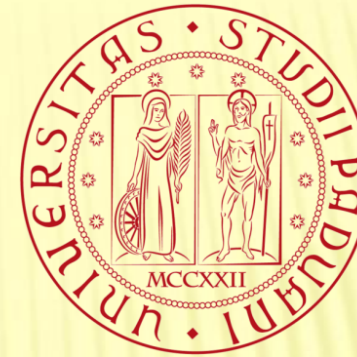


UNIVERSITÀ DELGI STUDI DI PADOVA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
MEDICINA VETERINARIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE PRODUZIONE E SALUTE



**PROTEZIONE FETALE DA PARTE DI VACCINI ANTI
BVD VIRUS GENOTIPO 1 E 2 IN VACCHE INFETTATE
SPERIMENTALMENTE CON HOBI-LIKE VIRUS (BVD-3)**

Relatore: Prof. Marco Martini
Correlatore: Dott. Stefano Nardelli

Dott. Mattia Schiavo

Anno Accademico 2017/2018

INTRODUZIONE

- Famiglia *Flaviviridae*
- Genere *Pestivirus*
 - BVDV-1, BVDV-2, *Border Disease Virus (BDV)* e Virus della peste suina classica (CSFV).
 - **PESTIVIRUS ATIPICI:** Tra cui «HoBi» like o BVDV-3

INTRODUZIONE

- BVDV (Bovine Viral Diarrhoea Virus)
- Virus a diffusione ubiquitaria in gran parte del mondo indipendentemente dal tipo di allevamento.
- Colpisce bovini di tutte le età.
- In determinate condizioni può diffondersi a ovini, caprini, suini, cervidi.

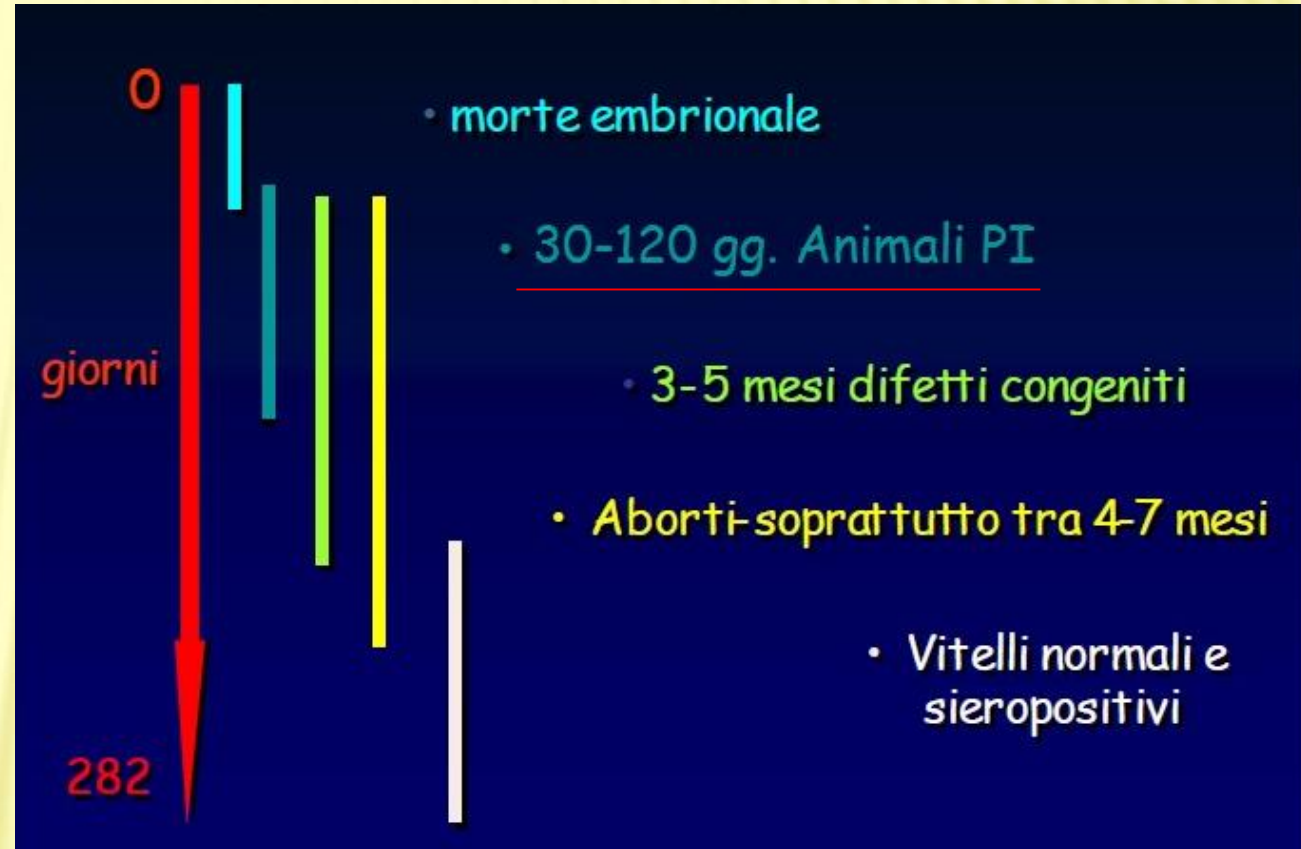


PATOGENESI

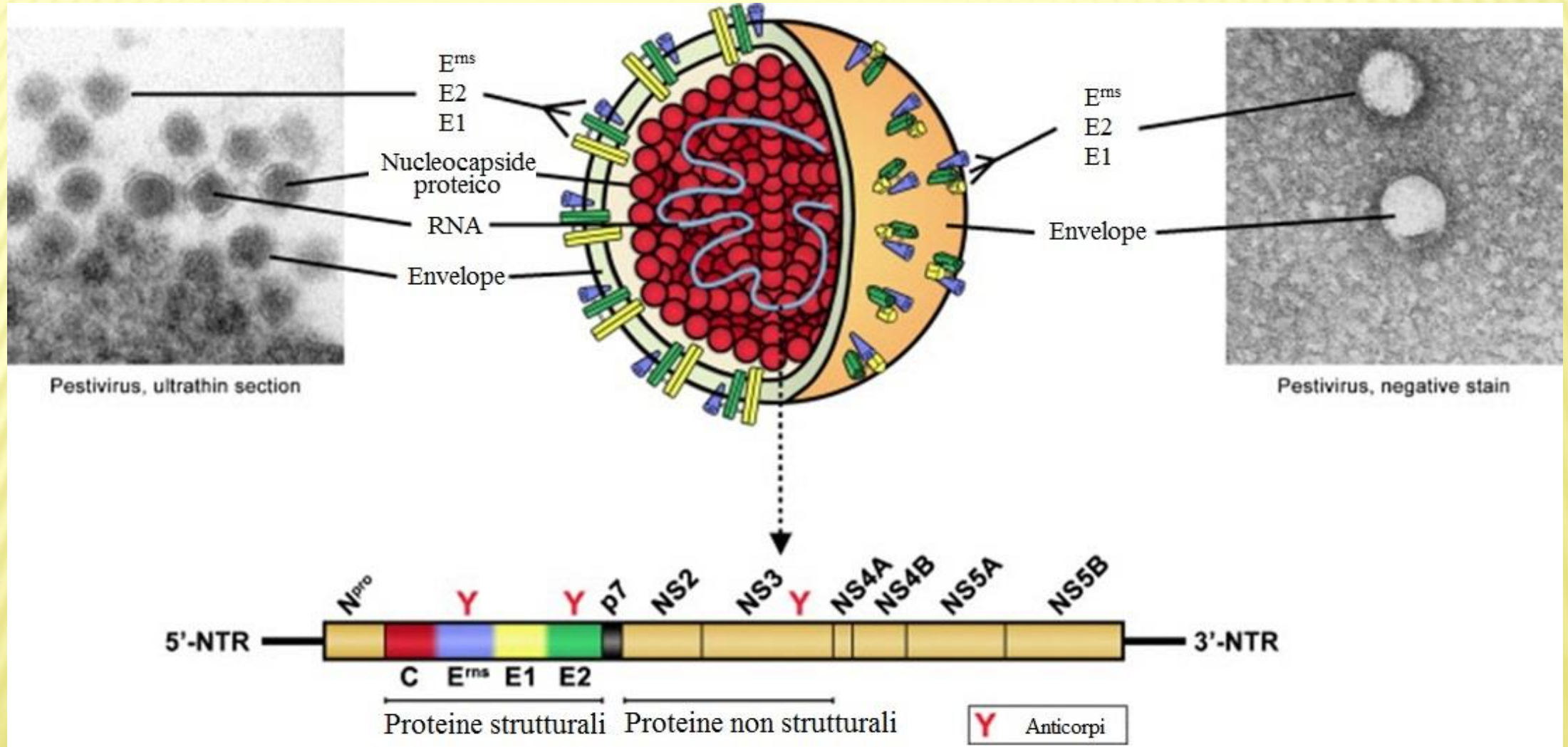
- Principale via di ingresso è oro-nasale
 - Replicazione cellule epiteliali, con predilezione per le tonsille.
 - Viremia transitoria (dal 3 al 10 gg post infezione)
 - Distribuzione del virus nei diversi tessuti con predilezione per quello linfoide.
 - Passaggio della placenta con infezione del feto.
- Sintomatologia variabile, immunodepressione con associazione a sindromi respiratorie e infertilità.
- Guarigione in seguito a comparsa di anticorpi (circa 2-4 settimane post infezione)

EPIDEMIOLOGIA

- L'infezione in utero può portare a conseguenze diverse in base al momento in cui avviene.
- Persistentemente infetti (PI) (diffusione stimata 0,5%-2%) sono serbatoio di malattia e grandi eliminatori virali.
- Il contagio tramite contatto con soggetti con infezione acuta è meno efficace.



AGENTE EZIOLOGICO



VARIABILITÀ GENETICA

- I *Pestivirus* presentano alti tassi di mutazione.
- I tratti maggiormente soggetti a mutazioni sono quelli codificanti per proteine strutturali.
 - Minor efficacia dei vaccini
 - Maggior difficoltà diagnostiche
- Vi è variabilità genetica anche all'interno dei genotipi.

CONTROLLO

- Obiettivo è interrompere la catena epidemiologica mediante misure di profilassi diretta e indiretta con lo scopo di individuare ed eliminare i PI.
- La vaccinazione è efficace nel prevenire o ridurre gli effetti clinici della malattia dopo la nascita, ma questo è un obiettivo secondario nei riproduttori.
- Il vaccino dovrebbe in primis impedire la trasmissione al feto.
- Ma non è del tutto accertato se i vaccini preparati verso un genotipo siano in grado di proteggere contro tutti gli altri genotipi.

Scopo di questa tesi è valutare appunto l'efficacia dei vaccini attualmente in commercio verso il genotipo identificato di recente.

MATERIALI E METODI

- Utilizzati 9 animali divisi in due gruppi:
 - Quattro bovine non vaccinate
 - Cinque bovine vaccinate
- Vaccino vivo attenuato verso BVDV genotipo 1 e 2
- Virus Genotipo 3 isolato da focolaio italiano



Applicatore intranasale su siringa da 5ml.



Le bovine sono state collocate in box singoli in una struttura di stabulazione dedicata alla sperimentazione. Successivamente la fase di infezione sono state ospitate in un box collettivo fino al momento del parto.

OBBIETTIVI DEGLI INTERVENTI DIAGNOSTICI

- Assicurarsi che gli animali, a inizio sperimentazione, non fossero mai venuti a contatto con BVDV prima (Ricerca virus e anticorpi mediante tecniche PCR e ELISA).
- Verificare la comparsa di anticorpi in seguito a vaccinazione (mediante tecnica ELISA).
- Verificare l'avvenuta infezione (Ricerca virus e anticorpi mediante tecniche PCR e ELISA).
- Individuare la presenza del virus nei vitelli al momento del parto (ricerca virus e anticorpi mediante tecniche PCR e ELISA)

MATERIALI E METODI - ANALISI

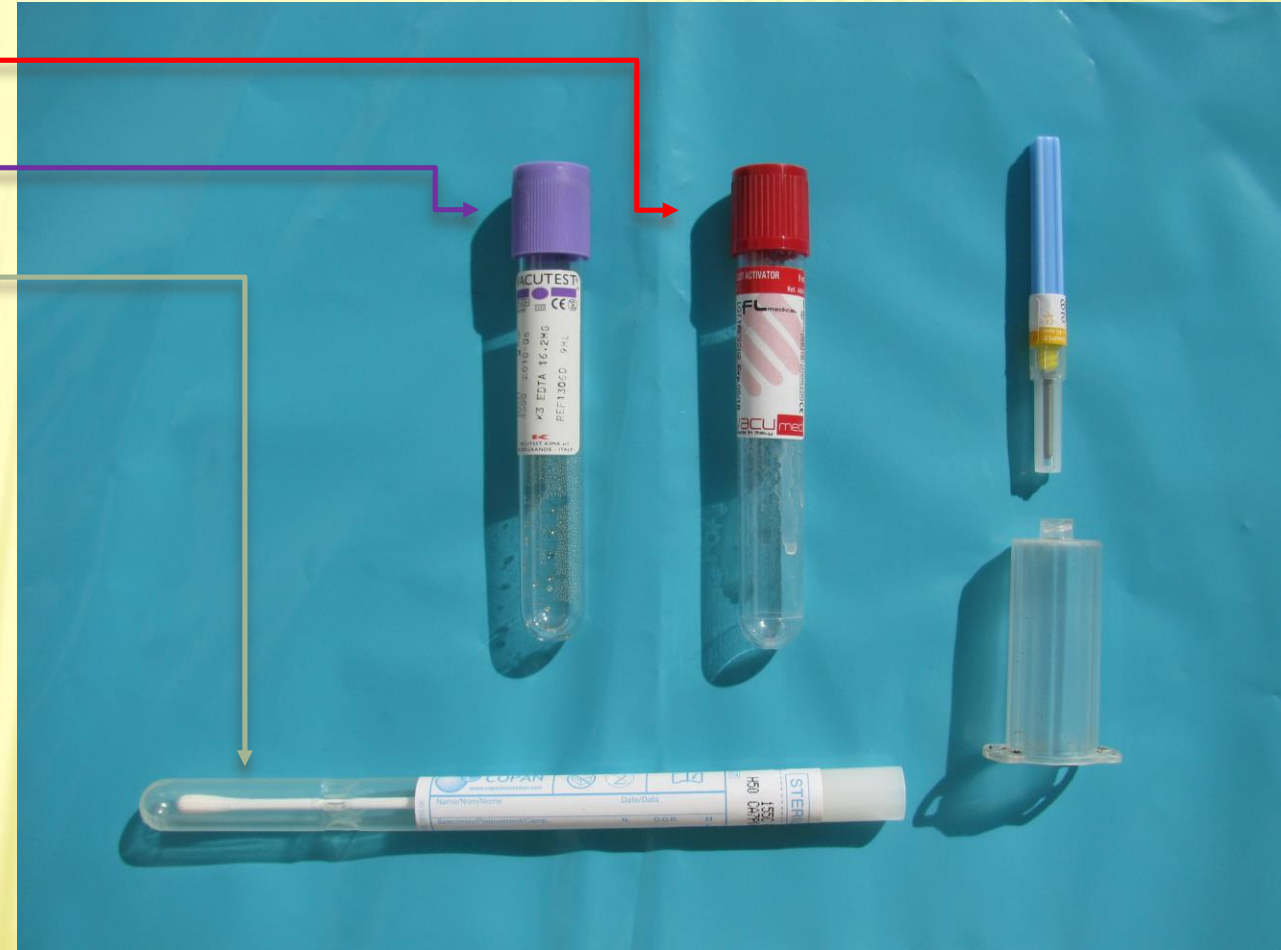
- Ricerca anticorpi (su siero di sangue)
 - ELISA per anticorpi verso proteine strutturali (E^{rns} , E1 e E2)
 - ELISA per anticorpi verso proteine non strutturali (NS2-3)
- Ricerca virus
 - ELISA Virus: su siero di sangue
 - Real time RT-PCR pan-BVD commerciale e PCR BVDV-3 specifica: su sangue con EDTA, tampone vaginale, cartilagine auricolare e organi e su siero.
- Ricerca gamma globuline su siero

MATERIALI E METODI – PRELIEVI PER DIAGNOSI BVD

- Siero di sangue
- Sangue con anticoagulante
- Tamponi di cotone sterili



Modalità di prelievo nelle bovine.



In alto a sinistra Vacutainer (tappo viola per sangue, tappo rosso per siero), in basso a sinistra tampone di cotone sterile, a destra camicia e ago.

MATERIALI E METODI – PRELIEVI PER DIAGNOSI BVD

- Cartilagine auricolare mediante pinza
- Organi in animali deceduti (rene, fegato, milza, polmone, timo e cervello).



In alto a destra pinza per prelievo cartilagine auricolare. A sinistra modalità di prelievo

CRONOGRAMMA DEGLI INTERVENTI

N° aziendale	VACCINAZIONE: gg ante FA	FECONDAZIONE (giorno 0)	INFEZIONE: gg post FA	PARTO: giorni post FA	RICERCA VIRUS FETO/VITELLO
57	--	0	82	282	DUE GEMELLI ENTRAMBI POSITIVI
610	--	0	88	277	POSITIVO
574	--	0	88	287	POSITIVO
621	--	0	88	162 (aborto a ~ 5 mesi)	FETO PERSO
58	-32	0	88	179 (aborto a ~ 6 mesi)	FETO NEGATIVO
596	-109	0	82	282	POSITIVO
598	-35	0	88	284	NEGATIVO
573	-74	0	83	292	NEGATIVO
624	-68	0	89	291	NEGATIVO

Tabella di riepilogo delle tempistiche della sperimentazione.

RISULTATI - VACCINAZIONE

N° aziendale	TO rRT-PCR SIERO	TO ELISA VIRUS	TO ELISA AC STRUTTURALI	TO ELISA AC NON STRUTTURALI	T28 POST VACC. ELISA AC STRUTTURALI	T28 POST VACC. ELISA AC NON STRUTTURALI
57	NEG	NEG	NEG (S/P 0,00)	NEG (%IB 0)	NEG (S/P 0,00)	NEG (%IB 0)
610	NEG	NEG	NEG (S/P 0,00)	NEG (%IB 0)	NEG (S/P 0,06)	NEG (%IB 2)
574	NEG	NEG	NEG (S/P 0,07)	NEG (%IB 0)	NEG (S/P 0,10)	NEG (%IB 2)
621	NEG	NEG	NEG (S/P 0,00)	NEG (%IB 0)	NEG (S/P 0,03)	NEG (%IB 0)
58	NEG	NEG	NEG (S/P 0,00)	NEG (%IB 0)	POS (S/P 1,00)	NEG (%IB 39)
596	NEG	NEG	NEG (S/P 0,01)	NEG (%IB 0)	POS (S/P 0,47)	NEG (%IB 25)
598	NEG	NEG	NEG (S/P 0,00)	NEG (%IB 0)	POS (S/P 0,94)	NEG (%IB 35)
573	NEG	NEG	NEG (S/P 0,00)	NEG (%IB 0)	POS (S/P 0,42)	DUB (%IB 44)
624	NEG	NEG	NEG (S/P 0,02)	NEG (%IB 0)	POS (S/P 0,56)	POS (%IB 52)

NON vaccinate

Vaccinate

- Le bovine vaccinate hanno sieroconvertito sviluppando una risposta anticorpale verso proteine strutturali.
- Vi è una iniziale risposta verso proteine non strutturali nelle bovine vaccinate.

Esiti delle ricerche sierologiche (ELISA per AC strutturali e non) e virologiche (Real Time PCR e ELISA virus) in bovine vaccinate e non al giorno della vaccinazione (T0) e dopo 28 giorni.

RISULTATI – INFEZIONE BOVINE VACCINATE

N° aziendale	Giorni post infez.	SIERO DI SANGUE			BUFFY COAT
		ELISA AC STR.	ELISA AC NS	ELISA VIRUS	rRT-PCR
58 Vaccinata	T0	POS (S/P 1,45)	POS %IB 89	NEG (137 OD)	NEG
	T6	POS (S/P 1,37)	POS %IB 88	NEG (-40 OD)	NEG
	T14	POS (S/P 2,08)	POS %IB 94	NEG (15 OD)	NEG
596 Vaccinata	T0	POS (S/P 0,86)	POS %IB 80	NEG (-23 OD)	NEG
	T6	POS (S/P 0,82)	POS %IB 79	NEG (-45 OD)	NEG
	T14	POS (S/P 1,94)	POS %IB 89	NEG (-1 OD)	NEG
598 Vaccinata	T0	POS (S/P 1,38)	POS %IB 81	NEG (230 OD)	NEG
	T6	POS (S/P 1,19)	POS %IB 80	NEG (-83 OD)	NEG
	T14	POS (S/P 2,23)	POS %IB 91	NEG (7 OD)	NEG
573 Vaccinata	T0	POS (S/P 1,12)	POS %IB 89	NEG (-16 OD)	NEG
	T6	POS (S/P 1,10)	POS %IB 89	NEG (-1 OD)	NEG
	T14	POS (S/P 1,80)	POS %IB 94	NEG (-154 OD)	NEG
624 Vaccinata	T0	POS (S/P 1,28)	POS %IB 86	NEG (-15 OD)	NEG
	T6	POS (S/P 1,24)	POS %IB 87	NEG (-39 OD)	NEG
	T14	POS (S/P 2,10)	POS %IB 94	NEG (139 OD)	NEG

- L'infezione è avvenuta in tutti i soggetti ad 1/3 della gestazione.
- Tutti gli individui vaccinati hanno manifestato un effetto boost a livello anticorpale.
- Nella bovina 596 l'infezione è avvenuta a 191 giorni dalla vaccinazione, questo porta ad avere un titolo anticorpale più basso al giorno dell'infezione.

Esiti delle ricerche sierologiche e virologiche in bovine vaccinate ai giorni T0, T6 e T14 dalla infezione.

RISULTATI – INFEZIONE BOVINE NON VACCINATE

N° aziendale	Giorni post infez.	SIERO DI SANGUE			BUFFY COAT
		ELISA AC STR.	ELISA AC NS	ELISA VIRUS	rRT-PCR
57 NON vaccinata	T0	NEG (S/P 0,00)	NEG %IB 0	NEG (29 OD)	NEG
	T6	NEG (S/P 0,00)	NEG %IB 0	NEG (31 OD)	NEG
	T14	POS (S/P 0,48)	NEG %IB 0	NEG (-8 OD)	NEG
	T29	POS (S/P 0,42)	NEG %IB 28		
610 NON vaccinata	T0	NEG (S/P 0,13)	NEG %IB 21	NEG (179 OD)	NEG
	T6	NEG (S/P 0,08)	NEG %IB 7	NEG (174 OD)	POS (CT 34)
	T14	NEG (S/P 0,16)	NEG %IB 7	NEG (29 OD)	POS (CT 37)
	T34	POS (S/P 0,72)	NEG %IB 31		
574 NON vaccinata	T0	NEG (S/P 0,05)	NEG %IB 3	NEG (142 OD)	NEG
	T6	NEG (S/P 0,05)	NEG %IB 6	NEG (6 OD)	POS (CT 37)
	T14	NEG (S/P 0,18)	NEG %IB 6	NEG (11 OD)	POS (CT 37)
	T34	POS (S/P 0,95)	POS %IB 65		
621 NON vaccinata	T0	NEG (S/P 0,02)	NEG %IB 5	NEG (238 OD)	NEG
	T6	NEG (S/P 0,05)	NEG %IB 7	NEG (151 OD)	POS (CT 33)
	T14	NEG (S/P 0,06)	NEG %IB 11	NEG (-4 OD)	POS (CT 36)
	T34	POS (S/P 0,80)	POS %IB 57		

- Tutte le bovine dimostrano una risposta anticorpale verso proteine strutturali a 4 settimane dall'infezione.
- In tutte le bovine tranne una (id 57) è stato possibile osservare viremia transitoria.
- L'ELISA virus non è stata in grado di individuare la presenza del virus nel siero.

Esiti delle ricerche sierologiche e virologiche in bovine non vaccinate ai giorni T0, T6, T14, T29 o T34 dalla infezione.

RISULTATI – PARTI (ANALISI MADRI)

CAMPIONE	ANALISI	610 Non vacc.	574 Non vacc.	57 Non vacc.	596 Vaccinata	573 Vaccinata	598 Vaccinata	624 Vaccinata
TAMPONE VAGINALE	rRT-PCR	POS (25 CT)	POS (35 CT)	POS (33 CT)	POS (34 CT)	NEG	NEG	NEG
	PCR BVDV-3	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
SANGUE EDTA	rRT-PCR	POS (38 CT)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SIERO	ELISAAC STRUTTURALI	POS (S/P 1,51)	POS (S/P 0,68)	POS (S/P 1,98)	POS (S/P 1,79)	POS (S/P 0,74)	POS (S/P 1,16)	POS (S/P 0,96)
	ELISAAC NS	POS (%IB 80)	POS (%IB 92)	POS (%IB 88)	POS (%IB 89)	POS (%IB 92)	POS (%IB 90)	POS (%IB 90)
	ELISA VIRUS	NEG (-40 OD)	NEG (-3 OD)	NEG (+10 OD)	NEG (-12 OD)	NEG (+2 OD)	NEG (-33 OD)	NEG (34 OD)
	rRT-PCR	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	PCR BVDV-3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

- Due bovine hanno abortito, una non vaccinata (Id. 621, feto perso) e una vaccinata (Id. 58, feto risultato negativo a BVDV).
- Le madri presentano tutte anticorpi, sia verso proteine strutturali che NS.
- Le madri che hanno partorito vitelli viremici risultano positive al tampone vaginale.
- Nella 610 è presente anche una debole positività alla PCR su sangue con EDTA.

Quadro riassuntivo relativo allo stato vaccinale, sierologico e virologico delle bovine al momento del parto.

RISULTATI – PARTI (ANALISI VITELLI)

CAMPIONE	ANALISI	610 Non vacc	574 Non vacc	57 Non vacc	596 Vacc	573 Vacc	598 Vacc	624 Vacc	
CARTILAGINE AURICOLARE	rRT-PCR	POS (25 CT)	POS (36 CT)	POS (31 CT)	POS (26 CT)	POS (27 CT)	NEG	NEG	NEG
	SANGUE EDTA	rRT-PCR	POS (25 CT)	NEG	POS (23 CT)	Nato morto (no sangue)	POS (19 CT)	NEG	NEG
SIERO	ELISAAC STRUTT.	NEG (S/P 0,04)	POS (S/P 0,50)	NEG (S/P 0,11)	NEG (S/P 0,12)	NEG (SP<0,3)	NEG (S/P <0,3)	NEG (S/P <0,3)	NEG (S/P <0,3)
	ELISAAC NS	NEG (%IB 0)	POS (%IB 82)	POS (%IB 58)	POS (%IB 59)	NEG (%IB 0)	NEG (%IB 4)	NEG (%IB 2)	NEG (%IB 13)
	ELISA VIRUS	POS (+3303 OD)	POS (+351 OD)	POS (+3549 OD)	POS (+3562 OD)	POS (+3715 OD)	NEG (+7 OD)	NEG (+3 OD)	NEG (+36 OD)
	rRT-PCR	POS (22 CT)	NEG	POS (23 CT)	POS (24 CT)	POS (23 CT)	NEG	NEG	NEG
	PCR BVDV-3	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
	TASSO GLOBULINE	1,6 g/lit	1,3 g/lit	1,8 g/lit	1,3 g/lit	1,0 g/lit	0,9 g/lit	1,3 g/lit	1,4 g/lit

- Un parto è stato gemellare (Id. 57).
- Esclusa la presenza di anticorpi materni.
- Rilevata presenza di anticorpi in un vitello, la rRT-PCR non è riuscita a rilevare in questo soggetto la presenza del virus in siero e sangue, maggior efficacia in cartilagine.
- Bassa positività ad anticorpi non strutturali nel parto gemellare riferibile a problemi di natura diagnostica.

Quadro riassuntivo relativo allo stato sierologico e virologico di vitelli nati da madre vaccinate e non vaccinate.

CONCLUSIONI

- Confermata la capacità di BVDV-3 di trasmettersi in linea verticale.
 - Il 100% (3/3) dei vitelli partoriti da bovine non vaccinate è risultato positivo.
- Il vaccino ha conferito una protezione a 4 dei 5 animali vaccinati (3 parti a termine più un aborto).
 - Non è chiaro quanto possa durare l'immunità conferita da questo vaccino nei confronti del genotipo 3.
- Infine come si sia potuta instaurare una immunità attiva in un vitello non è chiaro, un caso simile è stato descritto su un agnello da Decaro et al 2015.

Grazie dell'attenzione

Does Vaccination Of Pregnant Cows Against Bovine Viral Diarrhea Viruses Confer Foetal Protection Against Hobi-Like Pestivirus Infection?

Belfanti I., Decaro N., Lucente M.S., Buonavoglia C., Giammarioli M., Lucchese L., Cecchinato M., Martini M., Schiavo M., Lora M., Ceglie L., Nardelli S.

11th International Congress for Veterinary Virology – ESWV 2018, Vienna 27th – 30th August 2018

Progetto di ricerca corrente 01/2014 IZSve finanziato dal Ministero della Salute.