IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Convegno

I risultati della ricerca condotta dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"

ANNO 2012

Teramo, 23 maggio 2013

Infezione sperimentale del piccione (*Columba livia*) con i ceppi di West Nile emersi negli ultimi anni in Italia

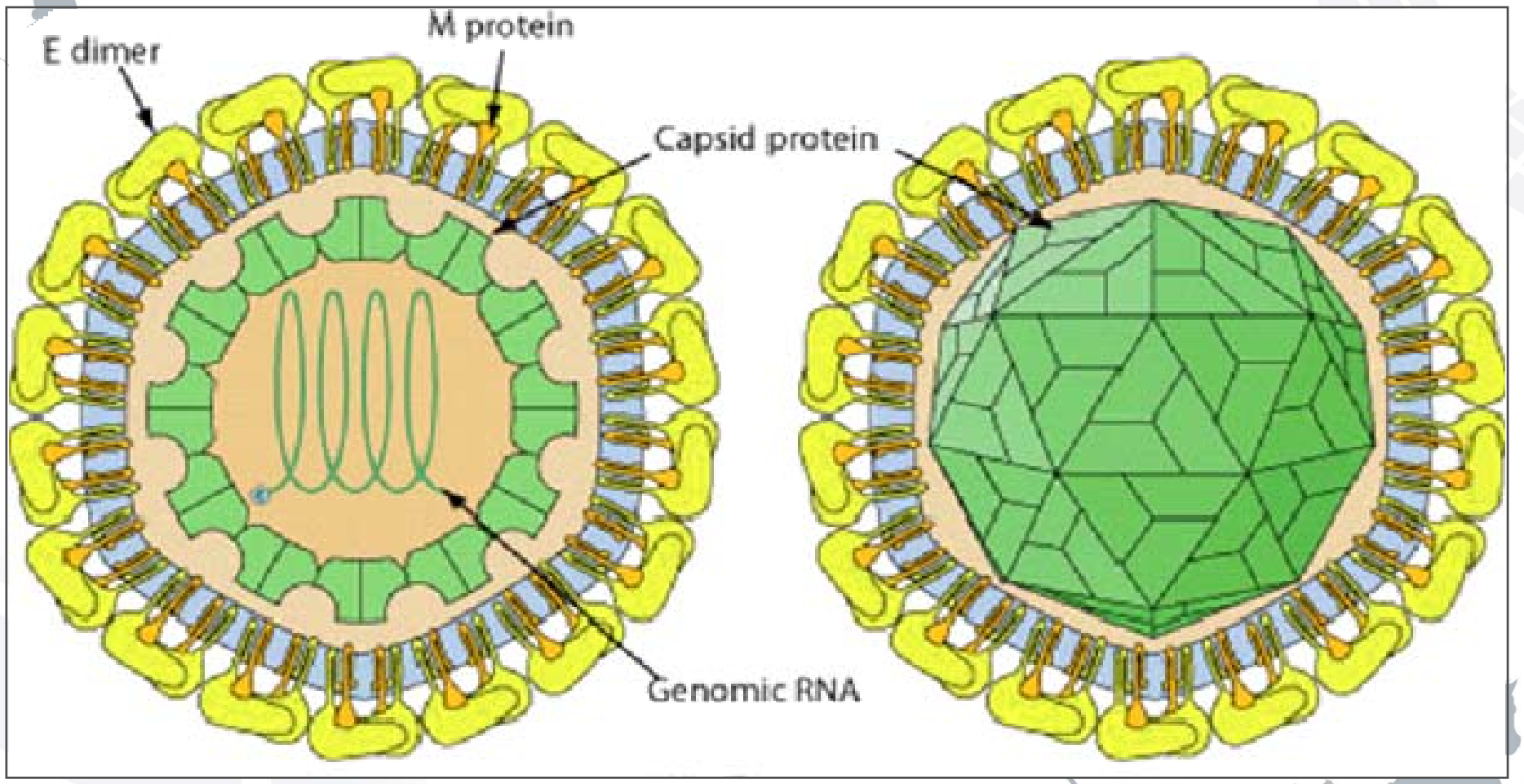
Massimo Spedicato

Reparto di Virologia – IZSAM G. Caporale

Responsabile Dott. Giovanni Savini

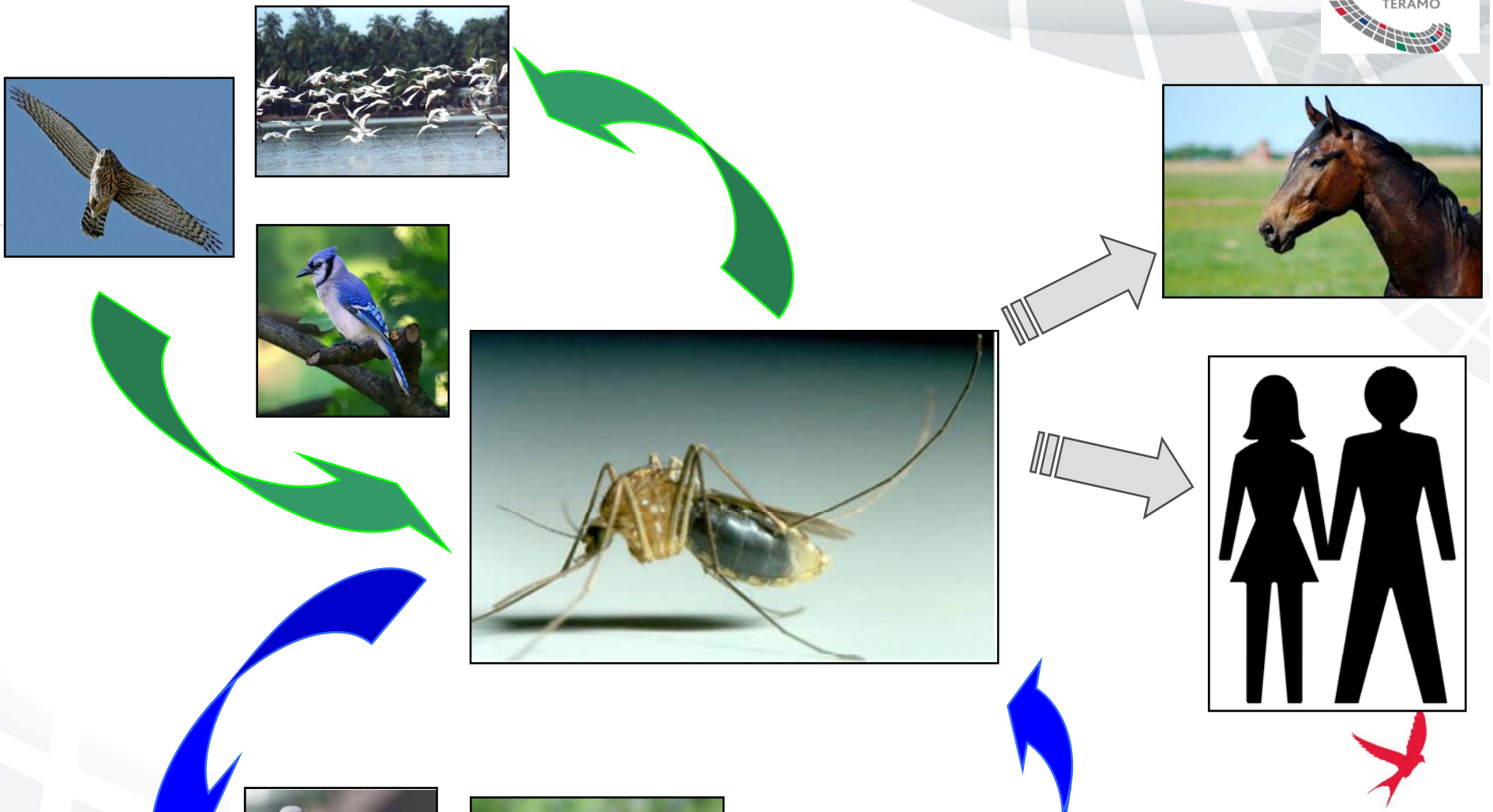
West Nile virus (WNV)

Flaviviridae
Flavivirus



Lineage 1 e 2 maggiormente diffusi ed epidemiologicamente importanti

Bowen, 2011
Monaco et al., 2011
Savini et al., 2012



Hubalek and Halouzka, 1999
Komar et al., 2000
Kulasekera et al., 2001

Situazione in Italia

Primo focolaio 1998: Toscana (Padule di Fucecchio)
9 aziende
14 cavalli con sintomi neurologici (6 morti)
NO casi umani

Lelli, 2002
Lelli et al., 2004

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

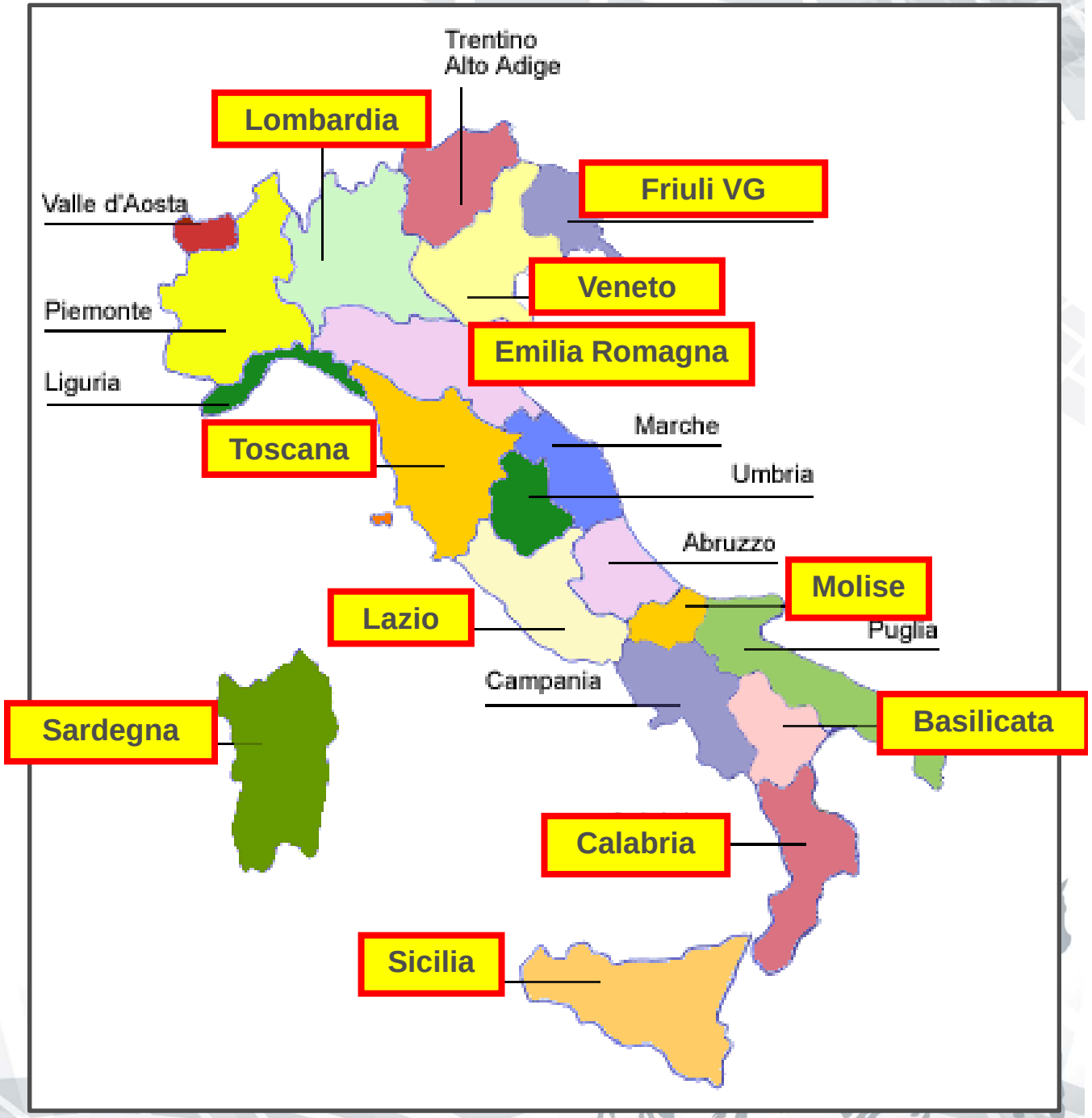
2008

2009

2010

2011

2012



BOLLETTINI EPIDEMIOLOGICI CESME

Casi di malattia neuro-invasiva da West Nile in Italia nell'uomo 2008-2012

REGIONE	2008	2009	2010	2011	2012	TOTALE
Emilia Romagna	3	10	/	/	/	13
Veneto	5	6	3	8	21	43
Friuli VG	/	/	/	1	4	5
Lombardia	/	2	/	/	/	2
Toscana	/	/	/	1	/	1
Sardegna	/	/	/	4	2	6
Basilicata	/	/	/	/	1	1
TOTALE	8	18	3	14	28	71

http://www.epicentro.iss.it

UCCELLI SINANTROPICI

Importante ruolo nell'endemizzazione e nella diffusione del WNV

PICCIONE (*Columba livia*)

✓**Uccello sinantropico cosmopolita**

✓**Colonizzazione aree urbane e rurali in tutto il mondo**

- *parchi pubblici*
- *piazze*
- *zone agricole*
- *scogliere*

LINK TRA CICLO URBANO E RURALE *(?)*

OBIETTIVI PRINCIPALI

✓**VALUTARE RUOLO DEL PICCIONE COME RESERVOIR PER CEPPI ITALIANI**

✓**DIFFERENZE NELLA DINAMICA VIRALE DEI 3 CEPPI UTILIZZATI**

ceppo **12010/09**, isolato dal cervello di una gazza (*Pica pica*)

ceppo **21412/11**, isolato dal cervello di una civetta sintomatica (*Athene noctua*);

ceppo **20652/12**, isolato dal cervello di una gazza

Lineage 1

MATERIALI E METODI

27 piccioni

Alloggiati in gabbie poste in unità di contenimento BSL-3

Acclimatamento 1 settimana

Osservazioni cliniche per tutta la durata della sperimentazione

T0 (prima dell'infezione): ***plasma testato per PCR USUV e WNV e anticorpi anti-WNV e tamponi cloacale e faringeo testati per PCR USUV e WNV***

4 gruppi

Gruppo A: 8 piccioni infettati col ceppo 12010/09

Gruppo B: 8 piccioni infettati col ceppo 21412/11

Gruppo C: 8 piccioni infettati col ceppo 20652/12

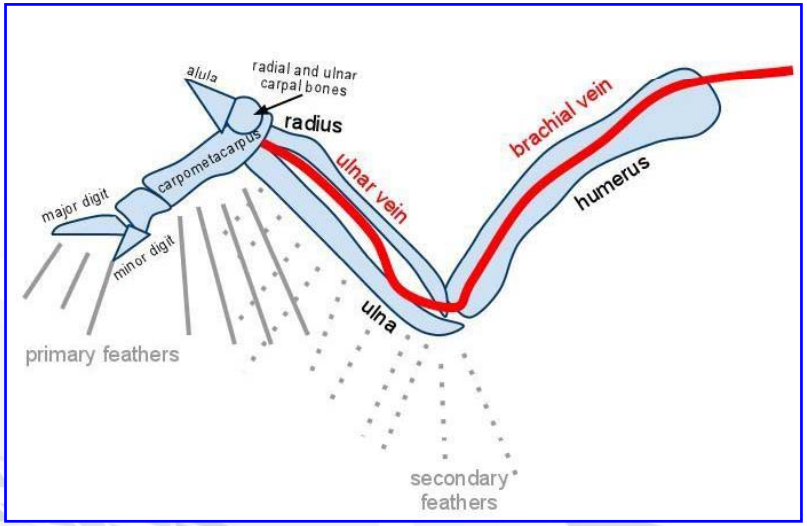
Gruppo K (controllo): 3 piccioni inoculati col terreno di coltura

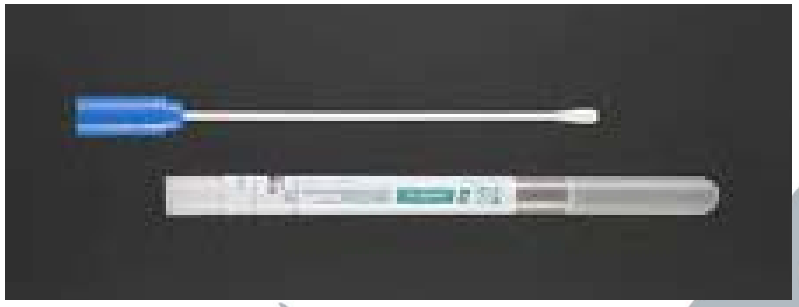
***INOCULO*: 1 mL di MEM contenente 10^6 $TCID_{50}$/mL**
SC regione inguinale

Da T1 a T23

✓ ***Prelievi ematici dalla vena brachiale in provette con EDTA***

✓ ***Tamponi cloacali e orofaringei posti in eppendorf con PBS antibiotato***





✓*PLASMA: PCR PER WNV LINEAGE 1 E TITOLO ANTICORPALE MEDIANTE SIERONEUTRALIZZAZIONE*

✓*SURNATANTE TAMPONI: PCR PER WNV LINEAGE 1*

Plasma e tamponi PCR-positivi sono stati titolati

Competence reservoir index (CRI)

Stima del numero di vettori infettanti che derivano da ogni individuo infetto di una particolare specie

CRI=S*I*D

Komar et al., 2003
Diaz et al., 2011

S: suscettibilità, proporzione di uccelli infettati dopo l'esposizione

I: infettività media giornaliera, proporzione di vettori che si infettano per giorno dopo un pasto di sangue su un uccello infetto

D: durata, giorni in cui gli uccelli mantengono una viremia ritenuta infettante

Valore soglia viremia infettante: $10^{4.7}$ $TCID_{50}$/mL ***(valori inferiori sono considerati nulli)***

Infettività calcolata in accordo con la formula di Kilpatrick et al. (2007)

I= 0.1349xlog10 (viremia) – 0.6235

NECROSCOPIE

Gruppo A sacrificato a T27

Gruppo B sacrificato a T30

Gruppo C sacrificato a T35

UN ANIMALE CONTROLLO SACRIFICATO INSIEME AD OGNI GRUPPO SPERIMENTALE

PRELEVATI MILZA, RENE, CERVELLO, POLMONE, INTESTINO, CUORE

SUGLI ORGANI

PCR

ISTOLOGIA

IMMUNOISTOCHIMICA
(solo su organi PCR+)

organi PCR-positivi: isolamento

Analisi statistica

- ✓*titolo anticorpale espresso come il reciproco della massima diluizione in grado di inibire l'effetto citopatico (N)*
- ✓*risultati della PCR espressi come numero di cicli termici al quale è stato rilevato l'RNA*
- ✓*titolo virale espresso come log10 della $TCID_{50}$/mL*

TUTTI I VALORI ESPRESSI COME MEDIA±SEM

Dati analizzati con ANOVA (Graphpad Instat Software, San Diego, CA, USA), con post-test di Tukey–Kramer

Valori significativi per P<0.05

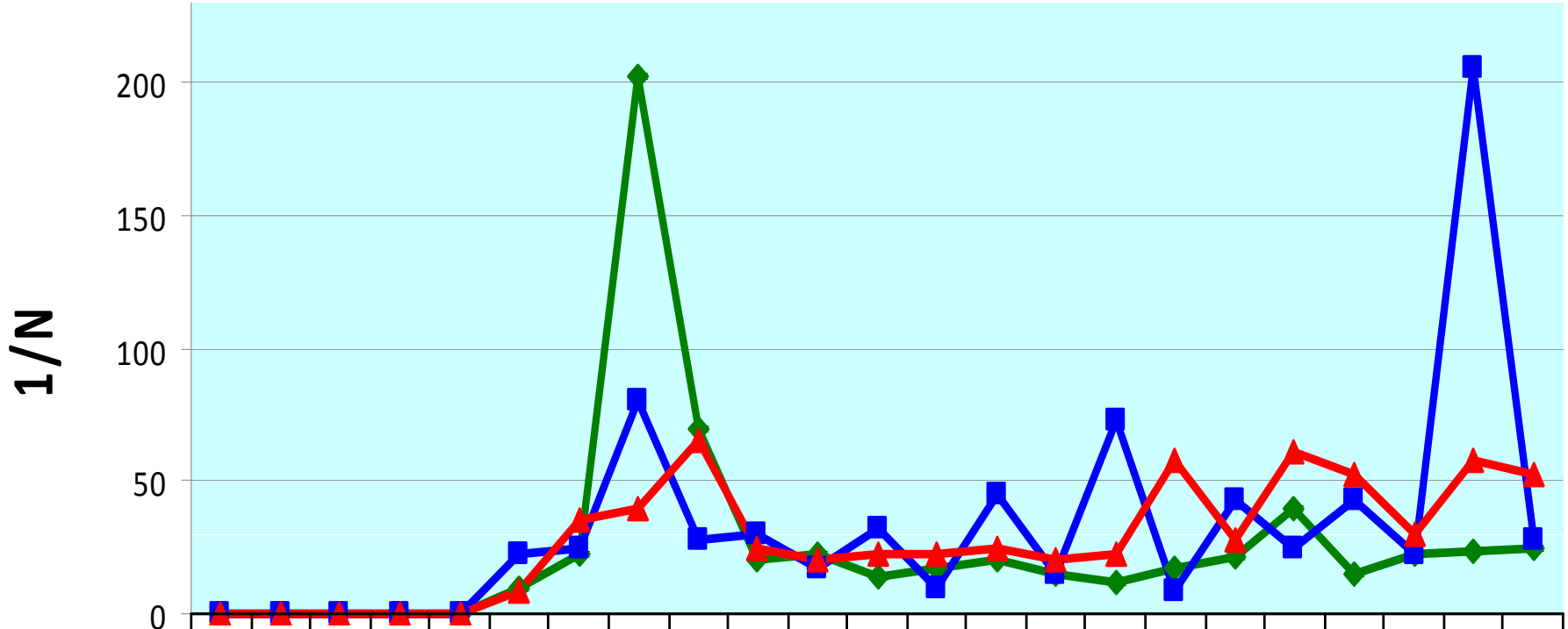
RISULTATI E DISCUSSIONI

NO segni clinici di malattia

ANIMALI CONTROLLO
No titoli anticorpali
No eliminazione cloacale o orofaringea
No viremia

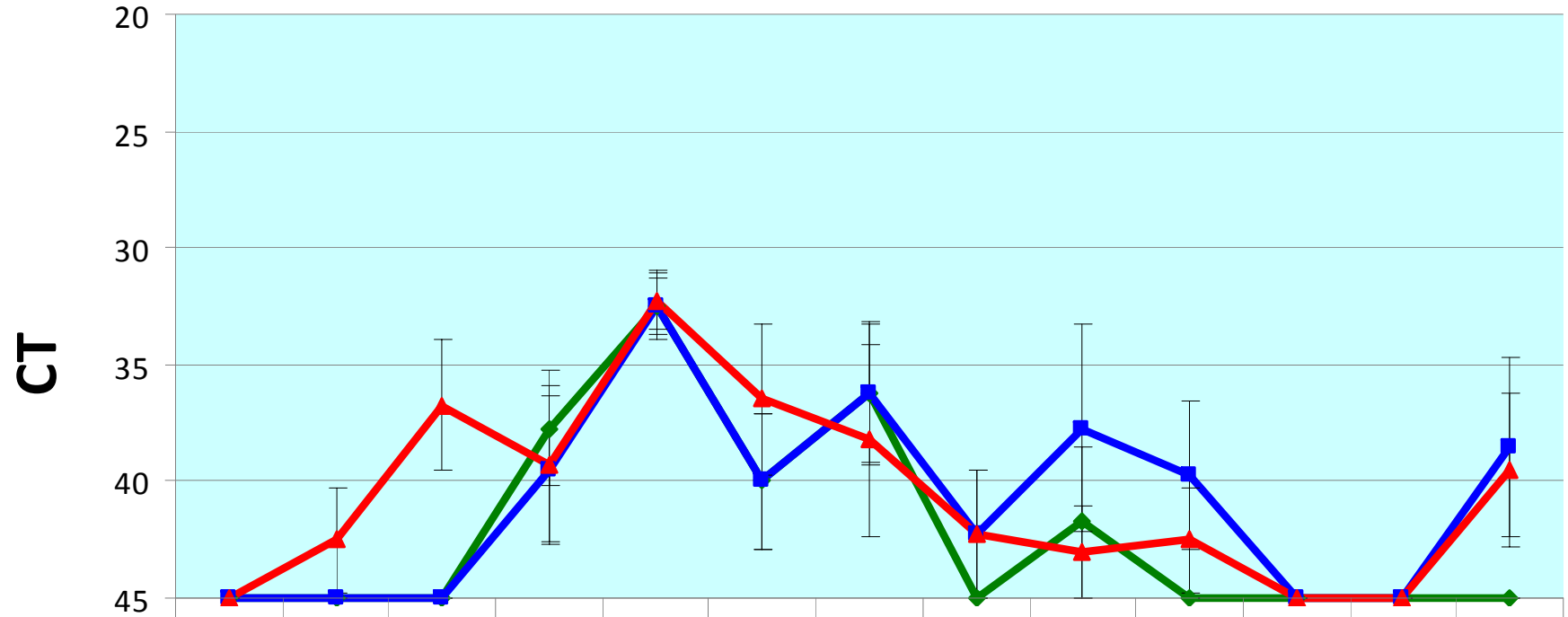
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

titolo anticorpale



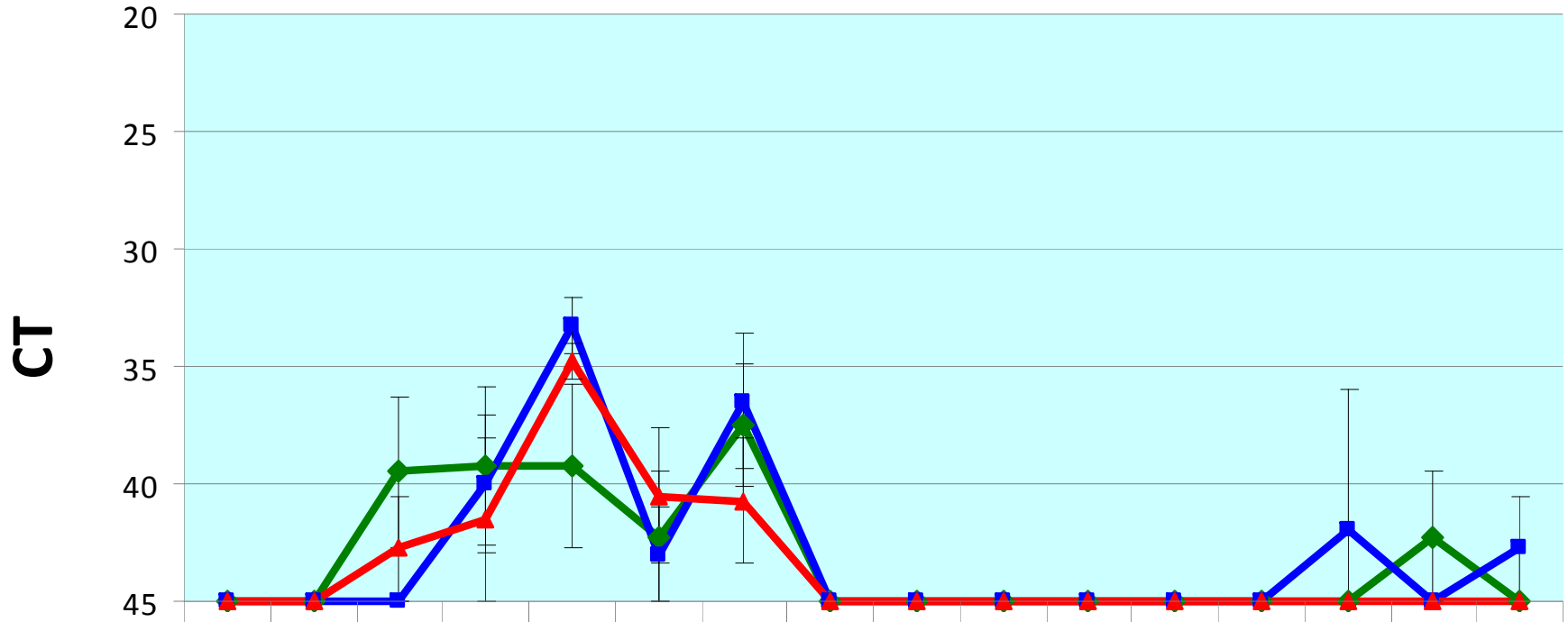
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	T20	T21	T22
gazza 09	0	0	0	0	0	10	23	203	70	20	23	14	18	20	15	11	18	21	40	15	23	24	25
civetta 11	0	0	0	0	0	23	25	80	28	30	18	33	10	45	15	73	8,8	43	25	43	23	205	28
gazza 12	0	0	0	0	0	8,8	35	40	65	25	20	23	23	25	20	23	58	28	61	53	30	58	53

Tamponi cloacali



	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
gazza 2009	45	45	45	37,75	32,5	40	36,25	45	41,75	45	45	45	45
civetta 2011	45	45	45	39,5	32,5	40	36,25	42,25	37,75	39,75	45	45	38,5
gazza 2012	45	42,5	36,75	39,25	32,25	36,5	38,25	42,25	43	42,5	45	45	39,5

Tamponi orofaringei



	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
gazza 2009	45	45	39,5	39,3	39,3	42,3	37,5	45	45	45	45	45	45	45	42,3	45
civetta 2011	45	45	45	40	33,3	43	36,5	45	45	45	45	45	45	42	45	42,8
gazza 2012	45	45	42,8	41,5	34,8	40,5	40,8	45	45	45	45	45	45	45	45	45

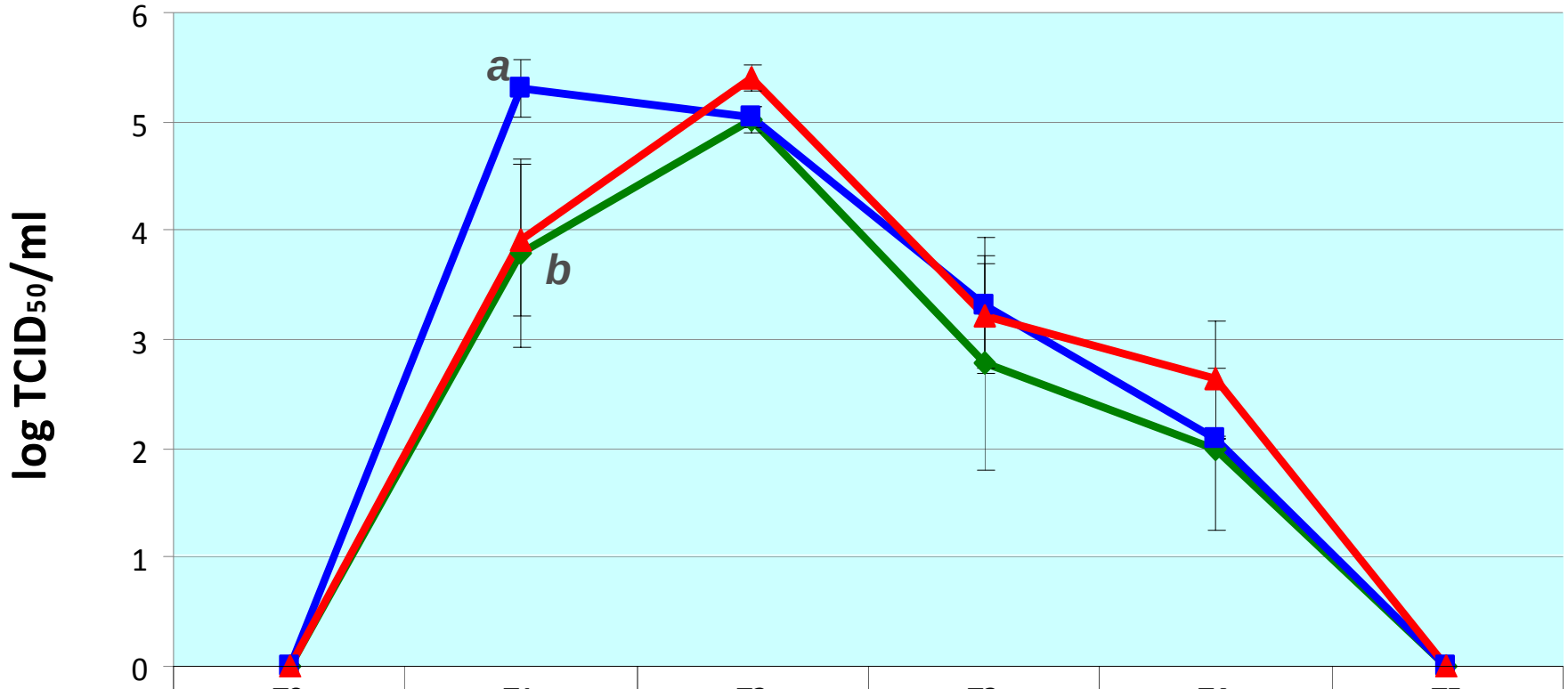
Eliminazione virale

Eliminazione cloacale:
Gruppo A e Gruppo C: 87.5%
Gruppo B: 75%

Eliminazione orale:
Gruppo A e C 62.5%
Gruppo B 75%

Isolamento virale da pochi tamponi PCR-positivi
T2: 1 tampone orofaringeo Gruppo A
T3: 1 tampone cloacale Gruppo A
T4: 2 tamponi cloacali Gruppo C

Viremia



	T0	T1	T2	T3	T4	T5
gazza 2009	0	3,79	5,02	2,79	1,99	0
civetta 2011	0	5,31	5,03	3,31	2,10	0
gazza 2012	0	3,91	5,39	3,22	2,63	0

a,b: p<0,05 *R2(CT, titolo virale)=0,775*

T= giorni post-infezione

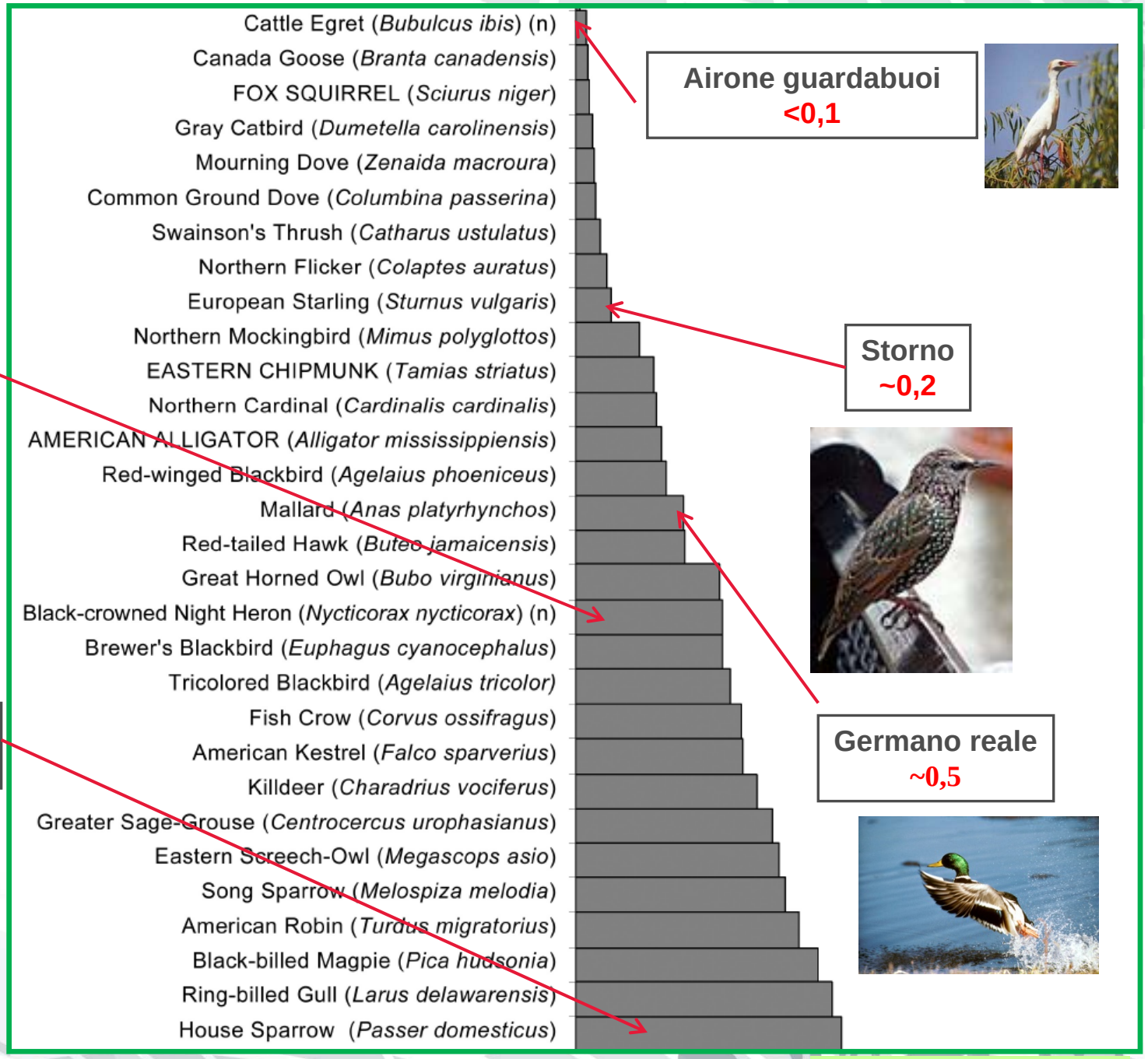
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

competence reservoir index	CRI=D*S*I

I=0,1349*log10(TCID)-0,6235 (Kilpatrick et al., 2007)

	PROGR.	D	I	CRI	media CRI solo >0
GAZZA 2009	1	0	0	0	0,14
	2	0	0	0	
	3	2	0,14	0,28	
	4	0	0	0	
	5	0	0	0	
	6	2	0,02	0,04	
	7	0	0	0	
	8	2	0,05	0,1	
CIVETTA 2011	9	2	0,14	0,28	0,11
	10	2	0,05	0,1	
	11	2	0,02	0,04	
	12	0	0		
	13	0	0		
	14	2	0,02	0,04	
	15	0	0		
	16	2	0,05	0,1	
GAZZA 2012	17	2	0,09	0,18	0,12
	18	2	0,02	0,04	
	19	2	0,09	0,18	
	20	2	0,05	0,1	
	21	2	0,05	0,1	
	22	0	0	0	
	23	0	0	0	
	24	0	0	0	

CRI



Kilpatrick et al., 2007

TROPISMO TISSUTALE

RENI E MILZA PCR+

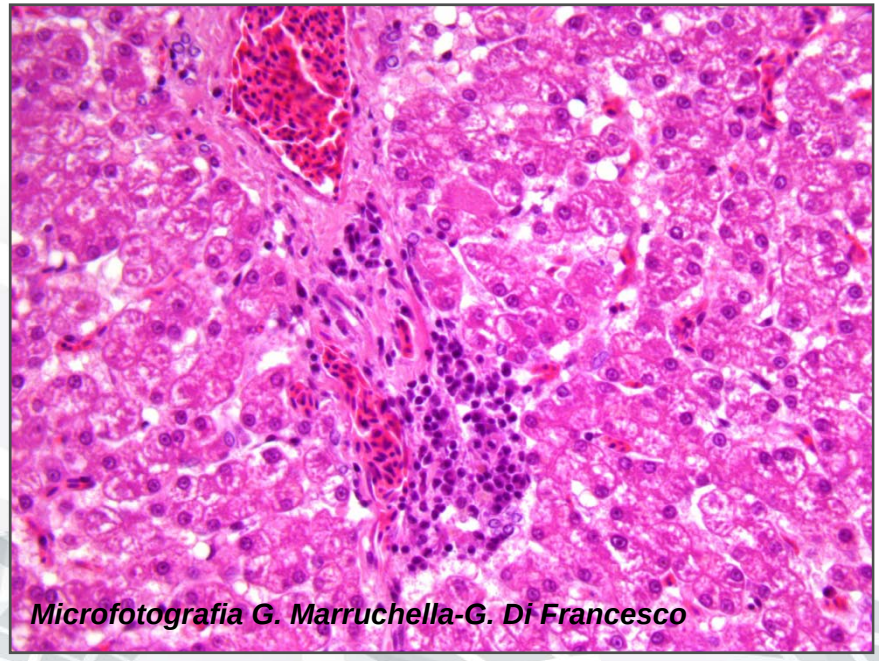
Gruppo A: 4 milze e 1 rene
Gruppo B e C: 3 reni e 2 milze

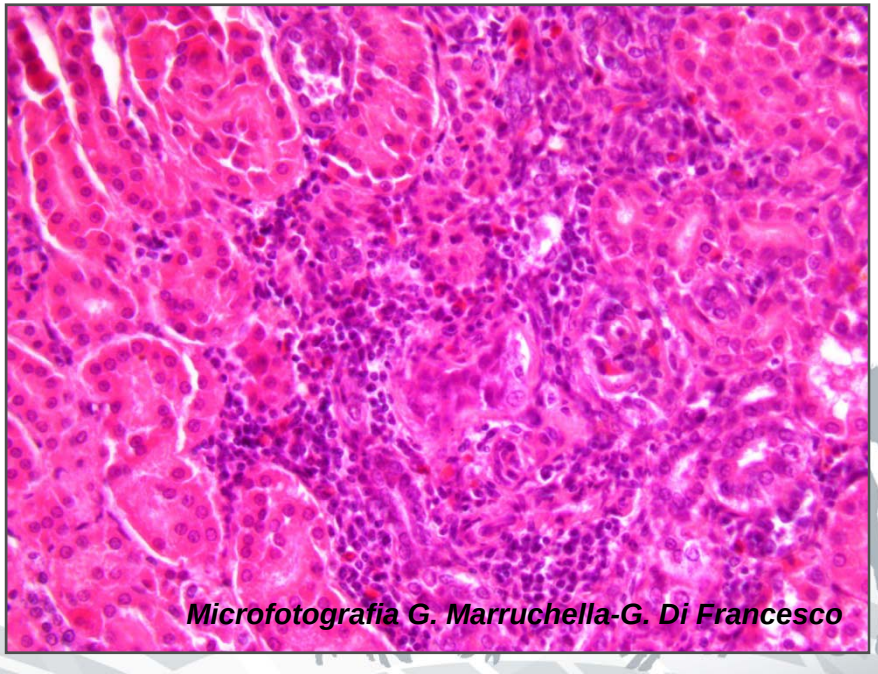
ISOLAMENTO NEGATIVO IN TUTTI I CASI

ISTOLOGIA

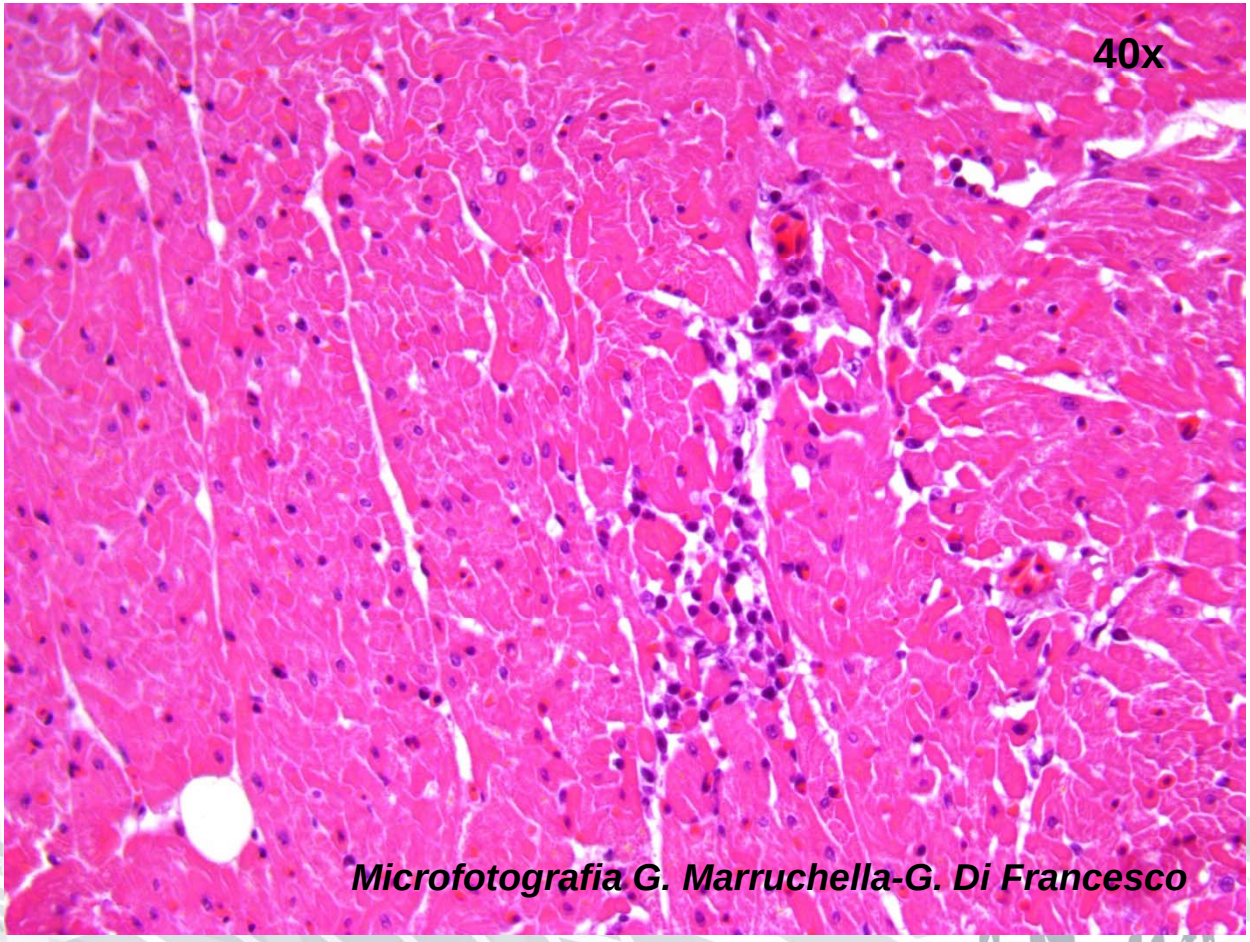
Epatite e nefrite interstiziale in tutti gli animali
(infiltrati linfocitari e plasmacellulari)

Frequentemente iperplasia linfofollicolare:
18/24 uccelli sperimentali e 1/3 animali controllo


Microfotografia G. Marruchella-G. Di Francesco


Microfotografia G. Marruchella-G. Di Francesco

Foci di miocardite con linfociti infiltranti l'interstizio in 4/24 animali infettati *(1 in Gruppo A e 3 in Gruppo C)*



Microfotografia G. Marruchella-G. Di Francesco

Conclusioni

Piccione non sviluppa forma clinica malattia di West Nile

No differenze di ceppo

Ospiti competenti

CRI basso rispetto ad altre specie ***(Komar et al., 2003; Kilpatrick et al., 2007; Guerrero-Sanchez et al., 2011)***

Tuttavia altri fattori da considerare: ecobiologia e popolazione

WHO → ospite amplificatore ideale: specie con un livello adeguato di viremia, localmente abbondante e che non sviluppa segni clinici

Questioni aperte

Rischio per gli uomini?

Habitat piccione sia rurale che urbano→link epidemiologico tra ciclo rurale ed urbano?

Dati sperimentali da considerare con cautela prima di trarre conclusioni riguardanti condizioni che si possono verificare in natura

Ringraziamenti

Anna Bellacicco
Irene Carmine
REPARTO VIROLOGIA

Gabriella Di Francesco
Giuseppe Marruchella

Andrea Capobianco
Vincenzo D'Innocenzo

GRAZIE PER L'ATTENZIONE