

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
“FEDERICO II”**



**TESI DI DOTTORATO  
IN**

**BIOLOGIA, PATOLOGIA E IGIENE AMBIENTALE IN  
MEDICINA VETERINARIA  
-XXVIII CICLO -**

**Valutazione della immunogenicità ed efficacia di un  
vaccino inattivato BoHV-1 gE marker nei confronti  
dell'infezione da BuHV-1 nel bufalo mediterraneo  
(*Bubalus bubalis*).**

Relatore e Tutor.

Chiar.mo Prof. Giuseppe Iovane.

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Giuseppe Cringoli

Candidato

dr. Giuseppe Parente

Anno Accademico 2014/2015

**ABSTRACT.....2**

**1. INTRODUZIONE.....4**

**1.1 ALPHA HERPESVIRUS ..... 7**  
1.1.1 BoHV-1..... 15  
FORMA RESPIRATORIA ..... 19  
FORMA GENITALE..... 21  
RISPOSTA IMMUNITARIA ..... 22  
DIAGNOSI ..... 24  
Profilassi ..... 25  
VACCINI DELETI ..... 29  
BoHV-1 NEL BUFALO ..... 33  
1.1.2 BuHV-1..... 34  
1.1.3 CORRELAZIONE TRA BoHV-1 E BUHV-1..... 36

**3. MATERIALI E METODI.....43**

**3.1 VIRUS E CELLULE ..... 43**  
**3.2 DISEGNO SPERIMENTALE ..... 43**  
**3.3 TEST DI NEUTRALIZZAZIONE VIRALE - CROSS-NEUTRALIZZAZIONE ..... 46**  
3.3.1 PROTOCOLLO DEL TEST DELLA NEUTRALIZZAZIONE VIRALE ..... 47  
**3.4 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAYS (ELISAs) ..... 49**  
3.4.1 PROTOCOLLO DEL TEST ELISA COMPETITIVA ..... 50  
**3.5 ISOLAMENTO DEL VIRUS ..... 52**  
**3.6 IDENTIFICAZIONE VIRALE ..... 53**  
**3.7 ANALISI STATISTICA ..... 55**

**4. RISULTATI .....56**

**5. DISCUSSIONE .....62**

## **ABSTRACT**

Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) and Bubaline herpesvirus type 1 (BuHV-1) are two closely related AlphaHerpesvirus able to infect water buffalo (*Bubalus bubalis*). In the present study, an inactivated marker BoHV-1 based vaccine against BuHV-1 challenge was evaluated to determine whether it induces protection from viral replication. One group of water buffalo calves was immunized with a killed BoHV-1 marker vaccine. A second group was not vaccinated and used as the control. During the post-vaccination period, we monitored the humoral immune response. The efficacy of the vaccine was tested after intranasal challenge of the calves with a BuHV-1 strain. The experiment showed that after vaccination, BuHV-1 replication was significantly reduced by approximately three titer points compared to the controls. The control animals showed high levels of viral shedding and mild signs associated with BuHV-1 infection. Therefore, our study provides evidence for the existence of cross-protection between BoHV-1 and BuHV-1 in buffalo calves.

## **ABSTRACT**

L'Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) e l'Herpesvirus bufalino tipo 1 (BuHV-1) sono due AlphaHerpesvirus in grado di infettare il bufalo d'acqua (*Bubalus bubalus*). In questo studio è stata valutata l'efficacia di un vaccino inattivato gE-deleto per BoHV-1 nei confronti di una infezione sperimentale da BuHV-1, per valutarne l'induzione della protezione nei confronti della replicazione virale. A questo scopo, un gruppo di vitelli bufalini è stato immunizzato con vaccino spento marker per BoHV-1. Un secondo gruppo è stato trattato con soluzione fisiologica ed usato come gruppo controllo. Durante il periodo post-vaccinale, abbiamo monitorato la risposta immunitaria umorale. L'efficacia del vaccino è stata testata in seguito ad infezione sperimentale per via intranasale con un ceppo di BuHV-1. L'esperimento ha mostrato che in seguito alla vaccinazione, la replicazione di BuHV-1 veniva notevolmente ridotta rispetto al gruppo controllo. Gli animali controllo hanno mostrato alti livelli di escrezione virale e lievi segni associati all'infezione con BuHV-1. Il presente studio ha quindi dimostrato l'esistenza di cross-protezione tra BoHV-1 e BuHV-1 nei vitelli bufalini.

## 1. INTRODUZIONE

In Italia il Bufalo D'acqua (*Bubalus bubalis*) rappresenta una risorsa rilevante sia dal punto di vista zootecnico che economico, in relazione alla produzione di latte destinato alla produzione della mozzarella di bufala campana DOP (Denominazione di origine protetta).

Questa specie è allevata principalmente in Italia centrale e meridionale, con una popolazione di approssimativamente 350.000 animali (National Livestock Database – B.D.N., 2010). In queste aree spesso bovini e bufali vengono allevati all'interno della stessa azienda.

Bufali e bovini sono specie strettamente correlate, anche se queste due specie (*Bos taurus* e *Bubalus bubalis*) appartengono alla famiglia *Bovidae*, non sono classificate nello stesso genere, per cui le conclusioni ottenute da ricerche condotte sui bovini non possono essere traslate nei bufali senza effettuare le appropriate verifiche. Infatti, sono state riportate differenze di sensibilità e specificità di test sierologici per la brucellosi tra bovini e bufali (Montagnaro et al., 2008). Un altro esempio può essere rappresentato da quanto evidenziato da Fosgate et al. (2003), il quale ha dimostrato che il vaccino vivo attenuato RB51 (SRB51) di *Brucella abortus*, somministrato alla dose raccomandata per i bovini,

non era in grado di proteggere il bufalo d'acqua dall'infezione in seguito alla naturale esposizione alla bio-variante 1 di *Brucella abortus*.

I membri della famiglia *Herpesviridae* sono virus a DNA che mostrano uno spettacolare successo evolutivo. Il nome, derivato dal greco ερπειν (herpein), "strisciare", si riferisce alle lesioni caratteristiche causate da due herpesvirus umani comuni: il virus herpes simplex (HSV) e l'herpesvirus varicella zoster (VZV). Questa famiglia di virus comprende quasi duecento virus isolati da ospiti diversi come i molluschi, pesci, anfibi, rettili, uccelli e mammiferi (Roizman and Pellet, 2001). In natura, la maggior parte dei virus erpetici sono strettamente associati con una singola specie ospite e quasi tutti gli ospiti di origine animale supportano adeguatamente l'infezione di almeno una specie di herpesvirus. La suscettibilità di ospiti agli herpesvirus indica che i virus si sono principalmente co-evoluti con i loro ospiti, portando ad uno stretto adattamento (Davison A.J., 2002).

La famiglia *Herpesviridae* è suddivisa in tre sottofamiglie, chiamate alfa, beta e *Gammaherpesvirinae*. La sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* contiene quattro generi: *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus* e *Illtovirus*. Questa sottofamiglia comprende virus caratterizzati da una grande gamma di ospiti, un ciclo replicativo breve e una capacità di indurre un'infezione latente principalmente, ma non esclusivamente, nei

neuroni(Roizman and Pellet, 2001). Tra gli *alphaherpesvis* che infettano i ruminanti, il prototipo è l' *herpesvirus bovino 1 (BoHV-1)*, un agente patogeno del bestiame associato a due principali sindromi, chiamate rinotracheite infettiva bovina (IBR) e vulvovaginite pustolosa infettiva (IPV), e una varietà di segni clinici, come la congiuntivite, encefalite e aborti (Pastoret et al., 1982). L'IBR è una malattia di grande rilevanza economica in molte parti del mondo e soprattutto in Europa, sia nei paesi in cui questa infezione è stata debellata che in quelli in cui il controllo della IBR è attualmente o sarà intrapresa (Thiry et al., 199)]. E' stato rilevato in molte specie di ruminanti(Thiry and Lemaire, 2001). Inoltre, diversi *alphaherpesvis* dei ruminanti correlati a BoHV-1 sono stati isolati e caratterizzati.

Il successo dei piani di controllo per IBR dipendono dall'uso di test diagnostici efficienti, sensibili e specifici. Tuttavia, poiché la maggior parte dei test diagnostici si basano sulla rilevazione di anticorpi policlonali in sieri, la loro specificità è compromessa dalla presenza di un cross-reattività sierologica tra BoHV-1 e questi *alphaherpesviruses* dei ruminanti strettamente correlati. Ciò può essere illustrato dalla situazione iniziale osservata in Finlandia. Nel 1982, il 23% di renne di questo paese aveva anticorpi contro BoHV-1, mentre tutti i bovini erano sieronegativi (Ek-Kommonen et al, 1982). Una analisi superficiale di

questi dati suggerisce un'infezione da BoHV-1 nelle renne con assenza di trasmissione al bestiame a causa di un'apparente mancanza di contatto tra i due ruminanti. Tuttavia, questa semplice ipotesi è stata rapidamente respinta. In effetti, da renne sieropositive per BoHV-1, un è stato isolato nuovo virus ulteriormente caratterizzato come CvHV-2. Questa infezione ha fornito una spiegazione probabile per la presenza di anticorpi anti CvHV-2 che cross-reagiscono con BoHV-1 nella renna (Ek-Kommonen et al., 1986). Nonostante questa situazione epidemiologica nella popolazione di renne, la popolazione bovina finlandese ha mantenuto uno stato indenne per IBR.

## **1.1 ALPHA HERPESVIRUS**

Gli Herpesvirus sono virus a DNA a doppio filamento con simmetria icosaedrica appartenenti al genere Herpesvirales ed alla famiglia Herpesviridae. Questi virus sono poi divisi in più sottofamiglie:

- **ALPHAHERPESVIRINAE**: caratterizzati da crescita rapida, scarsa selettività cellulare (cellule epiteliali, fibroblasti), abilità di lisare cellule infette e di determinare latenza principalmente (ma non esclusivamente) nel tessuto nervoso; come Herpes Simplex,

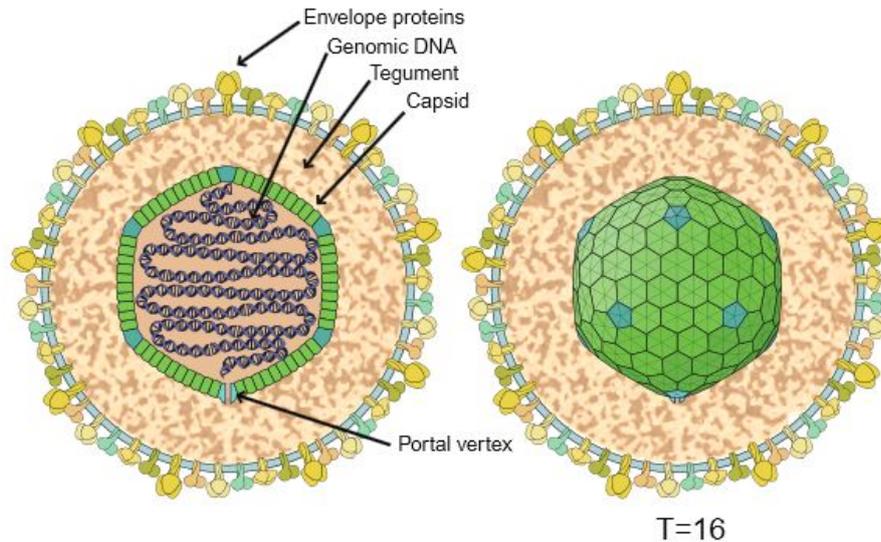
BHV-1, Malattia di Aujeszky, Esantema coitale, Herpesvirus canino (CHV), Rinotracheite virale infettiva felina, ecc..

- BETAHERPESVIRINAE: caratterizzati da crescita lenta, selettività cellulare (fibroblasti), latenza nelle ghiandole salivari e reni; come Cytomegalovirus del bovino e del cavallo, Rinite a corpi inclusi del suino, ecc..
- GAMMAHERPESVIRINAE: caratterizzati da crescita lenta in cellule linfoidi; come alcuni virus oncogeni, Virus della Malattia di Marek, Febbre catarrale Maligna, Adenomatosi polmonare, ecc

In particolare BoHV-1 e BuHV-1 sono Alphaherpesvirus appartenenti al genere Varicellovirus.

Il virione maturo ha dimensioni di 120-300 nm di diametro e presenta una struttura interna caratterizzata da un Core, contenente il genoma virale, che consiste in un DNA a doppio filamento, che codifica per 70 proteine (di cui 33 proteine strutturali e più di 15 non strutturali), protetto da un Nucleocapside a simmetria icosaedrica di 100-110 nm di diametro, composto da 150 esameri e 12 pentameri. Questa struttura è circondata da uno strato proteico Tegumentario, a sua volta circondato da un doppio strato lipidico che costituisce l'Envelope, contenente un gran numero di glicoproteine virali, tra cui gB, gD e gE, che danno origine a proiezioni

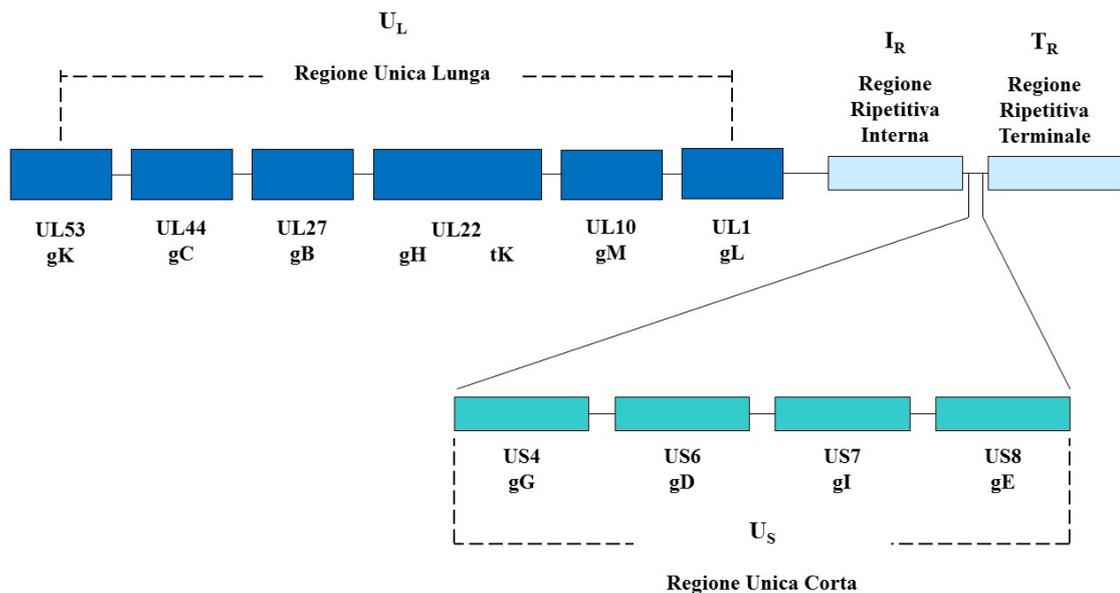
denominate “spikes”, con un importante ruolo nella patogenesi e nell’immunità. (Thiery et al., 2006)



**Figura 1: Rappresentazione grafica della struttura di un Varicellovirus.**

**(Foto tratta dal sito ViralZone dello Swiss Institute of Bioinformatics)**

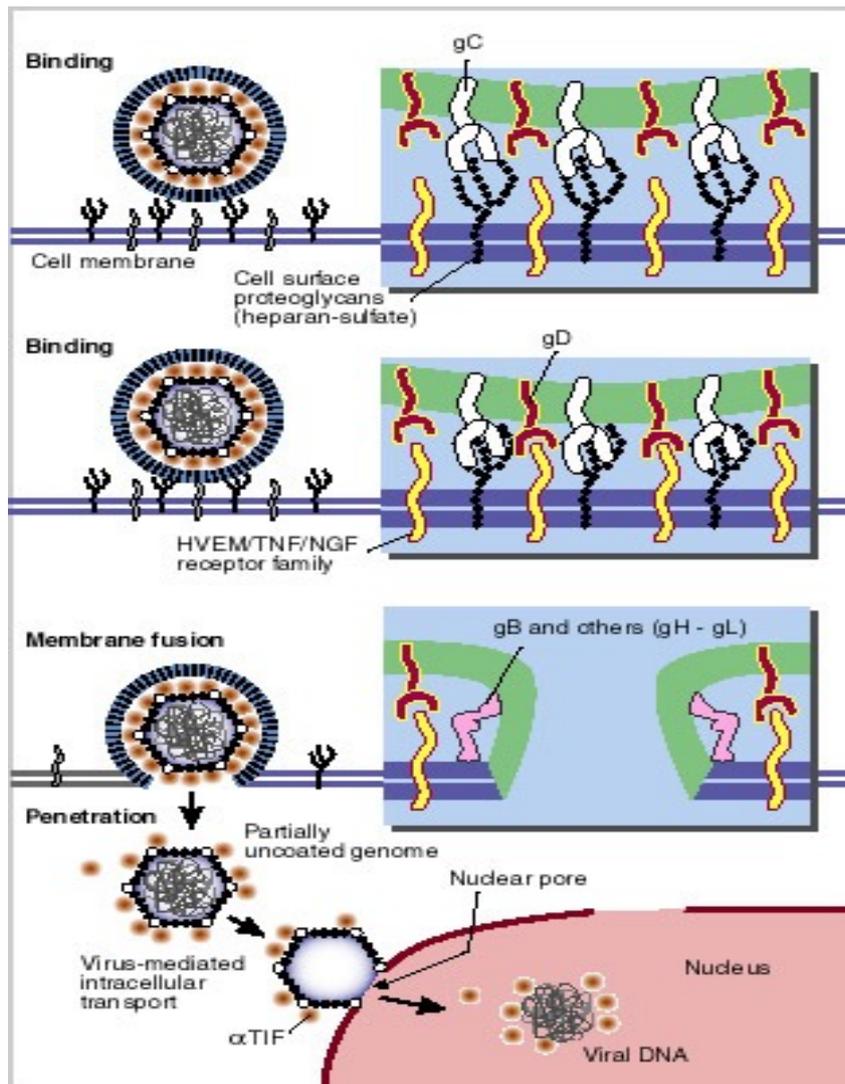
Il genoma consiste in un doppio filamento di DNA lineare, organizzato in un Unità Lunga ( $U_L$ ) ed un Unità Corta ( $U_S$ ), legate da due sequenze invertite ripetute chiamate Internal Repeat (IR) e Terminal Repeat (TR). Il genoma include 10 geni, che codificano per altrettante glicoproteine.



**Figura 2: Rappresentazione schematica della struttura del genoma di un AlphaHerpesvirus**

Il meccanismo di internalizzazione nella cellula ospite inizia con il legame tra il proteoglicano eparansolfato della superficie cellulare e la gC o gB virale. Fa seguito una specifica interazione con uno dei recettori cellulari chiamati “HVEM” (“Herpes Virus Entry Mediators”), collegati al fattore di crescita dei nervi ed al tumor necrosis factor. Questo legame coinvolge la gD e dà inizio alla fusione delle due membrane attraverso l’interazione di altri componenti cellulari e virali. L’ingresso si completa quando avviene la fusione dell’envelope virale con la membrana cellulare attraverso l’interazione delle glicoproteine gD, gB e l’eterodimero formato da gH e gL. Una volta penetrate nel citosol della

cellula ospite, le particelle virali migrano attraverso i pori nucleari utilizzando i meccanismi di trasporto della cellula ospite, probabilmente mediati da proteine del tegumento virale o componenti superficiali del capsido stesso. Solo il DNA virale con qualche proteina del tegumento, come alfa-TIF, entra nel nucleo, mentre le proteine tegumentarie vengono disperse nel citosol delle cellule infette, dove possono avere ruoli importanti nelle prime fasi dell'infezione, essendo le prime ad interagire con l'ambiente intracellulare.



**Figura 3: Rappresentazione grafica del meccanismo di internalizzazione nella cellula ospite ( Foto tratta dal sito:**

**<http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv4f.html>)**

La proteina tegumentaria VP8 è la più abbondante e si localizza nel nucleo subito dopo l'infezione grazie ad un segnale di localizzazione nucleare. La proteina tegumentaria VHS (Virion Host Shut-off),

codificata dall'U<sub>L</sub>41, determina una rapida interruzione della sintesi di proteine cellulari nelle cellule infette. Un'altra importante proteina è la VP16 (Virion Protein 16), conosciuta come  $\alpha$ -TIF (Transinducing factor of alpha genes – Fattore di transinduzione di geni alpha), responsabile dell'inizio dell'espressione genetica del virus, tramite la transattivazione dei geni IE (immediate Early) o geni alpha. E' possibile infatti distinguere l'espressione genetica virale in più fasi temporali: Immediate Early (IE), i cui geni  $\alpha$  sono essenziali per avviare la trascrizione virale; Early (E) o geni  $\beta$ , per la replicazione virale; Late (L) o fase  $\beta\gamma/\gamma$ , per l'espressione di una grande quantità di proteine strutturali, essenziali per la sintesi di una nuova progenie virale.

L'assemblaggio dei virioni è un processo complicato che prevede un iniziale assemblaggio delle proteine dello scheletro del capsido a formare un'impalcatura per la formazione di una prima particella virale all'interno del nucleo. Durante la maturazione, l'impalcatura proteica interna viene sostituita dall'interno del capsido, mentre il DNA viene impacchettato (Muylkens et al., 2007). Il capsido maturo attraversa la membrana nucleare tramite un doppio invaginamento della stessa, nel quale lega temporaneamente glicoproteine. Il capsido all'interno del nucleo è circondato da un primario tegumento proteico, che viene perso

attraversando la membrana nucleare. Il capside citoplasmatico è associato a numerose proteine del tegumento, come alfa-TIF e VHS, fondamentali per la costituzione dell'envelope. Esso si forma dalla membrana della vescicola di esocitosi, che contiene tutte le glicoproteine ad esso associate.

Dopo aver infettato la cellula, il virus può procedere con un'infezione produttiva o instaurare un'infezione latente, raggiungendo i neuroni dei gangli regionali per via assonale o tramite viremia. Il DNA virale che entra attraverso i pori nucleari può infatti circolarizzarsi nel DNA cellulare grazie ad enzimi "cellular DNA repair" che agiscono su sequenze "a", oppure rimanere lineare grazie all'azione di un IE (immediate early) proteina ICP0 (infected cell polypeptide), che inibisce "cellular DNA repair". Durante la latenza gli antigeni virali non vengono espressi, il virus non può essere isolato, ma il genoma resta vitale all'interno dei nuclei delle cellule ospiti (per cui evidenziabile tramite PCR). Le cellule con infezione latente non vengono distrutte, il virus non si replica e non trascrive proteine, ad eccezione delle proteine-LAT (trascrizione associata alla latenza). L'induzione dell'espressione di ICP0 determina poi la riattivazione dell'infezione latente. In ogni caso la latenza si instaura al termine della replicazione riproduttiva.

La virulenza di un ceppo è strettamente associata alle glicoproteine dell'envelope:

- Mutanti deficitarie in gC presentano infettività sensibilmente ridotta, anche se la funzione viene in parte recuperata da gB
- In assenza di gE l'infezione dei tessuti ha una durata inferiore, in quanto gE è coinvolta nel meccanismo di espulsione dei virioni dalla cellula ospite

(Patel J R, Didlick S, 2008)

### **1.1.1 BoHV-1**

Il primo riscontro del virus può essere ricondotto al 19° secolo, nella forma dell'Esantema Vescicolare Coitale. L'eziologia virale è stata dimostrata nel 1928 da Reisinger e Reimann. Fino agli anni '50 le manifestazioni della patologia erano confinate agli organi genitali, nella forma della Vulvovaginite Pustolosa Infettiva (IPV) nelle femmine e della Balanopostite Pustolosa Infettiva (IPB) nel maschio. Nei primi anni del 1950 si sono riscontrate le prime forme respiratorie in allevamenti del Nord America. Questa forma più grave di infezione, la Rinotracheite Infettiva del Bovino (IBR), si è diffusa rapidamente anche in Europa a

causa dell'importazione di capi infetti, con lo sviluppo dell'allevamento intensivo sia da latte che da carne. (Muylkens et al., 2007).

Ad oggi questo virus ha una distribuzione mondiale ed è diffuso in tutta Italia (solo la provincia autonoma di Bolzano è considerata indenne dall'UE) e in molti Paesi Europei, ad eccezione di Austria, Svizzera, Svezia, Norvegia, Finlandia, Danimarca e alcune aree della Baviera.

È responsabile di Rinotracheite infettiva (IBR) nel bovino, di una considerevole perdita economica dovuta ad una riduzione nella produzione di latte, perdita di peso ed aborto. Il largo spettro di sintomi clinici include rinotracheite, vulvovaginite pustolosa infettiva, balanopostite, congiuntivite, aborto, enterite ed encefalite (Muylkens et al., 2007).

Il virus è sensibile a molti disinfettanti, sopravvive nell'ambiente esterno per trenta giorni in inverno e per cinque-nove giorni in estate; nei mangimi può resistere per tempi molto lunghi; è stabile a temperatura inferiori ai  $-65^{\circ}\text{C}$ , dopo un anno a  $-20^{\circ}\text{C}$  la sua stabilità diminuisce; può sopravvivere nei contenitori di stoccaggio del seme. A  $+4^{\circ}\text{C}$  viene lentamente inattivato e completamente inattivato in 30 minuti a  $65^{\circ}\text{C}$ .

Il virus è stabile ad un pH tra 6 e 9 (stesso pH dell'apparato respiratorio e del tratto genitale).

Del BoHV tipo 1 esistono diversi sottotipi:

- BoHV-1.1: responsabile di Rinotracheite, Congiuntivite, Aborto, Encefalite
- BoHV-1.2: responsabile di infezioni genitali nel maschio e nella femmina
  - BoHV-1.2a: responsabile di Rinotracheite, Aborto
  - BoHV-1.2b: responsabile di Infezione Genitale
- BoHV-1.3: Agente Neuropatogeno nei vitelli, responsabile della Encefalite nel vitello (attualmente classificato come BoHV -5)

Tutti i ceppi di BoHV-1 isolati finora appartengono a una singola specie virale, e sono classificati in tre sottotipi BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b. Sebbene la maggior parte dei ceppi BoHV-1.1 siano stati isolati da malattie delle vie respiratorie o da casi di aborto mentre ceppi BoHV-1,2 da lesioni dell'apparato genitale, l'unico criterio distintivo affidabile è l'analisi del DNA virale mediante DNA fingerprinting e digestione mediante endonucleasi di restrizione (Engels et al., 1981; Metzler et al., 1985; Miller et al. 1991)

Infatti, vitelli infettati sperimentalmente per via nasale con BoHV-1.2 ceppi hanno mostrato segni clinici respiratori (*Edwards et al., 1991*;

*Spiliki et al., 2004*) e sono stati in grado di trasmettere l'infezione respiratoria in vitelli controllo (Edwards et al., 1991; *Smith et al., 1980*). Al contrario, lesioni del tratto riproduttivo in manze sono state osservate dopo l'inoculazione intrauterina con BoHV-1.1 (Miller et al, 1984). Sottotipi 1.1 e 1.2a sono stati associati con malattie gravi tra cui infezioni fetali ed aborto (Miller et al. 1991). Il sottotipo 1.2b non è stato associato con l'aborto (Edwards et al., 1990; Smith et al. 1991; Whetstone et al., 1989).

La trasmissione può avvenire:

- In maniera DIRETTA: tramite aerosol contenente particelle virali, monta, contatto delle mucose, contatto con placenti (notevole diffusione del virus tramite i cotiledoni placentari) o feti abortiti
- In maniera INDIRETTA: tramite embriotransfer o attraverso materiale seminale (in quanto il virus è in grado di passare nel seme e permanervi per lungo termine in seguito ad infezione balanoprepuziale e testicolare oppure durante la fase di viremia; inoltre il virus resiste molto bene al congelamento del seme e l'escrezione virale può essere intermittente, per l'alternanza di fasi di latenza e di riattivazione)

La principale fonte di trasmissione è costituita dagli animali infetti sintomatici, dove l'escrezione virale nei soggetti affetti da rinotracheite e da vulvovaginite pustolosa perdura per 1-2 settimane, mentre nel caso di balanopostite pustolosa l'escrezione perdura per 2-3 settimane.

La disseminazione avviene però anche a causa di animali infetti asintomatici, con infezioni con stipiti a bassa virulenza, infezioni a basse cariche virali, reinfezioni in seguito ad un calo dell'immunità, riattivazione di infezioni latenti.

A seconda del ceppo virale e della via di infezione, la patologia può manifestarsi clinicamente in due forme principali:

- RESPIRATORIA: RINOTRACHEITE (IBR)
- GENITALE: VULVOVAGINITE PUSTOLOSA (IPV) nella femmina o BALANOPOSTITE PUSTOLOSA nel maschio (IPB)

#### *FORMA RESPIRATORIA*

In seguito all'infezione per via aerogena, BoHV-1 replica ad alti titoli a livello delle membrane mucose delle prime vie respiratorie e delle tonsille. Segue poi una fase di viremia, con distribuzione ad utero, placenta, feto, ovaie e testicoli, che porta ad aborto ed infezione

neonatale sistemica; intestino, dove determina enteriti letali nei vitelli; SNC, con l'insorgenza di meningoencefaliti nei vitelli.

Successivamente, il virus si distribuisce alle congiuntiva e raggiunge il ganglio trigemino e glossofaringeo tramite trasporto neuronale assonale retrogrado, dove può determinare latenza, in cui il virus blocca la replicazione a causa della risposta immunitaria. Non si ha quindi moltiplicazione virale, non si ha formazione di nuovi virioni, né lesioni cellulari o stimolazione immunitaria ed i livelli di trascrizione e traduzione sono ridotti, il DNA virale circolarizza e rimane nel nucleo sotto forma episomiale, non integrato con il genoma cellulare. La riattivazione dell'infezione si ha in seguito a stress od immunodepressione, come per trasporti, vaccinazioni, malattie intercorrenti, utilizzo di farmaci corticosteroidi, parto, che permettono la moltiplicazione virale in periferia, raggiungendo la mucosa nasale mediante trasporto assonale anterogrado, la riescrezione virale e la ricomparsa della sintomatologia.

Ad un iniziale incubazione di 2-5 giorni, segue una fase acuta di 5-10 giorni, caratterizzata da:

- Sintomi respiratori, con tosse, scolo nasale e congiuntivale
- Febbre a 42°C
- Stato generale scadente, depressione, inappetenza

- Brusca caduta della produzione lattea
- Possibili complicazioni batteriche, responsabili di Polmonite
- ABORTO: segue di 3-6 settimane un focolaio di malattia respiratoria, si verifica prevalentemente fra il 5° e l'8° mese di gravidanza. Il feto è espulso dopo 2-3 settimane dalla morte e si riscontrano piccoli focolai necrotici a livello di fegato, reni, surreni, timo. In seguito all'aborto si può avere metrite.
- INFEZIONE NEONATALE SISTEMICA: l'infezione si instaura negli ultimi giorni di gravidanza o nei primissimi giorni di vita del vitello ed è caratterizzata da sintomi respiratori e gastroenterici ed una mortalità elevata. Nel caso di ceppi neurotropi si instaura una encefalite, con incoordinazione, eccitamento, opistotono, cecità e morte in 3 giorni.

### *FORMA GENITALE*

In seguito all'infezione genitale, BoHV-1 replica nelle membrane mucose vaginali o prepuziali e diventa latente in gangli sacrali. Il DNA virale rimane nei neuroni dei gangli in uno stato di latenza fino alla riattivazione, provocata da stress, come nel trasporto o al parto, ma anche dall'utilizzo di corticosteroidi.

L'incubazione dura da 1 a 3 giorni (successivi all'accoppiamento), successivamente si assiste alla comparsa di pustole di 2-3 mm sulla vulva e sulla regione caudale della vagina o sul glande ed il prepuzio, che tendono a confluire e poi ulcerare e guarire in 10-15 giorni.

### *RISPOSTA IMMUNITARIA*

A seguito dell'infezione primaria, le reazioni infiammatorie e cellulari non specifiche sono la prima risposta alla infezione da BoHV-1. Alcuni dei meccanismi non specifici sono costitutivi, come ad esempio l'attivazione del complemento mentre altri, quali la produzione di IFN, sono indotti dalla replicazione del virus. La produzione delle prime citochine porta al reclutamento e all'attivazione di diverse cellule come i macrofagi, neutrofili polimorfonucleati e grandi linfociti granulari (che agiscono come cellule Natural Killer nei bovini). Questi effettori migliorano la prima ondata antivirale secernendo citochine nell'epitelio infettato e uccidendo le cellule infettate dal virus (Campos et al., 1986; 1989). Le cellule immunitarie non specifiche attivate sono anche essenziali per l'avvio e la regolazione della risposta immunitaria specifica per BoHV-1 (Babiuk et al. 1994; Denis et al., 1994)

L'immunità cellulare specifica viene rilevata dal 5° giorno post infezione (pi) e raggiunge un picco a 7-10 giorni pi. Generalmente coincide con la

guarigione dalle manifestazioni cliniche (Babiuk et al., 1994) Specifici linfociti T helper mediano la lisi delle cellule infettate attivando macrofagi e le cellule NK attraverso la secrezione di IFN $\gamma$  e IL2 e promuovendo la proliferazione di linfociti T citotossici .

L'immunità umorale specifica diviene rilevabile dal giorno 10 pi. Anche se gli anticorpi sembrano essere meno importanti nella guarigione dell'infezione primaria, probabilmente partecipano a debellare l'infezione neutralizzando le particelle virali extra cellulari libere e mediando la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente. D'altra parte la risposta anticorpale è una risorsa fondamentale nella prevenzione delle infezioni secondarie nel limitare le conseguenze della riattivazione (Babiuk et al., 1994). Inoltre l'immunità passiva offerta da anticorpi colostrali è pienamente efficace a proteggere i vitelli neonati nei confronti delle forme neonatali sistemiche letali di infezione da BoHV-1 (Mechor et al., 1987). La risposta anticorpale compare quindi in 7-14 giorni dall'infezione primaria, con la produzione di anticorpi circolanti:

- Le IgM, prodotte nella prima fase dell'infezione e durante gli eventuali episodi di riattivazione
- Le IgG, anticorpi “di memoria”, che compaiono in un secondo momento, e che in particolare permangono più a lungo nelle infezioni respiratorie rispetto alle infezioni genitali.

Gli anticorpi persistono per anni, con fluttuazione dei titoli anticorpali per effetti booster causati da reinfezione e riattivazioni di infezioni latenti. Gli anticorpi materni sono trasferiti al vitello per via colostrale ed hanno una vita media di circa 3 settimane, anche se è possibile riscontarli in animali fino a 9 mesi di vita. (Mechor et al., 1987; OIE Terrestrial Manual 2010)

### *DIAGNOSI*

La diagnosi può avvenire con:

- METODI DIRETTI: su tamponi nasali prelevati in fase acuta, tamponi congiuntivali, vaginali, lavaggi prepuziali, feti abortiti, cotiledoni placentari e materiale seminale
  - Tecniche immunoenzimatiche
  - Immunofluorescenza
  - Esami colturali
  - PCR
  
- METODI INDIRETTI:
  - ELISA RICOMBINANTE, per la ricerca di anticorpi anti-gE
  - ELISA

## - SIERONEUTRALIZZAZIONE

(OIE Terrestrial Manual 2010, chapter 2.4.13 IBR/IPV)

### *Profilassi*

Secondo la qualifica OIE (2004/558/EC), affinché un Paese o zona possa essere definito indenne da IBR, la malattia o il suo sospetto devono essere denunciabili, nessun animale deve essere stato vaccinato negli ultimi 3 anni ed almeno il 99.8% degli allevamenti deve essere indenne da IBR

In un allevamento indenne da IBR, gli animali, il seme o gli embrioni introdotti in allevamento devono essere scortati da certificati che ne attestino la negatività all'infezione, tutti gli animali devono essere sottoposti ad indagini diagnostiche per due volte con risultato negativo, ad intervalli di 5-6 mesi e deve essere effettuato il controllo del latte su almeno cinque animali o su sangue per gli animali non in lattazione e per i maschi, per due volte con risultato negativo, ad intervalli di 5-6 mesi

Il mantenimento della qualifica si ottiene tramite indagini sierologiche su latte e sangue a cadenza annuale su un campione random della

popolazione bovina e tramite il controllo drastico della provenienza e della sierologia dei bovini importati.

Attualmente sono previsti Piani di Eradicazione in Piemonte, Veneto, Lombardia, Friuli Venezia Giulia, Provincia di Trento e Piani di Controllo in Lazio e Campania

Nello specifico in Campania, secondo quanto disposto dalla Deliberazione n° 2313 della Giunta Regionale, per la movimentazione di animali di età > ai 12 mesi verso allevamenti con capi da riproduzione, è obbligatorio effettuare un accertamento sierologico trenta giorni prima dello spostamento, riportando la data e l'esito degli accertamenti sierologici sul modello 4 di scorta. In particolare gli animali possono risultare Negativi all'IBR, nel caso di animali non infetti, risultati negativi alla ricerca di anticorpi totali; Negativi all'IBR ma Vaccinati, nel caso di animali non infetti vaccinati con vaccino deleto, che ne permette la distinzione, in quanto gli animali risultano positivi alla ricerca di anticorpi totali e negativi alla ricerca degli anticorpi anti-gE (sito di delezione); Positivi all'IBR, nel caso di animali infetti o vaccinati con vaccino tradizionale non deleto, che non ne permettono la

distinzione, in quanto gli animali risultano positivi sia alla ricerca di anticorpi totali che di anticorpi anti-gE.

Inoltre, sempre per quanto concerne la Campania, è fatto divieto di introduzione di bovini da riproduzione di età > ai 12 mesi, provenienti da altre Regioni Italiane e risultati positivi all'IBR.

La profilassi sanitaria basata sulla prevenzione prevede particolare attenzione all'Igiene dei ricoveri, tramite l'utilizzo di indumenti e calzari monouso o esclusivi per i tecnici che frequentano l'allevamento, la limitazione della frequentazione di altri allevamenti da parte del personale d'azienda, la limitazione dell'ingresso in allevamento di persone estranee, la particolare attenzione alle pulizie e disinfezioni dei ricoveri con cadenza periodica, il rispetto di un periodo di quarantena per i soggetti di nuova introduzione, il controllo della movimentazione di animali in occasione di fiere, mercati, alpeggio; nonché all'adozione di una Corretta gestione aziendale, evitando situazioni stressanti, quali affollamento, maltrattamento, manipolazioni superflue, limitando l'uso di farmaci immunosoppressori (come cortisonici) ed evitandone l'impiego su animali sieropositivi, utilizzando solo tori sieronegativi nella riproduzione e solo su capi sieronegativi, effettuando Embryo-Transfer con embrioni certificati provenienti da allevamenti indenni o

trattati con chimotripsina ed utilizzando colostro IBR-free, privo di anticorpi contro BHV-1, proveniente da madri sieronegative.

La profilassi immunizzante può essere effettuata mediante l'utilizzo di Vaccini inattivati, sicuri, capaci di ridurre la secrezione virale per titolo e giorni da 10 a 100 volte, ma che tuttavia richiedono ripetute inoculazioni, si dimostrano meno efficaci per le forme cliniche, non sono distinguibili dagli stipiti selvaggi e la loro efficacia dipende da dose, protocolli vaccinali, adiuvanti. Tra questi si possono distinguere

- Vaccini inattivati monovalenti IBR
- Vaccini inattivati monovalenti IBR deleti marker-gE<sup>-</sup>, che permettono di distinguere gli anticorpi vaccinali da quelli degli infetti
- Vaccini inattivati a subunità gD, costituiti da singole glicoproteine ad attività protettiva

In alternativa possono essere utilizzati Vaccini vivi attenuati, capaci di stimolare adeguatamente l'immunità locale, umorale e cellulo-mediata, proteggere contro le forme cliniche e di ridurre l'escrezione virale per titolo e giorni fino a 1000 volte; tuttavia, inducono una blanda infezione, hanno potenzialità abortigene ed anche questi non sono distinguibili dagli stipiti selvaggi. Tra questi possiamo distinguere

- Vaccini vivi attenuati monovalenti IBR
- Vaccini vivi attenuati termospecifici monovalenti IBR, modificati con acido nitroso
- Vaccini vivi attenuati TK<sup>neg</sup> (Timidina chinasi)
- Vaccini vivi attenuati monovalenti IBR deleti marker-gE<sup>neg</sup>, molto utili per distinguere i soggetti vaccinati da quelli infetti

### *VACCINI DELETI*

Gli obiettivi del controllo delle infezioni di BoHV-1 si sono evoluti negli ultimi decenni, da una semplice riduzione dell'impatto clinico ad una più complessa prevenzione della trasmissione virale.

La strategia DIVA, per la differenziazione degli animali infetti da quelli vaccinati, è stata ampiamente utilizzata da diversi Paesi Europei che hanno intrapreso programmi di controllo per l'eradicazione di BoHV-1 tramite vaccini marker gE deleti. Questi vaccini marker, inattivati o vivi attenuati, utilizzati assieme ad una rilevazione sierologica di anticorpi gE-specifici, permette la discriminazione degli animali infetti da quelli vaccinati (Lehmann D. et al., 2002; Van Oirschot J.T. et al., 1997).

L'efficacia dei vaccini DIVA è stata dimostrata in due esperimenti di campo. Nel primo è stata osservata una significativa riduzione della

sieroconversione gE in mandrie vaccinate con vaccini gE-deleti (Mars M.H. et al., 1930). Il secondo studio ha dimostrato l'efficacia di protocolli di vaccinazione ripetuti, utilizzando il vaccino inattivato o vivo attenuato gE delecto per BoHV-1, sia per la riduzione dell'incidenza della sierconversione per gE in bovini da latte, che per l'individuazione della prevalenza di animali gE-positivi nella mandria. (Dispas M. et al., 2004).

Questo studio ha inoltre sottolineato l'aumentata efficacia delle vaccinazioni ripetute a cadenza semestrale.

Nonostante la strategia DIVA si sia dimostrata efficace, presenta alcuni punti deboli (Beer M. et al., 2003). La valenza di questa strategia dipende dalla capacità del test diagnostico di rilevare anticorpi specifici per gE di BoHV-1, ma la sensibilità dell'unico test ELISA specifico per gE è di circa il 70 % (Kramps J.A. et al., 2004; Perrin B. et al., 1996)

Questo comporta un 30 % di falsi negativi a test individuali, ma è comunque sufficiente a garantire un'alta sensibilità per quanto riguarda le mandrie infette.

Un secondo svantaggio di questi test è dovuto ad una risposta immunitaria debole nei confronti di gE di BoHV-1 e di conseguenza

l'abilità di questo test di rilevare anticorpi per gE può essere ritardata fino a 42 giorni (Beer M. et al., 2003).

In ultimo bisogna menzionare 2 preoccupazioni di biosicurezza che riguardano i vaccini vivi attenuati gE deleti. È stato infatti dimostrato che il vaccino gE-deleto attenuato può indurre una infezione latente (Lemaire M. et al., 2001; Van Engelenburg F.A. et al., 1995) ed essere riescreto in seguito a riattivazione, sia in condizioni sperimentali (Lemaire M. et al., 2001) (Schynts F. et al., 2003) che di campo (Dispas M. et al., 2003). Tuttavia non vi sono indicazioni di una possibile permanenza di questo mutante deleto nella popolazione bovina. (Mars M.H. et al., 2000)

La seconda preoccupazione è legata alla possibile insorgenza di fenomeni di ricombinazione dovute a situazioni di coinfezione, che coinvolgono un BoHV-1 gE deleto in replicazione ed un ceppo di campo virulento di BoHV-1 (Thiry E. et al., 2005; Thiry E. et al., 2006).

La maggior parte dei vaccini è efficace nella prevenzione dei segni clinici in seguito all'infezione, ma nessuno è capace di prevenire a pieno l'infezione con ceppi altamente virulenti, che stabiliscono un'infezione latente e possono essere riescreti in seguito a riattivazione.

Nuove formulazioni vaccinali e nuovi protocolli sono stati sviluppati per ovviare a questi inconvenienti.

Risultati ambigui sono stati ottenuti testando le due forme del vaccino marker, inattivato ed attenuato. Quando somministrato due volte in bovini sieronegativi, il vaccino attenuato marker induceva una protezione virologica migliore in seguito all'infezione sperimentale, rispetto all'inattivato. (Bosch J.C. et al., 1996)

Tuttavia, il vaccino inattivato è risultato più efficace nel ridurre l'escrezione virale in vitelli in seguito alla riattivazione dell'infezione latente, rispetto alla forma attenuata. (Bosch J.C. et al., 1997)

Un approccio interessante consiste nel combinare il vaccino attenuato come iniezione primaria e quello inattivato come richiamo per completare la vaccinazione. Questo tipo di protocollo si è dimostrato il più efficace nel ridurre l'escrezione virale in seguito all'infezione sperimentale (Kerkhofs P. et al., 2003)

Per ridurre al massimo il rischio di riescrezione in animali carrier con infezioni latenti è necessaria l'adozione di uno schema vaccinale ad intervalli regolari di 6 mesi (Dispas M. et al., 2004; Muylkens et al., 2007)

### *BoHV-1 NEL BUFALO*

Sebbene in natura la maggior parte degli Alphaherpesvirus siano specie-specifici, in letteratura è descritta la capacità di tali virus erpetici di infettare altre specie animali.

Animali quali capre, pecore, cervi e renne sono stati infettati con successo con BoHV-1 in condizioni sperimentali (Thiry et al., 2007).

La suscettibilità del bufalo d'acqua all'infezione da BoHV-1 è stata dimostrata sia sierologicamente che virologicamente da Scicluna et al., 2010, tramite l'inoculazione di bufali di 5 mesi con un ceppo di campo di BoHV-1 isolato da bovini. Nonostante la presenza di questo virus nel bufalo d'acqua non sia associata ai gravi segni clinici che si è soliti osservare nelle infezioni da BoHV-1 nei bovini, si è dimostrata l'importanza di questa specie nel ruolo di reservoir di BoHV-1, specialmente nei casi in cui bovini e bufali vengono allevati assieme (Scicluna et al., 2010).

L'infezione naturale da BoHV-1 nel bufalo d'acqua è stata documentata per la prima volta da Fusco et al., in uno studio condotto tra il 2011 ed il 2012 su 65 campioni di bufali affetti da patologie ascrivibili all'azione dell'herpesvirus: rinotracheite, aborto e morte neonatale. Tramite PCR e pirosequenziamento è stato possibile isolare ed identificare il BoHV-1 in tamponi cervicali e vaginali di animali che avevano abortito e nei casi di

morte neonatale, escludendo tutti gli altri patogeni investigati (Bovine viral diarrhoea virus, Bovine coronavirus, Schmallenberg virus, Bluetongue virus, Border disease virus, Chlamydophila species, Coxiella burnetii, Leptospira species, Neospora caninum, Toxoplasma gondii, Ovine herpesvirus-2). Questi risultati indicano una maggiore gravità dell'infezione naturale rispetto a quella osservata sperimentalmente (da Scicluna et al., 2010), probabilmente legata ai numerosi fattori naturali che possono intervenire in un'infezione, quali la virulenza del ceppo virale, fattori di resistenza dell'ospite, l'età degli animali e le possibili infezioni batteriche concomitanti. Anche in questo studio si è sottolineata quindi l'importanza che il bufalo d'acqua può assumere per la diffusione del BoHV-1, e la necessità quindi di includere anche i bufali nei piani di eradicazione, soprattutto in Italia meridionale, dove spesso le due specie sono allevate assieme (Fusco et al., 2015).

### **1.1.2 BuHV-1**

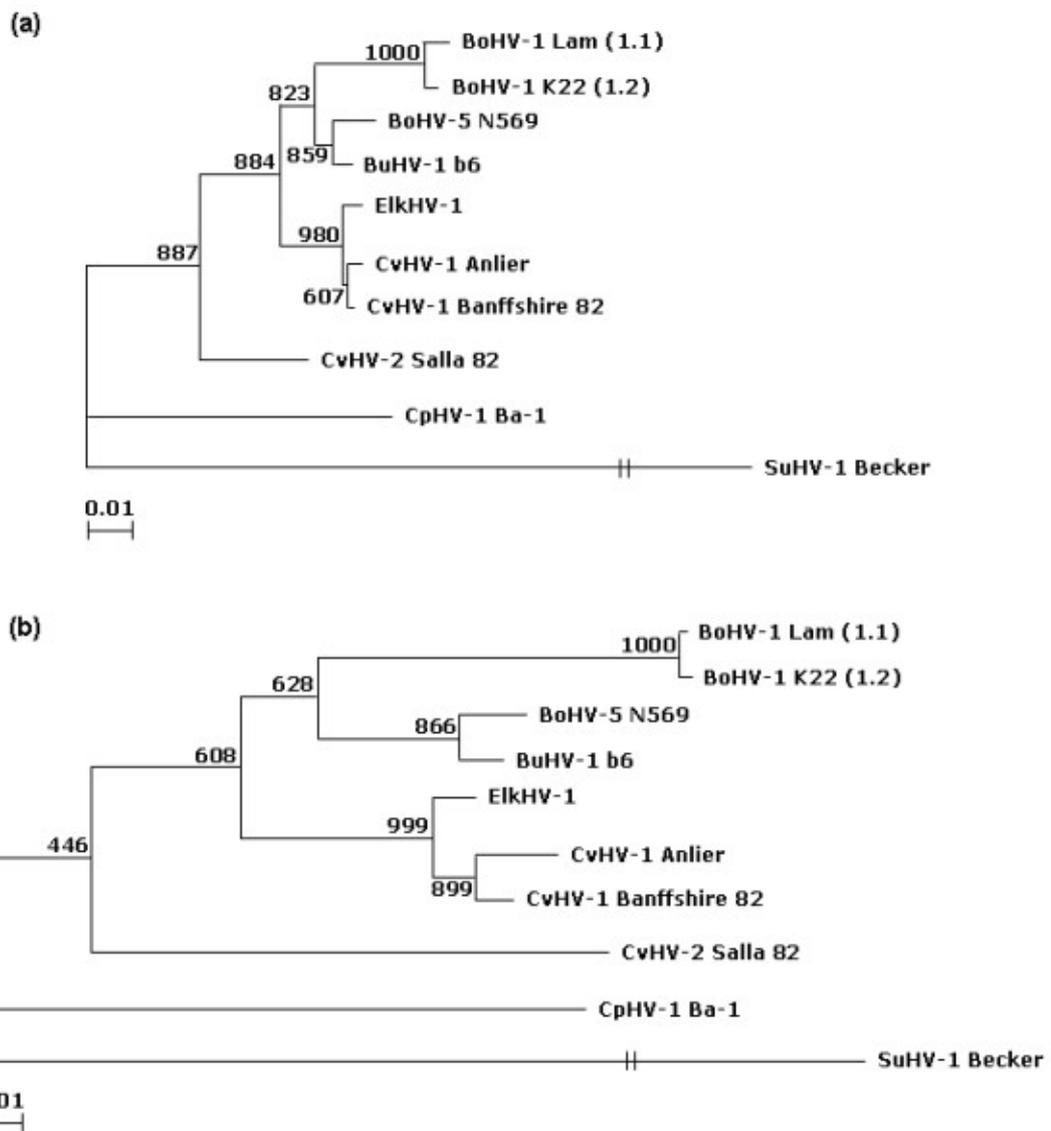
BuHV-1 è un Herpesvirus specie-specifico del bufalo d'acqua. Prove virologiche della suscettibilità dei bufali al BuHV-1 sono state descritte in uno studio sperimentale di riattivazione farmacologica in bufali naturalmente infettati (De Carlo et al., 2004) e prove di infezioni da BuHV-1 nella popolazione dei bufali sono state dimostrate

sierologicamente (Scicluna et al., 2007). Recentemente, Maidana et al. (2014), hanno isolato e caratterizzato dal punto di vista molecolare diversi ceppi di BuHV-1 in bufali in Argentina.

Isolato per la prima volta nel 1971 in Australia dal prepuzio di bufali d'acqua (St George and Philpott, 1972) e solo molti anni dopo in Italia meridionale in seguito a riattivazione farmacologica (De Carlo et al., 2004), il BuHV-1 è stato prevalentemente associato con malattie subcliniche nel bufalo d'acqua (St George and Philpott, 1972; Thiry et al., 2007°; Scicluna et al., 2010). Tuttavia risultati recenti dimostrano che le infezioni da BuHV-1 sono associate a gravi difficoltà respiratorie, evidenziate soprattutto in annutoli e caratterizzate da tosse, starnuti, rantoli, ipersecrezione nasale e congiuntivale; ipertermia al di sopra dei 41°C; inappetenza; depressione del sensorio e letargia. In alcuni animali si sono riscontrati anche sintomi enterici (diarrea) e un soggetto evidenziava arruffamento del pelo (Petrini et al., 2012). Ulteriori studi effettuati su feti abortiti provenienti da allevamenti bufalini in Italia meridionale hanno permesso di identificare un ceppo Mediterraneo particolarmente virulento di BuHV-1, in grado di determinare aborto nelle bufale, con una omologia del 99% (601 nucleotidi su 609) rispetto al ceppo b6 del BuHV-1, analizzata sulla similarità della sequenza nucleotidica per la gE (Amoroso et al., 2013).

### **1.1.3 CORRELAZIONE TRA BoHV-1 e BuHV-1**

BoHV-1 ha una stretta relazione antigenica e genetica con altri AlphaHerpesvirus di altri ruminanti, come il virus erpetico del bovino tipo 5 (BoHV-5), in grado di provocare meningo-encefalite nel vitello; il virus erpetico del bufalo tipo 1 (BuHV-1), responsabile di infezioni subcliniche nel bufalo; il virus erpetico della capra tipo 1 (CpHV-1), il quale induce malattia sistemica nei giovani animali e aborto nelle femmine gravide; il virus erpetico del cervo tipo 1 (CvHV- 1) responsabile di congiuntiviti nel cervo; il virus erpetico del cervo tipo 2 (CvHV-2) e il virus erpetico dell'alce tipo 1, responsabili di infezioni genitali subcliniche rispettivamente nel cervo e nell'alce. (Thiry et al., 2006)



**Figura 7: Albero filogenetico dedotto dalle sequenze nucleotidiche delle di UL27 - gB (a) ed US8 - gE (b) degli alphaherpesvirus dei ruminanti.**

**Figura tratta da “isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer” di Thiry et al, 2007**

Analisi filogenetiche hanno classificato più volte BoHV-1 e BuHV-1 come virus distinti ma con alte omologie (De Carlo et al., 2004; Ros and Belàk, 2002; Thit et al., 2007b) con una identità di sequenza nucleotidica del 96.6% per glicoproteina B (gB) e dell'86.5% per la glicoproteina E (gE).

	Nucleotide similarity										
	UL27	BoHV-1 Lam (1.1)	BoHV-1 K22 (1.2)	BoHV-5 N569	BuHV-1 b6	CpHV-1 Ba-1	CvHV-1 Banf. 82	CvHV-2 Salla 82	ElkHV-1	CvHV-1 Anlier	SuHV-1 Becker
Amino acid similarity	BoHV-1 Lam (1.1)		99	95.9	96.6	87.8	94.8	92.3	94.5	94.8	75.4
	BoHV-1 K22 (1.2)	100		95.7	96.1	87.8	94.5	92.1	94.5	94.5	75.2
	BoHV-5 N569	97.9	97.9		98.6	88.5	96.3	93.6	95.9	96.1	76.3
	BuHV-1 b6	97.2	97.2	99.3		88.9	96.8	93.6	96.6	96.8	76.5
	CpHV-1 Ba-1	88.5	88.5	88.5	87.8		88	88.7	88.2	87.8	75.6
	CvHV-1 Banf. 82	94.5	94.5	95.2	95.9	87.8		95	99.3	99.3	76.5
	CvHV-2 Salla 82	91.8	91.8	91.8	91.8	88.5	94.5		95.2	94.3	77.7
	ElkHV-1	94.5	94.5	94.5	94.5	88.5	98.6	95.9		98.8	75.9
	CvHV-1 Anlier	94.5	94.5	95.2	95.2	86.4	98.6	93.2	97.2		75.9
	SuHV-1 Becker	70.9	70.9	70.2	70.2	71.6	69.5	70.2	68.9	68.2	

**Figura 8: similarità nelle sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche di UL27 (gB) tra gli alphaherpesvirus dei ruminanti.**

**Figura tratta da “isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer” di Thiry et al, 2007**

	Nucleotide similarity										
	US8	BoHV-1 Lam (1.1)	BoHV-1 K22 (1.2)	BoHV-5 N569	BuHV-1 b6	CpHV-1 Ba-1	CvHV-1 Banf. 82	CvHV-2 Salla 82	ElkHV-1	CvHV-1 Anlier	SuHV-1 Becker
Amino acid similarity	BoHV-1 Lam (1.1)		99.4	85.3	86.5	76.2	83.4	76.5	83.7	83.1	50.2
	BoHV-1 K22 (1.2)	99		85	86.6	76.3	83.6	76.5	83.9	83.2	50
	BoHV-5 N569	76.4	75.9		96.5	74.8	87.3	80.6	88.3	87	53.9
	BuHV-1 b6	78.8	79.8	92.7		76.8	89	80.9	90	88.8	54
	CpHV-1 Ba-1	59.7	60.1	59.3	61.2		77.8	76.3	78.6	77.8	50.2
	CvHV-1 Banf. 82	69.8	70.8	76.4	79.8	60.2		82.6	97.5	97.3	53.2
	CvHV-2 Salla 82	64.5	65	67.3	69.8	60.2	70.3		82.7	82.4	52.9
	ElkHV-1	69.8	70.8	77.8	81.2	61.2	94.2	70.8		96.2	53.9
	CvHV-1 Anlier	70.3	71.2	76.4	80.2	57.8	95.1	69.8	92.3		52.4
	SuHV-1 Becker	25	25	30.4	30.7	25.8	28.7	25.3	29.1	27.2	

**Figura 9: Similarità nelle le sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche di US8 (gE) tra alphaherpesvirus dei ruminanti. Figura tratta da “isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer” di Thiry et al, 2007**

Questa forte relazione genetica ed antigenica tra BoHV-1 e BuHV-1 presenta implicazioni per programmi di diagnosi ed eradicazioni, in quanto i test sierologici di routine non sono capaci di discriminare tra anticorpi diretti contro BoHV-1 o BuHV-1.

## **2. OBIETTIVO DEL LAVORO**

La prevenzione ed il controllo delle infezioni da BoHV-1 è basata sulle buone pratiche di gestione, incluse le misure igieniche, gli schemi vaccinali, l'accertamento della siero negatività dei nuovi animali introdotti in allevamento e la rimozione degli animali infetti dalla mandria.

I vaccini normalmente prevengono il manifestarsi dei segni clinici e riducono marcatamente la diffusione del virus in seguito all'infezione, portando quindi ad una riduzione delle perdite economiche; tuttavia, i vaccini non sono in grado di prevenire in maniera completa le infezioni.

Diverse campagne di eradicazione sono state effettuate in passato e tutt'ora in diversi paesi, compresi programmi di test e rimozione o ancora campagne di vaccinazione (OIE Manual, 2010).

In paesi con un'alta prevalenza di infezioni da virus di campo, il controllo di BoHV-1 è raggiunto tramite la vaccinazione dei bovini con vaccini marker-glicoproteina E-negativa (Strube et al., 1996; de Wit et al., 1998) analoghi alle precedenti campagne di vaccinazione DIVA (differentiating infected from vaccinated animals-differenziante gli animali infetti dai vaccinati). Diverse strategie di vaccinazione sono state valutate in passato ed è stato dimostrato che l'utilizzo di vaccini vivi modificati (MLVs) potrebbe ridurre l'escrezione del virus contratto più

efficientemente che nel caso dell'utilizzo di vaccini inattivati (Bosch et al., 1996). Per questo motivo, nell'ottica di un programma di controllo o di eradicazione, quando la mandria presenta un alto tasso di animali infetti, sembra ragionevole vaccinare i bovini con vaccini-DIVA su base regolare durante specifici periodi, e monitorare il numero di bovini infetti. Per ottenere questo scopo, i vaccini convenzionali non sono adatti, in quanto la risposta anticorpale che inducono non può essere differenziata da quella indotta dall'infezione (EFSA, 2005).

Uno studio di campo nei Paesi Bassi, riguardante l'efficacia dei vaccini vivi modificati (MLVs), ha rivelato che sia l'incidenza che la trasmissione delle infezioni da BoHV-1 in mandrie vaccinate con vaccini marker era marcatamente ridotta; tuttavia per ottenere una riduzione del virus di campo, sono necessarie misure addizionali, come la previsione di un periodo di quarantena prima dell'introduzione di nuovi animali nella mandria (Bosch et al., 1998; Mars et al., 2001).

Poiché non esiste un vaccino commercializzato rivolto nei confronti del BuHV-1, è possibile sfruttare l'immunizzazione contro BoHV-1, che potrebbe potenzialmente proteggere i ruminanti dal contrarre l'infezione dal proprio herpesvirus.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'immunogenicità e l'efficacia indotte da un vaccino marker inattivato per BoHV-1 nei confronti di un'infezione da BuHV-1.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 VIRUS E CELLULE**

Sono stati utilizzati un ceppo Cooper di BoHV-1 ed un ceppo b6 di BuHV-1 (St George and Phipott, 1972) gentilmente fornito dalla Dottoressa Scicluna M.T., dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, e sono stati inoculati in cellule di rene di bovino Madin-Darby (MDBK) cresciute in Dulbecco Minimal Essential Medium (DMEM), con l'aggiunta del 5% di siero fetale bovino (SFB). Questa linea cellulare è stata conservata incontaminata da micoplasmi e dal Virus della Diarrea Virale (BVDV).

#### **3.2 DISEGNO SPERIMENTALE**

Nell'esperimento sono stati impiegati venti vitelli bufalini tra i 4 ed i 6 mesi di vita (10 maschi e 10 femmine) sierologicamente negativi sia per BoHV-1 che per BuHV-1, come verificato tramite neutralizzazione virale, gB e gE ELISA. Gli animali sono risultati virologicamente negativi per BVDV tramite test ELISA commerciale effettuato sui leucociti (Idexx, France). I vitelli provenivano da un allevamento commerciale esente da problematiche legate al BoHV-1 e sono stati

nutriti con alimenti commerciali privi di antibiotici, con l'aggiunta di fieno ed acqua ad libitum.

Gli animali sono stati divisi in due gruppi da 10 in maniera random. Il primo gruppo (5 maschi e 5 femmine) consisteva in vitelli bufalini che avevano ricevuto una prima vaccinazione con vaccino inattivato gE-marker (Bovilis® IBR marker inactivated – MSD Animal Health Italy) alla dose raccomandata per i vitelli bovini secondo un protocollo di immunizzazione comprendente una prima somministrazione ed un booster dopo 28 giorni ( 60 unità ELisa in grado di indurre 6.1 - 11.1 log<sub>2</sub> unità Virus Neutralizzanti nel modello murino /2 ml IM).

Il secondo gruppo (di controllo) consisteva di vitelli bufalini (5 maschi e 5 femmine) che erano stati inoculati con soluzione salina.

Dopo la vaccinazione, sono stati raccolti campioni di sangue con intervalli settimanali per 7 settimane.

I due gruppi sono stati stabulati separatamente su terreno cementato coperto da una lettiera di paglia. Sono state adottate tutte le precauzioni necessarie per evitare la dispersione virale. Nuovi guanti sono stati utilizzati per il trattamento dei singoli individui all'interno dei gruppi e le procedure dei trattamenti sono state identiche in entrambi i gruppi.

In seguito all'infezione, i vitelli sono stati esaminati clinicamente per 15 giorni da un veterinario estraneo al trattamento. I parametri valutati

includevano alterazione dello stato generale, valutazione della temperatura rettale, ingrossamento dei linfonodi superficiali, scolo oculare, sintomi respiratori ed enterici. La temperatura rettale è stata misurata ogni mattina allo stesso orario. Per queste specie, viene considerata febbre una temperatura rettale superiore ai 38.2°C (Aguggini et al., 2001).

Tutte le procedure di gestione e sperimentazione sugli animali sono state condotte sotto la supervisione veterinaria, in accordo con il corrente Regolamento Europeo sulla Sperimentazione Animale. Il Comitato Etico dell'Università di Napoli "Federico II" (ET 03/07) ha approvato il protocollo sperimentale.

Per tutti gli animali in entrambi i gruppi, la temperatura rettale è risultata normale e nessun animale ha mostrato alcun segno clinico di malattia. Vestiti e stivali sono stati cambiati prima di entrare in stalla. Prima del trattamento, i vitelli sono stati esaminati clinicamente ed è stata registrata la temperatura rettale per escludere eventuali malattie concomitanti.

Al 90° giorno dopo il trattamento, gli animali appartenenti al primo gruppo (Gruppo A) sono stati infettati con un titolo di  $10^8$  TCID<sub>50</sub> di BuHV-1 (1.5 ml in ogni narice di ogni singolo animale).

Dopo l'infezione, sono stati prelevati tamponi nasali per 15 giorni, inserendo tamponi nel meato nasale ventrale ed immergendoli

immediatamente dopo in 5ml di DMEM contenenti 5000UI di penicillina/ml, 2500 µg di streptomina/ml e 10 µg amphotericina B/ml.

### **3.3 TEST DI NEUTRALIZZAZIONE VIRALE - CROSS-NEUTRALIZZAZIONE**

Il test di neutralizzazione virale è stato effettuato come descritto nel Manuale di Test Diagnostici e Vaccini per Animali Terrestri (OIE Manual, 2010), usando il ceppo Cooper di BoHV-1 come virus e cellule MDBK come linea cellulare. La stessa procedura è stata seguita con il ceppo b6 del BuHV-1 su cellule MDBK. I campioni sono stati esaminati da una diluizione iniziale di 1:2, ottenuta in seguito all'aggiunta dell'antigene e sono stati ritenuti positivi qualora presentassero un titolo superiore o uguale a questa diluizione. Tutti i sieropositivi sono stati esaminati ad un titolo finale, espresso in log<sub>10</sub>, usando una diluizione in due tempi, come precedentemente descritto da Scicluna et al. (2010). La sieroconversione è stata definita come un aumento del log<sub>10</sub> di 1.2, corrispondente ad un aumento del titolo superiore di 4 volte rispetto al titolo del siero dello stesso animale al giorno 0. Un test di cross-neutralizzazione è stato effettuato per valutare i sieri di tutti gli animali, appartenenti al gruppo dei vaccinati e dei controlli, nei diversi giorni

post-infezione (dpc). Sono stati testati i sieri dai gruppi infettati con BoHV-1 o BuHV-1 nei confronti dei due virus.

### **3.3.1 PROTOCOLLO DEL TEST DELLA NEUTRALIZZAZIONE VIRALE**

Il metodo della neutralizzazione virale è basato sulla proprietà di alcuni anticorpi, anticorpi neutralizzanti, di interferire e bloccare l'infettività del virus, generalmente bloccandone il legame al recettore. Un set di anticorpi viene mescolato ad una preparazione virale e l'infettività del virus viene misurata su cellule indicatori.

Il protocollo prevede:

1. Inattivazione del siero, compreso il controllo standard, in bagnomaria a 56°C per 30 min
2. Diluizione doppia del siero nel medium della coltura cellulare. Utilizzando una piastra da microtitolazione da 96 pozzetti e partendo da siero non diluito, riempiendo almeno 3 pozzetti per diluizione con 50 µl per pozzetto. Prevedendo un pozzetto extra con siero non diluito per il controllo della tossicità
3. Aggiungere 50 µl di BoHV-1/BuHV-1 per pozzetto ad una diluizione nel medium di coltura calcolata per ottenere 100-200 TCID<sub>50</sub> per pozzetto. Nel pozzetto controllo per la tossicità

aggiungere 50 µl di medium di coltura, al posto del virus.  
Aggiungere 100 µl di medium di coltura in 10 pozzetti vuoti per il controllo cellulare

4. Effettuare almeno quattro diluizioni da 10 del virus residuo dallo stock nel medium di coltura, usando 50 µl per pozzetto ed almeno 4 pozzetti per diluizione
5. Incubare le piastre a 37°C per 24 h
6. Aggiungere 100 µl di sospensione cellulare al  $3 \times 10^4$  per pozzetto
7. Incubare le piastre a 37°C per 3-5 giorni
8. Lettura al microscopio per la valutazione dell'effetto citopatico. Validare il test controllando la titolazione virale (che dovrebbe dare un valore di 100 TCID<sub>50</sub> con un range accettabile di 30-300 TCID<sub>50</sub>), il siero di controllo ed i pozzetti delle cellule controllo
9. I risultati del test sono espressi come il reciproco della diluizione del siero che ha neutralizzato il virus nel 50% dei pozzetti. Se il 50% dei pozzetti con siero non diluito ha neutralizzato il virus, il titolo è letto come 1. Se tutti pozzetti non diluiti ed il 50% dei pozzetti con siero diluito della metà hanno neutralizzato il virus, allora il titolo è 2. Per risultati qualitativi, qualsiasi neutralizzazione ad un titolo  $\geq 1$  è considerato positivo. Se è stata osservata tossicità nei pozzetti di controllo, il campione è

considerato tossico, a meno che non sia stata osservata neutralizzazione virale in assenza di citotossicità a diluizioni maggiori e sia possibile la lettura di un titolo senza ambiguità. Laddove la citotossicità del siero interferisca con l'interpretazione dell'attività neutralizzante del campione, il cambio del medium nei pozzetti delle ultime 2 o 3 diluizioni, effettuato 16-24h dopo l'aggiunta di cellule, può rimuovere l'effetto citotossico

(OIE Terrestrial Manual 2010, Chapter 2.4.13. – IBR/IPV).

### **3.4 Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs)**

I sieri campione sono stati testati per gli anticorpi contro BoHV-1 con test commerciali di ELISA Competitiva (HerdChek1, Idexx, France), specifici per glicoproteina B (gB) e glicoproteina E (gE) del BoHV-1 (Kramps et al., 1994).

Questo tipo di saggio competitivo coinvolge l'uso del coniugato anticorpo-enzima, con l'antigene immobilizzato sulla fase solida. La reazione di competizione avviene fra l'antigene immobilizzato e quello libero in soluzione come standard o proveniente dal campione, nei confronti dell'anticorpo marcato presente in concentrazione fissa e in difetto. La misura del prodotto della reazione enzimatica sarà

indirettamente proporzionale alla concentrazione di antigene presente nel campione.

### **3.4.1 PROTOCOLLO DEL TEST ELISA COMPETITIVA**

Il principio dell'ELISA Competitiva per la misurazione di specifici anticorpi è basato sull'inibizione del legame di un antigene su gB/gE con il corrispondente anticorpo monoclonale da parte di specifici anticorpi presenti nel campione testato. La presenza di anticorpi nei campioni in esame comporta una riduzione della reazione colorimetrica che si sviluppa dopo l'aggiunta di un substrato o una soluzione cromogena.

Il protocollo prevede:

1. Preparazione dell'antigene, tramite crescita di BoHV-1 in cellule di coltura. Quando è possibile osservare un esteso effetto citopatico, le cellule ed il medium vengono congelate a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Dopo lo scongelamento, il lisato cellulare ottenuto viene centrifugato a 1000 giri per 20 min ed il surnatante viene centrifugato ad 8500 giri per 4 ore. Il pellet contenente il virus viene sospeso in un volume ridotto di PBS (Tampone Fosfato Salino), raffreddato in ghiaccio e disgregato utilizzando un disintegratore ultrasonico alla massima potenza ( 3 volte, per 15

secondi l'una). La preparazione dell'antigene viene poi centrifugata ad 800 giri per 10 min ed usata ad una diluizione appropriata per rivestire le piastre da ELISA.

2. Aggiunta di 100  $\mu$ l di antigene diluito (in 0.05 M tampone carbonato, PH 9.6) ad ogni pozzetto. Chiudere le piastre, incubare a 37°C per una notte e conservare a -20°C.
3. Coniugazione di un anticorpo monoclonale selezionato per la sua specificità nei confronti di gB di BoHV-1 con l'enzima HRP (Perossidasi di Rafano), seguendo il metodo descritto da Wilson e Nakane. Il coniugato è stato dializzato contro PBS, dopodichè è stato aggiunto glicerolo ad una concentrazione finale del 50% ed è stato conservato a -20°C. Prima dell'uso, il coniugato è stato diluito alla concentrazione appropriata nel Buffer dell'ELISA (0.01 M di idrogenofosfato di sodio, 0.5 M NaCl, 0.001 M Na<sub>2</sub>EDTA, 0.05% Tween 80, PH 7.3). La soluzione del substrato è stata preparata aggiungendo 55 mg di ABTS cromogeno e 50  $\mu$ l di perossido d'idrogeno al 30% a 100 ml di buffer di acido citrico a 0.05 M, pH 4.5.
4. Sciacquare le piastre con 0.05% di Tween 80. Aggiungere 100  $\mu$ l di siero negativo (siero fetale vitellino FCS), 100  $\mu$ l di ogni siero

campione, 100 µl di siero positivo. Chiudere le piastre ed incubare a 37°C per una notte.

5. Sciacquare le piastre ed aggiungere 100 µl dell'anticorpo monoclonale coniugato all'HRP ed incubare a 37°C per 1 h.
6. Sciacquare le piastre ed aggiungere il substrato o la soluzione cromogena
7. Incubare a temperatura ambiente per 1-2 h
8. Misurare l'assorbanza della piastra con un fotometro a 405 nm.
9. Calcolare la percentuale bloccata di ogni campione testato
10. Un campione è considerato positivo se la percentuale di blocco è  $\geq$  al valore di cut-off. Il test è ritenuto valido se il siero di controllo positivo è positivo ed il siero di controllo negativo reagisce negativamente al test

(Kramps et al., 1994)

### **3.5 ISOLAMENTO DEL VIRUS**

I tamponi nasali sono stati inoculati su un monostrato di cellule MDBK, immediatamente dopo la raccolta, come indicato di seguito:

- 0.1 ml di fluidi nasali sono stati inoculati in piastre per microtitolazione da 96 pozzetti;
- Sono state testate 10 diluizioni seriali in 4 pozzetti;
- I monostrati cellulari sono stati poi osservati dopo due giorni per la valutazione dell'effetto citopatico (CPE), caratterizzato dalla presenza di cluster a grappoli di cellule rotondeggianti raggruppati intorno a spazi vuoti nel monostrato; talvolta è possibile notare la presenza di cellule giganti con diversi nuclei. Il titolo virale è stato calcolato usando il metodo Reed e Muench (1938)

$$\frac{(\% > 50) - 50}{(\% > 50) - (\% < 50)}$$

### **3.6 IDENTIFICAZIONE VIRALE**

Gli isolati virali estratti sono stati caratterizzati tramite Reazione a Catena della Polimerasi (PCR) e il sequenziamento è stato effettuato secondo il metodo di Amoroso et al. (2013).

Il DNA virale è stato prelevato dal surnatante delle colture di cellule MDBK ed è stato amplificato con i seguenti primers:

- buHV-gEF1: (50-CGAGACGTGCATCTTCCACC-30);
- buHV-gER1: (50-GGCTCGTTGGTCGGC-30)

Il mix della reazione consisteva in:

- 100 ng DNA
- 15 pmol di ogni primer
- 2mM di Cloruro di Magnesio (MgCl<sub>2</sub>)
- 10% DMSO
- 0.2 mM di ogni deossinucleotide-trifosfato (dNTP)
- 1U di enzima Taq polimerasi dell'organismo *Thermus Aquaticus*,  
Taq gold (Roche)
- 1 buffer (Roche)

Il profilo termico era di:

- 95°C per 10 min
- 35 cicli a 95°C per 1 min
- 60°C per 1 min
- 72°C per 1 min
- Ultimo passaggio di allungamento finale a 72°C per 7 min

Il prodotto della PCR è stato poi riamplicato usando il protocollo descritto, ad eccezione della temperatura di *annealing* (a cui avviene il legame dei primer ai filamenti di DNA denaturati) di 62°C (e non 60°C).

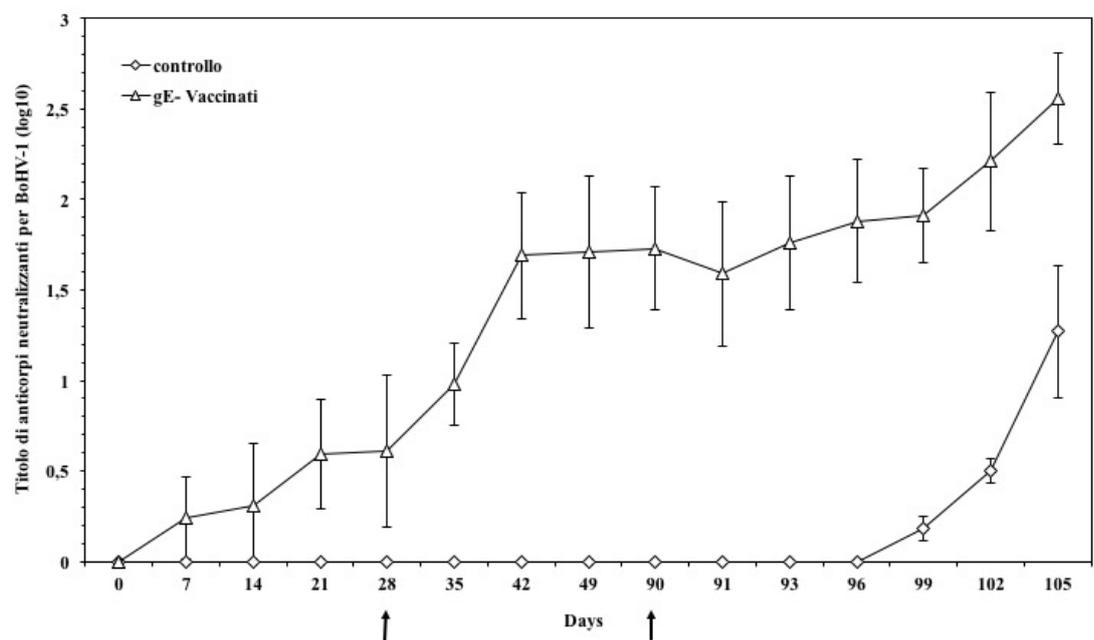
Le amplificazioni sono state purificate utilizzando un kit di purificazione Qiaquick e sequenziate bidirezionalmente dalla Primm srl (Milano – Italy). Le sequenze sono state analizzate utilizzando il software BioEdit (BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.2, Ibis Therapeutics; Carlsbad, CA, USA) ed il metodo di allineamento CLUSTALW.

### **3.7 ANALISI STATISTICA**

È stata effettuata una comparazione dello status vaccinale durante il periodo della sperimentazione utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) per misurazioni ripetute, con la correzione dei livelli di significatività di Greenhouse and Geisser, utilizzando la versione 3.06 per Windows del Graph Pad InStat. Le comparazioni post-ANOVA sono state effettuate usando il test Bonferroni. È stato usato il Wilcoxon Test per comparare i risultati di escrezione virale tra gli animali vaccinati ed il gruppo controllo (di animali non vaccinati) usando il medesimo software. In tutti i casi, risultati  $P \leq 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

## 4. RISULTATI

Nel gruppo vaccinati non sono stati osservati segni clinici in seguito alla vaccinazione né all'infezione. In seguito all'infezione con BuHV-1, gli animali del gruppo di controllo hanno presentato ipertermia transitoria al giorno 2-5 post-infezione, accompagnata da secrezione nasale



sieromucosa in 5 animali.

I risultati del Test di Neutralizzazione Virale (VNT) sono riportati in Fig.10.

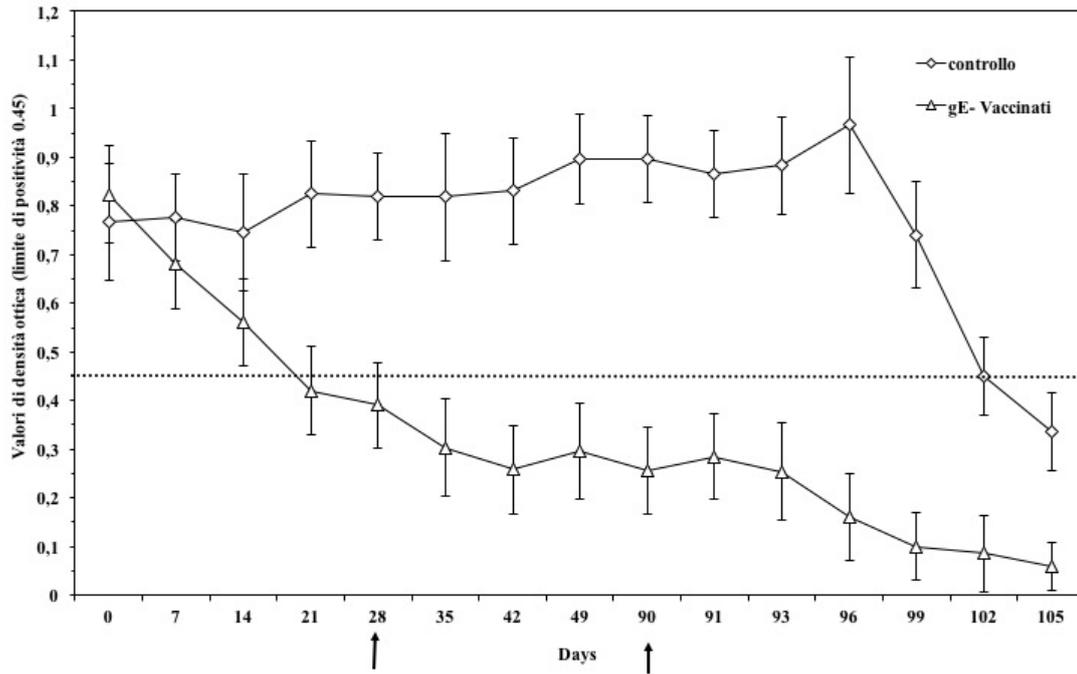
**Figura 10: Titolo di anticorpi neutralizzanti per gruppo trattati prima e dopo infezione con BuHV-1. La prima freccia indica il booster, la seconda freccia indica il giorno dell'infezione (90 dpv)**

Dopo la vaccinazione, tutti gli animali vaccinati hanno mostrato un aumento significativo del titolo di anticorpi neutralizzanti nel siero ( $P < 0.05$ ). Gli animali vaccinati hanno mostrato sieroconversione al giorno 35 post-vaccinazione, mentre gli animali del gruppo controllo (trattati con soluzione salina) sono rimasti sieronegativi fino all'infezione. Gli anticorpi neutralizzanti hanno raggiunto il massimo livello al 42° giorno post-vaccinazione, con un titolo di 1.7 ( $\log_{10}$ ) e questi livelli sono stati mantenuti fino all'infezione sperimentale.

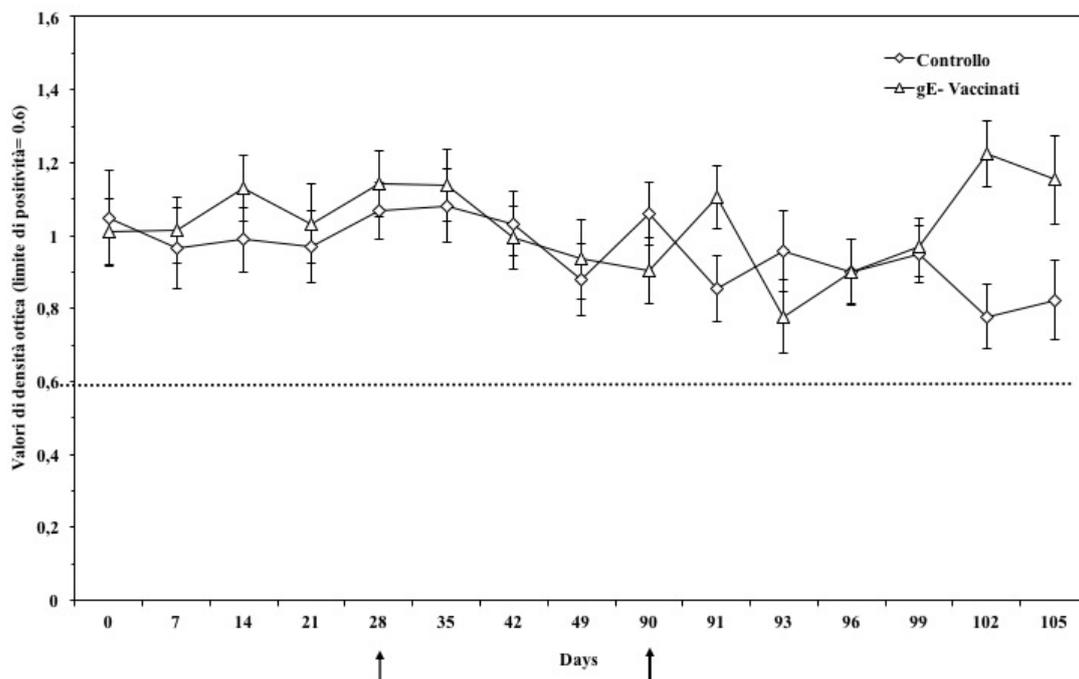
In seguito all'infezione, è stato misurato un aumento del titolo di anticorpi neutralizzanti verso BoHV-1/BuHV-1 in tutti gli animali. Il gruppo di animali vaccinati ha mostrato un picco più alto del titolo anticorpale in seguito all'infezione sperimentale, rispetto al gruppo di controllo ( $P < 0.05$ ), raggiungendo un titolo massimo di 2.6  $\log_{10}$  al giorno 105 post-vaccinazione.

Non sono state notate differenze significative nei titoli anticorpali mediante test di cross-neutralizzazione tra i due gruppi trattati.

I risultati ottenuti utilizzando i test ELISA per gB e gE di BoHV-1 sono riportati nelle Figure 11 e 12, rispettivamente.



**Figura 11: Valori della densità ottica degli anticorpi nei confronti di gB per gruppi trattati, prima e dopo infezione con BuHV-1. La prima freccia indica il booster, la seconda freccia indica il giorno dell'infezione (90 dpv). La linea tratteggiata indica il cut-off**

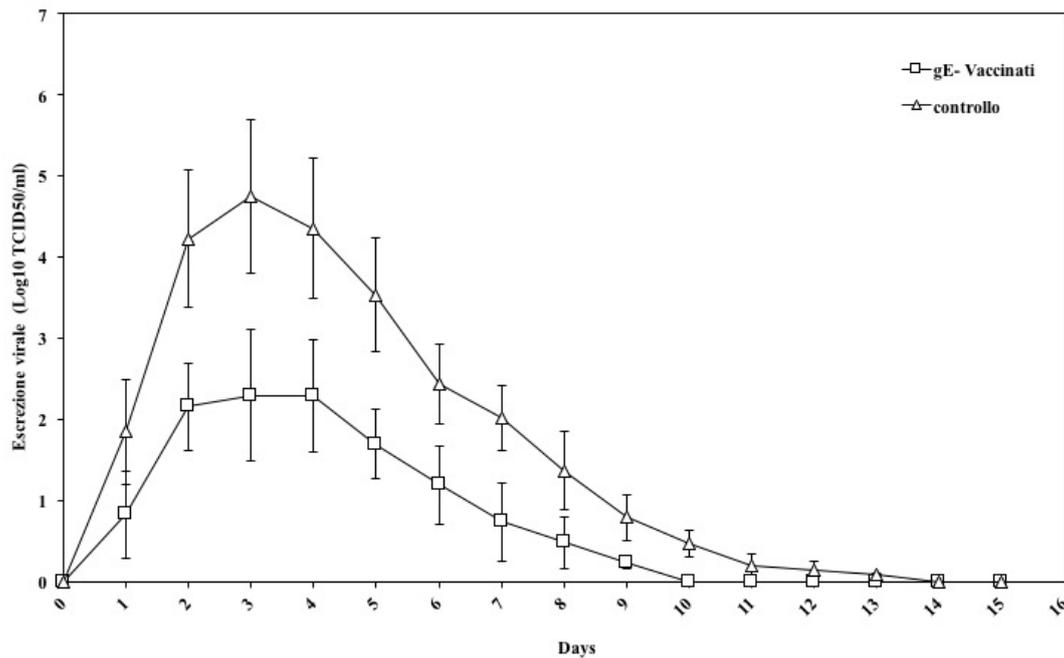


**Figura 12: Valori di densità ottica degli anticorpi nei confronti di gE per gruppi trattati, prima e dopo infezione con BuHV-1. La prima freccia indica il booster, la seconda freccia indica il giorno dell'infezione (90 dpv). La linea tratteggiata indica il cut-off**

Durante il periodo post-vaccinazione gli animali appartenenti al gruppo di controllo non hanno mostrato nessuna reazione rilevabile sierologicamente ai due test ELISA. Al contrario tutti gli animali vaccinati hanno reagito positivamente al test ELISA per gB, ma non hanno reagito al test ELISA per gE.

In particolare, per il test ELISA per gB di BoHV-1, tutti gli animali vaccinati sono risultati positivi al 35° giorno post-vaccinazione, ma non hanno mai mostrato sierconversione nel test ELISA gE.

Le analisi relative alle titolazioni dei tamponi nasali hanno mostrato una riduzione significativa dell'escrezione virale nel gruppo dei vaccinati, in comparazione al gruppo di controllo ( $P < 0.05$ ). Nel gruppo di controllo è stato possibile isolare il BuHV-1 fino all'11° giorno post-infezione, mentre nel gruppo dei vaccinati è stato possibile fino al 8° giorno post-infezione (Fig. 13).



**Figura 13: Titolo di escrezione nasale del virus per gruppi trattati, prima e dopo l'infezione con BuHV-1. I titoli sono espressi come log TCID50/ml delle secrezioni nasali.**

I ceppi virali escreti sono stati tutti caratterizzati come BuHV-1 tramite PCR e sequenziamento. Tutti gli animali di controllo hanno mostrato alti livelli di escrezione virale. Il periodo di escrezione virale è stato approssimativamente di 10 giorni ed i livelli più alti sono stati raggiunti al 3° giorno post- infezione. La vaccinazione ha portato ad una riduzione significativa dell'escrezione virale, riducendo l'escrezione di circa 3 unità logaritmiche in comparazione al gruppo non vaccinato, infettato con BuHV-1.

## **5. DISCUSSIONE**

Lo scopo di questo studio è stato di valutare la risposta immunitaria umorale e la protezione indotta nel bufalo d'acqua da un vaccino inattivato gE-marker per BoHV-1 nei confronti di un'infezione con un ceppo di BuHV-1.

Nonostante non vi siano attualmente in commercio vaccini contro BuHV-1, è possibile sfruttare una precedente immunizzazione contro BoHV-1, che potrebbe proteggere i ruminanti infetti dai loro Herpes Virus.

I risultati mostrano che un vaccino inattivato gE-marker è stato capace di indurre immunità protettiva. Gli animali di controllo hanno mostrato alti livelli di escrezione virale e lievi segni associati all'infezione da BuHV-1, mentre i vitelli bufalini immunizzati con il vaccino marker inattivato per BoHV-1 hanno mostrato una riduzione significativa della escrezione virale e non hanno mostrato segni clinici.

Abbiamo quindi osservato cross-protezione tra BoHV-1 e BuHV-1 in vitelli bufalini e questo potrebbe spiegare la rara occorrenza di segni clinici da BuHV-1, in particolare in quelle regioni dove si riscontra una

coesistenza di infezioni di BoHV-1 e BuHV-1, come analogamente riportato per BoHV-1 e BoHV-5 da Del Mèdico Zajac et al. nel 2006.

I bufali hanno sviluppato una risposta anticorpale all'infezione BoHV-1, in seguito alla vaccinazione per BoHV-1, simile a quella dimostrata nei bovini (*Bos Taurus*) (EFSA 2005; Scicluna et al., 2010; Muylkens et al., 2007). Infatti Patels et al. (2005), hanno dimostrato in vitelli bovini vaccinati, che gli anticorpi per BoHV-1 venivano inizialmente riscontrati tra i 12 ed i 28 giorni post vaccinazione.

In infezioni sperimentali effettuate su vitelli con BoHV-1, la protezione è comunemente valutata in termini di livelli di escrezione virale, periodo di escrezione virale post-infezione e gravità delle forme cliniche, in comparazione agli animali non vaccinati. Siccome solo gli animali di controllo hanno sviluppato lievi sintomi respiratori ed hanno mostrato un'alta escrezione virale, si può concludere che la vaccinazione con BoHV-1 ha ridotto l'escrezione virale ( $P < 0.05$ ) ed i segni clinici associati con l'infezione da BuHV-1.

Considerato l'alto grado di somiglianza tra i due virus, sia dal punto di vista antigenico che molecolare, questo risultato era prevedibile (De Carlo et al., 2004; Ros and Bèlak, 2002; Tity et al., 2007b), infatti anche Del Mèdico Zajac et al. (2006) hanno evidenziato cross-protezione tra BoHV-1 e BoHV-5, due Alpha Herpes Virus molto simili, che anche

presentano determinanti antigenici in comune. Cross-protezione è stata anche dimostrata in capre immunizzate con vaccino gE-negativo per BoHV-1, mostrando una riduzione significativa della durata e del picco della escrezione virale nonché protezione clinica a seguito di infezione sperimentale per via genitale con CpHV-1 (Thity et al., 2007a).

I risultati ottenuti mediante test ELISA per gE hanno mostrato assenza di sieroconversione verso gE in entrambi i gruppi, mentre per gB i risultati sono stati positivi sia negli animali controllo che nei soggetti vaccinati. La cross-reazione tra Alpha-Herpesvirus correlati al BoHV-1 rende la discriminazione sierologica molto difficile, a causa delle similarità antigeniche tra di loro (Nixon et al., 1998; Martin et al., 1990; Lyaku et al., 1992; Thity et al., 2006°). I nostri dati, come già suggerito da Scicluna et al. (2007), hanno dimostrato che è possibile effettuare una discriminazione sierologica tra bufali infetti da BoHV-1 e BuHV-1, tramite un doppio test ELISA per gB/gE. Tuttavia, i nostri risultati hanno dimostrato chiaramente che i bufali vaccinati con vaccino inattivato gE-marker e quelli infetti da BHV-1 presentano pattern sierologici in comune e questo indica che è necessario sviluppare un test specifico che possa chiaramente discriminare tra gli animali infetti da BuHV-1 e gli animali vaccinati con vaccino gE-marker. Questo aspetto è attualmente oggetto di ulteriori studi e recentemente Nogarol et al., (2014) hanno

messo a punto una ELISA per la ricerca di anticorpi verso la glicoproteina E di BuHV1 nei ruminanti.

In conclusione, i nostri dati dimostrano che un vaccino-marker-inattivato, inizialmente designato al controllo delle infezioni da IBR nei bovini, ed utilizzato alla dose raccomandata per i bovini, può indurre una risposta immunitaria protettiva e ridurre l'escrezione virale nei bufali, minimizzando i sintomi legati all'infezione con BuHV-1. È comunque da rilevare che i risultati della presente sperimentazione tengono conto esclusivamente di quanto ottenuto in seguito ad un challenge eseguito 90 giorni dopo l'iniziale immunizzazione. Sarebbe interessante poter valutare i risultati conseguenti a prove di challenge eseguiti ad intervalli di tempo maggiore al fine di poter valutare la durata dell'immunità del suddetto vaccino nel bufalo d'acqua, nonché gli effetti della immunizzazione in prove di riattivazione farmacologica dell'infezione latente. Non è stato possibile eseguire tali prove per chiari limiti di tempo, ma soprattutto disponibilità economiche per lo svolgimento di tali prove.

Si deve sottolineare che la necessità di effettuare il controllo IBR nei bufali utilizzando vaccini marker è di particolare preoccupazione nelle zone in cui piani di eradicazione IBR sono in corso, come ad esempio in

Italia. Al momento è difficile prevedere l'impatto del BuHV-1 nel contesto di un programma di eradicazione di BoHV-1 nel bufalo.

Ulteriori studi dovranno essere effettuati per indagare il ruolo patogenetico del BuHV-1 in bufale e bovine gravide.

## BIBLIOGRAFIA:

- Aguggini, G., Beghelli, V., Giulio, L.F., 2001. Fisiologia degli animali domestici con elementi di Etologia. UTET.
- Amoroso, M.G., Corrado, F., De Carlo, E., Lucibelli, M.G., Martucciello, A., Guarino, A., Galiero, G., 2013. Bubaline herpesvirus 1 associated with abortion in a Mediterranean water buffalo. *Res. Vet. Sci.* 94, 813–816.
- Babiuk L.A., van Drunen Littel-van den Hurk S., Tikoo S.K., Immunology of bovine herpesvirus 1 infection, *Vet. Microbiol.* (1996) 53:31–42.
- Babiuk L.A., van Drunen Littel-van den Hurk S., Tikoo S.K., Immunology of bovine herpesvirus 1 infection, *Vet. Microbiol.* (1996) 53:31–42.
- (B.D.N.) Banca Dati Nazionale dell'anagrafe zootecnica istituita dal Ministero della Salute presso il CSN dell'IZS Abruzzo e Molise–2010: <http://statistiche.izs.it/portal/page?pageid=73,12918&dad=portal&schema=PORTAL&op=elenco rep&p report=plet rep bov&p titolo= Bovini%20e%20Bufalini, December 2013>.
- Beer M., Konig P., Schielke G., Trapp S., Diagnostic markers in the prevention of bovine herpesvirus type 1: possibilities and limitations, *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* (2003) 116:183–191.
- Bosch J.C., Kaashoek M.J., van Oirschot J.T., Inactivated bovine herpesvirus 1 marker vaccines are more efficacious in reducing virus excretion after reactivation than a live marker vaccine, *Vaccine* (1997) 15:1512–1517.
- Bosch, J.C., De Jong, M.C., Franken, P., Frankena, K., Hage, J.J., Kaashoek, M.J., Maris-Veldhuis, M.A., Noordhuizen, J.P., Van der Poel, W.H., Verhoeff, J., Weerdmeester, K., Zimmer, G.M., Van Oirschot, J.T. An inactivated gE-negative marker vaccine and an experimental gD-subunit vaccine reduce the incidence of bovine herpesvirus 1 infections in the field. *Vaccine* (1998) 16, 265–271.
- Bosch, J.C., Kaashoek, M.J., Kroese, A.H., van Oirschot, J.T. An attenuated bovine herpesvirus 1 marker vaccine induces a better

protection than two inactivated marker vaccines. *Vet. Microbiol.* (1996) 52, 223–234.

- Campos M., Ohmann H.B., Hutchings D., Rapin N., Babiuk L.A., Lawman M.J., Role of interferon-gamma in inducing cytotoxicity of peripheral blood mononuclear leukocytes to bovine herpesvirus type 1 (BHV-1)-infected cells, *Cell. Immunol.* (1989) 120:259–269.
- Campos M., Rossi C.R., Cytotoxicity of bovine lymphocytes after treatment with lymphokines, *Am. J. Vet. Res.* (1986) 47:1524–1528.
- Davison A.J., Evolution of the herpesviruses, *Vet. Microbiol.* 86 (2002) 69–88.
- De Carlo, E., Re, G.N., Letteriello, R., Del Vecchio, V., Giordanelli, M.P., Magnino, S., Fabbi, M., Mazzocchi, C., Bandi, C., Galero, G., 2004. Molecular characterisation of a field strain of bubaline herpesvirus isolated from buffaloes (*Bubalus bubalis*) after pharmacological reactivation. *Vet. Rec.* 154, 171–174.
- De Wit, J.J., Hage, J.J., Brinkhof, J., Westenbrink, F., 1998. A comparative study of serological tests for use in the bovine herpesvirus 1 eradication programme in The Netherlands. *Vet. Microbiol.* 61, 153–163.
- Del Médico Zajac, M.P., Puntel, M., Zamorano, P.I., Sadir, A.M., Romera, S.A., 2006. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Res. Vet. Sci.* 81, 327–334.
- Denis M., Splitter G., Pastoret P.-P., Babiuk L.A., Infectious bovine rhinotracheitis (bovine herpesvirus 1): helper T cells, cytotoxic T cells and NK cells, CRC Press, Boca Raton, 1994.
- detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Vet Immunol Immunopathol.* 2008 Sep 15;125(1-2):135-42.
- Dispas M., Lemaire M., Speybroeck N., Berkvens D., Dupont A., Boelart F., Dramaix M., Vanopdenbosch E., Kerkhofs P., Thiry E., Deux protocoles d’hyperimmunisation au moyen de vaccins marqués réduisent l’incidence de séroconversion envers l’herpèsvirus bovin 1 en cheptels laitiers : résultats d’une étude sur le terrain, *Ann. Med. Vet.* (2004) 148:47–61.
- Dispas M., Schynts F., Lemaire M., Letellier C., Vanopdenbosch E., Thiry E., Kerkhofs P., Isolation of a glycoprotein E-deleted bovine herpesvirus type 1 strain in the field, *Vet. Rec.* (2003) 153:209–212.)
- Edwards S., Newman R.H., White H., The virulence of British

- isolates of bovid herpesvirus 1 in relationship to viral genotype, *Br. Vet. J.* (1991) 147:216–231.
- Edwards S., White H., Nixon P., A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the UK, *Vet. Microbiol.* (1990) 22:213–223.
  - EFSA-European Food Safety Authority, 2005. Definition of a BoHV-1-free animal and a BoHV-1-free holding, and the procedures to verify and maintain this status. *EFSA J.* 311, 1–20.
  - Ek-Kommonen C., Pelkonen S., Nettleton P.F., Isolation of a herpesvirus serologically related to bovine herpesvirus 1 from a reindeer (*Rangifer tarandus*), *Acta Vet. Scand.* 27 (1986) 299–301.
  - Ek-Kommonen C., Veijalainen P., Rantala M., Neuvonen E., Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus 1 in reindeer, *Acta Vet. Scand.* 23 (1982) 565–569.
  - Engels M., Steck F., Wyler R., Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis, *Arch. Virol.* (1981) 67:169–174.
  - Fosgate, G.T., Adesiyun, A.A., Hird, D.W., Johnson, W.O., Hietala, S.K., Schurig, G.G., Ryan, J., Diptee, M.D., 2003. Evaluation of brucellosis RB51 vaccine for domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Trinidad. *Prev. Vet. Med.* 58, 211–225.
  - Fusco G, Amoroso MG, Aprea G, Veneziano V, Guarino A, Galiero G, Viscardi M. First report of natural BoHV-1 infection in water buffalo. *Vet Rec.* 2015 Aug 8;177(6):152.
  - Huemer H.P., Larcher C., van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L.A., Species selective interaction of Alphaherpesvirinae with the “unspecific” immune system of the host, *Arch. Virol.* (1993) 130:353–364.
  - Kerkhofs P., Renjifo X., Toussaint J.F., Letellier C., Vanopdenbosch E., Wellemans G., Enhancement of the immune response and virological protection of calves against bovine herpesvirus type 1 with an inactivated gE-deleted vaccine, *Vet. Rec.* (2003) 152:681–686.)
  - Koppers-Lalic D., Reits E.A., Rensing M.E., Lipinska A.D., Abele R., Koch J., Marcondes Rezende M., Admiraal P., van Leeuwen D., Bienkowska-Szewczyk K., Mettenleiter T.C., Rijsewijk F.A., Tampe R., Neefjes J., Wiertz E.J., Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5- mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2005) 102:5144– 5149.

- Koppers-Lalic D., Rijsewijk F.A., Verschuren S.B., van Gaans-Van den Brink J.A., Neisig A., Rensing M.E., Neefjes J., Wiertz E.J., The UL41-encoded virion host shutoff (vhs) protein and vhs-independent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1, *J. Gen. Virol.* (2001) 82:2071–2081
- Kramps, J.A., Magdalena, J., Quak, J., Weerdmeester, K., Kaashoek, M.J., Maris-Veldhuis, M.A., Rijsewijk, F.A., Keil, G., van Oirschot, J.T., 1994. A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2175–2181.
- Kramps J.A., Banks M., Beer M., Kerkhofs P., Perrin M., Wellenberg G.J., van Oirschot J.T., Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe, *Vet. Microbiol.* (2004) 102:169–181
- Lehmann D., Sodoyer R., Leterme S., Crevat D., Improvement of serological discrimination between herpesvirus-infected animals and animals vaccinated with marker vaccines, *Vet. Microbiol.* (2002) 86:59–68.
- Lemaire M., Schynts F., Meyer G., Georgin J.P., Baranowski E., Gabriel A., Ros C., Belak S., Thiry E., Latency and reactivation of a glycoprotein E negative bovine herpesvirus type 1 vaccine: influence of virus load and effect of specific maternal antibodies, *Vaccine* (2001) 19:4795–4804.
- Lyaku, J.R., Nettleton, P.F., Mardsen, H., 1992. A comparison of serological relationships among five ruminant alphaherpesviruses by ELISA. *Arch. Virol.* 124, 333–341.
- Maidana SS, Konrad JL, Craig MI, Zabal O, Mauroy A, Thiry E, Crudeli G, Romera SA. First report of isolation and molecular characterization of bubaline herpesvirus 1 (BuHV1) from Argentinean water buffaloes. *Arch Virol.* 2014 Nov;159(11):2917–23.
- Mars M.H., de Jong M.C., van Oirschot J.T., A gE-negative BHV1 vaccine virus strain cannot perpetuate in cattle populations, *Vaccine* (2000) 18:2120–2124
- Mars, M.H., de Jong, M.C., Franken, P., van Oirschot, J.T. Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. *Vaccine* (2001) 19, 1924–1930.
- Martin, W.B., Castrucci, G., Frigeri, F., Ferrari, M., 1990. A serological comparison of some animal herpesviruses. *Comp.*

Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 13, 75–84.

- Mechor G.D., Rousseaux C.G., Radostits O.M., Babiuk L.A., Petrie L., Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows, *Can. J. Vet. Res.* (1987) 51:452–459.
- Mechor G.D., Rousseaux C.G., Radostits O.M., Babiuk L.A., Petrie L., Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows, *Can. J. Vet. Res.* (1987) 51:452–459.
- Metzler A.E., Matile H., Gassmann U., Engels M., Wyler R., European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies, *Arch. Virol.* (1985) 85:57–69.
- Miller J.M., Van der Maaten M.J., Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus, *Am. J. Vet. Res.* (1984) 45:790–794.
- Miller J.M., Whetstone C.A., Van der Maaten M.J., Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA, *Am. J. Vet. Res.* (1991) 52:458–461.
- Miller J.M., Whetstone C.A., Van der Maaten M.J., Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA, *Am. J. Vet. Res.* (1991) 52:458–461.
- Muylkens, B., Thiry, J., Kirten, P., Schynts, F., Thiry, E., 2007. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.* 38, 181–209.
- Nixon, P., Edwards, S., White, H., 1988. Serological comparisons of antigenically related herpesviruses in cattle, red deer and goats. *Vet. Res. Commun.* 12, 355–362.
- Nogarol C, Bertolotti L, De Carlo E, Masoero L, Caruso C, Profiti M, Martucciello A, Galiero G, Cordioli P, Lelli D, Nardelli S, Ingravalle F, Rosati S. Expression and antigenic characterization of bubaline herpesvirus 1 (BuHV1) glycoprotein E and its potential application in the epidemiology and control of alphaherpesvirus infections in Mediterranean water buffalo. *J Virol Methods.* 2014 Oct;207:16-21.
- OIE 2004/558/EC: Commission Decision of 15 July 2004 implementing Council Directive 64/432/EEC as regards additional guarantees for intra-Community trade in bovine animals relating to infectious bovine rhinotracheitis and the approval of the

eradication programmes presented by certain Member States (notified under document number C(2004) 2104)(Text with EEA relevance) Montagnaro S, Longo M, Mallardo K, Pisanelli G, De Martino L, Fusco G, Baldi L, Pagnini U, Iovane G. Evaluation of a fluorescence polarization assay for the

- OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests Vaccines, 2010. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. OIE, Paris, pp. 1–17 (Chapter 2.4.13).
- Pastoret P.-P., Thiry E., Brochier B., Derboven G., Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency, *Ann. Rech. Vét.* 13 (1982) 221–235.
- Patel J R, Didlick S. Epidemiology, disease and control of infections in ruminants by herpesviruses – An overview. *Journal of the South African Veterinary Association* (2008) 79(1): 8–14 (En.). JAS Biologicals Limited, The Centre for Veterinary Science, Madingley Road, Cambridge, CB3 OES, UK.
- Patel JR. Relative efficacy of inactivated bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccines. *Vaccine*. 2005 Jul 1;23(31):4054-61.
- Perrin B., Perrin M., Moussa A., Coudert M., Evaluation of a commercial gE blocking ELISA test for detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus, *Vet. Rec.* (1996) 138:520
- Petrini, S., Amoroso, M.G., Perugini, G., Gianfelici, P., Corrado, F., Bazzucchi, M., Paniccia, M., Casciari, C., Fortunati, M., Giammarioli, M., Fisichella, S., De Mia, G.M., Galiero, G., Cenci, T., 2012. Evidence of Bubaline herpesvirus 1 (BuHV-1) in a Buffaloes herd in central Italy. *Large Anim. Rev.* 18, 113–116.
- Reed, C.J., Muench, H.A., 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.* 27, 493–501.
- REGIONE CAMPANIA - Giunta Regionale - Seduta del 29 dicembre 2007 - Deliberazione N. 2313 - Area Generale di Coordinamento N. 20 - Assistenza Sanitaria - Piano di controllo della Rino- tracheite Infettiva Bovina (IBR) in Regione Campania
- Roizman B., Pellett P.E., The family Herpes- viridae: A brief introduction, in: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*, 4th ed., Lippincott Williams and Wilkins publishers, Philadelphia, 2001, pp. 2381–2398.
- Ros, C., Belák, S., 2002. Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Virus Gene* 24, 99–105.
- Schynts F., Meurens F., Detry B., Vanderplasschen A., Thiry E., Rise and survival of bovine herpesvirus 1 recombinants after

primary infection and reactivation from latency, *J. Virol.* (2003) 77:12535–12542.)

- Scicluna, M.T., Caprioli, A., Saralli, G., Manna, G., Barone, A., Cersini, A., Cardati, G., Condoleo, R.U., Autorino, G.L., 2010. Should the domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) be considered in the epidemiology of bovine herpesvirus 1 infection? *Vet. Microbiol.* 16, 81–88.
- Scicluna, M.T., Saralli, G., Bruni, G., Sala, M., Cocumelli, C., Calciolo, D., Condoleo, R.U., Autorino, G.L., 2007. Epidemiological situation of Herpesvirus infections in buffalo herds: Bubaline Herpesvirus1 or Bovine Herpesvirus1? *Ital. J. Anim. Sci.* 6 (Suppl. 2), 845–849.
- Smith G.A., Young P.L., Reed K.C., Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots, *Arch. Virol.* (1995) 140:599–603. Whetstone C.A., Miller J.M., Two different strains of an alphaherpesvirus can establish latency in the same tissue of the host animal: evidence from bovine herpesvirus 1, *Arch. Virol.* (1989) 107:27–34.
- Smith V.W., Coakley W., Maker D., Transmission of a genital isolate of bovine herpesvirus 1 to calves by the respiratory route, *Aust. Vet. J.* (1980) 56:302–304.
- Spilki F.R., Esteves P.A., de Lima M., Franco A.C., Chiminazzo C., Flores E.F., Weiblen R., Driemeier D., Roehle P.M., Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a), *Pesquisa Veterinaria Brasileira* (2004) 24:43–49.
- St George, T.D., Philpott, M., 1972. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from the prepuce of water buffalo bulls in Australia. *Aust. Vet. J.* 48, 126.
- Strube, W., Auer, S., Block, W., Heinen, E., Kretzdorn, D., Rodenbach, C., Schmeer, N., 1996. A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs. *Vet. Microbiol.* 53, 181–189.
- Thiry E., Lemaire M., Infection de ruminants par des herpesvirus hétérologues, *Point Vét.* 207 (2001) 20–25.
- Thiry E., Lemaire M., Schynts F., Meyer G., Dispas M., Gogev S., Les conséquences de l'infection des bovins par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine, *Point Vét.* 199 (1999) 279–285.
- Thiry E., Meurens F., Muylkens B., McVoy M., Gogev S., Thiry J., Vanderplasschen A., Epstein A., Keil G., Schynts F.,

Recombination in alphaherpesviruses, *Rev. Med. Virol.* (2005) 15:89–103.

- Thiry E., Muylkens B., Meurens F., Gogev S., Thiry J., Vanderplasschen A., Schynts F., Recombination in the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1, *Vet. Microbiol.* (2006) 113:171–177.)
- Thiry, J., Keuser, V., Muylkens, B., Meurens, F., Gogev, S., Vanderplasschen, A., Thiry, E., 2006a. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet. Res.* 37, 169–190.
- Thiry, J., Tempesta, M., Camero, M., Tarsitano, E., Bellacicco, A.L., Thiry, E., Buonavoglia, C., 2006b. A live attenuated glycoprotein E negative bovine herpesvirus 1 vaccine induces a partial cross-protection against caprine herpesvirus 1 infection in goats. *Vet. Microbiol.* 113, 303–308.
- Thiry, J., Tempesta, M., Camero, M., Tarsitano, E., Muylkens, B., Meurens, F., Thiry, E., Buonavoglia, C., 2007a. Clinical protection against caprine herpesvirus 1 genital infection by intranasal administration of a live attenuated glycoprotein E negative bovine herpesvirus 1 vaccine. *BMC Vet Res.* 3, 33.
- Thiry, J., Widén, F., Grégoire, F., Linden, A., Belák, S., Thiry, E., 2007b. Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. *BMC Vet Res.* 3, 26.
- Van Engelenburg F.A., Kaashoek M.J., van Oirschot J.T., Rijsewijk F.A., A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period, *J. Gen. Virol.* (1995) 76:2387–2392.)
- Van Oirschot J.T., Kaashoek M.J., MarisVeldhuis M.A., Weerdmeester K., Rijsewijk F.A.M., An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle, *J. Virol. Methods* (1997) 67:23–34.