

# CIRCOLAZIONE AUTONOMA DI VIRUS BLUETONGUE SIEROTIPO 2 DI ORIGINE VACCINALE NELLA PROVINCIA DI FORLÌ-CESENA

GIOVANNI VECCHI<sup>a</sup>, RODINGO USBERTI<sup>b</sup>, MARCO TAMBA<sup>a</sup>,  
MICHELE DOTTORI<sup>a</sup>, PAOLO BONILAURI<sup>a</sup>, PAOLA MASSI<sup>a</sup>, PAOLO CORDIOLI<sup>a</sup>,  
CONCITA FALLACARA<sup>a</sup>, AGOSTINO BOVO<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia-Romagna, Brescia

<sup>b</sup> Azienda USL di Forlì - Servizio Veterinario

<sup>c</sup> Azienda USL di Cesena - Servizio Veterinario

## Riassunto

La Bluetongue (BT) è presente in Italia dal 2000. Attualmente sono presenti in Italia quattro diversi sierotipi: 2, 4, 9, 16. Dal 2001 la BT è oggetto di un piano di controllo basato sulla vaccinazione obbligatoria con vaccino vivo attenuato di: bovini, ovini e caprini nelle aree in cui circola il virus di campo. In tutto il territorio nazionale è inoltre attivo un piano di sorveglianza entomologica e sierologica per definire le aree libere da infezione e quelle nelle quali le movimentazioni animali sono limitate. Gli animali vaccinati sono comunque liberi di muoversi trascorsi 30 giorni dalla vaccinazione.

Nella primavera del 2004 sono stati individuati 15 allevamenti con 42 bovini sieropositivi per il sierotipo 2 della BT (BTV-2) in un'area dell'Appennino forlivese, posta a oltre 100 km dalla zona di vaccinazione. Attraverso la sorveglianza entomologica e sierologica integrativa nella stessa area è stato possibile dimostrare la circolazione virale di un BTV-2 di origine vaccinale (BTVV-2) durante l'estate del 2004: il BTVV-2 è stato isolato da bovini e individuato tramite PCR nel vettore *C. obsoletus*.

Un monitoraggio svolto nell'inverno 2004-05 nell'area interessata ha mostrato che nei comuni inizialmente coinvolti (Bagno di Romagna, Mercato Saraceno, Sarsina, Sogliano A/R e Verghereto) durante l'estate 2004 la prevalenza di infezione negli allevamenti è passata dal 15% al 70% e nei capi dal 2% al 21%.

Si ritiene che nell'Appennino forlivese si sia creata una zona di endemia da BTVV-2 e che alla luce di questa scoperta debbano essere rivisti gli obiettivi del piano di controllo e progettato un programma di sorveglianza della BT che tenga conto del fatto che il ceppo vaccinale può diffondersi autonomamente.

## Summary

*Blue Tongue Virus (BTV) is present in Italy since 2000; disease outbreaks were reported only on the islands, Sardinia and Sicily and in some Southern Provinces of the Country. Actually four different serotypes of BTV are circulating in Italy: BTV2, BTV4, BTV9, and BTV16. Since 2001 an eradication plan based on compulsory vaccination with live vaccines of cattle, sheep and goats has been implemented in all the provinces involved in BTV circulation. A serological and entomological surveillance programme is being run to distinguish free areas from those infected in which ruminant movements are restricted. Nevertheless after 30 days from vaccination the animals are free to move inside the Country.*

*In spring 2004 for the first time 15 BTV2 seropositive cattle herds (42 positive samples) were detected in the mountain area (Appennino) of the Forlì-Cesena province. This area is more than 100 km far from the nearest vaccination zone. Serological and entomological surveillance activities carried out during summer 2004 proved circulation of a BTV2 vaccine strain (BTVV-2): the virus was both isolated from seropositive cattle and detected by PCR in vector *Culicoides obsoletus*.*

*A serological survey carried out during winter 2004-05 in the same area (Municipalities of Bagno di Romagna, Mercato Saraceno, Sarsina, Sogliano A/R, and Verghereto) showed increased prevalence in cattle from 15% to 70% at herd level, and from 2% to 21% at individual level. BTVV-2 strain circulation was confirmed also during summer 2005.*

*Probably because of vaccinated cattle movements BTVV-2 strain is actually endemic in the mountain area of Forlì-Cesena Province. Therefore control plan targets must be revised and it is necessary to plan a new surveillance programme in which BTVV-2 active circulation is considered.*

## INTRODUZIONE

La Bluetongue (BT) è una malattia infettiva, non contagiosa, dei ruminanti trasmessa da insetti vettori del genere *Culicoides*. Nel bacino del Mediterraneo la BT si è manifestata tra il 1940 e il 1979 con episodiche epidemie risoltesi spontaneamente. A partire dal 1998 invece, la situazione appare mutata, la BT comparsa in diversi Paesi dell'area del Mediterraneo con ondate epidemiche, legate ai periodi di attività dei vettori, che si sono ripetute anno dopo anno<sup>2</sup>. Dal 2000 questa malattia è stata segnalata in Italia; attualmente sul territorio italiano circolano quattro diversi sierotipi del virus BT (BTV): BTV-2, BTV-4, BTV-9, BTV-16<sup>6</sup>.

Dal 2001 la BT è oggetto di un piano di controllo basato sulla vaccinazione obbligatoria, con vaccino vivo attenuato, di: bovini, ovini e caprini nelle aree infette e a rischio. In tutto il territorio nazionale è inoltre attivo un piano di sorveglianza entomologico e sierologico per definire le aree libere da infezione e quelle nelle quali le movimentazioni animali sono limitate<sup>4</sup>. Gli animali vaccinati con vaccino vivo attenuato sono comunque liberi di muoversi trascorsi 30 giorni dalla vaccinazione.

L'impiego del vaccino vivo attenuato nella lotta alla BT è risultato fondamentale per il controllo della malattia clinica negli ovi-caprini<sup>5</sup>, ma perplessità sul suo impiego in campagne vaccinali di massa sono sorte in seguito al sospetto, suffragato da prove sperimentali, della presenza di una residua patogenicità dei ceppi vaccinali utilizzati<sup>14</sup>, nonché dell'induzione sia nei bovini<sup>9</sup>, sia negli ovini vaccinati<sup>12, 14</sup> di una viremia transitoria con titoli considerati infettanti per gli insetti vettori.

Evidenza di una limitata circolazione virale da virus vaccinale del sierotipo 2 (BTVV-2) nelle aziende vaccinate e nelle aree adiacenti alle zone di vaccinazione è già stata segnalata nelle Regioni Lazio e Toscana<sup>3</sup>; nel presente lavoro viene descritta un'estesa epidemia dovuta all'attiva circolazione di BTVV-2 in un'area distante oltre 100 km dalle zone di vaccinazione.

## MATERIALI E METODI

### Area di studio

L'Area interessata dal fenomeno indagato comprende il territorio di 12 Comuni della Provincia di Forlì-Cesena, per un'estensione complessiva di circa 1.280 kmq, al confine con le Regioni Marche e Toscana. Il territorio è collinare-montuoso con altezze variabili dai 150 ai 1400 metri s.l.m. e comprende l'alta e media valle dei fiumi Rabbi, Bidente e Savio. L'area è posta ad oltre 100 km in linea d'aria dalle zone in cui nel 2003/04 è stata effettuata la vaccinazione con vaccino vivo attenuato con BTVV-2 (Fig. 1).

Nella zona sono presenti oltre 450 allevamenti bovini per un totale complessivo di circa 14.450 capi, per lo più di razze da carne (Romagnola, Pezzata Rossa, Limousine e loro incroci; Fonte: BDN). I sistemi di allevamento prevedono l'impiego del pascolo nel periodo aprile-ottobre (Foto 1); solo una piccola parte degli animali sono stabulati tutto l'anno. Significativa è anche la presenza di allevamenti ovini, per lo più di razza sarda e appenninica: oltre 300 allevamenti per un totale complessivo di circa 11.000 capi.

## Attività di sorveglianza sierologica ed entomologica

### Periodo febbraio-luglio 2004

Durante questo periodo le attività di sorveglianza della BT si sono svolte come previsto dal piano nazionale di sorveglianza<sup>4</sup>. Nell'area erano presenti 237 sentinelle dislocate in 18 allevamenti che venivano controllate ogni 2 mesi nel periodo gennaio-aprile e con cadenza mensile nel periodo maggio-dicembre.

Alla rilevazione della prima sieropositività, avvenuta su un prelievo del 27/02/2004, si è applicato quanto previsto dal piano di sorveglianza. Non trattandosi di sieroconversione di bovino sentinella, in quanto l'azienda era stata sottoposta per la prima volta a controllo, si è proceduto a:

- controllo sierologico e virologico di tutti i bovini di età superiore a 30 giorni presenti nell'azienda sieropositiva;
- esecuzione dell'indagine epidemiologica;
- installazione nell'azienda sieropositiva di una trappola mobile per la cattura dei *Culicoides*;
- individuazione di una zona a rischio del raggio di 4 km (Zona A) intorno all'azienda sieropositiva nella quale effettuare:

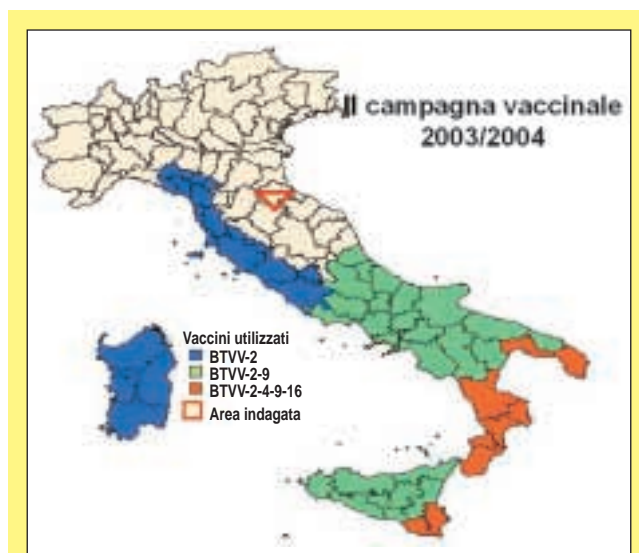


FIGURA 1 - Localizzazione dell'Area di studio rispetto alle Zone di vaccinazione per la BT nel 2003/04.



FOTO 1 - Pascoli nel Comune di Verghereto (FC).

- 3 visite cliniche, a cadenza settimanale, in tutti gli allevamenti ovi-caprini;
- controllo sierologico a campione, da effettuare entro 30 giorni, in tutte le aziende bovine.

Tutti i campioni di siero con positività in ELISA sono stati inviati al Centro Nazionale di Referenza per le Malattie Esotiche (CESME) di Teramo per la conferma e l'identificazione del sierotipo BTV coinvolto. Tutti i campioni di sangue per gli esami virologici sono stati inviati direttamente al CESME per le prove di laboratorio. Tutte le catture entomologiche sono state inviate al CESME per l'identificazione degli insetti catturati e le eventuali prove virologiche.

### Periodo agosto-novembre 2004

In conseguenza delle sieropositività rilevate nel periodo febbraio-luglio 2004 è stato predisposto, in accordo con il CESME, un piano di sorveglianza integrativo. È stata quindi definita una "Zona Sentinella", comprendente il territorio di 10 Comuni, nella quale effettuare:

- visite cliniche periodiche (ogni 3 settimane) in tutte le aziende ovi-caprine (sorveglianza clinica);
- sorveglianza sierologica da effettuare mediante l'arruolamento di aziende sentinella, in aggiunta a quelle già esistenti. Complessivamente nell'area erano quindi soggette a controllo 36 aziende, per un totale di 415 bovini sentinella. Per velocizzare le operazioni di controllo virologico sugli eventuali capi positivi, contemporaneamente al prelievo di campioni di siero, veniva prelevato un campione di sangue con EDTA per le prove virologiche. In caso di sieropositività, infatti, dovevano essere sottoposti ad esame virologico (PCR) tutti gli animali controllati sierologicamente. Tutti i campioni di siero con positività in ELISA sono stati inviati al CESME per la conferma e l'identificazione del sierotipo BTV coinvolto. Tutti i campioni di sangue positivi in PCR sono stati inviati al CESME per la conferma;
- intensificazione dell'attività di sorveglianza entomologica, con l'attivazione di altre 13 trappole fisse in aggiunta alle tre già operanti nell'area. Le catture dei *Culicoides* sono state effettuate con cadenza quindicinale. Tutte le catture entomologiche sono state inviate al CESME per l'identificazione degli insetti catturati e le eventuali prove virologiche.

### Periodo dicembre 2004-maggio 2005

In seguito alle positività rilevate nel periodo settembre-novembre 2004 i Servizi Veterinari delle Aziende USL coinvolte hanno predisposto autonomamente un piano di monitoraggio. La A.USL Forlì ha previsto il controllo di tutti i bovini di età superiore a 6 mesi nei comuni di Santa Sofia, Galeata, Civitella, Meldola, Predappio e Premilcuore; mentre la A.USL Cesena ha attuato un controllo dei bovini di età superiore a 12 mesi nei comuni di Bagno di Romagna, Borghi, Mercato Saraceno, Sarsina, Sogliano al Rubicone e Verghereto. Tutti i campioni di siero con positività in ELISA sono stati inviati al CESME per la conferma e l'identificazione del sierotipo BTV coinvolto.

Per velocizzare le operazioni di controllo virologico sugli eventuali capi positivi, entrambe le A.USL hanno predisposto che contemporaneamente al prelievo di cam-

pioni di siero, fosse prelevato anche un campione di sangue con EDTA per le prove virologiche. In caso di sieropositività, infatti, dovevano essere sottoposti ad esame virologico (PCR) tutti gli animali controllati. Tutti i campioni di sangue positivi in PCR sono stati inviati al CESME per la conferma.

### Test di laboratorio

I test sierologici sono stati effettuati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia-Romagna (IZSLER) usando un Kit ELISA del commercio (VMRD<sup>®</sup>; Se 99,1%, Sp 100%) o un'ELISA competitiva prodotta dal CESME (Se 100%, Sp 99,1%)<sup>8</sup>. Tutti i campioni positivi sono stati inviati al CESME stesso per la conferma e la determinazione del sierotipo implicato, effettuata mediante Siero-Neutralizzazione (SN), secondo la procedura prevista dall'OIE (2004).

Gli esami virologici nel periodo febbraio-giugno sono stati svolti presso il CESME, in particolare è stata effettuata una PCR secondo la metodica descritta da Katz<sup>7</sup> sia su campioni di sangue prelevati con EDTA, sia su catture di insetti conservati in alcool 70°. A partire dal mese di agosto 2004, anche IZSLER ha iniziato ad eseguire la medesima prova sui campioni di sangue secondo la stessa metodica. Inoltre per differenziare il ceppo vaccinale BTVV-2 da quello di campo (BTV-2) sui campioni positivi è stata effettuata la sequenza del frammento NS1 amplificato e un'analisi di restrizione per la verifica della presenza (BTV-2) o dell'assenza (BTVV-2) di uno specifico sito di restrizione per l'enzima HpaII, come descritto da Aguero et al.<sup>1</sup>. Tutti i campioni positivi in PCR sono quindi stati inviati al CESME per la conferma.

## RISULTATI

### Sorveglianza clinica, sierologica e virologica

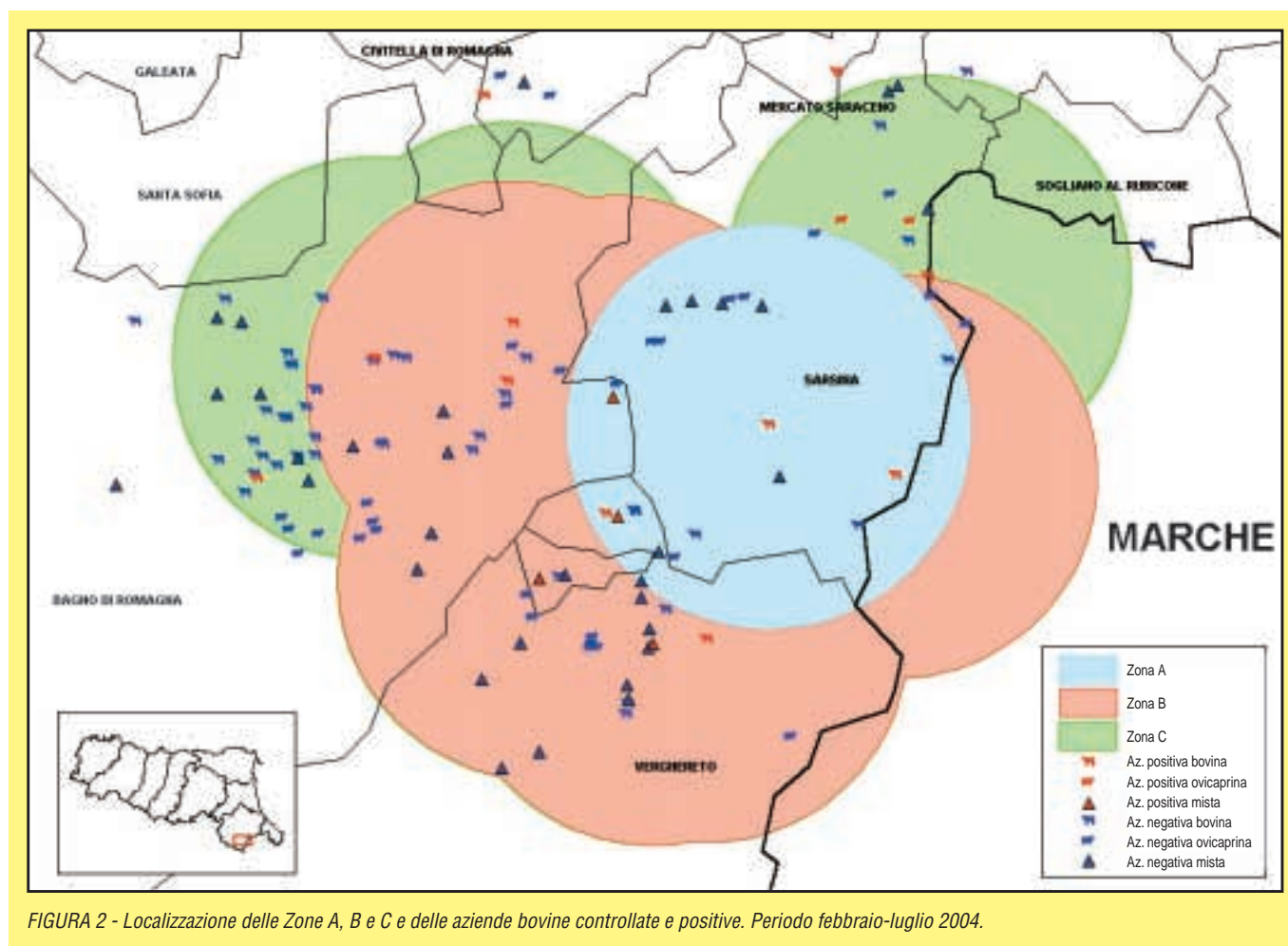
#### Periodo febbraio-luglio 2004

In questo periodo sono state svolte le attività previste dal piano nazionale di sorveglianza in seguito al riscontro di una sieropositività in bovini sentinella in un'azienda esaminata per la prima volta. In particolare intorno all'azienda con sieropositività è stata definita una zona a rischio del raggio di 4 km (Zona A) nella quale sono state svolte attività di sorveglianza clinica, sierologica e virologica.

Dal momento che la sorveglianza sierologica effettuata nella Zona A ha permesso l'individuazione di altre 8 aziende con sieropositività confermata, la procedura è stata ripetuta. La zona è stata quindi ampliata una prima volta, creando intorno a ciascuna azienda sieropositiva un'ulteriore area del raggio di 4 km (Zona B), e poi, alla rilevazione di ulteriori 3 aziende sieropositive nella zona B, una seconda volta (Zona C; Fig. 2).

Nelle Zone A, B e C erano presenti complessivamente 93 allevamenti bovini e 76 allevamenti ovi-caprini. Le visite cliniche svolte negli allevamenti ovi-caprini hanno sempre avuto esito favorevole. Nelle indagini sierologiche a campione sono stati esaminati complessivamente 2.605





**Tabella 1**  
Riepilogo attività di sorveglianza sierologica svolta nel periodo febbraio-luglio 2004

Zona	Specie	Allevam. esaminati	Allevam. positivi	Numero controlli	Capi esaminati	Capi positivi	% capi pos. per specie	% capi pos. per zona
A	Bovino	30	9	52	463	32	7,1%	3,7%
	Ovi-Caprino	34	0	34	426	0	0,0%	
B	Bovino	29	3	32	529	4	0,8%	0,5%
	Ovi-Caprino	20	0	20	336	0	0,0%	
C	Bovino	34	3	39	531	6	1,1%	0,9%
	Ovi-Caprino	22	2	22	320	2	0,6%	
Totale	Bovino	93	15	123	1.523	42	2,8%	1,7%
	Ovi-Caprino	76	2	76	1.082	2	0,2%	
	Totale gen.	169	17	199	2.605	44	1,7%	

animali (1.523 bovini e 1.082 ovi-caprini), 44 dei quali (1,7%) risultati positivi in ELISA. Tutti i capi positivi (42 bovini e 2 ovis), appartenenti a 17 diverse aziende, sono stati confermati e la sieropositività è stata attribuita a pregresso contatto con BTV-2. Tutti gli esami virologici svolti sui capi sieropositivi hanno dato esito negativo.

In Tabella 1 è stata riassunta l'attività di sorveglianza sierologica effettuata; da questa si evince che solamente nella Zona A è stata superata la soglia di rilevazione del 5% prevista dal piano di sorveglianza<sup>4</sup>.

### Periodo agosto-novembre 2004

In Tabella 2 sono riassunte, suddivise per Comune, le attività svolte su bovini sentinella nell'area soggetta a sorveglianza integrativa. Nel periodo agosto-novembre 2004 sono stati svolti complessivamente 136 controlli nelle 36 aziende sentinella individuate. Sieroconversioni in bovini sentinella sono state rilevate in due diverse aziende. La prima nel Comune di Verghereto (Zona A; prelievo di 5 animali, di cui uno positivo, effettuato in data

**Tabella 2**  
**Riepilogo attività di sorveglianza sierologica sui bovini sentinella svolta nel periodo agosto-novembre 2004**

Comune	Aziende sentinella controllate	Aziende sentinella con sieroconversione	Totale controlli	Totale campioni esaminati	Totale campioni positivi
Bagno di Romagna	5	0	21	161	0
Borghi	1	0	5	48	0
Civitella di Romagna	5	0	24	160	0
Galeata	2	0	8	70	0
Meldola	2	0	8	69	0
Mercato Saraceno	4	0	22	126	0
Predappio	5	0	8	184	0
Premilcuore	1	0	1	44	0
Santa Sofia	3	0	9	75	1*
Sarsina	3	1	13	93	1
Sogliano al Rubicone	4	0	14	126	0
Verghereto	1	1	3	15	1
<b>Totale</b>	<b>36</b>	<b>2</b>	<b>136</b>	<b>1.171</b>	<b>2</b>

\* = trattavasi di primo controllo positivo.

**Tabella 3**  
**Riepilogo attività di sorveglianza sierologica e virologica sugli allevamenti bovini posti nel raggio di 4 km dall'azienda di Verghereto con sieroconversione in bovino sentinella**

Periodo controlli	All. esistenti	Allev.Pos. +/esam.	% All. pos.	Capi ELISA +/esam.	% Capi ELISA+	Capi PCR +/esam.	% Capi PCR+
Mar.-Mag.04	27	6/27	22,2%	24/436	5,5%	0/111	0,0%
Set.-Nov.04	28	24/28	85,7%	222/545	40,7%	179/493	36,3%

07/09/2004) e la seconda nel Comune di Sarsina (Zona B; prelievo di 5 animali, di cui uno positivo, effettuato in data 12/10/2004).

In particolare attorno alla prima azienda con sieroconversione sono stati effettuati controlli sierologici e virologici in tutti gli allevamenti bovini situati nel raggio di 4 km, i cui risultati, confrontati con i controlli effettuati nel periodo febbraio-luglio sono riassunti in Tabella 3. Tutte le sieropositività rilevate sono state confermate dal CESME e attribuite al BTV-2. Nell'area considerata la percentuale di bovini sieropositivi durante l'estate è passata dal 5,5% al 40,7%. Al contrario di quanto rilevato in primavera, sono state riscontrate anche diverse positività alle prove virologiche. In tutti gli allevamenti con capi sieropositivi al sierotipo 2 sono stati rilevati capi positivi alla PCR. La sequenziazione degli amplificati effettuati da IZSLER e le PCR discriminanti eseguite dal CESME hanno inoltre permesso di determinare che in tutti questi allevamenti la sieroconversione era dovuta al ceppo vaccinale BTVV-2.

I controlli effettuati nell'altra azienda con sieroconversione, hanno rilevato che un bovino aveva sierconvertito contemporaneamente sia verso BTV-2, che verso BTV-9.

L'animale era comunque positivo in PCR per BTVV-2, indicando così che anche questa sieroconversione era da attribuire a virus vaccinali.

Le indagini cliniche effettuate negli allevamenti ovi-caprini dell'area hanno invece sempre dato esito favorevole.

### **Periodo dicembre 2004-maggio 2005**

I dati risultanti dai controlli sierologici svolti dalle Aziende USL di Forlì e Cesena nel periodo dicembre 2004-maggio 2005 sono stati uniti a quelli svolti nel periodo precedente per avere un quadro di insieme (Tab. 4). Allevamenti positivi per BTV sono stati rilevati in 13 diversi comuni della Provincia. La percentuale di allevamenti con positività è risultata mediamente intorno al 50%, ma nei Comuni riscontrati positivi in primavera la percentuale di infezione è risultata superiore anche al 70% (Fig. 3).

In Figura 4 sono state messe a confronto le percentuali rilevate prima e dopo l'estate 2004 nei 5 Comuni coinvolti nelle Zone A, B e C; in tutti è stato registrato un aumento della prevalenza nei bovini sia a livello di allevamenti, sia di capi. Ad eccezione di un'azienda con positi-

**Tabella 4**  
**Riepilogo attività di sorveglianza sierologica sugli allevamenti bovini posti nei comuni coinvolti nel programma di monitoraggio in Provincia di Forlì-Cesena. Periodo settembre 2004-maggio 2005**

Comune	Allevamenti esaminati	Allevamenti positivi	% allev. positivi	capi esaminati	capi positivi	% capi positivi
Bagno di Romagna	61	45	73,77%	898	158	17,59%
Borghi	2	1	50,00%	57	1	1,75%
Cesena	11	2	18,18%	122	2	1,64%
Civitella di Romagna	57	23	40,35%	1.675	117	6,99%
Galeata	21	6	28,57%	550	22	4,00%
Meldola	30	8	26,67%	868	13	1,50%
Mercato Saraceno	8	4	50,00%	104	15	14,42%
Predappio	19	3	15,79%	590	3	0,51%
Premilcuore	18	4	22,22%	727	6	0,83%
Santa Sofia	28	16	57,14%	759	85	11,20%
Sarsina	14	7	50,00%	229	61	26,64%
Sogliano al Rubicone	19	9	47,37%	354	38	10,73%
Verghereto	35	31	88,57%	659	196	29,74%
<b>Totale</b>	<b>323</b>	<b>159</b>	<b>49,23%</b>	<b>7.592</b>	<b>717</b>	<b>9,44%</b>

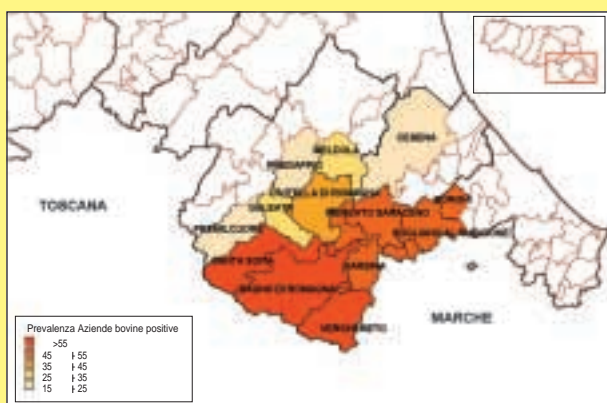


FIGURA 3 - Prevalenze per BTVV-2 riscontrate nei Comuni dell'Appennino forlivese. Maggio 2005.

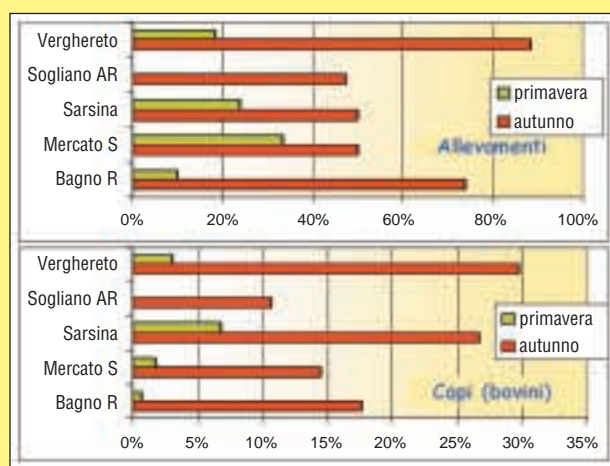


FIGURA 4 - Confronto tra la prevalenze per BTVV-2 rilevate nei comuni coinvolti nelle aree A, B e C.

vità per BTV-9 e BTV-2 e di una con capi vaccinati provenienti dalla Basilicata positivi per il sierotipo 16, nelle restanti aziende tutte le sieropositività sono state attribuite a BTV-2.

A differenza di quanto riscontrato in primavera, però, a partire da settembre 2004 e fino ad aprile 2005 i capi sieropositivi sono risultati positivi anche in PCR. In 83 delle 159 (52,2%) aziende con almeno un capo sieropositivo è stata eseguita la PCR, che è risultata positiva in 56 diversi allevamenti (67,5%). Per tutti gli allevamenti con un capo positivo in PCR il sequenziamento dell'amplificato e/o la PCR discriminante hanno dato esito positivo per il ceppo vaccinale BTVV-2. La percentuale di capi positivi sia all'ELISA che alla PCR è andata progressivamente decrescendo fino ad azzerarsi nel mese di maggio 2005 (Fig. 5).

Le indagini epidemiologiche svolte nelle aziende positive hanno rilevato che il 95,1% degli animali positivi era stato al pascolo, mentre solo l'8% era stato introdotto negli ultimi 3 mesi in allevamento.

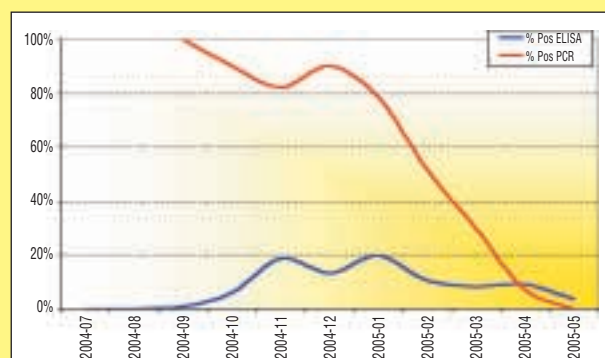


FIGURA 5 - Andamento delle percentuali di bovini sieropositivi e dei capi sieropositivi risultati positivi anche in PCR.

**Tabella 5**  
Riepilogo attività di sorveglianza entomologica nel periodo febbraio-luglio 2004

Comune	Numero trappole	n catture effettuate	n catture con Culicoides	Media Culicoides sp.	n catture con C. imicola	PCR su catture (pos/esam.)
Bagno di Romagna	1	5	5	2114,8	0	0/5
Sarsina	2	20	20	137,9	0	1/11
Verghereto	1	12	12	180,3	0	0/9
<b>Totale</b>	<b>4</b>	<b>37</b>	<b>37</b>	<b>418,8</b>	<b>0</b>	<b>1/25</b>

**Tabella 6**  
Riepilogo attività di sorveglianza entomologica nel periodo agosto-dicembre 2004

Comune	Numero trappole	n catture effettuate	n catture con Culicoides	Media Culicoides sp.	n catture con C. imicola	PCR su catture (pos/esam.)
Bagno di Romagna	1	15	15	222,5	0	4/11
Civitella di Rom.	3	30	30	331,7	0	4/22
Mercato Saraceno	2	12	12	629,3	0	0/12
Predappio	1	11	11	552,7	0	0/8
Santa Sofia	1	9	9	35,9	0	0/7
Sarsina	2	14	14	166,3	0	1/12
Sogliano A/R	1	6	6	42,3	0	1/5
Verghereto	6	43	43	75,8	0	5/17
<b>Totale</b>	<b>17</b>	<b>140</b>	<b>140</b>	<b>236,3</b>	<b>0</b>	<b>15/94</b>

## Sorveglianza entomologica

### Periodo febbraio-luglio 2004

L'attività di sorveglianza entomologica effettuata nel periodo febbraio-luglio 2004 è riassunta nella Tabella 5. Oltre alle trappole fisse nel periodo ha operato anche una trappola mobile attivata nella prima azienda riscontrata positiva. Complessivamente nel periodo considerato sono state eseguite 37 catture in 4 diversi siti. *C. imicola* non è mai stato rinvenuto, mentre mediamente ad ogni cattura sono stati catturati 419 culicoidi di altre specie. Il CESME ha eseguito la PCR su 25 delle 37 catture effettuate. Una cattura di *Culicoides*, effettuata attraverso la trappola mobile il 30/04/2004, è risultata positiva in PCR. Non è stato possibile eseguire la PCR discriminante per il ceppo vaccinale.

### Periodo agosto-dicembre 2004

L'attività di sorveglianza entomologica effettuata nel periodo agosto-dicembre 2004 è riassunta nella Tabella 6. Oltre alle trappole fisse nel periodo ha operato anche una trappola mobile attivata nella prima azienda che ha mostrato sierconversione nei bovini sentinella. Complessivamente nel periodo considerato sono state eseguite 140 catture in 17 diversi siti. *C. imicola* non è mai stato rinvenuto, mentre ad ogni cattura sono stati rilevati mediamente 236 culicoidi di altre specie.

Il CESME ha eseguito la PCR per BTV su 94 delle 140 catture effettuate in 16 aziende. Positività in PCR sono state registrate in 15 catture provenienti da 9 diversi siti (Fig. 6),

tra i quali la trappola mobile (1 positività su 2 catture esaminate). Quando è stato possibile il CESME ha effettuato separatamente la PCR su *C. obsoletus* e su *C. pulicaris*; in questi casi la PCR è risultata positiva solamente nelle catture di *C. obsoletus*.

## DISCUSSIONE

Le attività di sorveglianza clinica, sierologica, virologica ed entomologica svolte dai Servizi Veterinari della Provincia di Forlì-Cesena, hanno permesso di individuare e quindi di caratterizzare l'attiva circolazione del virus utilizzato per la vaccinazione nei confronti del sierotipo 2 della Bluetongue (BTVV-2). Per ciascun allevamento con capi positivi in PCR, infatti la sequenziazione e/o la PCR discriminante hanno attribuito al BTVV-2 la positività sierologica. Ferrari e coll.<sup>3</sup>, avevano già descritto sporadiche sierconversioni da BTVV-2 in sentinelle situate in zone adiacenti le aree di vaccinazione o nelle stalle nelle quali la vaccinazione era stata praticata e avevano individuato in *C. obsoletus* il vettore responsabile della trasmissione del virus vaccinale.

L'area dell'Appennino forlivese interessata da questa "epidemia" è invece distante 100 km dalle più vicine aree di vaccinazione ed in essa sono allevati bovini e ovi-caprini non vaccinati e ciò ha probabilmente favorito la diffusione del BTVV-2.

Altri Autori avevano segnalato come nei bovini e negli ovini vaccinati con BTVV-2 venisse indotta una viremia che raggiungeva titoli tali da essere potenzialmente infettivi per un vettore<sup>9, 14</sup>; nei bovini, in particolare, il virus



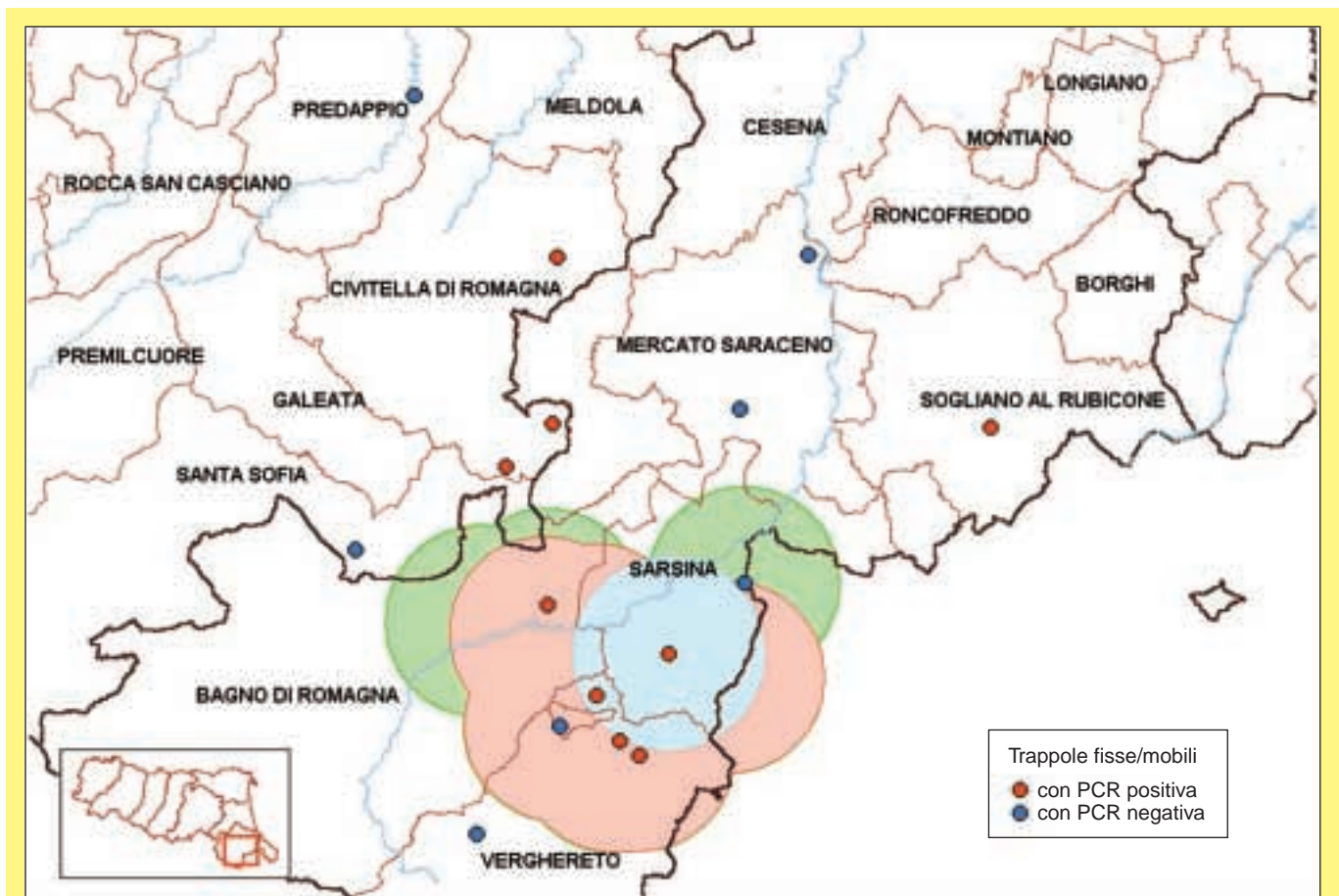


FIGURA 6 - Localizzazione delle trappole istallate nell'area di studio e dei risultati delle PCR eseguite sulle catture. Periodo Ago.-Dic.2004.

era rilevabile fino a 28 giorni dopo la vaccinazione<sup>9</sup>. Si può quindi ipotizzare che il BTVV-2 sia arrivato nell'Appennino forlivese attraverso la movimentazione di bovini vaccinati per i quali non sono stati rispettati i tempi di attesa previsti dalla normativa tra la vaccinazione con vaccino vivo attenuato e la movimentazione (30 giorni). In quest'area poi gli animali viremici hanno trovato un vettore in grado di trasmettere l'infezione. *C. obsoletus* era già stato individuato come vettore competente per la trasmissione del BTV in Italia<sup>13</sup>; con il nostro lavoro abbiamo evidenziato come questo insetto sia in grado di trasmettere molto efficacemente anche i ceppi vaccinali. Rispetto a *C. imicola*, però *C. obsoletus* mostra di avere periodi di attività più lunghi e vola già a marzo-aprile, quando è possibile esistano ancora animali con viremia a titoli in grado di infettarlo; ciò potrebbe permettere l'overwintering e la riattivazione della circolazione virale durante l'estate successiva.

La circolazione del BTVV-2 nell'area considerata sembra anche collegata alle modalità di allevamento; la grande maggioranza degli animali infetti era al pascolo nel periodo maggio-novembre. Se questa condizione fosse necessaria per il completamento del ciclo ospite-vettore si potrà pensare che il fenomeno, per quanto imponente, resti limitato alle aree nelle quali si trova ora, in quanto questa tipologia di allevamento non è particolarmente praticata in pianura o nelle province vicine.

Difficoltosa appare anche la sorveglianza per individuare se la zona coinvolta dalla circolazione del BTVV-2 au-

menta: il virus vaccinale non sembra provocare sintomatologia clinica rilevabile negli ovini e i bovini sentinella, essendo soggetti stabulati per permetterne il controllo periodico, non appaiono essere un sistema particolarmente efficace per la rilevazione precoce del fenomeno.

## CONCLUSIONI

La totalità delle positività per il sierotipo 2 del virus Bluetongue rilevate nell'Appennino forlivese sono da ascrivere al ceppo vaccinale BTVV-2.

Il problema è stato con tutta probabilità originato dalla movimentazione, avvenuta probabilmente nell'estate 2003, di bovini vaccinati. Il virus vaccinale BTVV-2 si è però dimostrato in grado di riattivarsi e diffondersi autonomamente nella zona tramite il vettore *C. obsoletus* durante l'estate-autunno 2004.

Nonostante l'imponente circolazione, nessuna sintomatologia clinica è stata rilevata negli ovi-caprini, a conferma che si è trattato di un virus di origine vaccinale.

Riteniamo che nell'Appennino Forlivese si sia ormai creata un'area di endemia da BTVV-2. Dal momento che in quest'area non sta circolando un virus selvaggio trasmesso da *C. imicola*, ma un ceppo vaccinale trasmesso da *C. obsoletus*, la patogenesi, l'epidemiologia e la diagnostica differenziale del fenomeno richiedono ulteriori approfondimenti. In particolare sarà opportuno monitorare l'andamento del fenomeno per definire la zona coinvolta dalla circolazione del ceppo vaccinale ed individuare i fattori che ne favo-



riscono la diffusione (densità della popolazione sensibile, pratica del pascolo, presenza di boschi, ecc.). Se infatti da un lato l'accertata circolazione di virus vaccinale non richiede l'immediata applicazione di provvedimenti sanitari, appare ovvio che questa sia indesiderabile. In tal senso la movimentazione dei bovini vaccinati con vaccino vivo rappresenta un fattore di rischio notevole, soprattutto qualora non vengano pienamente rispettati i tempi previsti dalla normativa tra la vaccinazione ed il trasporto dei soggetti vaccinati. Si può considerare che i soggetti da spostare siano vaccinati con vaccino spento o, in alternativa, vengano definite nuove procedure che garantiscano lo stato sanitario degli animali indipendentemente dal loro stato vaccinale.

La conferma della circolazione sul territorio nazionale di ceppi vaccinali accanto a quelli di campo richiede infine una revisione del piano di sorveglianza attualmente in vigore. Non appare infatti più sufficiente la sola sieroconversione degli animali sentinella per stabilire la circolazione del BTV.

È opportuno che per ciascuno dei sierotipi BTV circolanti sul territorio, con particolare riferimento ai sierotipi 2 e 9 che si sono dimostrati capaci di indurre nel bovino viremia a titoli infettanti per il vettore, vengano approntate procedure diagnostiche dirette finalizzate alla differenziazione tra i ceppi di campo ed i ceppi vaccinali. Tali procedure dovranno prevedere l'applicazione di provvedimenti sanitari solamente in seguito alla evidenziazione di circolazione di ceppi di campo.

## Parole chiave

*Bluetongue, circolazione virale, Culicoides, sorveglianza, vaccino.*

## Key words

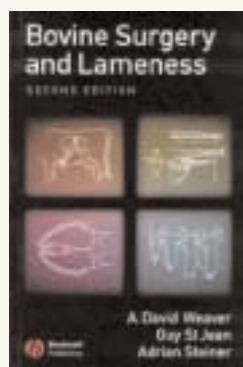
*Bluetongue, virus transmission, Culicoides, surveillance, vaccine.*

## Bibliografia

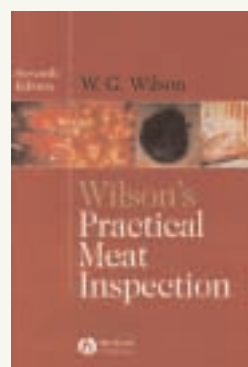
1. Agüero M., Arias M., Romero L.J., Zamora M.J., Sánchez-Vizcaino J.M. 2002. Molecular differentiation between NS1 gene of a field strain Bluetongue virus serotype 2 (BTV-2) and NS1 gene of an attenuated BTV-2 vaccine. *Vet. Microbiol.* 86: 337-341.
2. Breard E., Hamblin C., Hammoumi S., Sailleau C., Dauphin G., Zientara S. 2004. The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica. *Res. Vet. Sci.* 77: 1-8.
3. Ferrari G., DeLiberato C., Scavia G., Lorenzetti R., Zini M., Farina F., Magliano A., Cardeti G., Scholl F., Guidoni M., Scicluna M.T., Amadeo D., Scaramozzino P., Autorino G.L. 2005. Active circulation of bluetongue vaccine virus serotype-2 among unvaccinated cattle in central Italy. *Prev. Med. Vet.* 68(2-4): 103-113.
4. Giovannini A., Paladini C., Calistri P., Conte A., Colangeli P., Santucci U., Nannini D., Caporale V. 2004a. Surveillance system of bluetongue in Italy. *Vet. Ital.* 40(3): 369-384.
5. Giovannini A., Calistri P., Nannini D., Paladini, Santucci U., Patta C., Caporale V. 2004b. Bluetongue in Italy: Part II. *Vet. Ital.* 40(3): 252-259.
6. Gomez-Tejedor C. 2004. Brief overview of the bluetongue situation in Mediterranean Europe, 1998-2004. *Vet. Ital.* 40(3): 57-60.
7. Katz, J.B., Gustafson G.A., Alstad A.D., Adler K.A., Moser K.M., 1993. Colorimetric diagnosis of prolonged bluetongue viremia in sheep, using an enzyme-linked oligonucleotide sorbent of amplified viral nucleic acids. *Am. J. Vet. Res.* 54: 2921-2926.
8. Lelli R., Portanti O., Langella V., Lucani M., DiEmidio B., Conte A. 2003. Production of a competitive ELISA kit for the serological diagnosis of bluetongue disease. *Vet. Ital.* 47: 5-13.
9. Monaco F., DeLuca N., Spina P., Morelli D., Liberatore I., Citarella R., Conte A., Savini G. 2004. Virological and serological response of cattle following field vaccination with bivalent modified-live vaccine against bluetongue virus serotypes 2 and 9. *Vet. Ital.* 40(3): 657-660.
10. OIE. 2004. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccine for terrestrial animals (Chapter 2.1.9.). [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00032.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00032.htm)
11. Orru G., P.De Santis, F. Solinas, G. Savini, V. Pirasa, V. Caporale. 2004. Differentiation of Italian field and South African vaccine strains of bluetongue virus serotype 2 using real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 122: 37-43.
12. Savini G., Monaco F., Conte A., Migliaccio P., Casaccia C., Salucci S., DiVentura M. 2004. Virological and serological response of sheep following field vaccination with bivalent modified-live vaccine against bluetongue virus serotypes 2 and 9. *Vet. Ital.* 40(3): 631-634.
13. Savini G., Goffredo M., Monaco F., DiGennaro A., Cafiero M.A., Baldi L., DeSantis P., Meiwinkel R., Caporale V. 2005. Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (*Culicoides*, *Diptera*: *ceratopogonidae*) in Italy. *Vet. Rec.* 157: 133-139.
14. Veronesi E., Hamblin C., Mellor P.S. 2005. Live attenuated bluetongue vaccine viruses in Dorset Poll sheep, before and after passage in vector midges (*Diptera*: *Ceratopogonidae*). *Vaccine.* 23: 5509-5516.

## EDIZIONI VETERINARIE

Per ordini e informazioni: Tel. 0372/403507 - Fax 0372/457091 E-mail [editoria@evsrl.it](mailto:editoria@evsrl.it) - [www.evsrl.it](http://www.evsrl.it)



A. David WEAVER  
**Bovine Surgery and Lameness**  
 2/ed. 2005 Blackwell Publishing  
 listino € 52,65  
 scontato € 45,00



WILSON  
**Wilson's Practical Meat Inspection**  
 7/ed. 2005  
 Blackwell Publishing  
 listino € 80,90  
 scontato € 69,00