



IZSAM G. CAPORALE
TERAMO

 **CESME**
Centro di Referenza Nazionale

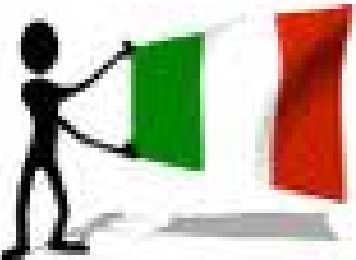
La West Nile Disease: evoluzione ed adattamento nel panorama italiano

Federica Monaco

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e
del Molise "G. Caporale"*

Teramo, 8 maggio 2015

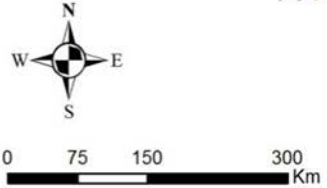




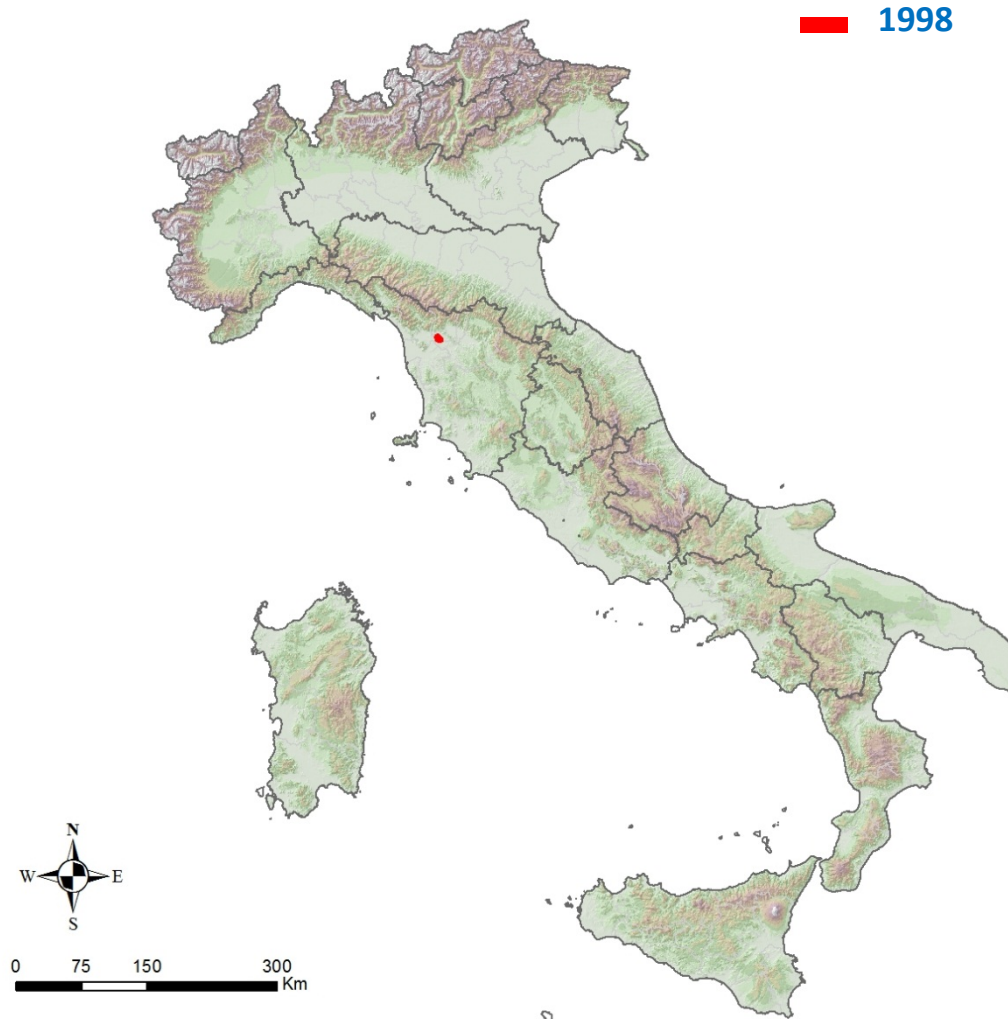
West Nile



Italia



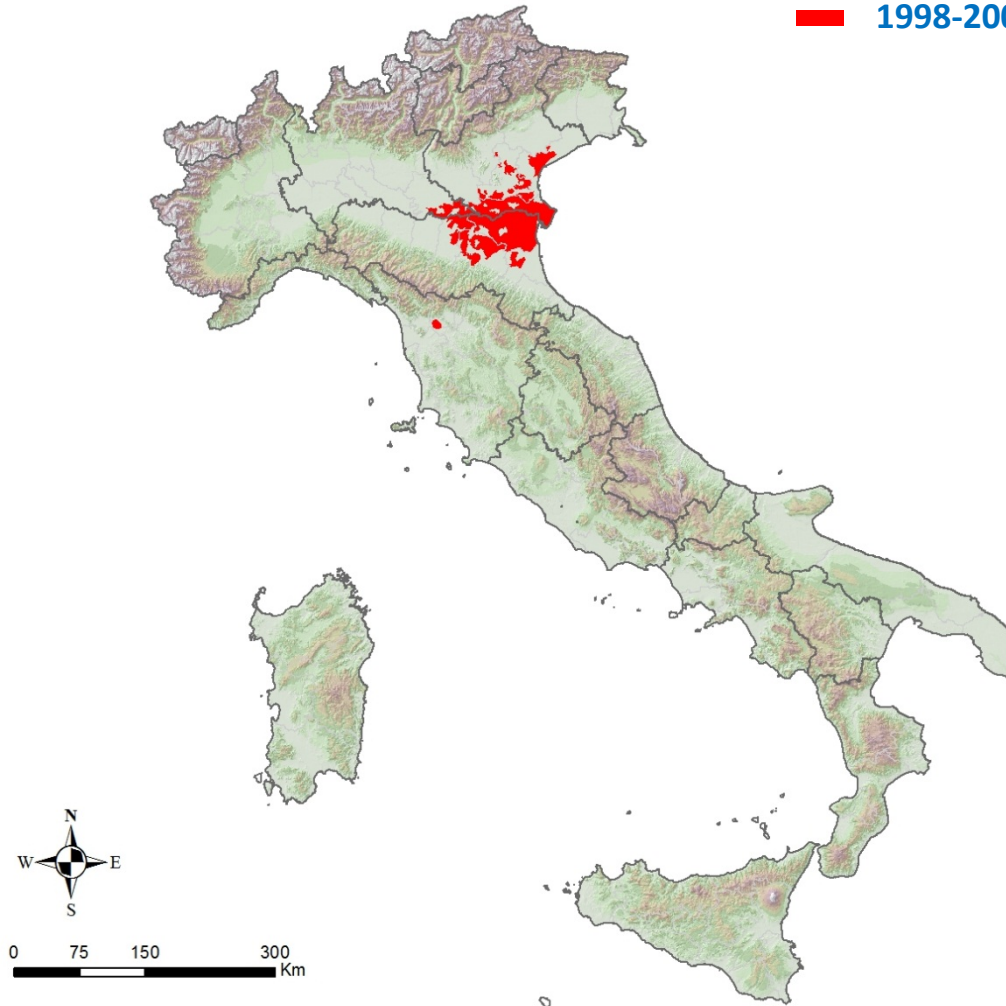
West Nile Disease Per la prima volta in Italia – 1998



Progressione WND 1998 - 2014

 CESME
Centro di F

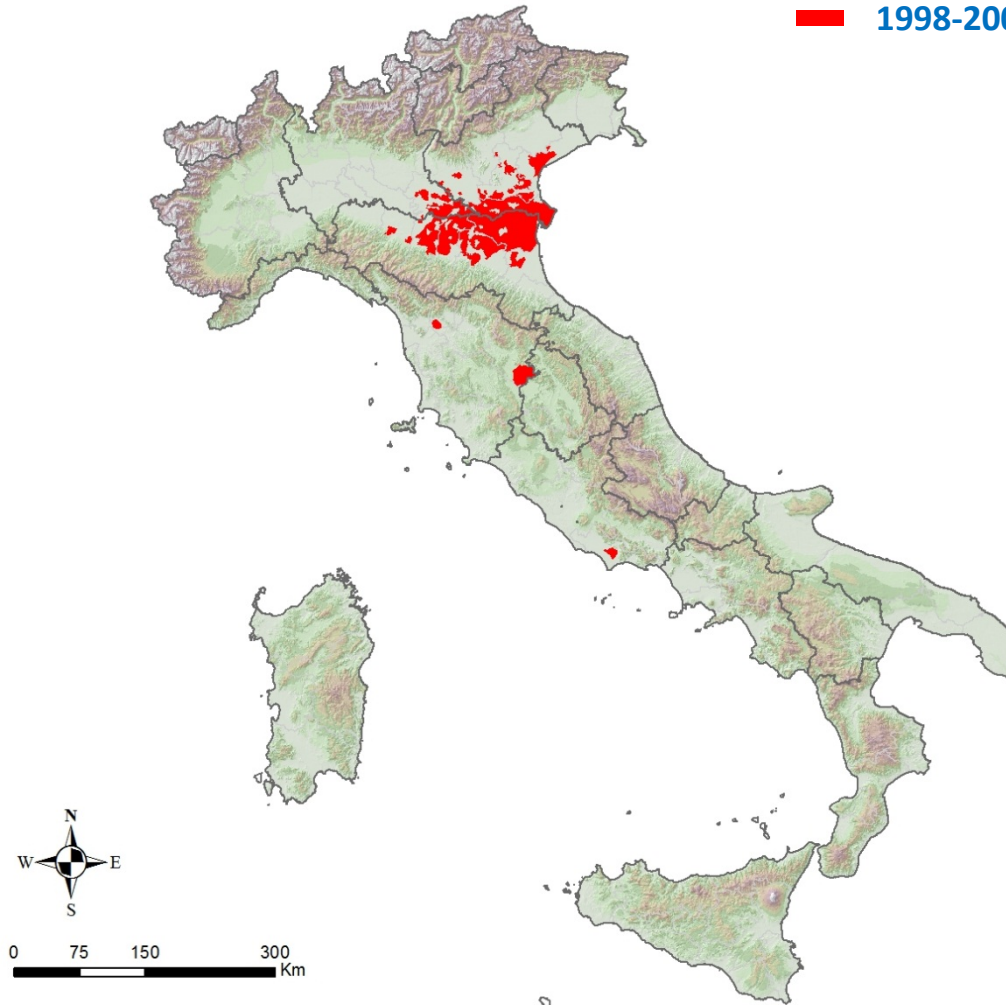
 1998-2008



Progressione WND 1998 - 2014

 CESME
Centro di F

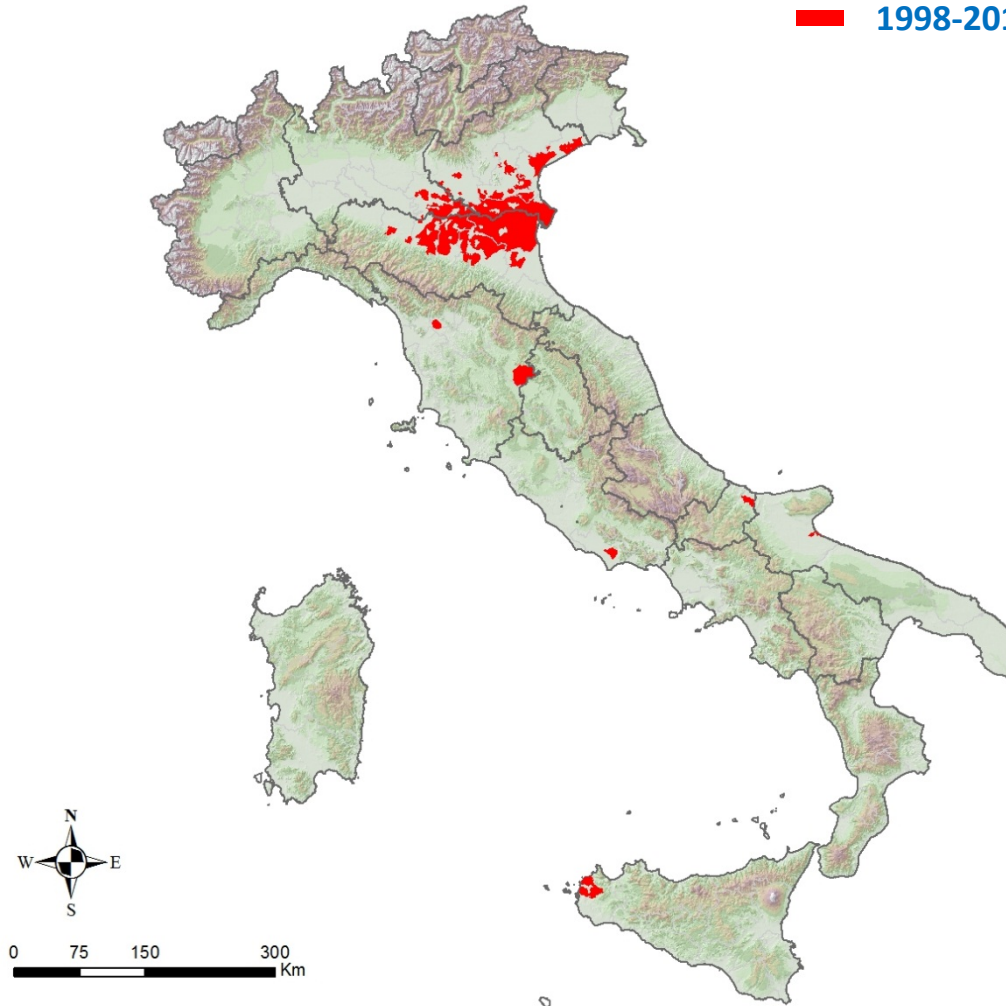
 1998-2009



Progressione WND 1998 - 2014

 CESME
Centro di F

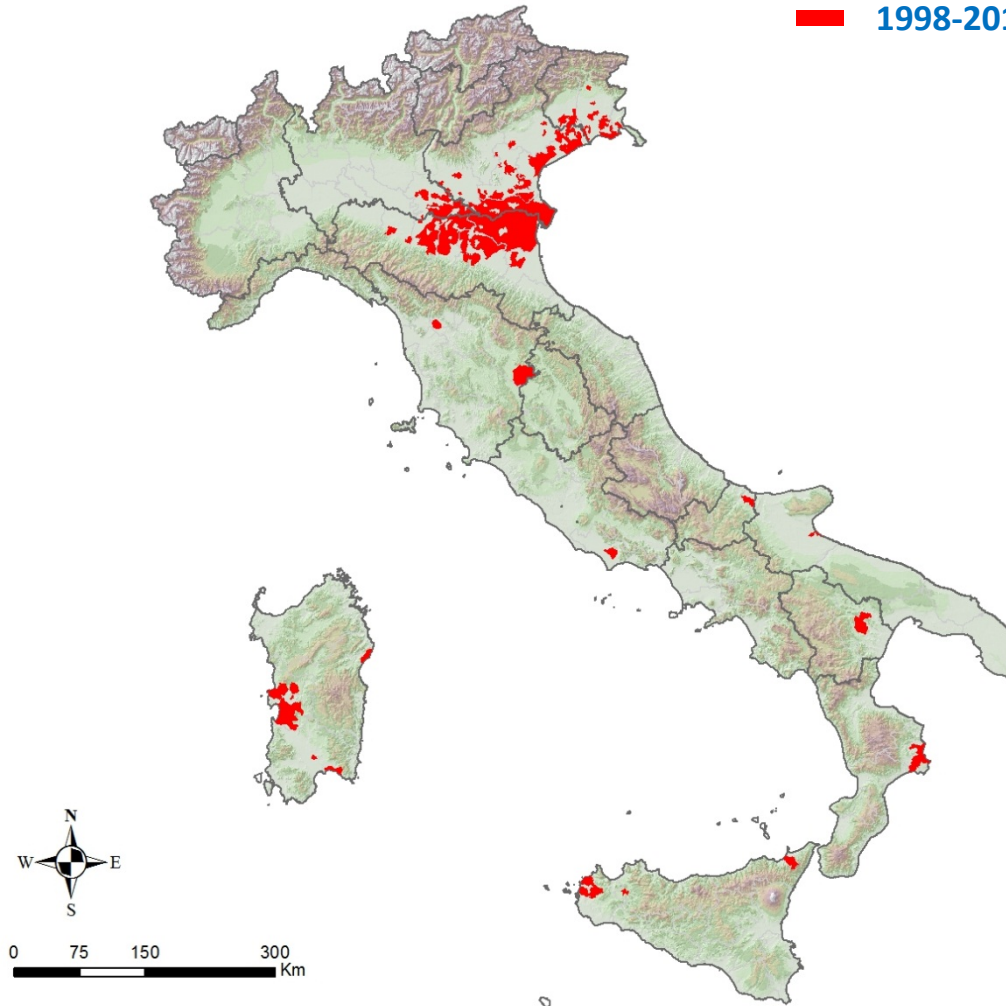
 1998-2010



Progressione WND 1998 - 2014

 CESME
Centro di F

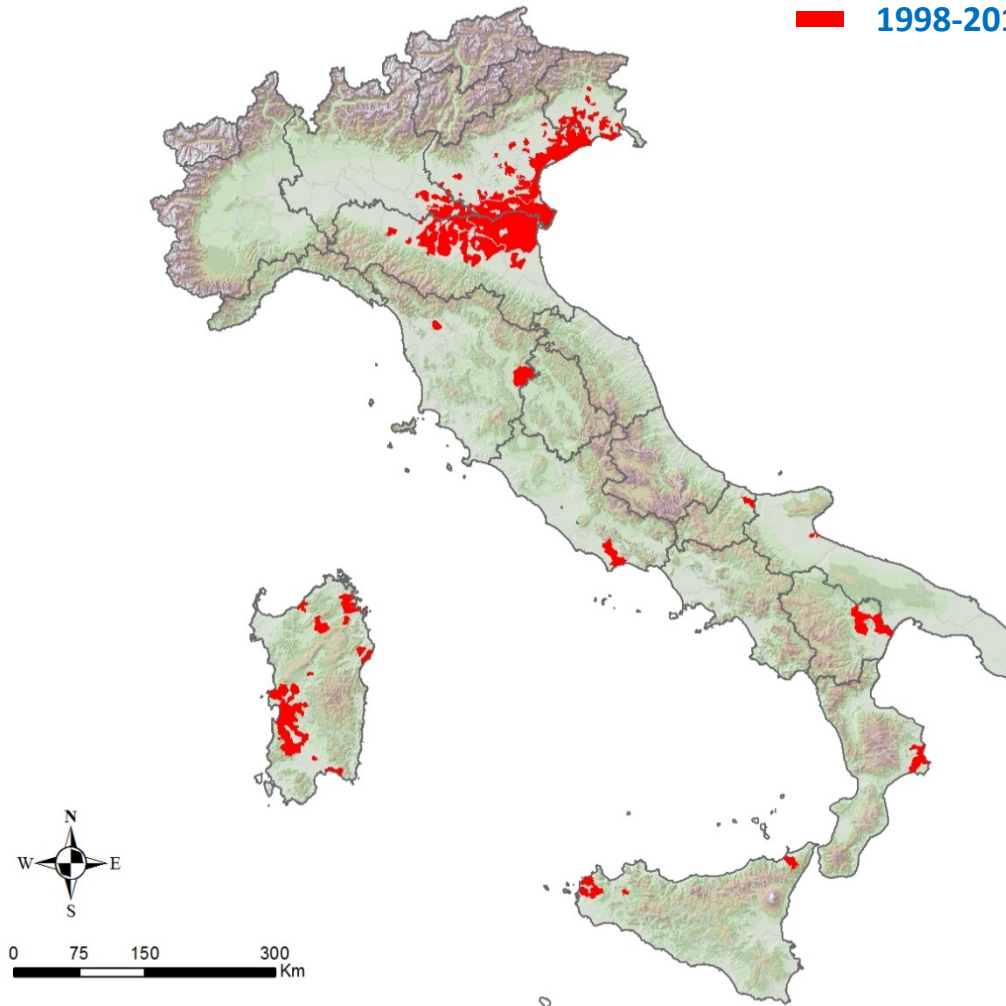
 1998-2011



Progressione WND 1998 - 2014

 CESME
Centro di F

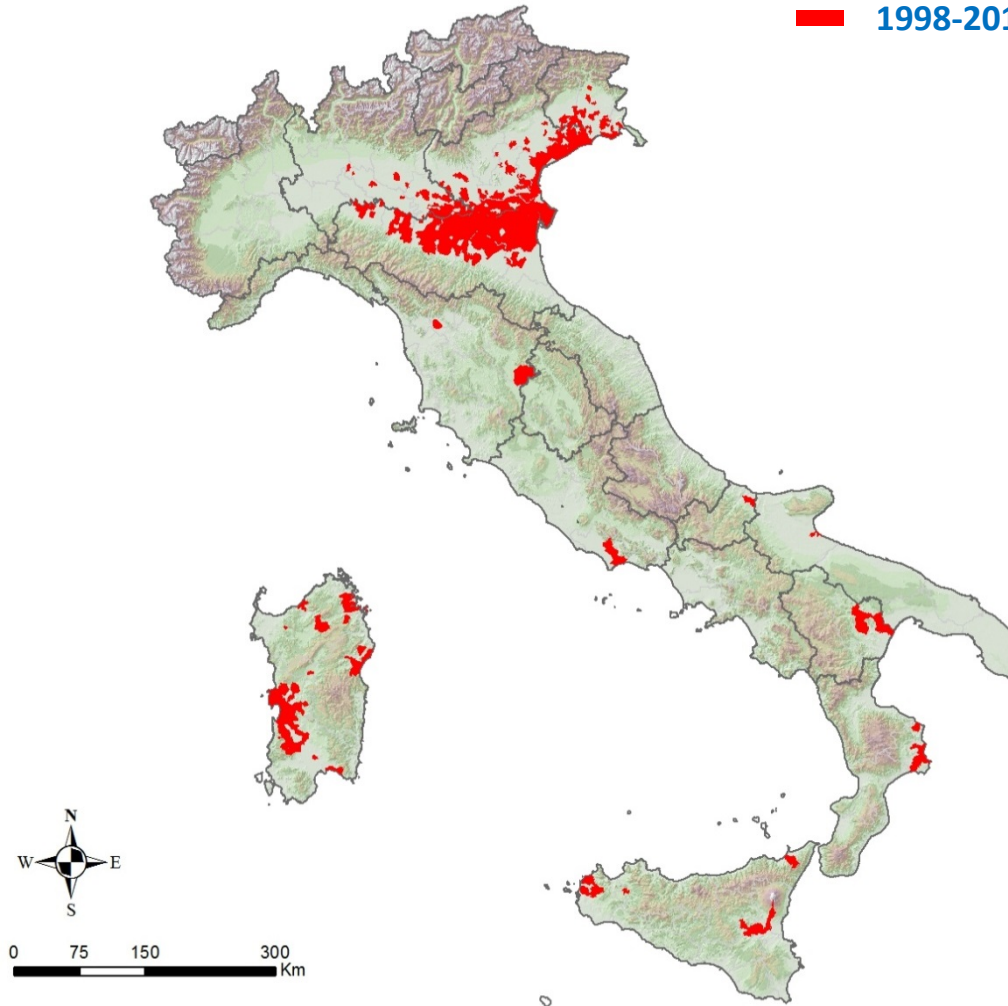
 1998-2012



Progressione WND 1998 - 2014

 CESME
Centro di F

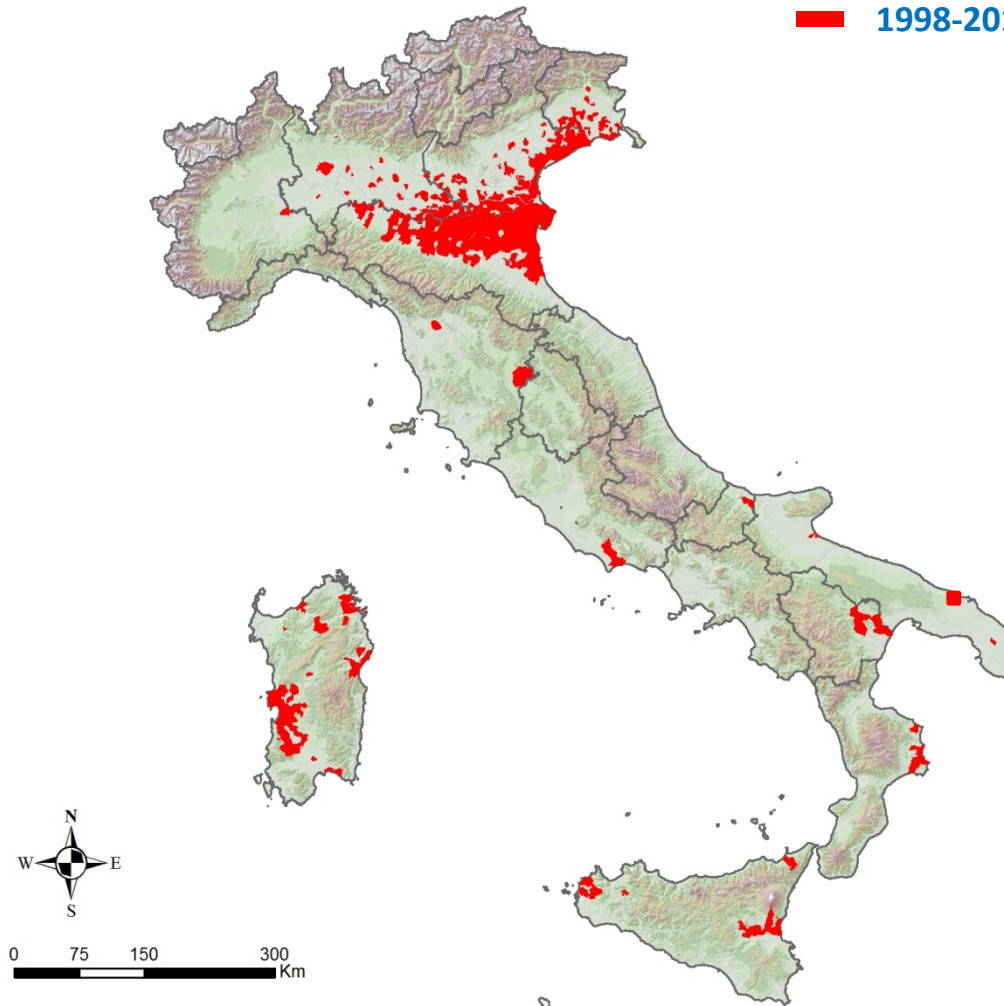
 1998-2013



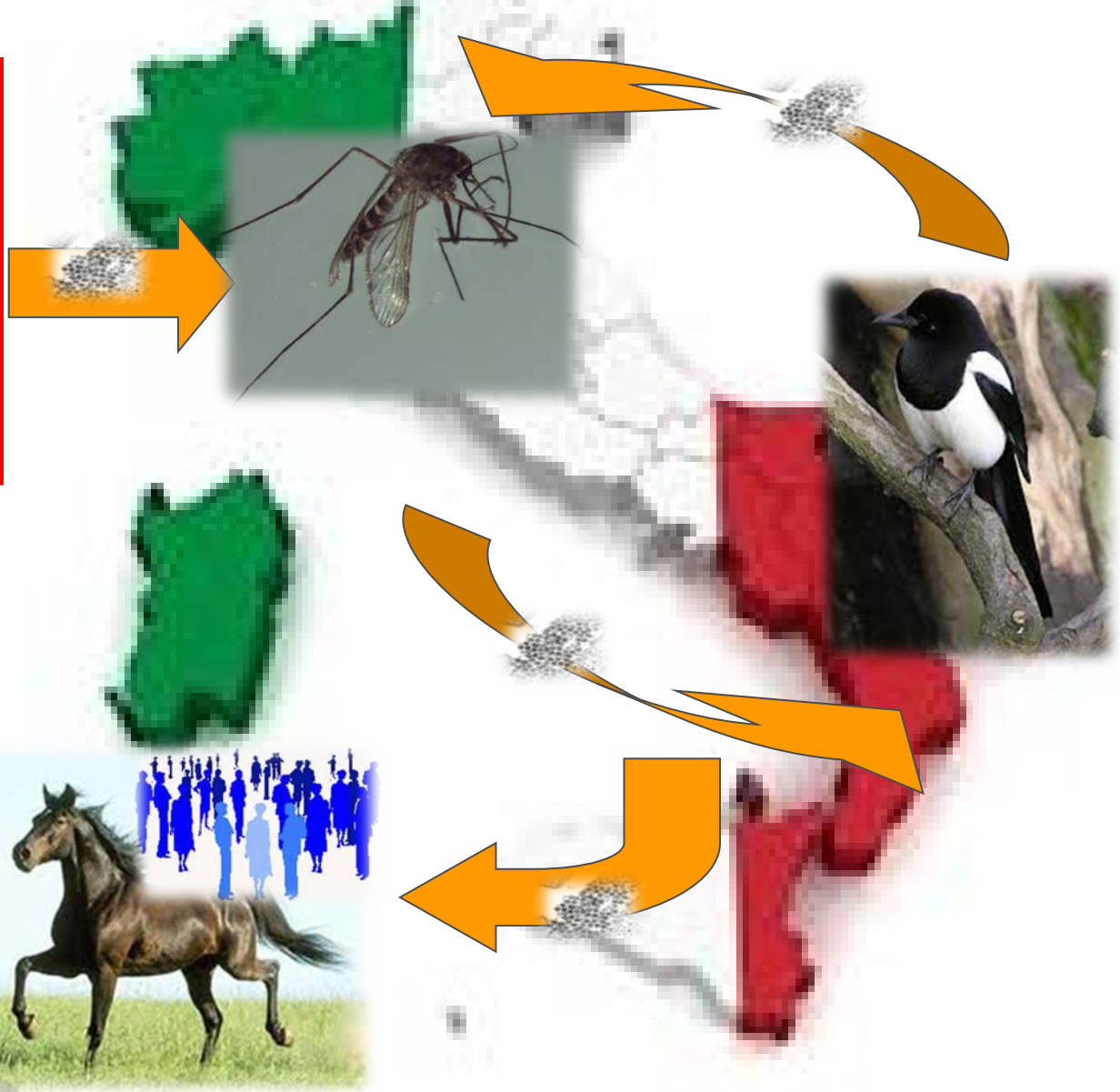
Progressione WND 1998 - 2014

 CESME
Centro di F

 1998-2014



CESME
Centro di R



La presenza della West Nile Disease nel **Vecchio Mondo** è ben nota **da decenni**. Il virus è stato identificato per la prima volta nel **1937** da una donna originaria del distretto di West Nile in **Uganda**. Nel **1950**, il WNV è stato ritrovato nel sangue di tre bambini in **Egitto**.




- ✓ Da allora casi sporadici e grandi epidemie di West Nile Disease sono stati segnalati in **Africa, Medio Oriente, Europa e Asia**.
- ✓ In **Sudafrica**, nel **1974**, un'epidemia di febbre West Nile ha causato circa **3000** casi clinici nell'uomo.



Ruolo dei migratori



- Sangue, tamponi tracheali e cloacali prelevati da 121 passeriformi appartenenti a 18 specie nel settembre 2010, durante una campagna di inanellamento.

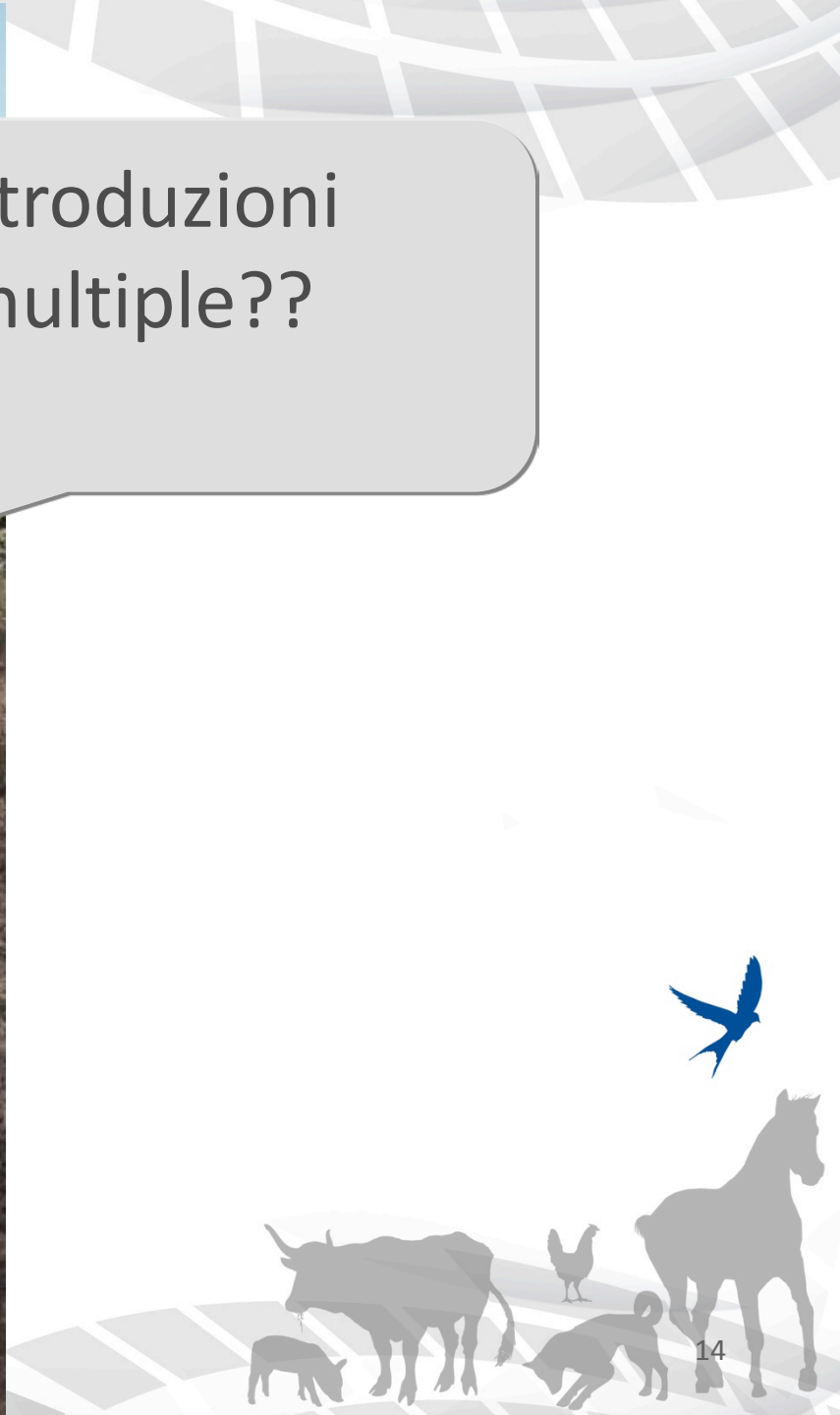
- Ab **Usutu** (SN test) in un merlo (*Turdus merula*) 

- PCR per **flavivirus** positiva in un beccafico (*Sylvia borin*) (1/19)





Introduzioni
multiple??

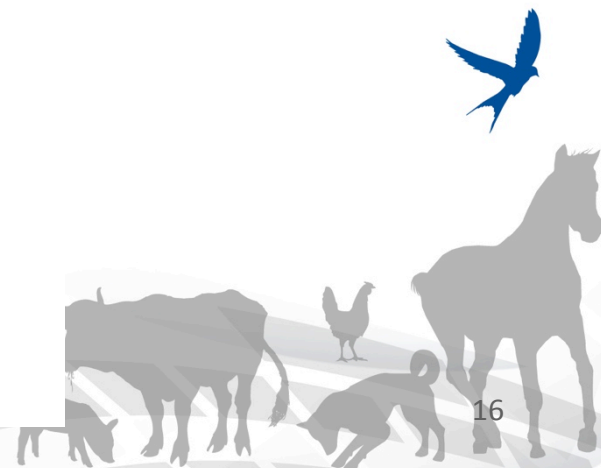




LINEAGE 1a

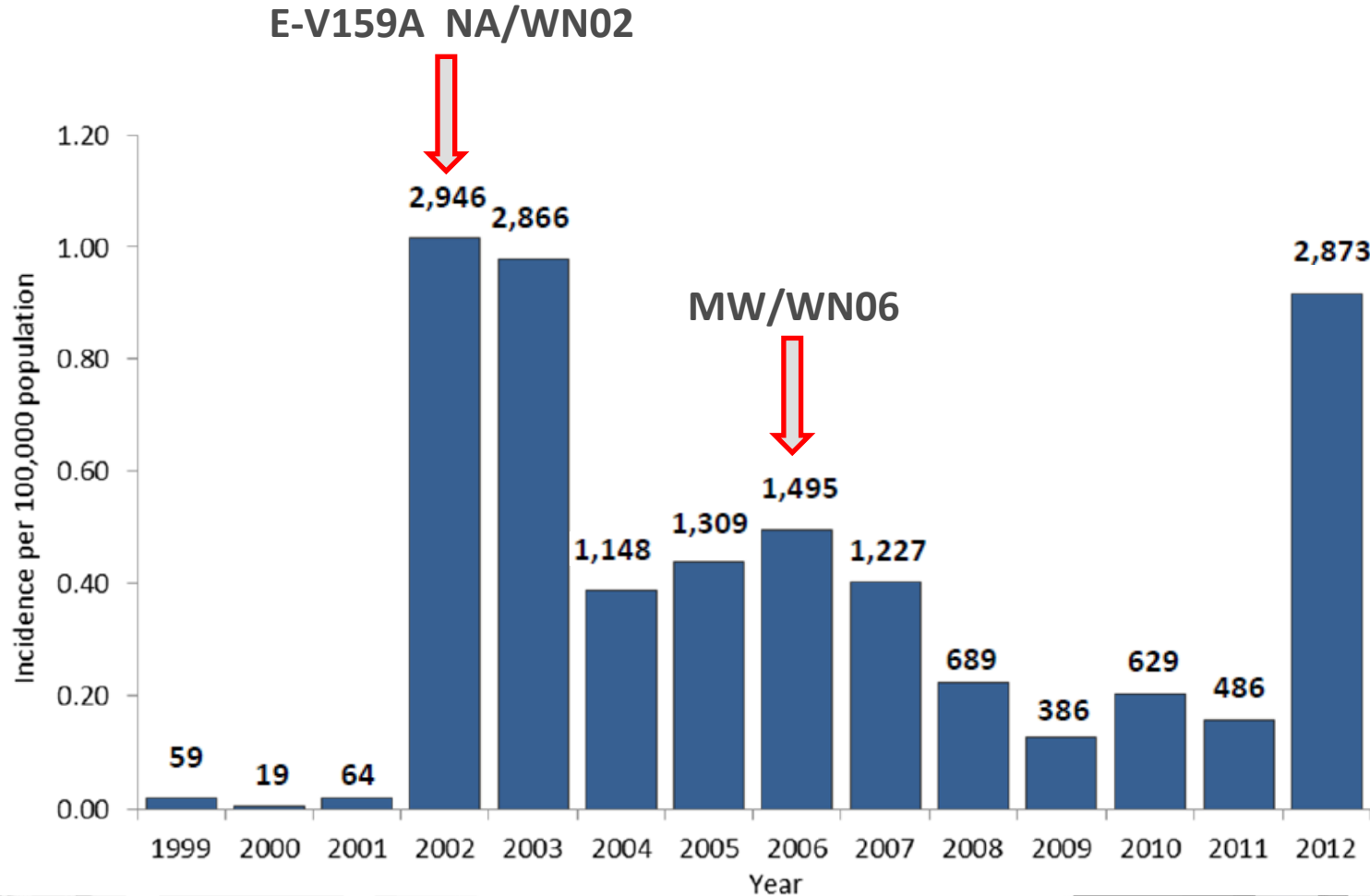
LINEAGE 1b

LINEAGE 1c / LINEAGE 5



Numero di casi neuroinvasivi negli Stati Uniti 1999-2012

 CESME
Centro di Riferenza Nazionale



WNV lineage I circolazione in Italia

Re-Emergence of West Nile Virus in Italy

F. Monaco, R. Lelli, L. Teodori, C. Pinoni, A. Di Gennaro, A. Polci, P. Calistri and G. Savini

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise "G. Caporale", Teramo, Italy

Zoonoses Public Health. **57** (2010) 476–486

I risultati **dell'analisi filogenetica** degli isolati italiani del **1998**, **2008** e **2009** indicano che questi ceppi appartengono al **lineage I** e al cluster dei ceppi **Mediterranei**.

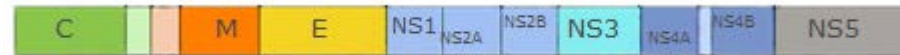
L'elevata identità tra i ceppi circolanti nel 2008 e nel 2009 avvalorata l'ipotesi che il WNV sia stato in grado di **sopravvivere durante il periodo inter-epidemico**, superando l'inverno e dando vita ad un nuovo ciclo di trasmissione nel 2009 nelle aree del nord est italiano.





Modello murino di patogenicità

T249P



WNV IT/2009



NewYork/1999

10^0 - 10^3 TCID₅₀/ml
IP e IC

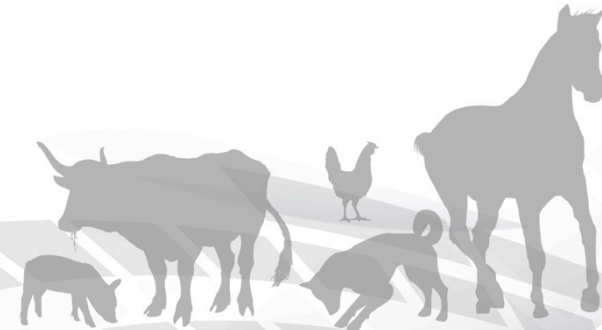


Italia/2009

10^0 - 10^3 TCID₅₀/ml
IP e IC



Prelevati
cervello,
cuore, reni e
milza dopo
la morte





Modello murino di patogenicità

- NY99 induce una **maggiore mortalità** rispetto a Ita09 se somministrato per via **i.c.** 100% (86,71%-100%) vs 55% (34,02%-74,29%) **MAGGIORE NEUROVIRULENZA**
- Qualunque sia la via di infezione, alle **dosi più basse** NY99 è più patogeno di Ita09 70% (47,82%-85,41%) vs 20% (8,22%-41,91%) **MAGGIORE NEUROINVASIVITA'**
- Per entrambi gli isolati (NY99 – Ita09) il **cervello** è stato l'organo più frequentemente infetto e con titoli maggiori seguito dai **reni**.





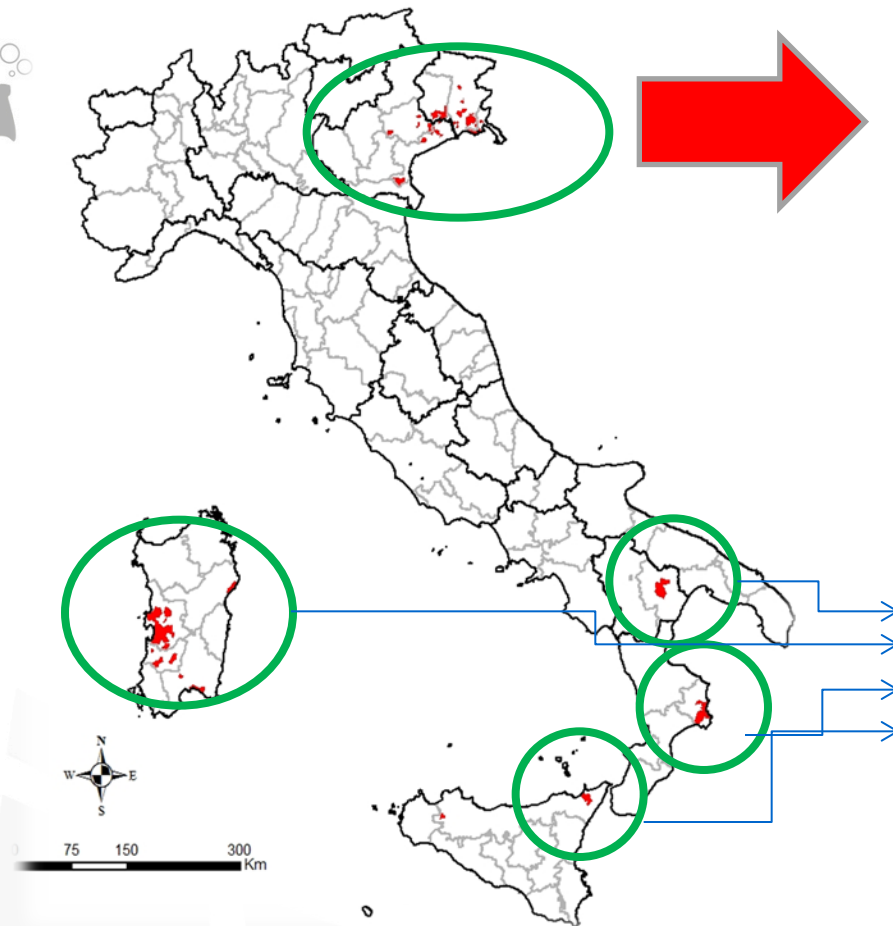
Ma nuovi virus continuano a raggiungere l'Italia...

 CESME
Centro di Referenza Nazionale



Aree con circolazione virale

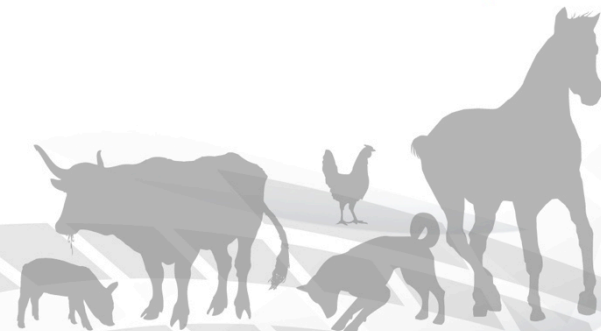
 CESME
Centro di Referenza Nazionale



Lineage 1 in uccelli e zanzare

Lineage 2 solo in 2 pool di *Cx pipiens* (UD) e in una colomba dal collare (*Streptopelia decaocto*) TV

Lineage 1 in cavalli, uccelli e zanzare



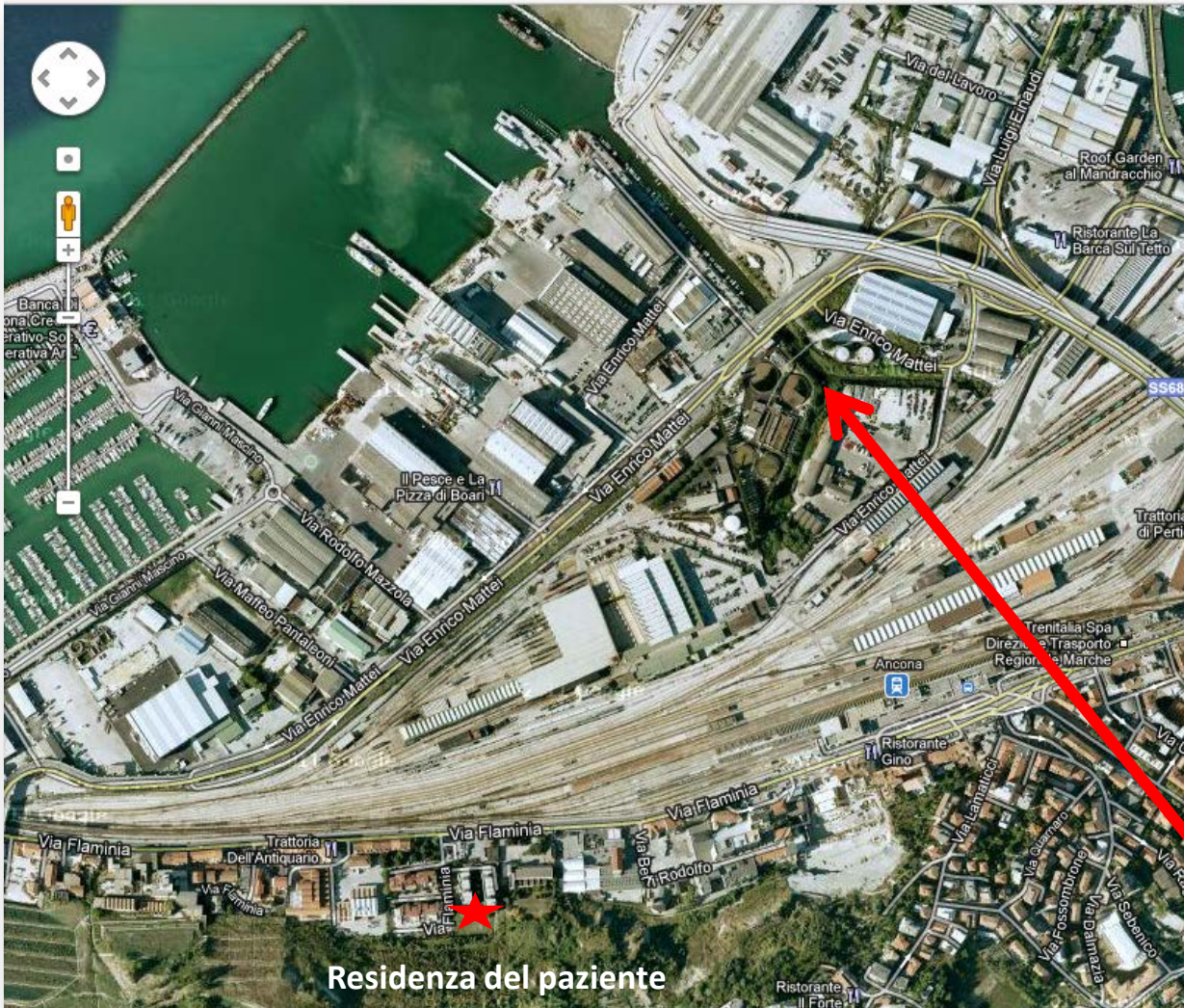
Ancona: WNV Lineage 2



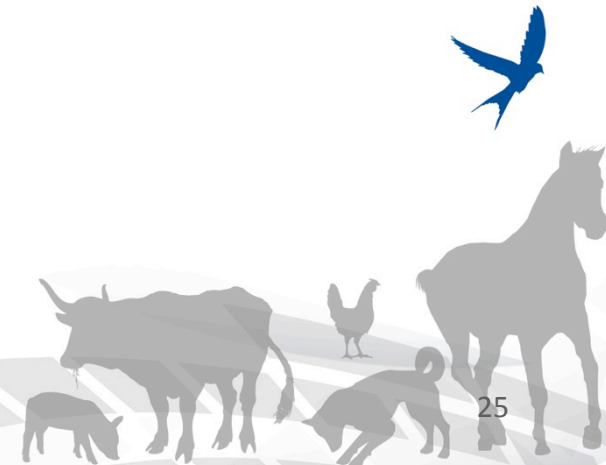
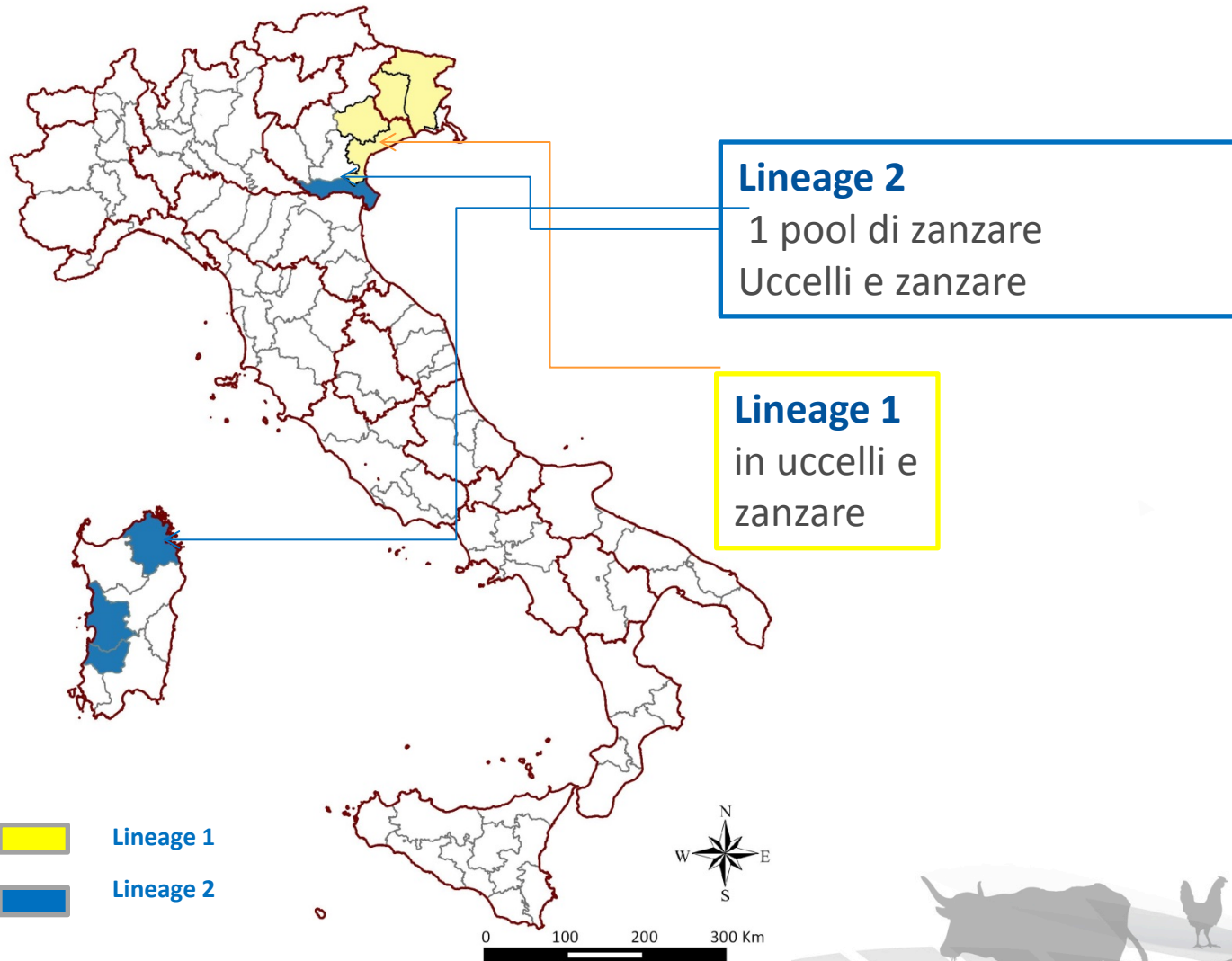
- Sintomi : **9 Settembre**
- Forma **non-neuroinvasiva** con febbre e mialgia
- Ipotesi dell'introduzione: **vettori**



Area umida, alta densità di uccelli e zanzare



2012 co-circolazione dei WNV L1 & L2

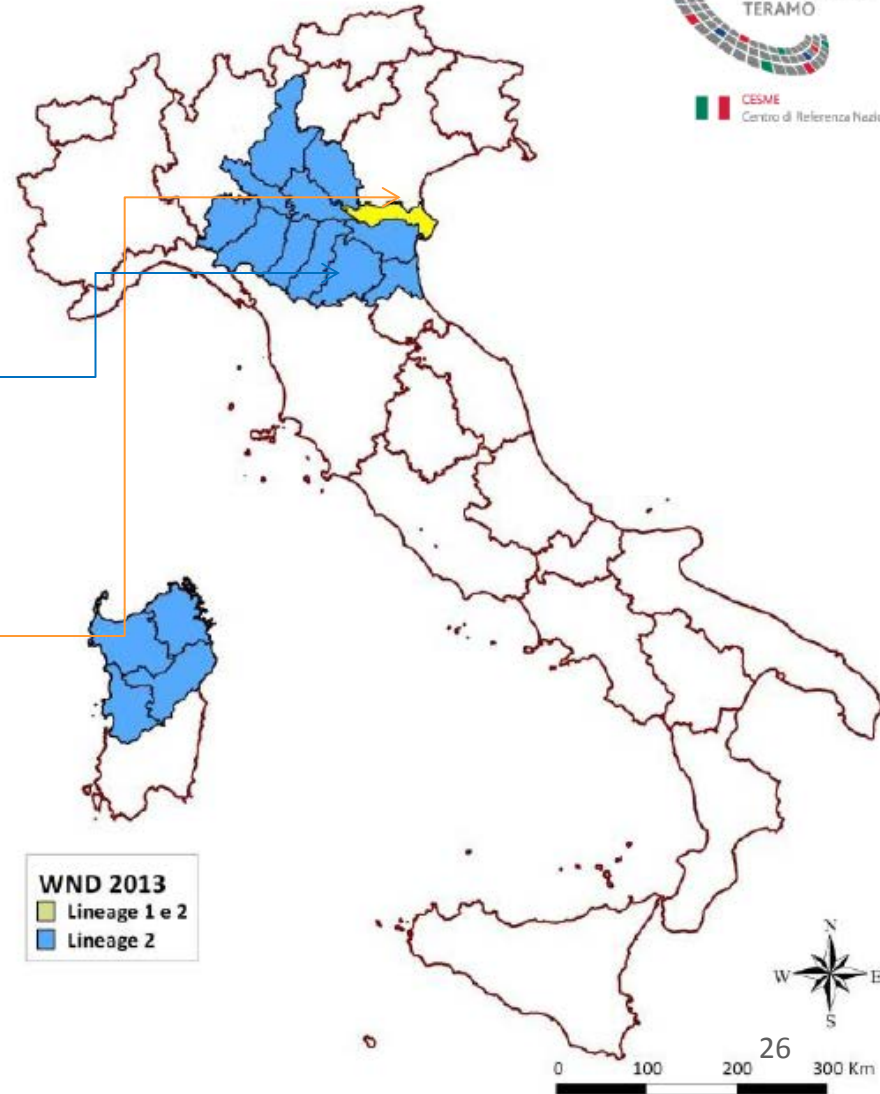


2013 co-circolazione dei WNV L1 & L2

Lineage 2 in cavalli, uccelli, zanzare

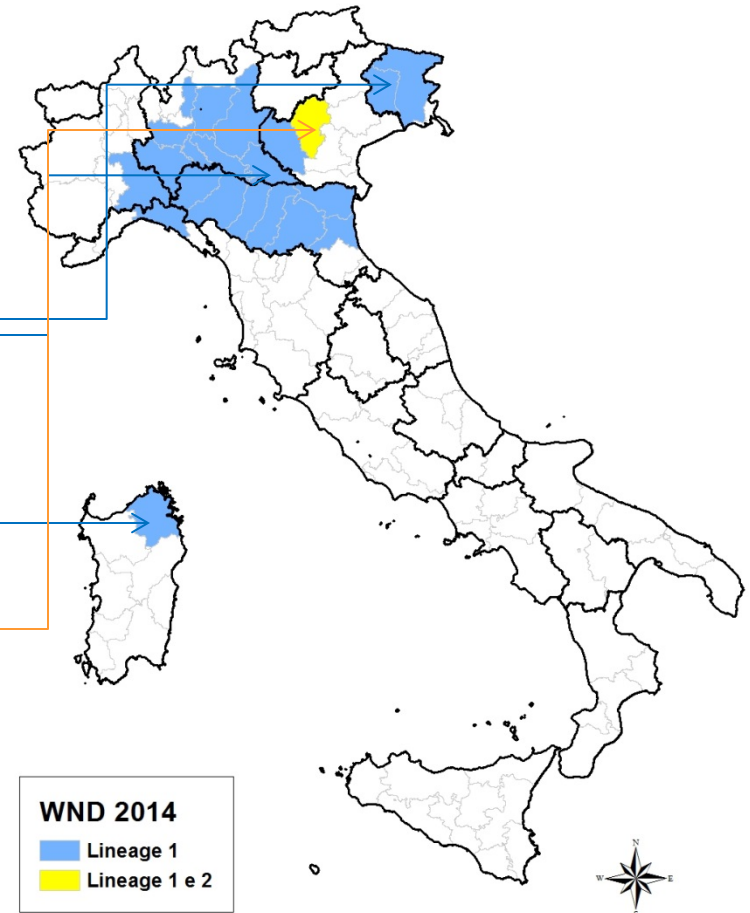
Lineage 2 in uccelli e zanzare

Lineage 1 solo in un pool di zanzare in
povincia di Rovigo

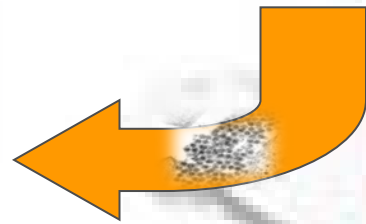
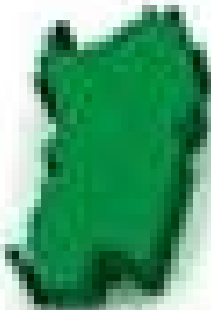
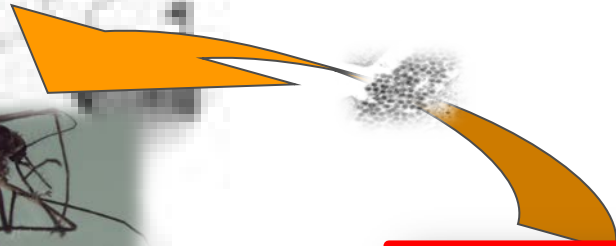


Lineage 2 in uccelli, zanzare

Lineage 2 in zanzare
Lineage 1 in un cavallo in provincia di
Vicenza



0 50 100 200 300 400
Km



Ma, per la prima volta dal 2008, sono stati segnalati **sintomi clinici in uccelli selvatici** (civetta, poiana) e **sinantropici** (cornacchie) in Sardegna (**Lineage 1**)...

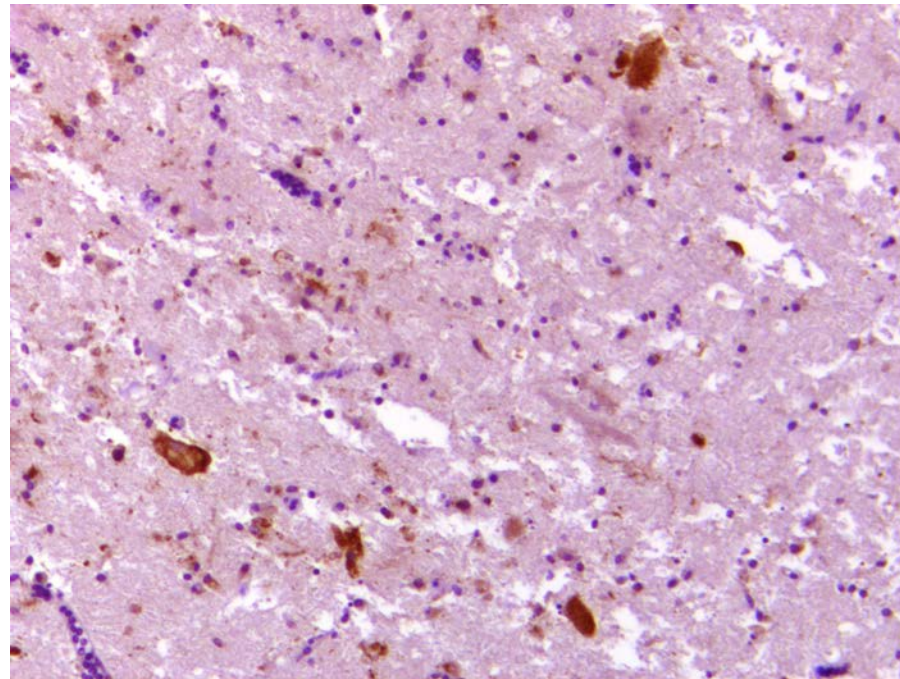


Dott. Paolo Briguglio - Merops Veterinaria e Ambiente srl
Clinica Veterinaria "duemari"



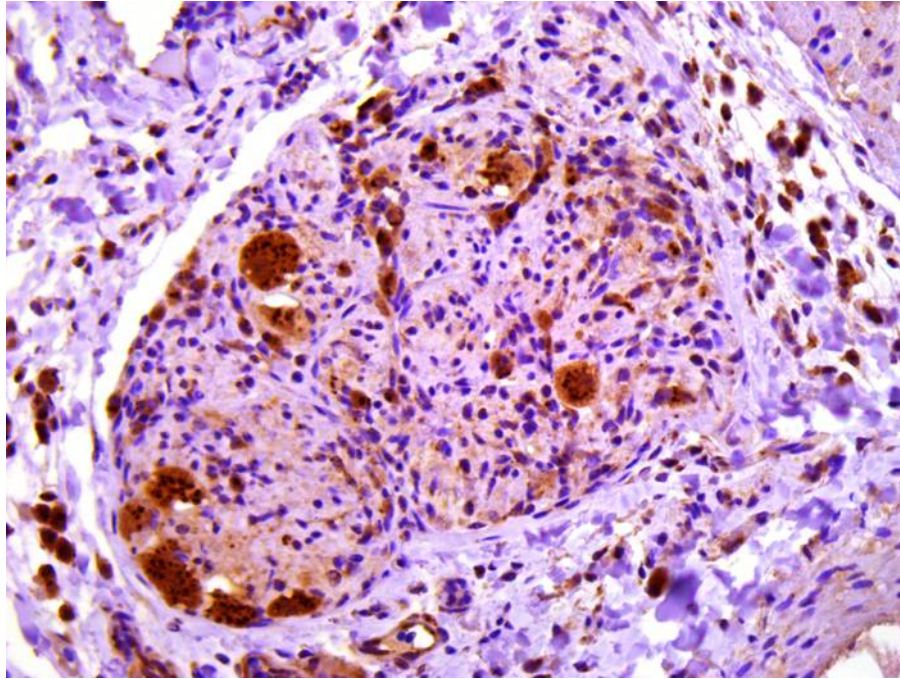
Ancora sintomi clinici negli uccelli in Sardegna ...

(Lineage 2)



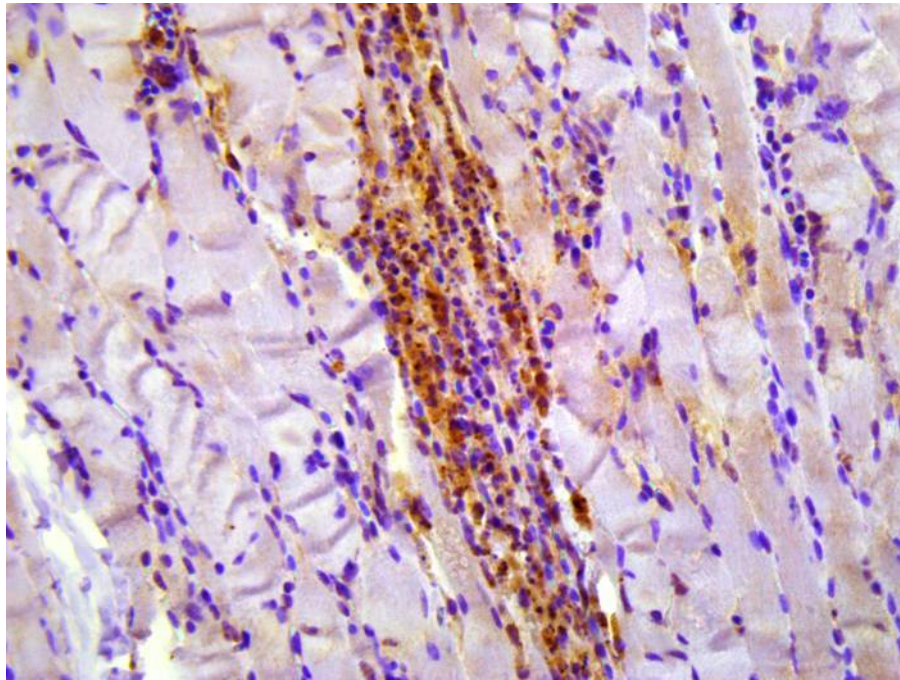
Astore. Cervello. WNV specific immunolabeling is seen within neuronal perikarya. Mayer's hematoxylin counterstain. Final magnification = x 400.





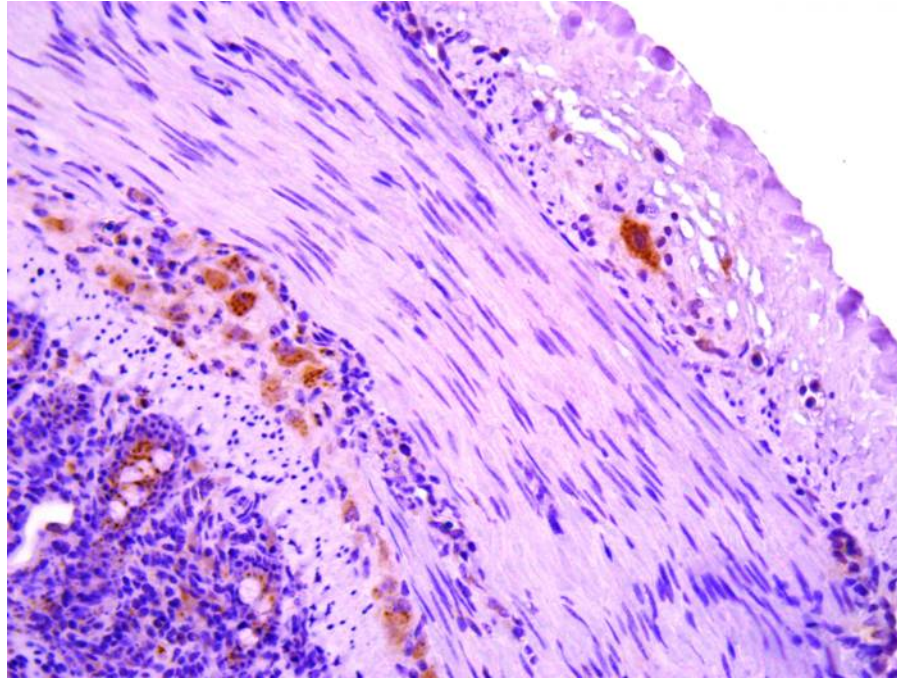
Astore. Cuore. Antigene WN rilevato nelle cellule del sistema di conduzione cardiaco e cellule infiammatorie circostanti. Mayer's hematoxylin counterstain. Final magnification = x 400.





Astore. Muscolo scheletrico. *Foci* di miosite con accumuli di antigene WNV con infiltrati infiammatori. Mayer's hematoxylin counterstain. Final magnification = x 400.

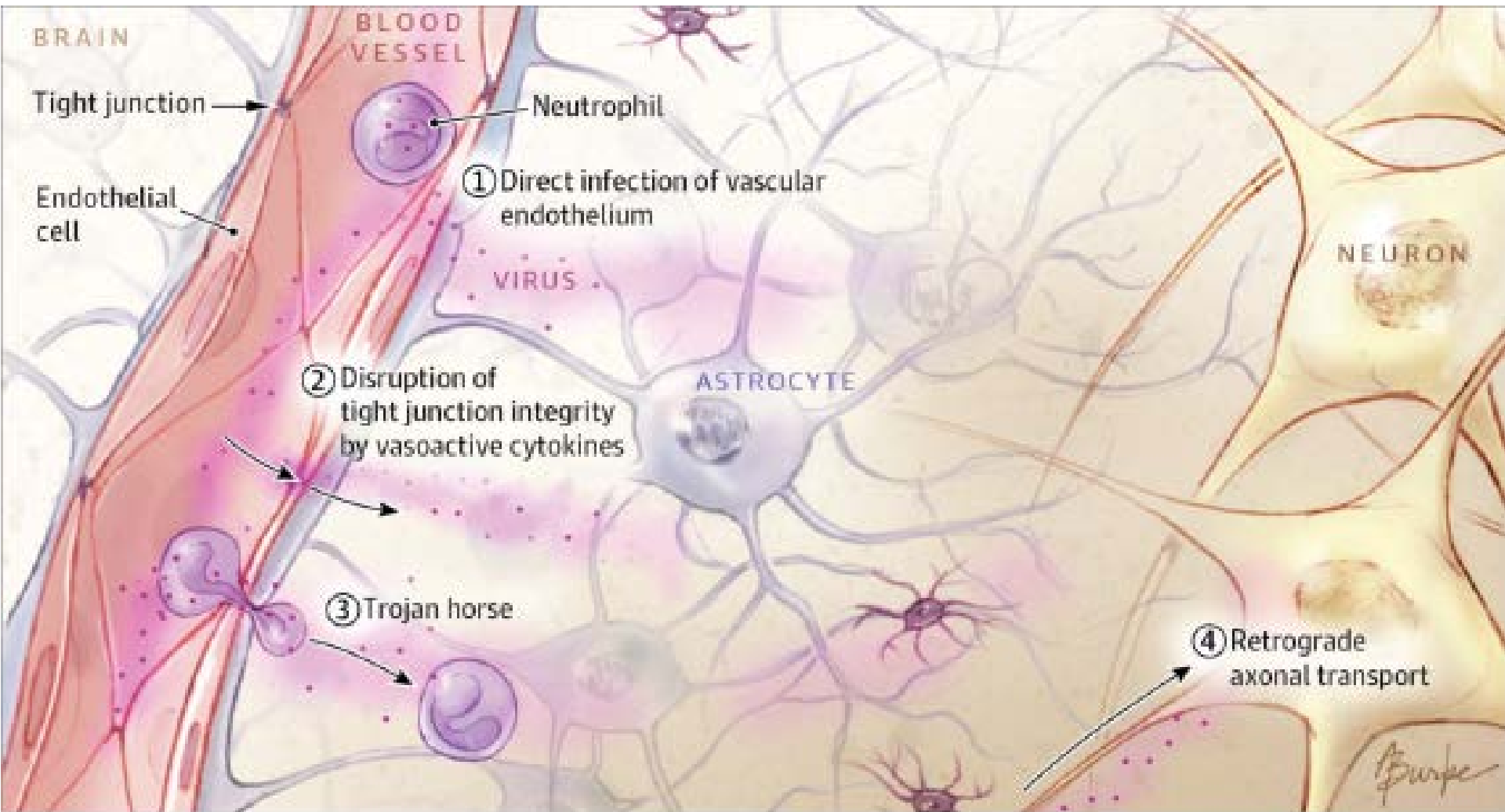




Astore. Piccolo intestino. Antigeni WNV nei neuroni del sistema nervoso enterico, nei plessi mioenterico e sottomucoso. Mayer's hematoxylin counterstain. Final magnification = x 400.



Neuroinvasività?



2013

- 
- ✓ gazza (*Pica pica*) L2
 - ✓ cornacchia grigia (*Corvus corone cornix*) L2
 - ✓ ghiandaia (*Garrulus glandarius*) L2
 - ✓ corvo (*Corvus corax*) L2
 - ✓ astore (*Accipiter gentilis*) L2
 - ✓ fenicottero (*Phoenicopterus roseus*) L2
 - ✓ cardellino (*Carduelis carduelis*) L2
 - ✓ gheppio (*Falco tinnunculus*)
 - ✓ merlo (*Turdus merula*) L2
 - ✓ tortora (*Streptopelia decaocto*) L2
 - ✓ passera d'italia (*Passer italiae*) L2

- ✓ upupa (*Upupa epops*) L2
- ✓ assiolo (*Otus scops*) L2
- ✓ civetta (*Athene noctua*) L2
- ✓ verzellino (*Serinus serinus*) L2
- ✓ balestruccio (*Delichon urbicum*) L2
- ✓ rondone (*Apus apus*)

2014

- ✓ gazza (*Pica pica*) L2
- ✓ cornacchia grigia (*Corvus corone cornix*) L2
- ✓ ghiandaia (*Garrulus glandarius*) L2
- ✓ astore (*Accipiter gentilis*) L2
- ✓ tortora (*Streptopelia decaocto*) L2
- ✓ civetta (*Athene noctua*) L2



2008

- **piccione** (*Columba livia*)
- **cornacchia grigia** (*Corvus corone cornix*)
- **gazza** (*Pica pica*)
- **ghiandaia** (*Garrulus glandarius*)
- **cormorano** (*Phalacrocorax carbo*)
- **gabbiano** (*Larus michahellis*)

2009

- **civetta** (*Athene noctua*)
- **cornacchia grigia** (*Corvus corone cornix*)
- **gazza** (*Pica pica*)
- **ghiandaia** (*Garrulus glandarius*)
- **germano** (*Anas platyrhynchos*)
- **gabbiano** (*Larus michahellis*)

2011

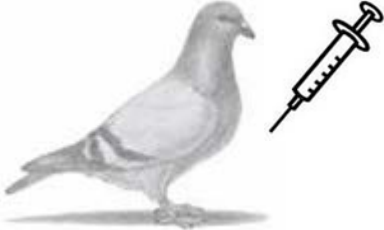
- ✓ **ghiandaia** (*Garrulus glandarius*)
- ✓ **cornacchia grigia** (*Corvus corone cornix*)
- ✓ **civetta** (*Athene noctua*)
- ✓ **poiana** (*Buteo buteo*)
- ✓ **germano** (*Anas platyrhynchos*)
- ✓ **colomba dal collare** (*Streptopelia decaocto*) L2

2012


- ✓ **gazza** (*Pica pica*) L1
- ✓ **cornacchia grigia** (*Corvus corone cornix*) L1 & L2
- ✓ **allodola** (*Alauds arvensis*) L2
- ✓ **astore** (*Accipiter gentilis*) L2
- ✓ **oca collarosso** (*Branta ruficollis*) L2



Il ruolo dei piccioni



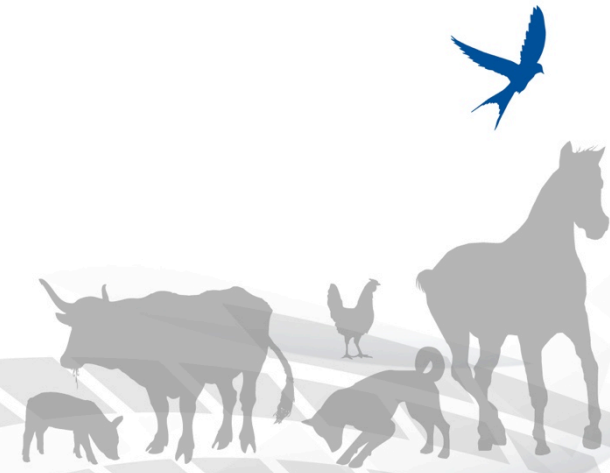
10^6 TCID₅₀/ml WNV sc
2009 (A)



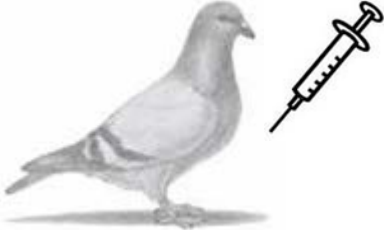
10^6 TCID₅₀/ml WNV sc
2011 (B)




10^6 TCID₅₀/ml WNV sc
2012 (C)




Il ruolo dei piccioni



10^6 TCID₅₀/ml WNV sc
2009 (A)



10^6 TCID₅₀/ml WNV sc
2011 (B)



10^6 TCID₅₀/ml WNV sc
2012 (C)



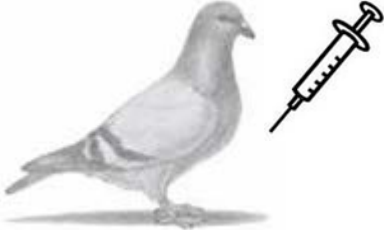
Prelievo
quotidiano di
siero




Prelievo
quotidiano di
tamponi
orofaringei e
cloacali



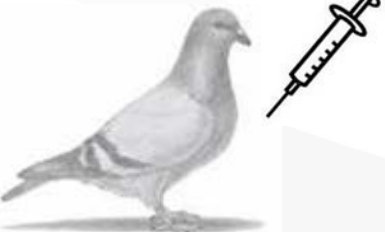
Il ruolo dei piccioni



10^6 TCID₅₀/ml WNV sc
2009 (A)



10^6 TCID₅₀/ml WNV sc
2011 (B)



10^6 TCID₅₀/ml WNV sc
2012 (C)



Prelievo
quotidiano di
siero

- SN
- qRT-PCR
- I.V.



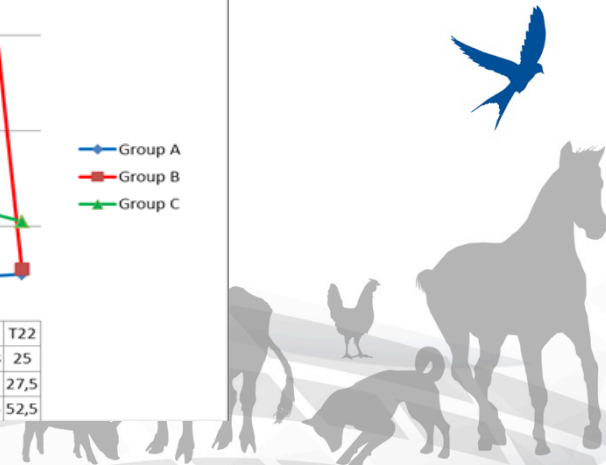
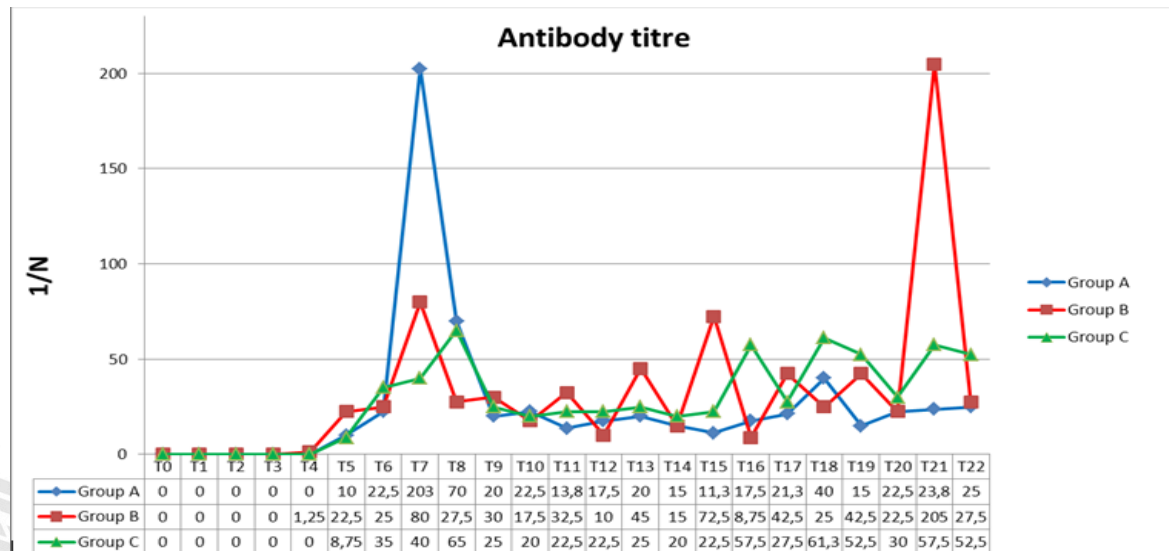
Prelievo
quotidiano di
tamponi
orofaringei e
cloacali

- 
- qRT-PCR
 - I.V.
- 



Il ruolo dei piccioni

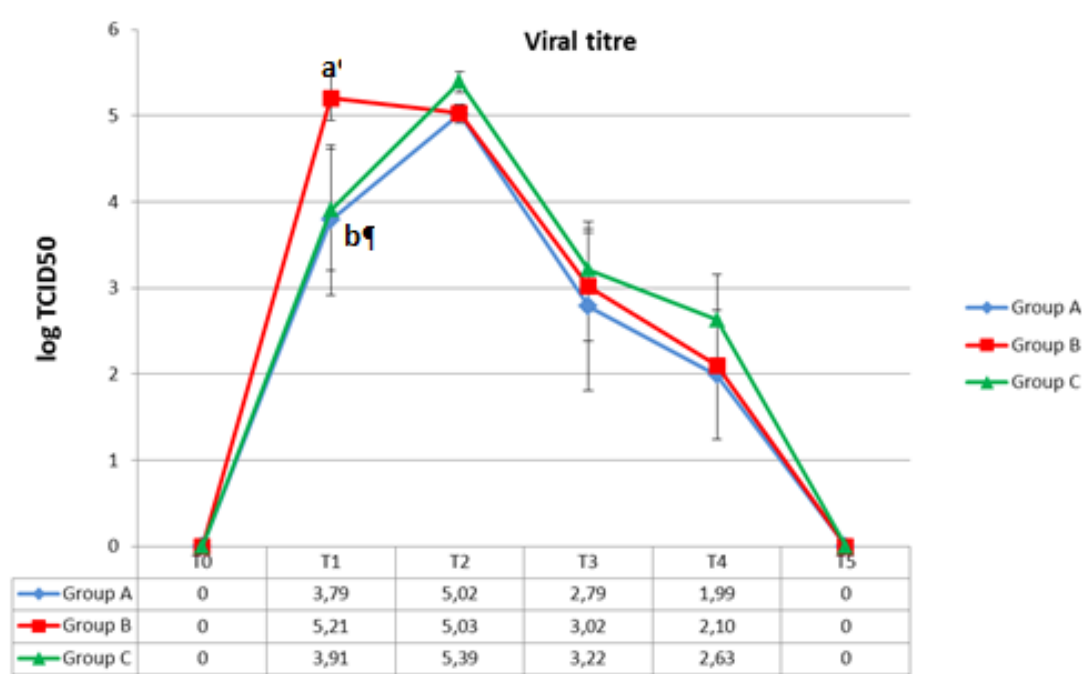
- Nessuno degli uccelli ha mostrato **sintomatologia clinica** durante il trial.
- Tutti gli animali hanno **sieroconvertito** a partire dal 5° giorno post infezione (dpi) fino alla fine dell'esperimento (35° dpi).



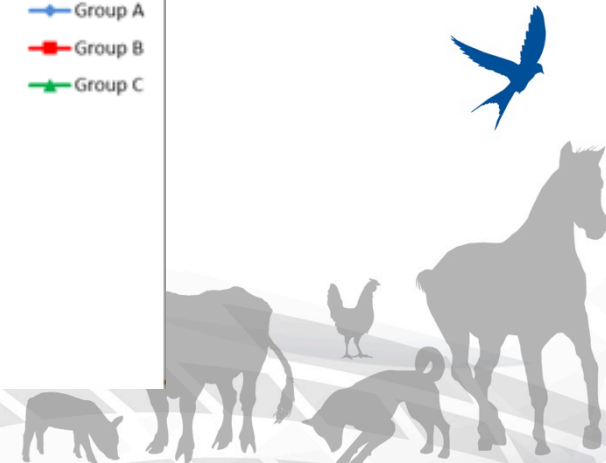


Il ruolo dei piccioni

Tutti gli animali infettati hanno sviluppato una **viremia** dal 1° dpi al 4° dpi. Il titolo virale (valore medio) varia da $10^{1.99}$ (WNV 2009) to $10^{5.39}$ (WNV 2012) TCID₅₀/ml.



Group A
Group B
Group C



Il ruolo dei piccioni



- Tre uccelli del Gruppo A e 5 dei Gruppi B e C hanno raggiunto un titolo viremico **potenzialmente infettante** ($10^{4.7}$ TCID₅₀/ml).
- Tutti gli animali hanno **eliminato il WNV** attraverso la **via cloacale e orofaringea**.

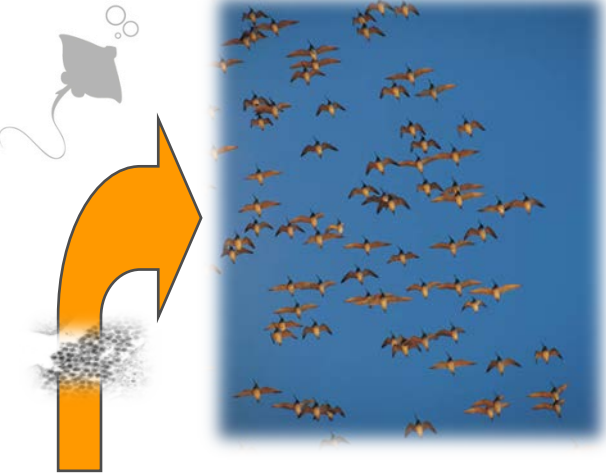




Il ruolo dei piccioni

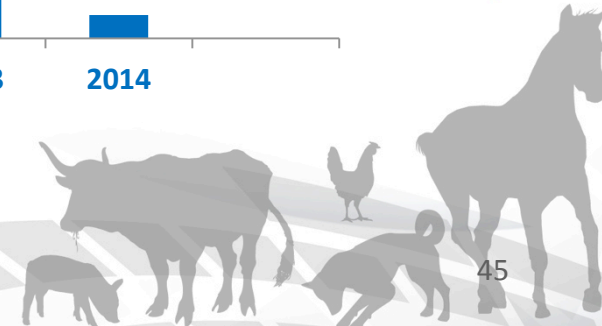
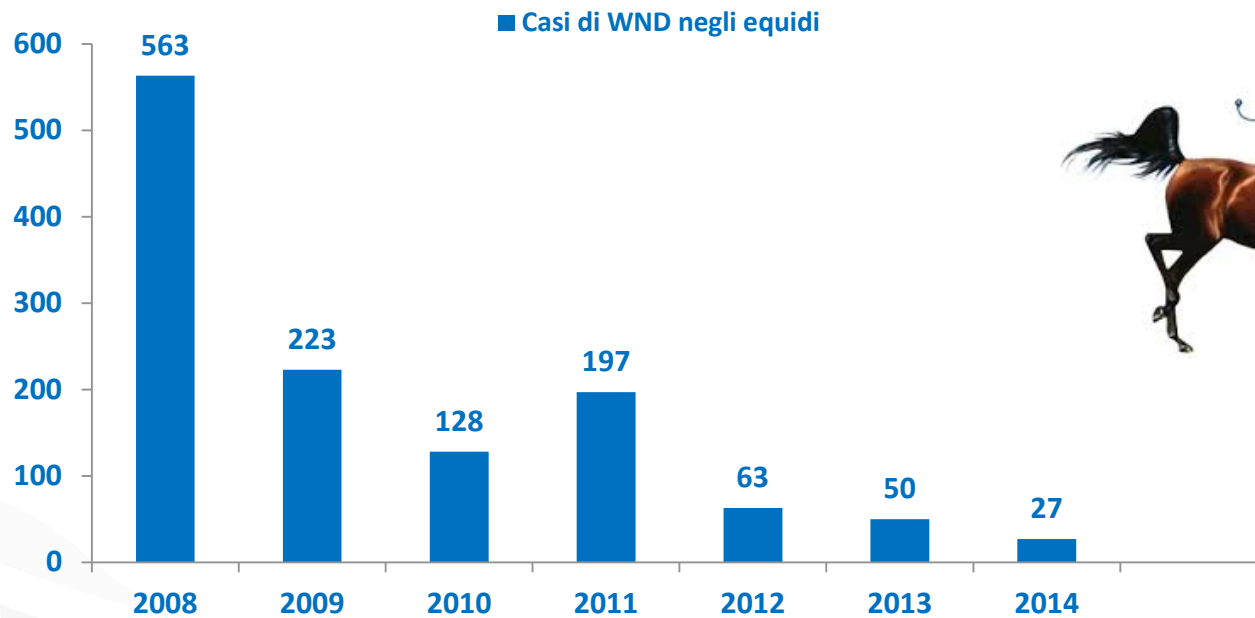
- I piccioni possono essere considerati una **specie reservoir competente** nei confronti dei ceppi di WNV che hanno circolato in Italia dal 2008 al 2012... **Possibile ruolo di “ponte” tra le aree urbane e quelle rurali...**
- I piccioni infetti sono potenzialmente in grado di **contaminare l’ambiente attraverso l’eliminazione per via orale e cloacale del WNV...** la dispersione del virus nell’ambiente può dar vita a infezioni orizzontali, soprattutto in condizioni di elevata densità degli animali.
- Nel corso di infezioni da WNV, i piccioni sviluppano una **risposta immune forte e persistente**, in grado di prevenire nuove infezioni.





Casi di infezione da WNV negli equidi in Italia 2008-2014

Numero di casi negli **equidi** dal 2008 al 2014

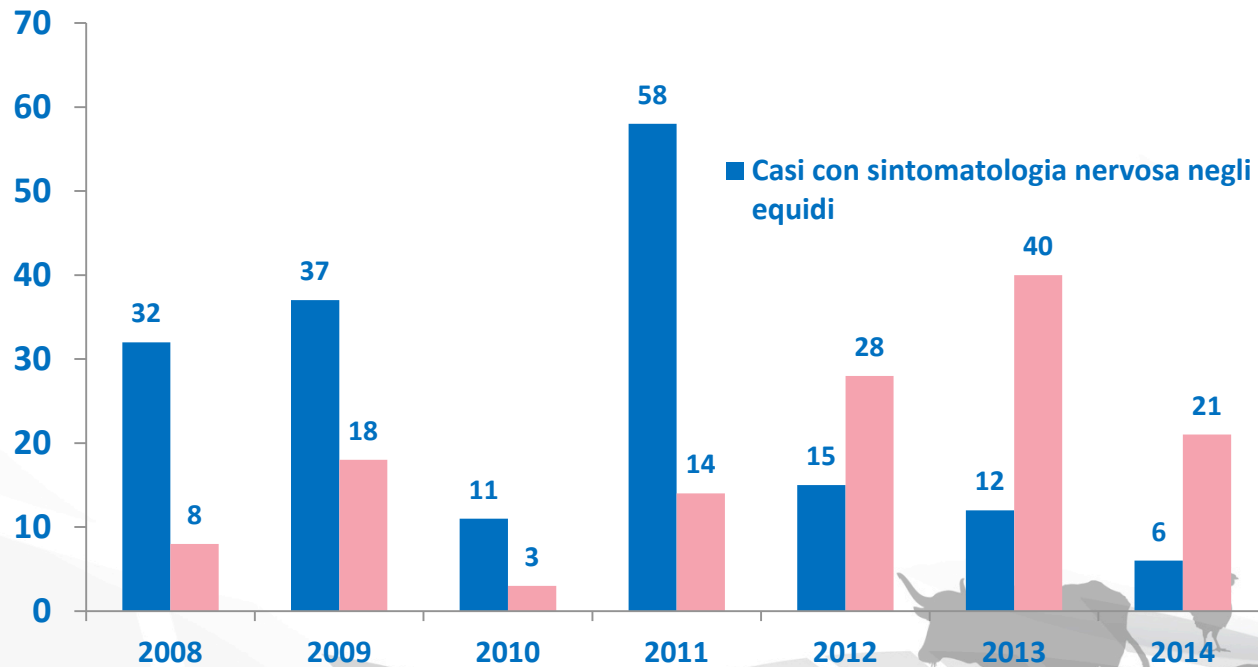


Casi con sintomatologia neurologica da WNV in Italia nell'uomo e negli equidi


2008-2014

 CESME
Centro di Riferenza Nazionale

Anno	Casi Equidi		Casi Uomo	
	Casi totali (sintomi nervosi + positività diagnostiche)	Casi con sintomatologia nervosa	Casi totali (WNF + WNND)	Casi con sintomatologia nervosa
2008	563	32	8	8
2009	223	37	18	18
2010	128	11	3	3
2011	197	58	15	14
2012	63	15	45	28
2013	50	12	70	40
2014	27	6	24	21
Totale	1251	171	183	132



Il Piano Nazionale di Sorveglianza WND come allerta rapido

- 
- ✓ Grazie alle attività di **sorveglianza** realizzate dai **servizi veterinari**, sono stati identificati precocemente i **territori in cui circola il virus**.
 - ✓ Questo **allerta rapido** é stato utilizzato per la tutela della **salute pubblica** facilitando la predisposizione di **azioni preventive** nelle aree interessate dal WNV.

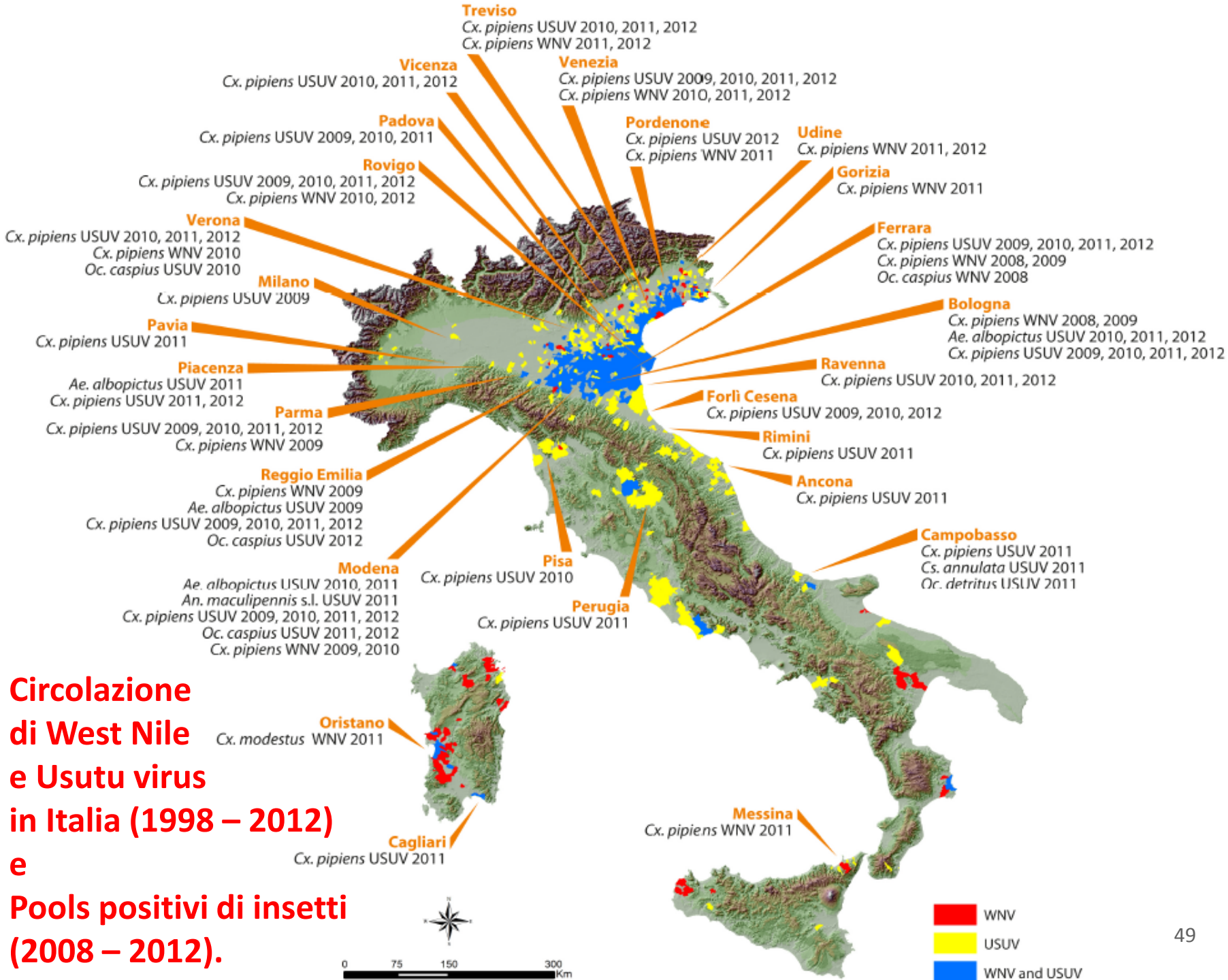


WESTHOLE



©Fewings
fewings.ca





Importanza della sorveglianza entomologica come early warning system per la circolazione del WNV

RAPID COMMUNICATION

New incursions of West Nile virus lineage 2 in Italy in 2013: the value of the entomological surveillance as early warning system

Mattia Calzolari¹, Federica Monaco², Fabrizio Montarsi³, Paolo Bonilauri¹, Silvia Ravagnan³, Romeo Bellini⁴, Giovanni Cattoli³, Paolo Cordioli¹, Stefania Cazzin³, Chiara Pinoni², Valeria Marini², Silvano Natalini⁵, Maria Goffredo², Paola Angelini⁵, Francesca Russo⁶, Michele Dottori¹, Gioia Capelli³ & Giovanni Savini^{2*}



In provincia di Modena, la circolazione del WNV L2 identificata in un pool of *Culex pipiens* il 3 giugno, con **42 giorni di anticipo** sul primo caso neuroinvasivo nell'uomo nella stessa provincia.



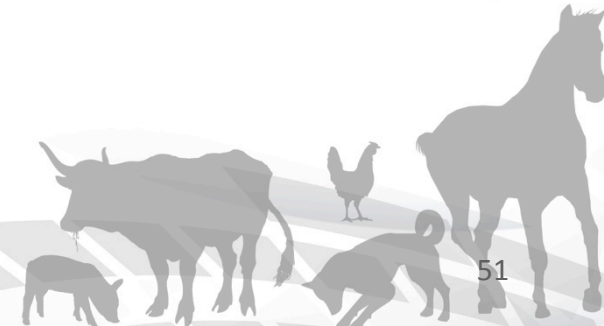
Il Nuovo Piano Nazionale di Sorveglianza WND 2014

Due aree geografiche

 CESME
Centro di Riferenza Nazionale



- ✓ **Aree endemiche:** il territorio dove il **WNV** ha circolato nel corso degli anni precedenti e dove, quindi, si sono ripetutamente osservati episodi di infezione, nonché **aree limitrofe**
- ✓ **Resto del territorio nazionale.**



Il Nuovo Piano Nazionale di Sorveglianza WND 2014

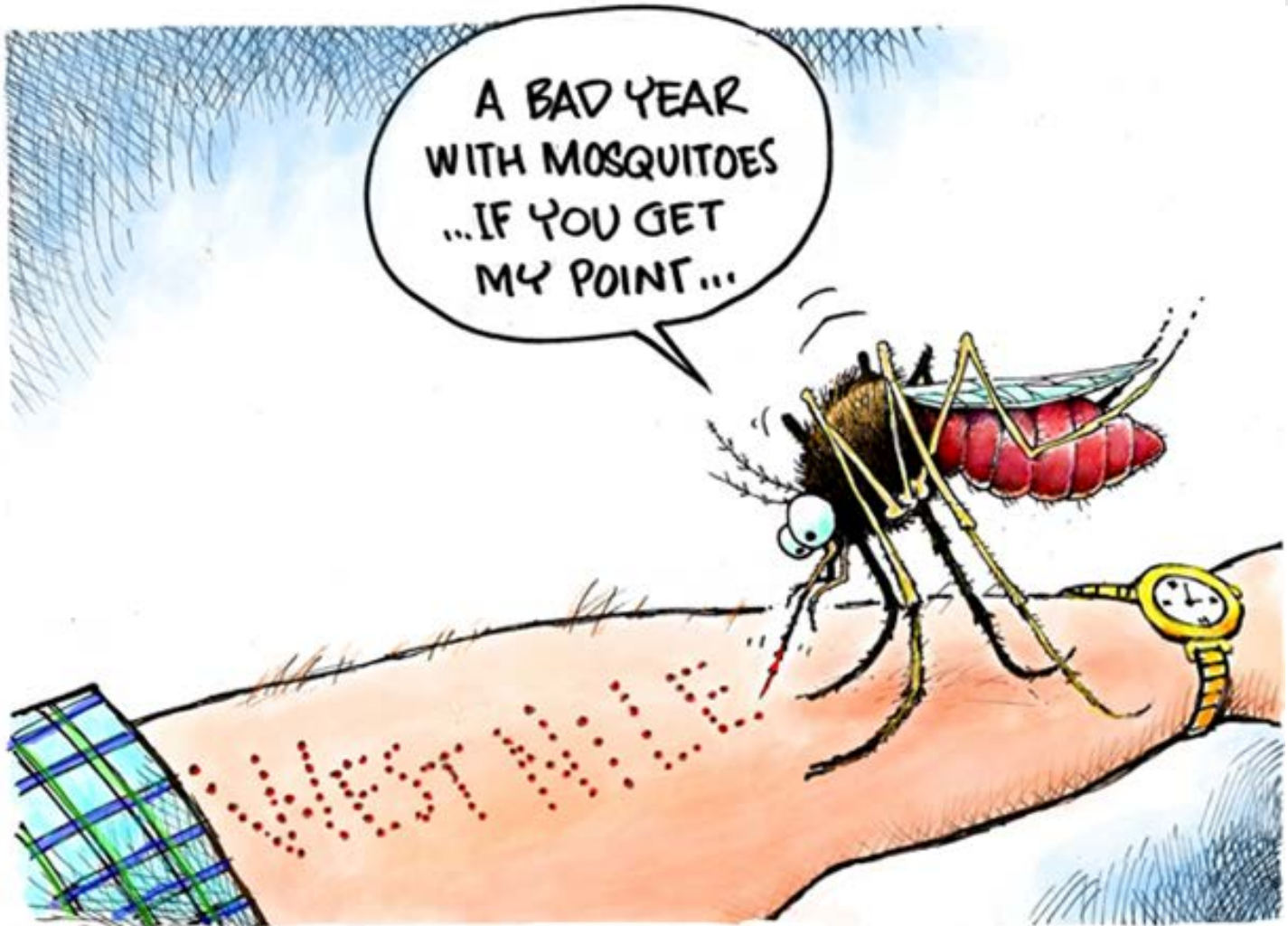
Novità

- ✓ I **test di prima istanza (ELISA e PCR)** sono effettuati dagli **Istituti zooprofilattici territorialmente competenti**
- ✓ Gli **accertamenti diagnostici di conferma** sono eseguiti dal **CESME**



Gli **Istituti Zooprofilattici Sperimentali** devono registrare nel **Sistema Informativo Nazionale per la notifica delle Malattie Animali (SIMAN)** con cadenza **settimanale** tutti **i dati degli esami da loro effettuati**





DAVE GRANLUND© www.davegranlund.com

