

$$\frac{A_07}{83}$$

Francesco Tolari, Patrizia Bandecchi

Malattie di interesse veterinario da
Flavivirus e Pestivirus



Copyright © MMXI
ARACNE editrice S.r.l.

www.aracneeditrice.it
info@aracneeditrice.it

via Raffaele Garofalo, 133/A-B
00173 Roma
(06) 93781065

ISBN 978-88-548-3921-2

*I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica
di riproduzione e di adattamento anche parziale,
con qualsiasi mezzo, sono riservati per tutti i Paesi.*

*Non sono assolutamente consentite le fotocopie
senza il permesso scritto dell'Editore.*

I edizione: Marzo 2011

Indice

- 7 *Prefazione*
- 9 *Capitolo I*
Generalità sulla famiglia Flaviviridae
- 13 *Capitolo II*
Genere Pestivirus
- 17 *Capitolo III*
Malattie da Pestivirus
- 3.1. Diarrea virale bovina, 17 – 3.1.1. *Introduzione*, 17 – 3.1.2. *Eziologia*, 18 – 3.1.3. *Patogenesi*, 20 – 3.1.4. *Epidemiologia*, 24 – 3.1.5. *Aspetti clinici e lesioni*, 26 – 3.1.6. *Diagnosi*, 30 – 3.1.7. *Profilassi Sanitaria*, 34 – 3.1.8. *Profilassi immunizzante*, 39 – 3.1.9. *Aspetti di sanità pubblica*, 43 – 3.2. *Peste suina classica*, 43 – 3.2.1. *Introduzione*, 43 – 3.2.2. *Eziologia*, 44 – 3.2.3. *Patogenesi*, 46 – 3.2.4. *Epidemiologia*, 49 – 3.2.5. *Aspetti clinici e lesioni*, 51 – 3.2.6. *Diagnosi*, 55 – 3.2.7. *Profilassi sanitaria*, 59 – 3.2.8. *Profilassi immunizzante*, 61 – 3.2.9. *Aspetti di sanità pubblica*, 64 – 3.2.10. *Normativa*, 64 – 3.3. *Border disease*, 65 – 3.3.1. *Definizione*, 65 – 3.3.2. *Eziologia*, 66 – 3.3.3. *Epidemiologia*, 67 – 3.3.4. *Patogenesi*, 67 – 3.3.5. *Aspetti clinici e lesioni*, 69 – 3.3.6. *Patologia*, 70 – 3.3.7. *Diagnosi*, 71 – 3.3.8. *Profilassi e controllo*, 73 – 3.3.9. *Aspetti di sanità pubblica*, 74.
- 75 *Capitolo IV*
Genere Flavivirus

77 Capitolo V

Flavivirusi trasmesse da zecche

5.1. Tick born encephalitis, 77 – 5.1.1. *Introduzione*, 77 – 5.1.2. *Eziologia*, 78 – 5.1.3. *Epidemiologia*, 78 – 5.1.4. *Patogenesi*, 79 – 5.1.5. *Aspetti clinici e lesioni*, 80 – 5.1.6. *Diagnosi*, 81 – 5.1.7. *Profilassi*, 82 – 5.1.8. *Aspetti di sanità pubblica*, 82 – 5.2. Louping ill, 82 – 5.2.1. *Definizione*, 82 – 5.2.2. *Eziologia*, 83 – 5.2.3. *Epidemiologia*, 83 – 5.2.4. *Patogenesi, aspetti clinici e lesioni*, 84 – 5.2.5. *Diagnosi*, 85 – 5.2.6. *Profilassi*, 86 – 5.2.7. *Aspetti di sanità pubblica*, 86.

87 Capitolo VI

Flavivirusi trasmesse da zanzare

6.1. Encefalite West Nile, 87 – 6.1.1. *Introduzione*, 87 – 6.1.2. *Eziologia*, 89 – 6.1.3. *Epidemiologia*, 91 – 6.1.4. *Patogenesi*, 93 – 6.1.5. *Aspetti clinici e lesioni*, 93 – 6.1.6. *Diagnosi*, 95 – 6.1.7. *Profilassi sanitaria*, 97 – 6.1.8. *Profilassi immunizzante*, 99 – 6.1.9. *Aspetti di sanità pubblica*, 100 – 6.1.10. *Normativa*, 101 – 6.2. Malattia di Wesselsbron, 101 – 6.2.1. *Definizione*, 101 – 6.2.2. *Eziologia*, 102 – 6.2.3. *Epidemiologia*, 102 – 6.2.4. *Patogenesi*, 103 – 6.2.5. *Aspetti clinici e lesioni*, 103 – 6.2.6. *Diagnosi*, 104 – 6.2.7. *Profilassi*, 105 – 6.2.8. *Aspetti di sanità pubblica*, 105 – 6.3. Encefalite giapponese, 105 – 6.4. Encefalite St. Louis, 107 – 6.5. Infezione da virus Usutu, 109.

III *Bibliografia consultata*

II9 *Ringraziamenti*

Prefazione

Questa monografia, frutto delle nostre esperienze di ricerca e didattica in virologia veterinaria, è rivolta a quanti siano interessati ad approfondire argomenti di malattie infettive virali ed in particolare ai veterinari che intendano rimanere aggiornati in questa materia in rapido cambiamento. L'evoluzione dei mezzi di comunicazione e la rapidità dei progressi scientifici rendono difficile la stesura di testi onnicomprensivi in tempi rapidi, tali da assicurare un sufficiente grado di aggiornamento. Nonostante ciò l'esigenza di una guida che indirizzi ed orienti fra la miriade di informazioni disponibili rimane ancora molto sentita.

A differenza dei testi classici questa monografia non contiene immagini e la bibliografia è essenziale ed elencata a fine testo. In compenso sono indicati una serie di siti web di organismi ufficiali e centri di referenza, dove il lettore può trovare immagini che possono integrare la mancanza di iconografia. In questo modo si è cercato di incoraggiare un nuovo metodo di studio basato sulla ricerca in rete di informazioni attendibili a partire da un testo guida.

Questa monografia è dedicata alla famiglia *Flaviviridae*, nella quale sono compresi virus responsabili di malattie di notevole interesse per la patologia veterinaria. Digni di nota sono: il virus della peste suina classica, malattia ad impatto economico mondiale e il virus della diarrea virale

bovina, per la quale le nuove conoscenze hanno aperto prospettive di eradicazione fino a pochi anni fa impensabili. Sono inoltre trattati *Flavivirus* trasmessi da zecche e da zanzare responsabili di diverse zoonosi emergenti ed in particolare il virus West Nile, agente eziologico di una zoonosi a diffusione mondiale.

Un ringraziamento a coloro che con i loro suggerimenti hanno contribuito alla stesura del testo.

Un ringraziamento particolare a Renato Farina, Professore Emerito di malattie infettive degli animali domestici, che con i suoi insegnamenti ci ha indirizzato nello studio di questa appassionante materia. Nella speranza di incontrare le esigenze dei lettori auguriamo una buona lettura.

Francesco Tolari
Patrizia Bandecchi

Generalità sulla famiglia *Flaviviridae*

Alla famiglia *Flaviviridae*, di recente costituzione, appartengono virus a RNA, molti dei quali trasmessi da artropodi, responsabili di malattie importanti per l'uomo e per gli animali. La specie virale tipo è costituita dal virus della febbre gialla (*Flavivirus febricis*), da cui il prefisso latino con il quale è denominata la famiglia *flavus* (giallo).

Morfologia I virioni appaiono come particelle sferiche o pleomorfe di 40–60 nm, dotate di un envelope circondato da una frangia di sottili e corte proiezioni superficiali, che avvolge il nucleocapside a simmetria icosaedrica.

Proprietà fisico-chimiche L'unità di massa atomica dei virioni è 60×10^6 e la densità di galleggiamento (*buoyant density*) misurata mediante ultracentrifugazione varia in rapporto al gradiente impiegato: 1,07–1,24 g/ml in CsCl; 1,10–1,23 g/ml in saccarosio. I virus di questa famiglia sono rapidamente inattivati dal calore (a 50°C in 10' perdono il 50% di infettività), ma la loro resistenza aumenta in presenza di materiale proteico (30' a 56°C). Sono sensibili all'azione dei solventi dei lipidi, dei detergenti e di vari disinfettanti (formaldeide al 3%, perossido di idrogeno al 2%, iodio all'1%, soluzioni a base di cloro). In condizioni di laboratorio sono stabili a pH 8.

Genoma e replicazione L'RNA genomico virale è formato da 9500 a 12500 nucleotidi e contiene un singolo filamento di RNA a polarità positiva, direttamente infettante. Nel genoma si distinguono: una regione non codificante chiamata *untranslated region* (UTR) all'estremo 5' (UTR 5'), molto conservata e con funzioni di innesco della traduzione; un lungo segmento ORF che codifica per un'unica poliproteina; una seconda regione non codificante in corrispondenza dell'estremo 3' (UTR 3'). Per chiarezza facciamo notare che la regione UTR viene da alcuni definita NTR (*not translated region*). La replicazione virale avviene nel citoplasma delle cellule infette, in artropodi ematofagi e in ospiti vertebrati. In condizioni di laboratorio la replicazione avviene su substrati di varia origine (uova embrionate di pollo, cellule primarie di vertebrati, linee cellulari) ed è seguita nella maggioranza dei casi dalla comparsa di effetto citopatico o dalla formazione di placche di lisi. L'effetto citopatico non si osserva sulle cellule di insetto.

Proteine e antigeni Le sequenze codificanti più vicine all'estremità 5' codificano per 3-4 importanti proteine strutturali mentre le proteine non strutturali (proteasi, elicasasi e polimerasi) sono codificate da sequenze più vicine all'estremità 3'. I virus di un genere sono antigenicamente correlati fra di loro, ma non con i virus degli altri generi.

Proprietà biologiche La maggior parte dei virus di questa famiglia presenta un ciclo di trasmissione che coinvolge vertebrati e artropodi. Negli artropodi, che fungono da vettori biologici, la trasmissione avviene anche per via transovarica. L'uomo generalmente costituisce un ospite

accidentale nella catena di trasmissione fra artropodi e vertebrati. Ad eccezione dei virus del genere *Pestivirus* tutti gli altri presentano attività emoagglutinante.

Tassonomia La famiglia *Flaviviridae* comprende tre generi: *Pestivirus*, *Flavivirus*, *Hepacivirus* ed alcuni virus non ancora del tutto inquadrati tassonomicamente. In questa monografia vengono descritte le caratteristiche dei generi *Pestivirus* e *Flavivirus*, ambedue contenenti specie virali di interesse veterinario. Il genere *Hepacivirus* comprende soltanto il virus dell'epatite C dell'uomo e pertanto non sarà preso in considerazione. Nella descrizione dei generi saranno prese in considerazione solo le caratteristiche specifiche di ciascun genere.

Tabella 1.1: Infezioni da virus della famiglia *Flaviviridae* trattate nella monografia

Genere	Specie virale	Malattia	Animali ospiti
<i>Pestivirus</i>	Classical swine fever virus	Peste suina classica	Suino, cinghiale
	Bovine viral diarrhoea virus (BVDV)	Diarrea virale bovina e malattia delle mucose	Bovino, suino, ruminanti selvatici
	Border disease virus (BDV)	Border disease	Pecora, capra, bovino, ruminanti selvatici
<i>Flavivirus</i> (trasmessi da zanzare)	West Nile virus	Encefalite West Nile	Cavallo, uomo, uccelli e mammiferi vari
	St. Louis encephalitis virus	Encefalite St. Louis	Uomo, uccelli domestici e selvatici
	Japanese encephalitis virus	Encefalite giapponese	Cavallo, suino, uomo
	Usutu virus	Infezione da virus Usutu	Uccelli, topi, uomo
<i>Flavivirus</i> (trasmessi da zecche)	Wesselsbron virus	Malattia di Wesselsbron	Pecora, capra, bovino, suino, cavallo, cammello, gerbillo, struzzo, uomo
	Tick born encephalitis virus	Tick born encephalitis	Pecora, capra, bovino, cane, uomo
<i>Flavivirus</i> (trasmessi da zecche)	Louping ill virus	Louping ill	Pecora, red grouse (pernice bianca scozzese), capra, bovino, cavallo, cane, suino, cervo, arvicole, uomo

Genere *Pestivirus*

Morfologia I virioni si presentano di forma sferica o leggermente pleomorfa. Dall'envelope si dipartono proiezioni esterne di 10 nm che formano subunità a forma di anello. Il capside icosaedrico di 25–37 nm è formato dalla proteina C. Nell'envelope sono inserite 3 glicoproteine virali: Erns, E1 e E2.

Genoma e replicazione L'informazione genetica è contenuta in una catena singola di RNA a polarità positiva direttamente infettante di 12,5 kb. Ciascun virione contiene normalmente una singola copia di genoma, ma alcuni segmenti genomici possono essere duplicati negli stipiti citopatogeni di BVD, con il risultato di avere una molecola di RNA genomico di dimensioni significativamente più grandi. Le particelle virali vengono rilasciate dalle cellule infette per esocitosi, generalmente senza danni apprezzabili morfologicamente.

Proteine ed antigeni Attraverso processi di post-traduzione e clivaggio ad opera di proteasi cellulari e virali, dalla poliproteina si generano le singole proteine strutturali e non strutturali virali. L'ordine in cui vengono codificate dai geni di ORF è il seguente: NH₂-(Npro-C-Erns-E1-E2-p7-NS2.3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B)-COOH. Struttura e

funzioni delle diverse proteine strutturali sono abbastanza conosciute:

- Npro: proteina non strutturale a funzione proteasica;
- C: proteina che forma il capsido, molto conservata, non evoca una risposta anticorpale svelabile;
- Erns: glicoproteina dell'envelope, induce una ottima risposta anticorpale ed anche una discreta immunità protettiva;
- E1: glicoproteina di membrana unita covalentemente alla E2. I sieri degli animali convalescenti contengono livelli bassi di anticorpi nei confronti di questa proteina;
- E2: è la principale glicoproteina dell'envelope, induce la formazione di anticorpi neutralizzanti e per questo è adatta ad essere utilizzata per la preparazione di vaccini a subunità, ma contiene una regione variabile e le differenze antigeniche fra stipiti possono creare problemi nella copertura vaccinale;
- p7: si pensa che questa proteina svolga la sua funzione in fase di assemblaggio e di maturazione dei virioni;
- NS2.3: proteina non strutturale necessaria per la replicazione virale, molto conservata nell'ambito del genere *Pestivirus*;
- NS5B: svolge funzione di RNA polimerasi RNA dipendente;
- altre proteine non strutturali con funzioni meno chiare sono NS4A, NS4B, NS5A.

I determinanti antigenici si ritrovano soprattutto sulle 2 maggiori glicoproteine strutturali dell'envelope E2 ed Erns. La cross-reattività antigenica all'interno del genere *Pestivirus* è molto elevata.

Proprietà biologiche Lo spettro degli animali che possono infettarsi con i *Pestivirus* include: bovino, piccoli ruminanti, suino, cinghiale ed una ampia gamma di ruminanti selvatici. Caratteristiche biologiche comuni ai *Pestivirus* sono tropismo per organi linfoidi ed endoteli vasali e fetopatogenicità. I *Pestivirus* replicano *in vitro* su cellule primarie di origine bovina, ovina, caprina e suina derivate da reni, testicoli, turbinati e su alcune linee cellulari. A seconda che producano o no effetto citopatico su colture cellulari, si distinguono stipiti citopatogeni (CP) e stipiti non citopatogeni (NCP). La maggioranza degli stipiti circolanti in natura sono NCP. Le basi genetiche della citopatogenicità dei *Pestivirus* sono attualmente abbastanza conosciute, gli stipiti NCP producono l'intera proteina di fusione NS2.3, mentre negli stipiti CP le due proteine NS2 e NS3 risultano distinte. In particolare la citopatogenicità è correlata con l'espressione della proteina NS3 che si origina dal clivaggio della NS2.3. La NS3 è quindi un marker molecolare di citopatogenicità e la sua produzione consegue a fenomeni di ricombinazione genetica. Fra questi ricordiamo: l'inserzione di sequenze di origine cellulare nel gene della NS2.3 (es. sequenze della ubiquitina cellulare); duplicazione della sequenze virali della regione NS3 che si inseriscono o all'interno dello stesso gene o in porzioni genomiche che lo fiancheggiano; delezione di sequenze; mutazioni puntiformi. Alcuni isolati virali CP risultano difettivi e dipendono dalla presenza di uno stipite NCP per la loro replicazione.

Tassonomia Nel genere *Pestivirus* sono comprese le seguenti specie virali responsabili di 3 malattie di notevole interesse veterinario: BVDV responsabile della diarrea vi-

rale bovina, VPSC responsabile della peste suina classica e BDV responsabile della border disease nei piccoli ruminanti ed in particolare negli ovini. Le differenze fra gli stipiti di origine ovina e caprina e quelli di origine bovina, sono abbastanza sfumate, tanto che alcuni ricercatori preferiscono raggrupparli sotto la denominazione comune di “pestivirus dei ruminanti” come se appartenessero ad un’unica specie.

Malattie da *Pestivirus*

3.1. Diarrea virale bovina

3.1.1. *Introduzione*

Storia e definizione

Nel 1946 Olafson e collaboratori descrissero una malattia dei bovini, che per certi aspetti somigliava alla peste bovina, ma presentava un decorso più benigno. Questa malattia, sostenuta da un nuovo virus, fu definita diarrea virale bovina (BVD). Successivamente fu descritta una sindrome molto più grave, denominata malattie delle mucose (MD), sostenuta dallo stesso virus, che a differenza della BVD colpiva un numero minore di soggetti, ma determinava elevata mortalità. BVD e MD sono due delle principali sindromi riscontrate nel bovino a seguito di infezione con il virus della BVD (BVDV). Solo in tempi più recenti si è accertato che BVDV è responsabile soprattutto di infezioni congenite e turbe riproduttive.

La BVD è inserita fra le malattie del bovino della lista della *World Organisation for Animal Health* (OIE).

Distribuzione geografica

I dati relativi alla prevalenza dell'infezione in Europa negli ultimi 30 anni dimostrano che le infezioni da BVDV sono endemiche in tutti i paesi ad esclusione di quelli del nord Europa, dove sono in corso programmi di controllo. BVDV-1 è presente in tutti i paesi europei e la presenza di BVDV-2 è stata segnalata in Italia, Germania, Belgio, Francia, Olanda, Austria, Slovacchia e Regno Unito.

3.1.2. *Eziologia*

Tassonomia

Morfologia, struttura, resistenza agli agenti fisico-chimici, organizzazione del genoma e proprietà biologiche (fetopatogenicità, tropismo per organi linfoidi ed endoteli vasali) di BVDV sono comuni a quelle degli altri *Pestivirus*. Sulla base di proprietà antigeniche (differenze significative nella glicoproteina di superficie E2) e genetiche si distinguono due tipi virali: BVDV-1, che comprende la maggioranza degli isolati virali "classici"; BVDV-2, che comprende gli isolati virali che causano quadri clinici caratterizzati da malattia acuta mortale accompagnata da trombocitopenia ed emorragie. All'interno del tipo BVDV-1 si distinguevano fino a poco fa due genotipi denominati BVDV-1 a e BVDV-1 b, ma, a conferma della notevole variabilità genetica, confrontando le differenze genetiche riferite alla regione 5'UTR e Npro su un numero elevato di stipiti isolati in diverse parti del mondo, sono stati identificati fino ad ora tredici diversi genotipi e continuando nell'esame di nuovi stipiti probabilmente se ne scopriranno altri. In Europa domina BVDV-1 che rappresenta oltre il 90% degli isolati virali, mentre gli isolati virali nord americani

appartengono nel 50% dei casi alla specie BVDV-2. Gli stipiti non citopatogeni (NCP) rappresentano la stragrande maggioranza degli stipiti circolanti e quindi possono essere considerati i normali stipiti di BVDV presenti in natura. Questi stipiti sono in grado di dar luogo ad infezione persistente a seguito di infezione congenita nel primo periodo della vita fetale. Sono inoltre dei possibili contaminanti virali di linee cellulari e di sieri fetali utilizzati per le colture cellulari, dove la loro presenza può passare inosservata perché non determinano alterazioni morfologiche della coltura. Tale contaminazione può interferire con l'isolamento su colture cellulari dello stesso BVDV e di altri virus e rappresenta un pericolo per la diffusione di questi stipiti mediante l'utilizzo di vaccini a virus vivi attenuati. Gli stipiti citopatogeni (CP) compaiono per mutazione dagli stipiti NCP, generalmente non danno viremia, non hanno tendenza a diffondere, non infettano i feti, la loro escrezione è ridotta, si isolano da soggetti con malattia delle mucose dove sono contemporaneamente presenti stipiti NCP. Sebbene i *Pestivirus* siano antigenicamente correlati fra loro, l'analisi antigenica di isolati virali di BVDV mediante sieroneutralizzazione ha dimostrato una notevole variabilità antigenica in particolare negli epitopi della glicoproteina E2 implicati nella neutralizzazione virale. Una marcata variabilità si riscontra anche nelle caratteristiche di virulenza.

Spettro *in vivo*

Lo spettro degli animali che possono infettarsi con BVDV non si limita al bovino ed include piccoli ruminanti, bufali, suini ed una ampia gamma di ruminanti selvatici. Indagini sierologiche hanno confermato la circolazione del

virus in popolazioni di ruminanti selvatici delle famiglie *Bovidae*, *Cervidae*, *Camelidae* ed *Antilocapridae* e per alcune specie è stato anche dimostrato che BVDV, o stipiti ad esso strettamente correlati, possono provocare malattia.

Spettro *in vitro*

BVDV replica bene in cellule di origine bovina, ovina e caprina, colture primarie e linee cellulari (BT e MDBK). Le colture primarie più adatte al primo isolamento sono derivate da reni, testicoli e turbinati nasali di bovino.

3.1.3. Patogenesi

La patogenesi dell'infezione da BVDV è piuttosto complessa, la risposta degli animali all'infezione e i diversi quadri clinici dipendono da una serie di fattori che interagiscono fra loro. Fra quelli legati all'ospite possiamo elencare:

- stato di immunocompetenza o di immunotolleranza nei confronti di BVDV;
- stato immunitario nei confronti di BVDV (non immune, immune per immunità passiva di origine materna, immune per immunità attiva dovuta a precedente infezione o vaccinazione);
- stato di gravidanza e fase della gravidanza al momento dell'infezione;
- presenza o meno di altre infezioni concomitanti;
- grado di stress ambientale al quale è sottoposto l'animale.