

WEST NILE DISEASE

Esperienze pratiche dal territorio

Vista l'importanza che continuano ad avere le problematiche legate alla diffusione della West Nile disease nel nostro Paese e le sue implicazioni di carattere zoonosico presentiamo le esperienze dei colleghi dei Servizi veterinari di Ferrara e Arezzo oggetto di relazione durante la giornata *Caso studio West Nile disease* che si è tenuta nell'ambito del convegno *Organizzazione e crescita professionale in Sanità pubblica veterinaria* organizzato dalla SIMeVeP, che si è svolto in provincia di Siena dal 23 al 26 novembre scorsi.

Epidemia di West Nile disease a Ferrara: attività di sorveglianza 2008 - 2009

Massimo Tassinari
Servizio Veterinario, AZ. USL - Ferrara

I dati e le osservazioni esposti sono il risultato dall'attività di sorveglianza operata dall'Area di Sanità pubblica veterinaria in Provincia di Ferrara durante l'epidemia di West Nile disease (WND) che si è manifestata, inizialmente con malattia negli equini dopo dieci anni dalla sua prima segnalazione, in questa specie, in un'area della Toscana circostante la palude di Fucecchio in Provincia di Firenze.

I focolai clinici si sono verificati, dalla terza decade di agosto alla prima di ottobre del 2008, in 10 scuderie per un totale di 16 equini ammalati, 2 dei quali sottoposti a eutanasia (foto 1).

I primi due casi, con esordio il 20 e 21 agosto 2008, si sono verificati in scuderie vicine ed è suggestiva la prossimità al fiume Po, in particolare a un sito di nidificazione collettiva di ardeidi (garzaia), denominato Isola Bianca (foto 2). L'Isola Bianca consente la nidificazione di molte coppie di aironi cenerini e di altri ardeidi.



Foto 1. Localizzazione dei focolai di West Nile disease del 2008 nella Provincia di Ferrara.

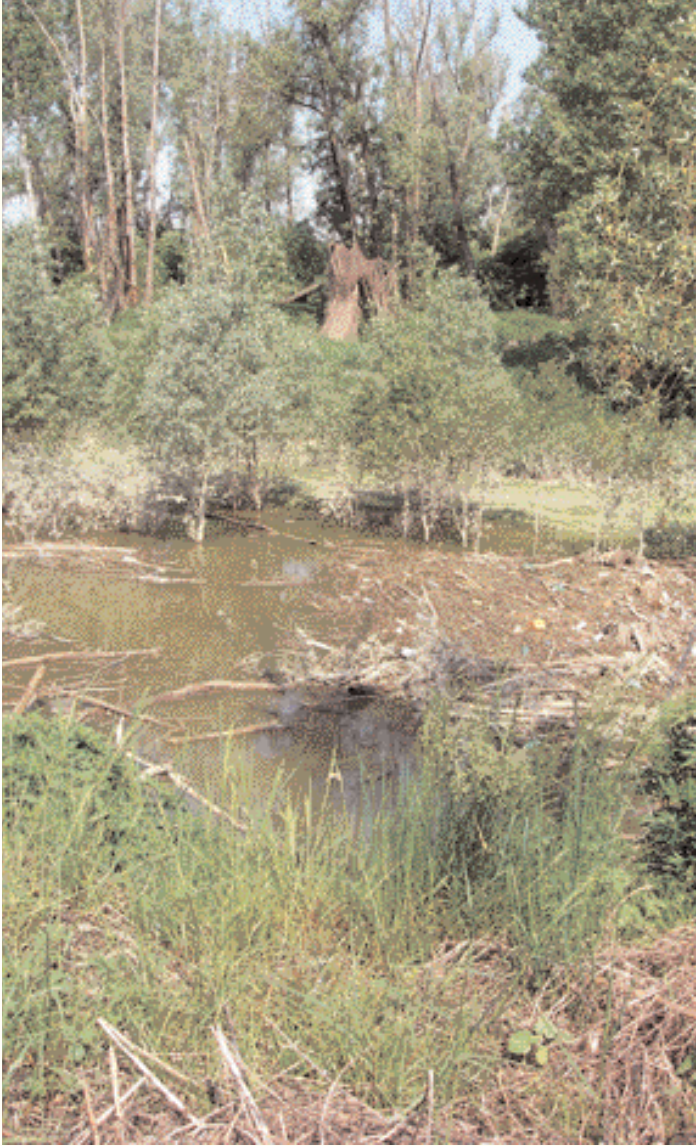


Foto 2. Isola Bianca, sito di nidificazione collettiva di ardeidi, vicino al Po, denominato Isola Bianca



Foto 3. Nidi di ardeidi resi evidenti dalla caduta stagionale del fogliame.

Gli ardeidi sono considerati buoni serbatoi per il West Nile virus (WNV) e in particolare i pulli, implumi e immobili che, costituendo facili prede per le zanzare ornitofile, sono probabilmente ottimi amplificatori virali.

L'Isola Bianca offre abbondanti ambienti idonei alla moltiplicazione delle zanzare ed è ipotizzabile che alla fine della stagione di nidificazione, nel mese di luglio, con l'abbandono del sito da parte di buona parte degli ardeidi, molte zanzare infette abbiano cercato altrove, nell'ambito del loro raggio di volo, nuove prede.; tra queste in particolare le zanzare, quali le *Culex* sp., di specie cosiddette "ponte", ovvero



Foto 4. Presenza di specie serbatoio rilevate vicino agli equini colpiti da WND.



Foto 5. Filari di alberi utilizzati per la nidificazione e come dormitori dai corvidi.

versatili nella specie predata e quindi capaci di nutrirsi sia su volatili sia su mammiferi.

Durante l'inverno, con la caduta del fogliame, è facile contare i nidi degli ardeidi. Nel dicembre 2008, sull'Isola Bianca, se ne contavano 49 (foto 3).

La presenza di specie serbatoio, inoltre, è stata rilevata in siti particolarmente vicini agli equini ammalati; nel secondo focolaio sono stati notati alcuni passeri domestici entrare e uscire da alcuni fori presenti nel soffitto della scuderia dove le intercapedini, oltre che a rifugio temporaneo, servivano verosimilmente pure per la nidificazione (foto 4).

I successivi focolai si sono verificati in zone della provincia più distanti dal fiume dove il territorio di pianura è contraddistinto da strade statali e provinciali fiancheggiate da alberi, che offrono molte possibilità di nidificazione soprattutto ai corvidi: gazze, più comunemente, ma anche cornacchie grigie e ghiandaie. I filari di alberi, utilizzati per la nidificazione e come dormitori dai corvidi inducono a considerare le strade alberate come vie di circolazione veloce anche per il WNV (foto 5); infatti, durante l'inverno, sono stati contati mediamente 2,6 nidi per km di strada, ma in certi tratti anche 10 nidi per km.

In effetti le indagini effettuate su corvidi catturati nell'estate 2008 hanno rivelato un'alta prevalenza di positività per WNV: 4 corvidi prelevati prima del 19 agosto sono risultati negativi; 20 su 30 corvidi, prelevati fra il 19 agosto e il 17 settembre, sono risultati positivi alla PCR (*Polymerase chain reaction*); altri 5 positivi di 66 pool (101 soggetti) di organi di corvidi catturati fino al 25 novembre. In totale circa il 30% dei pool è risultato positivo.

Nel 2008 nessun caso di positività nei volatili è stato associato a mortalità; in un solo caso, un'oca domestica ha presentato sintomatologia evidente. Sono state rilevate positività pure in carcasse di gabbiani reali recapitati a un CRAS, e in un cormorano abbattuto (figura 1).

Nel 2008 sono stati esaminati pure numerosi colombi torraioli, circa 220 in 59 pool: di questi circa il 45% è risultato positivo, se si vanno a sommare le positività sierologiche e quelle in PCR. Secondo quanto riportato in letteratura i columbiformi non sono considerati buoni serbatoi del WNV, poiché, durante la viremia, mediamente non vengono raggiunti titoli virali sufficienti a infettare la zanzara.

Nel 2009, sulla base del Piano regionale di monitoraggio, i corvidi catturati nell'ambito del Programma provinciale di contenimento della popolazione, già attuato da anni per limitare i

danni all'agricoltura e all'avifauna pregiata, sono stati utilizzati come sentinelle in sostituzione alle stazioni con galline sentinelle utilizzate fino al 2008; nella figura 2 sono riportati i dati numerici delle catture, secondo contingenti mensili in ognuno dei sei quadranti di ripartizione del territorio della Provincia; sono stati utilizzati preferibilmente soggetti giovani, nati nel 2009, per evitare di esaminare soggetti presenti durante la precedente stagione di circolazione virale che si fossero immunizzati nei confronti del Flavivirus.



Figura 1. Nel 2008 sono state rilevate positività alla PCR anche in spoglie di gabbiani reali e in un cormorano.

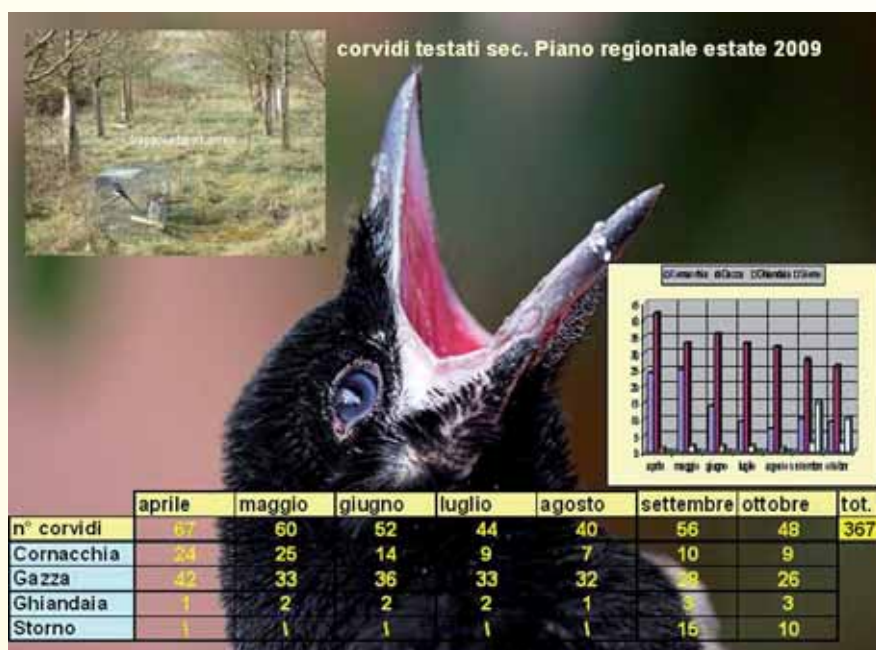


Figura 2. Dati numerici delle catture secondo contingenti mensili in ognuno dei sei quadranti di ripartizione del territorio della provincia.

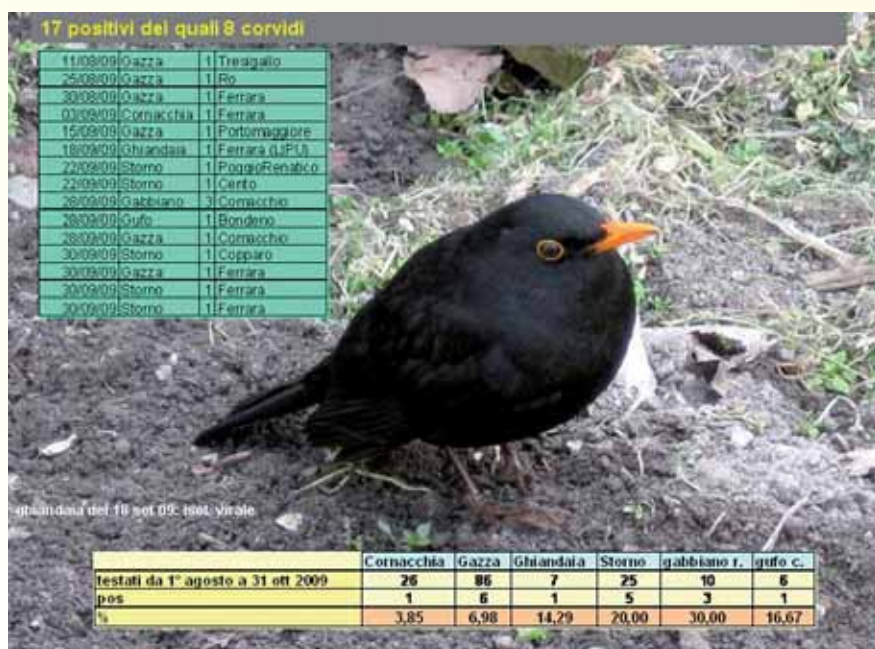


Figura 3. Positività in PCR rilevate nelle varie popolazioni aviarie.



Foto 6. Picchio rosso.

La prevalenza sui corvidi esaminati nel 2009 è molto inferiore rispetto al 2008, come si può evincere dai dati presenti in figura 3; è interessante il dato negli storni, (5 positivi su 25), la cui popolazione è soggetta a un rinnovamento più rapido, ovvero la frazione immune della popolazione è soggetta a una più rapida diminuzione. Sono state inoltre riscontrate positività in PCR di nuovo in gabbiani reali e in un gufo comune recapitati a uno dei 2 CRAS della provincia; anche

nel 2009 non vi sono state evidenze di malattia clinica o mortalità negli uccelli ad eccezione del caso di una ghiandaia raccolta moribonda alla periferia della città risultata positiva all'isolamento virale.

Nel 2009 è stato rilevato anche il *Flavivirus usutu* in un merlo e in zanzare.

Grazie alla collaborazione dei Centri di recupero della fauna selvatica presenti nella Provincia, sono stati esaminati numerosi nidiacci soccorsi dalla cittadinanza: si tratta di circa 60 soggetti di varie specie, soprattutto corvidi e passeriformi (foto 6). L'intento era quello di rilevare precocemente l'attività virale in soggetti non immuni (perché non presenti nella precedente stagione di circolazione virale), e inoltre particolarmente sensibili per altri motivi (immobilità, scarso piumaggio, debolezza conseguente alla caduta dal nido).

Nessuno di essi è risultato positivo; a parziale spiegazione di questo va notato che questi prelievi sono stati effettuati a fine primavera - inizio estate, dunque precocemente rispetto al consolidamento dell'attività dei vettori.

Nel 2008 l'attività di sorveglianza su sentinelle equine (28 sentinelle in 8 scuderie), ha potuto dimostrare sier conversionsi, ma più tardivamente rispetto all'insorgere dei focolai clinici, a causa della programmazione del secondo prelievo in epoca autunnale, poi anticipata a settembre; le sier conversionsi sono state rilevate in 6 scuderie su 8, nella seconda decade di settembre; in 3 di queste scuderie vi erano pure stati casi clinici. Durante la stagione vettoriale 2008 sono state poste in sorveglianza sentinelle avicole come da Piano nazionale (2 gruppi di 10 galline prelevati alternativamente ogni 15 giorni); la stazione delle sentinelle era sita presso una grande scuderia, dove si sono verificati casi clinici in cavalli e sier conversione nelle sentinelle equine (foto 7a). Il recinto delle galline era contiguo ai paddock (foto 7b).

Nelle galline sentinella le prime sier conversionsi si sono avute il 2 ottobre (ma una di esse, deceduta il 15 settembre, era positiva alla PCR); le sentinelle equine avevano sier convertito al prelievo del 15 settembre. Il primo caso clinico è stato constatato il 20 settembre. Sembra ipotizzabile che, pur essendo allo stesso modo a disposizione del vettore, le galline siano state esposte al virus più tardi rispetto ai cavalli, forse perché meno appetibili dal vettore.

Presso la stazione delle galline sentinella sono state effettuate quindicinalmente catture di culicidi con 2 trappole CDC + CO₂ (foto 8); le zanzare catturate sono state sottoposte pure a ricerca virologica, che ha dato esito negativo nei campioni provenienti da questo sito.

La sorveglianza entomologica nelle scuderie focolaio 2008 ha consentito di rilevare il WNV in alcune zanzare. Le catture positive per WNV (PCR) tutte in trappole tipo CDC riportano: la prima in un pool di 50 *Ochlerotatus caspius* la seconda in



Foto 7a, b. Sentinelle avicole poste in sorveglianza durante la stagione vettoriale vicino ai paddock.



Foto 8. Trappole per la cattura dei culicidi.



Foto 9. *Culex pipiens*.

Culex pipiens (foto 9) (pool 4 insetti) e *Ochlerotatus caspius* (pool 1 insetto), la terza in *Ochlerotatus caspius* (pool 1 insetto) e la quarta in *Culex pipiens* (pool 2 insetti).

Ochlerotatus (Aedes) caspius è una zanzara presente in modo massiccio nel territorio ferrarese, dotata di spiccata antropofilia e capace di grande molestia, ma non è riconosciuta come buon vettore di WNV; il rilievo di positività è significativo del fatto che si sia nutrita su un animale viremico; per essere un buon vettore deve consentire la moltiplicazione virale ed essere specie “ponte”.

Nel 2009 sono state effettuate dal Servizio veterinario 21 sedute di cattura di culicidi (foto 8) in 7 allevamenti, dei quali 5 focolaio; da giugno a ottobre sono state attuate 88 catture con CDC *light trap*, 21 con BG *sentinel* e 21 con *gravid trap*. Ad oggi nessuna di queste è risultata positiva per WNV, ma gli esami sono ancora in corso.

Sono state, inoltre, effettuate numerose catture con trappole a CO₂ dagli entomologi del Centro agricoltura ambiente G. Nicoli, su coordinamento della Regione Emilia Romagna (circa 60.000 insetti in 500 pool); in 3 casi è stata rilevata positività per WNV, a fine luglio e inizio agosto 2009, in pool di *Culex pipiens* catturate in siti non distanti dal primo focolaio clinico in equini localizzato nel quadrante ovest della provincia.

In seguito ai focolai clinici 2008 è stata posta in atto una

sorveglianza attiva che prevedeva il controllo sierologico di tutti gli equini che venivano controllati per AIE; questo ha determinato la rilevazione di altri 53 focolai su 74 aziende testate.

In totale sono state visitate 90 scuderie (20% delle aziende della provincia) e stati testati 675 equini (38% dei censiti in provincia); sono stati effettuati 1.049 prelievi, poiché numerosi soggetti sono stati sottoposti a un secondo prelievo per valutarne la dinamica anticorpale.

Il rilievo di PCR positiva nei campioni ematici è indicativo di infezione recente.

Nel 2008 la positività è avvenuta in 19 equidi (in uno di essi si è ottenuto pure l'isolamento virale). Deve essere considerato che le positività in PCR sono in gran parte state rilevate in campioni effettuati in concomitanza con un caso clinico, quindi nel luogo e momento in cui era più probabile una recente attività virale.

Oltre ai dati di presenza di culicidi forniti dalle trappole a CO₂ posizionate presso la stazione delle galline sentinella, nel 2008, abbiamo avuto la disponibilità di dati provenienti dai conteggi da ovitrappole per *Aedes albopictus* (zanzara tigre, foto 11), utilizzate per il Piano regionale di monitoraggio (199 ovitrappole disposte in siti urbanizzati in tutta la provincia). Sebbene la zanzara tigre non sia un buon vettore di WNV (non è una buona “zanzara ponte”), i dati della sua frequenza,



Foto 10. *Anopheles* sp.



Foto 11. *Aedes albopictus* (zanzara tigre).

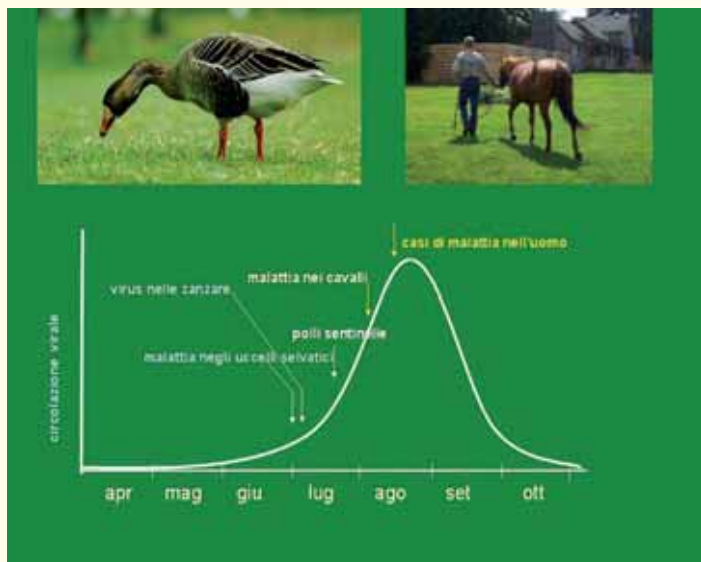


Figura 4. In letteratura è valutato come segno più precoce di circolazione virale la mortalità negli uccelli seguita nell'ordine dal reperimento di WNV in zanzare, sieroconversione in polli sentinella, casi clinici in equini, e infine casi clinici nell'uomo.

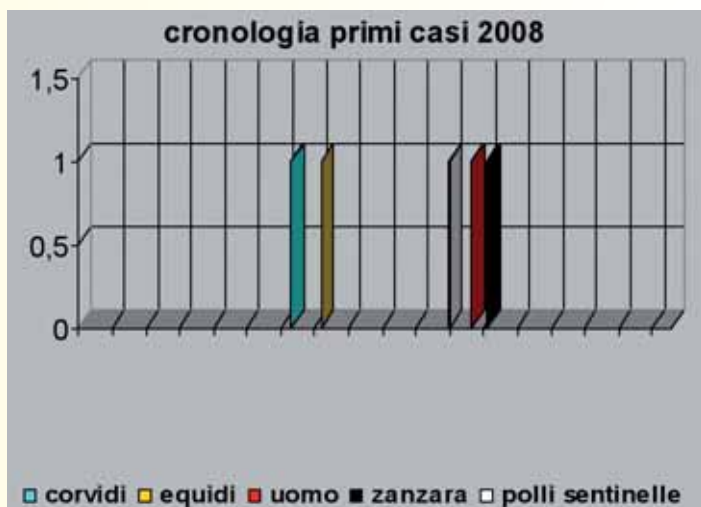


Figura 5. Cronologia dei primi casi del 2008.

confrontati con le condizioni meteorologiche, possono fornire indicazioni dell'attività vettoriale.

Nel 2009 però non vi sono stati rilievi di positività in PCR nei campioni ematici di equidi; sono stati invece segnalati in sorveglianza passiva 8 casi in equini, in 6 scuderie; per 2 di questi è stata scelta l'eutanasia.

Confrontando gli andamenti cronologici degli esordi dei focolai clinici nel 2008 e 2009 si riporta che nel 2008 in molti degli equidi rilevati positivi in sieroneutralizzazione, è stato prelevato un secondo campione a circa 3 settimane di distanza per poter valutare la dinamica anticorpale. Se si confrontano i risultati in scuderie dove l'accesso è stato determinato dal rilievo clinico (sorveglianza passiva), e in scuderie dove l'accesso è stato determinato dal rilievo di positività sierologica in sorveglianza attiva ovvero su campioni effettuati per il test

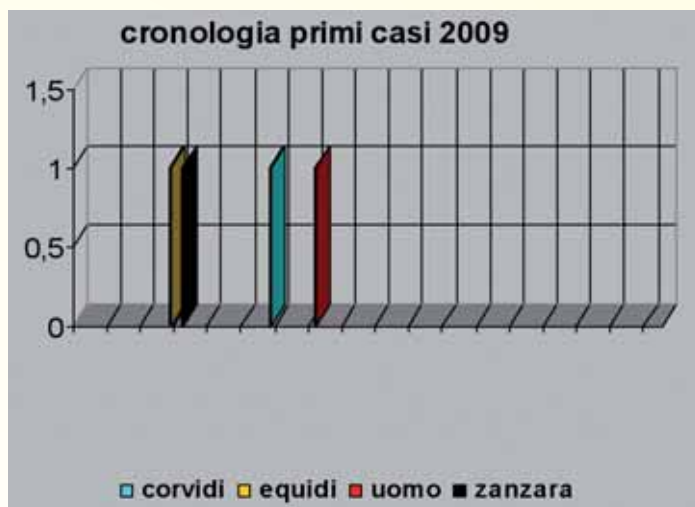


Figura 6. Cronologia dei primi casi del 2009.

di Coggins, quindi del tutto casuali è evidente, nel primo gruppo di aziende, che l'indicazione clinica ha consentito di rilevare un maggiore numero di casi di infezione in fase più precoce (sieropositivi con titoli destinati ad aumentare), ovvero di valutare con maggiore precisione l'inizio dell'attività, rispetto alla sorveglianza attiva.

Secondo le Procedure operative nazionali per il 2009, a Ferrara, che è stata Area di circolazione virale (ACV) nel 2008, non è stata prevista sorveglianza in sentinelle equine, ma è stato però attuato un progetto regionale di studio secondo il quale a maggio sono stati arruolati in 20 allevamenti 45 equidi sentinella, scelti fra quelli che si conoscevano sieronegativi negli ultimi mesi del 2008. Tra questi 32 sono stati sottoposti a prelievo nella prima decade di agosto e di settembre (non sono stati presi in considerazione quelli che nel frattempo sono stati vaccinati per WND o sono usciti dal territorio). 2 sentinelle in 2 diverse scuderie hanno sieroconvertito ad agosto (sono i primi 2 focolai 2009), altre 8 in 5 allevamenti in settembre.

Sono stati pure testati alcuni cani nei canili della provincia e 14 su 55 sono risultati positivi in Elisa competitiva. Secondo quanto riportato in letteratura, i cani sieroconvertono dopo l'infezione, ma non manifestano sintomi; hanno viremie brevi e a bassi titoli, ovvero, come finora si ritiene per i mammiferi, sono ospiti a fondo cieco.

In letteratura viene valutato come segno più precoce di circolazione virale la mortalità negli uccelli (vero negli Usa, non nei Paesi del Mediterraneo), seguita nell'ordine dal reperimento di WNV in zanzare, sieroconversione in polli sentinella, casi clinici in equini, e infine casi clinici nell'uomo (figura 4): a Ferrara non è andata così. Nel 2008 è comparsa prima la positività nei corvidi, seguita poco dopo dall'esordio clinico nell'equino (figura 5) mentre nel 2009 si è verificato prima l'esordio clinico nel cavallo, seguito poco dopo dalla positività in zanzare catturate. In entrambi i periodi viene invece confermata la tardività della comparsa di malattia nell'uomo (figura 6).