

Infezione da Cowpoxvirus negli animali: studi sulla presenza e diffusione del virus in Italia Centrale

Giusy Cardeti

SINTESI: Progetto IZS LT 03/13 RC, anno finanziario 2013. “Infezione da Cowpoxvirus negli animali: studi sulla presenza e diffusione del virus in Italia Centrale”.

Il Cowpox virus è una delle 10 specie appartenenti al genere Orthopoxvirus (OPXV), e come altre 4 del genere è patogeno per l'uomo. La caratteristica principale di questa specie è quella di avere un ampio spettro d'ospite tra i mammiferi domestici, selvatici ed esotici mantenuti ovviamente in cattività (circhi, giardini zoologici e centri di ricovero e recupero). Il virus è endemico nel nord Europa e Russia occidentale, ma negli ultimi 20 anni i casi descritti negli animali è stato registrato in aumento negli Stati dell'Europa centrale e meridionale. Inoltre, nell'ultimo decennio si segnala un incremento dei casi di malattia umana correlato sia all'abbandono dal 1980 della vaccinazione contro lo Smallpox, sia per l'aumento delle specie animali recettive quali cavalli, cani e animali da circo e zoo, sia per l'impiego scorretto dei farmaci antivirali. La capacità del Cowpoxvirus (CPXV) di superare le barriere di specie e di circolare tra animali domestici, selvatici, ed esotici in cattività, di disporre come serbatoio naturale dei piccoli roditori selvatici, nonché di indurre gravi forme in pazienti immunocompromessi, rende necessario effettuare studi mirati sul virus.

In ottemperanza a quanto sopra esposto e in considerazione dello scarso numero di indagini svolte a tal riguardo in Italia, la presente ricerca ha condotto studi specifici per rilevare la presenza e la diffusione di Cowpoxvirus in animali domestici e selvatici, alloctoni e/o sinantropi, ed esotici sia a Roma e provincia che nel territorio di competenza dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana (IZSLT). Gli obiettivi che il progetto si è prefisso di raggiungere sono: sensibilizzare i medici umani e veterinari alla zoonosi; raccogliere dati sulla diffusione del CPXV in Zoo e Centri di ricovero e recupero di animali esotici; ottenere informazioni sulla diffusione del CPXV nei gatti della provincia di Roma; raccogliere informazioni sulla diffusione del CPXV nelle persone a contatto con animali infetti; riscontrare sieropositività in specie animali domestiche e selvatiche, alloctone e/o sinantropi, ed esotiche; analizzare i fattori di rischio associati alla prevalenza della suddetta infezione. Obiettivi più specifici erano: mettere a punto tecniche biomelocolari per la diagnosi di CPXV; correlare filogeneticamente i ceppi identificati a quelli precedentemente isolati in Italia ed Europa.

La **fase 1** è consistita nell'organizzazione di 3 Workshop sull'infezione da Cowpoxvirus presso l'IZSLT, sede di Roma. Nell'ultimo anno di progetto sono stati organizzati n.6 seminari destinati ai veterinari libero professionisti e svolti presso la sede degli Ordini dei Medici Veterinari (OMV) di tre province del Lazio e tre province della Toscana.

Durante la **fase 2**, sono state definite le popolazioni animali a rischio (gatti di proprietà e di colonia della provincia di Roma, animali esotici recettivi ospitati in differenti strutture dell'Italia centrale) sulle quali effettuare indagini cliniche, virologiche e sierologiche nei confronti di Cowpoxvirus.

Nella successiva **fase 3**, sono stati contattati i veterinari di ASL, Zoo e Centri di ricovero e recupero di animali selvatici ed esotici presenti nelle regioni Lazio e Toscana per la divulgazione del progetto e la richiesta di collaborazione per la raccolta di materiale.

Sono state nel frattempo (**fase 4**) sviluppate due brochure informative sull'agente eziologico e sulle modalità di prelievo ed invio dei campioni. Sono stati formulati due questionari volti a rilevare eventuali fattori di rischio ambientali e comportamentali da far compilare in tutti i casi sospetti. Brochure e questionari sono stati distribuiti alle Sezioni provinciali dell'IZSLT, ad ASL, ambulatori veterinari, Zoo e Centri di ricovero e recupero di animali selvatici ed esotici da restituire compilati assieme ai campioni da analizzare.

Durante il periodo del progetto (**fase 5**) sono stati raccolti campioni per l'evidenziazione del virus: 29 tra lesioni cutanee e mucosali, 550 campioni di organi e tessuti da 164 animali sospetti e non, di specie alloctone e/o sinantropi, selvatiche ed esotiche. Il materiale prelevato è stato conservato congelato e/o in formalina.

Un totale di 1234 campioni di sangue (**fase 6**) sono stati prelevati da gatti (di colonia e padronali, sintomatici e non) e animali esotici anestetizzati per interventi chirurgici o deceduti. Questa fase si è prolungata oltre il previsto ed ha comportato la proroga della scadenza del progetto di un anno.

Sui campioni di organi, tessuti e sangue da animali pervenuti (**fase 7**), sono stati condotti i seguenti esami di laboratorio: esame anatomopatologico ed esame istologico mediante colorazione con ematossilina-eosina; esami virologici quali colorazione negativa e osservazione al microscopio elettronico a trasmissione, isolamento su due linee cellulari; tecniche biomolecolari (PCR Real Time e Sequenziamento); esami sierologici per ricerca anticorpi mediante test di sieroneutralizzazione e test di immunofluorescenza indiretta. Tutto il materiale patologico sottoposto ad indagini virologiche è risultato negativo per Cowpox virus, ad eccezione dei campioni prelevati all'interno del focolaio (fase 8). Tutti i sieri esaminati con i due test, compresi i 441 sieri da gatto di colonia campionati nei 4 distretti della ASL Roma 3, non hanno evidenziato presenza di anticorpi specifici contro il virus.

La **fase 8** prevedeva una serie di azioni allorché venisse diagnosticato un focolaio da CPXV, evento che si è verificato a gennaio 2015 con esito fatale in 12 dei 18 macachi di Tonkean del gruppo sociale colpito. In tale circostanza si è proceduto come segue:

- sono state applicate le norme sanitarie previste dal Regolamento di Polizia Veterinaria; essendo presenti altre specie animali recettive, si è proceduto con: isolamento del gruppo infetto, indagine epidemiologica, esame clinico e prelievo di campioni sia per test virologici che sierologici;

- sono stati effettuati esame clinico e prelievo di sangue dagli 11 operatori del Centro per indagini sierologiche. Un soggetto mai vaccinato e venuto a contatto con il gruppo sociale infetto, ha evidenziato una siero conversione.

- sono stati catturati i piccoli roditori selvatici circolanti, sia durante le operazioni di disinfezione e derattizzazione che liberi nel bosco circostante, per indagini virologiche e sierologiche.

Negli ultimi quattro mesi del progetto è stata condotta (**fase 9**) l'analisi epidemiologica dei risultati del campionamento tra i gatti di colonia della ASL Roma 3, per valutare la diffusione di CPXV nelle aree urbane ed extraurbane della Provincia di Roma, centrale in funzione di una valutazione del rischio per l'uomo. Stante la completa negatività del campione esaminato, considerando gli assunti ed il disegno di campionamento adottati ed assumendo sensibilità e specificità del test SN pari a 100%, la prevalenza massima teorica dell'infezione nella popolazione target è risultata pari a 0.67%.

Come da **fase 10**, è stato prodotto una relazione intermedia a 18 mesi dall'inizio del progetto.

La richiesta di proroga della data di scadenza del progetto, è stata supportata anche da un problema di scarsa sensibilità del test sierologico scelto per la ricerca di anticorpi contro il CPXV. Purtroppo anche il test alternativo scelto, nonostante gli studi e le prove eseguite, ha evidenziato dei limiti.

Discussione e Conclusioni

Le indagini istologiche, virologiche e sierologiche condotte sui campioni pervenuti nel periodo del progetto, ad eccezione del focolaio di OPXV tra i macachi di Tonkean nel Centro di ricovero e recupero in provincia di Rieti, non hanno evidenziato circolazione di virus in quanto tutti gli esami hanno dato esito negativo relativamente a lesioni istologiche, isolamento o rilevamento di DNA virale, evidenziazione di risposta anticorpale specifica).

Dai risultati ottenuti utilizzando il test di Sieroneutralizzazione (SN), è stata evidenziata una bassa sensibilità del metodo. E' stato pertanto, messo a punto un test di Immunofluorescenza indiretta (IFI) per quelle specie di cui era disponibile in commercio un siero anti-gammaglobuline coniugato con FITC con la conseguente adozione dell'IFI come test definitivo per la ricerca di anticorpi anti-CPXV nei primati e nei roditori. Non è stato possibile utilizzarla invece per tutte le altre specie, gatto compreso, per le quali si è continuato ad utilizzare l'SN.

Il ceppo virale isolato nei macachi di Tonkean presso il Parco Faunistico Piano dell'Abatino è stato caratterizzato come nuovo ceppo di Orthopoxvirus e le sequenze sono state depositate in banca dati (GenBank, Accession Number: XY123456).

Dai risultati ottenuti nei 4 anni di attività, durante i quali un nuovo caso di infezione da OPXV praticamente identico al ceppo isolato nel reatino, è stato isolato e tipizzato da un gatto di Siena con sintomatologia riferibile ad infezione da CPXV, sarebbe interessante ampliare l'area di indagine

estendendo i prelievi a tutto il territorio di competenza dell'IZSLT e attivando collaborazioni con ASL e ambulatori veterinari e medici dermatologi umani.

Tabella 1. Stima delle prevalenze massime teoriche per ciascun distretto dato il campione negativo e considerando Sensibilità e Specificità della SN pari a 100%

| Distretto | Gatti censiti | Colonie censite | N° Gatti esaminati | p% max teorica (Se - Sp 100%) | Stima del n° max gatti positivi nella popolazione |
|---------------|---------------|-----------------|--------------------|-------------------------------|---|
| Fiumicino | 3.645 | 302 | 116 | 2,52% | 92 |
| Municipio X | 8.124 | 714 | 115 | 2,56% | 208 |
| Municipio XI | 2.924 | 265 | 110 | 2,67% | 78 |
| Municipio XII | 2.070 | 185 | 100 | 2,90% | 60 |
| Totale | 16.763 | 1466 | 441 | 0,67% | 112 |

Tabella 2. Risultati esami virologici su materiale patologico prelevato dai 12 macachi di Tonkean morti. Il virus (OPV Abatino) è stato evidenziato in tutti i soggetti

| Metodo | Cute pos/tot | Mucosa lingua pos/tot | Encefalo pos/tot | Polmone pos/tot | Fegato pos/tot | Milza pos/tot | Miocardio pos/tot | Linfonodi pos/tot | Intestino pos/tot | Organi analizzati pos/tot |
|--------------------------|--------------|-----------------------|------------------|-----------------|----------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|
| nsEM | 10/10 | 1/1 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 0/12 | 11/23 |
| SYBR Green PCR real time | 10/10 | 1/1 | 3/3 | 12/12 | 10/12 | 12/12 | 3/3 | 5/5 | 3/12 | 59/70 |
| Colture cellulari | 3/3 | 1/1 | 3/3 | 3/3 | 2/2 | 2/2 | 3/3 | NA | 0/3 | 17/20 |

NsEM= microscopia elettronica in colorazione negativa. Pos/Tot= numero di campioni positivi/totale campioni analizzati. NA= non analizzato.

SUMMARY

The Cowpox virus (CPXV) is one of the 10 species belonging to the genus Orthopoxvirus, and like other 4 in the genus it is pathogenic to humans. The main feature of CPXV species is to have a broad spectrum of host among domestic mammals, wild and exotic kept in captivity (circuses, zoos and recovery centers). The virus is endemic in northern Europe and western Russia, but in the last 20 years the cases described in animals are increasing in central and southern Europe. Furthermore, in the last decade an increase in human cases has been observed, related to the abandonment of the vaccination against Smallpox since 1980, to the increase in receptive animal species such as horses, dogs and circus animals and zoos, and for incorrect use of antiviral drugs. The ability of the CPXV to overcome species barriers and to move between domestic, wild and exotic animals in captivity, to dispose of small wild rodents as a natural reservoir, and to induce serious forms in immunocompromised patients, makes it necessary to carry out targeted studies on the virus.

In compliance with these elements and considering the low number of investigations carried out in Italy, this research has conducted specific studies to detect the presence and spread of Cowpoxvirus in domestic and wild animals, allochthonous and/or synanthropic, and exotic both in Rome and province and in the territory of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale of Lazio and Tuscany (IZSLT). The objectives to be achieved by the project are: to sensitize human and veterinary doctors to the zoonosis; to collect data on the diffusion of CPXV in zoos and recovery centers for exotic animals; to obtain information on the spread of CPXV in cats in the province of Rome; to gather information on the spread of CPXV in people in contact with infected animals; to find seropositivity in domestic and wild animal species, alien and/or sinantropic, and exotic; to analyze the risk factors associated with the prevalence of the aforementioned infection. **Phase 1** consisted in organizing three

workshops on Cowpoxvirus infection at the IZSLT, Rome. During the last year of the project, six seminars were organized for free professional veterinarians and held at the headquarters of the OMV of three provinces of Lazio and three provinces of Tuscany.

During phase 2, the animal populations at risk were defined (owned and colony cats of the province of Rome, exotic animals hosted in different structures of central Italy) on which to carry out clinical, virological and serological investigations against Cowpoxvirus.

In the following phase 3, the veterinarians of ASL, Zoo and Centers for the recovery and recovery of wild and exotic animals in the Lazio and Tuscany regions were contacted for the request for collaboration and collection of material.

In the meantime (phase 4) two informative brochures have been developed on the etiological agent and on how to collect and send samples. Two questionnaires were formulated to identify possible environmental and behavioral risk factors to be completed in all suspect. Brochures and questionnaires were distributed to the provincial sections of the IZSLT, to ASL, veterinary clinics, zoos and centers for the recovery of wild and exotic animals, to be filled out and sent together with the samples to be analyzed.

During the project period (phase 5) samples were collected for the detection of the virus: 32 between cutaneous and mucosal lesions, 550 samples of organs and tissues from 164 suspected and unidentified animals, of alien and/or sinantropo species, wild and exotic. The material collected was stored frozen and/or in formalin.

A total of 1234 blood samples (phase 6) were taken from cats (free ranging and domestic, symptomatic or not) and exotic animals anesthetized for surgery or deceased. This phase has been prolonged beyond the expected and has led to the one year extension of the project deadline.

On the received organs, tissues and blood samples from animals (phase 7), the following laboratory tests were performed: anatomo-istopathological examination; virological tests such as negative staining-electron microscopy, isolation on two cell lines; biomolecular techniques (Real Time PCR and Sequencing); serological tests for antibody detection by serum neutralization (SN) test and indirect immunofluorescence test (IFA). All the pathological material subjected to virological investigations was negative for Cowpox virus, with the exception of samples taken from the outbreak in Abatino Park. All the sera examined with the two tests, including the 441 colony cat sera sampled in the 4 districts of the ASL Roma 3, did not reveal any specific antibodies against the virus.

Phase 8 provided for a series of actions when a CPXV outbreak was diagnosed, an event that occurred in January 2015 with fatal outcome in 12 of the 18 Tonkean macaques of the affected social group. In this circumstance we proceeded as follows:

- the health rules laid down by the Veterinary Police Regulations have been applied; being present other receptive animal species, epidemiological investigation, clinical examination and sampling for both virological and serological tests were conducted;
- clinical examination and blood sampling were carried out by the 11 operators of the Center for serological investigations. A subject never vaccinated and came into contact with the infected social group, he highlighted a conversion serum.
- small circulating wild rodents were captured, both during disinfection and deratting operations and free in the surrounding forest, for virological and serological investigations.

In the last months of the project, the epidemiological analysis of the sampling results among the colony cats of the ASL Roma 3 was conducted, to evaluate the spread of Cowpoxvirus in the urban and extra-urban areas of the Province of Rome according to a risk assessment for humans. Given the complete negativity of the sample examined, considering the assumed and the sampling design adopted and assuming sensitivity and specificity of the SN test equal to 100%, the theoretical maximum prevalence of the infection in the target population was equal to 0.67%.

The histological, virological and serological investigations carried out on the samples received during the project, with the exception of the OPXV outbreak among Tonkean macaques in the recovery center in the province of Rieti, did not reveal any virus circulation because all the exams have given negative outcome (no typical lesion, no isolated CPXV strain or detected DNA, no specific antibody

response).

From the results obtained using the SN test, a low sensitivity of the method was highlighted. Therefore, an IFA was developed for those species of which an anti-gammaglobulin conjugated serum with FITC was available with the consequent adoption of the IF as a definitive test for the detection of anti-CPXV antibodies in primates and in rodents. It was not possible to use it instead for all other species, including cats, for which the SN was continued to be used.

The viral strain isolated in Tonkean macaques at the Parco dell'Abatino Wildlife Park was characterized as a new Orthopoxvirus strain and its sequences were deposited in GenBank, (Accession Number: XY123456).

From the results obtained in 4 years of activity, during which a new case of Orthopoxvirus infection practically identical to the strain isolated in macaques, was isolated and typed by a cat from Siena with symptoms related to CPXV infection, it would be interesting to expand the survey area extending the withdrawals to the whole territory of IZSLT competence and activating collaborations with ASL and veterinary clinics and human dermatologists.