tissue samples derived*

*from era tagging using an Erns capture ELISA. (1999) J Vet Med B; 52:272-277*

*A. Joly, C. Fourichin, F. Beaudeau. - Description and first results of a BVDV control scheme in Brittany (western France).- (2005) Prev Vet Med; 72: 209-213.*

*Larson R.L., Grotelueschen D.M., Brock K.V., Dargatz D.A., Ellis J.A., Hunsaker B.D., Lewis S.D., MacGregor D.S., Smith R.A., Sprowls R.W. and Traffas V. - BVD decision/management guidelines for beef veterinarians. - (2004) Bov. Practit., 38 (1), 103-112.*

*C. Letellier, P. Kerkhofs, G. Wellemans, E. Vanopdenbosch. - Detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus by reverse transcription-polymerase chain reaction of the untranslated region.- (1999) Vet Microbiol; 64: 155-167.*

*C. Letellier, P. Kerkhofs. - Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. - (2003) J Virol Methods; 114: 21-27.*

*A. Lindberg, H. Groenendaal, S. Alenius, U. Emanuelson. - Validation of a test for dams carrying foetuses persistently infected with bovine viral diarrhoea virus based on the determination of antibody levels in pregnancy. (2001) Preventive Veterinary Medicine 51:199-214.*

*A. Lindberg, J. Brownlie, G.J. Gunn, H. Houe, V. Moennig, H.W. Saatkamp, T. Sandvik and P.S. Valle. -The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future . - Rev. sci. tech. Office international. Des Epizooties., 25 (3), (2006) , 961-979.*

*M.S. Lobmann, P. Charlier, C.L. Klaassen, N. Zygraich. Safety of a temperature-sensitive vaccine strain of bovine viral diarrhoea virus in pregnant cows. (1986) Am J Vet Res 47: 557-560.*

*O.J. Lopez, F.A. Osorio, R.O. Donis- Rapid detection of bovine viral diarrhoea virus by polymerase chain reaction - (1991) J Clin Microbiol. Mar;29(3):578-82.*

*B. Makoskey, M.G.J. Jansenn, M.P. Vrijenhoek, J. Korsten, P.V.D. Marel - An inactivated bovine virus diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2.- (2001) Vaccine; 19:3261-3268.*

*M.S. Marley, M.D. Givens, P.K. Galik, K. Riddell , D.A. Stringfellow. - Development of a duplex quantitative polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in bovine follicular fluid.- (2008)*

*Theriogenology*. Jul 15;70(2):153-60.

M.H. Mars, C. Van Maanen - Diagnostic assays applied in BVDV control in The Netherlands.- *Preventive Veterinary Medicine* 72 (2005) 43-48.

A.W. Mc Clurkin, S. Bolin, M.F. Coria. - Isolation of cytopathic and noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea.- (1985) *J Am Vet Med Assoc.* 186, 568-569.

A. Moen, J. Sol , O. Sampimon. - Indication of transmission of BVDV in the absence of persistently infected animals.- (2005) *Prev. Vet. Med.* 72, 93-98.

V. Moennig ,H.Houe, A.Lindberg. - BVD control in Europe: current status and perspectives.- (2005) *Anim. Hlth Res. Rev.*, 6 (1), 63-74.

J. Niza-Ribeiro, A. Pereira, J. Souza, H. Madeira, A.Barbosa, C. Afonso. - Estimated BVDV-prevalence, -contact and -vaccine use in dairy herds in Northern Portugal.- (2005) *Prev Vet Med.* 15;72(1-2):81-5

B.L. Njaa, E.G. Clark, E. Janzen, J.A. Ellis, D.M. Haines. -Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens.- (2000) *J Vet Diagn Invest.* Sep;12(5):393-9

Nuotio L., Juvonen M., Neuvonen E., Sihvonen L. and Husu-Kallio J. - Prevalence and geographic distribution of bovine viral diarrhoea (BVD) infection inFinland 1993-1997.- (1999) *Vet. Microbiol.*, 64 (2-3), 231-235.

A. Pankraz, H.J.Thiel, P. Becher. -Essential and nonessential elements in the 3' nontranslated region of Bovine viral diarrhea virus.- *Journal of Virology* 79(14); (2005):9119-27.

C. Pellerin, Hurk jan van den, J. Lecomte, P. Tussen. - Identification of a New Group of bovine Viral Diarrhea Virus Strains Associated with Severe Outbreaks and High Mortalities. - (1994) *Virol.* 203, 260-268.

J. Ridpath - Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: Impact of biotype and genotype on U.S. control programs.- *Preventive Veterinary Medicine*; (2005), 72:17-30

J. Ridpath, S. K. Hietala, S. Sorden, J.D. Neill. -Evaluation of the reverse transcription-polymerase chain reaction/probe test of serum samples and immunohistochemistry of skin sections for detection of acute bovine viral diarrhoea infections- (2002) *J Vet Diagn Invest* 14:303-307 .

J. Ridpath, S. Bolin - Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Mol Cell Probes* (1998); 12:101-106.

W. Rossmanith, R. Janacek, E. Wilhelm. - Control of BVDV-infection on common grassland: the key for successful BVDV-eradication in Lower Austria.- (2005) *Prev. Vet. Med.* 72 (1-2), 133-137, discussion 215-219.

T. Sandvik, J. Krogsrud. - Evaluation of an antigen-capture ELISA for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle blood samples. - (1995) *J Vet Diagn Invest*; 7: 65-71.

T. Sandvik. - Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe.- (2004) *Vet Clin North Am Food Anim Pract*; 20: 151-169

T. Sandvik. - Selection and use of laboratory diagnostic assay in BVD control programmes.- (2005) *Pre Vet Med*; 72: 3-16.

D.H. Schlafer, J.H. Gillespie, R.H. Foote, S. Quick, N.N. Pennow, E.I. Schiff, S.E. Allen, P.A. Powers, C.E. Hall, H. Voss.- Experimental transmission of bovine viral diseases by insemination with contaminated semen or during embryo transfer. - (1990) *Dtsch. Tierarztl Wochenschr* 1990; 97:68-72.

R. L. Smith, M.W. Sanderson, D.G. Renter, R.L. Larson, B.J. White. - A stochastic model to assess the risk of introduction of bovine viral diarrhoea virus to beef cow-calf herds.- *Preventive Veterinary Medicine* (2008).

B.A.Synge, A.M. Clark, J.A.E. Moar, J.T.Nicolson, P.F Nettleton, J.A. Herring . - The control of bovine viral diarrhoea virus in Shetland. (1999) *Vet. Microbiol.*, 64 (2-3), 223-229.

P.S.Valle, E.Skjerve, S.W Martin., R.B.Larssen, O. Österås, O. Nyberg . - Ten years of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) control in Norway: a cost-benefit analysis.- (2005) *Prev. Vet. Med.*, 72 (1-2), 189-20

J.T. Van Oirschot. - Diva vaccines that reduce virus transmission. - (1999) *J Biotechnol.* 20 73(2-3), 195-205.

Š. Vilcek, D.J. Paton, B. Durkovic, L. Strojny, G. Ibata, A. Moussa, A. Loitsch, W. Rossmannith, S. Vega, M.T. Scicluna, V. Palfi.- *Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups.*- (2001) *Arch Virol*; 146: 99-115.

Š. Vilcek., I. Greiser-Wilke , B. Durkovic, W. Obritzhauser, A. Deutz, J. Kofer. - *Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from the southeast of Austria (Styria).*- (2003). *Veterinary Microbiology* 91, 285-291.

Š. Vilcek, B. Durkovic, M. Kolesarova, I. Greiser-Wilke, D.J. Paton. - *Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group.*- (2004) *Vet. Re.* 35, 609-615.

N.J. Young, C.J. Thomas, M.E. Collins, J. Brownlie. - *Real-time RT-PCR detection of Bovine Viral Diarrhoea virus in whole blood using an external RNA reference* - (2006) *Journal of Virological Methods* 138. 218-222.

# Appendice

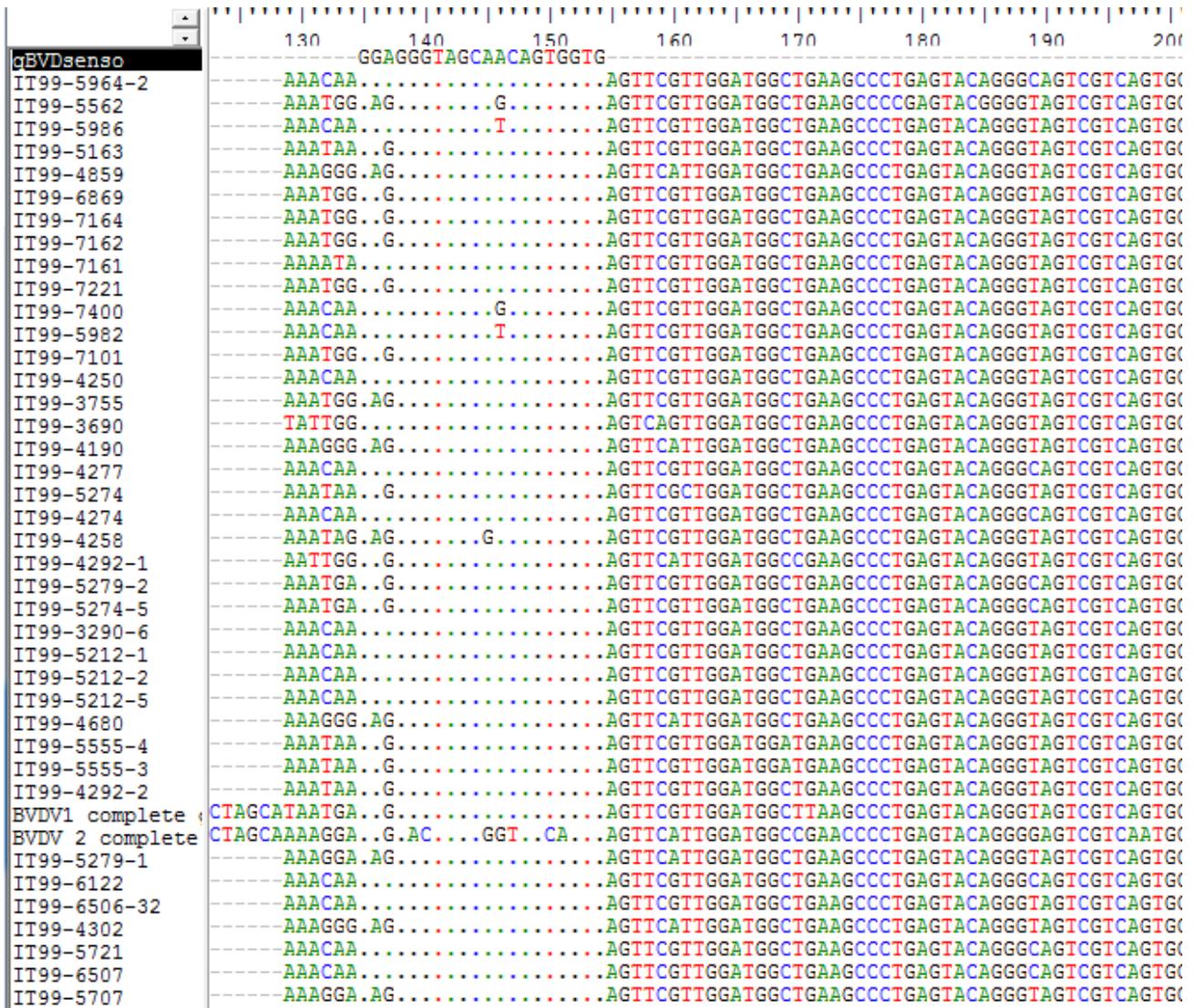


Immagine 6: Allineamento fra il primer qBVD senso e le 40 sequenze utilizzate.



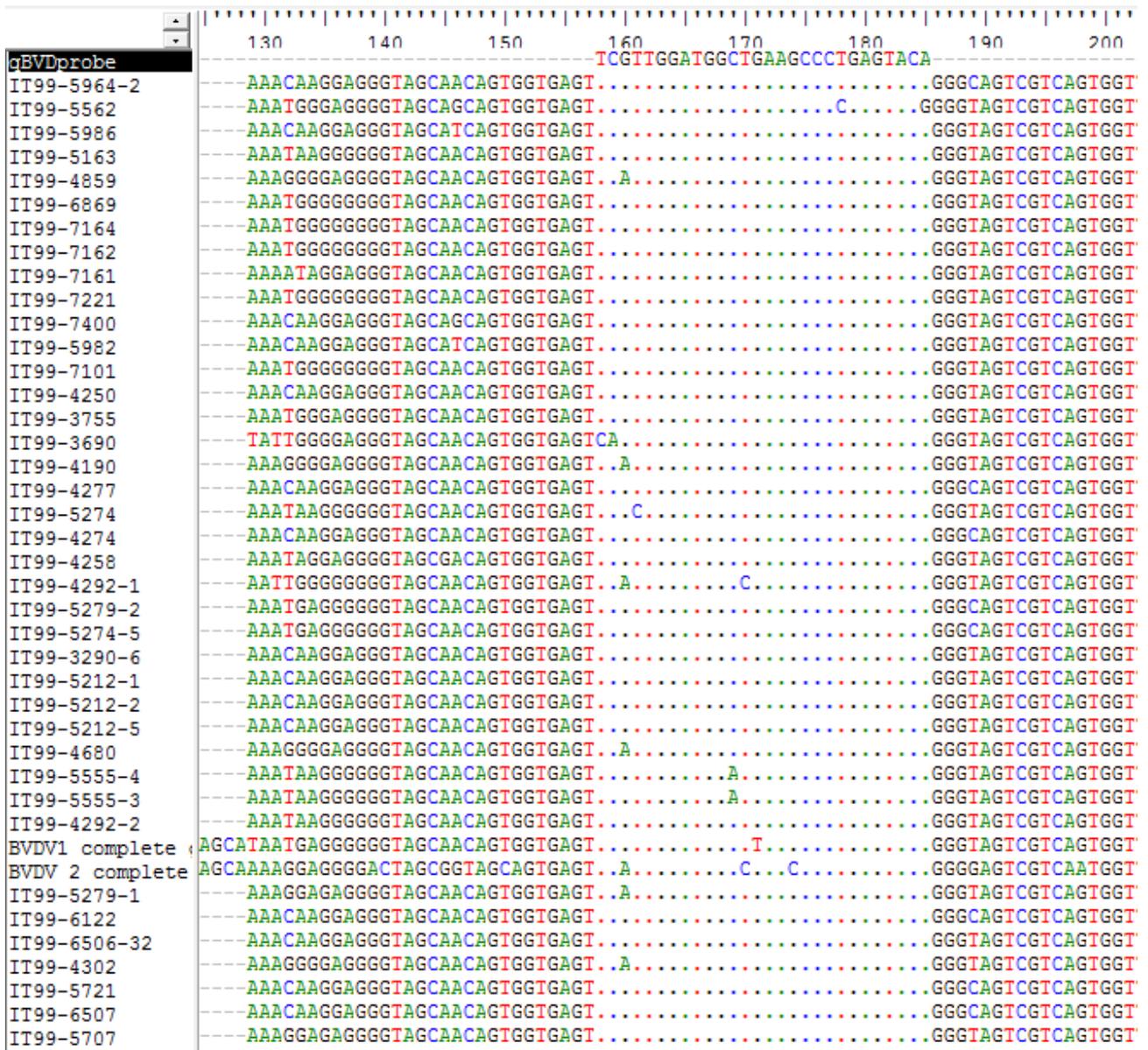


Immagine 8: Allineamento fra la sonda qBVD probe complementata e revertata e le 40 sequenze utilizzate.