PATOLOGIE EMERGENTI E RIEMERGENTI

Globalizzazione, Migrazione, Salute e Vaccini

Le nuove patologie della Globalizzazione

Martedì 24 Novembre 2009, ore 09.00 – 16.30

CAMERA DEI DEPUTATI
Palazzo Marini - Sala delle Conferenze
Via del Pozzetto, 158 Roma

MONITORAGGIO SANITARIO DI POPOLAZIONI SELVATICHE E PATOLOGIE EMERGENTI: IL VIRUS DELLA ENCEFALITE GIAPPONESE IN TOSCANA

Paolo Mani
Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti. Università di Pisa.

Il virus dell'Encefalite Giapponese (*JEV*) appartiene alla famiglia *Flaviviridae*, al genere *Flavivirus*, alla specie Mosquito-borne viruses ad al sierogruppo *Japanese encephalitis*. A tale gruppo appartengono i virus: *West Nile, Murray Valley encephalitis, St. Louis encephalitis, Kunjin, Alfuy, Cacipacore, Yaounde, Koutango* e *Ustusu*.

Van den Hurk A.F e collaboratori in "Ecology and Geographical Expansion of Japanese Encephalitis Virus" (Annual Review of Entomology 2009) riferiscono che *JEV* è diffuso in aree tropicali e temperate di molti paesi quali: Cina, Giappone, Corea, Taiwan, Filippine, Vietnam, Cambogia, Indonesia, Malesia, Papua Nuova Guinea, Tailandia, Bangladesh, Bhutan, India Nepal, Sri Lanka e Nord dell'Australia, in pratica fra India, Australia e Giappone e che l'incidenza annuale è di 45,000 casi umani con 10,000 decessi.

Il virus riconosce nelle zanzare gli esclusivi vettori, nel suino l'ospite amplificatore, negli uccelli acquatici ed in particolare negli ardeidi i principali responsabili di diffusione ed in uomo ed equidi i più importanti ospiti a fondo cieco. Il virus dell'Encefalite Giapponese viene da noi segnalato per la prima volta in Europa, in Toscana, nel 1996 in un episodio di encefalite ad elevata mortalità che ha coinvolto uccelli selvatici sinantropici quali merli, storni, passeri e tordi da richiamo.

La RT-PCR effettuata su organi e visceri inviati al Central Research Institute of Epidemiology di Mosca ha evidenziato infatti elevata omologia dell'RNA virale presente nei tessuti degli uccelli colpiti a *JEV* ceppo Ling e ceppo NAKAYAMA. Controlli sierologici con test ELISA (ID Screen® West Nile Competition Screening test, ID VET, Montpellier). hanno evidenziato positività in popolazioni selvatiche di allevamento e allo stato libero presenti nel Parco Naturale Regionale di Migliarino San Rossore Massaciuccoli:

- in fagiani di un Centro di Produzione di Selvaggina sito all'interno del Parco;
- in anatre utilizzate in un Appostamento Fisso di Caccia agli Acquatici, sito in area attigua al Parco ed al lago di Massaciuccoli (7 su 21 esaminate nel 2009);

- in cinghiali, di diversa età catturati in differenti aree del Parco (17 su 30 di cui 16 su 26 nel 2008 e 1 su 4 nel 2009).

La positività sierologica rilevata in fagiano e anatra conferma la recettività di specie aviarie a virus appartenenti al gruppo *JE*, mentre la positività riscontrata nel cinghiale conferma la presenza di *JEV* nell'area di studio e avvalora l'ipotesi che anche in zona geografica lontana da quella di origine il cinghiale, comunque…*Sus scrofa*, possa costituire il serbatoio amplificatore proprio del virus dell'Encefalite Giapponese.

I risultati da noi ottenuti trovano conferma nel recente lavoro di Ohno Y. et al. dal titolo "Detection of Antibodies against Japanese Encephalitis Virus in Raccoons, Raccoon Dogs and Wild Boars in Japan" (*J. Vet. Med. Sci.*, 2009). Trappole per la cattura delle zanzare sono state predisposte in prossimità dell'allevamento dei fagiani, nel recinto delle anatre da richiamo ed in aree particolarmente frequentate da cinghiali, allo scopo di rilevare presenza, abbondanza e distribuzione geografica/stagionale dei potenziali vettori del virus.

In questa prima fase di indagine *Aedes albopictus* rappresenta l'85% delle zanzare catturate mentre il restante 15% è costituito da *Culex* spp.. L'indagine, tutt'ora in corso, tende a rilevare il virus nei potenziali vettori ed a confermare l'ipotesi che *Aedes albopictus* possa aver costituito il "cavallo di Troia" con cui il virus ha raggiunto il nostro Paese, proprio nei primi anni '90.

Monitoraggio sanitario di popolazioni selvatiche: il Virus dell'Encefalite Giapponese in Toscana

Paolo Mani

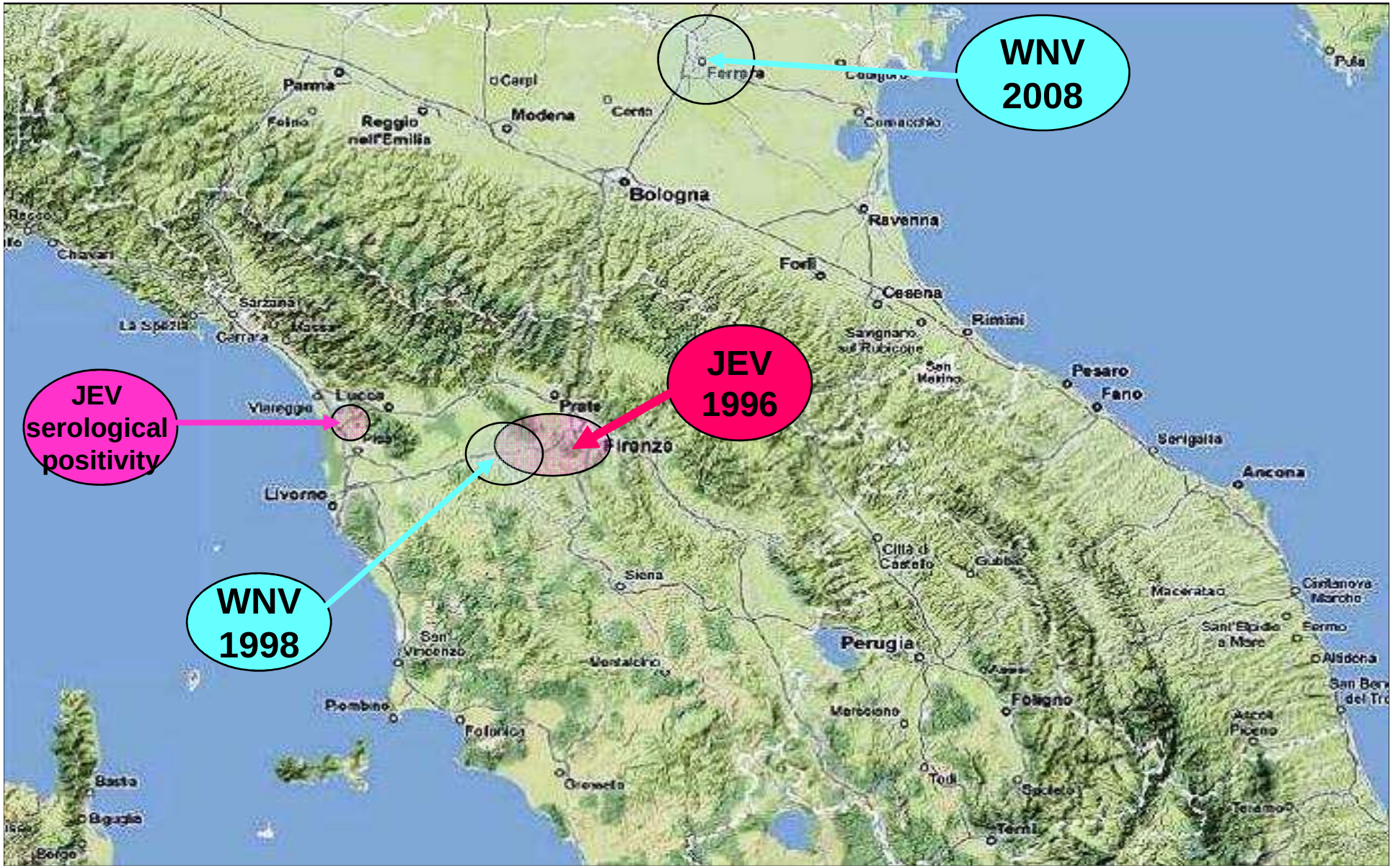
Docente di Malattie Infettive e Patologia Aviare

Dipartimento di Patologia Animale

Facoltà di Medicina Veterinaria

Convegno Patologie Emergenti e Riemergenti, Roma 24 Novembre 2009

Virus appartenenti a JE Group nel Centro Italia



JEV in Toscana 1

L'episodio risale al 1996

- *4 Settembre – 2 Ottobre.*
- *Area compresa fra Firenze, Pistoia e Prato.*

Vengono recapitati al Laboratorio di Patologia Aviare 41 uccelli selvatici:

- ***38 rinvenuti morti***
- ***3 ancora vivi***

(muoiono dopo poche ore)

- ***Vengono osservati o riferiti Sintomi nervosi***



Gli uccelli selvatici coinvolti

- *Turdus merula*
- *Turdus musicus* *
- *Sturnus vulgaris*
- *Passer italiae*

* uccelli da richiamo.

Lesioni anatomo patologiche macroscopiche

- Escara cute addome

- Quadri congestizio emorragici:
  - SNC
  - Fegato
  - Milza



Esami di Laboratorio

Esame Istologico:

- Quadri congestizio emorragici a organi e visceri
- Lesioni parassitarie a organi e visceri
- Lesione micotica a livello di escara

Esami tossicologici negativi

Positività Parassitologica:

- ***Capillaria spp***.(sangue-cuore)
- ***Nematodi*** (sede gastroenterica)
- ***Protozoi*** (sede ent.-epatica)
- ***Trematodi*** (coleciste)
- ***Cestodi*** (sede enterica)

Positività ad Esame:
IMMUNO ISTOCHIMICO

Anticorpo monoclonale diretto per: JE group

contro proteine capsidiche dei Flavivirus

del Gruppo Encefalite Giapponese

Materiale patologico risultato positivo:

- ***SNC:*** *neuroni corticali, cellule gliali ed endoteliali*
- ***Pancreas:*** *cellule acinari e dell'infiltrato infiammatorio*
- ***Rene:*** *cellule epiteliali dei tubuli*
- ***Cuore :*** *fibre miocardiche*
- ***Midollo osseo :*** *elevato numero di cellule mieloidi*

RT-PCR

Campioni di organi e tessuti delle diverse specie sono stati inviati al Central Research Institute of Epidemiology di Mosca.

RISULTATI RT-PCR

Specie	Tessuto positivo in IHC	Tessuto analizzato in biologia molecolare	Antigene flavivirale NS5	Sequenziamento NS5	Gene E WN specifico	Gene E JE specifico	Sequenziamento gene E
Turdus merula	M, P, Bm, S	milza	pos	non effettuato	neg	pos	compatibile con JEV
Turdus merula	M, P, Bm	pancreas	pos	compatibile con JEV	neg	pos	compatibile con JEV
Sturnus vulgaris	M, K, Bm	cuore	pos	non effettuato	neg	pos	compatibile con JEV
Turdus musicus	M, P	cuore	pos	compatibile con JEV	neg	pos	compatibile con JEV
Turdus musicus	M, P, Br	cervello	pos	non effettuato	neg	pos	non effettuato
Sturnus vulgaris	P, K, Br	cervello	neg	non effettuato	neg	neg	non effettuato
Passer domesticus	M, Br, Bm	cervello	pos	non effettuato	neg	pos	compatibile con JEV

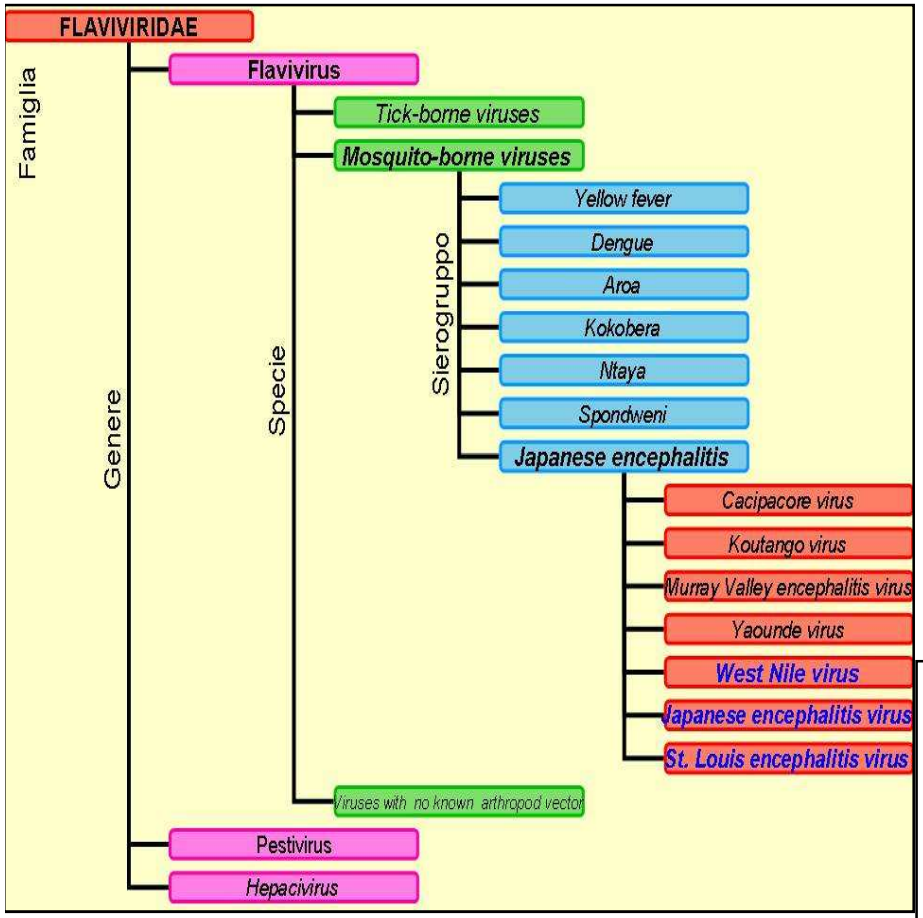
Legenda:M= miocardio, K= rene, Bm= midollo osseo, Br= cervello, P= pancreas, S= milza

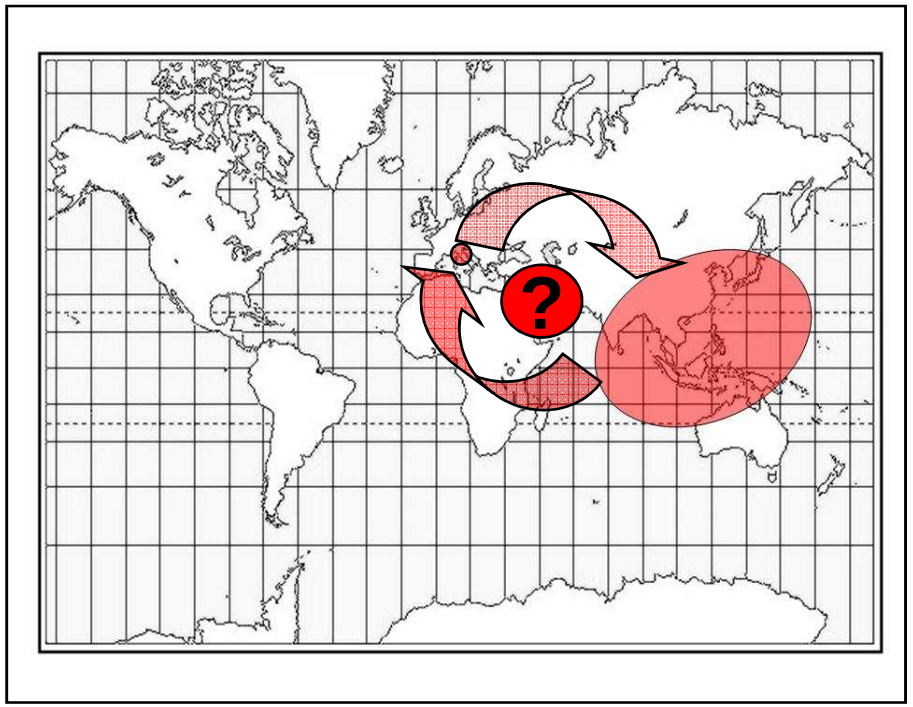
• **JEV-E gene** : positivi 6 campioni di organi su 7
• **WNV-E gene** : negativi tutti i campioni inviati

• frammenti amplificati NS5 ottenuti da due campioni positivi, sottoposti a sequenziamento diretto e confrontati con GeneBank di riferimento hanno dimostrato omologia (148 nucleotidi su 150) a :
JEV ceppo Ling (ACCESSION L78128)
•l'omologia con genoma non-JEV è risultata inferiore all'80%;

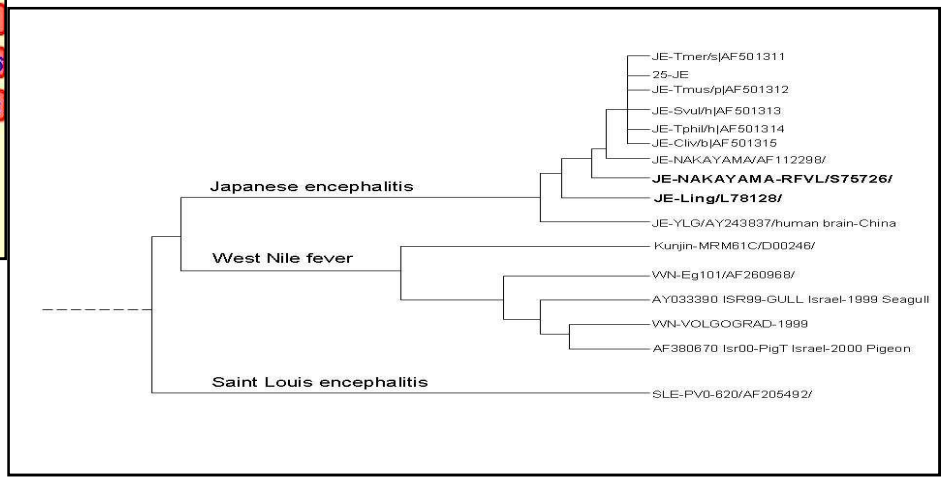
• frammento di 552 nucleotidi del gene E-JEV estratto dall'RNA virale di 5 uccelli è risultato altamente omologo (differenze di 1-3 nucleotidi e 1 aminoacido) con
ceppo NAKAYAMA/AF112298/,
l'omologia con non-JEV genoma è risultata inferiore all'70%.

IL Virus JEV in Toscana
e gli interrogativi che pone





Distribuzione geografica del virus dell'*Encefalite Giapponese (JEV)*



JEV in Toscana 2

Attività di Monitoraggio Sanitario
di Popolazioni selvatiche :
Fagiano di allevamento

Controlli Sierologici* su animali potenzialmente recettivi:

- Fagiano di allevamento in Centri di Produzione di Selvaggina (CPS)

*test ELISA per JE Group
ID Screen®, West Nile Competition Screening Test
ID VET, Montpellier France

CPS della Toscana e FRE

- **Sono stati controllati 8 CPS : 7 di Fagiano ed 1 di Pernice.**
- **Tale scelta ha considerato l'esposizione a differenti fattori di rischio epidemiologico (FRE) quali:**

  - ***localizzaione in area o in prossimità di area dove sono stati segnalati gli episodi di WNV e JEV ;***
  - ***localizzaione in area favorevole per presenza dei vettori;***
  - ***presenza in allevamento di avifauna selvatica recettiva;***
  - ***presenza di avicoli di allevamento recettivi***
  - ***presenza nei dintorni del CPS di mammiferi potenziali ospiti amplificatori;***
  - ***presenza nei dintorni dell'allevamento di ospiti fondo cieco di infezione.***

Fagiano: Risultati

Breeding	Species	District	ERF	Years					
Migliarino	Ph	PI	2,3,4,5,6	***1999***	2002	2003	2004	2006	***2007***
Fucecchio	Ph	PI	1,2,3,4,6	1999	2002	2003	2004	/	/
Le Pianora	Ph	PI	1,2,3,5,6	/	2002	2003	2004	/	/
Aulla	Ph	MS	3,4	/	/	2003	2004	/	/
Montaione1	Ph	FI	3,4	/	/	2003	2004	/	/
Montaione2	Ph	FI	3,4	/	/	2003	2004	/	/
Cedri	Ph	PI	3,5	/	/	2003	2004	/	/
Scarlino	Pa	LI	2,3	/	/	/	/	/	2007

Sono risultati positivi 2 sieri di fagiano prelevati nel 1999 e 2007.

- **Il Centro di Produzione di Selvaggina presenta 5 FRE su 6:**

- **FRE 2: l'allevamento è sito in area favorevole ai vettori per la vicinanza del Lago di Massaciuccoli;**

- **FRE 3: nell'allevamento è presente avifauna selvatica recettiva. Alcune voliere particolarmente ricche di vegetazione sono dormitorio stabile per passeri e temporaneo per altri piccoli passeriformi migratori;**

- **FRE 4: all'interno dell'allevamento è presente un pollaio con galline, anatre, tacchini e pavoni e nidificano stabilmente coppie di piccioni;**

- **FRE 5: all'esterno del recinto è presente il cinghiale (*Sus scrofa*) Il CPS si trova infatti all'interno del Parco Naturale dove la popolazione del cinghiale raggiunge una discreta densità.**

- **FRE 6: l'allevamento confina con un centro ippico dove sono presenti fattrici, stalloni e puledri.**

L’allevamento è all’interno del Parco Naturale Regionale di Migliarino San Rossore Massaciuccoli *:

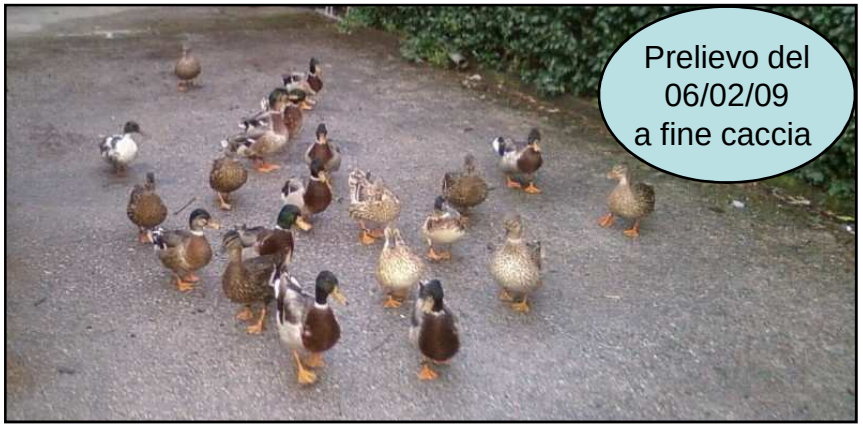
E’ un caso ?

Per rispondere al quesito ….. i controlli sierologici si estendono a:

- Anatre da richiamo
- Cinghiale



JEV in Toscana 3
Anatre da richiamo





	Anatre da richiamo		
	Esaminati	Positivi	%
1° prelievo 06/02/09	9 adulti	3	33,3
2° prelievo 08/06/08	9 giovani 12 adulti	0 4	0 33,3
3° prelievo 21/07/09	21 giovani	0	0
4° prelievo 02/10/09	12 giovani	0	0
Totale	63	7	11,1

Anatre da richiamo: Risultati

- al primo prelievo effettuato su anatre utilizzate nella stagione venatoria 2008, a circa un mese dal ritiro degli animali dall'appostamento fisso di caccia, si rileva la positività del 33,3%;
- ai successivi prelievi, la stessa percentuale di positività viene rilevata in soggetti adulti non esaminati al primo controllo;
- I soggetti giovani sono ad oggi negativi.

Anatre: Fattori di Rischio Epidemiologico

- Esposizione al contagio durante l'attività venatoria (da Settembre a Gennaio) *;
- Allevamento in area a rischio *.
- Vicinanza al CPS con positività nel fagiano *.







JEV in Toscana 4 Cinghiale

	Cinghiali		
	Esaminati	Positivi	%
2008	26	16	61
2009	4	1	25
Totale	30	17	56,6

Cinghiale: Risultati

- nel 2008 su animali adulti di diversa età catturati nel periodo autunno invernale si evidenzia la positività del 61%;
- nel 2009, sui primi 4 prelievi effettuati (ad una femmina adulta e tre giovani) si fa notare la positività riscontrata in un soggetto giovane di non oltre 4 mesi di età.

CONSIDERAZIONI 1

- La postività sierologica rilevata in fagiano e anatra conferma la recettività di specie aviarie a virus appartenenti al gruppo dell'Encefalite Giapponese

CONSIDERAZIONI 2

La positività riscontrata nel cinghiale, con prevalenza del 56,6%:

- Conferma la diffusione di JEV in Toscana;
- avvalora l'ipotesi che anche in area lontana da quella di origine, *Sus scrofa* possa costituire il serbatoio amplificatore di JEV.

1996






2008/2009






2008/2009



?



?



Cosa stiamo facendo:

Considerato che il vettore è indispensabile alla trasmissione di JEV, trappole per la cattura delle zanzare sono state predisposte:

- *in prossimità dell'allevamento dei fagiani;*
- *nel recinto delle anatre da richiamo;*
- *in aree particolarmente frequentate da cinghiali.*

Allo scopo di rilevare:

- la presenza-abbondanza dei vettori;
- la presenza del virus nei vettori.



Campionamento de 13-17 Novembre 2009



L’AREA
DI
STUDIO

Grazie per l’attenzione

