

Progetto di Ricerca Corrente - Ministero della Salute
Art. 12 D.Lgs 502/92
IZSLT 03/13 RC

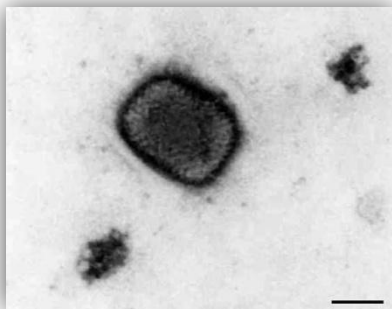


“Infezione da Cowpoxvirus negli animali:
studi sulla presenza e diffusione del
virus in Italia Centrale”

Workshop

Infezioni da Poxvirus Zoonosici: Cowpox,
Parapox e Vaccinia.

Clinica, Diagnostica e Ricerca



IZS LT, Roma

10 ottobre 2014



Lesioni congiuntivali di Lama

© D'Alterio, Italia 2009

Cowpoxvirus nel Lama (*Lama glama*) Luglio 2009



- ✓ Azienda in prov. di Viterbo (circa 580 animali)
- ✓ Virus isolato da 5 lama su 7 presenti
- ✓ Morti 3 soggetti
- ✓ Presenza di Ac nei 4 lama sopravvissuti, negative altre spp animali esaminate
- ✓ Ac in 2 delle 4 persone a contatto

Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 17, No. 8, August 2011

Cowpox Virus in Llama, Italy

Giusy Cardeti, Alberto Brozzi, Claudia Eleni, Nicola Polici, Gianlorenzo D'Alterio, Fabrizio Carletti, Maria Teresa Scicluna, Concetta Castilletti, Maria R. Capobianchi, Antonino Di Caro, Gian Luca Autorino, and Demetrio Amadeo

Cowpox virus (CPXV) was isolated from skin lesions of a llama on a farm in Italy. Transmission electron microscopy showed brick-shaped particles consistent with orthopoxviruses. CPXV-antibodies were detected in llama and human serum samples; a CPXV isolate had a hemagglutinin sequence identical to CPXV-MonKre08/1-2-3 strains isolated from banded mongooses in Germany.

- Lesioni nodulari 0,5 cm, localizzate su tutto il corpo; soprattutto: muso, padiglioni auricolari, congiuntiva, mammella e cute perianale
- abbattimento, anoressia, decubito e morte in circa 10 giorni
- guarigione spontanea delle lesioni cutanee nei 2 malati e sopravvissuti
- Esaminati ratti: tutti negativi



Famiglia Poxviridae, Genere Orthopoxvirus

Specie CowPoxVirus (200x350 nm; dsDNA, lineare 230 kbp)

Poxvirus patogeni per l'Uomo (4 generi su 8 nei *Chordovirinae*):

Genere	Specie	Ospiti non umani	Note
Orthopoxvirus	Variola virus (maior e minor) – VARV	No	Smallpox: estinto (bioterrorismo)
	Monkeypoxvirus – MPXV	Scimmie	USA, Africa
	Vaccinia poxvirus - VACV	Bovini, bufalo, coniglio	Usato come vaccino; Brasile
	Cowpoxvirus – CPXV	Bovino, gatto, cane, elefante, felidi selvatici, primati, lama, formichieri, manguste, roditori	Europa; sieropositività in cani, volpi, cavalli, piccoli roditori (arvicole, topi, toporagno, ratto, lemming)
Molluscipoxvirus	Virus Mollusco Contagioso - MOCX	No	Africa; soggetti immunodepressi
Parapoxvirus	Orf virus – ORFV	Pecore, capre, renne	Nodulo del mungitore
	Pseudocowpoxvirus – PCPV	Bovino	
	Virus Stomatite papulare bovina – BPSV	Bovino	
Yatapoxvirus	Tanapoxvirus – TANV	Roditori	Trasmessi da insetti; Africa e Asia; lesioni simil-tumorali nel s.c.
	Yaba monkey tumorvirus – YMTV	Primati	



Cowpoxvirus

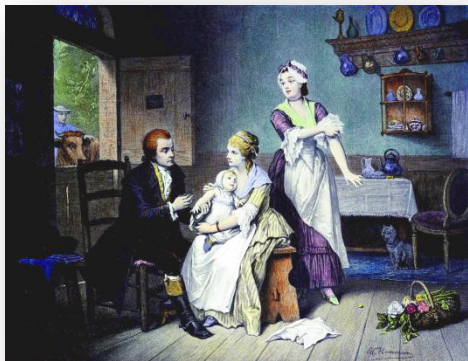


Cow = vacca

Storia:



- isolato per la prima volta da lesioni mammarie del bovino
- utilizzato da Jenner nel 1700 per i suoi studi medici vaccinali pionieristici che hanno condotto al definitivo debellamento del vaiolo
- da decenni non è più segnalato in tale specie



Situazione Epidemiologica

Zoonosi endemica: Ovest europeo, aree occidentali ex URSS e zone adiacenti Asia settentrionale e centrale



negli ultimi anni, circa **170** casi umani in Gran Bretagna, Germania, Belgio, Paesi Bassi, Francia, Svezia, Finlandia, Norvegia, Russia e Italia



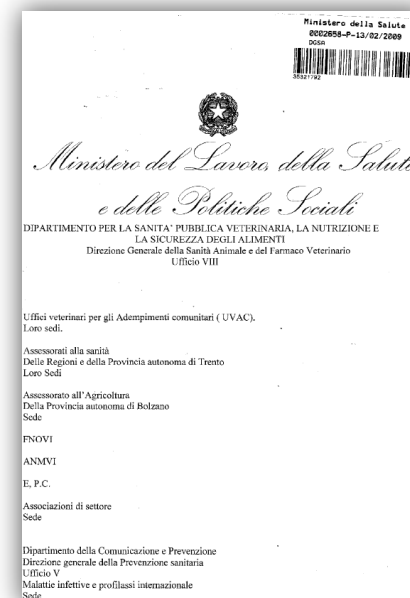
Provvedimenti legislativi

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

Allerta 02/2009 DG SanCo:
Commissione europea: invito agli
Stati Membri di incrementare la
vigilanza



**Dir. Gen. Sanità Animale-Farmaco
Veterinario: nota informativa del
Ministero della Salute 0002658-
P-13/02/2009 con scheda
riguardante la malattia nell'uomo**



Infezione rara a sud delle Alpi in Italia descritte poche casistiche

Due casi nel 2005 e 2007 in
Friuli Venezia Giulia: da gatto
a studente di veterinaria e da
gatto a medico veterinario

Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 15, No. 3, March 2009

Cat-to-Human Orthopoxvirus Transmission, Northeastern Italy

Fabrizio Carletti, Licia Bordi,
Concetta Castilletti,
Antonino Di Caro,
Laura Falasca, Cristiana Gioia,
Giuseppe Ippolito,
Stefania Zaniratti,
Anna Beltrame, Pierluigi Viale,
and Maria Rosaria Capobianchi



..... in Italia

nel 2011, nuovo caso in
un gatto del Friuli
Venezia Giulia; nessuna
trasmissione all'uomo

nel Friuli Venezia Giulia,
positività sierologica del
19,5% nei gatti e del 28,9%
nei veterinari (Castillette 2011, dati non
pubblicati)

Progetto di ricerca 2011

Zoonosi ed infezioni virali esotiche:
fronteggiare le emergenze attraverso un approccio integrato tra medicina umana
e veterinaria

**P2 INMI Innovative protocols to improve diagnosis and therapy of zoonotic and
arthropod-borne viral infections**

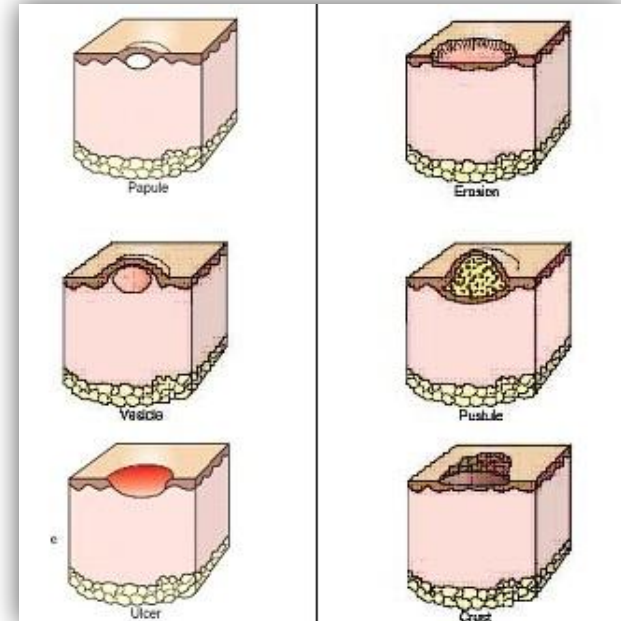
Work Package 3: *Evaluate the relevance of orthopoxviral zoonosis transmitted by
wild and domestic animals to humans in Italy*



Sintomo tipico

• Lesione cutanea e/o mucosa che compare dopo circa 4-5 giorni dal contatto e può guarire spontaneamente:

- ✓ papule e placche
- ✓ vescicole
- ✓ noduli
- ✓ pustole
- ✓ ulcere a bordi rilevati (c.d. crateriformi)
- ✓ croste



Nota: non necessariamente come stadi evolutivi progressivi

• Nelle forme generalizzate: esantema diffuso, sintomi vari ed esito fatale

La Malattia

Terapia

- Antibiotici per prevenire le infezioni batteriche
- Antivirale Cidofovir: efficace, ma può causare nefrotossicità.
- Vaccino contro il vaiolo umano: non protegge in assoluto da infezioni e sintomi, ma consigliabile nelle categorie professionali a rischio



Disinfezioni

- Virus sensibile a disinfettanti comuni quali ipoclorito di sodio (0,5-5%), sali quaternari di ammonio, idrossido di sodio (0,8%)
- Inefficaci alcool ed etere etilico.



Piccoli roditori: veri reservoir del CPXV

Indagini sierologiche:

Europa:

alta sieroprevalenza in:

- arvicole (*Clethrionomys glareolus*, *Microtus agrestis*)
- topi selvatici (*Apodemus sylvaticus*) e domestici (*Mus musculus*)
- ratto (*Rattus norvegicus*)
- lemming (*Lemmus lemmus*)



Scandinavia:

dimostrata recettività al virus:

- toporagno (*Sorex araneus*)
- volpe rossa (*Vulpes vulpes*)



Infezione da Cowpoxvirus nel *Rattus norvegicus*



Ratto domestico: lesioni cutanee sulle zampe
(Vogel S et al, Germania 2012)



Lesioni cutanee su muso di ratto
(Nitsche A. in Scagliarini A. La Settimana Veterinaria, 2010)

Infezione per **contatto diretto** con lesioni cutanee o feci.
Dimostrato contagio perinatale ai piccoli nati da madre infetta.

Lesioni più frequenti: **ulcere e croste** su muso, orecchie, zampe.
Manca il prurito, possibili congiuntivite e rinite.

Guarigione spontanea delle lesioni cutanee; se forma generalizzata,
esito fatale.



Lesioni zampe
(Campe H et al, Germania 2009)

Infezione da Cowpoxvirus nel Gatto



Lesioni da CPXV su orecchio
(Mostl K. et al, 2013)



Croste
(Mostl K. et al, 2013)

- Andamento stagionale
- Contagio da topi, ratti e gatti
- Lesioni cute e mucose
- Guarigione in 6-8 settimane
- Prognosi infausta nei soggetti giovani o immunocompromessi



Lesioni muso e orecchie
(Nitsche A. in Scagliarini A. La Settimana Veterinaria, 2010)

Lesioni cutanee (INMI, Progetto di Ricerca 2011)



Muso

Testa

Dorso

Zona mammaria



Lesioni di 7 gg all'avambraccio
(Pelkonen P et al, Finlandia 2003)

Infezione da Cowpoxvirus nell'Uomo

- Contagio da gatti, ratti domestici, animali esotici; non ancora dimostrato da uomo a uomo
- Lesioni su cute mano e collo dopo 4-14 gg
- Linfadenite e sintomi influenzali
- Guarigione spontanea in 6-12 settimane
- Prognosi infausta in soggetti immunocompromessi o sotto terapia cortisonica

Ulcera su mano

(Nitsche A., in Scagliarini A. La Settimana Veterinaria 2010)



Lesioni necrotiche e linfangite su collo e clavicola
(Vogel S et al, Germania 2012)



Animali esotici-selvatici da cui
è stato isolato il virus

Elefante asiatico (*Elephas maximus*)
Elefante africano (*Loxodonta africana*)
Leone (*Panthera leo*)
Pantera nera (*Panthera pardus*)
Gherpardo (*Acinonyx jubatus*)
Puma (*Felis concolor*)
Giaguaro (*Panthera onca*)
Ocelot (*Leopardus pardalis*)
Gatto del Bengala (*Felis bengalensis*)
Okapi (*Okapia johnstoni*)
Formichiere gigante (*Myrmecophaga tridactyla*)
Rinoceronte nero (*Diceros bicornis*)
Rinoceronte bianco (*Ceratotherium s. simum*)
Lama (*Lama glama*)
Alpaca (*Vicugna pacos*)
Marà (*Dolichotis patagonum*)
Panda rosso (*Ailurus fulgens*)
Castoro (*Castor fiber*, *C. canadensis*)
Macaco (*Macaca* spp.)
Scimmie cappuccine (*Cebus* spp.)
Mangusta (*Mungos mungo*)
Jaguarundi (*Herpailurus yagouaroundi*)

Cowpoxvirus negli animali esotici, selvatici

Infezione per contatto con
ratti malati o loro feci e
con altri animali infetti

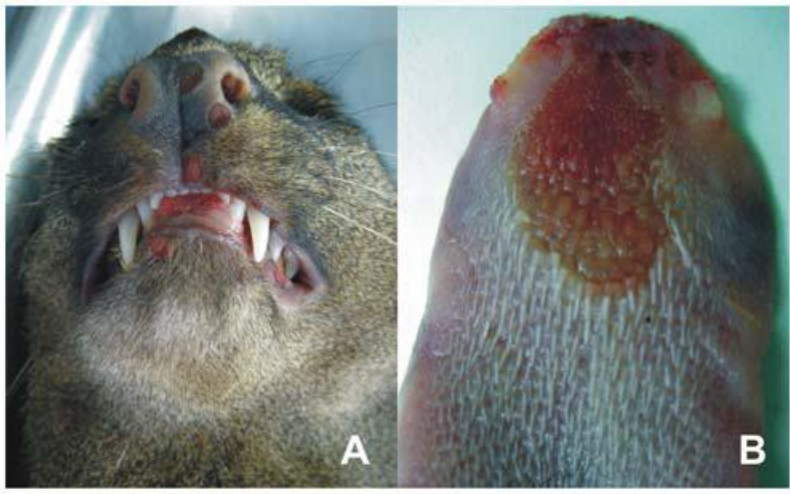


Lesione occhio elefante
(Kurth A et al, Germania 2008)

Lesioni su muso e corpo di Mangusta striata
(Kurth et al, Germania 2009)



Cowpoxvirus negli animali esotici, selvatici



Lesioni su muso e lingua di Jaguarundi
(Kurth et al, Germania 2009)

- Lesioni localizzate su muso, orecchie, zampe, mucosa oro-faringea.
- Possibili sintomi respiratori e gastroenterici o morte improvvisa.
- Guarigione spontanea delle lesioni cutanee; se interessamento generale, esito spesso letale.



Ulcere su lingua di Mangusta
(Schmiedeknecht et al., Germania 2010)

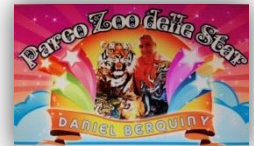


Bioparco di Roma

Giardino Zoologico di Pistoia



Parco Zoo delle Star, Aprilia



Crescente popolarità di ratti e animali esotici
da compagnia
ridotta cross-protezione per cessata profilassi
antivaiolosa

aumentato rischio per l'uomo di contrarre
l'infezione da CPXV

inclusa tra le Zoonosi emergenti in Europa



Il virus

- ✓ **Basso tasso di mutazione:** stessa variante nonostante il salto di specie
- ✓ **Virus antigenicamente correlato** al Vacciniavirus, al Monkeypoxvirus e allo Smallpoxvirus
- ✓ **Varianti diverse**, circolanti nella stessa area

**Perché
zoonosi
emergente?**

L'infezione

- **Alto titolo** negli animali infetti
- **Ampio spettro d'ospite**
- **Stop alla vaccinazione** contro il VARV
- **Nicchia ecologica** lasciata libera dallo Smallpox
- **Soggetti immunocompromessi** e con dermatiti atopiche



Obiettivi del Progetto

Generali

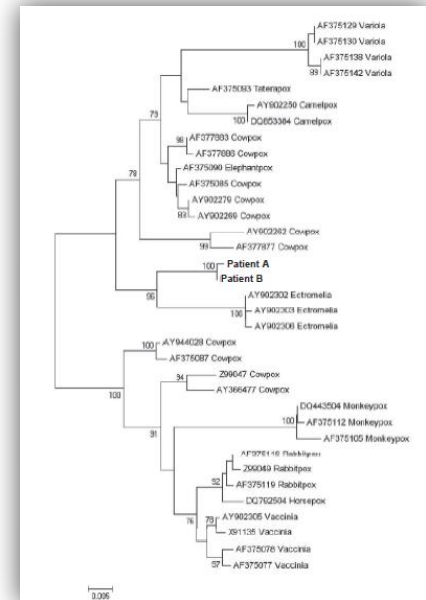
- **Sensibilizzare** i medici umani e veterinari **alla zoonosi**
- **raccogliere dati sulla diffusione del CPXV** in Zoo e Centri di ricovero e recupero di animali esotici, tra i gatti della provincia di Roma, nelle persone a contatto con animali infetti
- **riscontrare sieropositività** in specie animali domestiche e selvatiche, alloctone e/o sinantropiche, ed esotiche
- **analizzare i fattori di rischio** associati alla prevalenza della suddetta infezione.



Obiettivi del Progetto

Specifici

- Mettere a punto **tecniche biomelocolari** per la diagnosi di CPXV
- **Correlare filogeneticamente** i ceppi identificati a quelli precedentemente isolati in Italia ed Europa



a. Distribuzione di **Schede Raccolta Dati e Brochure:**

- Sito dell'IZS LT (www.izslt.it -> Modulistica -> Cowpoxvirus)
- Accettazioni dell'IZS Lazio e Toscana

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

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DEL LAZIO E DELLA TOSCANA M. ALVARDI

Data invio: _____

Scheda di raccolta dati anamnestici e di campionamento

Materiale/ID: _____

Animali esotici

Dati Richiedente	Dati Struttura/Responsabile/Proprietario
Ambulatorio Vet _____	Ragione sociale/Nome e Cognome _____
Indirizzo _____	Indirizzo _____
CAP _____ Comune _____ Provincia _____	CAP _____ Comune _____ Provincia _____
Telefono _____ Fax _____	Telefono _____ Fax _____
Email _____	Email _____
C.F.P./IVA _____	C.F.P./IVA _____

Dati Animale

Specie Animale: _____ Identificativo: _____

Sesso: M ☐ F ☐ Età: _____ anni probabile ☐ certa ☐

L'animale potrebbe aver avuto contatti con topi e/o ratti: SÌ ☐ NO ☐

L'animale potrebbe aver avuto contatti con altri animali: SÌ ☐ NO ☐

Tipologia di alimentazione: _____

Dati dell'azienda produttrice dell'alimento (denominazione, indirizzo): _____

L'animale ha presentato nel suo passato o presenta lesioni ulcerative su cute e/o mucose: SÌ ☐ NO ☐ Non So ☐

Tipologia campione

Condizioni di invio campione
Rinfreddato / congelato <input type="checkbox"/>
Formalina <input type="checkbox"/>

Altre informazioni

Altre informazioni
Samples/Ore: _____
Altri espositi: _____
Racchiuse: _____

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

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DEL LAZIO E DELLA TOSCANA M. ALVARDI

Data invio: _____

Scheda di raccolta dati anamnestici e di campionamento

Materiale/ID: _____

GATTO

Dati Richiedente	Dati Proprietario/Responsabile
Ambulatorio Vet _____	Nome e Cognome _____
Indirizzo _____	Indirizzo _____
CAP _____ Comune _____ Provincia _____	CAP _____ Comune _____ Provincia _____
Telefono _____ Fax _____	Telefono _____ Fax _____
Email _____	Email _____
C.F.P./IVA _____	C.F.P./IVA _____

Dati Gatto

Domicilio del gatto/albergo e denominazione della colonia feline: _____

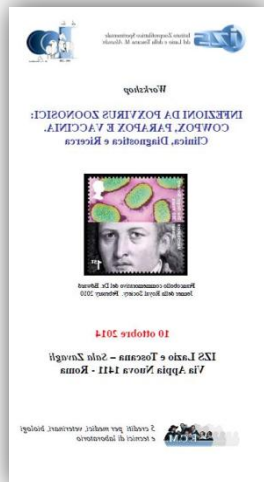
In area: rurale ☐ urbana ☐ altro ☐ specificare: _____

Razza: _____

Sesso: M ☐ F ☐ Età del gatto: _____ anni probabile ☐ certa ☐

Altre informazioni

Altre informazioni
Gatto che vive con altri animali: Roditori <input type="checkbox"/> Altri <input type="checkbox"/> specificare: _____
Animali esotici <input type="checkbox"/> Cani <input type="checkbox"/>
Gatto che potrebbe aver avuto contatti con topi e/o ratti: SÌ <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> specificare: _____
Gatto che ha presentato nel suo passato o presenta lesioni ulcerative su cute e/o mucose: SÌ <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Non So <input type="checkbox"/>



b. Organizzazione di
un **Workshop**

c. Raccolta e invio di **Campioni per indagini di laboratorio**



Animali campionati nel progetto:

- Gatti di colonia e padronali
- Animali esotici detenuti in Giardini zoologici, Centri di Ricovero e Recupero e simili
- Animali selvatici, sinantropi e alloctoni con lesioni sospette
- Uomo



Materiale biologico da inviare all'IZSLT

Lesioni cutanee o mucose: raschiato, ago aspirato, biopsia, tampone da bordo lesione (in 1 mL di soluzione fisiologica o PBS in provetta chiusa ermeticamente).

Essudato: aspirare con una siringa ed inviare tal quale.

Sangue: per ricerca di anticorpi nel siero da animali con lesioni cutanee; da gatti di colonia, ratti, topi e animali esotici-selvatici.

Organi di animali deceduti: se sospetto clinico-anatomopatologico di CPXV, prelevare fegato, milza, polmone, intestino, sangue intracardiaco.

Esempi di Lesioni cutanee tipiche



Papula (Uomo)

© Campe H et al, Germania 2009



Vescicola (Gatto)

© Castilletti C., 2011

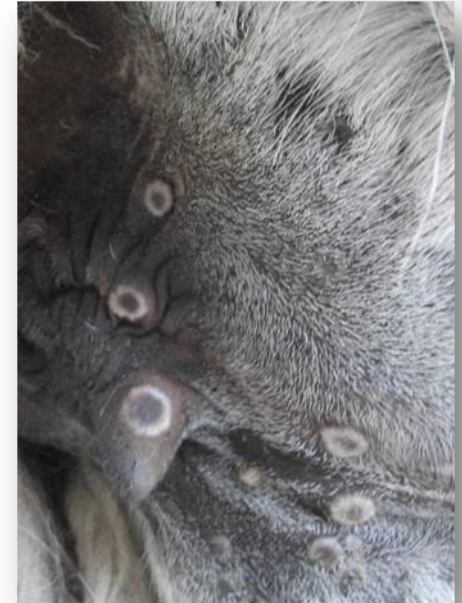


**Escara con eritema ed edema
all'articolazione sternoclavicolare
(Uomo)**

Strenger, 2009

Lesioni crateriformi (Lama)

© D'Alterio G, Viterbo, 2009

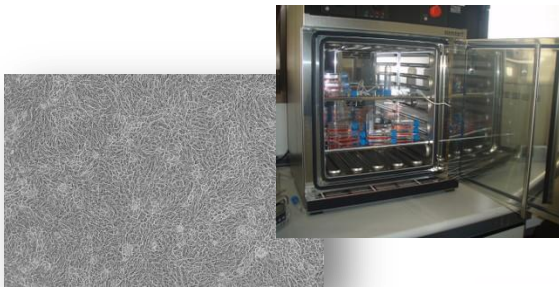
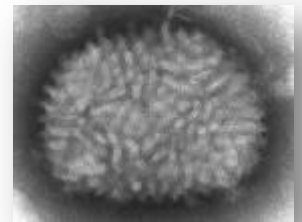


Condizioni di invio:

- refrigerato (se entro 24 ore) oppure congelato
- compilare *Scheda raccolta dati* (sito www.izslt.it → Modulistica → Cowpoxvirus).
- quando possibile, in formalina per l'esame istologico.

Esami di laboratorio:

- visualizzazione diretta ed identificazione, su base morfologica, di CPXV al **Microscopio Elettronico**
- isolamento in **Coltura cellulare** del virus
- **Esame istologico**
- tipizzazione del ceppo virale isolato, mediante tecniche di **Biologia molecolare** (PCR Real Time e Sequenziamento)
- evidenziazione di **Anticorpi specifici** mediante SN e IF



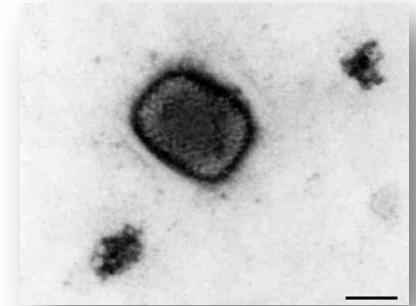
Osservazione al Microscopio Elettronico a Trasmissione

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



Philips EM 208

Particelle tipiche a mattoncino
con superficie a tubuli irregolari

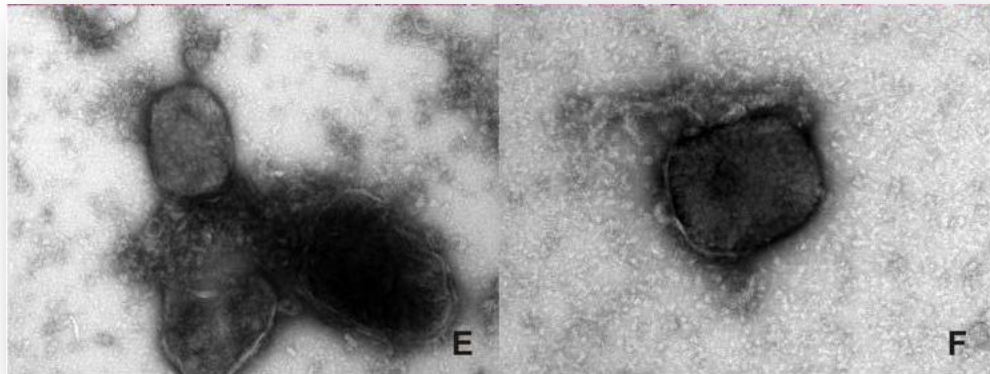


Cowpoxvirus

© G. Cardeti (IZSLT, Roma)

Cowpoxvirus

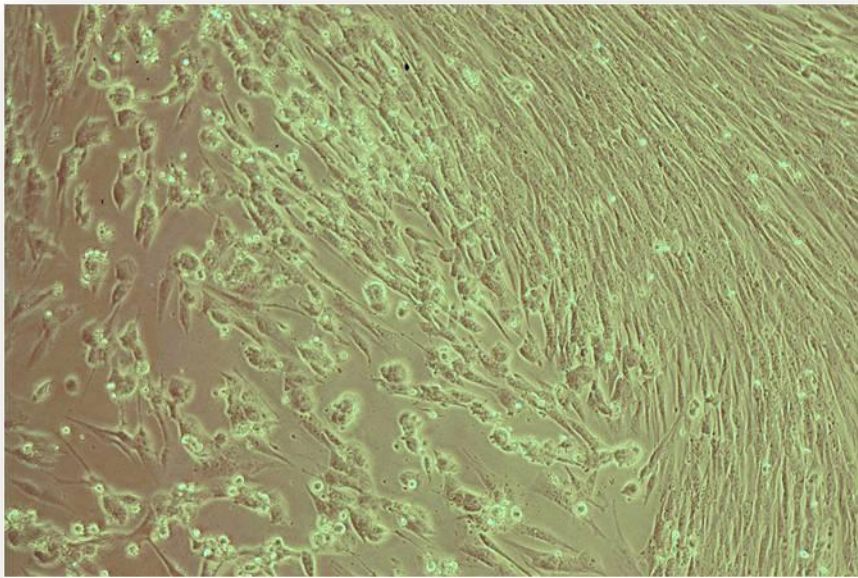
© A. Nitsche (Robert Koch-Institut, Berlin)



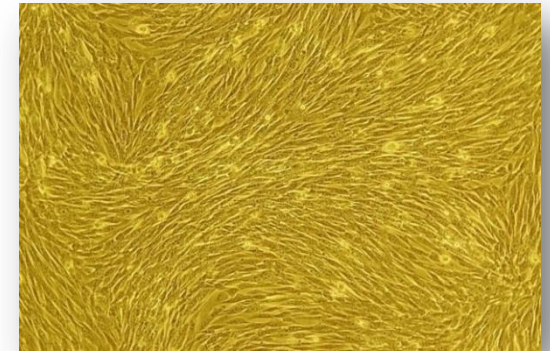
Isolamento su Colture cellulari

Due linee cellulari di mammifero: Vero e BHK₂₁

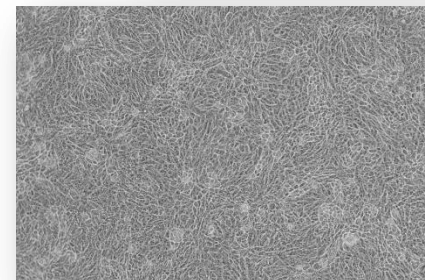
Effetto citopatico caratterizzato da *lisi cellulare*



ECP su BHK21



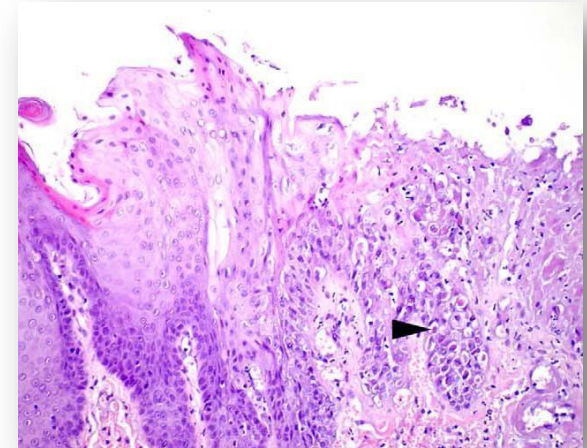
BHK₂₁



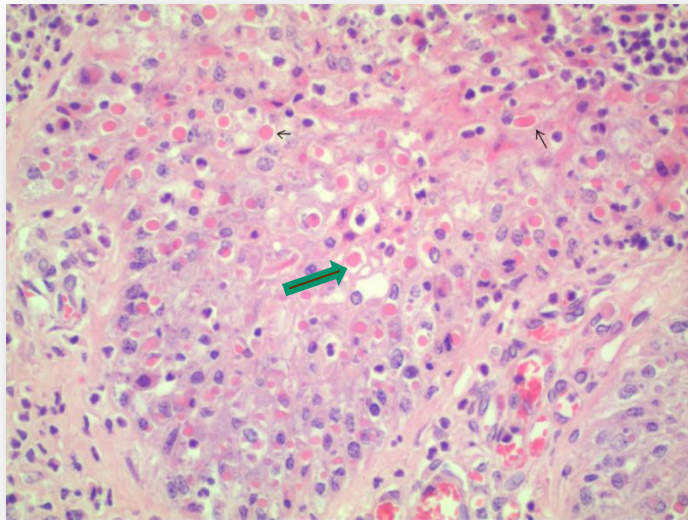
Vero

Porzioni di lesioni cutanee fissate in
formalina, incluse in paraffina, tagliate e
colorate con **ematossilina - eosina**

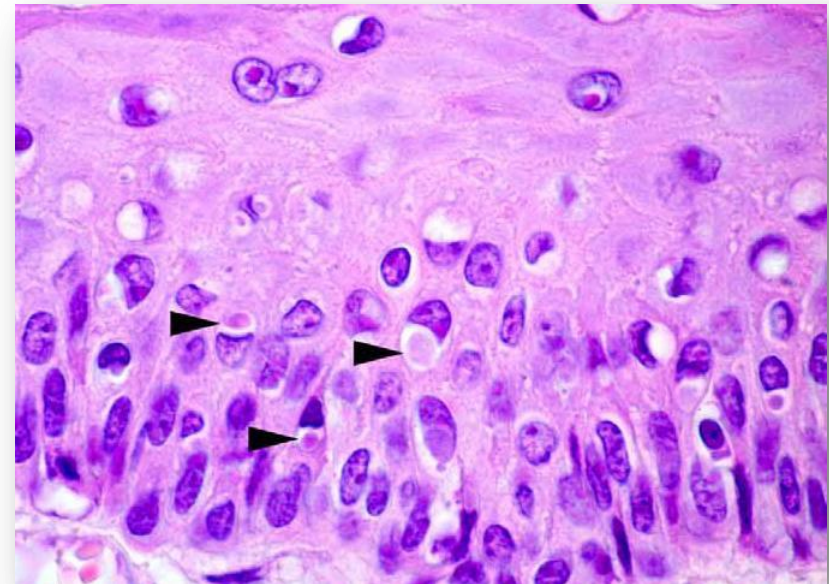
Evidenziati corpi inclusi
intracitoplasmatici ed eosinofilici negli
strati basale e spinoso dell'epidermide



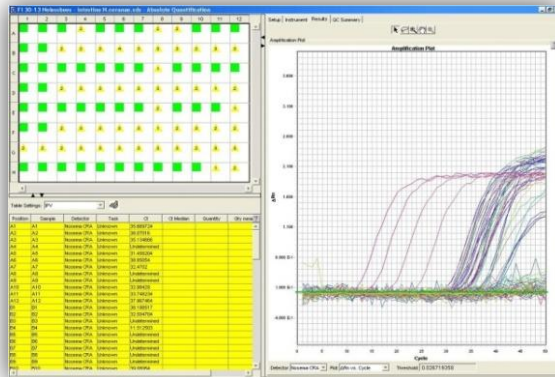
Corpi inclusi da CPXV - Mangusta
Schmiedeknecht et al, VetPat. 2010



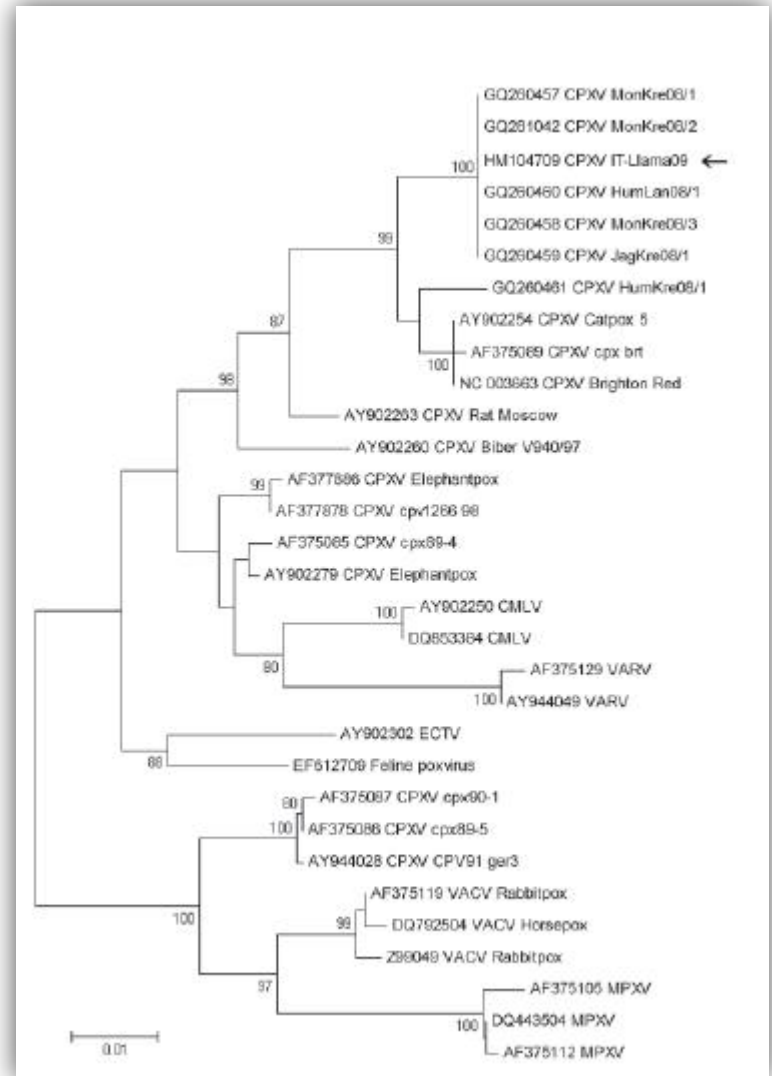
Corpi inclusi da CPXV - Lama
© C. Eleni - IZSLT, Roma



DNA virale totale estratto dal
materiale patologico e analizzato
mediante **Real-Time PCR** specifica per
una regione del gene *crmB*
dell'Orthopoxvirus



Per l'analisi filogenetica, eseguite due
PCR end-point specifiche per il gene
completo dell'emoagglutinina (HA) e
per il *crmB*



Phylogenetic tree based on nucleotide sequences of the complete hemagglutinin open reading frame (921 bp) from the llama orthopoxvirus isolate (arrow) and additional orthopoxvirus sequences available in GenBank. (Cardeti et al., 2011)



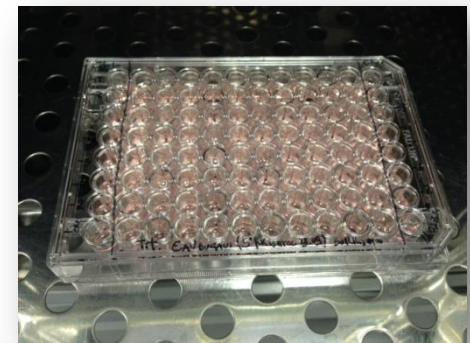
Comparsa di Anticorpi dopo circa 7 giorni
Cross-immunità con Vaccino Vaiolo umano

Test di Sieroneutralizzazione -> Anticorpi IgG

Test di Immunofluorescenza -> Anticorpi IgM e IgG

Campioni di sangue di:

- gatti di colonie feline (ASL Roma D ed altre)
- gatti padronali con lesioni sospette (ASL e ambulatori)
- animali esotici, selvatici, alloctoni (giardini zoologici e simili; sangue intracardiaco in sede autoptica)



Struttura del Progetto

Durata: 36 mesi

Attività distribuite tra le 5 U.O.

- U.O. IMS 1 - **Biotechnologie**, dott.ssa Cardeti G.
- U.O. IMS 2 - **Lab. Anatomo-Istopatologia**, dott.ssa Eleni C.
- U.O. IMS 3 - **Osservatorio Epidemiologico**, dott.ssa Scaramozzino P.
- U.O. IMS 4 - **INMI-IRCCS, Laboratorio di Virologia**,
dott.ssa Castillette C.
- U.O. EMS 1 - **ASL RM D, Assistenza zoiatrica canili comunali**,
dott.ssa Malandruccho L.



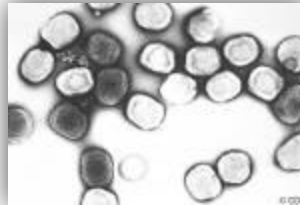
Incontri, Relazioni intermedie, Pubblicazioni scientifiche

...e con i risultati ottenuti,
costituire la "base line" per
la messa a punto di idonei
programmi di prevenzione
sul territorio...





Grazie per l'attenzione



....e soprattutto della vostra collaborazione, con l'invio di campioni...

giusy.cardeti@izslt.it

