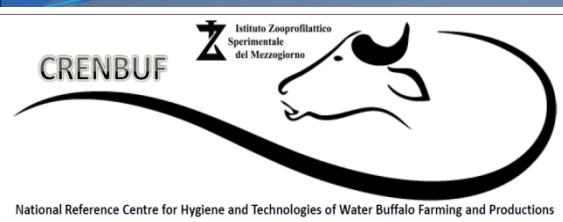


Roma, 14 aprile 2015



Recettività del bufalo alla LEB

Dr.ssa Ester De Carlo

Centro di Referenza Nazionale sull'igiene e le tecnologie
dell'allevamento e delle produzioni bufaline

IZS del Mezzogiorno

RC IZS UM 06/2011

LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA: STUDIO DELLA DINAMICA DI INFEZIONE NEL BUFALO (BUBALUS BUBALIS) MEDIANTE RIPRODUZIONE SPERIMENTALE DELLA MALATTIA

RC IZS ME 09/2011

VALUTAZIONE DEI PARAMETRI DI BENESSERE ED IMMUNITARI IN BUFALI DETENUTI IN STALLA AI FINI DI SPERIMENTAZIONE, DOPO INOCULAZIONE SPERIMENTALE CON VIRUS DELLA LEUCOSI BOVINA.





Obiettivi

- Infezione sperimentale *Bubalus bubalis*
- Studio della dinamica di infezione
- Studio della dinamica di parametri immunologici, ematologici e biochimici in relazione all'infezione
- Investigare gli eventi che sovvertono il sistema immunitario nelle diverse fasi di infezione a livello di regolazione citochinica
- Collezione di campioni di riferimento
- Osservazione clinica
- Valutazione test disponibili
- Perfezionamento e validazione dei test mediante sub standard per la specie bufalina

Conoscenze già disponibili

- Assenza di positività sul territorio italiano
- Segnalazione di positività naturali in bubalus bubalis in Sud America (Marìn et al. 1978, Tsoutsoumansky et al 1985, Molnàr et al. 2000)
- Precedenti infezioni sperimentali (Romero et al. 1981, Persechino et.al 1983, Del Fava et al. 2000)

PROTOCOLLO

- **SCELTA DEI SOGGETTI DA SOTTOPORRE A PROVA SULLA BASE DELL'ETÀ, DEL SESSO E DELLO STATO DI GRAVIDANZA**

Tipo animale	Caratteristiche	
3 bufale	Gravide nel I terzo gravidanza	Da infettare
3 bufale	Gravide nel II terzo gravidanza	Da infettare
2 bufale	Gravide nel III terzo gravidanza	Da infettare
1 toro	In fase di accertata fecondità	Da infettare
1 toro	Giovane	da non infettare (controllo)
2 ovini	Giovani	Da inoculare (controllo vitalità virus pre inoculo)
3 ovini	Giovani	Da inoculare (controllo trasmissione malattia)

PROTOCOLLO



Verifica pre inoculo

7 giorni prima

Tempo o

Parametri

Elisa LEB
AGID
Emocromo
Biochimico
QPE
Parametri immunità
innata (lisozima,
aptoglobina,
complemento
emolitico,
battericidia),
IL 2-4-6-10-12-IFN γ -
Tnf α

PROTOCOLLO



Inoculo i.m. 10 ml sangue intero donatrici Cerel
(100 ml e.v. Del Fava- 20 ml e.v. Persechino)

PROTOCOLLO

- Nessuna manifestazione clinica di reazione p. inoculo
- Positività ovini a 21 gg. dall'inoculo

Elisa leb in doppio	Emocromo	Biochimico e QPE	Interleuchine	Parametri immunità innata
Ogni 3 gg	Ogni 7 gg	Ogni 3 gg	Ogni 7 gg	Ogni 7 gg

Agid	Buffy coat per test biomolecolari	Osservazione clinica
Ogni 3 gg	Ogni 3 gg	Ogni 3 gg

RISULTATI SIEROLOGICI

Capo 1 (M)	Capo 5	Capo 8	Capo 9	Capo 10
T 35 Elisa T 76 AGID	T 326 (311 D) Elisa T 339 AGID	T 257 Elisa T 270 AGID	T 26 Elisa T 28 AGID	T 55 Elisa T 94 AGID
	Inoculata 7° MG	Inoculata 3° MG	Inoculata 2° MG	Inoculata 2° MG
	+ dopo 8 mesi dal parto	+ dopo 20 gg dal parto	+ 6 mesi prima del parto	+ 4 mesi prima del parto
	Annutola 😊	Annutolo 😊	Vitello disvitale- deceduto dopo 12 ore	Vitello disvitale- deceduto dopo 6 ore

VARIABILITÀ TEMPO DI POSITIVIZZAZIONE

Precedenti sperimentazioni

Romero et al.

7 capi giovani

1 capo 3 mesi post inoculo

1 capo 7 mesi post inoculo

2 capi 8 mesi post inoculo

Persechino et al.

2 capi giovani

Entrambi 3 mesi post inoculo

Del Fava et al.

2 capi giovani

1 capo 6 mesi post inoculo

Attuale sperimentazione

9 capi inoculati adulti

2 capi 1 mese circa post inoculo

1 capo 2 mesi post inoculo

1 capo 8 mesi post inoculo

1 capo 11 mesi post inoculo

ULTERIORI INDAGINI

Raccolta campioni in occasione del parto (lochiazioni)

Raccolta campioni vitelli venuti a morte

Raccolta buffy coat ogni 3 giorni

Invio al macello del toro con raccolta organi e totale siero

Raccolta colostro e latte



REAL TIME PCR su tutto il materiale biologico raccolto

Gene Target	Primers	Sequenze primers
gP 51	gP51 S	5'-CCTTTCTGTGCCAAGTCTCC-3'
	gP51 AS	5'-CTGACAGAGGGAACCCAGTC-3'

RISULTATI

Nessuna lesione anatomopatologica riferibile a LEB

Restanti esami microbiologici negativi

Nessun campione biologico è risultato positivo



RISULTATI

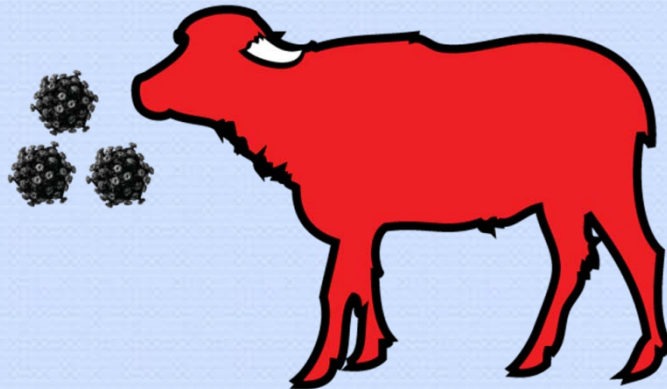
- Nessun organo linfoide del toro è risultato positivo ivi incluso testicoli ed epididimi
- Risultati non sovrapponibili per tutti i kit utilizzati
- Raccolta sangue da salasso al macello
- Catalogato, stoccato e depositato presso CEREL
- Colostro e latte saggiato con stessi kit ELISA
- Risultati non sovrapponibili al siero per tutti i kit, ma positività confermate sino alla diluizione 1:300



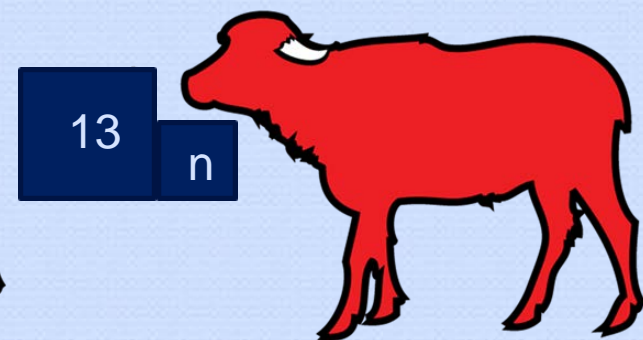
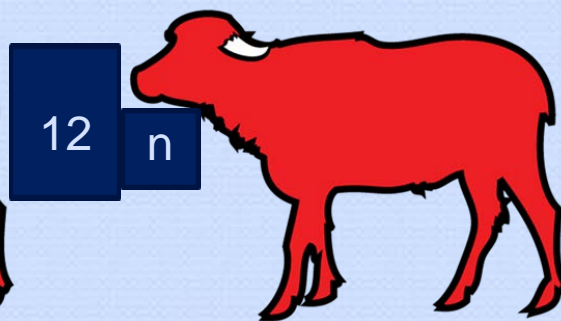
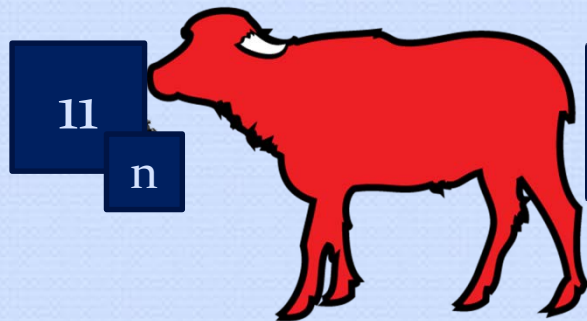
RISULTATI

- Nessun soggetto a tutt'oggi ha manifestato linfocitosi
- Tranne che per le IL 6-10 tutte le altre IL indagate (2-4-12-tnf- α) hanno mostrato un andamento variabile soggetto per soggetto in relazione al momento della risposta anticorpale.

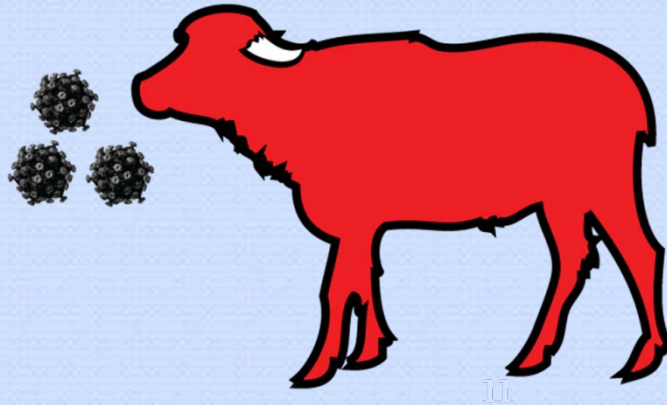
TRASMISSIBILITA'



POOL 1+9+10
(14/11/2014)
Positivi da 7-5-4 mesi



TRASMISSIBILITA'



POOL 1+9+10
positive



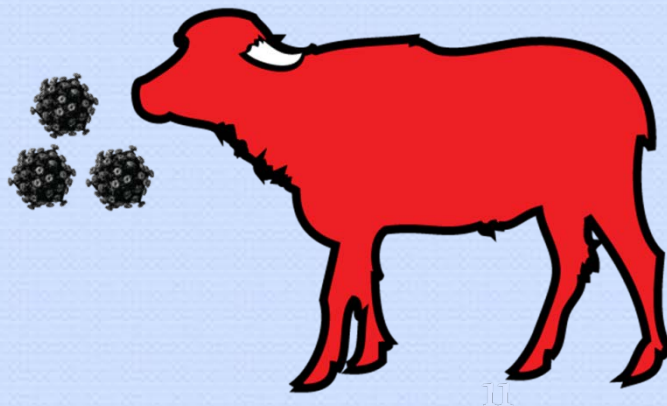
POOL negative



POOL negative



TRASMISSIBILITA'



POOL 5+8 positive
(05/02/2015)
Positive da 1 mese
(+ 257-326 gg)



P

Positivizzazione dopo 2 mesi dall'inoculo

Viremia transitoria/individuale o elevata carica virale
da stress da freddo?

CONCLUSIONI

- Minore sensibilità del bufalo VS bovino
- Elevata variabilità individuale nella risposta anticorpale
- Elevata variabilità individuale nel profilo citochinico
- Virus quindi replica nel bufalo
- Virus conserva la capacità intettante (Bufalo vs ovino)
- Virus non abortigeno nel bufalo = bovino
- Responsabile di vitelli disvitali se contratto entro 2 mesi????
- Test di elezione ELISA

WORK IN PROGRESS

- Perfezionamento Kit del commercio
- Standardizzazione materiali di riferimento
- Completamento profili immunitari
- Mantenimento annutoli e adulti
- Attesa parto di figlio di toro positivo

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

