



UNIVERSITA' DI PISA  
Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria

***Strategie di controllo ed eradicazione  
della Diarrea Virale Bovina: esperienze  
nell'allevamento della tenuta di Paganico  
(GR)***

Candidato: Boscarelli Francesco

Relatori: Dott. Maurizio Mazzei

Prof. Francesco Tolari

Dott. Francesca Pisseri

*ANNO ACCADEMICO 2010-2011*

*ai miei genitori*

# INDICE

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Riassunto/Abstract..... | pag. 5 |
|-------------------------|--------|

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Introduzione..... | pag. 6 |
|-------------------|--------|

## Capitolo I

|       |                                 |         |
|-------|---------------------------------|---------|
| 1     | Diarrea Virale Bovina.....      | pag. 7  |
| 1.1   | Eziologia.....                  | pag. 7  |
| 1.2   | Patogenesi.....                 | pag. 7  |
| 1.3   | Epidemiologia.....              | pag. 8  |
| 1.4   | Aspetti anatomo-patologici..... | pag. 9  |
| 1.5   | Diagnosi.....                   | pag. 11 |
| 1.5.1 | Diagnosi indiretta.....         | pag. 12 |
| 1.5.2 | Diagnosi diretta.....           | pag. 12 |

## Capitolo II

|       |                                      |         |
|-------|--------------------------------------|---------|
| 2     | Controllo e profilassi.....          | pag. 16 |
| 2.1   | Profilassi vaccinale.....            | pag. 16 |
| 2.2   | Profilassi diretta.....              | pag. 20 |
| 2.3   | Piani di eradicazione.....           | pag. 21 |
| 2.3.1 | Piani di eradicazione in Europa..... | pag. 24 |
| 2.3.2 | Piani di eradicazione in Italia..... | pag. 48 |

## Capitolo III

|       |                                       |         |
|-------|---------------------------------------|---------|
| 3     | Ricerche personali.....               | pag. 57 |
| 3.1   | Introduzione.....                     | pag. 57 |
| 3.2   | Allevamento oggetto dello studio..... | pag. 58 |
| 3.2.1 | Situazione sanitaria.....             | pag. 60 |
| 3.3   | Attività sperimentale.....            | pag. 63 |
| 3.3.1 | Primo controllo.....                  | pag. 63 |
|       | Prelievo campioni.....                | pag. 63 |
|       | Prove eseguite.....                   | pag. 64 |
|       | Risultati.....                        | pag. 66 |
| 3.3.2 | Secondo controllo.....                | pag. 67 |
|       | Prelievo campioni.....                | pag. 67 |
|       | Prove eseguite.....                   | pag. 68 |
|       | Risultati.....                        | pag. 68 |
| 3.3.3 | Terzo controllo.....                  | pag. 68 |
|       | Prelievo campioni.....                | pag. 68 |
|       | Prove eseguite.....                   | pag. 69 |
|       | Risultati.....                        | pag. 70 |
| 3.3.4 | Quarto controllo.....                 | pag. 71 |
|       | Prelievo campioni.....                | pag. 71 |
|       | Prove eseguite.....                   | pag. 72 |
|       | Risultati.....                        | pag. 72 |

|       |                           |         |
|-------|---------------------------|---------|
| 3.3.5 | Ricerche collaterali..... | pag. 73 |
| 3.3.6 | Conclusioni.....          | pag. 74 |

|  |                   |         |
|--|-------------------|---------|
|  | Bibliografia..... | pag. 77 |
|--|-------------------|---------|

|  |                     |         |
|--|---------------------|---------|
|  | Ringraziamenti..... | pag. 86 |
|--|---------------------|---------|

## **RIASSUNTO**

Parole chiave: diarrea virale bovina, eradicazione, allevamento brado, ELISA, PCR.

La Diarrea Virale Bovina è responsabile di un complesso di manifestazioni cliniche nel bovino, che spaziano da lievi sintomi fino alla forma letale della malattia delle mucose. Le perdite economiche provocate dall'infezione dal virus della BVD hanno indotto molti paesi Europei ad intraprendere programmi di eradicazione e controllo. Il primo passo verso l'eradicazione è l'identificazione e l'eliminazione degli animali persistentemente infetti (PI), ma la strategia applicata può dipendere dalle dimensioni dell'allevamento e dalla prevalenza dell'infezione. Dopo una rassegna bibliografica su controllo e strategie di eradicazione, riportiamo i risultati ottenuti in un allevamento brado situato nella provincia di Grosseto. La strategia di eradicazione applicata si basa sull'integrazione di metodi diagnostici diretti ed indiretti (ELISA per la ricerca di anticorpi ed antigene e PCR). I progressi conseguiti nel programma di eradicazione sono stati valutati alla luce dei risultati ottenuti.

## **ABSTRACT**

Keywords: *Bovine viral diarrhea, eradication, free-range cattle, ELISA, PCR.*

*Bovine viral diarrhea cause a complex of diseases in cattle, ranging from mild signs to lethal mucosal disease. The economic losses caused of BVDV infections has led several European countries to start eradication and control programmes. The primary step of eradication is the identification and slaughtering of persistently infected (PI) animals, but the strategy applied may vary depending on the size of the farm and the prevalence of infection in the cattle population. After a review of the literature on the topic of control and eradication strategies, we report the results obtained in a free-range cattle farm located in the province of Grosseto. The eradication strategy was based on the integration of direct and indirect diagnostic method (ELISAs to detect both antibodies and viral antigens and PCR). The progress of the eradication procedure was evaluated according to the obtained results.*

## Introduzione

La Diarrea Virale Bovina/Malattia delle Mucose (BVD/MD) è una malattia infettiva virale a diffusione mondiale causa di gravi perdite economiche in tutti i Paesi dove è praticato l'allevamento dei bovini. L'infezione da virus della Diarrea Virale Bovina (BVDV) è responsabile di un complesso di manifestazioni cliniche che spaziano da lievi sintomi fino alla forma letale della Malattia delle Mucose (MD), anche se l'impatto economico più rilevante è dovuto all'interferenza sull'attività riproduttiva. Infatti l'infezione di una bovina in età riproduttiva, in particolar modo durante la gravidanza, può determinare ridotta fertilità, malformazioni congenite, ritardi di accrescimento e aborti negli allevamenti colpiti. Un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'infezione è svolto dagli animali persistentemente infetti (PI), diffusori continui del virus. 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 stipiti ad elevata virulenza (Houe, 2003). Diversi sono i paesi Europei che hanno intrapreso un programma di controllo ed eradicazione della BVD, scelta supportata negli ultimi anni da studi che hanno evidenziato i benefici economici derivanti da tali piani già nel breve termine. In Norvegia, ad esempio, è stato dimostrato che i costi del piano di eradicazione furono già recuperati il secondo anno dopo il suo inizio, e il guadagno netto nell'intero periodo del piano fu intorno ai 19 milioni di euro (Valle,2004). In Italia recenti studi hanno verificato che la presenza di PI in allevamenti da latte di grandi dimensioni determina perdite del 6-7 % della produzione latte, mentre in quelli da carne genera un costo di 4 euro per animale se si prende in considerazione solo la mortalità e di 55 euro a capo se si considerano i trattamenti terapeutici e i mancati incrementi ponderali, dimostrando anche nel nostro paese l'importanza di interventi immediati. Scopo della presente tesi è la valutazione dell'applicazione di strategie di controllo e di eradicazione basate sull'integrazione di metodiche diagnostiche dirette ed indirette in un allevamento biologico di bovini da carne allevati allo stato brado.

# Capitolo I

## Diarrea Virale Bovina

### 1.1 Eziologia

Il virus agente della Diarrea Virale Bovina (BVDV) è un *Pestivirus* appartenente alla famiglia *Flaviviridae* (figura 1). Allo stesso genere appartengono gli agenti della Peste Suina Classica (CSFV) e della *Border Disease* (BDV), con i quali BVDV è antigenicamente e geneticamente correlato. Nella specie virale BVDV si riconoscono due genotipi: il genotipo 1, maggiormente diffuso, e il genotipo 2. Lo spettro d'ospite in vivo comprende i ruminanti domestici e selvatici appartenenti a diverse famiglie quali: *Antilocapridae*, *Bovidae*, *Camelidae* e *Cervidae* (Farina et al., 2002).

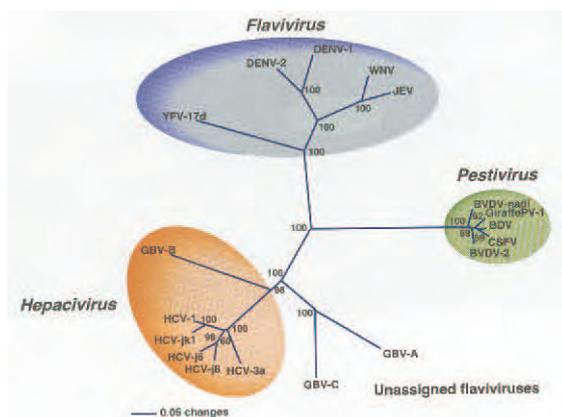


Fig.1: Famiglia delle *Flaviviridae*.

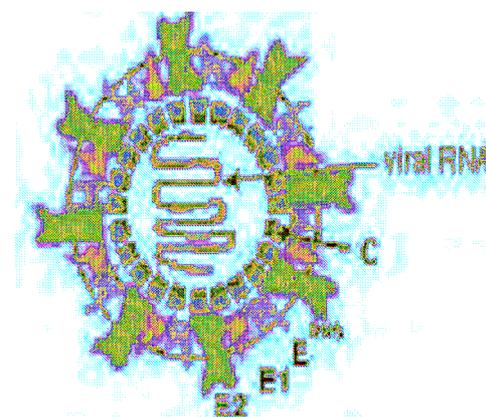


Fig.2: Struttura BVDV.

### 1.2 Patogenesi

A seguito dell'infezione acquisita, per via digerente o per via respiratoria, il virus replica a livello delle mucose. Segue una fase viremica in cui il virus viene veicolato nell'organismo attraverso i linfociti. Il virus può essere rilevato nel sangue dopo 2-4 ore dall'inoculazione sperimentale in vitelli sensibili e la viremia può durare fino a 14 giorni. L'infezione in soggetti normoergici raramente esita in malattia grave e solitamente il decorso è benigno. Nei soggetti adulti spesso l'infezione risulta asintomatica e generalmente determina linfopenia, anche marcata, ma sempre transitoria (Broes et al., 1992). Sono segnalate forme cliniche di gravità variabile, che coinvolgono apparati diversi, dovute alla concomitanza di infezioni da parte di agenti patogeni secondari che trovano nello stato di immunodepressione del bovino la condizione ideale

per manifestare a pieno il loro potere patogeno (Baker, 1987). La patogenesi della forma congenita è dipendente dalla fase della gestazione in cui si verifica l'infezione e dalle caratteristiche del virus. Il feto risulta sensibile all'infezione già dopo l'annidamento dell'embrione e nei primi 3 mesi di gestazione l'infezione da BVDV citopatogeno determina alterazioni fetali ed interruzione della gravidanza (Cavirani, 2002). L'infezione della bovina gravida da parte di BVDV non citopatogeno (NCP) entro i primi 4 mesi di gestazione, quando il sistema immunitario non è ancora maturo, esita in uno stato di immunotolleranza del feto (Pastoret et al., 1998). I soggetti immunotolleranti rimangono PI per tutta la vita e sono una sorgente continua di virus che consente il mantenimento e la diffusione dell'infezione all'interno del gruppo. Il destino degli animali immunotolleranti è legato all'eventualità che questi soggetti subiscano una super infezione da parte di uno stivite di BVDV omologo a quello che ha indotto lo stato di tolleranza immunitaria, ma questa volta CP (citopatogeno). In tal caso l'animale manifesterà la MD. Infezioni contratte tra il quarto e il sesto mese di gravidanza possono produrre alterazioni fetali con ipoplasia cerebellare ed alterazioni oculari (Marcato, 2002). Oltre questo periodo il feto è in grado di contrastare autonomamente il virus, pertanto si avrà un parto a termine e l'unico segno di avvenuto contatto con il virus durante la vita fetale sarà rappresentato dal rilievo di anticorpi sierici specifici, già prima dell'assunzione del colostro (Barber et al., 1985).

### **1.3 Epidemiologia**

La trasmissione di BVDV può avvenire per via verticale o per via orizzontale. La modalità più frequente d'infezione è l'introduzione di soggetti PI apparentemente sani (generalmente manze di rimonta) o di femmine in gravidanza portatrici di un feto infetto (Houe, 1995).

I soggetti PI non rappresentano l'unica via d'introduzione del virus, ulteriore fonte d' infezione è rappresentata dagli animali con una viremia transitoria (Moen, 2005). L'infezione primaria postnatale può svolgere un ruolo importante nella trasmissione del virus soprattutto se associata a sintomatologia respiratoria, in quanto la trasmissione avviene prevalentemente e con maggiore efficienza mediante aerosol. Secreti ed escreti di bovini con infezione primaria post natale risultano infettanti durante la fase di viremia transitoria, generalmente dal 4° al 10° giorno post-infezione. Tra le modalità di infezione vanno considerate anche se meno frequenti, la trasmissione iatrogena (Fusco

et al., 1997), il contatto di animali sensibili con soggetti escretori di virus appartenenti ad altre specie di ruminanti l'infezione di bovine sensibili con il seme di tori escretori (Meyling, 1988 ; Schlafer, 1990).

## 1.4 Aspetti anatomo-clinici

I quadri clinici correlati all'infezione da BVDV nel bovino variano in relazione allo stipte virale infettante, alle caratteristiche dell'ospite (età, condizione immunitaria, stato gravidico) e all'intervento di fattori esterni all'ospite, che possono favorire, scatenare e/o complicare l'attività patogena del virus (Brownlie et al., 1984). Si possono distinguere due sindromi principali : la MD e l'infezione primaria post natale. Quest'ultima suddivisibile a sua volta in: forma subclinica, diarrea virale bovina, sindrome emorragica e forma acuta grave.

### Malattia delle Mucose

Si manifesta solitamente in animali di età compresa tra i 6 ed i 24 mesi, ha carattere sporadico (bassa morbilità) ed esito letale (alta mortalità). L'animale manifesta febbre, emissione di feci liquide frammiste a sangue e fibrina (figura 3), spesso si osserva tenesmo. Caratteristica è la scialorrea (figura 4) associata ad erosioni della mucosa nasale e del cavo orale, del musello, degli spazi interdigitali e del cercine coronario (Trauttwein, 1991).



**Fig.3:** Feci sanguinolente



**Fig.4:** Lesioni buccali con scialorrea.

La morte sopraggiunge nell'arco di 5-7 giorni dall'esordio dei sintomi. Il quadro anatomo-patologico è dominato da lesioni a carico dell'apparato digerente: lesioni erosive ed ulcerative a livello della mucosa oro-esofagea e abomasale, con interessamento anche della sottomucosa, e a livello enterico si ha coinvolgimento delle

placche del Peyer e la porzione prossimale del colon, a testimonianza del tropismo del BVDV per il tessuto linfoide (Marcato, 2002). La milza appare di volume e spessore ridotti, reperto che da alcuni Autori viene ritenuto caratteristico di MD (Baker, 1987; 1995).

### Forma subclinica

In bovini immunocompetenti il BVDV tipo 1 determina un'infezione che generalmente decorre in maniera asintomatica, mentre più raramente si manifesta con una sintomatologia blanda caratterizzata da un leggero rialzo febbrile, leucopenia, inappetenza e diarrea. Si può inoltre riscontrare un calo nella produzione latte (Baker, 1995).

### Diarrea Virale Bovina (BVD)

Questa forma si manifesta solitamente nei giovani animali di pochi mesi d'età. L'infezione può essere acquisita precocemente, nei primi giorni di vita, o anche nelle fasi terminali della gravidanza. Dopo un'incubazione di 3-5 giorni, si ha un'ipertermia febbrile bifasica, accompagnata da leucopenia più o meno marcata; tali sintomi possono passare inosservati. Gli animali sierocconvertono, producendo anticorpi neutralizzanti e raggiungono il titolo più elevato circa 10 settimane dopo l'evento infettante. Nel vitello normoergico si osserva enterite acuta, associata a diarrea, senza caratteri patognomici. 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 linfoadenite mesenterica (Bielefeldt et al., 1995).

Altri sintomi riscontrabili sono: depressione, anoressia, respirazione accelerata, riduzione della produzione latte, scolo oculo-nasale e occasionali erosioni a carico della cavità orale responsabili di scialorrea (Marcato, 2002). 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.

### Sindrome Emorragica

Segnalata in corso di episodi acuti causati da BVDV, colpisce in prevalenza giovani animali ma è stata riscontrata anche in animali adulti. Questa forma è sostenuta da alcuni stipiti di BVDV tipo 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 (Sali et al., 2004). La diatesi emorragica si manifesta con petecchie emorragiche ed emorragie estese su cute e mucose (congiuntiva, sclera, mucose nasali, gengivali, prepuziali, vaginali). Il decorso è grave e la malattia è pressoché costantemente ad esito letale.

### Forma Acuta Grave

Gli animali, frequentemente adulti, presentano diarrea, febbre (di tipo bifasico e che può raggiungere i 41 ° C), anoressia, più o meno marcata secrezione oculo-nasale, caduta della produzione lattea nelle bovine in lattazione. Dal terzo giorno dell'infezione si manifesta una spiccata leucopenia. Gli animali che sopravvivono in condizioni di immunosoppressione sviluppano occasionalmente una zoppicatura cronica per infezioni batteriche secondarie a carico degli unghioni o dell'articolazione interfalangea distale. La comparsa di aborto rappresenta un evento non costante (Douart et al., 1997), così come la presenza di lesioni a carattere ulcerativo a carico delle mucose dell'apparato gastroenterico. L'indagine eziologica ha portato a riconoscere l'intervento del BVDV-NCP tipo 2 (Cavirani, 2002; David et al., 1994).

## **1.5 Diagnosi**

La grande variabilità delle manifestazioni cliniche provocate da BVDV rende molto ardua la sua diagnosi, infatti la sintomatologia e le lesioni anatomo-patologiche possono solo fornire un sospetto di malattia che deve essere confermato mediante indagini di laboratorio. Diverse metodiche di laboratorio possono essere utilizzate per la diagnosi diretta (rilevazione del virus) o indiretta (rilevazione degli anticorpi).

### **1.5.1 Diagnosi indiretta**

Permette di verificare la presenza dell'infezione in un allevamento e di individuare gli animali con un'infezione acuta quando si rilevi una sierconversione. Inoltre risulta fondamentale nella fase preliminare per la individuazione dei sieronegativi potenziali PI. Le metodiche più utilizzate sono la sieroneutralizzazione e l'ELISA indiretta.

## Sieroneutralizzazione

La sieroneutralizzazione è un saggio biologico in vitro che si basa sulla proprietà del siero di 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 soggetti immuni sono prevalentemente rivolti nei confronti delle proteine strutturali, in particolare nei confronti della proteina E2 (Sandvik, 2005). Non ci sono ceppi di referenza universalmente accettati per questo test, ma quelli più utilizzati sono il ceppo NADL e il ceppo Oregon C24V (Brock, 1995). 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 stipti di BVDV citopatogeni 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.

## ELISA

L'ELISA è una metodica che, pur dimostrando una minore sensibilità rispetto alla sieroneutralizzazione, ha notevoli vantaggi : può essere applicata a singoli campioni o a pool di sieri e al latte di stalla; non richiede attrezzature complesse per la sua esecuzione; risulta economica; può essere automatizzata; fornisce una risposta nel giro di poche ore e permette di esaminare un cospicuo numero di campioni contemporaneamente. Uno dei test che viene maggiormente 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 (Saliki, 2004).

### **1.5.2 Diagnosi diretta**

Risulta indispensabile per l'identificazione dei soggetti PI e per lo studio della variabilità biologica e genotipica dei vari stipti virali circolanti. I campioni biologici utilizzati per la ricerca virale possono essere le feci, le secrezioni nasali, il latte e vari organi (milza, polmone e rene) di soggetti con infezione transitoria o 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 di sangue provenienti da soggetti PI,

presentano generalmente cariche virali molto elevate. Risultano sempre positive le biopsie cutanee prelevate dai PI mentre quelle dei soggetti sani o con infezione transitoria sono sempre negative indipendentemente dall'età. Le metodiche più utilizzate sono l'isolamento virale, la ricerca degli antigeni virali e la ricerca del genoma virale.

### Isolamento 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 bovino) o in linea continua di origine bovina (BT e MDBK). 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 utilizzando le cellule mononucleate (Saliki, 2004). L'identificazione degli stipiti di BVDV citopatogeni avviene grazie all'effetto citopatico da essi indotto ma, poichè la maggioranza degli stipiti di BVDV non è citopatogena, all'esame colturale deve seguire l'impiego di tecniche che consentano l'identificazione del virus nelle cellule infette.

### Ricerca degli antigeni

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. Le metodiche utilizzate sono l'ELISA di cattura e l'immunoistochimica (IHC).

La disponibilità di anticorpi monoclonali verso antigeni virali altamente conservati quali le proteine NS3, E2 e E<sup>ns</sup> ha permesso lo sviluppo di diversi kit commerciali di ELISA. Tali test hanno dimostrato una buona sensibilità e specificità se impiegati sulla frazione leucocitaria del sangue, mentre risultano meno sensibili se applicati sul siero (Sandvik, 1995; Graham, 1998). In particolare il test per la ricerca della proteina NS3, la quale risulta essere meno variabile nei diversi stipiti di BVDV, è risultato adeguato per la ricerca virale in estratti di organi linfatici o nelle sospensioni di leucociti, mentre è risultato meno sensibile sul siero a causa della ridotta carica virale. Il test ELISA maggiormente impiegato nei piani di controllo e di eradicazione è quello per la ricerca della glicoproteina E<sup>ns</sup>, in quanto è utilizzabile sul siero ematico dove tale proteina è presente in grande quantità. E' inoltre idoneo per la ricerca degli antigeni in estratti di

porzioni cutanee prelevati mediante biopsie (Kuhne, 1999). E' da tener presente, quando si esaminano campioni di sangue, che gli anticorpi passivi di origine colostrale potrebbero dar luogo a risultati falsi negativi (nei soggetti con età inferiore ai 6 mesi) e che è possibile rilevare la presenza del virus in circolo per alcuni giorni nelle infezioni transitorie. Per tali motivi risulta fondamentale, negli allevamenti dove è presente l'infezione, testare gli animali dopo i 6 mesi di età e ripetere il test a distanza di un mese nei soggetti positivi.

L'IHC ricerca la presenza degli antigeni virali in sezioni di tessuto fissati in formalina o sezioni ottenute al criostato. E' utilizzata generalmente su biopsie cutanee del padiglione auricolare. Il risultato dei test di IHC 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 di origine colostrale, per questi motivi è impiegata sia per l'identificazione dei soggetti PI sia come test di conferma (Dubovi, 1992; Ridpath, 2002; Brodersen, 2004). In numerosi studi è stato provato che IHC e l'isolamento virale eseguiti sugli stessi tessuti di animali PI forniscono una concordanza prossima al 100% (Brodersen, 2004).

### Ricerca del genoma virale

L'applicazione di metodi di ricerca dell'acido nucleico presenta numerosi vantaggi rispetto all'isolamento virale per l'assenza di interferenza con gli anticorpi neutralizzanti, per l'elevata sensibilità e specificità e per la possibilità di evidenziare particelle virali difettive o inattivate (Brock, 1995). Tali tecniche permettono inoltre di diminuire i tempi di diagnosi e consentono di caratterizzare a livello genetico il ceppo virale isolato. I metodi di rilevazione del genoma virale maggiormente utilizzati sono la reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) e la real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (Real Time RT-PCR). Questi test sono estremamente sensibili, ma presentano svantaggi legati alla necessità di estrarre l'acido nucleico virale dal campione di origine e all'estrema sensibilità dell'RNA stesso alla degradazione per idrolisi enzimatica. A causa dell'elevata variabilità genetica dei ceppi di BVDV occorre scegliere primers in grado di amplificare il più ampio numero dei ceppi isolati. Vari studi dimostrano che i primers specifici per le sequenze nucleotidiche della regione 5'UTR e del gene NS3 offrono la maggiore sensibilità (McGoldrick et al., 1999).

E' una tecnica sensibile e specifica, essa può essere applicata su campioni individuali (Letellier, 1999) o in pool (Mars, 2005) e può essere impiegata su differenti materiali biologici: sangue, siero, latte, porzioni di organo, feti abortiti, tessuti fissati in formalina e liquido seminale. La Real Time RT-PCR, invece 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 (Gaede et al., 2004).

Tutti i test sopra elencati soffrono inoltre, in modo variabile, di un certo limite di sensibilità nella ricerca dei soggetti PI nei primi mesi di vita. Lo stimolo immunitario esercitato dal virus BVD di origine fetale fa sì che le bovine arrivino al parto con un titolo anticorpale così elevato che può essere considerato predittivo per identificare bovine gravide portatrici di feti PI. Il vitello PI quindi riceve per via colostrale un carico elevato di anticorpi, i quali nei primissimi giorni di vita possono portare ad una rapida scomparsa sia delle proteine virali nel sangue sia dei leucociti infetti circolanti: non solo quindi le prove ELISA, ma anche l'isolamento virale e, in una certa misura, anche la PCR, possono risultare transitoriamente negativi. Tale "effetto finestra" non si osserva in maniera costante, essendo dipendente dalla capacità che il ceppo virale ha di moltiplicarsi, dal livello più o meno elevato dell'immunità acquisita con il colostro, dalla matrice (leucociti/siero) e dalla metodica utilizzata (ELISA o PCR) per le analisi (Wolf et al., 2004; Zimmer et al., 2004).

La durata massima (dalla nascita) del periodo "finestra" nel siero di sangue è:

- a) PCR: alcune settimane
- b) ELISA<sup>nrs</sup>: due mesi

Mentre la durata massima (dalla nascita) del periodo "finestra" nei leucociti è:

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

Dati preliminari disponibili, da confermarsi ulteriormente, indicano l'assenza del "periodo finestra" se l'ELISA<sup>nrs</sup> è condotta su frammenti bioptici di cute auricolare (Kuhne et al., 1999).

# Capitolo II

## Controllo e Profilassi

Nei piani di controllo per BVD vengono utilizzate tecniche di diagnostica indiretta e diretta; le prime come metodo di screening per identificare allevamenti in cui è presente circolazione virale; le seconde per identificare soggetti PI. Le strategie di controllo possono prevedere tre tipologie di intervento: la profilassi diretta, quella indiretta (vaccinale) oppure l'integrazione dei due metodi.

### 2.1 Profilassi vaccinale

Gli obiettivi principali della vaccinazione sono innanzitutto il controllo delle forme cliniche di malattia e nello stesso tempo la riduzione della prevalenza dell'infezione. Negli ultimi anni notevole importanza ha rivestito la disponibilità di vaccini o di programmi vaccinali che consentono una efficace protezione fetale, fondamentale per prevenire della nascita di vitelli immunotolleranti. Tuttavia bisogna tener presente che nessun vaccino è in grado di impedire che bovine PI possano generare vitelli PI (Cavirani, 2002).

La vaccinazione nei confronti del BVDV è finalizzata al controllo della malattia, in particolare la patologia gastroenterica e respiratoria, la sindrome trombocitopenica e le turbe riproduttive (infertilità, aborto e riassorbimenti fetali). L'efficacia della vaccinazione dipende dalla misura in cui avviene la risposta immunitaria sia cellulo-mediata che umorale e viene valutata in base all'attitudine del vaccino nel ridurre la sintomatologia clinica e l'entità e durata dell'escrezione virale conseguente ad un'infezione sperimentale.

I vaccini disponibili in Italia contengono BVDV tipo 1, anche se i dati epidemiologici della nostra penisola suggeriscono la presenza di BVDV tipo 2 (Luzzago et al., 2001). I dati disponibili indicherebbero una certa protezione crociata, con esiti talora anche assai favorevoli nel controllo dei sintomi clinici correlati all'infezione da BVDV tipo 2 (Makosckeye al., 2001).

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

### Vaccini vivi attenuati

Vengono allestiti conseguentemente all'adattamento e all'attenuazione di stipiti di BVDV-CP su colture cellulari di origine bovina e suina. Tale processo determina modificazioni virali per cui nel bovino successivamente all'inoculazione del vaccino, la replicazione virale appare ridotta, così come la virulenza e l'escrezione. La somministrazione di un vaccino vivo attenuato porta a un'amplificazione antigenica, dovuta alla replicazione dello stipite vaccinale, con conseguente stimolazione di una notevole risposta umorale ed a carico dei linfociti T CD4 + e citotossici CD8 + (Chase et al., 2002). Gli stipiti vaccinali vivi attenuati inducono una risposta anticorpale verso le proteine non strutturali (in particolare NS2-3). La durata di questo tipo di immunità vaccinale è di circa di 12 mesi (ad eccezione di quelli termosensibili, per i quali la durata è ridotta a circa 6 mesi). Ciò comporta l'immunizzazione dell'animale dopo una singola somministrazione di vaccino, eseguita per via sottocutanea o intramuscolare. La comparsa della risposta immune è rapida e nel giro di 2-3 settimane nel siero dell'animale sono rilevabili anticorpi ad attività neutralizzante. La durata degli anticorpi nel siero si ritiene possa rispecchiare quanto avviene in condizioni di infezione naturale. Sebbene gli stipiti vaccinali abbiano un ampio spettro di protezione verso BVDV, l'efficacia della protezione indotta dal vaccino è comunque dipendente dal grado di omologia antigenica tra lo stipite vaccinale e quello infettante (Bolin , 1990; 1991; 1995).

Nell'utilizzo dei vaccini vivi-attenuati non va trascurata la valutazione della sicurezza. I vaccini attenuati presentano alcuni rischi relativi ad una certa attitudine abortigena ed alla possibilità di ricombinazione con gli stipiti selvaggi (Van Oirschot et al, 1999). Inoltre bisogna porre attenzione al loro utilizzo in animali immunotolleranti. Infatti in caso di completa omologia tra lo stipite vaccinale e quello che ha determinato lo stato di immunotolleranza può manifestarsi la forma classica di MD. In caso di parziale omologia antigenica può svilupparsi una forma cronica di MD. A differenza dei vaccini

vivi-attenuati tradizionali, quelli allestiti con stipiti termosensibili si sono dimostrati sicuri nell'utilizzo anche in animali immunotolleranti e soggetti gravidi (Kamstrup et al., 1999).

### Vaccini Inattivati

Sono allestiti a partire da ceppi altamente replicativi inattivati attraverso diverse metodiche. Numerose sono le sostanze utilizzate: cloroformio, formalina, beta-propiolattone. Le azeridine (etilenimine) sono le più utilizzate perché assicurano l'inattivazione del virus e mantengono l'identità antigenica (Mc Clurkin et al., 1978). La formulazione vaccinale richiede l'aggiunta di una sostanza ad attività adiuvante, che favorisce il richiamo di cellule della risposta immunitaria nel punto di inoculo ed un'efficace esposizione degli antigeni vaccinali.

Diversi vaccini in commercio contengono due diversi stipiti di BVDV, entrambi di tipo 1; per ottenere un ampio spettro di protezione immunitaria nei confronti degli stipiti circolanti.

I vaccini inattivati necessitano di due somministrazioni (vaccinazione di base e di richiamo o priming e booster) eseguite a distanza di due o tre settimane l'una dall'altra, per via intramuscolare o sottocutanea. La risposta immunitaria è prevalentemente umorale anche se in base alla qualità e al tipo di adiuvante utilizzato, i vaccini inattivati sono comunque in grado di stimolare l'immunità cellulo-mediata. I vaccini inattivati risentono dell'interferenza di anticorpi passivi, di origine colostrale. La durata della protezione normalmente indotta è di alcuni mesi, ma alcuni studi attestano una durata dell'immunità fino a 12 mesi (Harpin et al., 1997). Per quanto riguarda la protezione fetale indotta da tale tipologia di vaccinazione sembra sia di breve durata e non sufficiente a coprire l'intero arco della gravidanza (Patel et al., 1998).

I vaccini inattivati sono però pressoché privi di effetti indesiderati, infatti:

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

Gli svantaggi derivanti dal loro utilizzo sono:

- il maggior costo dell'unità di prodotto rispetto al vaccino vivo-attenuato;
- la necessità di un doppio intervento vaccinale;
- sporadici casi di anafilassi e reazioni infiammatorie vicino al punto di inoculo;
- un lieve calo nella produzione latte a seguito della somministrazione del prodotto.

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

### Vaccini Innovativi

L'obiettivo di tali vaccini è rivolto al miglioramento delle caratteristiche di sicurezza dei vaccini, senza diminuire l'efficacia della copertura immunitaria. A questo si aggiunge la possibilità di poter discriminare, in presenza di vaccinazione, reazioni immunitarie indotte da stati d'infezione e reazioni indotte da vaccinazione. A tal fine gli studi innovativi sono stati rivolti alla manipolazione del genoma virale e allo studio di nuovi adiuvanti.

Un esempio è la vaccinazione DNA-mediata, attraverso l'inoculazione di un plasmide codificante per la glicoproteina E2 del BVDV (Kelling, 2004). L'espressione di E2 è stata ottenuta attraverso l'allestimento di virus ricombinanti, utilizzando come virus vettori un adenovirus o l'herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) (Elahi et al., 1999; Schmitt al., 1999). Quest'ultimo caso rappresenta un tentativo di sviluppare un vaccino dotato di caratteristiche multiple: un vaccino bivalente immunizzante verso BoHV-1 e BVDV, pur attraverso l'inoculazione di un singolo virus vaccinale provvisto nello stesso tempo di caratteristica di marker, essendo deleti dei geni codificanti per la glicoproteina E di BoHV-1. Di interesse, specialmente in ordine alle caratteristiche di innocuità, sono le applicazioni vaccinali che prevedono l'inoculazione di singole subunità virali (quale E2); in tal caso l'efficacia del vaccino risulta strettamente dipendente dalla componente adiuvante che dovrà essere costituita da immunostimulating complex (ISCOM), in grado di esporre al sistema immunitario l'antigene vaccinale in modo ottimale (Kamstrup et al., 1999).

## 2.2 Profilassi diretta

La profilassi diretta comprende l'identificazione degli allevamenti infetti, l'identificazione e l'allontanamento dei soggetti PI e il monitoraggio sanitario degli allevamenti risanati.

### Identificazione degli allevamenti infetti

Per allevamento infetto si intende un allevamento nel quale si è evidenziata un'attiva circolazione da BVDV, imputabile alla probabile presenza di animali PI.

La verifica dell'eventuale circolazione virale è generalmente basata sull'indagine sierologica attraverso metodica ELISA per la ricerca degli anticorpi (normalmente è utilizzato il test ELISA per la ricerca di anticorpi verso la NS2-3), che si esegue sul sangue (siero e plasma) e sul latte. Possono essere sottoposti a test:

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

Il primo approccio è sicuramente più impegnativo ma risulta maggiormente affidabile. Lo *spot test* si basa su controlli da eseguire su soggetti in cui è più probabile ritrovare un soggetto PI (Houe, 1995).

L'interpretazione dell'indagine sierologica può essere condizionata da un'eventuale profilassi vaccinale, in particolare, ciò accade nel caso dell'utilizzo di vaccini vivi attenuati, che inducono non solo alti livelli anticorpali neutralizzanti, ma anche elevati livelli di anticorpi verso le proteine non strutturali (NS2-3) (Cavirani et al., 2005).

### Identificazione dei soggetti PI

In considerazione dello stato immunitario degli animali PI, i soggetti che risultano sieronegativi in allevamenti con alta prevalenza di infezione possono essere dei potenziali animali PI. Per tale motivo l'indagine può essere diretta verso questa categoria di animali.

Generalmente i test utilizzati sono rivolti alla ricerca degli antigeni virali mediante metodica ELISA oppure alla ricerca del genoma virale mediante PCR. Una volta

accertato lo stato viremico, il soggetto deve essere sottoposto a un test di conferma, di solito a distanza di un mese dal primo controllo, per escludere la possibilità di una viremia transitoria (Sandvick et al., 1997). A questo punto se l'animale è confermato PI si procederà alla sua eliminazione.

### Monitoraggio aziendale

Un allevamento va considerato potenzialmente risanato nel momento in cui sono stati individuati ed eliminati tutti gli animali immunotolleranti PI, e sia stata accertata assenza di circolazione del virus. Raggiunto questo obiettivo, si può decidere se continuare o meno con la profilassi. A questo punto risulta indispensabile attuare un piano di monitoraggio insieme all'applicazione di misure di biosicurezza volte a ridurre il rischio di introdurre il virus dall'esterno. Generalmente si procede al controllo di tutti i vitelli per almeno l'intero anno successivo all'eliminazione dell'ultimo soggetto PI, al fine di scongiurare l'ipotesi della nascita di nuovi PI.

Dopo tale periodo gli animali dell'allevamento saranno monitorati mediante esami sierologici periodici che possono essere compiuti su:

- tutti gli animali dell'allevamento;
- su un ristretto numero di animali rappresentativo delle diverse entità di allevamento;
- su campioni di latte di massa delle bovine in lattazione.

Inoltre è fondamentale il controllo dei soggetti di nuova introduzione, che può essere effettuato attraverso la rilevazione degli antigeni virali mediante ELISA oppure mediante la ricerca del genoma virale mediante RT-PCR.

## **2.3 Piani di eradicazione**

I programmi di controllo ed eradicazione possono prevedere l'applicazione della profilassi diretta o indiretta, oppure l'integrazione di ambedue. Un esempio di quest'ultima tipologia è il protocollo applicato da Cavarani e coll.(2010) in 28 allevamenti di bovini da latte, con un numero di animali compreso tra 380 e 1.252. Tali allevamenti presentavano evidenze sierologiche di circolazione virale, a seguito della presenza di capi PI.

## Test utilizzati

I test utilizzati sono stati:

- RT-PCR finalizzata alla ricerca dell'antigene virale (NS5B di BVDV) su pool di campioni di sangue;
- ELISA per la ricerca dell'antigene virale (kit ELISA BVD/MD Antigen Mix, Pourquier) su ogni singolo campione costituente i pool risultati positivi alla PCR;
- ELISA per la rilevazione degli anticorpi verso NS2-3 (kit ELISA BVD/MD p80-Antikörper, Pourquier).

## Programma di eradicazione

Il protocollo prevede:

1. campionamento mediante prelievo ematico su tutti gli animali con età superiore ai 6 mesi;
2. monitoraggio mediante prelievo ematico, ogni 4 mesi, di tutti i nuovi nati con età superiore ai 6 mesi;
3. successivamente a 3 controlli negativi per la ricerca dell'antigene BVDV, compiuti ogni tre mesi, il monitoraggio viene effettuato mediante indagine sierologica (con cadenza semestrale) verso la proteina NS2-3, per rilevare un'eventuale circolazione virale.

E' previsto inoltre l'impiego di un vaccino inattivato monovalente dai 6 mesi di età.

Il protocollo vaccinale ha previsto:

- un intervento di sensibilizzazione (priming);
- un intervento di richiamo (booster);
- interventi di richiamo a cadenza semestrale o annuale, a seconda del vaccino utilizzato.

## Risultati

In tutti gli allevamenti oggetto dello studio si è ritenuto aver eradicato l'infezione. Dopo l'ultimo screening in cui si sono identificati animali PI, ne sono seguiti altri tre, limitatamente ai soli nuovi nati, con esito negativo. Su 18.426 animali testati, 158 (0,86%) sono risultati PI. In 13 allevamenti su 28, il primo screening ha portato alla eliminazione di tutti i soggetti PI che non sono ricomparsi nei successivi screening. Da segnalare 3 situazioni singolari. In un allevamento, sono stati rilevati 5 soggetti PI al

primo screening e nessun altro caso nei restanti tre test di screening sui nuovi nati. Tuttavia, permaneva la sieropositività verso NS2-3. Nel caso di un altro allevamento, dopo i primi due test in cui non è stato rilevato alcun animale PI, nel corso del terzo screening è stato individuato un soggetto PI. Infine in un terzo allevamento, non è stato rilevato alcun soggetto PI, nonostante la sieropositività verso NS2-3. Tali incongruità di risultati possono essere ascrivibili a un deficit di sensibilità delle metodiche diagnostiche utilizzate per la ricerca del virus. Relativamente alle caratteristiche anagrafiche degli animali riconosciuti come PI, 133 (84,2%) erano di età compresa tra i 6 e i 12 mesi, 19 (12,02%) tra i 13 e i 24 mesi e 6 (3,8%) oltre i 24 mesi. Tutti gli stipti identificati mediante RT-PCR multiplex sono stati classificati come BVDV tipo 1.

## Conclusioni

I risultati ottenuti indicano che il protocollo permette di identificare i soggetti PI ed eradicare l'infezione, in allevamenti da latte con un elevato numero di capi. In particolare, l'utilizzazione della RT-PCR su pool di sangue e successiva identificazione degli animali PI mediante ELISA sui singoli campioni dei pool positivi, appare funzionale al raggiungimento dell'obiettivo con costi contenuti. I dati indicano che un intervento di screening seguito da altri tre interventi a cadenza quadrimestrale permette di eliminare i capi PI. Il proseguo dell'indagine virologica serve ad identificare rapidamente la comparsa di nuovi soggetti PI. E' utile considerare quanto di recente osservato riguardo alla persistente circolazione di BVDV, anche in assenza di animali PI, riconducibile alla presenza di animali con una sorta di infezione cronica. Per una valutazione complessiva del protocollo adottato, non va dimenticato il ruolo del programma vaccinale. La tipologia di vaccino inattivato utilizzato non induce la formazione di anticorpi verso NS2-3, almeno per i primi tre interventi vaccinali. Questo consente di monitorare mediante la sierologia l'eventuale circolazione del virus, il quale induce la comparsa di anticorpi anche verso le proteine non strutturali compresa la NS2-3. In merito all'età degli animali PI, si registra quanto atteso ovvero la prevalenza di soggetti giovani. Tuttavia, in sede di stesura di un programma di eradicazione non è corretto trascurare la possibilità di riscontrare animali PI adulti che, se femmine in attività riproduttiva, genereranno vitelli PI. Una volta raggiunta l'eradicazione si pone il problema se continuare a vaccinare o interrompere la vaccinazione. Considerando da un lato le aspettative dell'allevatore che, a fronte dei costi sostenuti per raggiungere l'eradicazione, si aspetta un ritorno economico immediato derivante dalla sospensione

della vaccinazione, e valutando il rischio di “reinfezione”, per gli allevamenti indenni, non vaccinati, in un’area ad alta prevalenza d’infezione, appare difficile adottare una linea di condotta univoca.

### **2.3.1 Piani di Eradicazione in Europa**

Differenti esperienze sono state fatte a livello europeo sul controllo delle infezioni da BVDV. 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%). 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 et al., 2005), dall'Olanda (Moen et al., 2005) e dalla Germania (Moenning et al., 2005) mentre progetti su scala ridotta sono in corso in Galizia (Spagna) e in Grecia (Billinis et al., 2005).

#### **Piano di eradicazione in Svezia**

Il programma di eradicazione sistematica, senza l'utilizzo della vaccinazione, ha inizio in Svezia nel 1993. Esso comprende tre passi successivi (Lindberg et al., 1999): (1) divisione della popolazione in allevamenti non infetti e infetti, (2) monitoraggio /certificazione degli allevamenti non infetti (3) eliminazione del virus dagli allevamenti infetti. Lo stesso modello viene utilizzato in tutti gli altri paesi scandinavi.

#### **Test per la determinazione dello stato sanitario dell'allevamento**

I test utilizzati sono sia quelli per la diagnosi diretta che indiretta. La metodica utilizzata di routine è quella immunoenzimatica (ELISA), sia su campioni di latte (Niskanen et al., 1991; Bitsch et al., 1997) che sul siero ematico o su pool di latte proveniente da un piccolo numero di animali di un determinato range di età (*spot test*) (Houe, 1992, 1994; Lindberg, 1996). Campioni di latte di massa possono essere ulteriormente raggruppati, oppure analizzati singolarmente, ma sempre interpretati come unità.

## Test diagnostici su campioni di latte di massa

L'utilizzo di un test sul latte di massa ha molti vantaggi pratici in quanto: è facile da ottenere e permette di testare un'intera mandria con un solo campione. Inoltre, il costo per il campionamento e le analisi è di solito sensibilmente inferiore rispetto alle metodiche che necessitano di prelievo individuale. Il suo principale svantaggio è la limitazione agli allevamenti che non praticano la vaccinazione contro BVDV, in quanto la presenza di anticorpi di origine vaccinale renderebbe impossibile l'interpretazione dei test diagnostici di tipo indiretto. I test utilizzati sono i seguenti:

- **Test per la ricerca degli anticorpi anti-BVDV.** Gli animali con infezione in corso mostrano, di solito, alti livelli di anticorpi anti-BVDV nel latte di massa (Niskanen et al, 1991; Bitsch et al., 1995; Drew et al, 1999). Il latte di massa continua ad essere anticorpo-positivo per qualche tempo, ma gradualmente gli anticorpi scendono a livelli bassi o non rilevabili. Questo dovrebbe avvenire entro circa 3 - 4 anni in allevamenti con un tasso di sostituzione del 25 - 30 %, in cui gli animali che costituiscono la rimonta provengono da allevamenti non infetti. Nel frattempo, possono essere monitorati con altri metodi di campionamento, come test su pool di campioni di latte provenienti da giovani mucche o test mirati sugli animali di nuova introduzione (Alenius et al., 1997).

- **Test per la rilevazione del virus della BVD.** Sebbene sia descritto l'impiego della RT-PCR sulle cellule somatiche di campioni di latte di massa non è una prova diagnostica di comune utilizzo. Questo metodo è utilizzato per testare campioni di tutti gli animali in lattazione presenti in azienda, al fine diagnostico di individuare gli animali PI. Tuttavia, poiché soggetti PI potrebbero non essere presenti tra gli animali destinati alla mungitura, non dovrebbe essere utilizzato nella fase iniziale della classificazione delle mandrie rispetto allo stato di infezione. Potrebbe essere utile come test di screening degli animali destinati all'allattamento all'interno di un allevamento designato come "possibilmente infetto".

- **Spot test.** Tale test è più laborioso e di conseguenza più costoso dei test sul latte di massa. Oltre a rivelare la presenza o l'assenza di infezione in corso, lo spot test dà informazioni sul tempo che è passato dall'infezione. In generale, tutti gli animali nati dopo la rimozione dell'ultimo animale PI sono sieronegativi, ad eccezione dei vitelli che nascono con gli anticorpi prodotti in seguito a una infezione avvenuta in utero a fine

gestazione poco prima che l'ultimo animale PI sia stato abbattuto. Di conseguenza, la rivelazione di individui siero-positivi tramite spot test sugli animali giovani è un indicazione di infezione recente o in corso. Se invece non vengono rilevati soggetti positivi, l'interpretazione generale è che la mandria non è stata infettata durante il periodo in cui gli animali ,sottoposti a campionamento, erano presenti in allevamento.

### Monitoraggio degli allevamenti classificati come non-infetti

Si basa su un sistema di certificazione degli allevamenti non infetti e comprende diverse procedure fondamentali:

- (1) analisi volte a dimostrare l'assenza di infezione da BVDV;
- (2) campionamenti ripetuti che certifichino livelli anticorpali costantemente bassi o assenti, utilizzando test sull'intera mandria;
- (3) mantenimento costante di un certo livello di biosicurezza dell'allevamento.

Ci sono due metodi per certificare l'assenza dell'infezione, basati entrambi su test ELISA per la ricerca degli anticorpi. Il primo si basa su test a livello aziendale, eseguiti due volte ad almeno 7 mesi di distanza. A questo scopo possono essere utilizzate tre diverse tipologie di campionamento: (1) latte di massa, (2) pool di campioni di latte derivanti da bovine primipare e (3) campioni di sangue individuali di 5-10 giovani capi con età superiore ai 12 mesi. I metodi 2 e 3 sono usati come alternative al metodo 1, in allevamenti che non possono utilizzare latte di massa a causa della presenza di bestiame sieropositivi, a causa di una precedente esposizione al virus.

Il secondo metodo si basa su test ripetuti su tutti gli animali dell'allevamento ai fini del rilevamento del virus e degli specifici anticorpi, con un intervallo di almeno 4 settimane. Durante questo periodo, non deve essere rilevato nessun animale PI o sieropositivo (durante il periodo della gravidanza), e non deve avvenire nessuna sieroconversione. Le certificazioni sono aggiornate ogni anno. Tuttavia, nel contesto commerciale o dei contatti con animali di altri allevamenti (ad esempio mostre, pascolo comune) l'ultimo test deve essere stato effettuato da non più di tre mesi. Allevamenti indenni sono autorizzati a vendere gli animali provvisti di certificato di indennità sulla base di un test compiuto sulla mandria di appartenenza piuttosto che sui singoli capi. Se vengono rilevati sieropositivi, in un test di controllo, si eseguono ulteriori approfondimenti al fine di confermare l'avvenuta introduzione dell'infezione. Se

quest'ultima è confermata, l'allevamento perde immediatamente la possibilità di vendere i propri capi con certificato di indennità.

### Valutazione dei test utilizzati nei processi di certificazione e monitoraggio

In allevamenti in cui gran parte degli animali è sieronegativo, un test sul latte di massa è in grado di rilevare una nuova infezione in una fase molto precoce, spesso anche prima della nascita del primo animale PI, questo in conseguenza del fatto che spesso bovine portatrici di feti PI mostrano elevati livelli anticorpali nell'ultima fase di gravidanza (Brownlie et al., 1998; Lindberg et al., 1998). Niskanen (1993) ha dimostrato che campioni di latte individuale con elevati livelli di anticorpi (densità ottica 1,0) possono essere diluiti in campioni anticorpo-negativi tra 256 e 1024 volte e risultare ancora positivi in un test ELISA indiretto. In altre parole, un test sul latte di massa può essere in grado di rivelare la presenza di un unico animale sieropositivo all'interno di una mandria di animali sieronegativi anche in grandi gruppi costituiti da 250-500 capi, e molto probabilmente più grandi. Inoltre, anche se si può concludere che non siano presenti soggetti PI, l'indagine deve procedere con un follow-up sulle bovine in stato di gravidanza. Se una di queste è portatrice di un feto PI l'infezione si stabilirà nella mandria. Tuttavia, il focolaio può essere evitato se l'animale viene rimosso prima del parto o dell'evento abortivo.

Gli allevatori, le cui mandrie sono monitorate con test su latte di massa, dovrebbero evitare l'acquisto di animali sieropositivi destinati alla rimonta, dal momento che questo può causare l'innalzamento dei livelli anticorpali nel latte di massa fino a superare la soglia consentita (densità ottica di 0,20) per la certificazione di indennità. In tal caso, la mandria deve essere monitorata con un altro metodo, che potrebbe risultare più costoso.

L'uso di spot test per il monitoraggio delle mandrie è giustificabile solo in un periodo transitorio, cioè fino a quando i livelli anticorpali nel latte di massa sono diminuiti a sufficienza. Per allevamenti che non possono ricorrere a test sul latte di massa, come nel caso dei bovini allevati per la produzione di carne, lo spot test risulta l'unico metodo disponibile. Purché non si acquistino animali PI, i vitelli costituiscono l'obiettivo del monitoraggio. Il limite inferiore di età degli animali da controllare è quello in cui gli anticorpi materni sono a livelli non rilevabili con i normali test utilizzati. In Svezia, i capi utilizzati per la certificazione e il monitoraggio mediante spot test sono le bovine primipare e i vitelli di età superiore ai 12 mesi. Si tratta di un compromesso tra il

desiderio di avere un periodo di tempo sufficientemente lungo prima dell'ottenimento della certificazione e una fascia di età sufficiente per il monitoraggio. La probabilità che uno spot test risulti positivo non solo fa affidamento sul presupposto che almeno un animale infetto sia presente, ma anche che sia presente per un periodo di tempo sufficiente da rientrare nel gruppo di animali sottoposti al prelievo (Houe, 1992). Pertanto, i spot test di solito non sono in grado di rilevare allevamenti nei primi stadi di infezione, positività che può invece essere rilevata mediante test su latte di massa. Questa mancanza di sensibilità rappresenta un pericolo per le altre mandrie se la bovina che porta un feto PI è venduta prima del parto.

### Misure applicabili ad allevamenti classificati come infetti

Gli animali di questi allevamenti non possono essere venduti come animali in vita ed avere contatti con quelli di altri allevamenti, il tutto per prevenire la trasmissione dell'infezione. Prima che l'eradicazione del virus possa iniziare, deve essere accertata la presenza del virus. E' necessario che sia rilevato almeno un campione positivo agli anticorpi tra i vitelli di età compresa tra i 6 e i 9 mesi di età, oppure episodi di sieroconversione e/o viremia in uno o più capi.

Il protocollo di eradicazione del virus prevede: (1) un primo test su tutti gli animali, (2) un successivo follow-up sui vitelli neonati e (3) un follow-up su quelle bovine che erano risultate sieronegative nello screening iniziale.

### Indagine iniziale (test su tutti gli animali)

Oltre a trovare animali PI, lo scopo dell'indagine iniziale è quello di individuare le bovine non immunizzate. Questo è l'unico gruppo di animali in cui i feti possono acquisire lo stato di PI e di conseguenza rendere l'infezione persistente nell'allevamento. Per trovare questi animali tutta la mandria deve essere sottoposta a prelievo ematico, ad esclusione degli animali di cui è già noto avere gli anticorpi verso BVDV, al fine di testarli per la ricerca degli anticorpi (metodica ELISA). Strategie in cui si tenta il solo rilevamento del virus (Houe, 1996) o dove gli animali sono esclusi dai test sulla base di una RT-PCR negativa sul latte di massa o di una prole sana (Bitsch et al., 1995) non sono in grado di individuare le bovine non immunizzate. Le bovine sospettate di essere portatrici di feti PI, perché risultate sieronegative, sono individuate e tenute in

quarantena durante il parto e il periodo post-partum, in modo da fermare l'infezione prima che possa diffondere in allevamento.

Inoltre, al termine del periodo di eradicazione della malattia i test di follow-up possono essere effettuati sui capi sieronegativi e quelli in stato di gravidanza per escludere la creazione di ulteriori infezioni persistenti. Per tutti gli altri animali, la presenza del virus viene ricercata mediante metodica ELISA sui singoli campioni dei soggetti con livelli anticorpali bassi (al di sotto del valore scelto come cut-off) o non rilevabili. In generale, gli animali virus-positivi devono essere sottoposti ad un ulteriore test di conferma e abbattuti se confermati PI.

#### Test di follow-up su vitelli nati durante l'anno successivo all'inizio del piano

Nel momento in cui l'indagine è iniziata, gli individui PI possono essere presenti sia come animali nella mandria sia come feti in bovine gravide. Al fine di individuare i capi PI appartenenti a quest'ultima categoria, si testano tutti i vitelli nati durante l'anno successivo all'inizio del piano. I vitelli sono testati sia per la rilevazione degli anticorpi che per quella del virus secondo la stessa strategia dell'inchiesta iniziale sulla mandria. I test di follow-up sono effettuati su tutti i vitelli, dopo che hanno raggiunto l'età in cui gli anticorpi materni non interferiscono con l'isolamento del virus.

#### Test di follow-up su animali inizialmente sieronegativi

Un test di follow-up viene effettuato su tutte le bovine inizialmente sieronegative in età riproduttiva, e viene condotto alla fine del periodo di follow-up sui vitelli, cioè circa 12 mesi dopo l'indagine iniziale sulla mandria. Tutto questo è motivato dal fatto che vitelli PI possono essere nati durante l'anno successivo all'inizio del piano, o se lo stato virologico di uno o più vitelli nati durante l'anno rimane sconosciuto, per esempio, a causa di morte precoce.

### Fattori di rischio per l'introduzione e la diffusione delle infezioni

#### Commercio di bestiame

Il commercio di bestiame senza controllo dello stato sanitario riguardo BVDV è un modo di diffusione dell'infezione tra gli allevamenti. Ciò è dovuto non solo al diretto commercio di animali PI, ma anche a una situazione commerciale in cui gli animali PI

possono venire in contatto con bovine sieronegative ad inizio gravidanza aumentando notevolmente l'efficienza di diffusione della malattia. Negli allevamenti infetti sono realizzati routinariamente test per evitare che possano essere venduti soggetti PI o bovine portatrici di feti PI. Tali esami sono condotti mediante l'applicazione di un test quantitativo per rilevare i livelli anticorpali di bovine in fase di gravidanza, vietando in tal modo il commercio delle bovine che risultano avere livelli anticorpali alti (Lindberg et al., 1998).

#### Vaccini vivi, sperma ed embrioni

Focolai di BVD caratterizzati da una insolita alta morbilità e mortalità nel bestiame di tutte l'età sono stati segnalati negli USA e nel Canada (Rebhun et al, 1989; Pellerin et al., 1994). Questi focolai sono stati associati alle infezioni primarie con BVDV tipo 2 (Pellerin et al, 1994; Ridpath et al, 1994). In entrambi i paesi, sono utilizzati in maniera estensiva vaccini vivi BVDV (Bolin, 1995). Nei paesi in cui vengono utilizzati vaccini simili, Belgio e Germania, è stata segnalata la presenza di BVDV genotipo 2 nella popolazione bovina (Letellier et al., 1997; Wolfmeyer et al., 1997).

Questo è in contrasto con i risultati conseguiti dalle indagini svolte in paesi che non utilizzano vaccini vivi come la Svezia (Vilcek et al., 1998), Gran Bretagna (Paton, 1998), Nuova Zelanda e Australia (Xingnian et al., 1997). Quindi, si può sospettare una correlazione tra l'uso di vaccini vivi BVDV e la presenza di BVDV tipo 2 nella popolazione bovina. Una possibile spiegazione può essere che l'uso dei tipi di vaccino attualmente disponibili ha determinato un'immuno-selezione, provocando l'emergere del virus di tipo 2. Un'altra spiegazione è la contaminazione con BVDV tipo 2 del siero fetale bovino (FCS) che è ampiamente utilizzato nella produzione di vaccini vivi contro BVDV. Vaccini con una contaminazione accidentale da BVDV hanno diffuso l'infezione non solo nel bovino, ma anche in diverse altre specie animali (Vannier et al., 1988; Wensvoort et al., 1988; Kreeft et al., 1990; Løken et al., 1991). Dal momento che il siero fetale bovino è utilizzato nel processo di produzione della maggior parte dei vaccini vivi, cioè non solo contro BVDV, una questione interessante da considerare è se in realtà tutti questi prodotti rappresentino un rischio per l'introduzione di nuovi ceppi di pestivirus potenzialmente più virulenti.

Nuovi ceppi di BVDV possono essere introdotti attraverso l'importazione del seme ed embrioni bovini. Un recente rapporto descrive un caso in cui un toro sieropositivo

mostrava la persistenza del virus nel seme, anche se l'indagine per la rilevazione virale nel sangue aveva avuto più volte esito negativo (Voges et al., 1998). Indipendentemente dalla causa di tale condizione, e trascurando il fatto che si tratta probabilmente di un evento raro, si evidenzia il rischio di accettare l'importazione di seme, certificato come sicuro, sulla sola base di un test negativo per la ricerca virale su siero ematico. Ad oggi, comunque il rischio di introdurre l'infezione tramite il materiale seminale è praticamente assente in considerazione del fatto che nei centri di produzione sono adottati stretti protocolli volti ad identificare ed escludere i soggetti PI. Infine, anche il commercio di embrioni rappresenta un rischio di introduzione di nuovi ceppi, principalmente a causa di un lavaggio insufficiente nel caso di donatori infetti in modo transitorio o PI (Bielanski et al., 1996; Fray et al., 1997), o per la contaminazione con il virus presente nel siero fetale bovino utilizzato come liquido di lavaggio. Entrambi i rischi possono tuttavia essere gestiti mediante una protezione adeguata con esami sui donatori o evitando l'uso de FCS.

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

## **Piano di eradicazione della BVD in Finlandia**

Il piano di controllo dell'infezione da BVDV in Finlandia , tra il 1998 e il 2004, è stato incentrato principalmente su una approfondita sorveglianza annuale degli allevamenti da latte, sul campionamento degli animali allevati per la produzione della carne e su ulteriori test eseguiti su base volontaria in allevamenti in cui è possibile che l'infezione da BVDV.

### Tipologie di analisi

Negli anni 2003 e 2004, sono stati prelevati dagli animali degli allevamenti da carne al momento della macellazione 11.003 campioni. I campioni di latte di massa e quelli dei sieri individuali sono stati testati mediante metodica ELISA indiretta “ELISA Svanovir BVDV-Ab” (Svanova Biotech AB,Uppsala Science Park, SE-751 83 Uppsala, Svezia). Inoltre è stata utilizzata la metodica ELISA diretta per il rilevamento dell'antigene virale nei campioni di siero ematico degli animali appartenenti alle mandrie positive alla ricerca degli anticorpi sul latte di massa.

### Programma di controllo e di eradicazione

Il materiale biologico esaminato nel corso del piano di eradicazione consiste in:

- campioni di latte di massa (BTM) prelevati con cadenza annuale;
- campioni di siero ematico dei singoli animali appartenenti a mandrie anticorpo positive al test sul latte di massa e che non erano stati precedentemente testati
- campioni di siero ematico dei singoli animali appartenenti ad allevamenti da carne.

### Risultati

Il campionamento individuale di tutte le mandrie risultate positive alla ricerca anticorpale su campioni di latte di massa ha portato alla scoperta di 23 nuovi allevamenti da latte con individui PI durante gli anni compresi fra il 1998 e il 2004 (Rikula et al., 2005). Animali PI sono stati trovati anche in due allevamenti da carne. In 10 dei 25 allevamenti con soggetti PI, la fonte di infezione è stata rintracciata, costituita il più delle volte dall'acquisto di un animale PI o di una bovina gravida portatrice di un soggetto PI, oppure più raramente da contatti occasionali diretti o indiretti con un

animale PI, mentre in un solo caso la fonte di infezione è stata l'inseminazione con seme proveniente da un toro con infezione acuta (Rikula et al., 2002).

## Conclusioni

La prevalenza già inizialmente bassa e la natura insidiosa della BVD hanno senza alcun dubbio influenzato la motivazione per il controllo della malattia sia a livello locale che nazionale. Inoltre, in precedenza non era possibile limitare il commercio degli animali da allevamenti PI. Il nuovo decreto BVD (MMM 2/EEO/2004), in vigore dal 1° maggio 2004, prevede misure apposite in caso di diagnosi dell'infezione da BVDV o nel caso di solo sospetto.

Il piano stabilisce che gli allevamenti infetti devono obbligatoriamente informare tutte le aziende che hanno rapporti commerciali con essi, nonché il personale dei macelli in cui vengono macellati i capi dell'allevamento e tutti i soggetti che entrano in tale allevamento, al fine di ridurre al minimo le possibilità di propagare l'infezione. L'introduzione di bovini o altri ruminanti negli allevamenti infetti è vietata, e gli animali possono essere movimentati solo al fine della macellazione. Inoltre, se gli animali PI sono trasportati al macello, devono essere asintomatici. Il decreto consente la verifica dell'infezione delle mandrie sospette e delle mandrie che vengono a contatto con loro a spese del governo.

## **Piano di eradicazione nelle isole Shetland**

Nel 1994, nelle isole Shetland è stato avviato un piano di analisi del sangue su tutto il bestiame e di abbattimento dei capi PI, in seguito ad un ampio dibattito tra veterinari, ricercatori e lo Shetland Islands Council (Synge et al., 1995).

## Tipologie di analisi

I test di scelta per il piano sono stati un test ELISA per la ricerca di anticorpi nel plasma (Barber et al., 1993) e un test ELISA per il rilevamento dell'antigene virale nei leucociti del sangue periferico dei soggetti risultati sieronegativi (Entrican et al, 1995;. Sandvik et al., 1995) . I campioni di sangue sono raccolti in eparina, quindi il plasma viene testato per la rilevazione degli anticorpi e il buffy coat viene conservato a -20 °C per il test volto alla rilevazione dell'antigene, se questo risulta necessario. Il cut-off scelto per

stabilire la positività di un campione al test dell'antigene è stato deliberatamente basso in modo che il test abbia un'elevata sensibilità, in quanto un eventuale falso positivo potrebbe essere rivelato dal test Elisa di conferma (eseguito almeno tre settimane dopo).

### Programma di eradicazione

Ogni allevamento di bovini nelle isole Shetland è sottoposto a campionamento e sono esaminati tutte le bovine, i tori e i vitelli con oltre 4 mesi di età (destinati a rimanere in allevamento). Un'altra condizione del piano di controllo è che qualsiasi capo acquistato sia da allevamenti localizzati nelle Shetland che fuori venga tenuto in isolamento fino a quando non si siano ottenuti i risultati del loro campionamento. I campioni di tutti i bovini di oltre 4 mesi di età sono sottoposti al test per la ricerca di anticorpi verso BVDV. In allevamenti con bovini risultati sieropositivi, quelli con livelli anticorpali inferiori alle 300 Unità, rilevati mediante test ELISA, e quelli sieronegativi sono testati per la ricerca dell'antigene. In allevamenti con più di otto animali, risultati essere tutti sieronegativi, non sono effettuati ulteriori test, mentre in allevamenti più piccoli (dove tutti i capi sono sieronegativi) sono compiuti i test per la ricerca del virus. Gli animali risultati positivi alla ricerca virale nel primo test, vengono sottoposti ad un ulteriore campionamento a distanza di almeno 3 settimane, al fine di stabilire se l'infezione è persistente o transitoria. Tutti i bovini che mantengono la positività anche nel secondo test sono abbattuti, e in conseguenza di tali perdite gli allevatori sono indennizzati. Tutti i vitelli allevati nelle mandrie sieropositive sono testati dopo aver raggiunto un'età superiore ai 4 mesi al fine di identificare i soggetti PI. Inoltre gli animali sieronegativi e negativi alla ricerca virale, in allevamenti con capi sieropositivi, sono successivamente sottoposti ad ulteriore test per verificare se il virus della BVD fosse ancora presente e attivo in tali mandrie. Tuttavia, se tutti i vitelli risultano sieronegativi e inoltre negativi alla rilevazione del virus, non sono effettuati ulteriori test.

### Risultati

Il piano ha incluso, in un periodo di 2 anni, 213 allevamenti (201 a da carne e 12 da latte), per un totale di 6.150 animali (Synge et al., 1999). Il numero di vitelli testati è di 1.363, molti invece non sono stati testati perché venduti prima di essere svezzati. Durante i 3 anni dello studio, 847 animali sono stati nuovamente sottoposti a campionamento per i test di laboratorio. L'analisi dei risultati dei test hanno mostrato un

numero di allevamenti esenti da BVD, alcuni con animali sieropositivi e sieronegativi, un paio aventi tutti i capi sieropositivi e un gruppo nei quali ci sono animali positivi o negativi agli anticorpi verso BVDV e soggetti positivi alla ricerca virale. Durante il periodo di attuazione del programma sono stati scoperti 36 allevamenti con animali risultati positivi alla ricerca virale di BVDV e negativi agli anticorpi verso BVDV, e altri invece sono risultati negativi al virus della BVD e positivi agli anticorpi. Un totale di 38 bovini sono stati nuovamente campionati e i risultati dei test hanno rivelato che 14 hanno subito una sieroconversione e sono diventati negativi alla ricerca virale, presumibilmente in seguito a un'infezione transitoria.

## Conclusioni

I risultati dimostrano che il piano ha avuto inizio prima che molti allevamenti fossero infettati e i test iniziali confermano che il 43% degli allevamenti non aveva mai avuto l'infezione. La maggioranza dei rimanenti allevamenti aveva già subito l'infezione, ma non presentava soggetti PI. Questo potrebbe dimostrare che il bestiame è stato esposto all'infezione al di fuori del periodo di gravidanza oppure che i feti avevano acquisito lo stato di immunocompetenza. L'abbattimento dei capi PI ha ridotto drasticamente le possibilità di infezione, mentre un'altra possibile fonte di contagio è stata l'acquisto di femmine riproduttrici. Un nuovo metodo di campionamento dei vitelli ha previsto il prelievo di sangue dal cordone ombelicale raccolto durante il parto. Questo metodo risulta difficoltoso nella pratica, ma ad oggi sembra essere stato efficace nel prevenire che la malattia diventasse endemica nelle isole Shetland.

Dal piano, per quanto riguarda il commercio del bestiame, risultano evidenti le seguenti raccomandazioni:

- eseguire un prelievo di sangue su tutto il bestiame acquistato e conseguente test per la ricerca del virus della BVD e degli anticorpi;
- eseguire un prelievo di sangue su tutti i vitelli nati da bovine acquistate da altri allevamenti, prima che i vitelli abbiano ricevuto il colostro;
- acquistare solo giovenche non gravide per la rimonta;
- la sorveglianza, il monitoraggio e i test sul sangue dei capi acquistati al di fuori del proprio territorio risultano fondamentali;
- E' un vantaggio commerciale essere in grado di vendere animali indenni da BVDV.

Idealmente sarebbe più sicuro continuare una stretta sorveglianza mediante la ripetizione del campionamento in tutti gli allevamenti per garantire che il virus della BVD sia stato eliminato, ma i vincoli finanziari lo impediscono.

## **Piano di eradicazione in Svizzera**

### Struttura degli allevamenti in Svizzera

L'allevamento bovino in Svizzera è costituito da circa 1,6 milioni di animali distribuiti in 43.722 aziende, delle quali il 55% in pianura e il 45% in montagna (Presi et al., 2010). La dimensione media delle mandrie è di 36 bovini. E' presente ogni tipo di allevamento, puramente da ingrasso o solo per la produzione di latte, ma la maggioranza delle aziende è un mix di entrambe le produzioni. La movimentazione degli animali è molto intensa ed è caratterizzata per lo più da pascoli che si tengono ogni estate in diverse regioni montuose del paese. Circa il 25% dei bovini sta, durante la transumanza, in montagna in contatto con animali provenienti da diversi luoghi di origine. Gli animali rimangono per tutta l'estate nelle montagne svizzere per tornare solo in autunno nella loro azienda di origine. Inoltre, a causa della specificità del mercato, è frequente che gli animali possano viaggiare in tutto il paese ai fini della vendita.

### Tipologie di analisi

Per questo programma di eradicazione, sono utilizzati speciali marchi auricolari, per raccogliere campioni di tessuto e contemporaneamente identificare gli animali. Il campione viene, nello stesso giorno, inviato ad uno dei nove laboratori certificati coinvolti nel piano. Nei laboratori vengono utilizzate sia la RT Real Time PCR che il test ELISA al fine di rilevare gli animali virus-positivi. Le prime analisi sono eseguite utilizzando una delle quattro prove:

- (1) test ELISA (Herd Check Ag / Serum Plus, IDEXX Laboratories) basato sull'individuazione dell'antigene E-ms (gp 48);
- (2) test ELISA (PrioCheck BVDV Ag PI Focus, Prionics AG) basata sull'identificazione della proteina p80 o di altre espressioni dell'antigene NS2/3 (solo per gli animali di oltre 60 giorni di età);
- (3) test RT-PCR (cador BVDV, Kit da Qiagen GmbH);
- (4) test RT-PCR (BoVir-SL® BVDV TaqMan da Andia-Tec GmbH & Co. KG).

Tutti i capi risultati inizialmente positivi e quelli non interpretabili possono essere verificati attraverso una prova di conferma. Può, inoltre, essere deciso dall'allevatore di abbattere l'animale senza ulteriore test di conferma oppure di testare un campione di sangue del soggetto con RTRT-PCR. Se anche in questo caso il risultato non è interpretabile, il campione è inviato al laboratorio di riferimento per ripetere il test.

### Programma di eradicazione

I punti chiave del programma di eradicazione in Svizzera sono i seguenti:

- obbligatorietà di esecuzione per tutti gli allevatori;
- identificazione individuale degli animali dell'intera popolazione bovina della Svizzera ed eliminazione degli animali PI;
- programma condotto in un breve periodo (un anno per testare l'intera popolazione);
- restrizione della movimentazione degli animali;
- educazione ed informazione continua degli allevatori;

Il programma è diviso in quattro fasi:

1. **Fase precedente al pascolo** (gennaio-luglio 2008): in Svizzera, il pascolo ha un ruolo importante nel mantenimento e trasmissione del virus, facilitando la nascita di vitelli PI. Pertanto, tutti gli animali più giovani di 2 anni sono testati al fine di verificare la negatività alla presenza del virus prima di essere avviati al pascolo estivo. In alcune regioni tale procedura è stata estesa anche agli animali più anziani. Il numero di animali da testare è stato stimato in 350.000 capi.

2. **Fase iniziale** (ottobre-dicembre 2008): sono testati tutti i capi che non lo sono stati in precedenza. Un'eccezione è fatta per i bovini delle aziende destinate al solo ingrasso, dove tutti gli animali dell'allevamento vanno direttamente al macello. La movimentazione degli animali in branchi è limitata dal momento della campionatura fino a quando i risultati divengono disponibili (15 giorni in media). Aziende in cui gli animali risultano tutti negativi non hanno ulteriori restrizioni. In aziende con animali positivi al test, tutte le femmine in gravidanza hanno limitazioni di movimentazione fino al momento del parto. I vitelli sono quindi testati subito dopo la nascita e bloccati fino all'ottenimento dell'esito negativo al test di rilevazione del BVDV.

3. **Seconda fase o dei vitelli** (dall'ottobre 2008 al 2009): dopo la fase iniziale, tutto il bestiame vivo deve essere testato e tutti quelli risultati positivi vengono abbattuti. Tuttavia, potrebbero esserci ancora vitelli PI nati successivamente alla fase iniziale. Pertanto, tutti questi vitelli devono essere campionati e testati. L'allevatore, nella fase di marchiatura dei vitelli, preleva un campione di tessuto auricolare e lo invia per l'analisi. In caso di risultato positivo al test, il vitello viene macellato e la movimentazione di ogni bovina gravida presente in azienda è bloccata fino al momento del parto.

4. **Fase di monitoraggio** (da ottobre del 2009 al 2011): nell'ottobre 2009, la maggior parte del bestiame svizzero è risultato esente da BVDV. In questo periodo è essenziale monitorare e verificare l'intera popolazione bovina della Svizzera. In questa fase si continuano a testare i vitelli neonati, per un periodo di almeno un anno, successivamente l'obiettivo del monitoraggio è spostato sulla rilevazione degli anticorpi nel latte delle bovine alla prima lattazione (a partire dal 2011). Possono essere utilizzate diverse strategie al fine di sfruttare al meglio le risorse a disposizione e garantire un programma di sorveglianza efficiente anche dal punto di vista dei costi.

## Risultati

All'inizio del programma, un totale di 595.230 animali (37% del bestiame) distribuiti in 33.617 aziende (77% delle aziende totali) sono stati testati per BVDV (alla data del 25 settembre 2008). Degli animali sottoposti alla prova iniziale 6.988 sono risultati positivi, 3.883 dei quali ha subito un test di conferma, comprovando la positività di 3.427 capi, corrispondente ad un tasso di conferma dell'88%. Si è rilevato un totale di 6.532 animali PI per una prevalenza dell'1,1%, con delle fluttuazioni regionali nella percentuale di animali PI comprese tra zero e 1,54%.

L'età media degli animali infetti è di 403 giorni, mentre quella degli animali non infetti è di 794 giorni. L'animale PI più vecchio è risultato avere una età di oltre 11 anni. In media, gli animali PI sono stati macellati entro 18 giorni dal risultato del laboratorio. Il numero massimo di giorni trascorsi prima della macellazione è stato di 242. La fase precedente al pascolo ha permesso l'individuazione e l'eliminazione di 6.532 animali PI. Anche se l'impatto sulla riduzione della nascita di nuovi animali PI non può essere valutata prima di aver analizzato i risultati dei vitelli nati nei seguenti nove mesi. Gli studi condotti chiariscono i progressi nella riduzione delle nuove infezioni in

transumanza, successivi all'aumento dei capi BVD-negativi (Bodmer et al., 2008.; Siegwart et al., 2006).

Anche se in media gli animali PI sono più giovani rispetto a quelli non PI, circa il 20% dei PI hanno oltre 2 anni di età, con un massimo di 11. Perciò, basare un programma di controllo solo sui giovani animali può determinare la mancata rilevazione di alcuni soggetti PI. Il tempo trascorso tra il rilevamento dei PI e la macellazione può rallentare il progresso del programma di eradicazione (Lindberg e Houe, 2005), ma limitando la movimentazione degli animali si riduce al minimo questo effetto. Considerando i problemi logistici che si verificano in tutto il processo di campionamento e ottenimento dei risultati in combinazione con la sensibilità del test e la rilevazione di animali infetti in modo acuto, il tasso di conferma degli animali PI è risultato dell'88% indice di una elevata specificità dei test. Il 12% di falsi positivi ha tuttavia causato la macellazione di circa 400 animali.

## Conclusioni

Il successo di un programma nazionale di tali dimensioni dipende molto dal coordinamento e dalla comunicazione tra tutti gli interessati. L' Ufficio Veterinario Federale coordina questo programma e ha sviluppato un database (ISVET) per collegare le diverse parti. A livello regionale, i veterinari cantonali organizzano il processo di campionamento e controllano l'attuazione delle misure del piano. E' presente inoltre un sito internet (BVD-Web) che riporta le informazioni dall' ISVET che tiene la lista di tutti gli animali per singolo allevamento, compreso il numero di marchio auricolare, data di nascita e risultato del test BVD (se esistente). BVD-Web è accessibile a tutti gli allevatori per acquisire i risultati dei test e gli elenchi degli animali possono essere stampati per consentire di avere un quadro generale della situazione. I laboratori comunicano i risultati dei test attraverso la banca dati del laboratorio centrale all'ISVET.

## **Piano di eradicazione nelle regioni dell'Austria meridionale**

Il programma di eradicazione della BVD è impostato secondo il modello svedese ed è stato introdotto nel 1996. In linea di principio la strategia comprende: (1) informazione ed educazione di tutti i gruppi coinvolti, (2) divisione delle mandrie in presumibilmente non infette e infette, (3) protezione delle mandrie non infette ed (4) eradicazione della malattia negli allevamenti infetti. La prevenzione dell'ingresso di animali PI sui pascoli comuni, è la chiave per una buona riuscita di tale piano di eradicazione.

### Tipologie di analisi

Lo screening iniziale e il monitoraggio delle mandrie non infette viene eseguito mediante test sierologici a livello aziendale, quali test sul latte di massa o test su gruppi di animali di giovane età (spot test). Gli anticorpi specifici verso BVDV sono rilevati in campioni di sangue o di latte mediante l' utilizzo della metodica ELISA indiretta (Svanovir®, Svanova Biotec, Svezia).

I campioni di sangue, utilizzati per ricerca dell'antigene virale, sono analizzati con test ELISA diretto (Herdcheck, IDEXX, Scandinavia). Tutti i campioni sottoposti a test ELISA per la rilevazione dell'antigene virale sono sottoposti ad un ulteriore test di conferma mediante RT-PCR, al fine di ottenere risultati accurati su vitelli provvisti di anticorpi materni con un'età superiore ai 28 giorni. E' utilizzata una metodica RT-PCR "one step" (GeneAmp Ez rTth DNA PCR Kit, Applied Biosystems). Ogni volta che un pool è trovato positivo, i singoli campioni che lo costituiscono sono sottoposti nuovamente al medesimo test di RT-PCR. I campioni che presentano risultati ambigui (negativi o dubbi al test ELISA diretto, ma positivi alla RT-PCR) sono raccolti e sottoposti ad un ulteriore test dopo 21 giorni. Gli animali che risultano positivi a quest'ultimo test sono considerati PI e quindi macellati. Gli animali che, invece, risultano negativi alla RT-PCR di conferma e successivamente positivi agli anticorpi, sono considerati transitoriamente infetti.

### Programma di eradicazione

Il programma segue fundamentalmente le linee guida del modello svedese, con alcune modifiche per quanto riguarda la movimentazione degli animali, i pascoli comuni e la certificazione degli allevamenti indenni. La movimentazione degli animali è

strettamente connessa allo stato sanitario dell'allevamento di provenienza, infatti gli animali provenienti da allevamenti non infetti non sono autorizzati ad avere contatti con mandrie di cui non è conosciuto lo stato sanitario. Gli animali possono essere movimentati da pascoli comuni o dai mercati, solo se tali capi provengono da mandrie testate per BVD negli ultimi 3 mesi, con esito negativo. I vitelli di età inferiore ai 5 mesi, prima di poter essere movimentati, devono essere testati (obbligatoriamente) per la ricerca dell'antigene BVDV mediante ELISA e RT-PCR, anche se provenienti da mandrie certificate esenti da BVDV. Gli animali provenienti da allevamenti di cui non si conosce lo stato sanitario riguardo BVDV devono essere testati singolarmente per la ricerca dell'antigene di BVDV prima di essere immessi nel pascolo comune. Inoltre alla fine della stagione del pascolo, almeno il 10% del patrimonio bovino di ogni pascolo, deve essere testato per la ricerca degli anticorpi specifici verso BVDV.

Gli animali che risultano negativi al test anticorpale all'inizio della stagione del pascolo devono esserlo anche alla fine di tale stagione. Questo risultato conferma che nel pascolo non ci sono animali PI. Un allevamento è considerato indenne da BVDV quando tre test di monitoraggio eseguiti consecutivamente risultano negativi in un periodo di almeno 12 mesi. I test di monitoraggio utilizzano la metodica ELISA per la ricerca degli anticorpi. Il materiale biologico impiegato può essere:

- campioni di latte di massa proveniente da tutte le bovine in lattazione;
- campioni di latte proveniente da giovani bovine;
- campioni sierologici (spot test) dei capi costituenti la rimonta.

Successivamente gli allevamenti dichiarati indenni sono sottoposti annualmente a test di follow-up obbligatori. Se lo spot test rivela un'infezione da BVDV o se comunque viene rilevato un animale PI nell'allevamento, deve essere eseguita un'indagine preliminare su tutti gli animali presenti in azienda. Successivamente sono condotti esami di follow-up su tutti gli animali presenti in allevamento e nati entro un anno dall'effettuazione dell'indagine preliminare o dopo l'eradicazione dell'ultimo animale PI. I test di follow-up devono inoltre essere eseguiti non prima di un anno dopo l'esecuzione dell'indagine iniziale oppure dopo almeno un anno dall'eliminazione degli ultimo PI. Al fine di dichiarare un allevamento indenne, questi ultimi test devono confermare l'assenza di anticorpi verso BVDV negli animali esaminati.

## Risultati

Nel 1999 sono stati testati individualmente 4.630 animali, provenienti da allevamenti con uno stato sanitario sconosciuto, al fine della loro immissione in pascoli comuni. Il 24,4% degli animali è risultato sieropositivo, con 33 soggetti PI.

Nel 2002, la prevalenza degli animali sieropositivi è stata ridotta al 12,96%; con solo due soggetti PI rilevati in occasione dei test di primavera (Rossmann et al., 2005). Le ultime sier conversionsi sono state rilevate nel 1999, causate dall'immissione di un soggetto PI nel pascolo comune senza essere stato sottoposto a prove per BVDV. La percentuale di allevamenti certificati indenni da BVDV in regioni con un utilizzo intensivo del pascolo comune è più alto (57,3%) che nelle altre regioni della Bassa Austria (43 %). Dei 9.800 allevamenti aderenti al piano, 5.067 hanno una certificazione di indennità.

## Conclusioni

Circa il 70% degli allevamenti da latte sono sieronegativi e possono essere monitorati con test su latte di massa, che risulta poco costoso. I pascoli comuni sono utilizzati intensamente in alcune zone della Bassa Austria, perciò un affidabile sistema di identificazione dei soggetti PI e la prevenzione della loro entrata nei pascoli comuni possono prevenire la trasmissione dell'infezione da BVDV. Gli animali transitoriamente infetti sono molto efficienti nella trasmissione del virus. Questo è stato osservato principalmente nei vitelli infettati da BVDV con una concomitante infezione da *coronavirus* bovino (Niskanen et al., 2002). Alcuni autori sostengono che ci possano essere infezioni transitorie per lunghi periodi di tempo, anche in assenza dell'identificazione di animali PI (Barber et al., 1985; Moermann et al., 1994), anche se non si sono osservati episodi di sier conversione nei pascoli comuni senza la presenza di un animale PI.

## **Piano di eradicazione in Bretagna (Francia)**

La Bretagna è una regione composta da quattro Dipartimenti, nella Francia occidentale in cui sono presenti 19.700 allevamenti da latte (780.000 capi) e 5.300 allevamenti da carne (142.000 capi) in un'area totale di 27.208 km quadrati. Nel 1986, le organizzazioni di Polizia Sanitaria in Bretagna (Union des Groupements Bretonne de Defense Sanitaire, UBGDS) hanno iniziato un programma di controllo per BVDV, concentrandosi sugli allevamenti con segni clinici causati da BVDV, con il fine di individuare e avviare alla macellazione gli animali PI. Fino al 1996, sono stati esaminati un numero compreso tra 500 e 600 allevamenti, con una rilevazione annuale di un totale di circa 1.000-1.500 animali PI (Joly et al., 2005). Nello stesso periodo, molti sono stati gli allevamenti (nei quali precedentemente non erano presenti animali con sintomatologia clinica ascrivibile a BVD) che hanno subito l'infezione, per esempio nel 1997 circa 60 allevamenti sono risultati infetti. Di conseguenza, gli allevatori hanno richiesto un sistema collettivo di controllo della BVD a prescindere dalla presenza di sintomi clinici ascrivibili alla malattia.

### Tipologie di analisi

Le tipologie di esami utilizzate per lo screening iniziale sono stati il test ELISA per la rilevazione degli anticorpi verso BVDV (proteina NS2/3) nel siero ematico, in campioni di latte individuali e di latte di massa, mentre la ricerca virologica è stata effettuata mediante metodica RT-PCR.

### Programma di eradicazione

Il primo passo del programma è stato quello di classificare gli allevamenti secondo il loro stato sanitario, valutato sulla base dei risultati di tre test consecutivi per la ricerca degli anticorpi (effettuati a quattro mesi di distanza l'uno dall'altro). Gli allevamenti sono stati quindi inseriti in cinque differenti classi: A per gli allevamenti presumibilmente non infetti, cioè con tre risultati consecutivi di assenza o di livelli molto bassi di anticorpi; B per quelli che probabilmente non hanno evidenziato un'infezione recentemente, cioè con tre risultati consecutivi che attestano livelli anticorpali bassi o moderati; C per quelli che hanno subito episodi di sieroconversione; D per quelli presumibilmente infetti, cioè con alti livelli di anticorpi; E per quelli in cui sono necessari ulteriori esami prima di poter stabilire lo stato sanitario dell'allevamento. I

risultati ottenuti, nella fase iniziale (ottobre del 1998) per gli allevamenti campionati sono stati: 39,4 % (A); 19,6 % (B); 1,9 % (C); 33,7 % (D) e 5,3% (E).

Successivamente a tali dati, l'UBGDS ha deciso di attuare un regime collettivo di controllo ed eradicazione per l'infezione da BVDV, con l'obiettivo di controllare il rischio di nuove infezioni in tutti gli allevamenti mediante una procedura di rilevamento e macellazione di tutti gli animali PI. Gli animali sono sottoposti a specifici esami prima di essere avviati al pascolo (per limitare il rischio di trasmissione per contatto), e prima della loro vendita (per limitare il rischio di introduzione in un altro allevamento). In allevamenti ritenuti presumibilmente infetti (sulla base di test per la ricerca degli anticorpi), la rilevazione dei soggetti PI può essere eseguita applicando uno dei seguenti due schemi:

1. Test ELISA (NS2-3) per la ricerca degli anticorpi verso BVDV sono effettuati su campioni di latte di massa di bovine in lattazione. Se il risultato di tale test è positivo si esegue un ulteriore test di conferma mediante RT-PCR, e se anche quest'ultimo risulta positivo, tutte le bovine da latte costituenti il campione sono testate sierologicamente in maniera individuale. Gli animali sieronegativi sono poi controllati virologicamente.

2. Test ELISA per la ricerca degli anticorpi vengono effettuati su sieri ematici prelevati da cinque giovenche gravide e da cinque giovani bovine (di età superiore ai 6 mesi). Quando più di 2 bovine risultano positive, l'intero gruppo che comprende le bovine sieropositive è sottoposto ad esame sierologico, e successivamente gli animali sieronegativi sono testati virologicamente.

Gli animali PI sono macellati entro 1 mese dopo il loro rilevamento. Questi schemi sono ripetuti su base semestrale. Le indagini vengono fermate quando tre controlli consecutivi risultano negativi. I costi del sistema sono condivisi tra gli allevatori e le organizzazioni di sanità animale.

### Restrizioni commerciali ed estensione del programma di controllo ed eradicazione agli allevamenti da carne

I bovini acquistati, prima della loro immissione in allevamento, devono essere preventivamente testati per BVD oppure si deve essere a conoscenza dello stato sanitario riguardo BVD dell'allevamento di provenienza (il tutto per impedire il

commercio di animali PI). Tutte le informazioni disponibili (sia sull'allevamento di provenienza che sugli animali) sono utilizzate per valutare ogni singolo animale. Partendo dal presupposto che un animale può diventare PI solo attraverso la trasmissione verticale del virus, un animale noto come “non PI” non può diventarlo, ma può solo subire un'infezione transitoria in caso di trasmissione orizzontale del virus. Pertanto, ogni animale con un risultato favorevole (non PI) è incluso in un gruppo di animali "garantiti non PI" in un apposito database ed è esentato dalle prove individuali per BVD necessarie per essere venduto ad un'altra azienda. Lo stato di “non PI” è conseguito da un animale solo se soddisfa uno dei seguenti criteri:

1. Ha un'età superiore ai 6 mesi e risulta negativo a un test ELISA per la ricerca dell'antigene virale.
2. Risulta negativo ad un test RT-PCR per la ricerca virale indipendentemente dall'età dell'animale.
3. Ha una età superiore ai 6 mesi e risulta positivo ad un test per la ricerca degli anticorpi verso BVDV.
4. Risulta negativo ad un test per la ricerca degli anticorpi verso BVDV e fa parte di un gruppo di minimo 10 animali in cui almeno il 90% risulta negativo alla ricerca degli anticorpi.
5. E' una bovina da latte appartenente ad un allevamento di stato A.
6. E' una bovina multipara appartenente ad un allevamento di stato B.
7. E' una bovina da latte appartenente ad un allevamento risultato negativo ad un test RT-PCR eseguito sul latte di massa.

Gli allevamenti da carne sono sottoposti ad un programma simile in cui viene determinato lo stato sanitario riguardo BVD dell'allevamento utilizzando due test sierologici su pool di campioni ematici prelevati da animali con un'età compresa tra 24 e 48 mesi.

## **Programma di eradicazione nella regione della Bassa Sassonia in Germania**

Il Settore lattiero-caseario e la produzione di carni bovine sono fattori fondamentali nella produzione agricola tedesca. Circa il 19% della carne di manzo venduta all'interno dell'Unione Europea è prodotta in Germania, per un totale di 14,7 milioni di bovini distribuiti in 226'000 allevamenti (Greiser-Wilke et al., 2003). Nella parte nord-occidentale e meridionale della Germania ci sono piccole aziende con elevata densità di bestiame, raggruppate in piccoli villaggi rurali, mentre il bestiame della parte orientale degli Stati Federali è presente in grandi aziende con circa 1.000-2.000 animali per allevamento. In tutte e tre le aree la sieroprevalenza per BVD del bestiame supera l'80%. L'incidenza di capi PI varia tra 1% e il 2%. La presenza di tali animali in combinazione con l'intenso commercio di bestiame sono le principali ragioni dell'elevata sieroprevalenza in Germania. Nella Bassa Sassonia il Ministero delle Politiche Agricole ha pubblicato delle linee guida per il controllo della BVD in combinazione con l'eradicazione delle infezioni da BoHV-1.

### Programma di eradicazione

Il programma di controllo ed eradicazione ha avuto inizio nel 1993, e nei successivi due anni è stato sottoposto ad attenta valutazione. In questo periodo si è potuto evidenziare un netto calo dei capi PI presenti negli allevamenti, dopodichè si è proceduto alla ridisegnazione del piano.

I punti principali sono i seguenti:

- la partecipazione al programma è volontaria;
- l'identificazione e la rimozione degli animali PI è basata su test ELISA per la ricerca dell'antigene virale su campioni individuali di sangue o di siero;
- vaccinazione sistematica delle nascite femminili;
- prevenzione della reintroduzione dell'infezione mediante misure igieniche, quali l'acquisto di soli animali con stato sanitario equivalente.

Lo scopo è quello di raggiungere lo stato di allevamenti “non sospetti” per l'infezione da BVDV, cioè non infetti ma con animali sieropositivi. Gli allevatori, che aderiscono al programma, sostengono le spese per il campionamento, mentre l'assicurazione pubblica

(“Tierseuchenkasse”) provvede ai costi di laboratorio e compensa le perdite economiche conseguenti all'abbattimento degli animali PI e alle spese per la vaccinazione (solo nella Bassa Sassonia). La procedura da seguire per i partecipanti al programma di controllo è la seguente:

- tutti gli animali fino a tre anni di età devono essere sottoposti al test Elisa per la ricerca dell'antigene virale. Gli animali positivi devono essere nuovamente testati a distanza di 14 giorni, e quelli che risultano positivi anche al secondo test (animali PI) devono essere abbattuti entro sei settimane.
- I vitelli nati durante i 12 mesi successivi alla rimozione dell'ultimo animale PI devono essere testati per la rilevazione dell'antigene BVDV. Gli animali che risultano positivi devono essere abbattuti.
- Tutte le manze di età superiore ai sei mesi devono essere vaccinate (almeno 10 settimane prima della prima inseminazione).

Le misure igienico-sanitarie da seguire al fine di mantenere lo stato di allevamenti “non sospetti” per l'infezione da BVDV sono:

- vitelli (con età superiore ai due mesi) nati entro 12 mesi dopo la rimozione dell'ultimo animale PI devono risultare negativi al test ELISA per la ricerca dell'antigene del BVDV;
- vaccinazione sistematica ( in due fasi);
- non devono essere presenti animali con segni clinici specifici per l'infezione da BVDV;
- possono essere introdotti solo animali provvisti di certificato ufficiale di indennità da BVDV.

Nel piano di controllo ed eradicazione possono essere utilizzati sia i vaccini vivi attenuati che quelli inattivati. Il protocollo raccomandato nella Bassa Sassonia prevede l'impiego di un programma vaccinale diviso in due fasi. Esso utilizza un vaccino inattivato per la vaccinazione primaria e un vaccino vivo modificato come richiamo. Le due vaccinazioni determinano una buona risposta immunitaria analoga a quella indotta in condizioni naturali. Dopo due anni dall'inizio del programma, la maggior parte degli allevatori ha eseguito il primo test eliminando gli animali PI, ma non ha fatto il test per il monitoraggio (Moennig, non pubblicato). Quindi sarebbe auspicabile l'uso di Regolamenti Federali, come in Danimarca, per migliorare l'efficacia del programma.

### **2.3.2 Piani di eradicazione in Italia**

Nel nostro paese, la Provincia Autonoma di Bolzano ha introdotto l'obbligatorietà del controllo delle infezioni da BVD basato sull'eliminazione dei soggetti PI in tutti gli allevamenti bovini da latte nell'ottobre 1999. Altri piani di controllo sono stati avviati dalla provincia di Trento e dalla regione Veneto e dalle province di Lecco e Como con la partecipazione dei servizi di assistenza tecnica della Associazione Provinciale Allevatori. A partire dal 2006 anche la regione del Piemonte ha promosso uno studio in alcune aree pilota per avere un quadro generale sulla prevalenza di BDV nella regione ed ottimizzare le procedure diagnostiche.

#### **Programma di eradicazione nella Provincia di Bolzano**

Nella provincia di Bolzano, dove non era mai stato impiegato alcun vaccino per BVDV, nel 1997 è partito un piano di controllo volontario, reso obbligatorio nel 1999.

##### Programma di eradicazione

Nella fase di controllo (1997-1999), il piano prevedeva l'esame virologico annuale di campioni individuali di sangue prelevati da tutti gli animali di età compresa, nel 1999-2000, tra i tre mesi e i tre anni e, nel biennio 2001-2002, tra i due mesi e i due anni di età, oltre ad esami su animali movimentati per il pascolo o l'alpeggio e su animali acquistati fuori dalla provincia di Bolzano. Inoltre, la partecipazione dei bovini ad aste effettuate sul territorio della provincia di Bolzano, solo successivamente a risultato negativo all'esame virologico effettuato 1 mese prima della manifestazione, era limitata a capi provenienti da aziende della provincia stessa. Gli esami sierologici venivano condotti mediante impiego di un test ELISA per la ricerca della proteina non strutturale E<sup>ns</sup> (gp 48). Si tratta di un test la cui sensibilità e specificità si avvicinano a quelle di un isolamento virale in coltura cellulare e che risente dell'interferenza da anticorpi materni solo limitatamente alle prime quattro settimane di vita del vitello. Soggetti riscontrati sierologicamente positivi venivano sottoposti a un riesame a distanza di almeno 30 giorni, nel periodo 1999-2000, e di almeno 60 giorni nel periodo 2001-2002, per verificare il tipo di viremia transitoria o persistente. Nel caso di viremia persistente, gli animali, considerati PI, erano eliminati. In caso di bovine gravide immunotolleranti, i

vitelli di nuova nascita venivano anch'essi destinati all'abbattimento. Era inoltre vietata la vaccinazione.

Nel corso della campagna di profilassi del 2004/05, sono stati prelevati per la prima volta nella provincia di Bolzano sia campioni di sangue che campioni di latte (ai fini del rilevamento degli anticorpi).

A partire dal 1° aprile del 2005 i vitelli neonati vengono controllati a tappeto per BVDV mediante il prelievo di biopsia auricolare. I marcatori prelevano i campioni al momento dell'apposizione della marca auricolare, entro le prime tre settimane di vita dell'animale. Questa metodologia consente di allontanare i soggetti PI poco tempo dopo la nascita, ed evitare quindi che costituiscano un pericolo per gli altri animali. Circa quattro settimane dopo il prelievo si provvede ad eseguire un ulteriore controllo sui capi risultati positivi. L' esame della cartilagine auricolare permette l'analisi dei vitelli maschi di tre settimane prima che possano essere venduti fuori provincia. In tutte le aziende, nel corso di tale piano di profilassi, si è provveduto a prelevare un campione di latte di massa da destinare alla ricerca degli anticorpi, e nel caso fosse risultato positivo si sarebbe proceduto a prelievo ematico individuale. Attualmente il piano di profilassi della BVD nella Provincia di Bolzano (Decreto del Direttore del Servizio del 10 marzo 2009, n. 31.12/136762) stabilisce che:

- il piano ha carattere obbligatorio;
- sono esclusi dal piano i bovini degli allevamenti volti esclusivamente alla produzione di carne, in cui non siano presenti capi riproduttori;
- tutti i bovini degli allevamenti, condotti al pascolo comune o all'alpeggio devono essere risultati negativi alla prova per la ricerca del virus della BVD;
- i test per la ricerca del virus della BVD sono eseguiti su campioni di cartilagine auricolare prelevati al momento dell'apposizione dei marchi auricolari oppure mediante test scelti dal Servizio Veterinario Provinciale, sentito l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale;
- gli animali possono essere introdotti negli allevamenti da riproduzione, nonché alle aste o alle fiere solo se risultati negativi alla ricerca virale;
- i bovini di oltre 6 mesi di età, che risultano virologicamente positivi ai test autorizzati, devono essere immediatamente allontanati dagli animali gravidi e in età riproduttiva, e sottoposti a distanza di almeno due mesi dal primo controllo ad un ulteriore test per

verificare se si tratta di un'infezione transitoria o persistente;

- se il secondo test conferma la positività, l'animale è considerato persistentemente infetto e come tale avviato alla macellazione entro 3 settimane dalla notifica diagnostica eseguita dal Servizio Veterinario Provinciale;

- per la macellazione degli animali infetti viene corrisposto al proprietario un indennizzo;

- è vietata la vaccinazione contro BVD nelle aziende della Provincia Autonoma di Bolzano.

## Risultati

Nella fase di controllo del piano (1997-1999), risultava sieropositivo il 58,9% dei soggetti testati appartenenti a 211 allevamenti dei 220 esaminati. La prevalenza dei soggetti immunotolleranti era pari all'1,1%. Tra il 1999 ed il 2002 fu possibile osservare una progressiva riduzione della circolazione del virus nel territorio della provincia dall'1,89% allo 0,30% di positività del 2002, cui corrispose una diminuzione nelle nascite di soggetti PI dall'1,1% del 1999 allo 0,26% del 2002. Nel periodo 2001-2002 sui 9.812 allevamenti da latte dell'intera provincia, risultarono positive per presenza di soggetti PI soltanto 125 aziende, mentre nella campagna di profilassi del 2004/05 su 5.839 allevamenti controllati 2.268 (39 %) sono risultati positivi. Nel 2009 negli allevamenti presenti nel territorio della Provincia, sono stati rilevati 98 nuovi casi di BVD/MD. Ad oggi perciò la provincia non può ritenersi indenne da BVD

## **Piano di eradicazione della Regione Veneto**

La Regione Veneto ha attivato nel 2007, con la DGR 2909/2007, uno specifico piano di controllo obbligatorio nei confronti di questa malattia. Il piano di controllo regionale prevede che:

- tutti i capi provenienti da allevamenti da riproduzione di età superiore ai 2 mesi devono essere sottoposti ad accertamento virologico per BVD, con metodica ELISA, su siero di sangue, nei trenta giorni precedenti la movimentazione;

- gli animali risultati positivi al test possono essere movimentati solo se negativi ad un secondo test eseguito, con la stessa metodica, almeno 21 giorni dopo la data del primo controllo;

- tutti i bovini di età superiore ai 2 mesi provenienti da altre regioni del territorio

italiano, da Paesi comunitari ed extra comunitari, introdotti in allevamento da riproduzione devono essere controllati entro 20 giorni dall'introduzione nel caso in cui non siano stati sottoposti a controllo prima della movimentazione;

- tutti gli animali risultati positivi ai due controlli virologici, eseguiti a distanza di 3 settimane l'uno dall'altro, devono essere adeguatamente isolati dalla mandria.

La tabella 1 illustra i dati relativi agli allevamenti e ai capi controllati nell'ambito del piano nel triennio 2007-2009.

Tabella 1.

|                                  | <b>2007</b> | <b>2008</b> | <b>2009</b> |
|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Totale allevamenti</b>        | 5217        | 5046        | 7605        |
| <b>Allevamenti Controllati</b>   | 1456        | 2065        | 2039        |
| <b>% Allevamenti Controllati</b> | 27,91       | 41          | 26,81       |
| <b>N°capi presenti</b>           | 303096      | 299686      | 336105      |
| <b>N° capi testati</b>           | 22437       | 27800       | 28150       |
| <b>% capi testati</b>            | 7,4         | 9,27        | 8,38        |
| <b>Allevamenti positivi</b>      | 94          | 141         | 148         |
| <b>% Allevamenti Positivi</b>    | 6,46        | 6,83        | 7,26        |
| <b>N° capi positivi</b>          | 176         | 317         | 247         |
| <b>% capi positivi</b>           | 0,78        | 1,14        | 0,98        |

Il numero dei soggetti positivi nel 2009 è stato pari allo 0,98% dei capi controllati, leggermente inferiore alla percentuale registrata nell'anno precedente. Il numero di allevamenti con almeno un soggetto eliminatore del virus è risultato in crescita rispetto al 2008 (6,83% di allevamenti positivi nel 2008 contro il 7,26% nel 2009), ciò conferma la necessità di mantenere attivo il controllo sulle movimentazioni al fine di ridurre la diffusione del virus nella popolazione bovina della Regione. In conclusione i dati emersi dimostrano la necessità di mantenere attiva la vigilanza su questa patologia, che risulta essere ampiamente diffusa nella Regione del Veneto e, a tale fine, il piano di controllo ha dimostrato di essere efficace in quanto, evidenziando un certo numero di soggetti viremici, ha impedito la propagazione del virus ad altre aziende attraverso restrizioni delle movimentazioni di tali animali.

## **Progetto pilota della Regione Piemonte**

La regione Piemonte ha attuato nell'ultimo triennio un progetto pilota, che coinvolgendo in una prima fase 5 ASL e a partire dal 2009 tutte le ASL del Piemonte, aveva la finalità di testare e proporre protocolli diagnostici ed operativi, ai fini della scelta futura delle strategie di controllo. Il progetto ha previsto il controllo, in ogni allevamento, di un numero ridotto di animali preferibilmente giovani, di età compresa tra 9 e 15 mesi, che rappresentano la categoria di elezione per valutare la circolazione del virus BVD in allevamento.

In caso di positività al campione sono stati sottoposti a prelievo e test virologico tutti i capi identificati e censiti presenti in allevamento, per individuare, dopo ripetizione del test virologico a distanza di 30 giorni sui soggetti positivi, gli animali PI, i quali sono poi abbattuti.

## **Piano di eradicazione delle Province di Lecco e Como**

Le province di Lecco e Como hanno adottato un piano di controllo volontario sugli allevamenti da latte a partire dal 2002. A maggio del 2004 aderivano al piano 84 aziende sulle 425 presenti sul territorio delle due province, 58 delle quali non praticavano la vaccinazione. L'esame sierologico, condotto con un campionamento in grado di rilevare una prevalenza del 10%, è stato integrato con un'indagine sui fattori di rischio per l'infezione da BVDV. Gli allevamenti venivano suddivisi in quattro categorie: allevamenti negativi a basso rischio, negativi a rischio elevato di infezione, allevamenti positivi a basso ed elevato rischio di infezione. Allevamenti appartenenti alle prime due categorie venivano nuovamente controllati a distanza di sei e dodici mesi, mentre gli allevamenti delle due ultime categorie erano sottoposti ad indagine per identificare soggetti PI. Negli allevamenti con infezione in atto veniva consigliata la vaccinazione con vaccino spento.

## **Programma di eradicazione in un area della provincia di Roma (Ferrari et al., 1999)**

In seguito al rilevamento dell'infezione da BVDV in due mandrie di grandi dimensioni situate in una definita area della provincia di Roma, è stato istituito un programma di controllo per l'intera area. L'obiettivo del programma è quello di ottenere un territorio esente da BVDV.

Il programma si basa sul rilevamento e la rimozione degli animali PI. Precedenti esperienze hanno dimostrato che l'eradicazione del virus da allevamenti infetti è possibile senza il ricorso alla vaccinazione (Bitsch et al., 1995), di conseguenza il programma non contempla l'uso di vaccini, se non specificatamente richiesto dai proprietari. Il territorio, che copre una superficie di 517 km quadrati, è sotto la giurisdizione di un singola unità sanitaria locale. Dei 174 allevamenti bovini presenti, 160 sono da latte, mentre i rimanenti sono allevamenti finalizzati alla produzione di carne, per un numero totale di 16.049 bovini. La media di animali per allevamento è di 25. Il programma di controllo ha utilizzato i campioni di sangue destinati al controllo della Brucellosi e della Leucosi, che sono regolarmente inviati all'Istituto Zooprofilattico di competenza. Ai fini del controllo della BVD, sono raccolte varie informazioni dall'allevatore, quali: stato di gravidanza (compreso il mese di gravidanza), se l'animale è stato introdotto negli ultimi 12 mesi e la sua storia vaccinale per BVD. Tutti gli animali entrati nell'allevamento negli ultimi 12 mesi sono inclusi nei campioni da controllare per la BVD, i rimanenti sono campionati in modo casuale fino ad un numero sufficiente al fine di rilevare una sieroprevalenza del 5% o superiore (con un livello di confidenza del 95%). Nessuna modifica è stata compiuta per migliorare la sensibilità del test, in considerazione del fatto che la prevalenza di animali sieropositivi nelle mandrie con infezione in corso è in genere superiore al 5 %.

### Tipologie di analisi

La tecnica sierologica impiegata come test di screening è un test immunoenzimatico competitivo (ELISA) prodotto e standardizzato dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia (Brocchi et al., 1992). Tutti i campioni risultati dubbi sono stati sottoposti nuovamente al test Elisa, utilizzando in questo caso un altro kit commerciale (Serelisa BVD / BD Ab mono blocking; Thibault et al., 1993).

Per la rilevazione degli anticorpi in campioni di latte è stata usata una tecnica immunoenzimatica indiretta (SVANOVIR1, diagnostica; Niskanen et al,1989). Per la rilevazione dell'antigene virale è stata usata una tecnica immunoenzimatica indiretta (Serelisa BVD-MD indiretta Ag; Thibault et al., 1993) su campioni di sangue di animali sieronegativi presenti in allevamenti classificati come infettati di recente.

### Programma di eradicazione

Sulla base di uno screening sierologico, le mandrie vengono classificate come negative se non sono stati rilevati animali sieropositivi o come positive se si rileva almeno un animale sieropositivo. Diverse sono le azioni intraprese negli allevamenti a seconda della classificazione iniziale:

- **Mandrie negative:** gli animali sono testati nuovamente dopo almeno 30 giorni. L'allevamento acquisisce lo stato di indennità da BVDV se il secondo test conferma il risultato precedente. Un programma di monitoraggio è effettuato al fine di mantenere tale stato. Esso consiste in test semestrali, su campioni di latte di massa o, nel caso di allevamenti da carne, su campioni di sangue prelevati casualmente fra quelli portati all'Istituto per i test sulla Brucellosi e sulla Leucosi.

- **Mandrie positive:** in seguito alla rilevazione di almeno un animale sieropositivo, l'intero gruppo di animali, con una età compresa tra 6 e 12 mesi, è sottoposto ad un esame sierologico per la ricerca degli anticorpi. In considerazione dei risultati degli esami sierologici, le mandrie positive sono ulteriormente classificate in mandrie con o senza recenti casi di infezione. Animali di età inferiore ai 6 mesi non sono testati a causa della possibile interferenza dovuta agli anticorpi di origine materna.

1. Allevamenti nei quali non ci sono stati casi recenti di infezione: lo stato sieronegativo di tutti gli animali con un'età compresa tra i 6 e i 12 mesi richiede solo ulteriori test eseguiti ogni 6 mesi al fine di verificare lo stato sierologico dei vitelli che hanno raggiunto i 6 mesi di età e non erano stati precedentemente inclusi nel campione. In questo caso si è arbitrariamente assunto che tra gli animali adulti, non testati sierologicamente, c'è almeno un animale a rischio di partorire un vitello PI. Di conseguenza, l'acquisizione della qualifica di indenne da BVD può essere raggiunta solo dopo che questi bovine hanno partorito e i loro vitelli sono stati testati per BVDV. In questi casi, la mandria è considerata indenne da BVDV, se gli animali con una età

compresa tra i 6 a 12 mesi risultano costantemente negativi per un periodo di almeno 18 mesi, a partire dalla data del primo test sugli animali con età inferiore a 1 anno (considerato come tempo zero).

2. Allevamenti con recenti casi di infezione: successivamente al rilevamento di uno o più vitelli sieropositivi, il controllo sierologico è esteso anche agli animali non testati precedentemente, e tutti gli animali che risultano sieronegativi vengono in seguito testati per rilevare la presenza di BVDV.

Un singolo animale è classificato come PI se il virus è rilevato due volte a distanza di 30 giorni. I soggetti sieronegativi, non sospettati di essere PI, sono comunque monitorati almeno ogni 6 mesi per rivelare nuovi casi di infezione negli animali giovani non precedentemente testati.

Sulla base dei risultati sierologici di tutti gli animali in combinazione con i dati riguardanti lo stato di gravidanza delle bovine presenti in allevamento, può essere stimata la data di nascita dell'ultimo possibile animale PI. La mandria è considerata esente da BVD quando il gruppo di animali con età compresa tra i 6 e i 12 mesi, nati all'interno di un periodo di 12 mesi dopo la data di allontanamento dell'ultimo possibile animale PI (tempo zero), e inoltre non vengono rilevati soggetti sierologicamente negativi e sieroconversioni. Se si verificassero sieroconversioni, il tempo zero verrebbe posticipato in funzione dei nuovi casi di infezione.

Una volta che lo stato di indennità da BVDV è stato acquisito, l'allevamento deve aderire ad un programma di monitoraggio per mantenere il suo stato sanitario. Nella prima fase questo programma si svolge testando gli animali con un'età compresa tra i 6 e i 12 mesi, con una cadenza semestrale fino alla completa rimozione dei soggetti sieropositivi, dopodiché l'allevamento può essere monitorato mediante test su campioni di latte di massa.

Il piano di eradicazione è iniziato nel febbraio 1997 dopo essere stato illustrato agli allevatori. Il primo passo consiste nel testare sierologicamente i campioni di sangue prelevati per i programmi di eradicazione della Brucellosi e della Leucosi, indipendentemente dal consenso degli allevatori, per stabilire la distribuzione di allevamenti potenzialmente infetti. Successivamente, sono state poste le condizioni di partecipazione al programma: (1) rimozione immediata e macellazione degli animali PI;

(2) controllo degli animali di nuova introduzione mediante indagini sierologiche e virologiche (3) controlli sierologici e virologici su tutti gli animali venduti ad altre unità riproduttive, se l'allevamento non ha ancora ottenuto lo stato di indennità da BVDV.

## Risultati

Il programma ha analizzato 147 allevamenti per un totale di 6.992 animali, mediante l'utilizzo di 7.261 test sierologici su campioni di siero e 49 su campioni di latte di massa. Il numero di test virologici eseguiti è di 224, mediante i quali sono stati rilevati 22 animali viremici. 63 allevamenti (42,9%) sono stati classificati come negativi, e 26 hanno già acquisito lo stato di indennità da BVDV. La prevalenza di allevamenti positivi è stata del 56,1%, ma solo 13 (8,8%) sono stati classificati come affetti da recenti casi di BVD e quindi sospettati di infezione in corso. La prevalenza complessiva degli animali positivi agli anticorpi ammonta a 2.199 (31,4%) e la prevalenza di animali PI nella popolazione testata è di 22 (0,31%).

## Conclusioni

L'ipotesi principale su cui è stato impostato il programma è che gli animali PI sono considerati come la principale fonte di infezione senza tener presente gli altri fattori di rischio negli allevamenti infetti. In questo studio la prevalenza di allevamenti che hanno sperimentato l'infezione da BVDV è del 56,1% e solo l'8,8% è classificato in corso d'infezione. Questo programma di eradicazione della BVD è stato progettato per essere eseguito in concomitanza con il programma nazionale di eradicazione della Brucellosi e della Leucosi, e uno dei primi obiettivi del programma è stato quello di verificare la sua fattibilità. Il controllo semestrale sugli allevamenti è stato lo stesso di quello stabilito per la Brucellosi e la Leucosi con l'importante vantaggio che nella maggior parte dei casi non sono stati richiesti costi aggiuntivi per la raccolta dei campioni di sangue.

## Capitolo III

### Ricerche Personali

#### 3.1 Introduzione

L'azienda agricola Tenuta di Paganico ha elaborato e intrapreso un piano di controllo e di eradicazione della BVD allo scopo di migliorare l'efficienza riproduttiva ed in particolare ridurre il periodo medio di interparto e il tasso di incidenza degli eventi abortivi.

Nel 2005 è stata condotta un'analisi dalla quale è risultato che il periodo di interparto nel 76 % dei capi allevati era superiore ai 400 giorni (dati riferiti al biennio 2004-2005). Il primo provvedimento intrapreso dall'azienda è stato quello di migliorare i fattori connessi con la gestione dell'allevamento di tipo ambientale e alimentare. Si è inoltre proceduto ad aumentare il tasso di rimonta annuale fino al 25 %, al fine di eliminare i capi più vecchi ed abbassare l'età media dei soggetti riproduttori. Tali provvedimenti non hanno però portato i risultati sperati, in quanto il numero di capi con interparto lungo si manteneva eccessivamente elevato.

Si è pertanto deciso di eseguire sui riproduttori esami sierologici per alcune malattie infettive sostenute da agenti abortigeni (clamidiosi, toxoplasmosi, leptospirosi e anaplasmosi) alle quali è stata aggiunta anche la paratubercolosi. Successivamente l'indagine è stata estesa anche a BVD ed è stata rilevata una sieroprevalenza del 100 %.

Il primo provvedimento, nei confronti di tale malattia, è stato quello di intraprendere un piano di profilassi vaccinale che nel corso di quattro anni (dal 2007 al 2010), ha portato ad una riduzione della sieroprevalenza dal 100 al 78 %. Tenuto conto dell'impegno economico (ogni dose vaccinale ha un costo di 7 euro ed a questo si deve aggiungere il costo di esecuzione, che per un allevamento allo stato brado incide considerevolmente), si è ritenuto opportuno procedere verso un vero e proprio programma di controllo e di eradicazione della malattia, fondato sull'identificazione ed eliminazione dei soggetti PI.

Il piano di controllo e di eradicazione poteva inoltre essere inquadrato nei principi di gestione dell'azienda, di garantire il più alto grado possibile di benessere animale e di indennità dalle principali malattie infettive.

### **3.2 Allevamento in studio**

L'allevamento oggetto dello studio è situato nel territorio di Paganico, una frazione del comune di Civitella Paganico in provincia di Grosseto. L'Azienda agricola e zootecnica della Tenuta di Paganico ha un'estensione di 1.500 ettari, dei quali 1.100 sono boschi e 400 terreni agricoli. Dal 2002 l'intera Azienda è stata convertita ai metodi dell'agricoltura e della zootecnia biologica. L'attività principale della Tenuta è quella zootecnica, sono infatti allevati bovini, cavalli di razza Maremmana e suini di razza Cinta Senese.

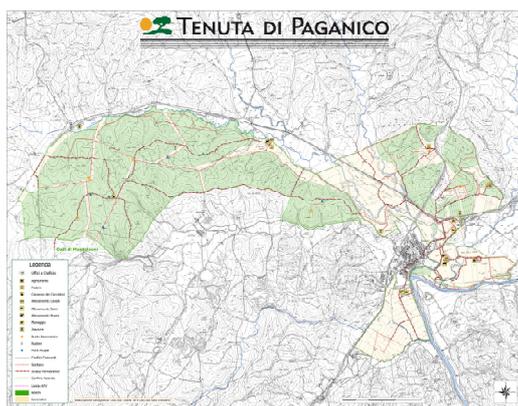
La Tenuta di Paganico possiede circa 100 bovini riproduttori di razza Maremmana, Chianina e Limousine allevati in 800 ha di boschi e pascoli. La parte boschiva copre circa 700 ha ed è costituita prevalentemente da cedui di specie quercine (cerro, roverella, farnia, sughere e leccio) ed in parte da macchia mediterranea, mentre il territorio rimanente è costituito da pascoli (avena, veccia, trifoglio alessandrino). Gli animali sono divisi per razza in tre mandrie, ognuna delle quali è composta da un toro, il quale permane per tutto l'anno nella mandria, e circa 30 riproduttrici. Le tre mandrie sono separate mediante recinzioni, che però permettono il contatto occasionale tra animali delle diverse mandrie.

Tutto il territorio destinato all'allevamento è diviso in dieci sezioni (figura 5) di estensione variabile (dai 200 ai 40 ettari), ognuna provvista di almeno un'abbeverata (sorgiva o invaso di raccolta di acqua piovana). Tali zone sono sottoposte a turni di rotazione nel corso dell'anno. Da ottobre a febbraio ogni mandria permane nella stessa zona di pascolo (boschi e pascoli). Nel resto dell'anno si segue un ciclo di rotazione nel quale gli animali sono spostati mensilmente da una zona all'altra, in base alla disponibilità di acqua e pascoli.

Gli animali allevati condividono il territorio con cavalli di proprietà della stessa Tenuta. Nell'area dei pascoli sono inoltre presenti animali selvatici (cinghiali, caprioli, lepri ed istrici), i quali vivono in stretto contatto con i bovini.

I redi vivono con le madri nei boschi e nei pascoli fino ad una età di circa sei mesi e successivamente i soggetti destinati alle fasi di accrescimento e di ingrasso sono trasferiti dal Podere “ Pian delle Monache”, dove sono localizzati i recinti di raccolta degli animali, al Podere “ i Noci”. Il Podere “ Pian delle Monache” dista circa 6 km dalla zona adibita al pascolo e gli spostamenti degli animali sono effettuati con una cadenza quadrimestrale tramite una condotta al passo, azione che richiede perciò un notevole impegno organizzativo. Quando gli animali si trovano nei recinti del podere “Pian delle Monache” vengono sottoposti a diagnosi di gravidanza, prelievi diagnostici, vaccinazioni, eventuali interventi terapeutici e apposizione delle marche auricolari. Tutte queste operazioni sono compiute utilizzando un travaglio per l'immobilizzazione degli animali. Nel Podere “ I Noci” gli animali, dopo un periodo di adattamento, sono divisi in box per razza e fascia di età con libero accesso all'aperto, fino al raggiungimento di un'età di 18/22 mesi.

Gli animali destinati alla rimonta, formano una quarta mandria (figura 6), in cui sono presenti manze e manzette di età compresa tra i 6 mesi ed i 4 anni. Questo rappresenta l'unico periodo in cui animali di diverse razze vivono in promiscuità, prima di essere inseriti nelle mandrie come riproduttori. Le manze di razza Maremmana sono trasferite nella mandria dei riproduttori una volta raggiunta un'età di quattro anni. Le manze di razza Chianina e Limousine sono trasferite all'età di 2 anni.



**Fig. 5:** Cartina topografica della Tenuta.



**Fig. 6:** La mandria delle manze.

Tutti gli animali si alimentano del pascolo erbaceo e della vegetazione arbustiva. Inoltre nei periodi dell'anno in cui la vegetazione è scarsa (pieno inverno e piena estate) sono fornite integrazioni esclusivamente con alimenti di origine aziendale: fieno, paglia, cereali e leguminose coltivati nei 400 ha della Tenuta. L'Azienda è certificata come biologica ed utilizza la medicina omeopatica, a scopo sia preventivo che curativo.

### 3.2.1 Situazione sanitaria

L'allevamento bovino è indenne da tubercolosi, brucellosi, leucosi bovina enzootica, ma nel corso degli ultimi anni sono stati segnalati casi di paratubercolosi, sui quali si è intervenuto con la macellazione di un soggetto sintomatico e un piano di monitoraggio. Sono stati inoltre segnalati casi di infezione da BoHV-1 e le indagini sierologiche precedenti al nostro studio hanno evidenziato una sieroprevalenza del 14 %. Nei confronti di tale agente infettante attualmente si sta vaccinando regolarmente con vaccino gE deleto inattivato e si è adottato il piano regionale di eradicazione.

Per quanto concerne le parassitosi dal 2004 si eseguono monitoraggi di tipo quantitativo con cadenza semestrale per strongili gastrointestinali, coccidi e tenie, e monitoraggio di tipo qualitativo per quanto riguarda i distomi. Questi esami, effettuati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale per il Lazio e la Toscana, hanno messo in evidenza unicamente strongili gastrointestinali con cariche parassitarie medio-basse, che sono state adeguatamente contenute tramite terapie con prodotti naturali.

Esami sierologici, compiuti nel 2009, hanno inoltre confermato l'assenza di capi positivi alla clamidiosi ed alla leptospirosi. Da questa indagine sono inoltre risultati tre capi sieropositivi alla toxoplasmosi e due alla neosporosi, mentre tutti i capi riproduttori sono risultati sieropositivi all'anaplasmosi che è presente allo stato endemico in tale territorio, ma non comporta sintomatologia clinica negli animali.

Per quanto riguarda la BVD, al momento dell'inizio del nostro studio, l'allevamento bovino era già da quattro anni (2007-2010) sottoposto a un piano di profilassi vaccinale con l'utilizzo di un vaccino bivalente inattivato (Mucobovin®), contenente gli stipiti Aveyronite e New York.

Lo schema vaccinale prevede:

- **Vaccinazione di base**, viene eseguita con due iniezioni a distanza di 3-4 settimane l'una dall'altra sui soggetti di oltre 6 mesi di età. Nei soggetti riproduttori l'ultima iniezione dovrebbe essere compiuta almeno 1 mese prima dell'entrata in riproduzione. Il momento dell'intervento vaccinale segue le esigenze organizzative dell'allevamento, legate soprattutto alle date in cui l'azienda decide di movimentare gli animali verso il podere Pian delle Monache.

- **Primo richiamo**, tra i sei e i nove mesi dal primo intervento vaccinale.
- **I successivi richiami**, sono compiuti annualmente.

Tutti gli animali sono trattati con rimedi omeopatici somministrati periodicamente a scopo preventivo sotto la guida della Dott.ssa Francesca Pisseri Medico Veterinario aziendale. Tutti i capi sono inoltre periodicamente visitati sia dal punto di vista clinico che ginecologico, al fine di trattare tempestivamente eventuali patologie preservando il benessere animale e la produttività aziendale. Le informazioni ottenute durante la visita ginecologica vengono scrupolosamente annotate in apposito archivio, così da ottenere una storia ginecologica per ogni singola bovina. In particolare da tale archivio si può ricavare il periodo di interparto e gli eventuali casi di aborto, sulla base di una diagnosi di gravidanza positiva non confermata nel successivo controllo. Quasi sempre risulta difficile determinare la causa dell'aborto in quanto i feti abortiti non vengono quasi mai ritrovati. Infatti la notevole estensione dei pascoli e la presenza di animali che possono ingerirli quali volpi e cinghiali rende difficile il ritrovamento dei feti. Di seguito sono riportate alcune informazioni sulle tre mandrie, raccolte durante le visite condotte negli ultimi anni.

### Mandria delle chianine

I capi di razza chianina hanno un'indole piuttosto nevriale e i comportamenti di dominanza sono accentuati, così che gli episodi traumatici sono più frequenti che nelle altre mandrie. Nonostante ciò dimostrano un forte istinto materno, anche se non capita mai che possano allattare vitelli di altre bovine. Lo sviluppo scheletrico e muscolare risulta buono. Da segnalare sporadici eventi diarroici ed alterazioni del pelo, soprattutto tra i vitelli all'ingrasso, episodi che hanno colpito però animali appartenenti anche alle altre razze. L'interparto medio nel triennio 2004/06 è risultato di 436 giorni e la percentuale dei capi con interparto lungo è stata del 52 %. Nel triennio 2006/08 l'interparto medio è aumentato a 451 giorni mentre la percentuale dei capi con interparto lungo è rimasta invariata. Nel 2011 l'interparto medio ha riscontrato un ulteriore aumento passando a 477 giorni e negli ultimi quattro anni (ad esclusione dei primi 5 mesi del 2011 durante i quali non si è verificato alcun aborto) ci sono stati 7 casi di aborto (il 28 % dei capi riproduttori ha avuto almeno un evento abortivo). E' inoltre da segnalare che in due casi l'evento abortivo si è verificato negli ultimi mesi di gravidanza, mentre in un caso nel periodo centrale della gravidanza.

### Mandria delle Limousine

Le bovine di questa razza hanno un'indole docile e gli episodi traumatici sono poco frequenti. Hanno un forte istinto materno e spesso capita che alcune bovine possano allattare i vitelli di altre bovine oltre il proprio. Lo stato di salute generale è buono, sono da segnalare episodi sporadici di alterazioni del pelo spesso diffuse, sia nei capi all'ingrasso che nei riproduttori, riferibili a micosi. L'interparto medio del triennio 2004/06 è stato di 430 giorni e la percentuale degli animali con una media di interparto lungo è risultata del 57 %. Nel triennio 2007/09 l'interparto medio si è innalzato a 502 giorni e la percentuale di soggetti con interparto lungo è risultata del 70 %. Nel 2011 l'interparto medio ha avuto un ulteriore aumento in quanto è risultato di 531 giorni con 4 casi di aborto (21 %). Tre di questi casi sono avvenuti nei mesi centrali della gravidanza, mentre uno è stato riscontrato nel primo periodo.

### Mandria delle maremmane

Le bovine di razza maremmana hanno un minor istinto di branco e quindi si disperdono maggiormente nel territorio di pascolo, ma possiedono un buon istinto materno. Mostrano un buono stato di salute e di sviluppo fisico. Particolarità delle bovine di questa razza, è che partoriscono lontano dalla mandria, per poi portare il vitello nel gruppo solo dopo alcuni giorni. Nel triennio 2004/06 l'interparto medio è stato di 559 giorni e la percentuale di animali con interparto lungo è stata del 92 %. Nel triennio 2007/09 l'interparto medio è sceso a 493 giorni e la percentuale dei soggetti con interparto lungo è risultata dell'81 %. Nel 2011 l'interparto medio è sceso ulteriormente a 473 giorni. Negli ultimi quattro anni gli eventi abortivi sono stati 10 (40 %), dei quali 7 avvenuti nei primi mesi di gravidanza e 3 nel periodo centrale della gravidanza. Una notevole incidenza degli aborti si è avuta nel corso dell'ultimo anno (7/10).

## 3.3 Attività Sperimentale

### 3.3.1 Primo controllo

#### Prelievo campioni

Il nostro studio ha avuto inizio il 5 novembre del 2010. Il primo passo è stato quello di valutare la sieroprevalenza per BVD tra i riproduttori, mediante screening sierologico. A tal scopo tutti i riproduttori, appartenenti alle tre mandrie, sono stati sottoposti a prelievo ematico senza anticoagulante (figura 7), per la ricerca degli anticorpi specifici verso la proteina non strutturale p80 mediante l'utilizzo di una metodica ELISA indiretta (Pourquier Elisa BVD/ MD/ BD P80 Antibodies Screening). Sono stati campionati un totale di 89 animali, di età compresa tra i 2 ed i 15 anni. Il passo successivo del piano è stato quello di verificare l'eventuale presenza di soggetti PI, eseguendo su soggetti sieronegativi la ricerca del virus mediante metodica real time RT-PCR. A tal fine sono stati prelevati campioni ematici senza anticoagulante da 10 vitelli (figura 8) non vaccinati scelti casualmente tra quelli allevati per l'ingrasso nelle stalle del Podere "I Noci". Gli animali sottoposti al test avevano un'età compresa tra i 12 e i 22 mesi. Il siero è stato sottoposto ad estrazione di RNA (QIAamp Viral RNA Mini Kit Qiagen) con successiva ricerca del genoma virale mediante metodica taqman real time RT-PCR (QuantiTect® Probe RT-PCR QIAGEN). Sono stati inoltre esaminati pool (formati da un massimo di cinque campioni) di sieri prelevati da soggetti riproduttori risultati negativi o dubbi al test ELISA per la ricerca degli anticorpi, esaminando separatamente i sieri delle tre mandrie.



**Fig. 7:** Prelievo ematico.



**Fig. 8:** Vitello allevato per l'ingrasso.

## **Prove eseguite**

### **Test Elisa per la ricerca degli anticorpi anti-p80**

Il test per la ricerca degli anticorpi anti-p80 è stato effettuato mediante il kit di ELISA competitiva "Pourquier Elisa BVD/MD/BD P80 Antibodies Screening", che utilizza un coniugato costituito dall'anticorpo monoclonale anti-p80 "WB112".

Questo test ELISA può essere utilizzato su siero, plasma e latte bovino individuali o in pool (fino a 10 campioni).

Procedura:

- Dispensare:

50 µl di "tampone di diluizione " per pozzetto;

50 µl di controllo positivo in A1;

50 µl di controllo negativo in B1 e C1;

50 µl di ciascun campione in un pozzetto;

- omogeneizzare il contenuto dei pozzetti scuotendo leggermente la piastra;

- coprire la piastra (con un foglio adesivo) e incubare.

I campioni possono essere incubati per un'ora ad una temperatura di 21 ° C o per una notte (14-18 ore) a 5 ° C. Dopo incubazione la piastra viene svuotata e sottoposta a 3 lavaggi con soluzione di lavaggio preparata al momento dell'uso.

- Successivamente dispensare 100 µl di coniugato diluito 1/100 in ogni pozzetto ed incubare per 30 minuti a 21 ° C . In seguito effettuare un ulteriore ciclo di 3 lavaggi e dispensare 100 µl di "Soluzione di rivelazione" in ciascun pozzetto.

- Incubare la piastra per 20 minuti a +21 ° C, al riparo dalla luce. Quindi dispensare 100 µl di "soluzione di arresto" per pozzetto e agitare delicatamente la piastra fino a quando la soluzione colorata è omogeneizzata.

- Leggere allo spettrofotometro con filtro da 450 nm e calcolare per ciascun siero la percentuale di inibizione.

$\% \text{ di inibizione} = (\text{DO } 450 \text{ del campione analizzato} / \text{media DO } 450 \text{ del controllo negativo}) \times 100$

- interpretare i risultati secondo i criteri descritti nella seguente tabella:

| <b>Percentuale di inibizione</b> | <b>Interpretazione</b> |
|----------------------------------|------------------------|
| <b>&gt; 50 %</b>                 | <b>Negativo</b>        |
| <b>40 – 50 %</b>                 | <b>Dubbio</b>          |
| <b>&lt; 40 %</b>                 | <b>Positivo</b>        |

### **Estrazione dell'RNA virale da siero ematico**

L'estrazione dell'RNA virale è stata effettuata utilizzando il “QIAamp Viral RNA Mini Kit® Qiagen”.

Procedura:

1. Dispensare 560 µl di preparato tampone AVL in una provetta da 1,5 ml.
2. Aggiungere 140 µl del campione e mescolare tramite l'utilizzo del vortex per 15 secondi. Quindi incubare a temperatura ambiente (15-25 °C) per 10 minuti.
3. Aggiungere 560 µl di etanolo (96-100%) per campione, e mescolare tramite vortex.
4. Aggiungere 630 µl della soluzione ottenuta alla colonnina Mini QIAamp e quindi centrifugare a 6000 x g per 1 minuto. Porre la colonnina in una provetta pulita da 2 ml e scartare la provetta contenente il filtrato. Successivamente ripetere questo passaggio.
5. Aggiungere 500 µl di tampone AW1 e centrifugare a 6000 x g per 1 minuto. Posizionare la colonnina in una provetta da 2 ml, ed eliminare la provetta contenente il filtrato.
6. Aggiungere 500 µl di tampone AW2 e centrifugare a 20.000 x g per 3 minuti.
7. Posizionare la colonnina in una provetta pulita da 1,5 ml ed eliminare la vecchia provetta contenente il filtrato. Quindi aggiungere 60 µl di tampone AVE ed incubare a temperatura ambiente per 1 minuto. Centrifugare a 6000 x g per 1 minuto per ottenere l'eluato.

## Real Time one-step RT PCR

Gli esperimenti di Real Time RT PCR secondo la metodologia TaqMan sono stati effettuati con Kit “QuantiTect® Probe RT-PCR Qiagen”, che prevede una procedura “one step”, che abbina in un solo passaggio la fase di trascrizione inversa a quella di amplificazione dell'acido nucleico. Ogni campione è stato testato in doppio. 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.

Il protocollo utilizzato fa riferimento alla tesi di Dottorato “Sviluppo e valutazione di un test di RT real time PCR per la identificazione di bovini persistentemente infetti da BVDV”.

**Tabella 2.**

| Step                           | Tempo     | Temperatura | Commenti Aggiuntivi                                                     |
|--------------------------------|-----------|-------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Trascrizione inversa           | 30 minuti | 50°C        |                                                                         |
| Iniziale attivazione della PCR | 15 minuti | 95°C        | La Polimerasi HotStarTaq DNA è attivata da questa fase di riscaldamento |
| Denaturazione                  | 15 s      | 94°C        |                                                                         |
| Annealing/estension            | 60 s      | 60°C        |                                                                         |
| Numero di cicli                | 40-45     |             |                                                                         |

## **Risultati**

I risultati del test ELISA (Pourquier Elisa BVD/ MD/ BD p80 Antibodies Screening) per la ricerca degli anticorpi sui sieri ematici dei riproduttori sono riassunti nella tabella 3.

**Tabella 3.**

| Razza     | M  | V  | T | Positivi         | Negativi         | Dubbi      | %<br>positivi |
|-----------|----|----|---|------------------|------------------|------------|---------------|
| Limousine | 14 | 19 | 1 | 12(M);17(V);1(T) | 1(M);1(V)        | 1(M);1(V)  | 94,1          |
| Maremm.   | 15 | 16 | 1 | 2(M);16(V)       | 13(M);1(T)       | -          | 56,2          |
| Chianina  | 5  | 17 | 1 | 2(M);17(V);1(T)  | 3(M).            | -          | 86,9          |
| Totale    | 34 | 52 | 3 | 16(M);50(V);2(T) | 17(M) ;1(V),1(T) | 1(M) ;1(V) | 78,6          |

M=Manze; V=Vacche Nutrici; T=Tori.

Dall'indagine è risultato che la maggior parte dei capi è sieropositiva (78,6 %). Inoltre la presenza di capi sieronegativi ci testimonia il fatto che animali plurivaccinati possano

risultare negativi al test impiegato per la rilevazione degli anticorpi verso BVDV. Il test ELISA utilizzato infatti rileva anticorpi specifici per la proteina virale p80, la quale è una proteina multifunzionale non strutturale espressa esclusivamente in fase di attiva replicazione virale, pertanto la vaccinazione mediante vaccino BVDV inattivato non induce la produzione di anticorpi specifici verso la p80 da parte del soggetto vaccinato, in un numero limitato di interventi vaccinali. Questo significa che, la sieropositività riscontrata nella maggior parte dei capi (78,6 %) è da ricondurre ad un'attiva circolazione virale. Dai risultati ottenuti, quindi si può giungere alla conclusione che la vaccinazione ha solo ridotto la prevalenza dei soggetti infetti (dal 100 % al 78,6 % dei capi). Il test ELISA ha invece evidenziato un solo animale (17 mesi di età) sieronegativo tra i 10 vitelli campionati.

I risultati ottenuti mediante la metodica real time RT-PCR hanno confermato che non ci sono soggetti riproduttori PI, il che risulta un dato favorevole in quanto bovine PI danno vita a vitelli PI, amplificando notevolmente l'infezione. Un vitello, risultato sieronegativo al test ELISA per la ricerca di anticorpi, si è invece rivelato positivo alla PCR, a conferma della possibile presenza di soggetti PI tra i vitelli. In base a tali risultati si è deciso di sospendere la vaccinazione su tutti i capi allevati.

### **3.3.2 Secondo controllo**

#### **Prelievo campioni**

In occasione del controllo eseguito in data 16 marzo 2011 si è deciso di sottoporre a prelievo ematico tutti i vitelli di sesso femminile fino ad un'età di 7 mesi (periodo in cui vengono svezzati) al fine di verificare l'eventuale presenza di PI tra questi animali. Si è scelta questa categoria di animali, in quanto è fra questi che si individuano i soggetti che costituiranno la rimonta delle mandrie dei riproduttori (dopo un periodo di permanenza nella mandria delle manze).

Si è proceduto all'effettuazione di due prelievi ematici per ogni soggetto da testare, uno mediante provette con eparina e l'altro con provette senza anticoagulante. Il sangue con anticoagulante è stato utilizzato per ottenere, mediante lisi dei globuli rossi con soluzione di cloruro di ammonio, un pellet di leucociti da utilizzare per la prova dell'estrazione dell'RNA virale e successiva amplificazione mediante PCR. I campioni

sono stati sottoposti a real time RT-PCR previo raggruppamento in pool formati da un massimo di cinque campioni. Sono stati sottoposti a campionamento 12 vitelli di sesso femminile con un'età compresa tra i 16 giorni e i 9 mesi. Il secondo prelievo (senza anticoagulante) è stato effettuato per disporre di un campione di siero individuale da testare in PCR in caso di positività di alcuni pool.

### **Prove eseguite**

Per l'estrazione dell'RNA dal pellet di leucociti si è utilizzato il QIAamp RNA Mini Kit® Qiagen, mentre per la successiva amplificazione virale si è utilizzato il Quantitect® Probe RT-PCR Handbook. Entrambi i metodi sono stati precedentemente descritti.

### **Risultati**

Tutti i pool esaminati sono risultati negativi al test di real time RT-PCR e questo fa pensare che nessuna delle manze da rimonta fosse PI. In considerazione del fatto che qualsiasi vitello a prescindere dal sesso, se PI, potrebbe costituire una sorgente di virus per tutto il periodo di permanenza nelle mandrie, nel prosieguo dei controlli abbiamo deciso di testare con esame virologico tutti i vitelli di nuova nascita.

## **3.3.3 Terzo controllo**

### **Prelievo campioni**

Nel controllo eseguito il 30 maggio 2011, sono stati testati tutti i vitelli presenti nelle mandrie dei riproduttori. Sono stati sottoposti a prelievo ematico, mediante l'utilizzo di provetta provvista di anticoagulante, 35 vitelli con un'età compresa tra i 2 giorni e i 7 mesi. Da ogni campione si è ottenuto, dopo lisi eritrocitaria mediante cloruro di ammonio, un pellet leucocitario da sottoporre alla ricerca dell'antigene virale per BVDV tramite metodica ELISA. Il kit utilizzato in quest'ultima prova è il "SERELISA® BVD p80 Ag Mono Indirect". Inoltre, allo scopo di verificare se ci sono stati recenti casi di infezione sono state campionate le manze non vaccinate con un'età compresa tra gli 8 e i 18 mesi, che si trovano in una mandria a parte rispetto a quelle dei riproduttori. Questo campionamento ha previsto per ogni capo un prelievo ematico, mediante provette prive di anticoagulante, al fine di testare il siero per la ricerca degli anticorpi verso BVDV. Il

kit utilizzato in questo caso è stato il “SERELISA® BVD p80 Ab Mono Blocking, Symbiotics”.

## **Prove eseguite**

### **Test Elisa per la ricerca dell' antigene virale**

Il kit SERELISA ® BVD p80 Ag kit Mono indirect utilizza una tecnica immunoenzimatica indiretta per la rilevazione di un antigene (p80/125 proteina non strutturale), che possiede un epitopo comune a tutti i ceppi citopatogeni e non citopatogeni del virus della BVD. Il test può essere effettuato direttamente su campioni di siero, plasma, sangue intero, leucociti (come nel nostro caso) ed estratti di tessuto.

Esso prevede quattro fasi:

1. I controlli ed i campioni da testare vengono inseriti direttamente nei pozzetti nei quali sono adsorbiti anticorpi monoclonali anti-BVD/MD [p80/125]. Le proteine virali eventualmente presenti nel campione si legano ai siti specifici.
2. Dopo una fase di lavaggio per eliminare le frazioni non legate ,viene poi aggiunto un siero di coniglio anti-BVD/MD [p80/125]. Gli anticorpi presenti nel siero si legano all'antigene precedentemente legato alla fase solida.
3. A seguito di una seconda fase di lavaggio, l'aggiunta di una immunoglobulina (coniugata con perossidasi), di origine caprina, permette la rivelazione del legame degli anticorpi anti-BVD/MD [p80/125] (presenti nel siero di coniglio), al complesso formato dall'antigene virale con l'anticorpo (anti-BVD/MD [p80/125]) adsorbito al pozzetto.
4. Dopo un terzo lavaggio, la rivelazione del complesso formato avviene grazie all'enzima associato al coniugato, il quale catalizza la conversione di un substrato (successivamente aggiunto) in un prodotto colorato. Le densità ottiche (OD) sono registrate e utilizzate per determinare la presenza o l' assenza dell'antigene in funzione della soglia di valore ottenuto attraverso l'uso del controllo positivo.

Indice del campione =  $0,5 \times (\text{OD campione} - \text{OD controllo positivo})$

| <b>Indice del campione</b> | <b>Interpretazione (per leucociti)</b> |
|----------------------------|----------------------------------------|
| > 0,1 x OD P               | Positivo                               |
| < - 0,1 x OD P             | Negativo                               |

## Test Elisa per la ricerca di anticorpi specifici verso la proteina P80

Il test Elisa per la ricerca di anticorpi verso la proteina p80 è stato eseguito mediante il kit “SERELISA® BVD p80 Ab Mono Blocking, Symbiotics”. Esso utilizza una tecnica immunoenzimatica per la rilevazione di anticorpi specifici verso la proteina p80 in campioni di siero o plasma bovino. Tali anticorpi sono prodotti in seguito alla replicazione virale dopo infezione naturale o vaccinazione con un virus vivo attenuato.

Procedura:

1. Distribuzione dei campioni di controllo:

- aggiungere 100 µl di controllo negativo (N) nei pozzetti A1e A2, e 100 µl di controllo positivo (P) nei pozzetti B1 e B2.

2. Distribuzione dei campioni da testare:

- aggiungere 100 µl dei campioni diluiti 1:10 per pozzetto.

- omogenizzare il contenuto della piastra ed incubare o.n. (14-18 ore) a + 5 ° C.

- Lavare per 4 volte la piastra con soluzione di lavaggio diluita 1/10. Successivamente aggiungere 100 µl del coniugato diluito 1/10 in tutti i pozzetti ed incubare per 1 ora a + 20 ° C .

- lavare per 4 volte con la soluzione di lavaggio e quindi aggiungere 100 µl del substrato per ciascun pozzetto.

- incubare per 30 minuti alla temperatura di 20 °C (a riparo dalla luce) e quindi aggiungere 50 µl di soluzione di arresto per pozzetto.

- misurare la densità ottica (OD) mediante spettrofotometro a 450 nm e quindi calcolare la percentuale di competizione.

$$\% \text{ campione} = [(\text{OD N} - \text{OD campione}) / (\text{OD N} - \text{OD P})] \times 100$$

| <b>% di competizione</b> | <b>Interpretazione</b> |
|--------------------------|------------------------|
| > 50                     | Positivo               |
| 30 – 50                  | Dubbio                 |
| < 30                     | Negativo               |

## Risultati

Il test ELISA (SERELISA® BVD p80 Ag Mono Indirect) per la ricerca degli antigeni virali su pellet di leucociti è risultato negativo per tutti i vitelli testati . Il risultato fa pensare che fra questi animali non ci siano soggetti PI.

I risultati del test ELISA (SERELISA® BVD p80 Ab Mono Blocking) per la ricerca degli anticorpi sui sieri delle manze non vaccinate sono riportati nella tabella 4.

**Tabella 4.**

| Razza      | 8-9 mesi di età | 12-13 mesi di età | 16-18 mesi di età | Negativi |   |   | Positivi |   |   |
|------------|-----------------|-------------------|-------------------|----------|---|---|----------|---|---|
| Limousine  | 4               | 2                 | 1                 | 0        | 1 | 0 | 4        | 1 | 1 |
| Maremmiana | -               | 2                 | 2                 | -        | 2 | 2 | -        | 0 | 0 |

Sono risultati positivi 6 capi di razza Limousine, 4 dei quali con un'età compresa tra gli 8 e i 9 mesi. Questi dati ci fanno ipotizzare che ci sia stata circolazione virale anche se non si sono svelati soggetti PI e che alcuni soggetti possano essersi infettati dopo che è venuta meno l'immunità di origine materna.

### 3.3.4 Quarto controllo

#### Prelievo campioni

Nel controllo eseguito il 23 settembre 2011, si è optato per il metodo di ricerca dei soggetti PI mediante una biopsia della cartilagine auricolare. Il prelievo è stato eseguito su tutti i vitelli di nuova nascita e presenti nelle mandrie dei riproduttori. Si è scelta questa tipologia di campionamento in quanto risulta meno difficoltosa e meno stressante per gli animali rispetto al prelievo ematico. Il campione bioptico è stato sottoposto a test per la ricerca dell'antigene virale mediante metodica ELISA. Il prelievo è stato eseguito tramite una pinza fustellatrice e successivamente ogni campione è stato inserito in una provetta eppendorf provvista di apposito diluente (fornito dal Kit ELISA) nella quantità di 100 µl. Sono stati sottoposti a campionamento 12 vitelli con un'età compresa tra 6 giorni e 4 mesi.

Inoltre sono stati sottoposti a prelievo ematico (senza anticoagulante):

- tutti i capi appartenenti alla mandria delle manze (mai testati in precedenza);
- tutti i capi riproduttori risultati sieronegativi al primo test sierologico di screening iniziale per verificare una eventuale sieroconversione.;
- tutte le manzette risultate sieronegative al precedente test per verificare una eventuale sieroconversione.

Su tali prelievi ematici è stato condotto il test ELISA per la ricerca degli anticorpi.

## Prove eseguite

### Preparazione della biopsia

1. Sminuzzare finemente il campione mediante l'utilizzo di forbici sterili.
2. Aggiungere 900 µl di diluente (fornito dal kit ELISA) al campione.
3. Omogeneizzare il preparato mediante l'utilizzo del vortex.
4. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (+ 20° C ).
5. Centrifugare per 15 minuti a 1000 g.
6. Recuperare il surnatante.
7. 100 µl del surnatante possono essere utilizzati per il test ELISA senza ulteriore diluizione.

Il Kit ELISA utilizzato per la ricerca dell'antigene virale è il "SERELISA® BVD p80 Ag Mono Indirect". Il kit utilizzato per la ricerca sierologia degli anticorpi è il "SERELISA® BVD p80 Ab Mono Blocking". La procedura di entrambi i test è stata precedentemente descritta.

## Risultati

Nessuno dei vitelli testati è risultato positivo alla ricerca dell'antigene virale, confermando l'assenza di soggetti PI tra i soggetti nati nell'ultimo periodo. Per quanto riguarda i test sierologici, i risultati sono riassunti nella tabella 5.

**Tabella 5.**

| <b>Animali</b>      | <b>Totale</b> | <b>Sieropositivi</b> | <b>Sieronegativi</b> | <b>Dubbi</b> |
|---------------------|---------------|----------------------|----------------------|--------------|
| <b>Manzette</b>     | 5             | 3                    | 1                    | 1            |
| <b>Riproduttori</b> | 6             | 3                    | 1                    | 2            |
| <b>Manze</b>        | 24            | 10                   | 12                   | 2            |

Tra i soggetti riproduttori tre hanno subito una sieroconversione, imputabile ad infezione avvenuta durante l'anno trascorso dal primo test sierologico (Novembre 2010). Tra le manze sono risultate sicuramente sieropositive 10 capi, il che significa una sieroprevalenza del 42 % tra i soggetti che andranno a costituire la rimonta. Il dato più significativo però è quello che riguarda le manzette, infatti 3 di questi soggetti hanno subito una sieroconversione a testimonianza di infezioni avvenute negli ultimi quattro mesi. Questo ci conferma che c'è ancora circolazione virale nonostante i test non abbiano rilevato soggetti PI.

### 3.3.5 Ricerche collaterali

Nelle operazioni di profilassi delle malattie infettive e parassitarie soggette a controllo e a piani di eradicazione negli animali domestici, assume particolare importanza la conoscenza delle riserve naturali dell'agente ed in particolare del ruolo rivestito dalle popolazioni selvatiche nel mantenimento dell'infezione/infestazione. Nelle zone di pascolo sia boschive che su prati pascoli della Tenuta di Paganico, il contatto tra bovini e caprioli è frequente in quanto tali animali condividono spesso sia i pascoli che le abbeverate.

Prima del nostro studio non erano disponibili dati sulla situazione sanitaria della popolazione di caprioli presenti nella Tenuta di Paganico e nelle zone circostanti. Per la nostra indagine abbiamo utilizzato campioni di sangue raccolti nell'ambito di una indagine sullo stato sanitario della popolazione di caprioli gestita dalla provincia di Grosseto. I campioni raccolti sono stati da noi utilizzati per eseguire un monitoraggio sierologico per BVD.

I campioni di sangue sono stati prelevati nei periodi febbraio-marzo 2011 ed agosto-settembre 2011 in occasione della caccia di selezione. I prelievi ematici sono stati effettuati con l'utilizzo di provette senza anticoagulante dai cacciatori raccogliendo il sangue che sgorgava dalla ferita dell'animale abbattuto. Le operazioni di raccolta e gestione dei campioni sono state seguite da personale coinvolto nel progetto della provincia di Grosseto (Si ringraziano le Dottoresse Sara Innocenti e Fiora Meschi e la studentessa Francesca Angelucci per la preziosa collaborazione). Una aliquota di siero ottenuta è stata inviata al Dipartimento di Patologia Animale per essere testato per la ricerca di anticorpi anti BVDV mediante il kit "SERELISA® BVD p80 Ab Mono Blocking", descritto precedentemente. In occasione del primo campionamento (febbraio-marzo 2011) sono stati esaminati un totale di 26 caprioli, dei quali 4 provenienti da zone nel comune di Scarlino e 22 dai territori della Tenuta di Paganico. Nel secondo campionamento (agosto-settembre 2011) sono stati sottoposti a prelievo un totale di 41 caprioli, dei quali 32 provenienti dai territori della Tenuta e 9 da Scarlino.

I test eseguiti sui campioni prelevati a febbraio-marzo 2011 hanno dato esito negativo, fra quelli prelevati ad agosto-settembre 2011 sono invece risultati positivi 16 animali, (3 provenienti dai territori di Scarlino e 13 dalla Tenuta di Paganico). Questi dati potranno

essere meglio interpretati con il prosieguo dell'indagine, ma fanno pensare che i caprioli possono venire a contatto con BVDV e questo deve essere tenuto presente ai fini della riuscita del piano di controllo e di eradicazione.

### **3.3.6 Conclusioni**

La corretta applicazione di un piano di controllo e di eradicazione, necessita che le procedure diagnostiche e di biosicurezza previste siano attentamente seguite per tutta la durata del piano stesso. Si deve essere sicuri che nessun animale sfugga ai controlli per la ricerca dei soggetti PI ed una volta identificati e rimossi questi animali, si deve continuare nella ricerca sistematica di eventuali vitelli PI almeno per un anno.

L'allevamento oggetto del nostro studio è costituito da tre mandrie diverse ed una stalla da ingrasso. Pertanto nella gestione dei controlli abbiamo dovuto tenere conto di spostamenti e contatti tra i diversi gruppi di animali. Questo fatto ha sicuramente reso più difficili le operazioni di controllo.

Le scelte sulle modalità di attuazione del piano hanno dovuto fare i conti con le difficoltà connesse con la gestione di un allevamento brado. Fra queste la difficoltà ad eseguire i controlli rispettando le tempistiche previste dal piano. Un aspetto importante per esempio è quello di poter controllare, mediante esame virologico finalizzato alla ricerca dei PI, i vitelli quanto prima dopo nascita. Nel nostro caso questo controllo si è potuto fare solo nel momento dello spostamento delle mandrie. Abbiamo inoltre riscontrate difficoltà nell'esecuzione dei prelievi, per il temperamento ribelle di animali poco abituati al contatto con l'uomo. Per questo abbiamo dovuto modificare in corso d'opera le modalità di prelievo in modo da trovare un giusto compromesso fra efficacia e fattibilità. Durante i primi prelievi la ricerca dei PI è stata fatta sul siero di sangue, sui leucociti e sui bulbi piliferi, ma alla fine abbiamo optato per la biopsia nel padiglione auricolare. In questo modo il prelievo del campione avveniva contemporaneamente con l'apposizione della marca auricolare (operazione obbligatoria in ottemperanza alle disposizioni sull'anagrafe bovina), risultando più semplice e meno stressante per gli animali.

Nei quattro controlli eseguiti è stato rilevato un solo soggetto PI nel novembre 2010. La mancata identificazione di soggetti PI nei controlli successivi può essere imputata a

diversi fattori fra i quali non escludiamo anche eventuali difetti nelle modalità di campionamento e di gestione dei campioni.

Nella ricerca degli immunotolleranti va considerata la sensibilità dei test utilizzati e i materiali biologici impiegati. La sensibilità di identificazione del virus da parte della RT-PCR è sicuramente superiore a quello dei test ELISA (Sandvick, 2005). Nel nostro caso soltanto durante i primi controlli, per questione di costi, abbiamo potuto utilizzare la RT-PC. Ma nell'ultima fase dello studio abbiamo trovato, nell'utilizzo del test ELISA per la ricerca degli antigeni su biopsia cutanea, un giusto compromesso fra sensibilità del metodo e praticità di esecuzione. Il prelievo della biopsia cutanea non preclude inoltre la possibilità di utilizzare anche la RT-PCR sullo stesso materiale in caso si debbano chiarire alcuni risultati controversi.

Nonostante non si siano rilevati soggetti PI, le ultimi indagini hanno comunque evidenziato episodi di sieroconversione avvenute nel corso degli ultimi quattro mesi, evidenza del fatto che il virus ha circolato fra gli animali. Diversi autori ritengono che in allevamenti bovini di grosse dimensioni (superiori ai 100 capi), la sola eliminazione degli animali PI non riesca a bloccare sempre la circolazione virale da infezioni occasionali, soprattutto quando aumenta il numero dei soggetti non immuni. In questo senso non ha aiutato la decisione di sospendere la vaccinazione, che sebbene costosa per l'azienda, avrebbe potuto conferire agli animali un certo grado di copertura immunitaria di base. Pensiamo che questo probabilmente non precluderà la riuscita del piano, ma sicuramente ne prolungherà i tempi. Sarà ancora necessario proseguire con i controlli periodici prima di poter verificare se la strategia adottata può portare ad un pieno successo del processo di eradicazione.

In conclusione pensiamo che anche in allevamenti bradi da riproduzione sia possibile impostare un programma di controllo e di eradicazione della BVD, ma che debbano essere adottati diversi accorgimenti per ovviare a diverse difficoltà oggettive che rendono l'obiettivo più difficile.

## Bibliografia

1. Alenius S., Lindberg A., Larsson B. (1997) - A national approach to the control of bovine viral diarrhoea virus - Proceedings of the Third ESVV Symposium on the Control of Pestivirus Infections. Lelystad, The Netherlands, 162–169.
2. Baker J. (1987) - Bovine viral diarrhea virus: a review. Journal of American Veterinary Medical Association 190,1449-1458.
3. Baker J. (1995) - The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. - VeterinaryClinic of North America. Food Animal Practise 11, 425-443.
4. Barber D.M.L., Nettleton P.F., Herring J.A. (1985) - Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine virus diarrhoea virus. - Veterinary Record 117, 459–464.
5. Barber D.M.L., Nettleton P.F. (1993) - Investigation into bovine viral diarrhoea virus in a dairy herd. - Veterinary Record 133, 549-550.
6. Bielanski A., Jordan L. (1996) - Washing or washing and trypsin treatment is ineffective for removal of noncytopathic bovine viral diarrhea virus from bovine oocytes or embryos after experimental viral contamination of an in vitro fertilization system. - Theriogenology 46, 1467-1476.
7. Bielefeldt-Ohmann H. (1995). The Pathologies of Bovine Viral Diarrhea Virus Infection. A Window on the Pathogenesis. - Veterinary Clinic of North America. Food Animal Practise 11, 447-475.
8. Billinis C., Leontides L., Amiridis G.S. , Spyrou V., Kostoulas P., Sofia M. (2005) - Prevalence of BVDV infection in Greek dairy herds. - Preventive Veterinary Medicine 72, 75-79.
9. Bitsch V., Rønsholt L. (1995) - Control of bovine viral diarrhea virus infection without vaccines.- The Veterinary Clinic of North America. Food Animal Practise 11, 627-640.
10. Bitsch V., Houe, H., Nylin, B., Rønsholt, L. (1997) - Examination of blood and bulk tank milk samples to monitor the bovine virus diarrhoea infection of cattle herds. - Proceedings of the Third ESVV Symposium on the Pestivirus Infections, Lelystad, the Netherlands, 158-161.
11. Bodmer M., Michel A., Brechbuhl M., Zanoni R., Peterhans E., Steiner A., Kaufmann T. (2008) - BVD\_free transhumance in the summer of 2006. - Schweizer Archiv für Tierheilkunde 150, 267–271.

12. Bolin S.R. (1990) - Laboratory diagnosis of Livestock Abortion. - Ames, Iowa State University.
13. Bolin S.R., Littledike E.T., Ridpath J.F. (1991) -Serological detection and practical consequence of antigenic diversity among bovine viral diarrhoea virus in a vaccinated herd.- American Journal of Veterinary Research 52, 1033-1037.
14. Bolin S.R. (1995) - Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. - The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice 11, 615-625.
15. Brocchi E., Cordioli P., Berlinzani A., Gamba D., De Simone F. (1992) - Development of a panel of antipestivirus monoclonal antibodies useful for virus identification and antibody assessment. - Proceeding Second Symposium on Pestiviruses, Annecy, France, 215-218.
16. Brodersen B.W. (2004) - Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhea virus infection. - Veterinary Clinic of North America. Food Animal Practise 20, 85-93.
17. Brock K. V. (1995) - Diagnosis of Bovine Viral Diarrhea Virus Infections. - Veterinary Clinic of North America. Food Animal Practise 11, 549-561.
18. Broes A., Wellemans G., Dheedene J. (1992) - Syndrome hémorragique chez des bovines infectés par le virus de la diarrhée virale bovine (BVD/MD). - Annales de Médecine Vétérinaire 137, 33–38.
19. Brownlie J., Clarke M. C., Howard C. J. (1984) - Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. - Veterinary Record 114, 535- 536.
20. Brownlie J., Hooper L.B., Thompson I., Collins M.E. (1998) – Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus. The bovine pestivirus. - Clinical and Diagnostic Virology 10, 141-150.
21. Cavarani S. (2002) - La diarrea virale del bovino. Il virus. - UTET Divisioni periodici 3- 6.
22. Cavarani S., Taddei S., Cabassi C.S., Galvani G., Luzzago C., Toni F., Malanca E. (2005) - Risposta anticorpale verso BVDV Tipi 1, 2 e NS23 in manze trattate con vaccini vivi attenuati e inattivati - Obiettivi e Documenti Veterinari Anno XXIV 4, 21-25.
23. Cavarani S., Piancastrelli C., Ghidini F., Taddei S., Figueredo G.M., C.S. Cabassi C.S. (2010) - Applicazione di un Protocollo di eradicazione della Diarrea Virale Bovina (BVD) in allevamenti di grandi dimensioni. - Large Animal Review 16, 167-171.

24. Chase C., Elmowalid G., Yousif A. (2004) - The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. - *The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice* 20 95-114.
25. David G.P., Crawshaw T.R., Gunning R.F., Hibberd R.C., Lloyd G.M., Marsh P.R. (1994) - Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. - *Veterinary Record* 134, 468-472.
26. Douart A., Simon A. (1997). Diagnostic et controle de l'infection par le BVDV. *PointVétérinaire* 28, 15-23.
27. Drew T.W., Yapp F., Paton D.J. (1999) - The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single tube RT PCR. - *Veterinary Microbiology* 64, 143-152.
28. Dubovi E.J. (1992) - Genetic diversity and BVD virus.- *Comparative Immunology Microbiology InfectiousDisease* 15, 155-162.
29. Elahi S.M., Shen S.H., Harpin S., Talbot B.G., Elazhary Y (1999) - Investigation of the immunological properties of the bovine viral diarrhea virus protein NS3 expressed by an adenovirus vector in mice. - *Archives of Virology* 144, 1057-1070.
30. Entrican G., Dand A., Nettleton P.F. (1995) - A double monoclonal antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. - *Veterinary Microbiology* 43, 65-74.
31. Farina R., Scatozza F., Buonavoglia C. (2002) - *Trattato di Malattie Infettive degli Animali, Seconda Edizione UTET* 720-728, 2002.
32. Ferrari G., Scicluna M.T., Bonvicini D., Gobbi C., Della Verita F., Valentini A., Autorino G.L., (1999) - Bovine virus diarrhoea (BVD) control programme in an area in the Rome province (Italy). - *Veterinary Microbiology* 64, 237-245.
33. Fray, M.D., Prentice, H., Clarke, M.C., Charleston B. (1997). Bovine viral diarrhoea virus in 7 day old embryos. - *Proceeding of European Symposium on the control of BVD virus infection in Cattle, VESO, Lillehammer, Norway*, 46.
34. Gaede W., Gehrman B., Kenklies S., Mewes L., Pollandt G., Krippner S., Ewert B. (2004) - Eradication program for BVD in Saxony\_Anhalt (Germany). - *Second Symposium on BVDV Control, Porto, Portugal*, 98.
35. Fusco G., Guarino A. (1997) - Diarrea virale del bovino malattia delle mucose. - *Obiettivi & Documenti Veterinari* 11, 39-46.

36. Graham D.A., McLaren I.E., German A. (1998) - Evaluation of the suitability of a commercial bovine viral diarrhoea virus antigen capture ELISA for diagnostic testing.- *Veterinary Journal* 156, 149-154.
37. Greiser-Wilke I., Grummer B., Moennig V. (2003) - Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. - *Biologicals* 31, 113–118.
38. Haines D.M., Njaa B.L., Clark E.G., Janzen E., Ellis J.A. (2000) - Diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus infection by immunohistochemical staining of formalin\_fixed skin biopsy specimens. - *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12, 393-399.
39. Harpin S., Talbot B., Mbikay M., Elazhary Y. (1997) - Immune response to vaccination with DNA encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein gp 53 (E2). - *FEMS Microbiology Letters* 146, 229-34.
40. Houe H. (1992) - Serological analysis of a small herd sample to predict presence or absence of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy herds. - *Research in Veterinary Science* 53, 320-323.
41. Houe H. (1994). Bovine virus diarrhoea virus: Detection of Danish dairy herds with persistently infected animals by means of a screening test of ten young stock. *Preventive Veterinary Medicine* 19, 241-248.
42. Houe H. (1995) - Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice* 11, 521-547.
43. Houe H. (1996) - BVDV in Denmark. Comparison with Michigan. - *International Symposium Bovine Viral Diarrhoea Virus: a 50 year review*, Cornell University, Ithaca, 121-126.
44. Houe H. (2003). Economic impact of BVDV infections in dairies. - *Biologicals* 31, 137–143.
45. Joly A., Fourichon C., Beaudeau F. (2005) - Description and first results of a BVDV control scheme in Brittany (western France). - *Preventive Veterinary Medicine* 72, 209–213.
46. Kamstrup S., Roensholt L., Jensen M. H., Dalsgaard K. (1999) - Production of a highly immunogenic subunit ISCOM vaccine against Bovine Viral Diarrhoea Virus. - *Vaccine* 17, 1057-64.
47. Kelling C. L. (2004) - Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. - *The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice* 20, 115-129.

48. Kuhne S., Schroeder K., Holmquist G., Wolf G., Corner S., Brem G., Ballagi A. (1999) - Detection of bovine viral diarrhoea virus infected cattle – testing tissue samples derived from era tagging using an Erns capture ELISA. - *Journal of Veterinary Medicine* 52, 272-277.
49. Kreeft, H.A.J.G., Greiser-Wilke, I., Moennig, V., Horzinek, C., 1990. Attempts to characterize bovine viral diarrhea virus isolated from cattle after immunization with a contaminated vaccine. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 97, 63-65.
50. Letellier C., Kerkhofs P., Van der Hallen H., Wellemans G., Van op den Bosch E. (1997) - Detection and genotyping of Bovine Diarrhea virus by reverse transcription\_polymerase chain amplification of 50 noncoding Region. - *Proceeding European Symposium on Control of BVD\_virus Infection in Cattle*, Lillehammer, Norway, 17.
51. Letellier C., Kerkhofs P., Wellemans G., Vanopdenbosch E. (1999) - Detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus by reverse transcription\_polymerase chain reaction of the untranslated region. - *Veterinary Microbiology* 64, 155-167.
52. Lindberg A. (1996) - Regionalised eradication of bovine viral diarrhoea virus in Sweden. An approach complementary to the current control scheme. - *Proceedings of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine Glasgow, Scozia*. 146–156.
53. Lindberg A., Groenendaal H., Emanuelson U., Alenius S. (1998). - Identification of dams carrying foetuses persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) applying an indirect antibody ELISA. - in manuscript.
54. Lindberg A.L.E., Alenius S. (1999) - Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. - *Veterinary Microbiology* 64 , 197-222.
55. Lindberg A., Houe H. (2005) - Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) of relevance to control. - *Preventive Veterinary Medicine* 72, 55–73.
56. Løken T., Krogsrud J., Bjerås I. (1991) - Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. *Journal of Comparative Pathology* 104, 195-209.
57. Luzzago C., Bandi C., Bronzo V., Ruffo G., Zecconi A. (2001). - Distribution pattern

- of bovine viral diarrhoea virus strains in intensive cattle herds in Italy. - *Veterinary Microbiology* 83, 265-274.
58. Marcato P. S. (2002). *Patologia sistematica comparata* Eds. Ed agricole, Bologna.
  59. Mars M.H., Van Maanen C. (2005) - Diagnostic assays applied in BVDV control in the Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine* 72, 43-48.
  60. Makoskey B., Jansenn M. G. J., Vrijenhoek M. P., Korsten J. H. M., Marel P. V. D. (2001) - An inactivated bovine virus diarrhea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2. - *Vaccine* 19, 3261-3268.
  61. Mc Clurkin A. W., Coria M. (1978) - Selected isolates of bovine viral diarrhea (BVD) virus propagated on bovine turbinate cells: virus titer and soluble antigen production as factors in immunogenicity of killed BVD virus. - *Archives of Virology* 58 , 119-125.
  62. McGoldrick A., Bensaude E., Iyata G., Sharp G., Paton D.J. (1999) - Closed onetube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. *Journal of Virological Methods* 79,85-95.
  63. Meyling A., Jensen A.M. (1988) - Transmission of bovine viral diarrhea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently infected bull. - *Veterinary Microbiology* 17, 97-105.
  64. Moen A., Sol J., Sampimon O. (2005) - Indication of transmission of BVDV in the absence of persistently infected animals. - *Preventive Veterinary Medicine* 72, 93-98.
  65. Moennig V., Eicken K., Flebbe U., Frey H.R., Grummer B., Haas L., Greiser-Wilke I., Liess B. (2005) - Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). *Preventive Veterinary Medicine* 72, 109-114.
  66. Moermann A., Straver P.J., De Jong M.C.M., Quak J., Baanvinger T., van Oirschot J.T. (1994) - A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. - *Veterinary Record* 132, 622-626.
  67. Niskanen R., Alenius S., Larsson B., Juntti N. (1989) - Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine virus diarrhoea virus in milk. - *Journal of Veterinary Medicine* 36, 113-118.
  68. Niskanen R., Alenius S., Larsson B., Jacobsson S.O. (1991) - Determination of level of antibodies to bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in bulk tank milk as a tool in the diagnosis and prophylaxis of BVDV infections in dairy herds.- *Archives of virology. Supplementum* 3, 245-251.

69. Niskanen R. (1993) - Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. - *Veterinary Record* 133, 341-344.
70. Niskanen,R., Lindberg, A., Traven, M., 2002. Failure to spread bovine virus diarrhoea virus infection from primarily infected calves despite concurrent infection with bovine coronavirus. - *Veterinary Journal* 163, 251–259.
71. Pastoret P.,Hamers C., Lecomte C., Lambot M. (1998). Biologia ed Epidemiologia dell’Infezione da Virus BVD/MD. *Summa* 6, 33-37.
72. Patel J., Williams J. (1998) - Proceedings 20th World Buiatric Congress 1023.
73. Paton D.J., Goodey R., Brockman S., Wood L. (1989) - Evaluation of the quality and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDV. *Veterinary Record* 124, 63.
74. Pellerin C., Lecomte J., Tijssen P., van den Hurk J. (1994) - Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. - *Virology* 203, 260-268.
75. Presi P., Heim D. (2010) BVD eradication in Switzerland\_A new approach. - *Veterinary Microbiology* 142, 137–142.
76. Rebhun W.C., French T.W., Perdrizet J.A., Dubovi E.J., Dill S.G., Karcher L.F. (1989) - Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. - *Journal of Veterinary Internal Medicine* 3, 42-46.
77. Ridpath J.F., Bolin S.R., Dubovi E.J. (1994) - Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology* 205, 66-74.
78. Ridpath J., Hietala S.K., Sorden S., Neill J.D. (2002) -Evaluation of the reverse transcription polymerase chain reaction/probe test of serum samples and immunohistochemistry of skin sections for detection of acute bovine viral diarrhea infections - *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14, 303–307.
79. Rikula U., Laamanen I., Veijalainen P., Sihvonon L. (2002) - Transmission of BVDV Via semen from transiently infected (TI) bull. In: Proceedings of the XXII World Buiatrics Congress, Hannover, 18–23 August 2002, p. 52.
80. Rikula U., Nuotio L., Aaltonen T., Ruoho O. (2005) - Bovine viral diarrhoea virus control in Finland 1998–2004. - *Preventive Veterinary Medicine* 72, 139–142.
81. Rossmannith W., Janacek R., Wilhelm E. (2005) - Control of BVDV infection on common grassland. The key for successful BVDV eradication in Lower Austria. - *Preventive Veterinary Medicine* 72, 133-137.

82. Sali G. (2004) – Medicina interna e chirurgia del bovino. – Le Pointe Vétérinaire Italie.
83. Saliki J.T., Dubovi E.J. (2004) - Laboratory diagnosis of BVDV infections. - Veterinary Clinic of North America. Food Animal Practise 20, 69-83.
84. Sandvik T., Krogsrud J. (1995) - Evaluation of an antigen\_capture ELISA for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle blood samples. - Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 7, 65-71.
85. Sandvik T., Fredriksen B., Løken T. (1997) Level of viral antigen in blood leucocytes from cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus; Journal of Veterinary Medicine 31,127-131.
86. Sandvik T. (2005) - Selection and use of laboratory diagnostic assay in BVD control programmes.- Preventive Veterinary Medicine 72, 3-16.
87. Schlafer D.H., Gillespie J.H., Foote R.H., Quick S., Pennow N.N., Schiff E.I., Allen S.E., Powers P.A., Hall C.E., Voss H. (1990) - Experimental transmission of bovine viral diseases by insemination with contaminated semes or during embryo transfer. - Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 97, 68-72.
88. Schmitt J., Becher P., Thiel H. J., keil G. M. (1999) - Expression of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E2 by bovine herpesvirus\_1 from a synthetic ORF and incorporation of E2 into recombinant virions. - The Journal of General Virology 80, 2839-2848.
89. Siegwart N., Hilbe M., Hassig M., Braun U. (2006). Increased risk of BVDV infection of calves from pregnant dams on communal Alpine pastures in Switzerland. - Veterinary Journal 172, 386–388.
90. Synge B.A., Bond J.M., Nettleton P.F., Herring J.A., Moar J.A.E., Murray L., Nicolson J.T. (1995) - A pilot scheme for the control of bovine virus diarrhoea virus in Shetland. - Cattle Practice 3, 385-391.
91. Synge B.A., Clark A.M., Moar J.A.E., Nicolson J.T., Nettleton P.F., Herring J.A. (1999). The control of bovine virus diarrhoea virus in Shetland. Veterinary Microbiology 64, 221-227.
92. Thibault J.C., Crevat D., Chappius G. (1993) - Control of bovine virus diarrhoea mucosal disease in cattle: Examples of the combined use of serological screening,

- viral antigen detection and vaccination. - *Revue scientifique et technique\_ Office international des épizooties* 12(2), 281±471.
93. Trautwein G. (1991) - La Diarrea Virale Bovina. - *Obiettivi e Documenti Veterinari* 5,31-35.
  94. Valle P.S. (2004) - Ten years of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) control—a beneficial joint effort in three parts. - In *Second European Symposium on BVDV Control*, 50.
  95. Vannier P., Leforban Y., Carnero R., Cariolet R. (1988). Contamination of a live virus vaccine against pseudorabies (Aujeszky's disease) by an ovine pestivirus pathogenic for the pig. *Annal of veterinary Research* 19, 283-290.
  96. Van Oirschot J., Brusche C., Van Rijn P. (1999) - Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Veterinary Microbiology* 64, 169-183.
  97. Vilcek S., Alenius S., Paton D.J., Belak S. (1998) - Genetic clustering of bovine viral diarrhoea viruses in cattle farms. -
  98. Voges H., Horner G.W., Rowe S. (1998) - Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno competent, non viraemic bull. - *Veterinary Microbiology* 61, 165-175.
  99. Wensvoort G., Terpstra C. (1988) - Bovine viral diarrhoea infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. - *Research in Veterinary Science* 45, 143-148.
  100. Wolf G. (2004) Diagnostik von BVDV-PI Kalbern in der kolostralen Phase: quantitative Virusislierung, E<sup>ms</sup> – und NS2/3-IFT (FACS) und RT-PCR aus Blutproblem. *AVID-Taging Proceedings, Kloster Banz*, 15.
  101. Wolfmeyer A., Wolf G., Beer M., Strube W., Hehnen H., Schmeer N., Kaaden O.R. (1997) - Antigenic and genetic diversity (50untranslated region) of German and American bovine viral diarrhoea virus isolates. *Proceeding 3rd ESVV Symposium on Pestivirus Infections, Lelystad, The Netherlands*, 99-103.
  102. Xingnian G., Brown L., Downes M., Shannon A. (1997) - Sequence analyses show Australian BVDV isolates form a distinct, isolated geographic pool of viruses. - *Proceeding European Symposium on Control of BVD\_virus Infection in Cattle, Lillehammer, Norway*, 14.

103. Zimmer G.M., Van Maanen C., De Goey I., Brinkhof J., Wentink G.H. (2004) -  
The effect of maternal antibodies on the detection of bovine virus diarrhea virus in  
peripheral blood. -*Veterinary Microbiology* 100,145-149.
104. Zoccola R. (2009) - Sviluppo e valutazione di un test di RT real time PCR per la  
identificazione di bovini persistentemente infetti da BVDV. -

## Ringraziamenti

Premesso che con l'utilizzo delle sole parole non è possibile ricompensare l'affetto dimostratomi dalle persone a me più care, desideravo comunque mettere per iscritto la mia eterna riconoscenza nei loro confronti.

Il primo pensiero va sicuramente alla mia famiglia, ai miei genitori in particolare, che non si sono limitati ad offrirmi la possibilità di esaudire i miei sogni ma mi hanno accompagnato in ogni mio passo, sempre in maniera discreta ma estremamente rassicurante. A mio padre volevo dire grazie, non solo perché mi ha trasmesso la passione per la sua professione, ma soprattutto per i valori di lealtà e umiltà che ogni giorno mi trasmette. A mia madre, grazie per esserci sempre qualunque sia il momento e qualunque sia il tuo stato d'animo mettendo sempre in primo piano l'amore verso i tuoi figli.

Un grazie particolare va a mio fratello Alessio, a mia sorella Marta e a mia zia Angela che nonostante la notevole distanza che ci ha separato in questi anni, hanno sempre trovato il modo di farsi sentire presenti.

Grazie ai miei amici di vecchia data, Marco e Francesco, che non si sono scordati di me e che hanno continuato a cercarmi nonostante non fossi lì con loro.

Grazie a tutti i miei amici universitari per aver reso speciali questi anni trascorsi a Pisa. Sperando di non dimenticare nessuno ringrazio: Alberto, Francesco S., Felice, Filippo, Gerardo, Nicola, Angela, Antonino, Viviana, Gianluca, Jacopo, Luca, Cristiano, Martina, Mario, Riccardo, Vittore, Vincenzo e tutti quelli che ho sicuramente dimenticato.

Per il lavoro di tesi ringrazio il Prof. Tolari, il Dott. Mazzei, la Dott.ssa Pisseri e la Dott.ssa Tozzini (Gia) per gli immensi insegnamenti e la grande disponibilità.

Grazie a tutte le persone della Tenuta di Paganico, che non solo hanno reso possibile questo lavoro, ma lo hanno fatto diventare una esperienza indimenticabile. Per questo ringrazio: Jacopo, Maria Novella e Luigi.