

# Diarrea virale bovina [BVD]

> LINEE GUIDA

LG in VET3





#### **LGinVET - Collana a cura di**

GADDO VICENZONI

Direttore

Dipartimento di patologia animale e sanità pubblica

SCT1 Verona e Vicenza

#### **Testo redatto da**

STEFANO NARDELLI

Medico veterinario

SCT3 Padova e Adria

Diagnostica in sanità animale

*Responsabile Alda Natale*

#### **Layout e impaginazione**

SCS7 Comunicazione e conoscenza per la salute

Laboratorio comunicazione della scienza

*Responsabile Licia Ravarotto*

#### **Foto**

ARCHIVIO IZSVe

Nonostante l'attenzione dedicata alla stesura della pubblicazione e i controlli effettuati sulle immagini e sui contenuti, qualche errore potrebbe essere sfuggito alle nostre verifiche. Ce ne scusiamo con i lettori e li invitiamo a trasmetterci eventuali osservazioni.

1ª edizione: giugno 2017

Copyright © 2017 by Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Riproduzione vietata ai sensi di legge (art. 171 della legge 22 aprile 1941, n° 633)

Pubblicazione non in vendita

I lettori che desiderano informazioni e aggiornamenti sulle attività dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie possono visitare il sito web [www.izsvenezie.it](http://www.izsvenezie.it)

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

# Diarrea virale bovina [BVD]

> LINEE GUIDA  
LG *in* VET3

Nardelli S.

## ENTI PROMOTORI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

## REFEREE

Marco Martini  
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS)  
Università di Padova

Alexander Tavella  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie- Sezione diagnostica di Bolzano

Si ringraziano il prof. Marco Martini e il dott. Alexander Tavella per il tempo e l'impegno profusi nel lavoro di revisione delle presenti Linee guida

# PRESENTAZIONE

La diarrea virale bovina (BVD) è una malattia infettiva del bovino con una storia non particolarmente lunga, ma sicuramente movimentata: se ne parla infatti a partire dagli anni '40, ma solo negli anni '80 è emersa la sua peculiarità, legata:

- al meccanismo dell'infezione persistente in soggetti immunotolleranti infettati in utero da ceppi non citopatogeni
- nonché alla sua manifestazione clinica nella forma eclatante nota come malattia delle mucose, causata da ceppi citopatogeni in soggetti immunotolleranti

Similmente, solo da un ventennio è emersa la variabilità dei ceppi circolanti, a livello sia antigenico che genomico, con tutte le conseguenze che ciò provoca sulla sensibilità delle prove diagnostiche. In questo stesso periodo, da malattia di interesse esclusivamente zootecnico, la BVD è divenuta oggetto anche di attività di sanità pubblica, ovvero di piani regionali/nazionali di controllo i quali, pur non avendo ancora una dignità ufficiale di riconoscimento al livello della normativa comunitaria, sono operativi in generale a livello europeo (in primo luogo nei paesi di lingua tedesca ed in Scandinavia), ed in particolare, per quanto riguarda l'Italia, in Trentino Alto Adige e nel Friuli Venezia Giulia.

Si tratta sicuramente di una malattia complessa, assai spesso clinicamente subdola e di difficile identificazione, anche perché il quadro clinico è spesso legato all'immunodepressione. Ma al tempo stesso è una malattia che di sicuro impatta significativamente a livello economico, nella realtà degli allevamenti bovini sia da latte che da carne.

Il controllo efficace della malattia presuppone una conoscenza adeguata dello strumento sia diagnostico che vaccinale. A proposito di quest'ultimo, anche in questo caso solo negli ultimi vent'anni è cresciuta la consapevolezza dell'importanza della protezione fetale fra i claim che un vaccino efficace deve esibire. Protezione fetale non sempre dichiarata nei foglietti illustrativi dei vaccini disponibili in commercio e che, ove presente, può tuttavia essere limitata dalla variabilità antigenica dei ceppi BVD, in grado di sfuggire talvolta all'immunità vaccinale.

Per tutti questi motivi si è ritenuto estremamente utile predisporre una Linea Guida che permettesse a chi opera in campo (in particolare: veterinario pubblico o libero professionista) di avere un quadro riassuntivo della BVD, tale da poter gestire al meglio gli strumenti di controllo della malattia stessa, a livello sia diagnostico che vaccinale.

Un doveroso ringraziamento deve essere rivolto:

- ai Servizi Veterinari Regionale del Veneto e del Friuli Venezia Giulia nonché delle due province autonome di Trento e Bolzano, per aver supportato una serie di attività diagnostiche riferite alla BVD, nell'ambito di attività di controllo
- ai colleghi di campo, sia pubblici che liberi professionisti, che hanno chiesto il supporto dell'Istituto e collaborato in svariate azioni sul campo

tutte cose che hanno permesso all'Istituto di accrescere la propria esperienza nei confronti della malattia, a livello sia diagnostico che gestionale.

*Stefano Nardelli, Medico Veterinario  
SCT3 – Padova e Adria  
Diagnostica in sanità animale*

## INDICE

Introduzione	9
Guida ai livelli di prova e alla forza delle raccomandazioni	11
<b>Capitoli</b>	
1. Caratteristiche microbiologiche	12
2. Descrizione della forma clinica	14
3. Lesioni anatomopatologiche	17
4. Patogenesi	20
5. Epidemiologia	25
6. Diagnosi	46
7. Interventi nelle aziende infette	68
8. Vaccinazione	75
9. Selezione genetica	79
<i>Allegato I - Protocollo Assogene - Esami prima dell'ingresso al Centro genetico</i>	82
<i>Bibliografia</i>	84



# Introduzione

La diarrea virale bovina (BVD) è una malattia infettiva ad eziologia virale, contagiosa, caratteristica (ma non esclusiva) della specie bovina, nella quale può dar luogo a diverse forme cliniche, strettamente legate al ceppo infettante ed al meccanismo patogenetico dell'infezione in corso nell'animale, ma comunque caratterizzate da un'ampia variabilità del quadro, che può andare da episodi subclinici a quadri molto importanti, fino alla morte. Sotto questo punto di vista, la denominazione della malattia, che fa riferimento al sintomo diarrea, è in realtà fuorviante, e trova la sua giustificazione nella storia: infatti, nella prime segnalazioni della malattia, pubblicate a partire dal 1946 negli USA ed in Canada (Goens et al., 2002), il quadro prevalentemente descritto era quello a carico dell'intestino. In realtà l'importanza della malattia è dovuta principalmente ai suoi effetti negativi su altri apparati/sistemi, con particolare riferimento alla sfera riproduttiva ed a quella immunitaria, come sarà meglio evidenziato nel prosieguo.

## Gli obiettivi di questa Linea guida sono:

1. Riassumere le conoscenze di base relative alla malattia, con una particolare attenzione dedicata a quelle con dirette ed importanti ricadute nella pratica quotidiana clinica, diagnostica e di controllo della malattia: questo al fine di permettere al lettore (tipicamente: il veterinario di campo) di trovare in un unico documento le risposte alle principali domande che la pratica quotidiana può porgli
2. Definire una serie di raccomandazioni, in particolar modo per la diagnostica ed il controllo della malattia, articolando la linea guida in modo tale da consentire di trovare al suo interno le ragioni che stanno alla base delle raccomandazioni suddette: questo per evitare di far assumere alle raccomandazioni il valore di postulato

## Guida ai livelli di prova e alla forza delle raccomandazioni

Nelle linee guida, le raccomandazioni vengono qualificate con un certo grado di forza della raccomandazione (FDR) e di livello di prova (LDP), espressi rispettivamente in lettere (da A a E) e in numeri romani (da I a VI). Con FDR ci si riferisce alla probabilità che l'applicazione nella pratica di una raccomandazione sia utile ai fini sanitari. Con LDP ci si riferisce alla probabilità che un certo numero di conoscenze sia derivato da studi pianificati e condotti in modo tale da produrre informazioni valide e prive di errori sistematici.

Esistono diversi sistemi di gradazione per le prove di efficacia e per la forza delle raccomandazioni riportate in letteratura. Il sistema adottato in questa Linea Guida si basa sulla rielaborazione messa a punto dal Centro per la valutazione dell'efficacia dell'assistenza sanitaria (CeVEAS) di Modena. Questo sistema ha come principale caratteristica il fatto che la forza delle raccomandazioni non si basa soltanto sul tipo di disegno di studio, ma tiene conto anche di altri fattori, quali la fattibilità, l'accettabilità e l'economicità dell'intervento.

Forza delle raccomandazioni		Livelli di prova delle raccomandazioni	
<b>A</b>	comportamento o intervento fortemente raccomandato	<b>I</b>	in base a più studi clinici randomizzati e controllati, o revisioni sistematiche
<b>B</b>	comportamento o intervento raccomandato	<b>II</b>	in base ad almeno uno studio clinico randomizzato
<b>C</b>	comportamento o intervento da considerare, ma di impatto incerto	<b>III</b>	in base a studi di coorte
<b>D</b>	comportamento o intervento da disincentivare	<b>IV</b>	in base a studi caso-controllo
<b>E</b>	fortemente sconsigliato	<b>V</b>	in base a studi su serie di casi senza gruppo di controllo
		<b>VI</b>	in base a opinioni di esperti





# 1. Caratteristiche del virus

# 1. Caratteristiche del virus

L'agente causale di BVD è un virus a RNA, e per la precisione un virus appartenente alla famiglia Flaviviridae, genere Pestivirus, identificato con l'acronimo BVDV (Bovine Viral Diarrhea Virus). Il genere Pestivirus include altri agenti infettivi, tutti fra loro imparentati a livello antigenico e tutti (ad eccezione del virus della peste suina classica) caratterizzati da uno spettro d'ospite piuttosto ampio all'interno dei ruminanti e dei suini, e più in generale dell'ordine *Artiodactyla*. Nel dettaglio:

- Virus della peste suina classica (CSFV) --> **suino**
- Virus della diarrea virale bovina (BVDV) --> **bovino**, altri ruminanti domestici e selvatici, suino
- Virus della Border Disease (BDV) --> **ovino**, altri ruminanti domestici e selvatici, suino
- Pestivirus atipici:
  - ✓ HoBi-like (talvolta identificato anche con l'acronimo BVDV3)
  - ✓ ceppo giraffa
  - ✓ ceppo Pronghorn (antilocapra)
  - ✓ ceppo Bungowannah (suini)

Per CSFV - BVDV- BDV sono indicata in grassetto le specie principalmente coinvolte, al cui interno il virus si mantiene in modo autonomo: le altre specie spesso fungono da ospite occasionale e/o rivestono comunque un interesse molto minore dal punto di vista dei danni economici causati dalle tre malattie.

Da un punto di vista strutturale, il virus BVDV è costruito secondo lo schema classico dei Pestivirus, constando di:

- un nucleocapside proteico a simmetria icosaedrica, con diametro di circa 30 nm, contenente l'acido nucleico (RNA)
- una membrana lipidica (envelope) che avvolge la particella proteica e nella quale sono immerse le glicoproteine di membrana: le tre principali sono E<sup>ns</sup> (principale target delle prove virologiche basate sui test ELISA), E1 ed E2 (la più variabile, principale target degli anticorpi neutralizzanti), nel loro insieme rientranti nel gruppo delle cosiddette proteine strutturali, ovvero facenti parte del capsido virale

Esistono altre proteine virali, non facenti parte del capsido virale, e pertanto definite come "non strutturali"; fra esse una particolare importanza ai fini diagnostici, nonché come marker differenziante i ceppi citopatogeni da quelli non citopatogeni spetta alla

proteina NS2-3, che verrà presa più avanti in considerazione. La particella virale matura risulta alquanto piccola, con un diametro oscillante fra 40-60 nm.

Da un punto di vista della resistenza, il virus BVDV risulta sensibile in linea generale a tutti i disinfettanti, mentre, per quanto concerne la sua persistenza, esso non presenta caratteristiche di resistenza particolarmente spiccate: da segnalare come la presenza di materiale fecale risulti alquanto nociva per la stabilità del virus, anche a livello genomico (Ridpath et al, 2014).

Da un punto di vista della variabilità antigenica, vengono riconosciuti all'interno di BVDV due genotipi (BVDV1 - BVDV2). Il genotipo 3, talvolta così citato in letteratura, corrisponde di fatto ai Pestivirus atipici appartenenti al gruppo HoBi-like; si tratta di ceppi virali perfettamente sovrapponibili dal punto di vista patogenetico/clinico ai ceppi BVDV classici 1 e 2, ma la loro distanza a livello genomico e antigenico da questi non ha ancora portato ad un riconoscimento ufficiale dei virus HoBi-like come terzo genotipo del virus BVDV (Bauermann et al., 2013). Per praticità, nelle presenti linee guida si farà uso della dizione HoBi-like. A livello europeo, è netta la prevalenza dei ceppi BVDV1, modesta la presenza di BVDV2 (<10% dei ceppi identificati in campo), mentre ceppi HoBi-like sono segnalati per ora solo in Italia meridionale (Decaro et al., 2011 - Cavirani et al., 2013 - Luzzago et al., 2014 - Schirrmeyer, 2014). Negli USA il riscontro di BVDV2 è molto più frequente (Ahn et al. 2005 - Fulton et al., 2005). Il perché di questa diversa distribuzione dei genotipi non è chiaro, tanto più che in Europa fino a pochissimo tempo fa i vaccini disponibili contenevano soli il genotipo 1, quindi (in teoria) la diffusione del genotipo 2 sarebbe dovuta essere stata facilitata da un meccanismo di immunità selettiva.

La variabilità antigenica si rileva tipicamente a carico degli epitopi collocati sulle glicoproteine di membrana, di norma target degli anticorpi neutralizzanti, perché questa è la classica strategia che il virus mette in campo per sfuggire alla risposta immunitaria. Tale variabilità non si esprime solo a livello di genotipo, ma anche all'interno dei genotipi stessi sono riconosciuti ulteriori subgenotipi, identificati tramite una lettera: all'interno di BVDV1 ad oggi se ne contano 18 (1a --> 1r), mentre per BVDV2 sono molti di meno (4 - 2a --> 2d) (Alpay e Yesilbag, 2015).

Tutti e tre i genotipi condividono di regola il meccanismo patogenetico classico dell'infezione da BVDV, ovvero l'induzione

- del fenomeno dell'immunotolleranza da ceppi non citopatogeni (ncp)
- del quadro clinico definito come "malattia delle mucose" in soggetti immunotolleranti nei quali si sviluppa l'infezione da variante citopatogena (cp) del ceppo ncp in essi presente (recentemente descritto anche per i ceppi HoBi-like - Decaro et al., 2014)

In aggiunta, alcuni ceppi ncp (cosiddetti "trombocitopenici") appartenenti al genotipo 2 si caratterizzano per un'elevata patogenicità, tale da renderli in grado di indurre un grave quadro clinico a carattere emorragico in assenza della corrispondente variante cp.

Vi è un'ampia serie di lavori che si occupa di indagare nel dettaglio, a livello laboratoristico, le differenze fra le due varianti ncp e cp del virus BVD; in questa sede basti brevemente ricordare che

- la variante cp, a differenza della ncp, coltivata su monostrati cellulari recettivi, ne determina la morte, testimoniata dallo sviluppo di un effetto citopatico visibile al microscopio ottico
- la variante cp, a differenza della ncp, è in grado di scindere la proteina non strutturale NS2-3 in un segmento più breve (NS3)



## 2. Spettro d'ospite

## 2. Spettro d'ospite

Il virus BVDV infetta tipicamente il bovino, specie al cui interno il virus circola autonomamente ad ha il proprio serbatoio, rappresentato dai soggetti immunotolleranti, infetti in modo persistente. Può tuttavia trasmettersi al suino, ad altri ruminanti ed ai camelidi: evento che, in funzione della specie, può configurarsi come fatto occasionale o piuttosto, nel momento in cui si rileva all'interno della specie stessa l'instaurarsi del fenomeno dell'immunotolleranza, può portare a considerare tale specie come un serbatoio virale autonomo, indipendente dalla specie bovina.

Il virus BVDV crea soggetti PI e circola autonomamente nelle seguenti popolazioni di ruminanti:

- Alpaca (*Vicugna pacos* - Carman et al., 2005)
- Cervo dalla coda bianca (*Odocoileus virginianus* - Passler et al., 2007)
- Cervo mulo (*Odocoileus hemionus* - van Campen et al, 2001; Duncan et al., 2008)
- Tragulo di Giava (*Tragulus javanicus* - Grondhal et al., 2003), che è sperimentalmente in grado di infettare il bovino (Uttenthal et al., 2006)

Nel bufalo (*Bubalus bubalis*): è segnalata la presenza del virus in feti abortiti (Martucciello et al., 2009) nonché nel sangue di soggetti immunotolleranti (Craig et al., 2015). Il virus BVDV crea soggetti PI, ma non si è dimostrata una sua circolazione autonoma nelle seguenti popolazioni di ruminanti

- Pecora (*Ovis aries*): prove di infezione sperimentale (Paton et al., 1997)
- Capra (*Capra hircus*): prove di infezione sperimentale (Bachofen et al., 2013)

Esistono inoltre svariate segnalazioni di animali, non bovini, naturalmente infetti

- |   |             |
|---|-------------|
| • Yak tibetano ( <i>Bos grunniens</i> )         | BVDV 1c     |
| • Bisonte europeo ( <i>Bison bonasus</i> )      | BVDV2       |
| • Bisonte canadese ( <i>Bison bison bison</i> ) | BVDV 1a, 1b |
| • Cervo ( <i>Cervus elaphus</i> )               | BVD 1b      |

Il suino (*Sus scropha*) può essere infettato da BVDV (oltre che Border disease), e questo rappresenta la principale causa di reazioni aspecifiche, in tale specie, verso la peste suina classica; non si riesce ad eliminare al 100% tali reazioni neppure ricorrendo a test basati di anticorpi monoclonali.

Per quanto riguarda il cervo, i dati sono contrastanti: un'indagine condotta su n. 764 cervi rossi (*Cervus elaphus*) in Austria non ha evidenziato positività virologiche (Glawschnig et al, 2010), mentre in Spagna una significativa presenza di positività sia

sierologiche che virologiche è stata più recentemente riportata da Rodríguez-Prieto et al. (2016). In linea generale comunque, nei ruminanti selvatici europei, sono descritte infezioni occasionali, con basse prevalenze sierologiche, spesso in vicinanza topografica a episodi di infezione nel bovino, e riscontro più frequente di Border Disease (Casaubon et al., 2015).

Infine, il riscontro di diffuse sieropositività nella lepre europea (*Lepus europaeus*), recentemente segnalata da Colom-Cadena et al. (2016), documenta la recettività in condizioni naturali di questa specie all'infezione da Pestivirus dei ruminanti. In condizioni sperimentali, è dimostrata nel coniglio (*Oryctolagus cuniculus*) la sensibilità all'infezione da BVDV nonché la possibilità di trasmissione verticale alla progenie, ma il significato epidemiologico di questo riscontro nella realtà non è chiaro. (Grant et al., 2015). Al virus BVDV non è riconosciuto alcun potere zoonosico.





### 3. Quadro clinico

## 3. Quadro clinico

Vanno nettamente distinte tre diverse situazioni cliniche, legate ad altrettanto diversi meccanismi patogenetici, ovvero (per un più ampio riferimento bibliografico si invita a consultare le due review seguenti: Lanyon et al., 2014a - Brodersen, 2014):

1. infezione clinica acuta in soggetti immunocompetenti (da ceppi ncp a patogenicità "convenzionale"), spesso con un quadro clinico aspecifico/subdolo, ma talvolta più manifesto in funzione della virulenza del ceppo infettante e delle condizioni ambientali in cui l'animale esposto si trova, nella quale le principali strutture bersaglio dell'azione patogenica virale sono:
  - apparato digerente
  - apparato riproduttivo
  - sistema immunitario
2. infezione clinica acuta in soggetti immunocompetenti da ceppi ncp cosiddetti "trombocitopenici", finora descritti invariabilmente all'interno del genotipo 2, caratterizzata dalla comparsa di un grave quadro emorragico con significativa letalità fra gli animali colpiti; si tratta di eventi piuttosto rari, strettamente legati all'elevata virulenza di questi ceppi trombocitopenici, la quale peraltro si rileva solo in alcuni dei ceppi virali appartenenti al genotipo 2, mentre la maggioranza degli altri si comportano come un normale ceppo a patogenicità "convenzionale"
3. infezione persistente in soggetti immunotolleranti, dove la manifestazione clinica più eclatante è rappresentata dal quadro della cosiddetta "malattia delle mucose" (MD), scatenata dalla comparsa nel soggetto immunotollerante della variante citopatogena del virus, e tipico per la sua sporadicità nel gruppo (essendo coinvolti i soli soggetti immunotolleranti), la sua imponentza clinica e l'esito invariabilmente letale. Per quanto riguarda la sporadicità, va tuttavia sottolineato che, se in azienda sono presenti contemporaneamente più capi immunotolleranti (un esempio pratico: sono state inviate in una malga infetta sei manze sieronegative gravide nei primi cinque mesi, destinate a partorire al loro ritorno altrettanti vitelli immunotolleranti a breve distanza di tempo), la comparsa della malattia delle mucose in uno di questi sei animali potrà in poco tempo indurre la stessa malattia negli altri cinque, per effetto del passaggio del ceppo cp dal capo malato agli altri ancora sani, creando in tal modo un cluster di malattia.

Per quanto riguarda i quadri clinici riferibili alle infezioni di cui al punto 1, sintomi caratteristici sono rappresentati

- dalla diarrea e dalla formazioni di lesioni erosive a livello orale, tutti strettamente legati alla colonizzazione virale della mucosa dell'apparato digerente, dove è evidente l'interessamento delle strutture linfatiche. In sede necroscopica tali lesioni erosive si possono riscontrare nell'intero tratto dell'apparato digerente, associate ad enterite catarrale
- dall'aborto, dalla riduzione del tasso di concepimento, dall'aumento dei riassorbimenti e dalla nascita di soggetti malformati (con particolare riferimento all'ipoplasia cerebellare) o apparentemente sani, ma con infezione persistente causa immunotolleranza
- dall'aumento di patologie infettive generiche, quali forme respiratorie - mastiti - forme enteriche, per effetto di una situazione di immunodepressione (Ridpath, 2010)

I sintomi più frequentemente segnalati in capi infetti in modo acuto da BVD sono diarrea, aborto e forme respiratorie, senza una particolare associazione tra essi ed il genotipo infettante (Ahn et al., 2005).

L'insieme dei quadri sopra descritto è in linea generale legato alla generalizzata presenza del virus nel tessuto linfoide degli animali colpiti. Si tratta spesso di quadri clinici di modesta gravità, ma sono descritti ceppi più spiccatamente aggressivi (Ridpath, 2010 - Brodersen et al., 2014).

Per quanto riguarda i quadri clinici riferibili alle infezioni di cui al punto 2, si tratta di episodi sicuramente molto meno frequenti rispetto al quadro descritto nel punto precedente, sostenuti da ceppi appartenenti al genotipo 2 e dotati di una spiccata virulenza: quadri trombocitopenici sono riportati anche in seguito all'infezione da genotipo 1 (Blanchard et al. 2010), ma non rivestono il carattere di rilevanza clinica descritto per questi ceppi ipervirulenti del genotipo 2; resta fermo il fatto che non tutti i ceppi di BVDV2 sono trombocitopenici, e che molti fra essi si comportano come i comuni ceppi BVDV1 a patogenicità "convenzionale" (Hamers et al., 2000a). Ipertermia, diarrea grave e sintomi respiratori importanti si osservano in modo sistematico, unitamente ad una profonda alterazione di alcuni parametri ematici (trombocitopenia, anemia) ed esito spesso infausto: da sottolineare è che si tratta della conseguenza di un'infezione *per se* da ceppo ncp, senza la sovrapposizione di ceppi cp come nella classica malattia delle mucose.

Per quanto riguarda infine i quadri clinici riferibili alle infezioni di cui al punto 3, vanno distinte due situazioni specifiche, ovvero

- quadri clinici in soggetti persistentemente infetti da ceppi ncp: si può variare da una completa assenza di sintomi ad un ridotto sviluppo dell'animale rispetto a pari età non infetti; in ogni caso, si tratta di animali che, anche se apparen-

temente normali, hanno mediamente una prospettiva di vita inferiore rispetto agli omologhi immunocompetenti, perché

- sono esposti al rischio di sviluppare il quadro clinico della malattia delle mucose (con esito invariabilmente letale), che si innesca quando, nel corso della loro vita
  - ✓ vengono infettati da un ceppo cp antigenicamente omologo al ceppo ncp responsabile dell'immunosoppressione, oppure
  - ✓ il ceppo ncp responsabile dell'immunosoppressione muta nella variante cp
- sono più esposti ad infezioni secondarie, con ciò evidenziando una minore efficienza del loro sistema immunitario (Ridpath, 2010)

Tutto ciò tuttavia non preclude la possibilità di trovare bovini immunosoppressi anche di età avanzata.

- quadri clinici in soggetti persistentemente infetti da ceppi ncp + cp: nel momento in cui, nell'animale persistentemente infetto, sopraggiunge una superinfezione da variante cp (esogena o, molto più comunemente, per mutazione della variante ncp responsabile dell'immunosoppressione), compare il quadro della cosiddetta "malattia delle mucose", nelle sue varianti
  - ✓ "early onset": quando i due ceppi ncp + cp sono fra di loro antigenicamente speculari (tipicamente nel caso di mutazione endogena della variante ncp) - il quadro clinico si evidenzia dopo una breve incubazione (<1 mese), in modo eclatante, con grave compromissione dell'apparato digerente e respiratorio, caratterizzata da flogosi, erosioni e diarrea imponente con morte dell'animale nel giro di pochi giorni
  - ✓ "late onset": quando i due ceppi ncp + cp non sono fra di loro antigenicamente speculari (tipicamente nel caso di infezioni esogene da ceppi cp) - in questo caso il quadro clinico si manifesta a distanza di tempo dalla superinfezione (anche mesi)

Le due varianti sono sostanzialmente indistinguibili a livello clinico, si differenziano solo nel tempo di incubazione.

In ogni caso, ed a prescindere dalla variabilità delle manifestazioni cliniche legate (anche) ai diversi meccanismi patogenetici coinvolti, la regola generale è quella di una malattia ad andamento cronico nel gruppo, subdola, con sintomi aspecifici, dove comunque assume un aspetto predominante l'impatto economico sulle produzioni. A livello aziendale, l'ampia review di Houe (2003), nel confermare il significativo impatto economico dell'infezione nell'allevamento della vacca da latte, evidenzia comunque una marcata variabilità del danno stimato, riconducibile in parte al modello di calcolo

applicato (che non di rado porta a sottostimare il danno stesso), ma sicuramente anche alla diversa virulenza dei ceppi, al sovrapporsi di infezioni concomitanti ed altro ancora.

Nell'allevamento da latte, le principali voci di danno sono rappresentate da (Fourichon et al., 2005):

- Calo della produzione lattea
  - ✓ direttamente correlato all'infezione (Beaudeau et al., 2004)
  - ✓ indirettamente correlato all'infezione (allungamento dell'interparto, patologie mammarie intercorrenti da immunodepressione)
- Aumento della mortalità fra i vitelli
- Riduzione del prezzo del latte per aumento delle cellule somatiche in misura tale da giustificare l'applicazione di misure di controllo non solo nelle aziende infette (per risanare), ma anche in quelle indenni (per prevenire l'introduzione del virus)

Anche nella linea vacca-vitello, quindi in aziende che non conferiscono latte, l'impatto economico dell'infezione da BVDV si conferma importante (Gunn et al., 2004).

A livello territoriale, indagini retrospettive di costo-beneficio, svolte in Norvegia (Valle et al., 2005) ed in Svizzera (Häsler et al. 2012), indicano un vantaggio economico a favore di una politica di controllo della malattia rispetto al non controllo, sottolineando al tempo stesso la necessità di mitigare le misure di controllo (e quindi le relative spese) quando la prevalenza di infezione scende a livelli molto bassi (Häsler et al. 2012). A favore dell'introduzione di una politica di controllo sono anche i risultati di simulazioni in previsione dell'avvio di piani di controllo nazionali (ad ed. in Irlanda - Stott et al., 2012; in Scozia - Weldegebriel et al., 2012).





## 4. Patogenesi

## 4. Patogenesi

Prendendo spunto da quanto evidenziato in riferimento al quadro clinico, bisogna distinguere tre meccanismi patogenetici fondamentali, ovvero riferiti a (anche in questo caso, per un più ampio riferimento bibliografico si invita a consultare le due review nel capitolo dedicato al quadro clinico: Lanyon et al., 2014a - Brodersen, 2014):

1. *Infezione acuta in soggetti immunocompetenti da ceppi a patogenicità "convenzionale"*

L'infezione viene tipicamente innescata dal contatto diretto di animali naïve, sieronegativi, con animali infetti (tipicamente: soggetti immunotolleranti), con penetrazione del virus a livello delle mucose nasali - orofaringee o per via venerea. Ne consegue una viremia transitoria, che inizia pochi giorni dopo il contagio e si esaurisce nell'arco di 1-2 settimane (Howard, 1990), cui consegue (dopo 2-3 settimane p.i.) lo sviluppo di una risposta immunitaria, testimoniata dallo sviluppo di anticorpi che persistono per tutta la vita dell'animale. La fase iniziale di viremia si può associare a leucopenia, linfopenia e trombocitopenia, apoptosi a livello del timo, immunodepressione, febbre e diarrea. Il virus presenta un particolare tropismo per linfociti e macrofagi, individuato a livello molecolare nel recettore di membrana CD46. BVDV non si localizza solo a livello di linfociti circolanti, ma anche a livello dell'apparato digerente (tessuto linfoide, enterociti), timo, milza, linfonodi. L'immunodepressione a sua volta facilita l'instaurarsi o l'esacerbarsi di patologie concorrenti, come ad es. forme respiratorie; esistono anche segnalazioni, ma non ancora definitivamente accertate, relative ad un collegamento fra infezione da BVDV ed aborto da *Neospora caninum* (Quinn et al., 2004). L'infezione acuta in concomitanza dell'ovulazione induce un'alterazione della funzionalità endocrina la quale, unitamente all'azione diretta sulle ovaie, si può tradurre in una riduzione della fertilità (Fray et al., 2002). Con lo svilupparsi dell'immunità l'infezione di regola si estingue, ma con alcune importanti eccezioni, ovvero:

- Persistenza di un'infezione localizzata a livello testicolare, con possibile escrezione di BVDV nello sperma: al riguardo, vengono descritte due fattispecie distinte, e cioè:
  - ✓ Infezione testicolare prolungata: descritta in soggetti immunocompetenti esposti ad infezione acuta, con presenza del virus dimostrata in biopsie testicolari per oltre due anni e nel seme per oltre un anno; il seme peraltro non appare in grado di infettare animali recettivi, anche se inoculato per via endovenosa (Givens, 2009)

- ✓ Infezione testicolare persistente: descritta molto meno frequentemente in soggetti immunocompetenti esposti ad infezione acuta, ma caratterizzata da un livello di escrezione virale nello sperma significativamente maggiore, che si traduce nella possibilità di infettare bovine fecondate artificialmente (Voges et al., 1998 - Dünser et al., 2005 - Newcomer et al. 2014)

Si tratta in entrambi i casi di eventi peraltro alquanto sporadici, risultando la grande maggioranza dei tori sieropositivi negativa nel seme per BVDV.

- Persistenza di un'infezione a livello ovarico: descritta per 60 giorni p.i. (Grooms et al. 1998)
  - ✓ Persistenza di un'infezione "occulta" a livello di leucociti circolanti: descritta a livelli molto bassi 98 giorni PI in animali negativi virologicamente, ma il cui sangue, inoculato in soggetti naive, è in grado di trasmettere l'infezione (Collins et al., 2009)

In conclusione, delle situazioni di infezione persistente sopra descritte, solo la condizione di infezione testicolare persistente appare al momento quella potenzialmente pericolosa.

L'importanza dell'infezione acuta è in realtà principalmente connessa all'instaurarsi del fenomeno dell'immunosoppressione in vacche gravide, che verrà discusso successivamente nel presente capitolo.

## 2. *Infezione acuta in soggetti immunocompetenti da ceppi "trombocitopenici"*

In questo caso ci si trova di fronte ad un'infezione tradizionale, che rispetta i postulati di Koch; la tipica condizione di immunosoppressione descritta per i ceppi a virulenza "convenzionale" non appare compatibile con l'elevata aggressività di questi ceppi di BVDV2 trombocitopenici.

## 3. *"Malattia delle mucose" (MD)*

Il quadro clinico si rileva solo a carico di soggetti persistentemente infetti, quando subiscono una superinfezione da una variante cp del virus BVDV, la quale sia antigenicamente omologa al ceppo ncp responsabile del fenomeno dell'immunosoppressione (Brownie et al., 1984).

La situazione classica è quella rappresentata dalla mutazione (casuale e temporalmente imprevedibile) del ceppo ncp stesso, che produce un suo clone cp (Peterhans et al., 2010); in questo caso la perfetta omologia fra i due ceppi si traduce nella comparsa della malattia delle mucose in forma classica, con una breve incubazione ed una letalità pari al 100%. Viceversa, nel caso di una superinfezione esogena da ceppo cp parzialmente omologo, si potrà produrre la

malattia nella sua forma "late onset" (ovvero incubazione prolungata, dell'ordine di mesi, se non anni), ma con esito comunque infausto: in questi casi si rileva come il ceppo cp isolato dall'animale malato derivi da mutazioni e/o ricombinazioni del ceppo cp utilizzato per la superinfezione (Fritzemeier et al., 1995 - Fritzemeier et al., 1997). Da sottolineare inoltre come, in queste circostanze, un trattamento immunodepressivo possa accelerare l'evolvere del quadro clinico (Sentsui et al., 2001). Esiste peraltro anche la possibilità, nel caso di superinfezioni da ceppi cp eterologhi rispetto al ceppo ncp del capo immunotollerante, di non avere alcuna conseguenza clinica, anche se non è facile stabilire una correlazione fra livello di eterogeneità antigenica e probabilità di induzione della malattia delle mucose "late onset" (Loehr et al. 1998). Da segnalare che in queste circostanze l'animale immunotollerante infettato da ceppo cp eterologo produce anticorpi verso gli epitopi del ceppo cp non condivisi con il ceppo ncp, quindi tipicamente anticorpi di tipo strutturale rivolti verso le glicoproteine di membrana, rilevabili tramite SN.

In ogni caso, il meccanismo patogenetico fondamentale dell'infezione da virus BVDV è rappresentato dall'infezione fetale e dall'instaurarsi del fenomeno dell'immunotolleranza (Brock, 2003). Il feto è il bersaglio principale dell'azione patogena del virus BVDV, ma in stretto collegamento con il momento della gravidanza in cui la vacca va incontro all'infezione acuta, ovvero

#### 1. *Infezione nella prima metà della gravidanza*

Si possono avere tre esiti possibili, a loro volta strettamente collegati al periodo di gestazione (ovvero: alla maturazione del sistema immunitario fetale), qui di seguito sintetizzati:

- Aborto (per azione diretta sul feto/per azione sulla placenta): 0-30 giorni di gestazione; va precisato che in linea di principio, non essendo BVDV capace di penetrare la zona pellucida dell'embrione, l'embrione stesso non viene infettato finché non si fissa nell'utero materno; è pertanto possibile (anzi, è l'evento più frequente - Kirkland et al., 1994) avere bovine infettate per via venerea in sede di FA che partoriscono vitelli normali e sieronegativi
- Immunotolleranza: 30-120 giorni di gestazione; il virus penetra nel feto, dove si insedia in primis a livello di tessuto linfoide; il sistema immunitario fetale non riconosce BVDV come antigene, e quindi non sviluppa una reazione immunitaria; alla nascita si avrà un vitello normale, ma che sarà persistentemente infetto dal virus BVDV per tutta la sua vita
- Malformazioni (con mortalità fetale/neonatale): 80-150 giorni di gestazione; tale evento è ricondotto ad infezione nella fase in cui il sistema immunitario fetale sta maturando, e si manifesta principalmente con

malformazioni del sistema nervoso (ipoplasia cerebellare), degenerazione oculare, brachignatismo; gli animali il più delle volte non risultano immunotolleranti, ma sono anche descritti anche casi di animali malformati e persistentemente infetti (Blanchard et al., 2010)

2. *Infezione nella seconda metà della gravidanza*

Dopo i 150 giorni di gravidanza il sistema immunitario fetale è adeguatamente maturo per contrastare l'infezione, produrre autonomamente anticorpi ed eliminare il virus presente; alla nascita si avranno vitelli sieropositivi, negativi per virus e clinicamente normali.

Quanto sopra descritto si applica esclusivamente ai ceppi ncp; i ceppi cp del tutto incapaci di indurre il fenomeno dell'immunotolleranza per motivi che verranno descritti oltre. Si tratta in altre parole di ceppi virali destinati all'estinzione spontanea (Peterhans et al., 2010), che sopravvivono solo in quanto generati per mutazione spontanea dalla corrispondente variante ncp oppure che sono mantenuti artificialmente per la produzione di vaccini.





## 5. Lesioni anatomopatologiche

## 5. Lesioni anatomo patologiche

Le lesioni vengono descritte in modo raggruppato per ciascuna delle tre forme cliniche sopra descritte:

1. *Infezione acuta in soggetti immunocompetenti da ceppi a patogenicità "convenzionale"*  
In questo specifico caso, trattandosi di forme subdole e che di regola non portano a morte l'animale, l'aspetto anatomopatologico passa in secondo piano, limitandosi a lesioni modeste a carattere flogistico-erosivo a carico dell'apparato digerente
2. *Infezione acuta in soggetti immunocompetenti da ceppi "trombocitopenici"*  
In questo caso predominano le lesioni emorragiche, a carico di organi interni (milza, cuore, vescica), apparato digerente (abomaso) nonché focolai multipli di polmonite, con un quadro generale di disidratazione (Hamers et al., 2000a)
3. *"Malattia delle mucose" (MD)*  
Una diffusa lisi dei cheratinociti si traduce in un diffuso indebolimento dell'epitelio del tratto superiore dell'apparato digerente (dal cavo orale all'omaso), con la comparsa di gravi erosioni ed ulcerazioni, che mettono a nudo il tessuto connettivo sottostante; anche più a valle, il quadro si caratterizza per una grave infiammazione, con lesioni erosive diffuse; l'entità delle lesioni appare meno pronunciata nelle forme "late onset", ma in realtà la differenza principale non è tanto a livello autoptico, quanti piuttosto a livello istologico, con una vasculopatia a livello intestinale che si rileva solo nelle forme "late onset" (Lieber-Tenorio et al., 2000)



## 6. Immunologia

## 6. Immunologia

La risposta del sistema immunitario bovino a fronte di un'infezione da virus BVDV si articola attraverso meccanismi specifici sia cellulo-mediati che umorali. Da un punto di vista della sierologia classica, e prescindendo dal caso specifico dei bovini immunotolleranti, la risposta anticorpale a seguito di un'infezione presenta una dinamica anticorpale tradizionale, con la comparsa degli anticorpi circolanti nel giro di due-tre settimane dall'infezione, dopo l'esaurimento dell'infezione acuta, e la loro persistenza per l'intera vita dell'animale (Sandvik, 2005).

Ai fini pratici, senza volersi dilungare negli aspetti più sottili dell'interazione virus-ospite, è sufficiente elencare in breve i seguenti punti:

1. *Il fenomeno dell'immunotolleranza appare legato ad una mancata produzione a livello fetale di interferone tipo 1*

Una volta compresa la patogenesi della malattia delle mucose, l'incapacità dei ceppi cp di sviluppare il fenomeno dell'immunotolleranza si è resa evidente fin da subito (Brownlie et al., 1989), ma si ipotizzava all'epoca una generica refrattarietà del feto bovino all'infezione da ceppi cp; oggi invece è chiaro che i ceppi cp infettano sì il feto bovino già nei primi quattro mesi di gravidanza, ma, a differenza dei ceppi ncp, il feto reagisce con la produzione di interferone tipo I, che porta alla clearance virale (Charleston et al., 2001)

2. *La produzione di anticorpi verso BVDV presenta delle caratteristiche nettamente diverse in funzione delle proteine (strutturali/non strutturali) verso cui i singoli anticorpi sono rivolti*

Come in linea generale per tutte le infezioni virali, la replicazione del virus BVDV induce nel bovino la produzione di anticorpi rivolti verso le proteine strutturali (ovvero facenti parte del capsido virale, con particolare riguardo alle tre glicoproteine di membrana citate precedentemente) e quelle non strutturali (libere, non legate al capsido virale). Nel caso specifico del virus BVDV, come già detto, le tre glicoproteine di membrana, ed in particolare E2, possono variare da ceppo a ceppo, e conseguentemente la risposta anticorpale indirizzata verso di esse (tipicamente: gli anticorpi neutralizzanti) è almeno relativamente ceppo-specifica. La situazione è invece molto diversa per quanto riguarda gli anticorpi rivolti verso la proteina non strutturale NS2-3, che risulta altamente conservata all'interno del intero genere Pestivirus: ne consegue che le prove sierologiche che misurano gli anticorpi verso questa proteina (tipicamente: ELISA competitiva basata su anticorpi monoclonali) non sono influenzate dalla variabilità dei ceppi

3. *Il bovino immunotollerante non è in grado di produrre anticorpi verso il ceppo re-*

*sponsabile dell'immunosoppressione, ma può produrre verso ceppi eterologhi*

Dato quanto esposto al punto precedente, il bovino immunosoppresso infettato da/vaccinato con ceppi BVDV esogeni (cp/ncp) immunologicamente eterologhi, produrrà anticorpi verso gli epitopi del ceppo esogeno non condivisi col ceppo endogeno: ovviamente si tratterà di epitopi collocati a livello tipicamente delle glicoproteine di membrana (e specialmente E2), in quanto variabili da ceppo a ceppo, mentre in ogni caso non si avrà la produzione di anticorpi NS2-3, in quanto si tratta di proteina altamente conservata anche fra ceppi eterologhi.





## 7. Diagnosi

## 7. Diagnosi

Conformemente alla regola generale delle malattie infettive, la diagnosi può essere posta non tanto su base clinica (dove non è facile formulare un sospetto più o meno fondato), quanto piuttosto su base laboratoristica, per via diretta (dimostrazione del virus) o indiretta (dimostrazione degli anticorpi). Fanno eccezione, ma sono evenienze relativamente rare, le forme trombocitopeniche e la malattia delle mucose, dove l'imponenza della sintomatologia associata (nella malattia delle mucose) alla sua sporadicità nel gruppo aiutano in modo consistente ad indirizzare la diagnosi. Sulla base dell'epidemiologia del virus, è evidente che lo sforzo diagnostico deve essere indirizzato in primis verso i soggetti immunotolleranti, quindi deve:

- Evidenziare le aziende al cui interno è presumibile la presenza dei soggetti immunotolleranti
- Identificare, all'interno di esse, i soggetti immunotolleranti, in modo da poterli eliminare

Un discorso a parte è rappresentato dai tori con infezione testicolare, che verranno brevemente discussi in un capitolo a parte.

### 1. *Diagnosi virologica*

Da un punto di vista storico, la diagnosi eziologica di BVD nasce con l'isolamento del virus su coltura cellulare: metodica oggi non dimenticata, ma riservata fondamentalmente ad attività particolari di diagnostica e/o ricerca, causa la sua indagine e lentezza nei tempi di risposta.

Successivamente è subentrata la prova ELISA di cattura dell'antigene (ACE - **A**ntigen **C**apture **E**LISA) indirizzata per la proteina non strutturale NS2-3, da utilizzare tipicamente su leucociti purificati o organi linfatici. Essa presenta il grande vantaggio di essere rivolta verso un target antigenico altamente conservato, e pertanto di non essere influenzata dalla variabilità dei ceppi BVDV; al tempo stesso tuttavia soffre di sensibilità se applicata sul siero di sangue, dove questa proteina non è particolarmente abbondante, essendo confinata a livello endocellulare, mentre i risultati sono migliori con la frazione leucocitaria (Sandvik, 2005). Essendo il siero di sangue una delle classiche matrici diagnostiche raccolte nell'ambito dei piani di profilassi, conservabile e lavorabile con molta più facilità dei campioni di sangue con anticoagulante, questa circostanza compromette alquanto l'impiego dell'ELISA ACE NS2-3 su ampia scala.

L'identificazione di una proteina virale (E<sup>rns</sup>) abbondantemente secreta nel siero di sangue e, per quanto glicoproteina di membrana, relativamente conservata fra i diversi ceppi di virus BVDV (Sandvik, 2005) ha permesso lo sviluppo di un'ELISA ACE-E<sup>rns</sup> idonea per tale matrice, sulla quale sono stati impostati

e sono tuttora impostati molti piani di controllo a livello territoriale nonché la diagnostica routinaria a livello aziendale, sfruttando le possibilità di automazione semplificata che il siero di sangue offre. Questa stessa proteina E<sup>rn5</sup> è peraltro presente in abbondanza anche a livello intra-cellulare (Sandvik, 2005), cosa che ha permesso di estendere l'ELISA ACE-E<sup>rn5</sup> anche ai frammenti di tessuto prelevati in sede di applicazione della marca auricolare richiesta dalla normativa UE per l'identificazione individuale dei bovini. Da un punto di vista teorico si potrebbe pensare di utilizzare per il tessuto auricolare anche un ELISA ACE per NS2-3, ma tale proteina soffre di una certa termolabilità (Sandvik e Kogsrud, 1995), più marcata rispetto a E<sup>rn5</sup>, che può tradursi in esiti falsamente negativi (Fux e Wolf, 2012).

Successivamente all'ELISA ACE-E<sup>rn5</sup>, è stata introdotta la PCR, tipicamente applicata a pool, anche per ragioni di contenimento dei costi, e di regola indirizzata sul tratto 5'-UTR del genoma virale, per il suo elevato livello di conservazione. Anche la PCR viene impiegata su campioni di tessuto auricolare, ma in questo caso la dimensione del pool è inferiore rispetto alla matrice siero: da sottolineare che, nel caso del tessuto auricolare, è possibile sostituire le classiche procedure di estrazione dell'RNA con un semplice trattamento di lisi al calore, cosa che rende la procedura facilmente automatizzabile. Come regola generale la metodica PCR offre una sensibilità diagnostica migliore del test ELISA, dato che amplifica il target oggetto della ricerca: tuttavia, nel caso specifico dei bovini persistentemente infetti, l'abbondante presenza di proteina E<sup>rn5</sup> nel siero di sangue e nel tessuto auricolare fa sì che in termini di sensibilità diagnostica, a livello di campione individuale, queste due metodiche in linea generale si equivalgano (Hilbe et al., 2007), ad eccezione dei primi mesi di vita, quando l'elevata concentrazione di anticorpi materni può dar luogo ad esiti di falsa negatività, in particolare con la prova ELISA su siero di sangue (si rimanda al successivo punto 3). Come già detto, l'elevato costo della PCR rispetto all'ELISA ACE-E<sup>rn5</sup> fa sì che tale metodica sia impiegata su campioni collettivi (pool di sieri, tessuto auricolare e -vedi oltre- latte di massa). Ovviamente la dimensione del pool potrà essere tanto maggiore (nei limiti consentiti dalla procedura), quanto minore è la prevalenza dei capi persistentemente infetti: in altre parole, la PCR è lo strumento più conveniente per l'analisi di gruppi di animali in aziende / popolazioni in regioni dove la prevalenza dei capi immunotolleranti è molto bassa, (tipicamente per effetto di piani di controllo). Ipotizzando ad es. una PCR che consenta l'analisi di pool di 50 campioni di sangue bovino,

- nel caso di popolazioni bovine con una prevalenza di capi immunotolleranti dell'1%, la probabilità che il pool risulti negativo è  $0,9950 = 61\%$
- nel caso di popolazioni bovine con una prevalenza di capi immunotolleranti dello 0,1%, la probabilità che il pool risulti negativo è  $0,99950 = 95\%$

Quindi nel primo caso la dimensione del pool è sicuramente eccessiva, porterebbe a dover risolvere individualmente troppi pool e quindi a perdere la convenienza economica. In questo caso sarebbe quindi necessario ridurre la dimensione del pool (ad es, con pool di 5 sieri la probabilità di esito positivo è  $0,99^5 = 95\%$ ), a patto che questo non azzeri il beneficio economico rispetto all'ELISA ACE-E<sub>rn</sub>s.

Ne consegue che l'uso della PCR a pool è limitato:

- nelle aziende infette, dove la PCR potrà essere applicata principalmente nel gruppo di animali (vacche in lattazione), dove per ragioni anagrafiche la probabilità di trovare capi immunotolleranti è bassa
- nell'ambito dei piani di profilassi a livello territoriale, nelle fasi iniziali del piano, quando la prevalenza dei capi immunotolleranti può aggirarsi o anche superare il valore dell'1%: nel primo anno (autunno 1999 - primavera 2000) di piano in provincia di Bolzano essa risultò essere dell'1,13% su un totale di oltre 60.000 capi controllati (dati del Servizio Veterinario Provinciale)

Esistono infine altre procedure diagnostiche (immunoistochimica, citofluorimetria, etc.), su cui in questa sede è tuttavia inutile dilungarsi, trattandosi di metodiche di nicchia, almeno per quanto riguarda la gestione dei grandi piani di profilassi in corso a livello europeo.

L'analisi del tessuto auricolare, introdotta successivamente al test su sangue, combina una serie di vantaggi che la rendono assai interessante, ovvero

- Il prelievo è combinato ad un'azione resa obbligatoria dalla normativa sull'anagrafe bovina (Regolamento CE 1760/2000), e quindi non comporta costi aggiuntivi, se non per la marca auricolare, che deve essere predisposta alla raccolta di questo tipo di campione
- Il prelievo garantisce un elevato grado di sicurezza nell'identificazione del campione, perché la marca auricolare è costruita in modo da riportare l'identificativo dell'animale anche sul contenitore del tessuto auricolare
- Il campione prelevato cade in un piccolo contenitore con una sostanza essiccante all'interno, che disidrata il materiale e ne garantisce la conservabilità anche a temperatura ambiente
- L'evidenziazione del virus nel tessuto auricolare subisce meno l'influenza degli anticorpi materni rispetto alla matrice siero di sangue, tanto da non comprometterne sostanzialmente l'affidabilità diagnostica anche nei primi giorni di vita del vitello immunotollerante, pure in presenza di elevati titoli di anticorpi materni; nel caso invece di ACE-ELISA specifica

per NS2-3, il test torna ad essere positivo solo a 3-4 mesi dalla nascita (Fux e Wolf, 2012 – Lanyon et al., 2014b)

Come ultima matrice di interesse per la diagnosi virologica di BVD, in questo caso solo con la PCR, resta il latte di massa: in caso di negatività, l'esito presenta una notevole utilità pratica per escludere, con l'analisi di un unico campione, la presenza di soggetti persistentemente infetti tra le vacche in lattazione. Le cellule somatiche presenti nel latte sono in buona parte leucociti, e questo permette, concentrandole tramite centrifugazione, di concentrare anche il virus, che sta al loro interno, permettendo l'analisi di campioni di massa corrispondenti ad un numero assai elevato di campioni. Prendendo come riferimento un kit PCR realtime commerciale, esso risulta validato, in funzione della matrice, per pool di 25 (tessuto auricolare) - 50 (siero di sangue) - 100 (latte) campioni, ma vi sono indicazioni bibliografiche (Renshaw et al., 2000) che consentono di incrementare ulteriormente la dimensione del pool di latte. L'unica avvertenza da seguire, nel caso del latte, è quella di consegnare il campione al laboratorio entro le 24 h, conservato a +4°C senza aggiunta di conservanti, prima che le cellule vadano incontro a morte ed esponano l'RNA virale al rischio di lisi enzimatica (Dubovi, 2016). Ovviamente l'approccio qui descritto è meno interessante in aree dove esiste un piano territoriale di controllo della malattia, che porta praticamente a zero la possibilità di avere una vacca in lattazione immunotollerante.

**A**  
**I** Per la diagnosi virologica in giovani animali, è fortemente raccomandata l'analisi del tessuto auricolare (anche a pool) o (solo su singolo campione) la PCR su siero di sangue / leucociti

## 2. *Diagnosi sierologica*

La ricerca anticorpale viene condotta con due metodiche fondamentali, ovvero sieroneutralizzazione (SN) ed ELISA: premesso che la SN evidenzia gli anticorpi neutralizzanti, i quali hanno come target epitopi collocato sulle glicoproteine dell'envelope virale, ed in particolare E2, questa è una reazione tipicamente rivolta verso le proteine strutturali, ovvero facenti parte del capsido virale. Per quanto concerne invece l'ELISA, ne esistono due diversi formati, ed esattamente:

- ELISA per anticorpi verso le proteine totali (strutturali e non - tipicamente in formato non competitivo)
- ELISA per anticorpi verso la proteina non strutturale NS2-3 (tipicamente in formato competitivo)

Da un punto di vista interpretativo, i test per anticorpi strutturali, ed in primis quindi la SN, condividono alcune proprietà generali, ovvero:

- sono il test più idoneo per misurare il livello di protezione, essendo per definizione gli anticorpi neutralizzanti rivolti verso le proteine strutturali
- risultano positivi in animali sia infetti che vaccinati (a prescindere dal tipo di vaccino, vivo o spento)
- sono influenzati dalla variabilità antigenica dei ceppi del virus BVDV, nel senso che lo stesso campione risulta positivo/negativo oppure, se positivo, con titoli più o meno elevati in funzione del livello di omologia fra il ceppo virale che ha stimolato la produzione degli anticorpi e quello impiegato per l'allestimento del test (Hamers et al. 2000b); il problema è più rilevante nelle prove di SN, mentre nella prova ELISA gli antigeni assorbiti alla piastra di regola includono proteine sia strutturali che non (Sandvik, 2005)

Le prove ELISA per anticorpi non strutturali verso NS2-3, invece,

- Non sono strettamente legate al livello di protezione, non essendo tali anticorpi neutralizzanti
- Risultano positive negli animali infetti, mentre in quelli vaccinati possono risultare negative in funzione del tipo di vaccino impiegato
- Non sono influenzati dalla variabilità antigenica dei ceppi del virus BVDV, essendo la proteina NS2-3 la più conservata all'interno del genere Pestivirus

A livello di diagnostica routinaria, la metodica ELISA ha soppiantato la prova di SN, assai più indaginosa e lenta nei tempi di risposta. Inoltre la metodica ELISA è impiegabile sulla matrice latte, dove trova un'interessante applicazione nei prelievi di massa, permettendo di stabilire una correlazione, per quanto grossolana, fra livello di reattività del campione e prevalenza sierologica fra le vacche in lattazione (come specificato anche nel foglietto illustrativo di alcuni kit commerciali).

A  
VI

Per la diagnosi sierologica finalizzata alla valutazione della circolazione virale, è fortemente raccomandato l'impiego di un test

- ✓ per anticorpi NS2-3, in quanto non influenzato dalla variabilità dei ceppi virali BVDV
- ✓ su giovani animali nati in azienda, in quanto testimoni della storia recente

### 3. Cause di errore nella diagnostica virologica

- Esiti di falsa negatività
  - ✓ Infezioni acute in soggetti immunocompetenti: esse sono caratterizzate non solo da una brevità temporale limitata all'ordine

dei giorni, ma anche da una titolo virale nel sangue e negli organi di gran lunga inferiore (100-1000x) rispetto all'infezione persistente in soggetti immunotolleranti, ragione per la quale tutte le problematiche che vengono descritte nei punti successivi rendono meno improbabile, in questo tipo di infezione, un riscontro di falsa negatività; peraltro, nell'ambito dei piani di controllo della malattia, la mancata evidenziazione di tali soggetti non è considerata tale da inficiare l'esito dei piani di controllo della malattia (Lindberg e Alenius, 1999)

- Variabilità antigenica / genomica dei ceppi di virus BVD:
  - ✓ per quanto riguarda i test ELISA, il problema non riguarda le prove indirizzate verso NS2-3, dato l'elevato livello di omogeneità antigenica di questa proteina all'interno del genere Pestivirus (confermato anche in ampie valutazioni di campo – Sandvik e Krogsrud, 1995), quanto piuttosto l'ELISA ACE per E<sup>ns</sup>, proteina più variabile di NS2-3, pur essendo relativamente conservata (Sandvik, 2005); è descritta la comparsa, per quanto occasionale, di ceppi mutanti a livello di E<sup>ns</sup> in grado di sfuggire completamente alla prova ELISA (dati personali, non pubblicati – Gaede et al., 2003, riferito ad un ceppo di BVDV1 – Gripshover et al., 2007, riferito ad un ceppo di BVDV2); per quanto riguarda la sensibilità dei kit ELISA ACE-E<sup>ns</sup> verso i ceppi HoBi-like, le segnalazioni non sono del tutto concordanti, e fanno comunque propendere per una minore sensibilità rispetto a BVDV1 e BVDV2 (Bauer mann et al. - 2013; Bauer mann et al., 2014)
  - ✓ per quanto riguarda i test PCR, pur essendo essi di regola indirizzati su un tratto genomico altamente conservato (5'-UTR), valori di sensibilità diversi sono rilevabili non solo tra kit commerciali di differenti fornitori, ma anche all'interno dello stesso kit nel confronto ad es. dei diversi genotipi del virus BVD; il problema è evidente in particolare verso ceppi di BVD3, che in PCR real-time gruppo BVDV - specifiche evidenziano un livello di reattività mediamente più debole, che per alcuni kit può risultare anche in un esito di falsa negatività, mentre i risultati sono migliori con PCR disegnate ad hoc per genotipo 3 (Bauer mann et al. - 2013; Bauer mann et al., 2014)
- Immunità passiva nei soggetti immunotolleranti: l'immunità passiva, anche in considerazione dell'elevata quantità di anticorpi assunti per via colostrale da una madre iperimmunizzata durante la gravidanza,

interferisce a livello sia di prove ELISA (per effetto del legame diretto fra anticorpi e proteina virale target del test ELISA) sia anche di prove PCR, posto che nel momento dell'assunzione del colostro si ha un calo drammatico dei leucociti infetti circolanti nel sangue (Fux e Wolf, 2012)

- ✓ Per quanto riguarda i test ELISA, le prove ACE rivolte verso NS2-3 sono nettamente più sensibili, rispetto a E<sup>rns</sup>, all'interferenza degli anticorpi materni sia nel sangue che nel tessuto auricolare, tanto da sconsigliarne l'impiego a livello diagnostico; le prove E<sup>rns</sup> risultano meno inibite nel caso della matrice tessuto auricolare (dove esiti di falsa negatività sono segnalati nell'ordine del 3-5%) rispetto alla matrice sangue, dove tali esiti sono meno infrequenti, sebbene limitati alle prime due settimane di vita del vitello (Fux e Wolf, 2012)
- ✓ Per quanto riguarda le prove PCR, l'effetto di inibizione è più marcato nel siero rispetto ai leucociti purificati, mentre è assente nel tessuto auricolare, dove manca il fenomeno di rimozione delle cellule infette che si rileva invece nel sangue (Fux e Wolf, 2012)

Il piano vigente in Germania indica che, nei primi 40 giorni di vita, l'analisi PCR di siero di sangue / leucociti va fatta su animale singolo, non in pool, mentre non si applicano restrizioni alle analisi su tessuto auricolare ed organi sia in ELISA E<sup>rns</sup> che in PCR (Schirrneier, 2014)

- Fluttuazioni del livello della viremia in soggetti immunotolleranti: sono riportate nel tempo fluttuazioni della viremia che possono talora portare ad esiti (transitori) di falsa negatività nelle prove su siero di sangue condotte tramite isolamento virale (Brock et al. 1998) oppure ELISA ACE NS2-3 (Cavirani, comunicazione personale). Nella pratica, sono descritti animali immunotolleranti sfuggiti ai controlli in ingresso ed in quarantena in un centro genetico (Brianzi et al., 2003) che possono essere attribuiti a questa circostanza. Brock et al. (1998) evidenziano tali fluttuazioni in concomitanza allo sviluppo di anticorpi neutralizzanti in animali che comunque mantengono un'infezione attiva, dimostrata dalla positività virologica dei loro leucociti; è quindi probabile che con i metodi più sensibili (PCR, ELISA ACE E<sup>rns</sup>) attualmente disponibili si riesca a restare sempre sopra la soglia di positività. Fluttuazioni transitorie della viremia, ma questa volta senza la comparsa di anticorpi neutralizzanti, sono descritte anche a seguito di vaccinazione con vaccino inattivato, tali comunque da non compromettere l'esito positivo dell'ELISA ACE E<sup>rns</sup> (Taddei et al., 2013)

#### 4. Cause di errore nella diagnosi sierologica

A prescindere dai limiti di sensibilità e specificità ineliminabili per qualsiasi prova diagnostica, esistono comunque delle circostanze specifiche che portano a

risultati errati in campo sierologico e che vanno specificatamente citati

- Esiti di falsa positività:
  - ✓ Infezione da Border disease: il bovino è recettivo all'infezione da Border disease e risponde a livello sierologico, anche a livello di anticorpi strutturali, ed è quindi possibile che la comparsa inattesa di anticorpi BVDV possa dipendere dal contatto (ad es. al peggio) fra bovini e pecore infette da Border disease (Braun et al., 2013); è peraltro dimostrata anche la possibilità di trasmissione tra bovini, in assenza di pecore, con la creazione di feti persistentemente affetti da BDV (Braun et al., 2015)
  - ✓ Prove su latte di massa: è evidente che, a prescindere da possibili interferenze dovute alle vaccinazioni (più evidenti nel caso dell'impiego di ELISA per anticorpi strutturali), se un esito negativo per anticorpi del latte di massa è indicativo di assenza di circolazione virale, al tempo stesso un esito positivo non necessariamente indica la presenza di una circolazione virale recente, riflettendo tale esito il quadro immunologico degli animali con età superiore a due anni (Houe et al. 2006 - Booth e Brownlie, 2016)
  - ✓ Nei soggetto immunotolleranti:
    - Anticorpi passivi: i soggetti persistentemente infetti non sono in grado di produrre anticorpi nei confronti del ceppo ncp responsabile della loro condizione di immunotolleranza, e quindi, in linea generale, verso tutti i ceppi ad esso omologhi; tuttavia, al momento della nascita, assumono per via colostrale notevoli quantità di anticorpi da una madre che è stata da loro stessi iperimmunizzata durante la gravidanza; questi anticorpi sono in teoria destinati ad un decadimento più rapido dei canonici sei mesi, per effetto della costante presenza di virus nel sangue, ma -rilevato assai curioso- tale decadimento è più rapido per gli anticorpi strutturali (scompaiono dopo 60-90 gg alla prova di SN), mentre quelli non strutturali sono rilevabili fino a 6 mesi (Fux e Wolf, 2012), con la conseguenza pratica che si crea un periodo nel quale l'animale risulta positivo solo per anticorpi non strutturali
    - Infezione da ceppi eterologhi: in questi casi non si sviluppa necessariamente il quadro clinico della malattia delle mucose; si può rilevare invece una risposta anticorpale

verso gli epitopi non condivisi del ceppo eterologo, testimoniata dallo sviluppo di anticorpi neutralizzanti ed osservata in seguito a vaccinazione (Bolin, 1988) o anche spontaneamente (Brock et al., 1998)

- Esiti di falsa negatività
  - ✓ Variabilità antigenica dei ceppi di virus BVD (anche all'interno del medesimo genotipo): tale variabilità si riflette sulla sierologia per anticorpi strutturali (ed in particolare la prova di SN), come chiaramente documentato dai dati pubblicati da Hamers et al. (2000b), Cavarani et al. (2006), Alpay e Yesilbag (2015); in pratica, gli anticorpi strutturali possono risultare a titolo inferiore se il virus usato nella prova sierologica (i ceppi usati per la prova di SN spesso appartengono al subgenotipo BVDV1a) è diverso da quello responsabile dell'infezione, cosa non infrequente in Italia essendo il subgenotipo 1a scarsamente diffuso (Luzzago et al., 2014); lo stesso si verifica in modo più pesante negli animali vaccinati, i cui titoli sono inferiori rispetto a quelli infetti: è quindi più facile avere nei bovini vaccinati risultati di completa negatività, come dimostrato nel caso di bovini inoculati con vaccini basati sul genotipo 1b e testati in SN con un ceppo 1a (Pisoni et al. 2016)
- Prove su latte di massa:
  - ✓ è possibile, per quanto occasionale, l'eventualità di esiti falsamente negativi in aziende dove il capo immunotollerante è comparso recentemente (Houe et al., 2006); in questi casi ovviamente una separazione fisica fra giovani animali da rimonta e vacche in produzione rallenta l'infezione fra queste ultime (Booth e Brownlie, 2016)
  - ✓ è segnalata, in aziende molto piccole con soggetti immunotolleranti in lattazione, una possibile riduzione degli anticorpi misurabili nel latte di massa per effetto delle abbondanti quantità di virus in esso immesse col latte della vacca persistentemente infetta (Sandvik et al., 2001 - Straub, 2005); si tratta peraltro ed evidentemente di situazioni limite eccezionali



## 8.Epidemiologia

## 8. Epidemiologia

L'infezione viene tipicamente innescata dal contatto diretto di animali naïve, sieronegativi, con soggetti persistentemente infetti, che rappresentano il principale veicolo di diffusione del virus: le vie tipiche di ingresso sono rappresentate dalle mucose rino-orofaringee, oppure dalla via venerea. Bovini infetti in modo acuto sono molto meno efficienti nella trasmissione del virus, data la ridotta quantità di virus escreta, in termini sia di concentrazione che di durata temporale rispetto ai soggetti immunotolleranti: pertanto la loro importanza nella diffusione del virus e nella sua persistenza all'interno dei gruppi infetti è limitata (Stahl e Alenius, 2012). Per quanto concerne la trasmissione meccanica, attraverso insetti (mosche che si posano attorno agli occhi di bovini immunotolleranti), attrezzature veterinarie (ad es. aghi) o zootecniche (ad es. pinze nasali) contaminate per contatto con bovini immunotolleranti, oppure semplicemente stabulando animali naïve in box, non puliti e disinfettati, dove prima erano tenuti soggetti immunotolleranti oppure in prossimità, ma non a diretto contatto, di soggetti immunotolleranti, in linea generale è dimostrata la possibilità di trasmissione meccanica del virus (Tarry et al., 1991 - Gunn, 1993 - Niskanen e Lindberg, 2003): tuttavia, in termini probabilistici, si tratta di eventi molto meno frequenti, che di fatto si azzerano nel momento in cui si eliminano i capi persistentemente infetti, i quali sono gli unici (a causa della costante presenza e dell'elevato titolo del virus BVDV nel sangue e nelle loro escrezioni) in grado di contaminare insetti/attrezzature da un livello tale da renderli contagiosi.

Per quanto riguarda il seme bovino per FA, il rischio più elevato è rappresentato dal seme di tori immunotolleranti, per la durata (permanente) ed il livello di escrezione (assai elevato) del virus BVDV, che rendono questo materiale estremamente infettante (McGowern e Kirkland, 1995). In seconda battuta, il seme dei tori immunocompetenti con infezione testicolare persistente (Newcomer et al. 2014) risulta capace, almeno occasionalmente, di trasmettere l'infezione. Va peraltro precisato che le norme attualmente in vigore nella UE rendono questi eventi altamente improbabili, per la tipologia dei controlli previsti dalla legge (direttiva 88/407), che ha come scopo di escludere dalla raccolta di seme i tori immunotolleranti e quelli, immunocompetenti, con infezione testicolare.

Per quanto riguarda l'embryo transfer, le informazioni disponibili non sono del tutto concordi; per la precisione:

- embrioni raccolti da bovina PI, trapiantati in vacche sieropositive, hanno portato alla nascita di vitelli normali (in altre parole: gli embrioni non "nascono" immunotolleranti - Brock et al., 1997)
- la zona pellucida degli oociti/embrioni, se integra, non consente la penetrazione del virus BVDV nell'oocita/embrione

- embrioni prodotti in vivo da vacche sottoposte a superovulazione e fecondate con seme infetto risultano in parte infetti, anche dopo lavaggio, ma non trasmettono il virus alle vacche riceventi (Bielanski et al., 2013)
- embrioni prodotti in vitro, esposti a ceppi diversi di virus BVDV ncp e quindi sottoposti a lavaggio evidenziano da un lato una diversa efficienza di adesione dei ceppi alla zona pellucida degli embrioni stessi, dall'altro la capacità di trasmettere l'infezione, almeno in alcuni casi, alle bovine riceventi, senza tuttavia produrre vitelli immunotolleranti (Bielanski et al., 2009)

In conclusione, quantomeno per gli embrioni prodotti in vivo, resta valido quanto scritto nel manuale dell'International Embryo Transfer Society, ovvero che:

- il virus BVDV è classificato tra gli agenti di categoria 3, ovvero agenti per i quali i dati scientifici preliminari fin qui raccolti indicano che il rischio di trasmissione tramite gli embrioni è trascurabile, purché gli embrioni stessi siano stati trattati secondo le procedure IETS
- sono tuttavia necessarie ulteriori prove sperimentali per confermare questi risultati preliminari

I milioni di embryo transfer eseguiti negli anni a livello mondiale permettono in ogni caso di considerare tale pratica come sufficientemente sicura.

Per quanto concerne invece gli embrioni prodotti in vitro, il rischio appare almeno a livello teorico più rilevante, anche se, pure in questo caso, l'elevato numero di embrioni trapiantati annualmente nel mondo (dell'ordine di svariate centinaia di migliaia, con trend temporale in crescita - Galli et al., 2014) è tale per cui eventuali rischi di natura infettiva riferiti alla BVD sarebbero emersi.

Resta infine la possibilità (oggi alquanto teorica, ma in passato di fatti concretizzatasi - Falcone et al., 1999), di introdurre ceppi ncp tramite vaccini attenuati contaminati: il virus BVDV è infatti il principale agente biologico contaminante dei lotti di siero fetale bovino che possono essere impiegati per la coltivazione delle linee cellulari impiegate per la produzione di vaccini virali. Si tratta di un'eventualità peraltro riscontrata anche in vaccini attenuati ad uso umano, con quindi possibili risvolti zoonosici. E' chiaro che le esperienze passate hanno portato alla messa in campo di una serie di controlli in fase di produzione volti ad escludere questa possibilità, ma:

- i bassi livelli di contaminazione che si possono avere nei lotti di siero fetale
- il fatto che i controlli sono giocoforza effettuati su una campionatura del lotto
- i test impiegati potrebbero essere non perfettamente validati verso ceppi BVDV divergenti rispetto a quelli storici (ovvero genotipo 1 - 2), come ad es. il genotipo 3, non di rado identificato come contaminante del siero fetale
- sono tutte situazioni che portano a non declassificare completamente il potenziale rischio connesso all'impiego di vaccini virali attenuati (Giangaspero, 2013)





9. Profilassi diretta

## 9. Profilassi diretta

Da quanto esposto nel capitolo dedicato all'epidemiologia, con particolare riguardo ai meccanismi attraverso i quali il virus BVDV può entrare in una stalla indenne, è possibile definire una scala di rischio (sintetizzata nella tabella n. 1), sulla base della quale impostare misure di profilassi diretta proporzionalmente adeguate.

### 1. *Introduzione in azienda di bovini immunotolleranti*

Il primo e più importante fattore di rischio è rappresentato dall'introduzione in azienda di bovini persistentemente infetti, evento che può concretizzarsi tipicamente attraverso tre fattispecie, ovvero:

- acquisto di animali persistentemente infetti
- acquisto di bovine immunocompetenti gravide, con feto persistentemente infetto (le cosiddette "trojan cows")
- movimentazione verso l'esterno di proprie bovine gravide naïve, destinate poi a rientrare in azienda (tipicamente: alpeggio)

Per quanto concerne il rischio di acquistare animali persistentemente infetti, la disponibilità di un precedente esame virologico con esito negativo (ad es. test della cartilagine auricolare alla nascita) o, se assente, la programmazione di questa prova prima della movimentazione del capo sono misure che consentono di ricondurre il rischio a livelli trascurabili.

Per quanto riguarda l'acquisto di bovine gravide con feto persistentemente infetti, è stata pubblicata la possibilità di identificare tali animali (o quanto meno di sospettarla) sulla base della misura del titolo anticorpale della bovina gravida, partendo dal presupposto che la presenza di un feto immunotollerante esercita un energico stimolo immunitario, che porta tali titoli a livelli assai elevati (Brownlie et al., 1998 - Lindberg et al, 2001). Trattandosi di un approccio probabilistico, e non di certezza, è più ragionevole affidarsi piuttosto all'acquisto di animali, ancorché sieropositivi, in aziende con comprovata assenza di circolazione virale recente, unito al test virologico (possibilmente su sangue precolostrale, per evitare rischi di falsa negatività - v. capitolo sulla diagnosi) sul vitello nato da madri sieropositive. Ancora più sicura (ma meno praticabile) sarebbe la separazione di questi animali dall'effettivo della stalla fino al parto. Recentemente è stata segnalata, nel sangue di vacche gravide con feto immunotollerante, la presenza di marcatori genetici, che potrebbero un domani essere utilizzati come strumento diagnostico per identificare le "trojan cows" (Hansen et al., 2010).

Per quanto riguarda infine la movimentazione di bovine verso/dall'alpeggio,

Tabella 1. Fattori di rischio relativi all'introduzione del virus BVD in azienda

Rischio	Fattori di rischio	Misure di controllo proposte per ridurre il rischio
Acquisto di animali	acquisto di animale infetto in modo persistente bovina gravida con feto infetto in modo persistente acquisto di animale infetto in modo persistente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• acquisto di animali virus-negativi (vale qualsiasi esito, a prescindere dalla data di esecuzione del test)</li> <li>• acquisto di animali gravidi sieronegativi; in subordine, separazione del capo fino al parto ed esame virologico sul vitello al momento del parto</li> <li>• acquisto da allevamenti certificati</li> <li>• no transito degli animali attraverso stalle di sosta</li> </ul>
Contatto al pascolo	contatto tra animali giovani infetti in modo persistente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• accesso al pascolo consentito ai soli capi virus-negativi (vale qualsiasi esito, a prescindere dalla data di esecuzione del test) e (nella misura del possibile) ai capi gravidi anticorpi-negativi</li> <li>• separazione al pascolo da altri gruppi di animali a stato sanitario ignoto</li> <li>• esame virologico sul vitello nato da madre condotta al pascolo</li> </ul> <p><b>NB</b> nella pratica il rischio connesso al pascolo risulta significativo</p>
Visitatori professionali	impiego di indumenti/strumenti contaminati	<ul style="list-style-type: none"> <li>• impiego di materiale monouso o dedicato (impiegato cioè solo in un'azienda)</li> <li>• ove non possibile, disinfezione degli strumenti</li> </ul> <p><b>NB</b> il virus BVD è sensibile verso tutti i più comuni disinfettanti</p>
Veicoli	contatto con animali persistentemente infetti di altre stalle caricati sui veicoli	<ul style="list-style-type: none"> <li>• i veicoli devono sostare all'esterno dell'allevamento</li> </ul>
Seme ed embrioni	Acquisto di seme prodotto da: <ul style="list-style-type: none"> <li>• tori infetti in modo persistente</li> <li>• tori con infezione testicolare persistente</li> <li>• embrioni prodotti da bocine infette in modo persistente/acuto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• acquisto di seme prodotto da tori controllati secondo la vigente normativa UE</li> <li>• trattamento con tripsina degli embrioni</li> <li>• utilizzo di reagenti virus-negativi per manipolazione embrioni</li> </ul> <p><b>NB</b> la normativa sui centri FA rende praticamente nullo il rischio di commercializzare seme infetto</p>
Vaccini	lotti di vaccini vivi contaminati da virus BVDV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• non sono proponibili misure particolari, se non l'affidabilità del produttore</li> </ul>

si tratta di una situazione alquanto problematica da gestire, trattandosi di una tradizione storicamente consolidata per gli animali allevati in un ambiente alpino, e che altrettanto storicamente porta spesso a situazioni di promiscuità, essendo molte malghe gestite a livello comunale e non di singolo allevatore. Questo rischio è dimostrato per il virus BVDV (Rossmann et al., 2005 - Siegwart et al., 2006), Ma non solo: è dimostrata l'importanza delle malghe come punto di trasmissione del virus della Border Disease fra i piccoli ruminanti (Krametter-Froetscher et al. 2007), come pure la possibilità che in malga tale virus venga trasmesso ai bovini a contatto (Braun et al., 2013), con la possibilità:

- non solo di indurre di anticorpi che potrebbero portare a conclusioni diagnostiche errate
- ma anche di portare alla nascita di vitelli persistentemente infetti dal virus della Border Disease (Braun et al., 2015), anche se la reale importanza di questo evento nelle condizioni pratiche deve essere valutata

Per le malghe promiscue l'unica misura che appare attuabile è solo *ex post*, ovvero il controllo virologico dei vitelli partoriti dalle bovine ospitate in malga.

## 2. *Introduzione in azienda di bovini infetti in modo acuto*

Il rischio in questo caso è di gran lunga inferiore, perché è nota la scarsa contagiosità di questi animali, sia per la brevità del periodo di escrezione virale sia per la bassa concentrazione del virus eliminato (Houe, 1995); solo nel caso in cui, sfortunatamente, il bovino infetto riesca a trasmettere il virus ad una vacca gravida nella prima metà della gravidanza si avrà (al momento del parto del vitello immunotollerante) la comparsa dell'infezione in azienda.

A livello di misure di controllo, la sierologia è di fatto inutile, perché:

- gli animali naïve con infezione acuta sono di regola sieronegativi (la sieroconversione avviene successivamente)
- gli animali sieropositivi possono comunque andare incontro ad infezioni acute sostenute da ceppi antigenicamente diversi rispetto a quello verso cui sono immunizzati

La virologia su un campione di sangue è indicativa (se positiva), ma in caso di esito negativo nulla può garantire rispetto a quello che succede dopo l'esecuzione del prelievo: quindi il bovino testato oggi negativo e spostato fra una settimana potrà infettarsi in questo periodo di tempo successivo all'analisi, magari durante il trasporto stesso (se ad es. giunge a contatto con soggetti persistentemente infetti). Sotto questo profilo, l'acquisto di animali in aziende

con comprovata assenza di circolazione virale tempo ed un trasporto dedicato sono garanzie efficaci.

La pratica della quarantena all'arrivo in azienda è per questa fattispecie, data la brevità dell'infezione acuta, la misura di sicuro più efficace per azzerare il rischio

3. *Ingresso di personale esterno*

L'attenzione principale va in questo caso rivolta al personale veterinario o altro personale incaricato di trattamenti veterinari (inoculazione di farmaci/vaccini) oppure operazioni potenzialmente cruente sugli animali (ad es. pareggio unghie). L'uso di dispositivi usa-e-getta e di indumenti dedicati (ad es. stivali forniti dalla stalla e non di proprietà degli operatori), l'accurata disinfezione delle attrezzature, il divieto di riciclare flaconi con residui di farmaci/vaccini tra aziende diverse e l'adozione - per quanto possibile - di norme comportamentali da parte degli operatori (ad es. riservare alle aziende infette da BVDV la parte finale della propria giornata di lavoro) sono nel loro insieme misure applicabili ed al tempo stesso tali da ricondurre il rischio ad un livello ragionevole

4. *Uso di vaccini attenuati*

Relativamente a questa pratica veterinaria non è evidentemente possibile impostare alcuna misura di profilassi diretta, se non fidarsi dell'attenzione che la ditta produttrice riserva alla prevenzione delle contaminazioni accidentali con virus BVDV.

5. *Pratiche di embryo transfer – FA*

Sulla base di quanto precedentemente esposto, e tenuto conto della cornice normativa che regola tali pratiche e ne definisce i requisiti sanitari (v. capitolo sulla legislazione), il rischio di introduzione del virus BVDV tramite queste vie è trascurabile.

Un discorso a parte va dedicato al ruolo di altre specie animali quali fonti di contagio per il bovino: prescindendo dalla segnalazione della presenza di soggetti immunotolleranti nel cervo dalla coda bianca, nel cervo mulo, nel tragulo di Giava e nell'alpaca (animali esotici), il discorso si fa molto più interessante per pecore (Paton et al., 2007), capre (Bachofen et al., 2013) e bufali (Craig et al., 2015), dove è stata dimostrata la possibilità di avere soggetti persistentemente infetti da virus BVD. Per quanto riguarda il bufalo, la segnalazione è assai recente e nulla è descritto in merito alla possibilità di trasmettere il virus ai bovini. Per quanto riguarda le pecore e le capre, i dati di campo ottenuti dal piano di profilassi della provincia di Bolzano (area nella quale è frequente la coabitazione stretta fra bovini e piccoli ruminanti), il quale piano non prende in considerazione specie diverse da bovino, non evidenzia una circolazione virale autonoma di virus BVDV nei piccoli ruminanti allevati in aziende infette, successivamente alla rimozione dei capi immunotolleranti: non si conferma quindi un loro ruolo

significativo come serbatoio di infezione (Tavella et al. 2007). Nel caso specifico delle capre, l'ipovitalità dei soggetti persistentemente infetti da BVD potrebbe concorrere a spiegare tale risultato (Bachofen et al, 2013)

A  
VI

E' fortemente raccomandato l'esame virologico sui vitelli nati da madri acquistate da altre aziende / rientrate da periodo in malga mentre erano nella prima metà della gravidanza



10.Profilassi indiretta

## 10. Proflassi indiretta

L'utilizzo della proflassi vaccinale appartiene ormai alla storia della malattia: i primi vaccini attenuati vennero impiegati infatti negli anni '60, utilizzando uno stipite cp passato serialmente su colture cellulari (ceppo "Oregon" - Goens et al., 2002), appartenente al subgenotipo BVDV1a ed attualmente ancora impiegato in un vaccino attenuato monovalente. Da allora la situazione in campo vaccinologico si è evoluta, ed oggi sono disponibili vaccini sia inattivati che attenuati, in forma mono - o polivalente, costruiti con ceppi cp o ncp appartenenti al genotipo 1 o 2. Da sottolineare che a livello europeo la valenza 2 è stata inclusa solo a partire dal 2015. Ad oggi non esistono né vaccini contenenti il genotipo 3 né vaccini che permettono un approccio DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) basato sull'impiego di ceppi deleti (non esistenti nel caso del virus BVDV). Tuttavia un approccio DIVA basato sulla risposta verso le proteine non strutturali del virus BVDV (nel caso specifico: NS2-3) è possibile a certe condizioni, come descritto più estesamente in seguito.

Relativamente ai vaccini BVD, esistono alcune regole di carattere generale che vanno attentamente considerate al fine di poter impostare correttamente un piano di proflassi indiretta.

1. *Esistono due distinti livelli di protezione, ovvero protezione dalla forma clinica (riferita al soggetto vaccinato) e protezione fetale (riferita alla possibilità di trasmissione verticale del virus al feto durante i primi quattro mesi di gravidanza)*

In linea generale, ad un vaccino BVD vengono richieste due diverse protezioni

- Protezione clinica, ovvero protezione dai sintomi legati all'infezione acuta, quali
  - ✓ Sintomi dovuti all'infezione *per se*
  - ✓ Sintomi dovuti all'immunodepressione (comparsa di patologie concorrenti o esacerbazione di quelle preesistenti)
  - ✓ Sintomi dovuti alla trombocitopenia (nel caso dei ceppi trombocitopenici)
- Protezione fetale, ovvero, nella vacca gravida, blocco della trasmissione verticale al feto

Il primo tipo di protezione è sufficiente nel caso degli allevamenti da ingrasso, mentre negli allevamenti da riproduzione bisogna garantire anche la protezione fetale, in modo da interrompere la catena epidemiologica di trasmissione del virus. Da un punto di vista storico, i vaccini BVD nascono per garantire la protezione clinica, solo nell'ultimo ventennio si è avuto un forte aumento

dell'attenzione sul problema della protezione fetale, come dimostra il fatto che molti dei vaccini "storici" sono inefficaci o solo parzialmente protettivi da questo punto di vista (Kelling, 2004). Il potere immunogeno necessario per ottenere la protezione fetale è superiore a quello richiesto per la protezione clinica, e quindi le vecchie procedure di registrazione dei vaccini, basate su prove di protezione clinica, hanno portato alla registrazione di vaccini non necessariamente protettivi a livello fetale (Lindberg et al., 2006)

A puro titolo esemplificativo, vengono riportati di dati di alcuni dei molti lavori scientifici pubblicati sull'argomento:

- Patel et al., 2002: prova condotta con vaccino inattivato monovalente (BVD1a); vaccinazione + richiamo, challenge 6 mesi dopo la prima vaccinazione per contatto con bovini PI per 40 giorni (ceppo BVD1); protezione fetale del 100%
- Zimmer et al., 2002: prova condotta in parallelo con due vaccini inattivati, il primo contenente un ceppo BVD1 cp + 1 ceppo Border Disease ncp, il secondo invece con un ceppo BVD1 cp + 1 ceppo BVD1 ncp; vaccinazione + richiamo; challenge 5 mesi dopo il completamento del ciclo vaccinale per inoculazione endonasale con miscela 3 ceppi BVD1b; protezione fetale rispettivamente del 78% e del 60%
- Meyer et al., 2012: prova condotta con vaccino attenuato monovalente (BVD1a), singola vaccinazione, challenge dopo 4 mesi per inoculazione endonasale con ceppo BVD1f; protezione fetale 100%

Da questa brevissima esemplificazione emergono una serie di difficoltà che possono ostacolare una corretta comparazione dei dati, ovvero:

- Scelta dei ceppi da utilizzare nella prova di challenge (rispetto al ceppo presente nel vaccino)
- Scelta del modo di esecuzione del challenge
  - ✓ Esposizione puntuale degli animali vaccinati (ad es. mediante inoculazione endonasale)
  - ✓ Esposizione prolungata degli animali vaccinati (contatto con capi PI): procedura simile alle condizioni naturali e (probabilmente) più severa (per altre malattie è stato dimostrato che il challenge con animali infetti è più severo di una singola inoculazione puntuale)
- Scelta del tempo di esecuzione del challenge (specialmente nel caso di protocolli vaccinali basati su richiamo annuale)

Un recente studio di metanalisi (Newcomer et al., 2015), che prende in consi-

derazione oltre 40 lavori che descrivono prove di protezione fetale, porta ad evidenziare che

- Una maggiore protezione fetale si ottiene in caso di challenge con ceppo omologo
- I vaccini inattivati, in linea generale, riducono il rischio di trasmissione verticale al feto rispetto ad animai vaccinati, ma i vaccini vivi garantiscono una protezione fetale superiore

Da sottolineare il fatto che nella maggioranza delle prove citata da Newcomer et al. (2015) non si è raggiunta una protezione del 100%, e che comunque questi valori di protezione, ottenuti in condizioni sperimentali, vanno poi rivalutati nelle condizioni di campo, dove sono destinati ad essere inferiori.

In conclusione, appare ragionevole riportare quanto affermato da Stahl e Aleenius (2012), ovvero che *"Parecchie prove di challenge dimostrano che (alcuni - NdT) vaccini vivi o inattivati possono prevenire l'infezione sperimentale in condizioni sperimentali controllate - Si discute tuttavia sull'efficacia di questi vaccini nel proteggere i feti dall'infezione BVD in condizioni di campo - Il dubbio di cui sopra è supportato da osservazioni di campo, che riportano la nascita di vitelli PI in gruppi vaccinati - Tali osservazioni si spiegano in parte con il timore, spesso sollevato, che la vaccinazione possa creare un falso senso di sicurezza, che crei delle falle nelle misure di biosicurezza". In parole povere: i vaccini (ed alcuni più di altri) aiutano, ma sorprese sono sempre possibili, né si possono mai dimenticare le norme di profilassi diretta*

2. *Per il vaccino il nemico più difficile da sconfiggere è rappresentato dalla variabilità antigenica dei ceppi di virus BVD*

Questa affermazione è comprovata dall'esperienza della comparsa di sintomatologia clinica riferibile a BVD e/o di soggetti persistentemente infetti all'interno di gruppi di bovini vaccinati correttamente (Chase et al. 2004 - Stahl e Aleenius, 2012). Questo problema va al di là della diversità genotipica del virus BVD, nel senso che anche restando all'interno del genotipo 1 è segnalata un'ampia variabilità, testimoniata dalla comparsa di nuovi subgenotipi (Giammarioli et al. 2015), anch'essi talvolta isolati anche all'interno di gruppi correttamente vaccinati (Rossi et al., 2013) con vaccini basati sul genotipo BVDV1 e con claim di protezione fetale (dati personali non pubblicati)

3. *E' possibile, a certe condizioni, un approccio DIVA con i vaccini inattivati a livello di gruppo*

Un approccio DIVA è descritto per almeno un vaccino inattivato (Graham et al., 2003, Makoschey et al., 2007 - Alvares et al., 2012), basandosi sul principio che tale vaccino ha un ridotto contenuto di una specifica frazione antigenica (proteina non strutturale NS2-3). Questo ridotto contenuto è conseguenza del-

la procedura di concentrazione che si rende necessaria per conferire ai vaccini inattivati un adeguato potere immunogeno: tale potere è tipicamente legato alle proteine strutturali del virus, presenti nel capsido virale, con dimensioni assai più grandi di una proteina non strutturale. Quindi, una procedura di concentrazione basata ad es. sull'ultrafiltrazione, mentre trattiene i grossi capsidi virali, lascia passare le piccole proteine non strutturali. Ne consegue che la ricerca degli anticorpi specifici verso la proteina NS2-3, possibile con comuni kit ELISA commerciali, nei soggetti vaccinati con vaccini inattivati possa risultare negativa, a patto che il vaccino sia stato adeguatamente purificato. Si tratta in sostanza di un approccio del tutto equivalente a quello utilizzato per la vaccinazione contro l'afte epizootica, ma in un contesto decisamente meno regolamentato: infatti, mentre per i vaccini anti-aftosi l'OIE prevede uno specifico percorso autorizzativo, a livello di singolo lotto di produzione, per poter dimostrare (e riportare sul foglietto illustrativo del vaccino) l'assenza di potere immunogeno verso le proteine non strutturali del virus, nel caso dei vaccini BVD nulla è ufficialmente definito (ed in effetti nulla viene tutt'oggi indicato in merito sul foglietto illustrativo del vaccino inattivato citato nei lavori sopra citati). Una notevole variabilità viene peraltro riportata tra vaccini e tra kit ELISA di diversi produttori nella comparsa di anticorpi NS2-3 a seguito di vaccinazione (Raue et al., 2011).

In conclusione, l'approccio DIVA è teoricamente possibile, ma solo a livello di gruppo e purché, nel momento della scelta del vaccino, e quindi sulla base di una trattativa privata tra allevatore/veterinario e produttore del vaccino, siano state acquisite dal produttore adeguate informazioni in merito al potere immunogeno del vaccino stesso nei confronti di NS2-3. In ogni caso tale approccio è tanto più affidabile, quanto minore è il numero delle vaccinazioni subite dagli animali, perché frazione residuale di proteina NS2-3 persiste comunque nel vaccino e vaccinazioni ripetute possono alla fine indurre la comparsa di anticorpi specifici, per quanto a basso titolo e per un periodo transitorio (Alvarez et al., 2012)

4. *L'approccio DIVA in linea generale è possibile solo con i vaccini inattivati, ma è possibile disegnare piani vaccinali (negli allevamenti da riproduzione) anche con vaccini non-DIVA (attenuati) che comunque consentano la valutazione della circolazione virale nel gruppo*

In linea di principio, i vaccini vivi attenuati, dovendo moltiplicarsi nell'animale per stimolare una risposta immunitaria, esprimono la proteina NS2-3 e quindi inducono anche anticorpi di tipo non strutturale, con ciò impedendo l'approccio DIVA utilizzato per i vaccini spenti. A questa regola si contrappone una rilevante eccezione, ovvero l'impiego di vaccini vivi basati sul ceppo termosensibile RIT4350: si tratta di un vaccino particolare, nel senso che, pur basato su un ceppo termosensibile, viene comunque somministrato per via intramuscolare,

ed è caratterizzato dal fatto di non indurre anticorpi non strutturali verso NS2-3, almeno in animali che hanno subito un ridotto numero di vaccinazioni (Pisoni et al., 2016). Tuttavia i vaccini basati su questo ceppo non godono del claim della protezione fetale: e questo è un limite da tenere presente, posto che il punto fondamentale della profilassi vaccinale, nell'allevamento bovino da riproduzione, sta nell'assicurare la protezione fetale.

Dato questo presupposto, è ragionevole posticipare l'inizio delle vaccinazioni verso il primo anno di vita, in modo da un lato di garantire la massima copertura immunitaria al momento della prima fecondazione e dall'altro di disporre di una quota di animali giovani (6 – 10 mesi d'età) da usare come sentinelle in grado di segnalare (a livello sierologico) un'eventuale circolazione virale. Una vaccinazione anticipata ad animali più giovani sarebbe giustificata solo nel caso in cui si dovesse dare una protezione clinica a fronte di una possibile infezione da ceppi ad alta virulenza: cosa che, nelle condizioni pratiche dei nostri allevamenti, è più l'eccezione che la regola

5. *Nella realtà zootecnica vi è uno scarso livello di consapevolezza riguardo allo strumento vaccinale*

Sono frequenti situazioni di piani vaccinali in cui non è rispettata la tempistica, oppure basati (in allevamenti da riproduzione) su vaccini dei quali è nota l'ineadeguata protezione fetale, oppure dove la vaccinazione è (inutilmente) iniziata in età molto giovane, ancora in presenza di anticorpi colostrali e senza un'adeguata valutazione della necessità o meno di proteggere anche gli animali molto giovani.

Nella realtà del bovino da carne, un'indagine condotta recentemente nella regione Veneto ha evidenziato una diffusione a macchia di leopardo della vaccinazione BVD, anche qui con piani a volte alquanto personalizzati, in una realtà zootecnica dove sicuramente:

- la presenza di capi immunotolleranti è di gran lunga più probabile rispetto all'allevamento da riproduzione
- l'effetto di immunodepressione indotta da BVDV ha modo di esprimersi al meglio in una situazione di assembramento di animali spesso stressati e con origini le più variegata

6. *Criteri generali per la scelta del vaccino*

In linea generale (per una review si veda Newcomer e Givens, 2013), e conformemente alle regole della vaccinologia, dal punto di vista dell'efficacia i vaccini attenuati, rispetto a quelli spenti:

- Inducono un livello più elevato di anticorpi neutralizzanti (che sono collegati alla protezione)
- Inducono titoli anticorpali più duraturi nel tempo (Kelling, 2004)

- Sono associati a migliori percentuali di protezione fetale (Newcomer, 2015); va peraltro aggiunto che comunque esistono vaccini inattivati in grado di conferire protezione fetale (Paton et al., 2002) e che riportano tale claim sul foglietto illustrativo
- Stimolano l'immunità cellulo-mediata
- Conferiscono la protezione più rapidamente, anche dopo un solo intervento vaccinale (mentre per gli spenti vale la regola della doppia inoculazione a distanza generalmente di 4 settimane): ciò può essere interessante specialmente nella realtà del bovino da carne, dove l'assemblamento di gruppi eterogenei ed il loro spostamento rende molto utile il rapido sviluppo di una copertura immunitaria

Da un punto di vista pratico, con i vaccini attenuati quindi è spesso sufficiente una sola inoculazione iniziale con richiamo annuale, mentre gli inattivati, per garantire un adeguato livello di protezione, ne sono necessarie due iniziali + richiamo semestrale.

Come regola altrettanto generale, in termini di innocuità i vaccini spenti danno garanzie superiori. Ai vaccini attenuati, relativamente all'innocuità, sono stati mossi principalmente tre addebiti:

- In passato a questi vaccini (di norma prodotti con ceppi cp) fu addebitata la nascita di vitelli immunotolleranti, per effetto di un'ipotizzata contaminazione da ceppi ncp (Lindberg et al., 2006), ascrivibile non solo a lotti di siero fetale infetto, ma anche al fatto che alla base di ogni ceppo cp sta un ceppo ncp "genitore" che si co-riproduce col ceppo cp: le matrici virali usate per la produzione del vaccino vanno quindi attentamente esaminate al fine di separare/verificare l'assenza del ceppo ncp "genitore". Si tratta di problemi attualmente risolti, tant'è vero che oggi esistono vaccini basati su ceppi cp che possono essere somministrati anche durante il periodo a rischio della gravidanza. Recentemente è stato licenziato un vaccino vivo contenente due ceppi ncp (BVDV1 + BVDV2), modificati a livello di due diverse proteine: ciò li rende incapaci di trasmettersi per via verticale e di indurre infezione persistente nel feto, pur mantenendo un potere abortigeno nel caso di inoculazione endouterina (Meyers et al., 2007): è quindi possibile l'uso in gravidanza, peraltro suggerito solo in caso di necessità ed a condizioni particolari
- È descritta la possibilità (per i vaccini basati su ceppi cp) di indurre la malattia delle mucose nei capi immunotolleranti, tanto più probabile quanto più omologo è il ceppo vaccinale rispetto a quello ncp dell'animale infetto

- In corrispondenza della viremia da virus vaccinale attenuato è talvolta riportata una transitoria leucopenia, che, almeno in casi particolari (animali defedati ecc.) potrebbe tradursi in comparsa di sintomatologia; si tratta di un rilievo peraltro aneddotico, molte volte non confermato da chi nel campo concretamente utilizza i vaccini vivi

In merito alla composizione del vaccino rispetto alla variabilità dei ceppi BVDV circolanti, fino al 2015 tutti i vaccini in uso in Europa contenevano esclusivamente la valenza BVDV1, fatta eccezione per un vaccino spento, ora ritirato dal commercio, che conteneva anche un ceppo di virus della Border Disease; solo da un anno è disponibile un vaccino BVDV1 + BVDV2. Questo ampliamento dei ceppi è spiegato dal produttore con la necessità di ampliare la copertura immunitaria; al tempo stesso però, dati attestanti la protezione clinica (Chase et al., 2004) e fetale (Moennig et al., 2005) verso BVDV2 ottenuta con vaccini contenenti solo BVDV1 sono pubblicati, anche se, per la protezione fetale, non è chiaro se essa copra l'intero periodo fino al momento del richiamo successivo. Va infine ricordato che all'interno di BVDV1 si rileva una notevole variabilità antigenica, che permette ad alcuni ceppi comunque appartenenti al genotipo 1 di trasmettersi verticalmente al feto anche negli animali vaccinati con lo stesso genotipo. In conclusione: la necessità di un'ampia copertura è evidente, con quale vaccino ottenerla è un po' più difficile da definire

A  
I

Per la scelta del vaccino in allevamenti bovini da riproduzione, è fortemente raccomandata la scelta di prodotti con claim di protezione fetale

A  
VI

Per la definizione del programma vaccinale, è fortemente raccomandata un'impostazione che consenta di disporre di un periodo finestra, in cui i giovani animali non sviluppino anticorpi vaccinali NS2-3, in modo da consentire tale prova come test di screening per la circolazione virale



# 11. Gestione di un piano di risanamento a livello aziendale

# 11. Gestione di un piano di risanamento a livello aziendale

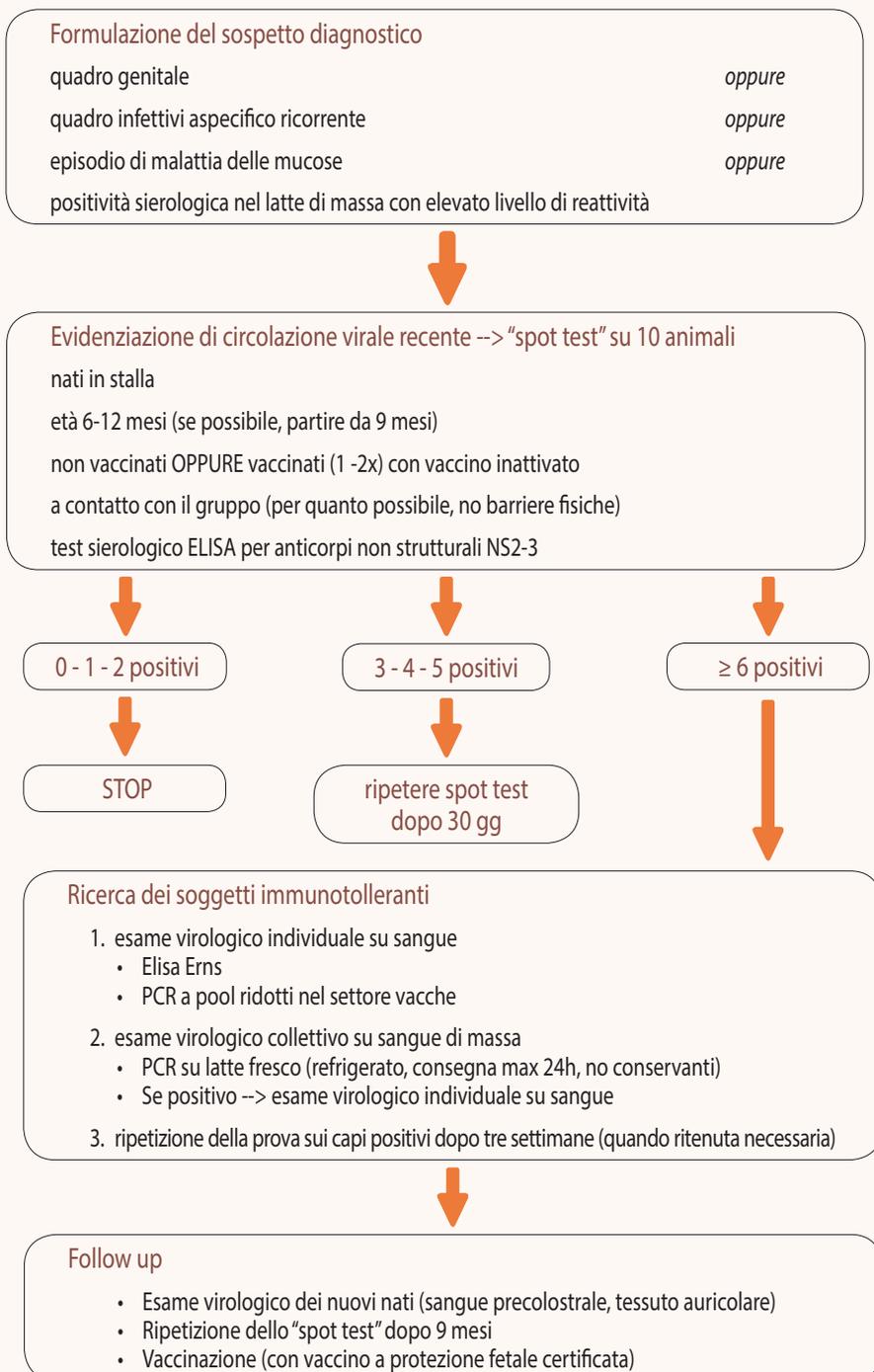
La situazione è sostanzialmente diversa nel caso di allevamenti bovini da carne piuttosto che da latte. Nel caso dell'allevamento da carne, non appare realistico parlare di un piano di controllo vero e proprio, per evidenti motivi di praticità, ma piuttosto di una gestione della malattia basata sul corretto uso dello strumento vaccinale. Nel caso invece dell'allevamento da riproduzione, è necessario seguire un percorso diagnostico impegnativo e prolungato nel tempo (riportato nella tabella n. 2), che si può riassumere nelle fasi seguenti:

## 1. Formulazione del sospetto diagnostico

Premesso che il decorso spesso subdolo della malattia (fatta eccezione per le forme eclatanti, rappresentati dalla malattia delle mucose e, più raramente, dalle forme trombocitopeniche) non semplifica la formulazione di un sospetto diagnostico, le situazioni da tenere in considerazione possono essere le seguenti:

- Quadro genitale (ipofertilità, ritorno in calore), tipicamente fra le manze, quando nel loro gruppo, tendenzialmente sieronegativo, entra per la prima volta un bovino immunotollerante
- Quadro infettivo 'aspecifico' ricorrente (immunodepressione: diarrea, forme respiratorie, etc.), in particolar modo fra i giovani animali, perché:
  - ✓ è all'interno del giovane bestiame che di regola compaiono i bovini immunotolleranti (è molto meno probabile l'ipotesi di acquisto di un capo adulto persistentemente infetto)
  - ✓ i giovani animali sono quelli che devono sviluppare una propria immunità, e quindi il virus trova con più facilità soggetti sieronegativi sensibili all'infezione
- Episodio di malattia delle mucose: è evidente che, se si diagnostica un caso di malattia delle mucose, ci potranno essere altri soggetti immunotolleranti in azienda; in ogni caso, a prescindere dal percorso di controllo qui di seguito delineato, a fronte del rilievo di un capo immunotollerante è buona norma procedere subito al controllo virologico dei soggetti di pari età (quindi esposti al medesimo rischio di infezione durante la gravidanza) nonché della madre (che potrebbe essere essa stessa immunotollerante)

Tabella 2. Gestione di un piano di risanamento a livello aziendale



- Esito di positività sierologica nel latte di massa con un elevato livello di reattività: anche ricorrendo ad una prova per anticorpi NS2-3, la persistenza degli anticorpi vaccinali dopo l'infezione e la possibile presenza di anticorpi vaccinali (specialmente nel caso di vaccini attenuati) fanno sì che tale esito possa non corrispondere ad una circolazione virale recente tuttavia tale riscontro analitico è meritevole di un approfondimento diagnostico, perché è spesso effetto del forte stimolo antigenico esercitato all'interno del gruppo da capi immunotolleranti ((Booth e Brownlie, 2016)

## 2. *Evidenziazione di circolazione virale recente*

Le situazioni sopra evidenziate devono avviare un percorso di controllo, la cui prima finalità è quella di capire se nel gruppo sta circolando o meno in modo attivo il virus BVDV. La dimostrazione di tale circolazione è fortemente indicativa della presenza di soggetti immunotolleranti, essendo nota l'incapacità dei bovini infetti in modo acuto di mantenere efficiente la catena epidemiologica di trasmissione del virus. L'azione da intraprendere consiste nell'analisi sierologica di un campione qualificato di animali sentinella (cosiddetto "spot test"), secondo i seguenti criteri:

- Analisi per anticorpi NS2-3, in modo da escludere qualsiasi problema legato alla variabilità dei ceppi BVDV circolanti
- Animali giovani (tipicamente: 6/9 --> 12 mesi) e nati in azienda: in quanto testimoni della recente storia infettiva dell'azienda; data la lunga persistenza degli anticorpi, la positività anticorpale di una vacca di 5 anni può dipendere da un episodio infettivo di 4 anni prima
- Animali non vaccinati o vaccinati con vaccini spenti: perché in tal modo si può ragionevolmente escludere l'interferenza della vaccinazione, dato che la giovane età degli animali fa sì che il numero di vaccinazioni subite sia limitato

Dal punto di vista della numerosità campionaria, l'elevata contagiosità dei bovini immunotolleranti, che porta in breve ad una quasi totale sieropositivizzazione del gruppo a contatto, permette di ridurre il gruppo di sentinelle a 5-10 capi (Houe, 1992 - Booth e Brownlie, 2016): va tuttavia posta attenzione al livello di separazione fisica fra i diversi gruppi di animali in azienda (ad es. capannoni separati), che potrebbe tradursi in un ostacolo nel passaggio del virus fra un gruppo e l'altro, e quindi dar luogo a risultati di falsa negatività fra le sentinelle, solo perché appartenenti ad un gruppo "protetto" dall'infezione virale: se ad esempio viene acquistata una manza immunotollerante, e questa viene immessa in un capannone diverso da quello in cui stanno gli animali utilizzati per

lo spot test, questo potrebbe risultare, almeno per un po' di tempo, falsamente negativo. Quanto più gli animali giovani sono a stretto contatto fra loro e con l'intero effettivo, tanto più lo spot test è affidabile (Booth e Brownlie, 2016). Dal punto di vista dell'interpretazione del risultato, la pratica insegna che la maggior parte di questi spot test evidenzia un segnale univoco, ovvero completa negatività oppure positività nella gran parte se non tutti i campioni esaminati. Si può discutere quale sia il numero minimo di animali positivi sopra il quale avviare la ricerca dei soggetti immunotolleranti; in ogni caso va ricordata:

- la possibilità di incappare in residui di anticorpi materni: la soglia canonica dei 6 mesi ha una validità più statistica che assoluta, perché a tale età una frazione ancorché minoritaria di capi conserva residui di anticorpi materni (Chamorro et al., 2014), per cui è opportuno spostare la soglia di età a 9 mesi se possibile, o comunque valutare con attenzione deboli segnali di positività sierologica in vitelli di 6-8 mesi
- la possibilità di avere sier conversionsi occasionali / sporadiche per contatto con soggetti infetti in modo acuto

Viene qui di seguito proposta una possibile chiave di lettura pratica, basata su uno spot test di 10 animali testati per anticorpi NS2-3:

- 0 – 2 capi positivi --> non evidenza di circolazione virale recente (NB: in ogni caso, sui capi positivi, valutare età ed intensità di reazione al test ELISA)
- 3 – 5 capi positivi --> ripetere lo spot test dopo un mese
- ≥6 capi positivi --> evidenza di circolazione virale recente, procedere con la ricerca dei soggetti immunotolleranti (punto 3)
- Lo spot test può anche essere, anzi è opportuno venga utilizzato per il monitoraggio periodico dello stato sanitario aziendale

### 3. *Ricerca dei soggetti immunotolleranti*

L'approccio più lineare consiste nel prelievo di sangue da tutti i capi presenti, da sottoporre ad analisi virologica tramite ELISA ACE-E<sup>ms</sup>; si tratta tuttavia, nelle aziende di grandi dimensioni, di un'azione onerosa in termini di costo sia per il prelievo che per l'analisi, per alcune opzioni alternative sono possibili:

- Esame del sangue a pool tramite metodica PCR (per le aziende vacca-vitello): negli animali adulti (vacche) si presuppone che i capi immunotolleranti fra gli adulti siano molto pochi, e quindi, da un punto di vista probabilistico, il numero di pool positivi da risolvere singolarmente sarà

nullo o ridotto; ovviamente bisogna trovare, relativamente al pool, un equilibrio tra probabilità di esito positivo/dimensione (che per il siero di sangue può teoricamente arrivare fino a 50 capi)/numero di campioni da risolvere singolarmente in caso di positività, per cui si suggerisce di non superare pool di 10 animali, da risolvere singolarmente in ELISA ACE-E<sup>rns</sup> in caso di esito positivo

- Esame del latte di massa (per le aziende da latte): la soluzione ideale per le vacche da latte, perché consente, con un unico o pochissimi campioni, di escludere, in caso di negatività, la presenza di capi immunotolleranti fra le vacche in lattazione; ovviamente, in caso di positività, è necessario procedere a livello di campione di sangue individuale

I soggetti immunotolleranti, una volta identificati, vanno eliminati quanto prima. Tuttavia, da un punto di vista strettamente scientifico, la classificazione di un bovino come persistentemente infetto richiederebbe un secondo prelievo con esito positivo, a distanza di almeno tre settimane dal primo; da un punto di vista pratico però, in molti casi, è possibile basarsi già sul primo prelievo, tenuto conto del titolo virale nettamente superiore che si ha nel sangue degli animali persistentemente infetti rispetto a quelli con infezione acuta, cosa che si traduce in esiti di positività molto forte alla prova ELISA ACE-E<sup>rns</sup>. Nel caso invece di esiti di positività medio - debole, premesso che essi possono derivare sì a infezioni acute, ma anche, nelle infezioni persistenti, da fluttuazioni di titolo virale come pure da ceppi BVD eterologhi, sarà necessario procedere al secondo prelievo.

A volte la ricerca dei capi persistentemente infetti può dare esito negativo, semplicemente perché il capo immunotollerante è stato rimosso/è morto poco tempo prima, cosa non impossibile data la minore prospettiva di vita di questi soggetti. In ogni caso, a fronte di un chiaro segnale sierologico, è comunque necessario proseguire con il follow-up di cui al punto 4

#### 4. *Follow-up dopo l'eliminazione dei soggetti immunotolleranti*

L'eliminazione dei capi immunotolleranti presenti non chiude il cerchio: altri feti persistentemente infetti potrebbero infatti essere nell'utero delle bovine gravide allevate in azienda. Si rende pertanto necessario un follow-up, da articolare in due attività:

- Per i primi 12 mesi dalla rimozione dei capi immunotolleranti: test virologico sui nuovi nati, tramite ELISA ACE E<sup>rns</sup>, idealmente su sangue precolostrale o su tessuto auricolare, da eseguire quanto prima, al più tardi al momento dell'applicazione della marca auricolare; il vitello immunotollerante neonato è ovviamente pericoloso, ma nei primi giorni di vita l'elevata quantità di anticorpi materni riduce la quantità di virus

non solo circolante, ma anche eliminato con i secreti nasali e con la saliva (Lanyon et al., 2014b) , oltre al fatto che spesso questo animale viene segregato in gabbietta individuale, cosa che ne limita molto il contatto con altri animali e quindi la contagiosità

- 9 mesi dopo la rimozione dei capi immunotolleranti: esecuzione dello spot test, da ripetere con cadenza semestrale
- Dato l'elevato rischio che possano comparire nuovi soggetti immunotolleranti nel gruppo, va infine prevista la vaccinazione delle femmine destinate o già in riproduzione con vaccino dotato di protezione fetale certificata

D  
VI

Nelle aziende con evidenza sierologica di circolazione virale recente, è sconsigliato il ricorso alla pratica vaccinale come unica misura di controllo della malattia

A  
I

E' fortemente raccomandato, dopo l'allontanamento dei capi immunotolleranti, il follow up virologico dei nuovi nati (su siero precolostrale, tessuto auricolare) per un periodo di tempo corrispondente alla finestra durante la quale possono nascere nuovi vitelli immunotolleranti (orientativamente 1 anno)

A  
VI

E' fortemente raccomandato, dopo l'allontanamento dei capi immunotolleranti, il follow up sierologico dei giovani animali, in modo da verificare l'assenza della circolazione virale





## 12. Legislazione

## 12. Legislazione

A livello di legislazione comunitaria, la BVD non è malattia oggetto di piani di controllo obbligatori né a notifica; non risulta inoltre elencata nell'allegato E della direttiva 64/432, e pertanto non può neppure essere oggetto di piani a livello locale riconosciuti in sede comunitaria. Tuttavia, piani di controllo al livello territoriale sono di fatto in corso:

- in Finlandia e nei paesi scandinavi, con un approccio tipicamente basato sulla sierologia
- nei paesi di lingua tedesca (Germania, Svizzera, Austria), con un approccio misto sierologico-virologico (Svizzera, Austria) o solo virologico (Germania)
- in Irlanda, con un approccio virologico
- in Italia nelle province di Bolzano - Trento e nella regione Friuli Venezia Giulia, con un approccio virologico.

La differenza fra i due approcci consiste nel target delle prove di laboratorio, ovvero:

- approccio sierologico: anticorpi (evidenziazione di sieroconversione in bovini che si presume negativi, ad es. giovani animali)
- approccio virologico: virus (evidenziazione dei capi persistentemente infetti)

L'approccio sierologico è in linea generale meno oneroso in termini economici, ma il suo impiego è tipicamente ristretto ad aree a bassa prevalenza di infezione e dove la vaccinazione non è praticata.

Last but not least, la BVD viene presa in considerazione nell'ambito delle disposizioni che regolamentano la riproduzione bovina, ovvero nel dettaglio:

1. *Direttiva 88/407 e successive modifiche*  
concernente gli scambi intracomunitari e le importazioni di sperma bovino: per quanto riguarda la BVD, vengono enunciati tre principi fondamentali, ovvero:
  - il divieto dell'introduzione nei centri di fecondazione artificiale di tori immunotolleranti
  - il divieto dell'introduzione nei centri di fecondazione artificiale di tori immunocompetenti, ma escretori del virus nel seme
  - l'obbligo del controllo sierologico dei tori sieronegativi in produzione, al fine di escludere la presenza di circolazione virale nel gruppo stesso

2. *Direttiva 89/556 e successive modifiche*

concernente gli scambi intracomunitari e le importazioni di embrioni bovini: per quanto riguarda la BVD, tale malattia non è espressamente menzionata; tuttavia viene espressamente richiesto che *“products of animal origin used during collection of the embryos and in the transport medium shall be obtained from sources which present no animal health risk”*; posto il frequente uso del siero fetale bovino nella manipolazione degli embrioni, è sottinteso, ma chiaro, il riferimento al virus BVDV quale principale agente infettivo potenzialmente presente in tale matrice



## > BIBLIOGRAFIA

1. Ahn B.C., Walz P., Kennedy G.A. e S. Kapil (2005) Biotype, genotype and clinical presentation associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from cattle. *Intern J Appl Res Vet Med* 4, 309-325
2. Alpay G. e K. Yesilbag (2015) Serological relationships among subgroups in bovine viral diarrhoea virus genotype 1 (BVDV-1). *Vet Microbiol.* 175:1-6
3. Álvarez M., Donate J. E.B. Makoschey (2012) Antibody responses against non-structural protein 3 of bovine viral diarrhoea virus in milk and serum samples from animals immunized with an inactivated vaccine. *Vet J.* 191:371-376
4. Bachofen C., Vogt H.-R., Stalder H., Mathys T., Zanoni R., Hilbe M., Schweizer M. e E. Peterhans, Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhoea virus from cattle to goats and among goats. *Vet Res.*, 44:32
5. Bauermann F.V., Ridpath J.F., Weiblen R. e E.F. Flores (2013) HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *J Vet Diagn Invest.* 25:6-15
6. Bauermann F.V., Falkenberg S.M., Vander Ley B., Decarò N., Brodersen B.W., Harmon A., Hessman B., Flores E.F. e J. F. Ridpath (2014) Generation of Calves Persistently Infected with HoBi-Like Pestivirus and Comparison of Methods for Detection of These Persistent Infections. *J Clin Microbiol.* 52:3845-3852
7. Beaudeau F., Fourichon C., Robert A., Joly A. e H. Seegers (2004) Milk yield of cows and Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) infection in 7,252 dairy herds in Bretagne (western France). 55th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Bled (Slovenia), 05 - 09 September 2004, M4.1
8. Blanchard P.C., Ridpath J.F., Walker J.B. e S.K. Hietala (2010) An outbreak of late-term abortions, premature births, and congenital deformities associated with a Bovine viral diarrhoea virus 1 subtype b that induces thrombocytopenia. *J Vet Diagn Invest.* 22:128-131
9. Bielanski A., Algire J., Lalonde A. e S. Nadin-Davis (2009) Transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. *Theriogenology* 71:499-508
10. Bielanski A., Algire J., Lalonde A. e A. Garceac (2013) Embryos produced from fertilization with bovine viral diarrhoea virus (BVDV)-infected semen and the risk of disease transmission to embryo transfer (ET) recipients and offspring. *Theriogenology* 80:451-455
11. Bolin S.R. (1988) Viral and viral protein specificity of antibodies induced in cows persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus after vaccination with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res.* 49:1040-1044.
12. Booth R.E. e J. Brownlie (2016) Comparison of bulk milk antibody and young stock serology screens for determining herd status for Bovine Viral Diarrhoea Virus. *BMC Veterinary Research* 12:177
13. Braun U., Bachofen C., Büchi R., Hässig M. e E. Peterhans (2013) Infection of cattle with Border disease virus by sheep on communal alpine pastures. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 155:123-128
14. Braun U., Hilbe M., Janett F., Hässig M., Zanoni R., Frei S. e M. Schweizer (2015) Transmission of border disease virus from a persistently infected calf to seronegative heifers in early pregnancy. *BMC Veterinary Research* 11:43
15. Brianzi M., Olzi E., Cordioli P. e S. Cavirani (2003) Rilevazione di bovini immunotolleranti per Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) presso il centro genetico A.N.A.F.I. *Atti della Società Italiana di Buoiatria - Vol. XXXV:*181.187
16. Brock K.V., Lapin D.R. e D.R. Skrade (1997) Embryo transfer from donor cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Theriogenology*, 47:837-844
17. Brock K.V., Grooms D.L., Ridpath J. e S. R. Bolin (1998) Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest.* 10:22-26
18. Brock K.V. (2003) The persistence of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals* 31, 133-135.
19. Brodersen B.W. (2014) Bovine Viral Diarrhoea Virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. *Vet Pathol.* 51:54-464

20. Brownlie J, Clarke M.C. e C.J. Howard (1984) Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec.* 114:535-6.
21. Brownlie J, Clarke M.C. e C.J. Howard (1989) Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Res Vet Sci.* 46:307-11.
22. Brownlie J, Hooper L.B., Thompson I. e M.E. Collins (1998) Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) - the bovine pestivirus. *Clin Diagn Virol.* 15:141-50.
23. Carman S., Carr N., DeLay J., Baxi M., Deregt D. e M. Hazlett, Bovine viral diarrhoea virus in alpaca: abortion and persistent infection. *J Vet Diagn Invest.* 17:589-593
24. Casaubon J., Vogt H.-R., Stalder H., Hug C. e M.-P. Ryser-Degiorgis (2012) Bovine viral diarrhoea virus in free-ranging wild ruminants in Switzerland: low prevalence of infection despite regular interactions with domestic livestock. *BMC Veterinary Research* 8:204
25. Cavirani S, Taddei S., Cabassi C.S., Donofrio G., Ghidini F., Piancastelli C., Bonato O. e C.F. Flammini (2006) Entità e durata della risposta immune umorale verso BVDV indotta da vaccini diversi. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, 5:13-19
26. Cavirani S., Alborali G. L., Boldini M., Cabassi C. S., Cordioli P., Luini, M., Nigrelli A., Taddei S., e F. Vezzoli (2013) Indagine sulla prevalenza di infezione da Bovine Viral Diarrhoea Virus tipo 2 (BVDV-2) in allevamenti bovini da latte del Nord Italia. *Large Animal Review* 19:203-207
27. Chamorro M.F., Walz P.H., Haines D.M., Passler T., Earleywine T., Palomares R.A., Riddell K.P., Galik P., Zhang Y. e M.D. Givens (2014) Comparison of levels and duration of detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus 1, bovine viral diarrhoea virus 2, bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1, and bovine parainfluenza virus 3 in calves fed maternal colostrum or a colostrum-replacement product. *Can J Vet Res.* 78:81-8.
28. Charleston B., Fray M.D., Baigent S., Carr B.V e W.I. Morrison (2001) Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J Gen Virol.* 82:1893-1897.
29. Chase C.C.L, Elmowalid G. e A.A.A Yousif (2004) The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. *Vet Clin Food Anim.* 20:95-114
30. Collins M.E., Heaney J., Thomas C.J.e J. Brownlie (2009) Infectivity of pestivirus following persistence of acute infection. *Vet Microbiol.* 138:289-296
31. Colom-Cadena A., Cabezona O., Rosell R., Fernández-Aguilar X., Blanch-Lázaro B., Tetas A., Lavín S. e I. Marco (2016) The European hare (*Lepus europaeus*) as a potential wild reservoir for ruminant pestiviruses. *Prev Vet Med.* 131:60-63
32. Craig M.I., König G.A., Benitez D.F. e M. G. Draghi (2015) Molecular analyses detect natural coinfection of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) with bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) in serologically negative animals. *Rev Argent Microbiol.* 47:148-151
33. Decaro N., Lucente M.S., Mari V., Cirone F., Cordioli P., Camero M., Sciarretta R., Losurdo M., Lorusso E. e Buonavoglia C. (2011) Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg Infect Dis.* 17:1549-1552.
34. Decaro N., Lanave G., Lucente M.S., Mari V., Varello K., Losurdo M., Larocca V., Bozzetta E., Cavaliere N., Martella V. e C. Buonavoglia (2014) Mucosal disease-like syndrome in a calf persistently infected by Hobi-like pestivirus. *J Clin Microbiol.* 52:2946-2954
35. Dubovi E.J. (2016) Bulk Milk Tank Testing For the Detection of BVDV Persistently Infected Lactating Cows. Cornell University, Animal Diagnostic Center, [https://ahdc.vet.cornell.edu/docs/Bulk\\_Milk\\_Tank\\_Testing\\_For\\_Detection\\_of\\_BVD\\_PI\\_Cow.pdf](https://ahdc.vet.cornell.edu/docs/Bulk_Milk_Tank_Testing_For_Detection_of_BVD_PI_Cow.pdf)
36. Duncan C., Van Campen H., Soto S., LeVan I.K., Baeten L.A. e M.W. Miller (2008) Persistent Bovine viral diarrhoea virus infection in wild cervids of Colorado. *J Vet Diagn Invest.* 20:650-653
37. Dünser M., Altmann M., Dengg J., Eichinger M., Loitsch A., Revilla-Fernandez S. e H. Schweighardt (2005)

Nachweis einer persistierenden Infektion des Genitaltraktes mit dem Bovinen Virus Diarrhoe Virus (BVDV) bei einem immuntoleranten Besamungstier. *Vet Med Austria* 92, 227-232

38. Falcone E., Tollis M. e G. Conti (1999) Bovine Viral Diarrhea disease associated with a contaminated vaccine. *Vaccine* 18: 387-388.
39. Fourichon C., Beaubeau F., Bareille N. e H. Seegers (2005) Quantification of economic losses consecutive to infection of a dairy herd with bovine viral diarrhoea virus. *Prev Vet Med.* 72:177-181
40. Fray M.D., Mann G.E., Bleach E.C.L., Knight P.G., Clarke M.C. e B. Charleston (2002) Modulation of sex hormone secretion in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Reproduction* 123:281-289
41. Fritzscheier J., Greiser-Wilke I., Haas L., Pituco E., Moennig V, e B. Liess (1995) Experimentally induced "late-onset" mucosal disease--characterization of the cytopathogenic viruses isolated. *Vet Microbiol.* 46:285-94.
42. Fritzscheier J., Haas L., Liebler E., Moennig V. e I. Greiser-Wilke (1997) The development of early vs. late onset mucosal disease is a consequence of two different pathogenic mechanisms. *Arch Virol.* 142:1335-50.
43. Fulton R.W., Ridpath J.F., Ore S., Confer A.W., Saliki J.T., Burge L.J. e M.E. Payton (2005) Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes. *Vet Microbiol.* 111:35-40.
44. Fux R. e G. Wolf (2012) Transient elimination of circulating bovine viral diarrhoea virus by colostral antibodies in persistently infected calves: a pitfall for BVDV-eradication programs? *Vet Microbiol.* 161:13-19
45. Gaede W., Gerhmann B. e Koerber R. (2003) BVD-Virämikereleminierung: Effektives Herdenscreening durch Kombination von RT-PCR und Antigen-ELISA in Blut- und Milchproben. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 116:234-239.
46. Galli C., Duchi R., Colleoni S., Lagutina I. e G. Lazzari (2014) Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* 81:138-151
47. Giammarioli M., Ceglie L., Rossi E., Bazzucchi M., Casciari C., Petri S. e G.M. De Mia (2015) Increased genetic diversity of BVDV-1: recent findings and implications thereof. *Virus Genes* 50: 147. doi:10.1007/s11262-014-1132-2
48. Giangaspero M. (2013) Pestivirus species potential adventitious contaminants of biological products. *Trop Med Surg.* <http://dx.doi.org/10.4172/2329-9088.1000153>
49. Givens M.D., Riddell K.P., Edmondson M.A., Walz P.H., Gard J.A., Zhang Y., Galik P.K., Brodersen B.W., Carson R.L. e D.A. Stringfellow (2009) Epidemiology of prolonged testicular infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol.* 139:42-51
50. Glawischnig W., Schoepf K. e M. Matt (2010) Monitoring for Bovine Viral Diarrhoea Virus in Austrian red deer (*Cervus elaphus elaphus*) by using ear-notch samples. *J Wild Dis.* 46:1269-1273
51. Goens S.D. (2002) The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. *Can Vet J.* 43:946-954
52. Graham D.A., German A., Mawhinney K. e E.A. Goodall (2003) Antibody responses of naive cattle to two inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines, Measured by indirect and blocking ELISAs and virus neutralization. *Vet Rec.* 152:795-800.
53. Grant D.M., Dagleish M.P., Bachofen C., Boag B., Deane D., Percival A., Zadoks R.N. e G.C. Russell (2015) Assessment of the rabbit as a wildlife reservoir of bovine viral diarrhoea virus: serological analysis and generation of trans-placentally infected offspring. *Frontiers in Microbiology* Volume 6, Article 1000, doi: 10.3389/fmicb.2015.01000
54. Gripshover E.M., Givens M.D., Ridpath J.F., Brock K.V., Whitley E.M. e E.A. Sartina (2007) Variation in Erns viral glycoprotein associated with failure of immunohistochemistry and commercial antigen capture ELISA to detect a field strain of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol.* 125:11-21
55. Grondahl C., Uttenenthal A., Houe H., Rasmussen T.B., Hoyer M.J. e L.E. Larsen (2003) Characterisation of a

- pestivirus isolated from persistently infected mousedeer (*Tragulus javanicus*). *Arch Virol.* 148:1455–1463
56. Grooms D.L., Brock K.V. e L.A. Ward (1998) Detection of bovine viral diarrhea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhea virus. *J Vet Diagn Invest.* 10:125–129.
  57. Gunn H.M. (1993) Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Rec.* 132:584-5
  58. Gunn G.J., Stott A.W. e R.W. Humphry (2004) Modelling and costing BVD outbreaks in beef herds. *Vet J.* 167: 143–149
  59. Hamers C., Couvreur B., Dehan P., Letellier C., Lewalle P., Pastoret P.-P., E.P. Kerkhofs (2000a) Differences in Experimental Virulence of Bovine Viral Diarrhoea Viral Strains Isolated from Haemorrhagic Syndromes. *The Veterinary Journal* 2000, 160:250–258
  60. Hamers C., di Valentin E. Lecomte C., Lambot M., Joris E., Genicot B. e P.-P. Pastoret (2000b) Virus Neutralizing Antibodies Against a Panel of 18 BVDV Isolates in Calves Vaccinated with Rispoval™ RS-BVD. *J Vet Med. B* 47:721-726
  61. Hansen T.R., Smirnova N.P., Van Campen H., Shoemaker M.L., Ptitsyn A.A. e H. Bielefeldt-Ohmann (2010) Maternal and fetal response to fetal persistent infection with Bovine Viral Diarrhea Virus. *Am J Reprod Immunol.* 64:295–306
  62. Häsler B., Howeb K.S., Presic P. e K.D.C. Stärka (2012) An economic model to evaluate the mitigation programme for bovine viral diarrhoea in Switzerland. *Prev Vet Med.* 106:162– 173
  63. Hilbe M., Stalder H., Peterhans E., Haessig M., Nussbaumer M., Egli C., Schelp C., Zlinszky, K. e F. Ehrenspenger (2007) Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhea virus infection in calves. *J Vet Diagn Invest.* 19:28–34
  64. 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. *Res Vet Sci.* 53:320-3
  65. Houe H. (2003) Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 31:137–143
  66. Houe H. (1995) Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1995 11:521-4
  67. Houe H., Lindberg A. e V. Moennig (2006) Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest.* 18:427–436
  68. Howard C.J. (1990) Immunological responses to bovine virus diarrhea virus infections. *Rev. Sci. Tech.* 9:95–103.
  69. Kelling C.D. (2004) Evolution of bovine viral diarrhea virus vaccines. *Vet Clin Food Anim.* 20:115–129
  70. Kirkland P.D., Mackintosh S.G. e A. Moyle (1994) The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. *Vet Rec.* 135:527-9.
  71. Krametter-Froetscher R., Kohler H., Benetka V., Moestl K., Golja F., Vilček S. e Baumgartner, W (2007) Influence of communal alpine pasturing on the spread of pestiviruses among sheep and goats in Austria: first identification of border disease virus in Austria. *Zoonoses Public Health* 54:209-213
  72. Lanyon S.R., Hill F.I., Reichel M.P. e J. Brownlie (2014a) Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *The Veterinary Journal* 199:201–209
  73. Lanyon S.R., Sims S.K., Cockcroft P.D. e M.P. Reichel (2014b) Comparison of serum, ear notches, and nasal and saliva swabs for Bovine viral diarrhea virus antigen detection in colostrum-fed persistently infected (PI) calves and non-PI calves. *J Vet Diagn Invest.* 26:783–787
  74. Liebler-Tenorio E.M., Lanwehr A., Greiser-Wilke I., Loehr B.I. e J. Pohlenz (2000) Comparative investigation of tissue alterations and distribution of BVD-viral antigen in cattle with early onset versus late onset mucosal disease. *Vet Microbiol.* 77:163-174
  75. Lindberg A. e Alenius S. (1999) Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. In: *Proceedings of the European Symposium on Control of Bovine Viral Diarrhoea*

- Virus in Cattle, Lillehammer, *Vet. Microbiol.* 64:97–222.
76. Lindberg A., Groenendaal H., Alenius S. and U. Emanuelson (2001) Validation of a test for dams carrying fetuses persistently infected with bovine viral diarrhoea virus based on determination of antibody levels in late pregnancy. *Prev Vet Med.* 51:199–214.
  77. Lindberg A., Brownlie J., Gunn G.J., Houe H., Moennig V., Saatkamp H.W., Sandvik T. e P.S. Valle (2006) The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Rev sci tech Off int Epiz.* 25:961-979
  78. Loehr B. Frey H.R., Moennig V. e I. Greiser-Wilke I. (1998) Experimental induction of mucosal disease: consequences of superinfection of persistently infected cattle with different strains of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Arch Virol.* 143:667-79
  79. Luzzago C., Lauzi S., Ebranati E., Giammarioli M., Moreno A., Cannella V., Masoero L., Canelli E., Guercio A., Caruso C., Ciccozzi M., De Mia G.M., Acutis P.A., Zehender G. e S. Peletto (2014) Extended genetic diversity of Bovine Viral Diarrhoea virus and frequency of genotypes and subtypes in cattle in Italy between 1995 and 2013. *BioMed Research International Volume 2014*, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/147145>
  80. Makoschey B., Sonnemans D., Munoz Bielsa J., Franken P., Mars M., Santos L. e M. Alvarez (2007) Evaluation of the induction of NS3 specific BVDV antibodies using a commercial inactivated BVDV vaccine in immunization and challenge trials. *Vaccine* 25:6140–6145
  81. Martucciello A., De Mia G.M., Giammarioli M., De Donato I., Iovane G. e G. Galiero (2009) Detection of Bovine viral diarrhoea virus from three water buffalo fetuses (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. *J Vet Diagn Invest.* 21:137–140
  82. McGowan M.R. e P. D. Kirkland (1995) Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. *Br vet. J.* 151:263-270
  83. Meyer G., Deplanche M., Roux D., Moulignie M., Picard-Hagen N., Lyazrhi F., Raboisson D., Mathevet P. e Schelcher F. (2012) Fetal protection against bovine viral diarrhoea type 1 virus infection after one administration of a live-attenuated vaccine. *Vet J.* 192:242–5.
  84. Meyers G., Ege A., Fetzer C., von Freyburg M., Elbers K., Carr V., Prentice H., Charleston B. e E.M. Schürmann (2007) Bovine viral diarrhoea virus: prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting Erns RNase and Npro protease. *J Virol.* 81:3327-3338
  85. Moennig V., Eicken K., Flebbe U., Frey H.-R., Grummer B., Haas L., Greiser-Wilke I. e B. Liess (2005) Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). *Prev Vet Med.* 72:109–114
  86. Newcomer B.W. e M.D. Givens (2013) Approved and experimental countermeasures against pestiviral diseases: Bovine viral diarrhoea, classical swine fever and border disease. *Antiviral Research* 100:133–150
  87. Newcomer B.W., Toohey-Kurth K., Zhang Y., Brodersen B.W., Marley M.S., Joiner K.S., Zhang Y., Galik P.K. Riddell K.P. e M. D. Givens (2014) Laboratory diagnosis and transmissibility of bovine viral diarrhoea virus from a bull with a persistent testicular infection. *Vet Microbiol.* 170:246–257
  88. Newcomer B.W., Walz P.H., Givens M.D. e A.E. Wilson (2015) Efficacy of bovine viral diarrhoea virus vaccination to prevent reproductive disease: A meta-analysis. *Theriogenology* 83:360–365
  89. Niskanen R. e A. Lindberg (2003) Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *The Veterinary Journal* 165:125–130
  90. Passler T., Walz P., Ditchkoff S.S., Givens M.D., Maxwell H.S. e K.V. Brock (2007) Experimental persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in white-tailed deer. *Vet Microbiol.* 122:350–356
  91. Patel J.R., Shilleto R.W., Williams J. e D.C. (2002) Prevention of transplacental infection of bovine foetus by bovine viral diarrhoea virus through vaccination. *Arch Virol.* 147:2453–63.
  92. Paton D., Gunn M., Sands J., Yapp F., Drew T., Vilček S e S. Edwards (1997) Establishment of serial persistent infections with bovine viral diarrhoea virus in cattle and sheep and changes in epitope expression related to host species. *Arch. Virol.* 142:929–938

93. Peterhans E., Bachofen C., Stalder H. e M. Schweizer (2010) Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet Res.* 41:44 - DOI: 10.1051/vetres/2010016
94. Pisoni G., Petrini S., Casciari C., Pellegrini C. e F. Toni (2016) Cross-neutralization analysis against BVDV-1a and BVDV-1b in serum from heifers vaccinated with Rispoval RS-BVD. *Rivista di Buiatria*, 2016
95. Quinn H.E., Windsor P.A., Kirkland P.D. e J.T. Ellis (2004) An outbreak of abortion in a dairy herd associated with *Neospora caninum* and bovine pestivirus infection. *Aust Vet J.* 82:99-101
96. Renshaw R.W., Ray R, e E.J. Dubovi (2000) Comparison of virus isolation and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk tank samples. *J Vet Diagn Invest.* 12:184–186
97. Ridpath J.F. (2010) The contribution of infections with Bovine Viral Diarrhoea Viruses to Bovine Respiratory Disease. *Vet Clin Food Anim.* 26:335–348
98. Ridpath J.F., Neill J.D., Chiang Y.-W. e J. Waldbillig (2014) Stability of Bovine viral diarrhoea virus 1 nucleic acid in fetal bovine samples stored under different conditions. *J Vet Diagn Invest.* 26:6-9
99. Rodríguez-Prieto V., Kukielka D., Rivera-Arroyo B., Martínez-López B., de las Heras A.I., Sánchez-Vizcaíno J.M. e J. Vicente (2016) Evidence of shared bovine viral diarrhoea infections between red deer and extensively raised cattle in south-central Spain. *BMC Veterinary Research* 12:11
100. Raue R., Harmeyer S.S. e I.A. Nanjiani (2011) Antibody responses to inactivated vaccines and natural infection in cattle using bovine viral diarrhoea virus ELISA kits: assessment of potential to differentiate infected and vaccinated animals. *Vet J.* 187:330–334
101. Rossi E., Ceglie L., Cunico G., Giammarioli M., Mion M., Rampazzo E., Torresi C., Nardelli S. e G.N. De Mia (2013) Diversità genetica del virus della diarrea virale del bovino in Italia: identificazione di un nuovo genotipo virale. XV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. - Monreale (PA), 23-25 Ottobre 2013
102. Rossmann W., Janacek R. e E. Wilhelm (2005) Control of BVDV infection on common grassland – The key for successful BVDV-eradication in Lower Austria. *Prev Vet Med.* 72:133-137
103. Sandvik T. e J. Krogsrud (1995) Evaluation of an antigen-capture ELISA for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle blood samples. *J Vet Diagn Invest.* 7:65-71
104. Sandvik T., Larsen I.-L. e Nyberg O. (2001) Influence of milk from cows persistently infected with BVD virus on bulk milk antibody levels. *Vet Rec.* 148:82-84
105. Sandvik T. (2005) Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. *Prev Vet Med.* 72:3–16
106. Schirmmeier H. (2014) Three years of mandatory BVD control in Germany – lessons to be learned. *Proceedings XXVIII World Buiiatrics Congress, Cairns 2014*
107. Sentsui H., Nishimori T., Kirisawa R. e A. Moroka (2001) Mucosal disease induced in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus by antigenically different cytopathic virus. *Arch Virol.* 146: 993–1006
108. Siegwart N., Hilbe M., Haessig M. e U. Braun (2006) Increased risk of BVDV infection of calves from pregnant dams on communal Alpine pastures in Switzerland. *Vet J.*, 172:386–388
109. Stahl K. E S. Alenius (2012) BVDV control and eradication in Europe - an update. *Japanese Journal of Veterinary Research* 60(Supplement): S31-S39, 2012
110. Stott A.W., Humphry R.W., Gunn G.J., Higgins I., Hennessy T., O’Flaherty J. e D.A. Graham, Predicted costs and benefits of eradicating BVDV from Ireland. *Irish Vet J.* 65:12
111. Straub O.C. (2005) Aktuelles zur BHV1-/BVD-Bekämpfung – Sanierungsfortschritt am Beispiel einiger Bundesländer. *Tierärzt Umsch.* 60:44-47
112. Taddei S., Bosello C., Cabassi C.S., Schiano E. e S. Cavarani (2013) Valutazione della viremia in bovini persistentemente infetti da virus della diarrea virale bovina sottoposti a vaccinazione. *Buiatria - Journal of the Italian Association for Buiiatrics* vol. 8, n.2, 2013

113. Tavella A., Stifter E., Zambotto P., Lombardo D., Rabini M., Robatscher E. e S. Nardelli (2007) Die Rolle des Schafes und der Ziege als BVD-Virusüberträger in Rinderhaltenden Betrieben, Feldstudie in BVD-infizierten Beständen in der autonomen Provinz Bozen/Südtirol (Italien). 6. Stendaler Symposium zur BHV1-, BVD- und Paratuberkulose Bekämpfung
114. Tarry D.W., Bernal L. e S. Edwards (1991) Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies. *Vet Rec.* 128:82-84
115. Uttenthal A., Hoyer M.J., Grøndahl C., Houe H., van Maanen C., Rasmussen T.B. e L.E. Larsen (2006) Vertical transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in mousedeer (*Tragulus javanicus*) and spread to domestic cattle. *Arch Virol.* 151:2377-87
116. Valle P.S., Skjerve E., Wayne Martin S., Larssen R.B., Østera O. e O. Nyberg (2005) Ten years of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) control in Norway: a cost-benefit analysis. *Prev Vet Med.* 72:189-207
117. Van Campen H., Ridpath J., Williams E., Cavender C., Edwards J., Smith S. e H. Sawyer (2001) Isolation of bovine viral diarrhoea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming. *J Wildl Dis.* 37:306-311.
118. Voges H., Horner G.W., Rowe S. e G.J. Wellenberg (1998) Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non viraemic bull. *Vet Microbiol.* 61:165-175
119. Weldegebriel H.T., George J. Gunn b, Alistair W. Stott (2009) Evaluation of producer and consumer benefits resulting from eradication of bovine viral diarrhoea (BVD) in Scotland, United Kingdom. *Prev Vet Med.* 88:49-56
120. Zimmer G.M., Wentink G.H., Brusckhe C., Westenbrink F.J., Brinkhof J. e I. de Goey (2002) Failure of foetal protection after vaccination against an experimental infection with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Microbiol.* 89:255-265



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Viale dell'Università, 10 - 35020 Legnaro (Pd)

Tel. +39 049 8084211 Fax +39 049 8830046

[comunicazione@izsvenezie.it](mailto:comunicazione@izsvenezie.it)

[www.izsvenezie.it](http://www.izsvenezie.it)