

Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Progetto MS - IZSLT 03/13 RC  
Infezione da Cowpoxvirus negli animali:  
studi sulla presenza e diffusione del virus in Italia Centrale



# Infezione da Orthopoxvirus nell'uomo in Italia

Concetta Castilletti – Antonino Di Caro

Istituto Nazionale per le Malattie Infettive “L. Spallanzani” - IRCCS

Workshop

INFEZIONI DA POXVIRUS ZOONOSICI: COWPOX, PARAPOX e VACCINIA.

Clinica, Diagnostica e Ricerca

Roma, 10 ottobre 2014

# Premessa

- Il Cowpox virus (CPXV) appartiene alla famiglia Poxviridae genere Orthopoxvirus, è distribuito in Europa ad eccezione dell'Irlanda, nell'ovest della Russia e nelle adiacenti aree dell'Asia
- CPXV, il cui *reservoir* naturale è il roditore, infetta un ampio spettro di mammiferi tra cui cani, gatti, bovini, primati e diversi altri animali
- CPXV causa nell'uomo una rara infezione zoonosica, normalmente autolimitante, ad eccezione dei pazienti immunocompromessi
- Nel febbraio 2009 la Commissione Europea ha emanato un'allerta a seguito della segnalazione di numerosi casi di infezione da CPXV nell'uomo (Germania, Francia)
- I casi di malattia umana potrebbero aumentare come conseguenza della sospensione della vaccinazione contro il vaiolo (1976 in Italia) la quale conferisce protezione nei confronti di diversi orthopoxvirus
  - L'infezione zoonosica da CPXV è stata segnalata in diverse regioni europee ma è estremamente rara a sud delle Alpi

# Premessa

- Nel luglio del 2009, si è verificato un focolaio di infezione da Cowpox in 5 lama ospitati in un allevamento dell'Italia centrale
- Alcuni dati rivelano la circolazione autoctona di orthopoxvirus nel Nord-Est d'Italia



Lama, allevamento in provincia di Viterbo (Italy)

5 lama adulti dei 7 presenti in un allevamento situato nei dintorni di Viterbo affetti da lesioni cutanee in differenti siti del corpo presenti sia in forma di noduli che di croste

Alcune delle lesioni presentavano il classico aspetto crateriforme tipico delle lesioni causate dai poxvirus



*Lesioni cutanee con morfologia crateriforme in sede perianale*



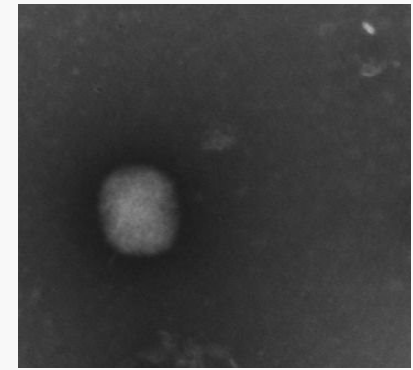
*Lesioni cutanee con morfologia crateriforme presenti sulla membrana palpebrale*

Nessun'altra specie degli uccelli e degli altri mammiferi ospitati nell'allevamento mostravano le stesse lesioni cutanee o altra sintomatologia

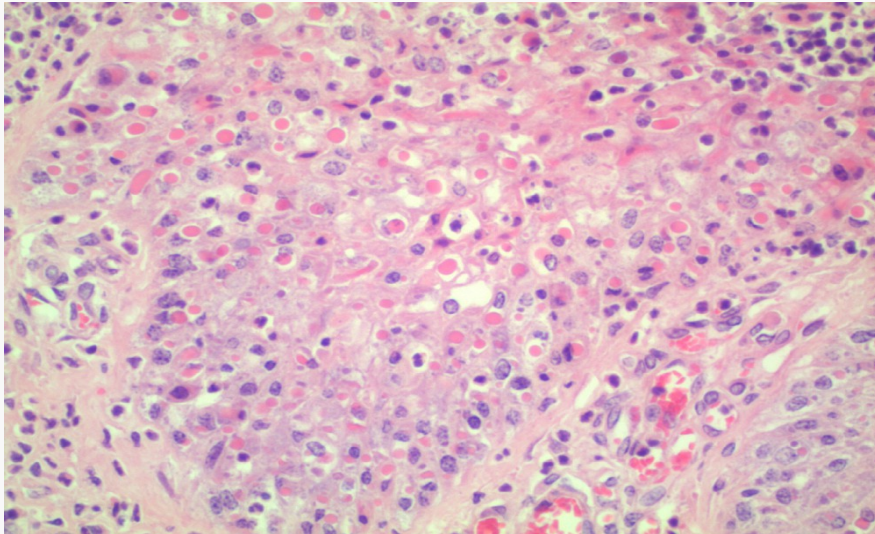
Nessuno degli operatori dell'allevamento presentava alcuna sintomatologia



L'analisi in microscopia elettronica dell'essudato prelevato dalle lesioni ha messo in evidenza la presenza di particelle di forma squadrata (mattoncino) tipiche delle particelle virali dei poxvirus



Particella di orthopoxvirus rilevata mediante microscopia elettronica eseguita su preparato da lesione sottoposto a colorazione negativa.



Corpi inclusi intracitoplasmatici eosinofili  
(Corpi del Guarnieri)

L'esame istologico ha evidenziato la presenza corpi inclusi citoplasmatici sia nello stato basale che nello strato spinoso dell'epidermide.

Mediante l'analisi filogenetica eseguita sul gene completo dell'emoagglutinina è stato caratterizzato il virus:

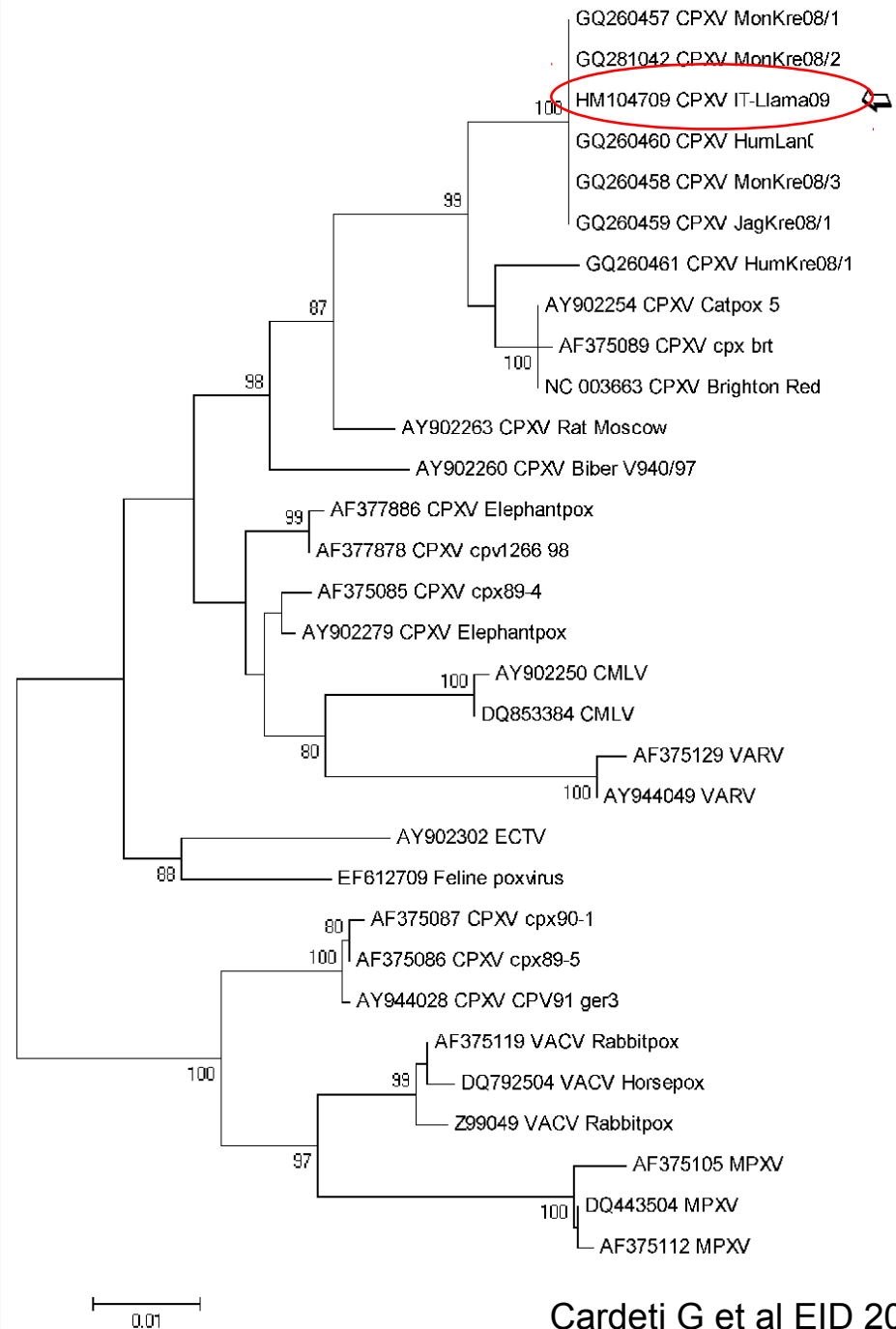
Un Cowpoxvirus, omologo ai ceppi CPXV-MonKre08/1-2-3 isolati in Germania nel 2008 da manguste e giaguari

Kurth A, et al. PLoS ONE. 2009

Schmiedeknecht G, et al. Vet Pathol. 2010

Sono stati testati per la presenza del virus in biologia molecolare *pool* di fegato, rene e milza di due lotti di topi (n=31) importati da un grande allevamento tedesco ed utilizzati per l'alimentazione degli uccelli rapaci ospitati nell'allevamento.

Contemporaneamente sono stati testati ratti grigi (*Rattus rattus*, n=44) catturati nell'allevamento. Tutti i topi ed i ratti testati sono risultati negativi



# Anticorpi specifici per CPXV (IgG) nei sieri dei lama e degli operatori

Spp	SN Test	IFA Test	Titres (IgG)
Llama	4/8	/	1:64; 1:16; 1:4; 1:32
Cattle	0/4	/	
Goat	0/25	/	
Horse	0/3	/	
Donkey	0/18	/	
Human	/	3/4	1:640; 1:20; 1:80

- L'analisi sierologica è stata condotta su sieri prelevati da bovini, cavalli, asini, capre, lama ed operatori 19 giorni e dopo 60 giorni dopo l'esordio della sintomatologia
- Tutti I sieri umani sono risultati IgM negativi
- Uno solo dei 4 operatori era stato vaccinato contro il vaiolo

# Riflessioni



- Le lesioni da Cowpoxvirus sono state osservate solo sui lama
- E' stata riscontrata la presenza di IgG specifiche nel siero degli operatori che lavoravano nell'allevamento
- Dal momento che il ceppo identificato sembra essere praticamente identico a quello tedesco isolato dalle manguste nel 2008, si potrebbe ipotizzare una sua introduzione con i roditori usati per alimentare gli uccelli rapaci



# Premessa

- Nel luglio del 2009, si è verificato un focolaio di infezione da Cowpox in 5 lama ospitati in un allevamento dell'Italia centrale
- Alcuni dati rivelano la circolazione autoctona di orthopoxvirus nel Nord-Est d'Italia





Nel 2007 e nel 2009 in Friuli Venezia Giulia (FVG) sono stati notificati due casi di malattia da orthopoxvirus in giovani veterinari venuti a contatto con 2 diversi gatti domestici malati

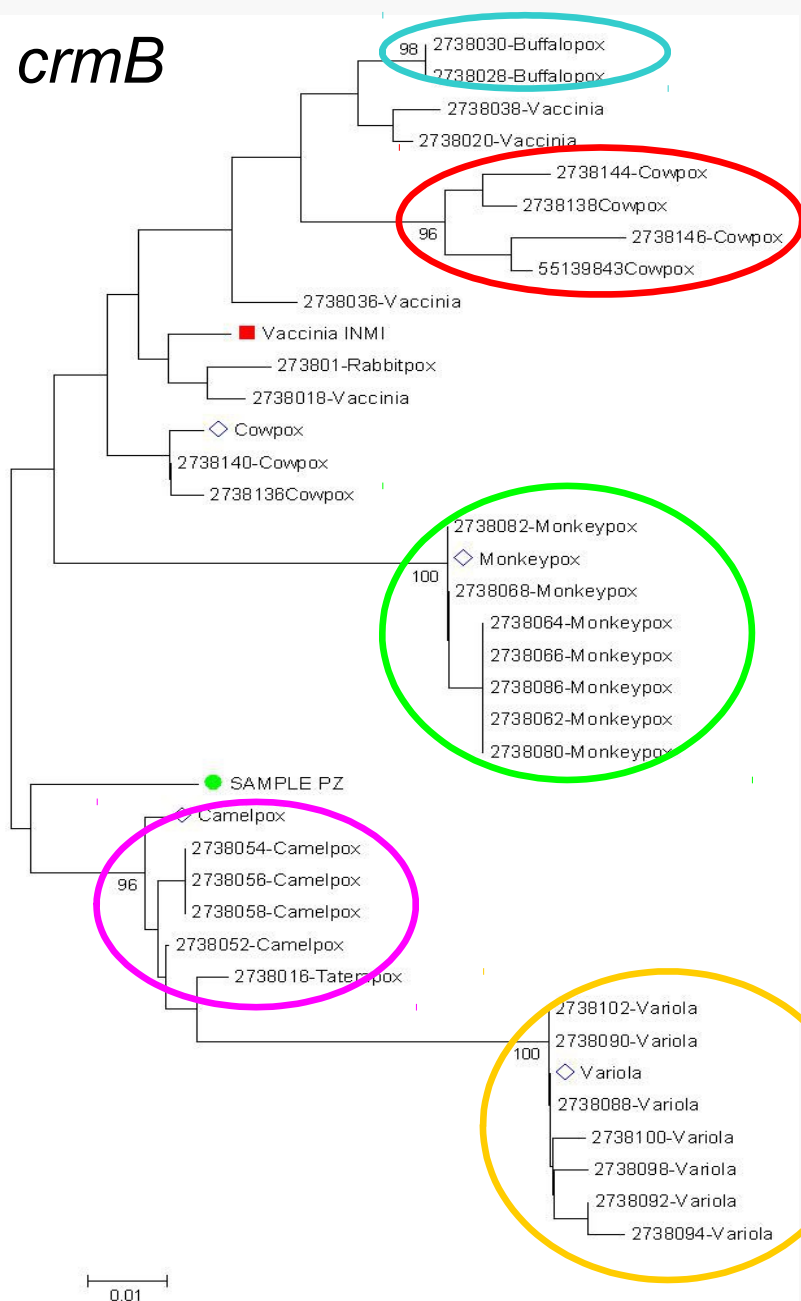
In Europa i dati di sieroprevalenza di infezione da orthopoxvirus nella popolazione felina variano dal 2% al 10.1%, i dati italiani non si conoscono

I casi di malattia umana potrebbero aumentare come conseguenza della sospensione della vaccinazione contro il vaiolo (1976 in Italia) la quale conferisce protezione nei confronti di diversi orthopoxvirus.

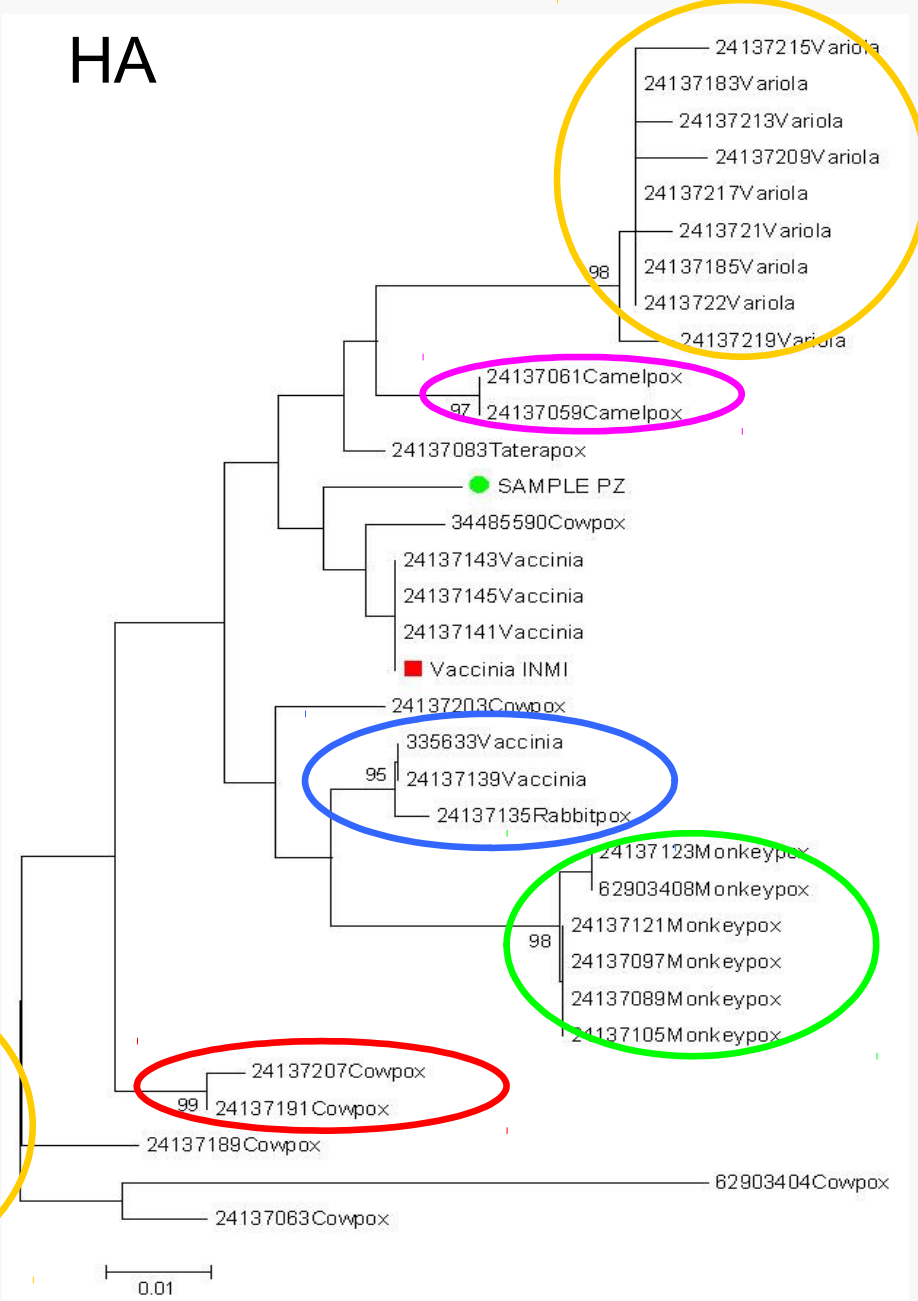
Si è pensato di effettuare uno studio di sieroprevalenza dell'infezione da orthopoxvirus nei gatti domestici e di colonia e nei veterinari del FVG per valutare l'estensione di un emergente problema di sanità pubblica



*crmB*

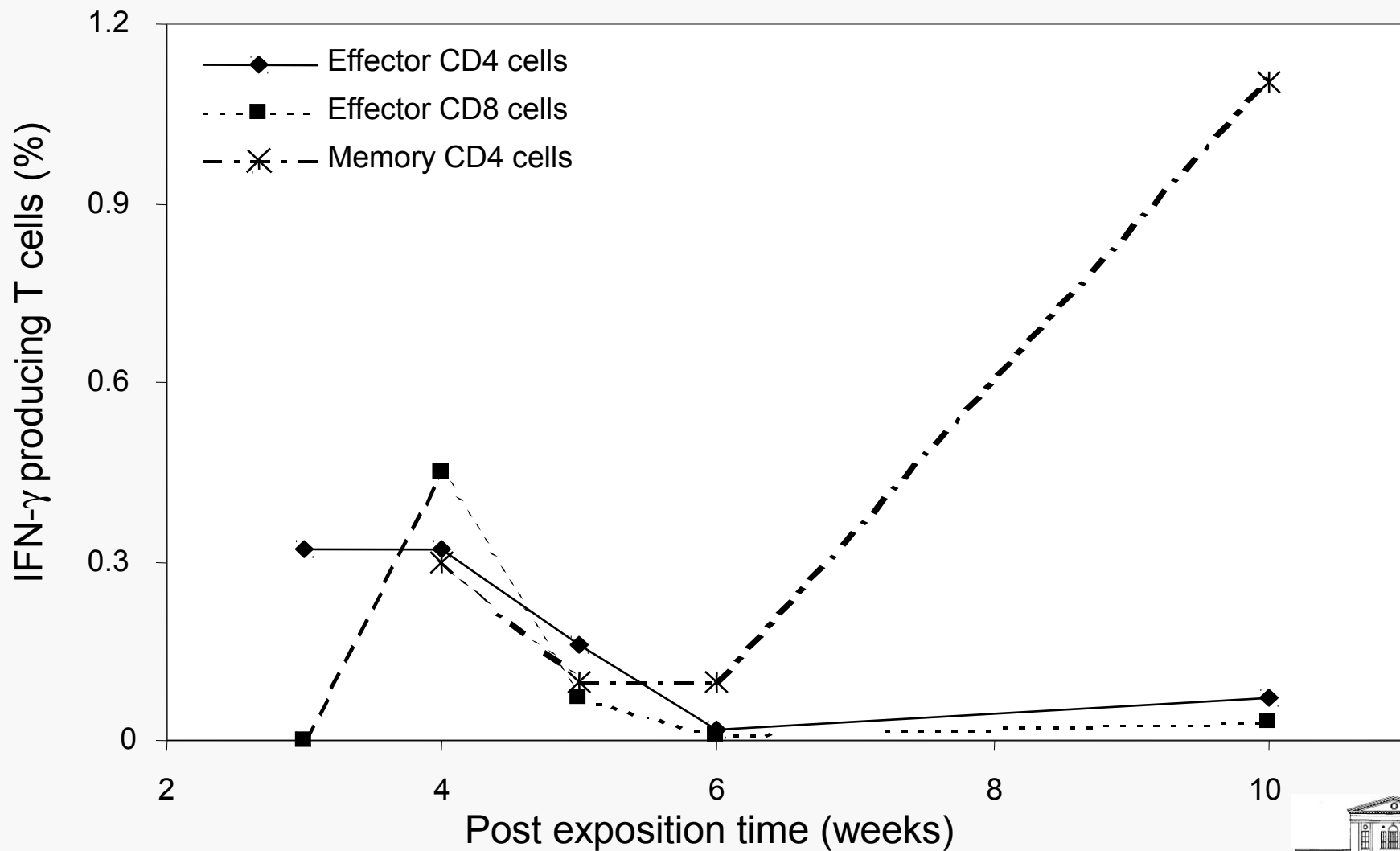


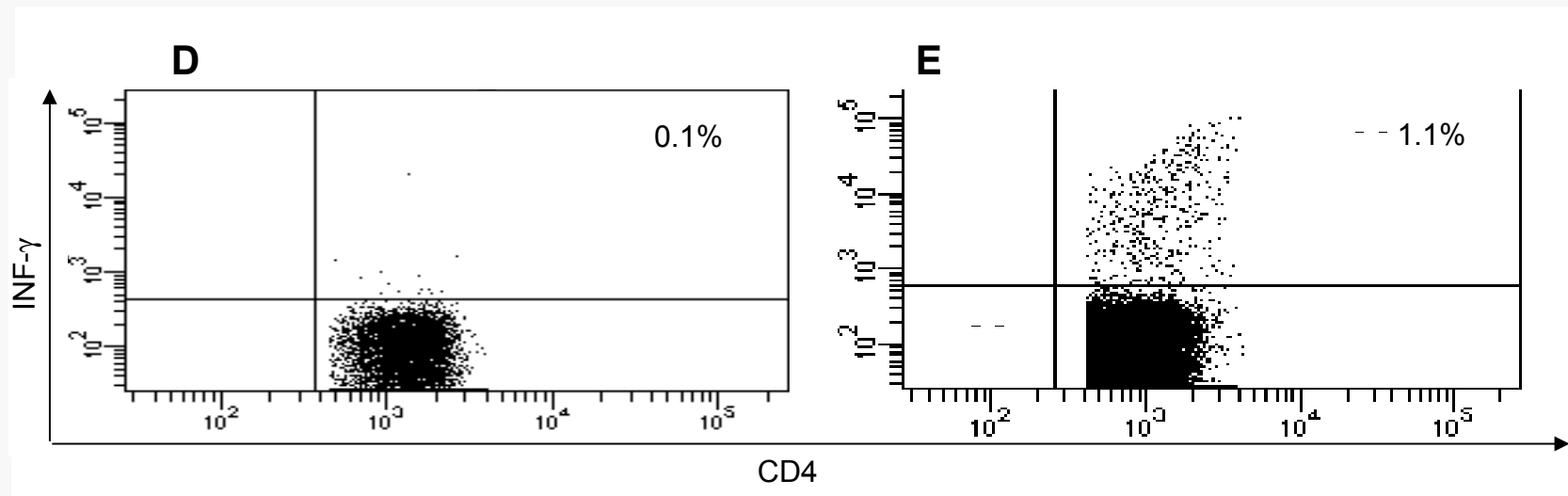
HA



Le sequenze di HA e di un segmento parziale di *crmB* di ciascun isolato forma un *cluster* distinto nel genere degli Orthopoxvirus; Risultati simili sono stati ottenuti dalle analisi concatenate di entrambi i geni

# Risposta T antigene specifica





Cellule *memory* T CD4+ a 6 e 10 settimane dall'esordio della malattia



# Immunità umorale

Sampling Time	Titolo neutralizzante*		Titolo in immunofluorescenza	
	Vs poxvirus Pt.	Vs Vaccinia Lancy	Vs poxvirus Pt.	Vs Vaccinia Lancy
30/12/05	40	8	640	320
02/01/06	160	128	5120	2560
17/01/06	1000	128	5120	5120
24/01/06	1280	160	10240	5120
20/03/06	320	240	5120	5120

Reciproco della diluizione

\*Titolo neutralizzante calcolato come riduzione del 50% delle PFU





Nel 2007 e nel 2009 in Friuli Venezia Giulia (FVG) sono stati notificati due casi di malattia da orthopoxvirus in giovani veterinari venuti a contatto con 2 diversi gatti domestici malati

In Europa i dati di sieroprevalenza di infezione da orthopoxvirus nella popolazione felina variano dal 2% al 10.1%, i dati italiani non si conoscono

I casi di malattia umana potrebbero aumentare come conseguenza della sospensione della vaccinazione contro il vaiolo (1976 in Italia) la quale conferisce protezione nei confronti di diversi orthopoxvirus.

Si è pensato di effettuare uno studio di sieroprevalenza dell'infezione da orthopoxvirus nei gatti domestici e di colonia e nei veterinari del FVG per valutare l'estensione di un emergente problema di sanità pubblica



Periodo di studio = Febbraio 2010 – Maggio 2011  
cliniche veterinarie private = 23  
canili comunali = 2  
veterinari arruolati = 38  
gatti arruolati = 226

Fare clic per modificare lo stile del



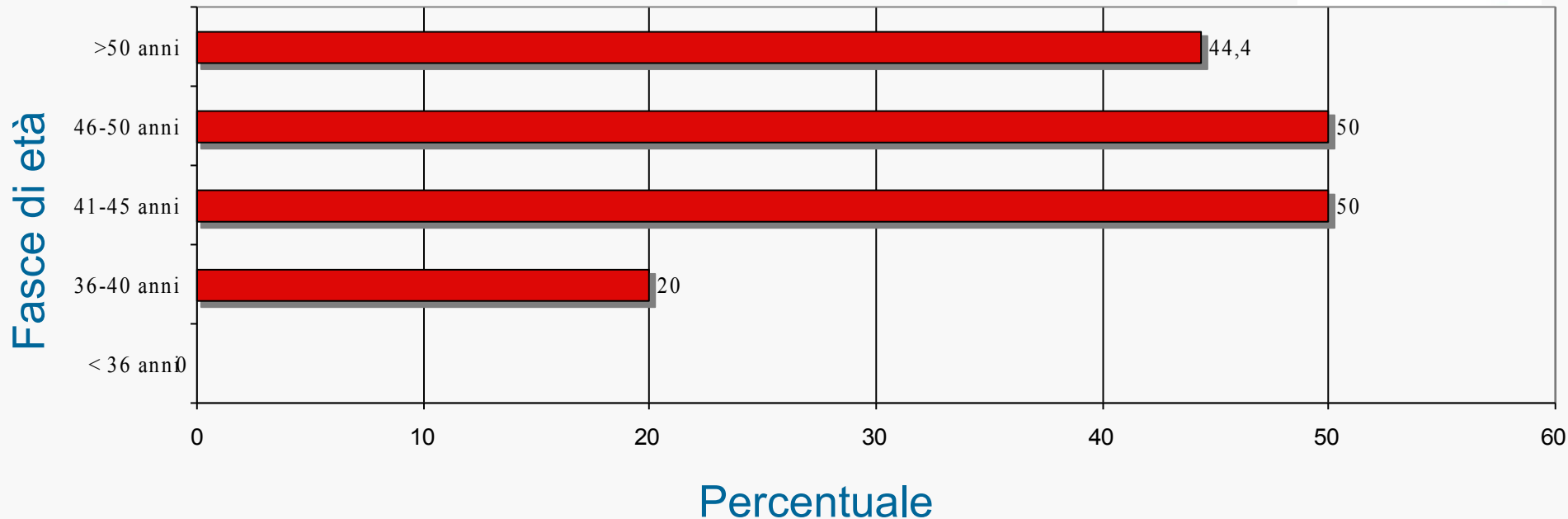
## VETERINARI: CARATTERISTICHE EPIDEMIOLOGICHE

Età (mediana)	42 anni (range, 25-57 anni)
Sesso F	20 (52.6%)
Conoscenza dell'infezione da orthopoxvirus	36 (94.7%)
L'infezione da orthopoxvirus è considerata una zoonosi professionale	10 (26.3%)
Precedente vaccinazione al vaiolo	18 (47.4%)
Fattori di rischio (immunodepressione)	5 (13.2%)
Esperienza lavorativa (mediana)	16 anni (range, 1-31 anni)
Esposizione > 10 gatti alla settimana	24 (63.2%)
Ricordo di cura prestata ad animale affetto da orthopoxvirus	3 (7.9%)



Fare clic per modificare lo stile

## Sieroprevalenza IgG per orthopoxvirus in diverse fasce di età



Positività sierologica per orthopoxvirus (titolo neutralizzante >20) = **11 (28.9%)**

La percentuale di sieroprevalenza decresce con l'avanzare dell'età

Tutti i veterinari sieropositivi erano stati vaccinati contro il vaiolo, ma non tutti i vaccinati mostrano memoria sierologica



### **GATTI: CARATTERISTICHE EPIDEMIOLOGICHE**

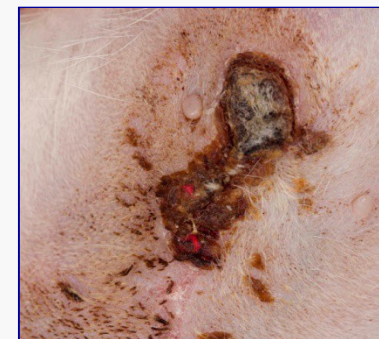
Età (mediana)	6 anni (range, 1- 19 anni)
Gatto domestico	134 (59.2%)
Domicilio in zona rurale	108 (52.2%)
Contatti con altri gatti	173 (76.5%)
Contatti con roditori	163 (72.1%)

**n=226**

Positività sierologica per orthopoxvirus (Ab NT >20) = 44/226 (19.5%)



Fare clic per modificare lo stile



- Il 23/2/11 nell'ambulatorio veterinario di Fagagna è stato valutato un gatto di sesso femminile di 1 anno di età affetto da numerose vescicole diffuse su muso, testa, dorso e in zona mammaria.
- Diagnosi istologica e microbiologica: **infezione da orthopoxvirus.**
- Il ceppo virale, classificato come cowpoxvirus, è lo stesso di quello isolato precedentemente dai due veterinari del FVG, e mostra delle caratteristiche genetiche uniche.
- Il gatto è sopravvissuto. Nessuno dei proprietari si è ammalato.

**Sick sats**      **Seropositive cats**

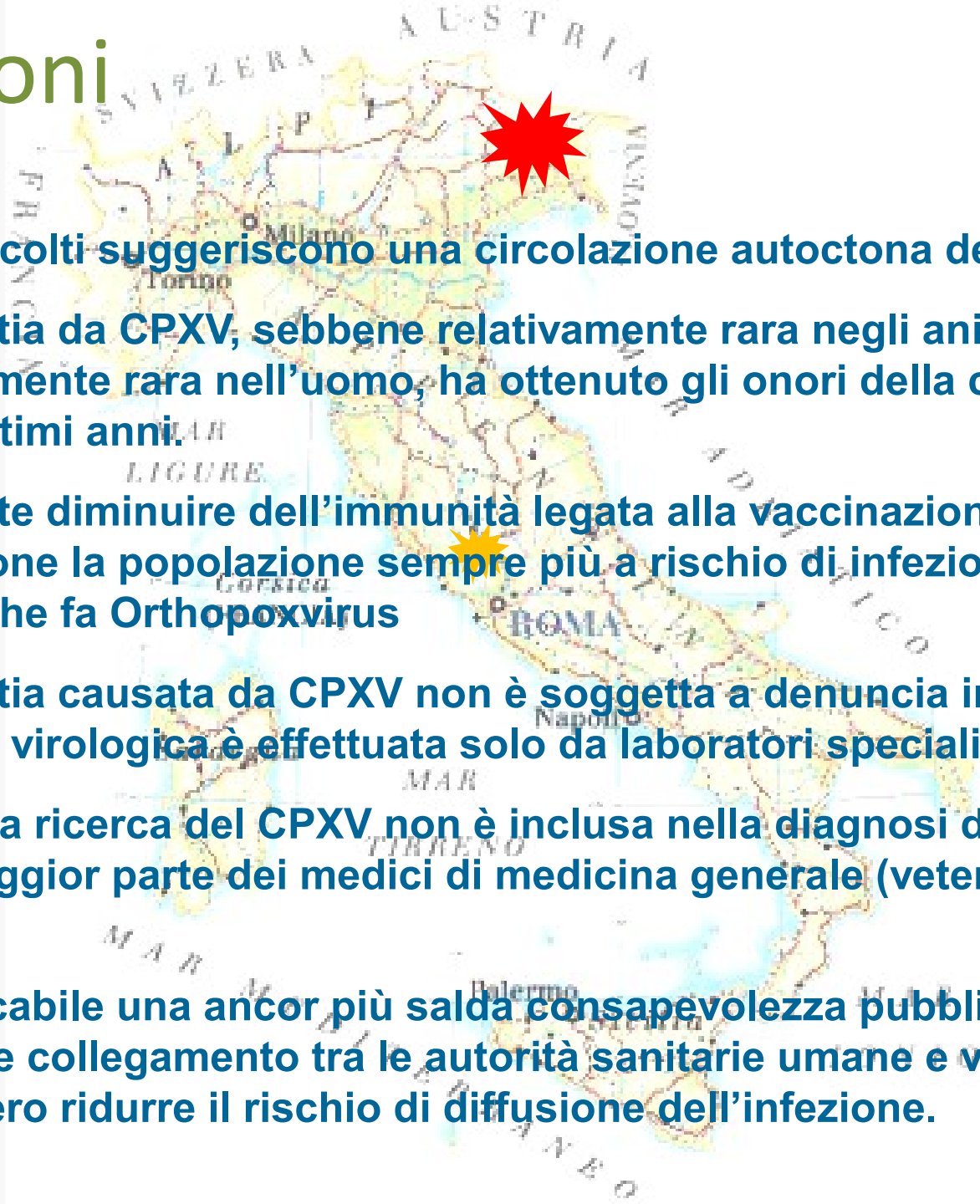
**Sick sats**      **Seropositive cats**



### Seropositive cats



# Riflessioni

- 
- ❖ I dati raccolti suggeriscono una circolazione autoctona del virus
  - ❖ La malattia da CPXV, sebbene relativamente rara negli animali ed estremamente rara nell'uomo, ha ottenuto gli onori della cronaca in questi ultimi anni.
  - ❖ Il costante diminuire dell'immunità legata alla vaccinazione contro il vaiolo pone la popolazione sempre più a rischio di infezioni zoonotiche da Orthopoxvirus
  - ❖ La malattia causata da CPXV non è soggetta a denuncia in Italia, la diagnosi virologica è effettuata solo da laboratori specializzati
  - ❖ Spesso la ricerca del CPXV non è inclusa nella diagnosi differenziale della maggior parte dei medici di medicina generale (veterinario o umano)
  - ❖ E' auspicabile una ancor più salda consapevolezza pubblica ed maggiore collegamento tra le autorità sanitarie umane e veterinarie potrebbero ridurre il rischio di diffusione dell'infezione.

Il 71% della popolazione di veterinari del FVG analizzata è sieronegativo agli orthopoxvirus

Tutti i veterinari sieropositivi erano stati vaccinati contro il vaiolo, ma non tutti i vaccinati mostrano memoria sierologica; è possibile che la presenza di anticorpi rilevata nello studio sia il risultato di un *boost* antigenico dovuto al contatto con gatti infetti con orthopoxvirus in soggetti vaccinati

Un ceppo di orthopoxvirus dalle caratteristiche geograficamente confinate circola da vari anni nella zona

La distribuzione di sieropositività nei gatti è a spot, suggerendo una diffusione non generalizzata del virus

Data l'elevata sieroprevalenza (19.5%) di orthopoxvirus riscontrata nella popolazione felina sarebbe importante includerla nella diagnosi differenziale delle patologie cutanee del gatto e dell'uomo in FVG, quest'ultimo a rischio di vita se immunodepresso

Ulteriori studi epidemiologici dovrebbero essere estesi alle altre aree dell'Italia

# Working group.....

## INMI – IRCCS “L. Spallanzani”

Fabrizio Carletti  
Concetta Castilletti  
Daniele Lapa  
Antonino Di Caro  
Maria R. Capobianchi  
Giuseppe Ippolito



INMI “L. Spallanzani”



## IZLT

Giusy Cardeti  
Claudia Eleni  
Maria Teresa Scicluna  
Gian Luca Autorino  
Alberto Brozzi  
Nicola Polici  
Gianlorenzo D’Alterio  
Demetrio Amaddeo

## Università of Udine

Anna Beltrame  
Andrea Troi  
Alessandra Arzese,  
Emmanuel Ndip Nganyuo  
Bruno Del Pin



## Progetto di Ricerca Corrente IZSLT 03/13 RC

Giusy Cardeti (IZSLT)  
Claudia Eleni (IZSLT)  
Paola Scaramozzino (IZSLT)  
Concetta Castilletti (INMI)  
Livia Malandrucchio (ASL RM D)

We also warmly thanks  
Hermann Meyer