

## Patologia comparata delle infezioni da Morbillivirus nei mammiferi acquatici

### *Comparative pathology of Morbillivirus infections in aquatic mammals*

Giovanni Di Guardo<sup>1\*</sup>, Leonardo Della Salda<sup>1</sup>, Giuseppe Marruchella<sup>1</sup>, Umberto Agrimi<sup>2</sup>, Giuliana Terracciano<sup>3</sup>, Seamus Kennedy<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Piazza Aldo Moro, 45 – 64100 Teramo

<sup>2</sup> Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Medicina Veterinaria, Viale Regina Elena, 299 – 00161 Roma

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Dipartimento Territoriale di Pisa, Via Lucchese, 2 – 56100 Pisa

<sup>4</sup> Department of Agriculture and Rural Development for Northern Ireland, Veterinary Sciences Division – Stormont, Belfast, BT4 3SD, Northern Ireland (UK)

RIASSUNTO - A partire dal 1987, almeno 8 differenti epidemie sostenute da morbillivirus hanno causato altrettanti episodi di mortalità collettiva nelle popolazioni di pinnipedi e di cetacei dell'intero pianeta. I virus responsabili di tali epidemie, tutti appartenenti al genere *Morbillivirus* (Fam. *Paramyxoviridae*), sono stati ulteriormente caratterizzati dal punto di vista genomico ed antigenico grazie ad opportune indagini di tipo biomolecolare. È stato così possibile distinguerli in ceppi di virus del cimurro ("Canine Distemper Virus", CDV), in grado di infettare i pinnipedi, nonché in tre nuovi morbillivirus, mai segnalati prima, denominati rispettivamente "Phocid (Phocine) Distemper Virus" (PDV), "Porpoise Morbillivirus" (PMV) e "Dolphin Morbillivirus" (DMV), il primo in grado di infettare i pinnipedi, i rimanenti due i cetacei. Questi ultimi sono stati più recentemente riuniti nella comune definizione di "Cetacean Morbillivirus" (CMV). I reperti anatomico-patologici più comunemente osservabili nel corso di tali infezioni consistono: a) in una polmonite bronco-interstiziale bilaterale non purulenta, caratterizzata a sua volta da iperplasia dei pneumociti di tipo II e dalla formazione di sincizi endobronchiali, endobronchiolari ed endoalveolari di tipo Warthin-Finkeldey; b) in un'encefalite multifocale non purulenta; c) in una grave e generalizzata deplezione dei tessuti linfo-reticolari dell'ospite. Inoltre, è di assai frequente riscontro la presenza di inclusioni virali eosinofile, intracitoplasmatiche ed intranucleari, rilevabili all'interno delle cellule dell'epitelio nasale, tracheale, bronchiale, bronchiolare ed alveolare (pneumociti di tipo II), nonché nei neuroni, negli astrociti e nelle cellule ependimali. Tali inclusioni, alla stessa stregua dei suddetti elementi cellulari e delle cellule linfoidi, risultano spesso positive alle indagini immunostochimiche volte a dimostrare la presenza di specifici antigeni morbillivirali. Sebbene le infezioni morbillivirali dei mammiferi acquatici siano state oggetto di molteplici indagini nel corso degli ultimi 15 anni, numerosi risultano tuttora i quesiti insoluti e meritevoli di ulteriore attività di ricerca in tale ambito. In particolare, rimangono del tutto aperte le questioni relative all'origine di tali virus, al loro spettro d'ospite *in vivo* (quest'ultimo comprendente anche i mammiferi terrestri), alla loro patogenicità, alla loro ecologia ed alla loro epidemiologia. Rimane infine da chiarire l'eventuale effetto sinergizzante che certi contaminanti ambientali, quali in particolare gli organoclorurati (PCB, diossine, 4-4' DDE, ecc.) ed i metalli pesanti (Hg, Pb, Cd, ecc.), potrebbero svolgere nel modulare l'azione patogena e l'attività patogenetica dei morbillivirus nei mammiferi acquatici.

*SUMMARY - Starting from 1987, at least eight morbillivirus infection (MI) epidemics have caused mass mortality in several free-living pinniped and cetacean populations around the world. The responsible agents all belong to the genus Morbillivirus (Family Paramyxoviridae) and have been characterized as either "Canine Distemper Virus" (CDV) strains, infecting pinnipeds, or as three new morbilliviruses, namely "Phocid (Phocine) Distemper Virus" (PDV) of pinnipeds, "Porpoise Morbillivirus" (PMV) and "Dolphin Morbillivirus" (DMV). The latter two viruses are currently gathered under the common denomination of "Cetacean Morbillivirus" (CMV). At post-mortem examination, a commonly occurring macroscopic lesion is represented by a more or less severe bilateral pneumonia, with consolidation, congestion and oedema of both lungs, which fail to collapse. Histologically, a non-suppurative broncho-interstitial pneumonia, characterized by type II pneumocyte hyperplasia and intrabronchial, intrabronchiolar and endoalveolar "Warthin-Finkeldey type" syncytia, as well as a multifocal, non-suppurative encephalitis, associated with a severe and generalized lymphoid tissue depletion, are common*

pathological findings. Furthermore, eosinophilic viral inclusions are often detected, at both intracytoplasmic and intranuclear level, within bronchial and bronchiolar epithelial, pulmonary syncytial, neuronal and other cell types. These inclusions, together with lymphoid and other cellular elements, are often found immunohistochemically positive for morbillivirus antigens. Although much high quality scientific work has been carried out during the last 15 years in the context of MI in aquatic mammals, there still remain a number of relevant issues requiring further research activity. Among these, hitherto unsolved questions concern the origin and the evolutionary phylogeny of such viruses, as well as their host range (including also terrestrial mammals), pathogenicity, ecology and epidemiology. In this respect, it should be also underlined that, apart from the lack of detailed scientific information regarding the pathogenesis of MI in sea mammals, such infections may represent useful comparative pathology models in the study of similar disease conditions in man and terrestrial mammal species. Finally, another crucial matter is that regarding the potential synergistic effect, if any, of a number of environmental pollutants, with special emphasis on certain organochlorines (PCBs, dioxins, 4-4'DDE, etc.) and heavy metals (Hg, Pb, Cd, etc.), in modulating the pathogenic and pathogenetic activity of sea mammal morbilliviruses.

**Key words:** Morbillivirus, Pathology, Immunohistochemistry, Aquatic mammals, Pollutants.

---

\* Corresponding Author: Prof. Giovanni Di Guardo, DVM, Dipl. ECVP, Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Piazza Aldo Moro, 45 - 64100 - Teramo, Italia; Tel. 0861-266933; Fax 0861-266865; E-mail: diguardo@vet.unite.it

## INTRODUZIONE

L'interesse scientifico relativo allo studio della patologia dei mammiferi acquatici si è notevolmente accresciuto a seguito dell'identificazione, dal 1987-88 in avanti, di una serie di nuovi agenti virali appartenenti al genere *Morbillivirus*. Tale genere virale appartiene alla famiglia *Paramyxoviridae* e comprende un gruppo di virus ad RNA monocatenario, provvisti di *envelope*, tutti sierologicamente correlati e privi di attività neuraminidasica (Kennedy, 1998).

Fino al 1988 erano stati identificati soltanto quattro morbillivirus, i quali si erano fino ad allora dimostrati in grado di sostenere infezioni in numerose specie di mammiferi terrestri, causando spesso delle vere e proprie epidemie in popolazioni precedentemente non esposte al contagio e pertanto prive di una protezione immunitaria specifica. I quattro agenti in questione sono il virus del morbillo umano ("*Measles Virus*", MV), il virus del cimurro canino ("*Canine Distemper Virus*", CDV), il virus della peste bovina ("*Rinderpest Virus*", RPV) ed il virus della peste dei piccoli ruminanti ("*Peste-des-Petits Ruminants Virus*", PPRV).

Negli ultimi quindici anni sono state documentate almeno otto diverse epidemie sostenute da morbillivirus in più specie di mammiferi acquatici. Lo studio approfondito di tali eventi epidemici ha portato all'identificazione ed alla caratterizzazione di almeno tre nuovi agenti virali appartenenti al genere *Morbillivirus*, del tutto sconosciuti rispetto a quelli noti fino ad allora (Kennedy, 1998).

Il presente lavoro ha lo scopo di fornire una sintetica rassegna in merito ai principali aspetti delle infezioni morbillivirali nei mammiferi acquatici, con particolare riferimento alle caratteristiche biologiche di tali agenti virali, all'epidemiologia, alla patogenesi ed alle peculiari lesioni anatomo-istopatologiche, nonché ai relativi quadri immunoistochimici riscontrati nel corso delle suddette infezioni sia nei pinnipedi, sia nei cetacei.

## LE EPIDEMIE MORBILLIVIRALI NEI MAMMIFERI ACQUATICI

Nel 1988 circa 18.000 foche comuni (*Phoca vitulina*) ed alcune centinaia di foche grigie (*Halichoerus grypus*) furono coinvolte, lungo le coste dell'Europa settentrionale, in un grave episodio di moria collettiva. L'ipotesi relativa ad un'origine morbillivirale dell'epidemia venne inizialmente avanzata, non senza posizioni contrastanti in materia, sulla base dell'osservazione di lesioni anatomico-istopatologiche molto simili a quelle tipicamente documentate in corso di infezione da CDV nella specie canina. Tale ipotesi venne successivamente avvalorata dai risultati delle indagini immunoistochimiche, sierologiche e virologiche condotte su numerosi animali pervenuti *ad exitus*. L'agente causale in questione si dimostrò essere un nuovo membro del genere *Morbillivirus*, mai identificato prima di allora e denominato "*Phocine (Phocid) Distemper Virus*" (PDV) (Kennedy *et al.*, 1988a; Cosby *et al.*, 1988). Ad un analogo agente virale è stata successivamente attribuita la responsabilità causale di un ulteriore grave episodio di mortalità collettiva che ancora una volta ha interessato le popolazioni di foche del Mare del Nord nel corso del 2002, con oltre 21.000 decessi stimati nell'arco di soli sei mesi (Jauniaux & Coignoul, 2003).

Contemporaneamente all'episodio verificatosi nel 1988 lungo le coste dell'Europa settentrionale, migliaia di foche del lago Baikal (*Phoca sibirica*), in Siberia, manifestarono quadri clinici ed anatomico-istopatologici del tutto sovrapponibili a quelli presenti nelle foche europee. I successivi studi di caratterizzazione genomica ed antigenica degli stipti virali isolati nel corso dei due succitati episodi di mortalità collettiva esclusero comunque ogni eventuale nesso epidemiologico fra i due eventi, individuando in uno stipte di CDV l'agente eziologico responsabile dell'epidemia nelle foche del lago Baikal (Osterhaus *et al.*, 1989; Mamaev *et al.*, 1996). Ad un ceppo del medesimo agente virale (CDV) è stata pure ascritta la responsabilità causale del grave episodio di mortalità collettiva che, durante la primavera del 2000, ha coinvolto oltre 10.000 foche del Mar Caspio (*Phoca caspica*) (Kennedy *et al.*, 2000).

Risalgono al 1988 anche le prime epidemie morbillivirali descritte nei cetacei. Lesioni simil-cimurrose vennero dapprima osservate in sei focene (*Phocoena phocoena*) rinvenute spiaggiate sulle coste irlandesi, mentre casi analoghi vennero successivamente descritti in focene spiaggiate lungo le coste inglesi, scozzesi ed olandesi. Sebbene in un primo momento fosse stata ipotizzata una trasmissione interspecifica di PDV, le successive indagini di caratterizzazione biomolecolare condotte sui ceppi virali isolati dalla foca e dalla focena consentirono l'identificazione di un ulteriore "nuovo" morbillivirus dei mammiferi acquatici, denominato "*Porpoise Morbillivirus*" (PMV) (Kennedy *et al.*, 1988b; Visser *et al.*, 1993).

A seguire, una grave epidemia morbillivirale interessò, a partire dal 1990, le popolazioni di stenelle striate (*Stenella coeruleoalba*) residenti lungo le coste spagnole del Mediterraneo. L'episodio si diffuse quindi verso oriente fino ad interessare progressivamente le coste francesi, italiane, greche e turche, prima di attenuarsi in maniera considerevole nel corso del 1992 (Domingo *et al.*, 1990; Di Guardo *et al.*, 1992a; Di Guardo *et al.*, 1992b; Barrett *et al.*, 1995; Kennedy, 1998). Le indagini biomolecolari consentirono anche in questo caso l'individuazione e la successiva caratterizzazione di un terzo "nuovo" agente, denominato "*Dolphin Morbillivirus*" (DMV) ed intimamente correlato dal punto di vista genomico ed antigenico con il PMV. A conferma di quanto sopra, i due virus succitati sono stati riuniti sotto la comune denominazione di "*Cetacean Morbillivirus*" (CMV) (Blixenkron-Moller *et al.*, 1994).

Si ritiene altresì che il DMV ed il PMV siano stati all'origine di un'ulteriore epidemia che, nel periodo 1987-88, causò la morte di circa il 50% dei tursiopi (*Tursiops truncatus*) residenti lungo la costa orientale degli Stati Uniti (Krafft *et al.*, 1995). Tale epidemia venne

inizialmente attribuita all'azione di una tossina algale ("brevitossina") prodotta da un dinoflagellato marino (*Ptychodiscus brevis*) (Geraci, 1989). Al solo PMV è stata invece ascritta la responsabilità eziologica di una successiva epidemia, di entità comunque ben più limitata rispetto alla precedente, che ha interessato la stessa specie (*T. truncatus*) lungo il Golfo del Messico nel biennio 1993-'94 (Krafft *et al.*, 1995).

Sebbene non sia l'ultima in ordine di tempo, pur tuttavia riteniamo utile citare con particolare enfasi il gravissimo episodio di mortalità collettiva che, nel corso del 1997, ha interessato lungo le coste della Mauritania la locale popolazione di foca monaca (*Monachus monachus*), una specie peraltro già ritenuta a forte rischio di estinzione. La causa dell'episodio in oggetto è stata ascritta, anche in questo caso, ad un nuovo morbillivirus, filogeneticamente correlato al DMV e denominato "*Monk Seal Morbillivirus*" (MSMV) (Osterhaus *et al.*, 1997).

## I MORBILLIVIRUS DEI MAMMIFERI ACQUATICI

L'origine dei morbillivirus descritti in diverse specie di mammiferi acquatici risulta tuttora sconosciuta, nonostante la loro caratterizzazione genomica ed antigenica abbia consentito di classificarli come agenti virali del tutto nuovi (PDV, CMV), piuttosto che come stipiti (o varianti) di morbillivirus preesistenti (CDV) (Kennedy, 1998).

Attualmente si ritiene che alcuni mammiferi terrestri, infettati da CDV, abbiano rappresentato la fonte di contagio per le foche del lago Baikal (*P. sibirica*). A sostegno di quanto sopra, infatti, l'infezione cimurrosa è estremamente diffusa nella popolazione canina di tale area geografica e la stessa può coinvolgere anche altre specie animali (canidi, mustelidi, ecc.), con effetti talvolta devastanti sulle popolazioni selvatiche. Si è anche ipotizzato che l'origine di tale epidemia fosse ascrivibile all'impiego di uno stipite vaccinale attenuato di CDV, ampiamente utilizzato in Siberia per la profilassi immunizzante nel cane e nel visone. Le indagini biomolecolari, ed in modo particolare il sequenziamento dei geni che codificano per l'emoagglutinina (H, "*haemagglutinin*") e per la fosfoproteina (P, "*phosphoprotein*"), hanno comunque escluso questa eventualità, dimostrando inoltre che CDV ha continuato a circolare nella popolazione di *P. sibirica* anche successivamente al 1988 (Mamaev *et al.*, 1996).

Ancora più oscura è l'origine del PDV, nonché del PMV e del DMV, ora riuniti come precedentemente accennato sotto la comune denominazione di CMV. A tal proposito, lo studio analitico delle sequenze nucleotidiche dei geni che codificano per gli antigeni H, N ("*nucleoprotein*"), F ("*fusion protein*"), P, L ("*large protein*") ed M ("*matrix protein*") ha dimostrato che PDV è filogeneticamente più vicino a CDV rispetto agli altri morbillivirus conosciuti. Si tratta, in ogni caso, di differenze tali da giustificare la classificazione in due specie virali distinte (Blixenkrone-Moller *et al.*, 1992).

Viceversa, i morbillivirus dei cetacei (DMV e PMV) risultano più intimamente correlati, dal punto di vista genomico ed antigenico, ai morbillivirus dei ruminanti (RPV, PPRV). Inoltre, i due succitati agenti differiscono fra loro solo in corrispondenza di pochi epitopi e vengono attualmente considerati come stipiti di una medesima specie virale (CMV) (Visser *et al.*, 1993).

Per quanto più specificamente concerne l'origine epidemica di tali infezioni, sulla base delle indagini siero-epidemiologiche effettuate su materiale biologico "di archivio", si ritiene che un'infezione morbillivirale a carattere "endemico" presente in alcune popolazioni di mammiferi acquatici possa aver costituito la fonte di contagio per alcune specie fino a quel momento considerate indenni. In proposito, alterazioni nel comportamento "migratorio" di alcuni animali infetti potrebbero aver determinato l'introduzione di "nuovi" virus all'interno

delle suddette popolazioni indenni, scatenando la comparsa di vere e proprie epidemie. In tal senso, il ruolo epidemiologico giocato dagli animali infetti in forma subclinica potrebbe essere stato di ben più rilevante impatto rispetto a quello svolto dai soggetti in preda alla malattia clinicamente conclamata. Più in particolare, è stato ipotizzato che le foche della Groenlandia (*Phoca groenlandica*) abbiano veicolato il PDV all'interno delle popolazioni di *P. vitulina* e di *H. grypus* dell'Europa nord-occidentale (Dietz *et al.*, 1989), mentre il globicefalo (*Globicephala melas*) potrebbe aver esplicato un analogo ruolo epidemiologico rispetto alle infezioni morbillivirali ad andamento epidemico nei cetacei, veicolando il DMV dalle coste nord-americane al Mar Mediterraneo (Duignan *et al.*, 1995).

#### CENNI PATOGENETICI

Nessun dato è attualmente disponibile in merito alla patogenesi delle infezioni morbillivirali dei cetacei e solo pochi studi dettagliati sono stati finora condotti nei pinnipedi (Harder *et al.*, 1990; Kennedy, 1998). A tal proposito, nell'ambito delle diverse problematiche scientifiche che più o meno direttamente investono la materia, rimane tuttora da chiarire l'eventuale effetto sinergizzante che certi contaminanti ambientali assunti per via alimentare, quali in particolare gli organoclorurati (PCB, diossine, 4-4' DDE, ecc.) ed i metalli pesanti (Hg, Pb, Cd, ecc.), potrebbero svolgere nel modulare l'azione patogena e l'attività patogenetica dei morbillivirus nei mammiferi acquatici (De Swart *et al.*, 1994; Kennedy, 1998; Di Guardo *et al.*, 2003).

#### ASPETTI SINTOMATOLOGICI

Le principali manifestazioni cliniche dell'infezione sostenuta da PDV nei pinnipedi sono essenzialmente sovrapponibili a quelle già descritte in corso di infezione da CDV nel cane, essendo pertanto caratterizzate da ipertermia febbrile, disturbi respiratori, gastrointestinali e neurologici. A queste si può comunemente associare un più o meno marcato enfisema sottocutaneo a livello delle regioni cervicali e toraciche, che determina una ridotta capacità di immersione.

Estremamente scarni i dati clinici a disposizione relativamente alle infezioni morbillivirali dei cetacei. Le manifestazioni sintomatologiche osservate nelle stenelle striate rinvenute spiaggiate sulle coste spagnole durante l'epidemia del 1990 sono state di tipo esclusivamente neurologico-comportamentale (Domingo *et al.*, 1992).

#### LESIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE E RILIEVI IMMUNOISTOCHEMICI

In corso di infezioni morbillivirali, la principale alterazione macroscopica rilevabile all'esame *post-mortem*, sia nei pinnipedi sia nei cetacei, è pressoché invariabilmente costituita da una grave polmonite bilaterale. I polmoni interessati da tale processo lesivo non collassano, si presentano intensamente congesti ed edematosi e mostrano inoltre un evidente enfisema interlobulare e subpleurico (Foto 1), che si rende evidente anche in sede mediastinica. Contestualmente, è di comune riscontro l'osservazione, spesso congiunta, di ascessi polmonari e granulomi parassitari. All'esame della cavità toracica possono rendersi altresì evidenti l'edema e l'aumento di volume dei linfonodi polmonari e peribronchiali, unitamente alla presenza di versamenti in sede pleurica (idrotorace) e pericardica (idropericardio).

Ulteriori lesioni apprezzabili, seppur incostantemente, all'esame anatomico-patologico sono rappresentate, nei cetacei, da edema sottocutaneo, congestione epatica, encefalite emorragico-necrotizzante, stomato-gengivite e glossite di tipo ulcerativo o vescicolare-erosivo (stenella), nonché da una cheratite bilaterale (foca) (Kennedy *et al.*, 1989; Kennedy *et al.*, 1991; Domingo *et al.*, 1992; Di Guardo *et al.*, 1992a; Di Guardo *et al.*, 1992b).

Le lesioni istopatologiche descritte nei pinnipedi in corso d'infezione morbillivirale sono in buona parte o del tutto sovrapponibili a quelle osservate nei mammiferi terrestri. I quadri lesivi più eclatanti sono rilevabili a carico dell'apparato respiratorio, del sistema nervoso centrale (SNC), del tessuto linfatico e dell'apparato digerente.

Istologicamente, le lesioni a livello dell'apparato respiratorio sono inquadrabili in una polmonite bronchiolo-interstiziale diffusa o multifocale, variabile da subacuta a cronica e sovente caratterizzata da più o meno marcate espressioni proliferative dei pneumociti di tipo II. Di frequente riscontro sono pure fenomeni di necrosi degli epiteli e delle pareti bronchiali e bronchiolari, al cui interno si osservano abbondante essudato siero-fibrinoso e cospicua infiltrazione leucocitaria e macrofagico-istiocitaria, analogamente con quanto si osserva pure nei lumi di numerosi alveoli. La parete alveolare può presentare più o meno evidenti segni di congestione, edema e "fetalizzazione" epiteliale ed al suo interno sono comunemente reperibili estese emorragie e formazione di membrane ialine. Nei setti interalveolari sono inoltre presenti edema, più o meno abbondanti depositi di tessuto fibro-reticolo-connettivale ed infiltrati flogistici macrofagico-istiocitari, leucocitari e linfocitari. La caratteristica istopatologica più saliente, e pressoché patognomonica, dell'infezione in sede polmonare è però costituita dalla presenza nei bronchioli, negli alveoli e, meno frequentemente, nei setti interalveolari, di voluminosi sincizi multinucleati di tipo Warthin-Finkeldey (Foto 2), spesso contenenti, analogamente alle cellule dell'epitelio bronchiale (Foto 3), bronchiolare ed alveolare, una o più inclusioni virali acidofile nucleari e/o citoplasmatiche. Tali inclusi possono essere singoli o multipli, di circa 10-20 µm di diametro, di forma ovoidale o tondeggiante e provvisti di bordi netti. I sincizi e gli inclusi sono molto più numerosi nei cetacei. Le lesioni primarie virus-indotte sono spesso sovrastate dalla concomitante presenza di infezioni batteriche e parassitarie.

Cimentando i tessuti in esame con anticorpi monoclonali nei confronti delle diverse frazioni antigeniche di PDV è possibile dimostrare elevate quantità di antigene virale nelle cellule degli epiteli bronchiali e bronchiolari, nonché in quelle dell'epitelio alveolare, negli istiociti ed in numerosi sincizi multinucleati endobronchiali, endobronchiolari, endoalveolari ed interstiziali (Foto 4) (Kennedy *et al.*, 1989; Kennedy *et al.*, 1991; Domingo *et al.*, 1992; Di Guardo *et al.*, 1992a; Di Guardo *et al.*, 1992b).

Le principali alterazioni neuroistopatologiche riscontrate in corso d'infezione morbillivirale nei mammiferi acquatici non si discostano sostanzialmente dalle classiche espressioni morfolesive evidenziabili nelle encefaliti virali dell'uomo e degli animali, con comparsa di multipli manicotti perivasali di cellule infiammatorie mononucleate, di degenerazione e di necrosi neuronale, di gliosi (microgliosi) focale o diffusa e di neuronofagia. Le lesioni infiammatorie risultano prevalentemente localizzate a livello di corteccia cerebrale, dove possono presentare una distribuzione laminare (diffusa) o multifocale. All'interno dei neuroni è frequente il riscontro di più o meno voluminose inclusioni virali acidofile, intracitoplasmatiche e/o intranucleari (Foto 5).

Solo nella foca sono presenti estesi focolai di demielinizzazione a livello della sostanza bianca sub-ependimale e, occasionalmente, sub-meningea. Sempre a carico della sostanza bianca possono essere presenti, sia nei pinnipedi, sia nei cetacei, più o meno estesi focolai malacici, contenenti a loro volta sincizi a 2-6 nuclei; le espressioni lesive più importanti e significative a tale livello sono comunque rappresentate da una marcata microgliosi ed astrocitosi, quest'ultima caratterizzata da fenomeni di proliferazione di determinati elementi

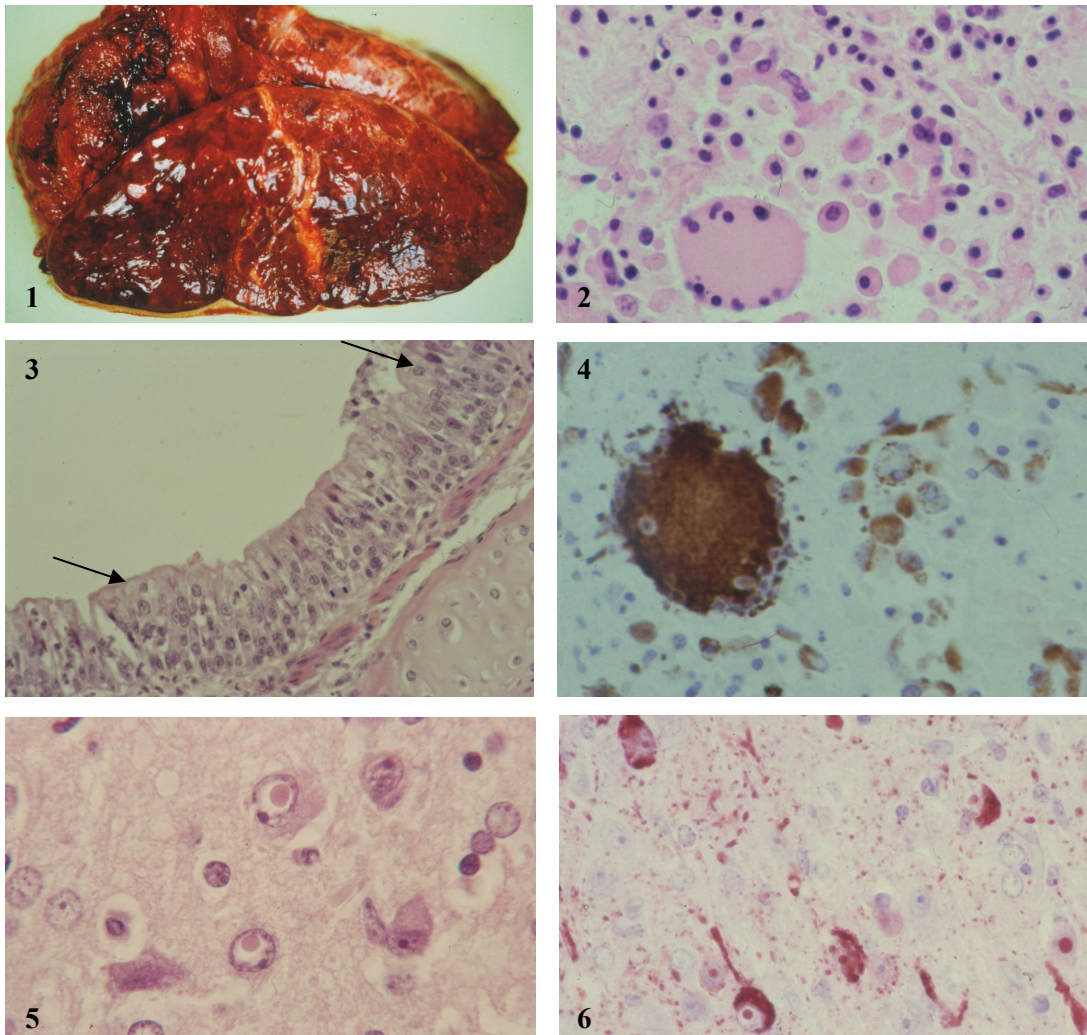


Foto 1 - Foca comune (*Phoca vitulina*). Infezione da PDV. Polmone. Grave ed estesa polmonite bilaterale.

Foto 2 - Stenella striata (*Stenella coeruleoalba*). Infezione da CMV. Polmone. Un elemento sinciziale di tipo Warthin-Finkeldey è chiaramente riconoscibile nel contesto di un infiltrato infiammatorio costituito in massima parte da elementi cellulari mononucleati. E.E.

Foto 3 - Foca comune (*P. vitulina*). Infezione da PDV. Polmone. Corpi inclusi virali eosinofili si osservano all'interno del citoplasma di singoli elementi epiteliali della parete bronchiale (freccie). E.E.

Foto 4 - Stenella striata (*S. coeruleoalba*). Infezione da CMV. Polmone. Reazione immunoperoxidasica intensamente positiva a livello di pneumociti di tipo II iperplastici, di macrofagi endoalveolari e di un elemento sinciziale endoalveolare di tipo Warthin-Finkeldey. Quest'ultimo mostra inoltre alcuni corpi inclusi intranucleari intensamente immunoreattivi. Metodo avidina-biotina-perossidasi sviluppato utilizzando un anticorpo monoclonale (MoAb) specifico per l'antigene P di PDV. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer.

Foto 5 - Stenella striata (*S. coeruleoalba*). Infezione da CMV. Encefalo. Corpi inclusi intranucleari eosinofili sono chiaramente riconoscibili all'interno di singoli neuroni. E.E.

Foto 6 - Stenella striata (*S. coeruleoalba*). Infezione da CMV. Encefalo. Una reazione immunoperoxidasica intensamente positiva, diffusa e puntiforme, è ben riconoscibile in corrispondenza rispettivamente dei neuroni della sostanza grigia subcorticale e del neuropilo circostante. Da notare la presenza, all'interno di singoli neuroni, di corpi inclusi intranucleari intensamente immunoreattivi. Metodo avidina-biotina-perossidasi sviluppato utilizzando un anticorpo monoclonale (MoAb) specifico per l'antigene H di PDV. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer.

*Photo 1 - Common seal (Phoca vitulina). PDV infection. Lung. Macroscopic evidence of severe bilateral pneumonia.*

*Photo 2 - Striped dolphin (Stenella coeruleoalba). CMV infection. Lung. A prominent endoalveolar Warthin-Finkeldey type syncytium is clearly recognizable in the context of a mononuclear cell inflammatory exudate.*

*Photo 3 - Common seal (P. vitulina). PDV infection. Lung. Eosinophilic intracytoplasmic viral inclusion bodies are observed within single epithelial elements of the bronchial wall (arrows).*

*Photo 4 - Striped dolphin (S. coeruleoalba). CMV infection. Lung. Intense immunostaining for morbilliviral antigen is observed in hyperplastic type II pneumocytes, in endoalveolar macrophages and in a large intraalveolar Warthin-Finkeldey type syncytium, in which some intranuclear inclusion bodies are also immunoreactive. Immunoperoxidase technique with a MoAb to the P antigen of PDV as primary Ab. Mayer's haematoxylin counterstain.*

*Photo 5 - Striped dolphin (S. coeruleoalba). CMV infection. Brain. Prominent eosinophilic intranuclear viral inclusion bodies are seen within single neurons.*

*Photo 6 - Striped dolphin (S. coeruleoalba). CMV infection. Brain. A diffuse and a punctate immunostaining pattern for morbilliviral antigen are respectively detected in grey matter subcortical neurons and in the surrounding neuropil. Most notably, the neuronal cell intranuclear inclusion bodies shown above are strongly immunoreactive. Immunoperoxidase technique with a MoAb to the H protein of PDV as primary Ab. Mayer's haematoxylin counterstain.*

astrogliali (“*gemistocytic astrocytes*”) a citoplasma debolmente eosinofilo, con uno o più nuclei eccentrici, spesso in atteggiamento mitotico ed ospitanti inclusioni virali acidofile, nonché in preda a vari stati alterativo-regressivi nucleo-citoplasmatici.

Facendo ricorso alle summenzionate indagini immunoistochimiche, è possibile dimostrare la presenza di notevoli quantità di antigene virale in molti neuroni della corteccia cerebrale il cui nucleo, pericario, assone e dendriti appaiono intensamente colorati, come pure nelle cellule astrogliali e microgliali. Immunodepositi fortemente reattivi si osservano inoltre in corrispondenza delle inclusioni virali, nucleari e citoplasmatiche, intraneuronali (Foto 6), in numerosi linfociti perivascolari e, occasionalmente, anche in cellule ependimali ed in macrofagi infiltranti le meningi (Kennedy *et al.*, 1989; Kennedy *et al.*, 1991; Domingo *et al.*, 1992; Di Guardo *et al.*, 1992a; Di Guardo *et al.*, 1992b).

Una grave linfocitolisi (necrosi carioretica) associata a marcata deplezione linfocitaria costituiscono le modificazioni istolesive più evidenti a carico dei linfonodi, della milza, del GALT (“*Gut-Associated Lymphoid Tissue*”) e del timo. Nei cetacei è di comune rilievo anche la presenza di elementi sinciziali, particolarmente numerosi in ambito linfonodale, analogamente a quanto è possibile osservare in corso di morbillo e di peste bovina. Immunoistochimicamente, è possibile osservare reazioni positive specifiche a livello di cellule linfoidi in ambito sia splenico, sia linfonodale (Kennedy *et al.*, 1989; Kennedy *et al.*, 1991; Domingo *et al.*, 1992; Di Guardo *et al.*, 1992a; Di Guardo *et al.*, 1992b).

Corpi inclusi intracitoplasmatici e positività alle indagini immunoistochimiche sono inoltre stati osservati in corrispondenza dell’epitelio vescicale, del bacinetto renale, dei dotti pancreatici e biliari, nonché dell’apparato gastroenterico. Nei cetacei, la presenza di corpi inclusi è stata pure documentata nell’epitelio dell’uretra peniena, del prepuzio, dell’ovidutto, della vagina, della ghiandola lacrimale, della cute e delle cellule degli acini pancreatici.

Degno di nota è infine l’occasionale riscontro, nella stenella, di alterazioni flogistiche caratterizzate dalla comparsa di sincizi multinucleati, in sede mammaria, ove possono rinvenirsi pure abbondanti quantità di antigene virale, elemento quest’ultimo che suggerirebbe la possibilità di una eliminazione dell’agente per via lattea (Kennedy *et al.*, 1989; Kennedy *et al.*, 1991; Domingo *et al.*, 1992; Di Guardo *et al.*, 1992a; Di Guardo *et al.*, 1992b).

## CONCLUSIONI

Sebbene le infezioni morbillivirali dei mammiferi acquatici siano state oggetto, nel corso degli ultimi 15 anni, di una rilevante mole di qualificate indagini, numerosi risultano tuttora i quesiti insoluti e meritevoli di ulteriore attività di ricerca in tale ambito. In particolare, rimangono del tutto aperte le questioni relative all’origine di tali virus, al loro spettro d’ospite *in vivo* (quest’ultimo comprendente anche i mammiferi terrestri), alla loro patogenicità, alla loro ecologia ed alla loro epidemiologia. Rimane infine da chiarire l’eventuale effetto sinergizzante che certi contaminanti ambientali, quali in particolare gli organoclorurati (PCB, diossine, 4-4’ DDE, ecc.) ed i metalli pesanti (Hg, Pb, Cd, ecc.), potrebbero svolgere nel modulare l’azione patogena e l’attività patogenetica dei morbillivirus nei mammiferi acquatici.

Pertanto, si ritiene assolutamente auspicabile una continua attività di monitoraggio e di ricerca che permetta di meglio definire le caratteristiche epidemiologiche e patogenetiche delle infezioni morbillivirali nei mammiferi acquatici, infezioni che si sono rivelate in grado di compromettere seriamente la sopravvivenza di specie animali a rischio di estinzione e che si connotano, a pieno titolo, quali validi modelli di studio in ambito di patologia comparata.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia sentitamente il Dott. A. Trudgett (Queen's University, Belfast, Irlanda del Nord, UK) per aver fornito gli anticorpi monoclonali (MoAbs) anti-PVD utilizzati nel presente lavoro.

## BIBLIOGRAFIA

Barrett T., Blixenkron-Moller M., Di Guardo G., Domingo M., Duignan P., Hall A., Mamaev L. & Osterhaus A.D.M.E. (1995) Morbilliviruses in aquatic mammals: report on round table discussion. *Veterinary Microbiology*, 44 (2-4): 261-265.

Blixenkron-Moller M., Bolt G., Gottschalk E. & Kenter M. (1994). Comparative analysis of the gene encoding the nucleocapsid protein of dolphin morbillivirus reveals its distant evolutionary relationship to measles virus and ruminant morbilliviruses. *Journal of General Virology*, 75: 2829-2834.

Blixenkron-Moller M., Svansson V., Appel M., Krosgrud J., Have P. & Orvell C. (1992). Antigenic relationships between field isolates of morbilliviruses from different carnivores. *Archives of Virology*, 123: 279-294.

Cosby S.L., McQuaid S., Duffy N., Lyons C., Rima B., Allan G.M., McCollough S.J., Kennedy S., Smith J.A., McNeilly F. & Craig C. (1998). Characterization of a seal morbillivirus. *Nature*, 336: 115-116.

De Swart R.L., Ross P.S., Vedder E.J., Timmermann H.H., Heisterkamp S.H., van Loveren H., Vos J.G., Reijnders P.J. & Osterhaus A.D. (1994). Impairment of immune function in harbour seals (*Phoca vitulina*) feeding on fish from polluted water. *AMBIO*, 23: 155-159.

Dietz R., Hansen C.T., Have P. & Heide-Jorgensen M.P (1989). Clue to seal epizootic. *Nature*, 338: 627.

Di Guardo G., Amaddeo D., Agrimi U. & Kennedy S. (1992a). L'infezione da Morbillivirus nei delfini ed in altre specie di mammiferi acquatici. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, 9: 23-34.

Di Guardo G., Agrimi U., Amaddeo D., McAliskey M. & Kennedy S. (1992b). Morbillivirus infection in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from the coast of Italy. *Veterinary Record*, 130: 579-580.

Di Guardo G., Agrimi U., Della Salda L., Terracciano G., Marruchella G., Bongiovanni L., Malatesta D., Romanucci M., Marà M., Palmieri C. & Kennedy S. (2003). Morbillivirus Infections in Free-Living Sea Mammals: An Overview. *Proceedings of 21<sup>st</sup> Annual ESVP Meeting*, Dublin, Ireland, 10-13 September 2003.

Domingo M., Ferrer L., Fumarola M., Marco A., Plana J., Kennedy S., McAliskey M. & Rima B.K. (1990). Morbillivirus in dolphin. *Nature*, 348: 21.

Domingo M., Visa J., Fumarola M., Marco A.J., Ferrer I., Rabanal R. & Kennedy S. (1992). Pathological and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Veterinary Pathology*, 26: 1-10.

Duignan P.J., House C., Geraci J.R., Early G., Copland H.G., Walsh M.T., Bossart G.D., Gray C., Sadove S., St Aubin D.J. & Moore M. (1995). Morbillivirus infection in two species of pilot whales (*Globicephala* sp.) from the western Atlantic. *Marine Mammal Science*, 11 : 150-162.

- Geraci J.R. (1989). Clinical investigation of the 1987-88 mass mortality of bottlenose dolphins along the US central and south Atlantic coast. *Final report to National Marine Fisheries Service, US Navy Office of Naval Research, and Marine Mammal Commission. Guelph, Ontario, Canada;*
- Harder T., Willhaus T., Leibold W. & Liess B. (1990). Morbillivirus infections of seals during the 1988 epidemic in the Bay of Heligoland: III. Transmission studies of cell culture-propagated phocine distemper virus in harbour seals (*Phoca vitulina*) and a grey seal (*Halichoerus grypus*): clinical, virological and serological results. *Journal of Veterinary Medicine B*, 37: 641-650.
- Jauniaux T. & Coignoul F. (2003). Causes of death of small cetaceans and pinnipeds on continental coastlines of the Southern North Sea. *17<sup>th</sup> Conference of the European Cetacean Society*, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, 9-13 March 2003.
- Kennedy S., Smith J.A., McCollough S.J., Allan G.M., McNeilly F. & McQuaid S. (1988a). Confirmation of cause of recent seal death. *Nature*, 335: 404.
- Kennedy S., Smith J.A., Cush P.F., McCollough S.J., Allan G.M. & McQuaid S. (1988b). Viral distemper now found in porpoises. *Nature*, 336: 21.
- Kennedy S., Smith J.A., Cush P.F., Duignan P., Platten M., McCollough S.J. & Allan G.M. (1989). Histopathologic and immunocytochemical studies of distemper in seals. *Veterinary Pathology*, 26: 97-103.
- Kennedy S., Smith J.A., Cush P.F., McAliskey M., McCollough S.J. & Rima B.K. (1991). Histopathologic and immunocytochemical studies of distemper in harbor porpoises. *Veterinary Pathology*, 28: 1-7.
- Kennedy S. (1998). Morbillivirus infections in aquatic mammals. *Journal of Comparative Pathology*, 119: 201-225.
- Kennedy S., Kuiken T., Jepson P.D., Deaville R., Forsyth M., Barrett T., van de Bildt M.W., Osterhaus A.D.M.E., Eybatov T., Duck C., Kydyrmanov A., Mitrofanov I. & Wilson S. (2000). Mass die-off of Caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerging Infectious Diseases*, 6: 637-639.
- Krafft A., Lichy J.H., Lipscomb T.P., Klaunbert B.A., Kennedy S. & Trautenberger J.H. (1995). Postmortem diagnosis of morbillivirus infection in bottle-nosed dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Atlantic and Gulf of Mexico epizootics by polymerase chain reaction-based assay. *Journal of Wildlife Diseases*, 31: 779-785.
- Mamaev L.V., Vissero I.K., Belikov S.I., Denikina N.N., Harder T., Goatley L., Rima B., Edginton B., Osterhaus A.D.M.E. & Barrett T. (1996). Canine distemper virus in Lake Baikal seals (*Phoca sibirica*). *Veterinary Record*, 138: 437-439.
- Osterhaus A.D.M.E., Groen J., UytdeHagge F.G., Visser I.K., van de Bildt M.W., Bergman A. & Klingeborn B. (1989). Distemper virus in Baikal seals. *Nature*, 338: 209-210.
- Osterhaus A.D.M.E., Groen J., Niesters H., van de Bildt M.W., Martina B., Vedder L., Vos J., van Egmond H., Sidi B.A. & Ould Barham M.E. (1997). Morbillivirus in monk seal mass mortality. *Nature*, 388: 838-839.
- Visser I.K., Van Bresse M.F., de Stewart R.L., van de Bildt M.W., Vos H.W., van der Heijden R.W., Saliki J.T., Orvell C., Kitching P., Kuiken T., Barrett T. & Osterhaus A.D.M.E. (1993). Characterization of morbilliviruses isolated from dolphins and porpoises in Europe. *Journal of General Virology*, 74: 631-641.