

LA BLUE TONGUE

PATOLOGIA

La febbre catarrale degli ovini, più comunemente conosciuta come Blue tongue (BT), è una malattia infettiva, non contagiosa, dei ruminanti trasmessa dagli insetti vettori.

L'agente eziologico è un virus appartenente alla famiglia Reoviridae, genere Orbivirus, del quale si conoscono 24 sierotipi. La loro patogenicità è variabile e, benché tutte le specie di ruminanti siano recettive, la malattia si manifesta in forma grave negli ovini, con sintomi caratterizzati da infiammazione, congestione, edema a carico della regione della testa, emorragie ed ulcere delle mucose.

EPIDEMIOLOGIA

Il virus della BT è trasmesso da insetti appartenenti al genere Culicoides, e la diffusione della malattia nel mondo è compresa in un'area geografica delimitata approssimativamente tra il 53° parallelo Nord e il 35° Sud, dove esistono le condizioni climatiche ed ambientali idonee al ciclo vitale degli stessi.

La BT è presente in Africa, Europa, Nord e Sud America, Australia, Asia meridionale e Medio Oriente. Il principale vettore riconosciuto nel bacino Mediterraneo è *C. imicola*. La posizione geografica dell'Italia al centro del bacino del Mediterraneo, offre senz'altro condizioni climatiche tali da consentire la moltiplicazione e lo sviluppo dei vettori. In particolare condizioni ambientali favorevoli allo sviluppo di artropodi vettori possono essere individuate su tutto il territorio nazionale, ed anche nelle zone settentrionali si ritrovano nicchie ecologiche che per le loro caratteristiche di umidità, clima e temperatura possono permettere la moltiplicazione e lo sviluppo di diverse specie di artropodi vettori.

I bovini giocano un ruolo rilevante nell'epidemiologia della BT. Infatti, il bovino, una volta infettato dal vettore, presenta una fase viremica molto lunga, fino a 60 giorni post infezione, costituendo, pertanto, un serbatoio del virus in grado di garantire all'infezione il superamento dei periodi di freddo invernale nelle zone temperate.

L'esistenza del ciclo virale bovino-Culicoides diviene manifesto solitamente quando le pecore entrano nel ciclo epidemico. Negli ovi-caprini la viremia permane per 14-31 giorni sino ad un massimo di 54 giorni. Gli adulti di Culicoides sono attivi nelle ore notturne (dal tramonto all'alba) e si infettano ingerendo il sangue da animali infetti nella fase di viremia e rimangono tali per il resto della loro vita. La trasmissione verticale del virus nell'insetto non è mai stata provata.

I Culicoides per riprodursi necessitano di avere acqua dolce a disposizione. Infatti *C. imicola* depone le uova nel terreno umido o nella fanghiglia. Le zone umide, anche di piccole dimensioni, sono quindi quelle che permettono la riproduzione degli insetti vettori. Gli adulti di Culicoides rimangono nell'ambito di poche centinaia di metri dal luogo dove sono nati. Il vento, comunque può trasportarli passivamente anche per 100 chilometri. Gli adulti del genere Culicoides vivono in genere per 10-20 giorni, ma eccezionalmente, possono sopravvivere per periodi più lunghi (60-90 giorni). Il numero di adulti decresce a partire da temperature minori di +12°C. Nonostante ciò, è stato provato che a temperature di -1.5°C il 15% degli esemplari adulti di *C. imicola* sopravvivono per oltre 15 giorni.

PATOGENESI

In condizioni naturali, il virus, penetra nell'ospite sensibile mediante la puntura dell'insetto vettore, si moltiplica nei linfonodi regionali e diffonde in tutto l'organismo. Dopo la replicazione iniziale nei tessuti linfoidi e negli endoteli, inizia la viremia che raggiunge il picco 7-8 giorni dopo l'infezione. La viremia negli ovini di solito non supera i 30 giorni, in letteratura vengono riportati casi di animali infettati sperimentalmente in cui la viremia ha avuto una durata anche di 54 giorni. Nei bovini la viremia persiste in genere per periodi di 30-40 giorni, anche se può prolungarsi per periodi più lunghi. L'Organizzazione Mondiale della Sanità Animale (OIE), dopo una attenta disamina dei risultati di decine di studi scientifici, ha fissato in 60 giorni il periodo di infettività del bovino. Il bovino, pertanto, è importante per il mantenimento dell'infezione in un territorio, da una stagione epidemica all'altra.

Nel sangue il virus è legato agli eritrociti e ai leucociti, e solo una piccola frazione virale circola libera nel plasma. Con la viremia il virus si diffonde a tutto l'organismo ed è in seguito evidenziabile nella maggior parte degli organi e tessuti. Vengono infettati i tessuti linforeticolari e le cellule endoteliali che vanno incontro a degenerazione e necrosi, con conseguente iperplasia ed ipertrofia rigenerativa dell'endotelio che provoca un'occlusione del vaso, con stasi ed essudazione. Queste lesioni conducono i tessuti circostanti ad ischemia, con edema, emorragie e sviluppo di lesioni secondarie a carico degli epitelii. Le lesioni secondarie sono aggravate da traumi meccanici e abrasioni, e si sviluppano soprattutto in tessuti quali la mucosa orale e la cute. Si verificano anche lesioni a carico delle fibre muscolari striate e sono una conseguenza diretta dell'effetto citopatico del virus.

SINTOMATOLOGIA

Il periodo di incubazione negli ovini è di 5-20 giorni, la malattia può manifestarsi in diverse forme cliniche. Le forme clinicamente apparenti sono più frequenti negli ovini e in alcune specie di cervidi, mentre negli altri ruminanti l'infezione decorre solitamente in forma inapparente; negli ovini la letalità può variare tra il 2% ed il 30%.

Forma iperacuta: gli animali muoiono senza segni clinici o per asfissia conseguente al grave edema polmonare.

Forma acuta: il primo sintomo a comparire è la febbre (fino a 42°C) che persiste per circa 6-8

giorni. In seguito si osserva depressione, inappetenza, rapida perdita di peso, edema delle labbra, della lingua, del retrobocca e della punta del petto. La mucosa orale può essere arrossata, cianotica, talora con petecchie ed erosioni. Anche la lingua può essere tumefatta e cianotica (da questo il nome di "blue tongue"). Le labbra sanguinano facilmente e le lesioni buccali necrotiche causano un alito fetido che talvolta è il primo segno clinico rilevato.

Possono comparire emorragie petecchiali sul musello e sulla mucosa oculare, talora accompagnate da congiuntivite. Si osservano forme respiratorie con scolo nasale e croste attorno alle narici, edema polmonare e polmonite. A livello cutaneo invece possono essere messe in evidenza aree di iperemia che sfociano in dermatite circoscritta, che sono più gravi nei punti esposti direttamente alla luce del sole. E' possibile la perdita del vello. Gli animali manifestano rigidità locomotoria o zoppia in seguito alle lesioni muscolari e podali, le lesioni muscolari possono provocare anche torcicollo. L'esame del piede può

evidenziare una linea o zona rosso-porpora sulla cute in corrispondenza del cerchio coronario, erosioni sul cerchio ed emorragie del tessuto corneo.

Negli agnelli in certi casi prima della morte si osserva diarrea emorragica. Le pecore gravide possono abortire. Nei feti che si sono infettati durante la gravidanza possono essere messe in evidenza malformazioni congenite (idrocefalo interno, cecità, artrogriposi, scoliosi, cifosi e prognatismo).

L'esposizione degli animali infetti alla luce solare accresce la gravità della malattia e la mortalità aumenta drammaticamente quando gli ovini infetti sono esposti a condizioni di freddo umido come spesso accade nel tardo autunno.

I soggetti che sopravvivono alle forme acute (gli altri muoiono in 8-10 giorni) guariscono di solito dopo una lunga convalescenza, talora con alopecia, sterilità e ritardi nell'accrescimento.

Forma cronica: gli animali possono morire per polmoniti batteriche secondarie o per il grave deperimento, oppure in certi casi il decorso può essere molto prolungato.

Forma sub clinica: gli animali malati si riprendono in pochi giorni con completa remissione della sintomatologia.

LESIONI ANATOMO-PATOLOGICHE

Si osservano aree cutanee iperemiche che sfociano in dermatite circoscritta con perdita del vello. La cute è congesta in corrispondenza del cerchio coronario e, spesso, si osservano emorragie del tessuto corneo e laminite.

Nell'apparato digerente e respiratorio sono presenti congestione, edema, emorragie e ulcerazioni delle mucose (bocca, esofago, , prestomaci, intestino, cavità nasali, faringotrachea e polmoni). Si osserva inoltre iperemia ed edema polmonare con molta schiuma in trachea e idrotorace. Nelle forme acute e iperacute, in caso di irruzione dei germi di sortita si possono osservare broncopolmonite bilaterale. Ci può essere idropericardio con presenza di emorragie petecchiali sul pericardio. Talora sono presenti petecchie, ecchimosi e emorragie più gravi nella tunica media dell'arteria polmonare vicino alla sua base (da alcuni sono considerate patognomoniche di BT, ma in realtà sono presenti anche in altre malattie).

Alcune volte sono presenti emorragie subcapsulari della milza, a cui si associa spesso splenomegalia. I linfonodi faringei, cervicali e toracici sono edematosi e ingrossati. Negli animali morti si osserva grave edema, emorragie e degenerazione muscolari.

DIAGNOSI

La diagnosi di laboratorio può essere diretta o indiretta: la prima evidenzia direttamente il virus o l'antigene virale, la seconda gli anticorpi nei confronti del virus della Bluetongue.

DIAGNOSI DIRETTA

Inoculazione di uova embrionale di pollo (OIE 2004)

I tempi richiesti per la prova variano dai 14 ai 35 gg. Si usano sospensioni di globuli rossi lavati oppure campioni di milza o di linfonodi, omogeneizzati. L'inoculazione avviene per via endovenosa a livello della membrana allantoidea in uova embrionate di 11-13 gg di età. Gli embrioni morti tra il 2° ed il 7° giorno vengono raccolti e conservati a 4°C; successivamente, previa asportazione dell'intestino, gli embrioni vengono omogeneizzati. Se presente, il virus si localizza nel surnatante e dopo amplificazione su monostrato cellulare, può essere identificato utilizzando un'ELISA diretta o l'immunofluorescenza. Il virus può anche essere rilevato direttamente dal cervello o dal fegato degli embrioni inoculati usando un'ELISA diretta.

Inoculazione di colture cellulari (OIE 2004)

Si utilizzano cellule VERO (African green monkey kidney), cellule BHK-21 (Baby Hamster Kidney) o cellule di *Aedes albopictus* (AA). La tecnica fornisce risultati migliori se preceduta da inoculazione su uova embrionate di pollo, gli embrioni vengono raccolti e passati su cellule AA. L'effetto citopatico è atteso entro 5-7 gg mantenendo il monostrato cellulare a 37°C in un'atmosfera contenente il 5% di CO₂. Talvolta sono necessari uno o più passaggi "ciechi" prima di osservare la comparsa delle lesioni cellulari. L'identificazione del virus viene effettuata con l'ELISA diretta, o con il test di immunofluorescenza o di immunoperossidasi o con il test di virus neutralizzazione.

Polymerase chain reaction (PCR)

L'introduzione della Polymerase chain reaction (PCR), tecnologia che permette l'amplificazione di sequenze ordinate dell'acido nucleico virale, ha rivoluzionato anche la diagnosi di BT. In breve tempo dall'arrivo dei campioni al laboratorio, è infatti possibile rilevare l'eventuale presenza di acido nucleico virale.

Metodiche immunologiche utilizzate per la tipizzazione:

Sierogruppo

Immunocapture ELISA

sebbene caratterizzato da scarsa sensibilità, è una metodica molto usata poiché rapida e non dà cross-reazioni con virus correlati. Viene applicata ad organi di embrioni di pollo, colture cellulari o insetti infetti. Il virus o le particelle del core vengono legate dagli anticorpi adsorbiti sui pozzetti di piastre per ELISA, l'utilizzo di un secondo tipo di anticorpi ne permette l'identificazione.

Immunofluorescenza diretta

prevede l'impiego di un monoclonale anti-BTV coniugato con fluoresceina, utilizzato secondo procedure standard di immunofluorescenza.

Immunospot test

piccoli volumi (2 µl) del supernatante ottenuto da colture cellulari infettate o lisate o sonicate sono adsorbiti alla nitrocellulosa e lasciate asciugare all'aria.

I siti di legame non specifici vengono bloccati, tramite incubazione, con proteine di latte scremato. Dopo l'incubazione con un anticorpo monoclonale reattivo ad un sierogruppo della BT, l'anticorpo legato viene rivelato per mezzo di una IgG, antiglobulina di topo coniugata alla perossidasi di cavallo.

Perossidasi-AntiPerossidasi (PAP), indiretta e diretta:

tale test è attualmente poco utilizzato, poiché è stato sostituito da un test di immunoperossidasi utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la VP7 ed un coniugato anti-topo. Questo tipo di analisi ha diversi vantaggi rispetto all'immunofluorescenza poiché può essere realizzato in micropiastre, non richiede un microscopio a raggi UV ed i risultati, rilevabili in piastre colorate, possono essere conservati nel tempo.

Sierotipo

Virus neutralizzazione

Sfrutta la capacità del virus di neutralizzare antisieri sierotipo specifici ottenuti da animali di laboratorio (porcellini d'india o conigli). Si preferisce usare sieri di queste specie in quanto presentano minore cross-reattività sierotipica di quelli ottenuti da ovini o bovini (O.I.E. 2004).

Inibizione dell'emoagglutinazione

Pur conoscendo le proprietà emoagglutinanti del virus, l'inibizione dell'emoagglutinazione non viene impiegata data la necessità di avere un antigene altamente purificato per ciascun sierotipo, con notevoli problemi di stabilità.

DIAGNOSI INDIRETTA

Fissazione del complemento

Ha scarso impiego in quanto è caratterizzata da bassa sensibilità e specificità, quest'ultima dovuta a possibili reazioni crociate con virus antigenicamente correlati.

Immunodiffusione in gel di Agar (AGID). (OIE 2004):

Dal 1982 e per lungo tempo, è stato il test riconosciuto a livello internazionale per la movimentazione degli animali. Ha sensibilità e specificità minore di altre prove, fra le quali l'ELISA. A seguito delle problematiche correlate alla lettura, come l'evidenza di reazioni crociate e la lettura che può essere soggettiva, nell'interpretazione dei risultati da parte degli operatori, l'AGID è stato progressivamente sostituito da un test più specifico, quale l'ELISA competitiva.

ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) competitiva

E' un test caratterizzato da elevata sensibilità e specificità. La specificità è dovuta all'impiego di diversi tipi di anticorpi monoclonali sierogruppo-specifici. Il test, raccomandato dall'OIE, permette di evidenziare gli anticorpi di tutti e 24 i sierotipi, ed inoltre, data l'elevata specificità, non si hanno reazioni verso antigeni correlati o proteine cellulari. La lettura, infine, è effettuata tramite spettrofotometro con risultati oggettivi che possono essere ottenuti in 4 ore.

Sieroneutralizzazione

E' una prova molto sensibile ed altamente specifica, in grado di rilevare gli anticorpi neutralizzanti nel siero di animali venuti a contatto con il BTV. Questi, legandosi alla proteina VP2 caratteristica per ogni sierotipo, conferiscono alla sieroneutralizzazione la facoltà di identificare il sierotipo virale. Il test si basa sulla capacità degli antisieri tipo-specifici di neutralizzare l'effetto citopatico del BTV.

PROFILASSI

PROFILASSI DIRETTA

Metodi di lotta nei confronti del vettore

Repellenti

L'applicazione di piretroidi sugli animali, come repellenti nei confronti dei Culicoides, non garantisce la protezione degli stesi. È stato dimostrato, ad esempio, che varie molecole di piretroidi, come permetrina e deltametrina, causano una diminuzione dei Culicoides sugli animali, ma solo per un breve lasso di tempo, variabile da poche ore a 10 giorni, a seconda della molecola, della specie di Culicoides coinvolta e della zona di applicazione del repellente. Un animale trattato con piretroidi può diventare "tossico" per i Culicoides e può quindi contribuire al declino della popolazione locale dei vettori, ma non è necessariamente protetto contro l'esposizione dell'infezione.

Trattamenti ambientali

A tale proposito i dati sperimentali disponibili in bibliografia, sono scarsi e poco incoraggianti.

In Sardegna nel 2000 e nel 2003 sono state monitorate alcune aziende prima e dopo il trattamento di disinfestazione con piretroidi: in tutti i casi si è registrata una diminuzione della concentrazione della popolazione di adulti di Culicoides, ma solo temporanea, per circa una settimana.

Trattamenti antilarvali

Il problema principale che si pone, nella lotta biologica ai Culicoides, è l'individuazione dei siti di riproduzione degli stessi che, per molte specie, non sono noti. È in ogni caso da tenere in considerazione che, per specie come *C. imicola*, che si riproducono in habitat fangosi e ricchi di materiale organico, è comunque utile rimuovere pozze e letame dalle aziende e dai territori circostanti.

La lotta biologica che viene utilizzata contro le zanzare, attraverso, per esempio, l'uso di pesci

(*Gambusia*) o del *Bacillus thuringiensis*, non risulta efficace contro le larve di Culicoides.

Stabulazione

In aree in cui il vettore è *C. imicola*, la protezione degli animali durante le ore di attività dell'insetto (da un'ora prima del tramonto fino all'alba) è sicuramente un efficace mezzo di profilassi. Infatti, nell'85% delle stalle dove sono adottati accorgimenti per evitare l'introduzione di vettori, si è notata una riduzione, fino a 14 volte, del numero di *C. imicola* presenti. Per le specie dell'*Obsoletus*

complex, invece, non si hanno dati a disposizione per valutare questa misura di profilassi.

Misure di profilassi in Paesi indenni

Come stabilito dall'articolo 2.2.13.2 del Codice Zoosanitario dell'Organizzazione Mondiale

per la Sanità Animale (OIE), un Paese è considerato indenne da Bluetongue quando:

- i programmi di sorveglianza messi in atto dimostrino l'assenza di circolazione virale negli ultimi 2 anni; oppure

- i programmi di sorveglianza messi in atto dimostrino l'assenza di Culicoides considerati competenti per la trasmissione dell'infezione; oppure

- il Paese si trovi per la totalità del suo territorio al di sopra del 53°N o al di sotto del 34°S, e non sia adiacente ad un Paese non indenne.

Quarantena

In caso di movimentazione, gli animali provenienti da territori dove è presente l'infezione devono essere sottoposti, nei territori di partenza, ad un periodo di quarantena (articolo 2.2.13.8 del Codice

Zoosanitario dell'OIE). Tale periodo deve essere almeno pari a 60 giorni. Le strutture di quarantena devono impedire qualsiasi possibile contatto con il vettore, quindi devono essere dotate di zanzariere con maglie di diametro non superiore ad 1 mm e di dispositivi atti ad impedire l'ingresso di insetti, ed in particolare dei Culicoides. Tali strutture, al fine di monitorare continuamente il livello di isolamento raggiunto, devono predisporre un piano di controlli periodici tesi ad evidenziare l'eventuale presenza del vettore.

Sorveglianza sierologica, clinica ed entomologica

La sorveglianza da attuare deve essere effettuata in accordo con le conoscenze epidemiologiche della malattia, le conoscenze relative alla biologia del vettore e tenendo in considerazione i fattori ambientali (geografici e climatici) di un determinato territorio. La definizione di un sistema di sorveglianza è fondamentale nelle aree a rischio di introduzione della malattia e può rappresentare un valido strumento di prevenzione, attraverso il controllo delle aree confinanti con i territori dove la malattia è presente; in un Paese indenne, il sistema di sorveglianza deve comprendere almeno una fascia di territorio di 100 km dai confini del paese o della zona infetta (Codice zoosanitario dell'OIE, articolo 2.2.13.1)

Stamping out

Lo stamping out (ovvero l'abbattimento coatto di tutti gli animali malati, infetti, sospetti d'infezione e sospetti di contaminazione) è una misura efficace per malattie che si trasmettono per contagio. Diventa meno efficace in caso di malattie che si trasmettono da insetti o da altri vettori. L'abbattimento degli animali infetti è giustificabile esclusivamente per motivi di benessere animale, e cioè per risparmiare inutili sofferenze agli animali malati.

Misure di profilassi in Paesi infetti

Come stabilito dal articolo 2.2.13 del Codice Zoosanitario dell'OIE, un Paese è considerato

infetto quando negli ultimi due anni sia stata evidenziata la presenza del virus della Bluetongue.

La normativa comunitaria prevede la delimitazione delle aree di restrizione tenendo conto dei fattori di ordine geografico, amministrativo, ecologico ed epidemiologico connessi con la Bluetongue (Direttiva CE 2000/75 del 20 novembre 2000).

Inoltre, nell'ambito dell'area soggetta a restrizione distingue:

a) la Zona di Protezione (ZP), costituita da una parte del territorio comunitario avente un raggio minimo di 100 km intorno all'azienda infetta;

b) la Zona di Sorveglianza (ZS), costituita da una parte del territorio comunitario profonda almeno 50 km oltre i limiti della ZP.

Controllo delle movimentazioni (animali vivi, seme o embrioni)

Dai Paesi infetti è possibile movimentare animali vivi, seme o embrioni secondo quanto prescritto dal articolo 2.2.13.7. del Codice Zoosanitario dell' OIE . I Paesi devono cioè avere in atto un sistema di sorveglianza in grado di individuare precocemente l'insorgenza dell'infezione, devono controllare gli animali, sia quelli da movimentare sia quelli donatori di seme o embrioni, prima degli spostamenti e devono effettuare una efficace profilassi vaccinale.

Sorveglianza sierologica, clinica ed entomologica

La sorveglianza da attuare deve essere effettuata in accordo con le conoscenze epidemiologiche della malattia, le conoscenze relative alla biologia del vettore e tenendo in considerazione i fattori ambientali (geografici e climatici) di un determinato territorio. Nei Paesi infetti, il principale scopo della sorveglianza sierologica e clinica è legato all'individuazione di nuovi sierotipi o al controllo della diffusione dei sierotipi già presenti sul territorio. La sorveglianza entomologica ha lo scopo di determinare la presenza/assenza del vettore, la distribuzione geografica dei vettori competenti e la dinamica stagionale dei vettori stessi.

PROFILASSI INDIRETTA

La protezione anticorpale nei confronti del virus della Bluetongue è tipo-specifica, quindi la

conoscenza dei sierotipi circolanti sul territorio assume fondamentale importanza, in quanto l'infezione da parte di un sierotipo non protegge da ulteriori infezioni da parte di sierotipi virali differenti. Tra alcuni sierotipi, in ogni caso, vi può essere reazione antigenica crociata, come ad esempio tra il sierotipo 4 e i sierotipi 17 e 20. Tali considerazioni sono di primaria importanza quando si decide di ricorrere alla vaccinazione in un determinato territorio.

Il vaccino vivo attenuato è l'unico vaccino attualmente disponibile in commercio per tutti i sierotipi virali, di facile produzione e relativamente economico. Fu prodotto per la prima volta nel 1947 in Sud Africa attraverso passaggi seriali su uova embrionate.

Negli ultimi anni sono stati compiuti numerosi sforzi per sviluppare un vaccino inattivato nei confronti del BTV con la messa a punto di un vaccino monovalente nei confronti del sierotipo 2 e 4 ed un vaccino bivalente nei confronti dei sierotipi 2 e 4. Con il limite che per indurre una risposta anticorpale in grado di proteggere l'animale da un'eventuale infezione è necessario utilizzare dosi maggiori di vaccino con il virus selvaggio.

Continuano gli studi per la produzione di vaccini ricombinanti che preserverebbero da tutti gli effetti indesiderati dei vaccini vivi attenuati. I prodotti fino ad ora testati non danno i risultati sperati.