

Herpesvirus equino 1 e 4: linee guida per la diagnostica di laboratorio

Dott.ssa Susanna Mereghetti

Nell'ultimo mese la movimentazione degli equini sportivi in tutta Europa ha subito delle pesanti limitazioni a causa dei recenti casi di Herpesvirus equino, precisamente di un ceppo neuropatogeno del sierotipo 1 che si è dimostrato particolarmente diffusivo.

Esistono **5 sierotipi** conosciuti di Herpesvirus equino: le varianti 1 e 4 appaiono correlate geneticamente e responsabili di quadri clinici patologici simili. In particolare la variante EHV1 ha dimostrato di poter causare, oltre alla consueta forma respiratoria, anche aborto, natimortalità, vasculite, uveite e la grave forma neurologica denominata *Mieloencefalopatia da Herpesvirus equino (EHM)*. Entrambi questi sierotipi sono inoltre in grado di produrre forme latenti con periodiche rivirulenzioni - con o senza sintomatologia evidente - che creano i cosiddetti soggetti "**diffusori asintomatici**", piuttosto difficili da rilevare, ma che svolgono un'importanza strategica cruciale nella diffusione del virus.

Il **contagio** avviene principalmente tramite l'aerosol delle secrezioni respiratorie, con contatto diretto tra soggetti ma anche indirettamente tramite fomite e persone che possono veicolare il virus venendo in contatto con secrezioni, liquidi ed invogli fetali abortiti. Il virus può permanere sulle superfici anche una settimana, fortunatamente è sensibile alla maggior parte dei detergenti e disinfettanti e **non è responsabile di zoonosi**.

La **prima porta di ingresso** del virus è la mucosa nasale, dove si deposita ed entra rapidamente nelle cellule dell'epitelio nasale, moltiplicandosi attivamente e proteggendosi in

questo modo dall'azione degli eventuali anticorpi circolanti. Di seguito si diffonde nell'organismo causando viremia già dopo 12 ore. I **primi sintomi** (febbre altalenante, tosse, scolo oculo-nasale mucoide, inappetenza, ingrossamento dei linfonodi) appaiono di solito dai 2 ai 10 giorni dopo l'infezione: questa fase può passare inosservata nei soggetti vaccinati o che hanno già avuto un contatto con il virus nell'arco della loro vita. Può seguire l'**aborto** nelle fattrici gravide, causato da trombosi ed infezione endoteliale dei vasi placentari, con viremia e morte fetale improvvisa. Questa evenienza può verificarsi dopo un tempo variabile da 2 settimane fino a tre mesi dopo l'infezione, preferibilmente verso fine gravidanza (10° - 11° mese di gestazione).

La **forma neurologica** invece si sviluppa se sono colpite le cellule endoteliali dei microcapillari che circondano il midollo allungato ed il cervello, causando una rottura della barriera vascolare che, assieme alla viremia persistente, permette al virus di localizzarsi in questo distretto. I danni sono dovuti sia all'azione diretta del virus sugli endoteli vasali che alla formazione di immunocomplessi e microcoaguli che peggiorano la vasculite e causano infine una grave encefalomalacia necrotica, responsabile dei deficit neurologici. I **sintomi principali** sono incoordinazione, letargia, difficoltà ad urinare o incontinenza, paralisi flaccida della coda ed insensibilità della cute degli arti posteriori. In alcuni casi si rileva una paralisi completa del posteriore con decubito permanente, per cui si richiede l'eutanasia.

I soggetti che sviluppano la forma neurologica di solito mostrano minor sintomatologia respiratoria ma picchi più alti di febbre e viremia, cosa che si è visto agevolare l'ingresso del virus nel sistema nervoso. I sintomi neurologici peggiorano rapidamente nell'arco delle prime 24/48 ore. Nei soggetti che superano la malattia il miglioramento dei deficit è comunque lento e richiede lunghe terapie di supporto.

Sono possibili **reinfezioni** in quanto l'immunità (anche vaccinale) è parziale e di breve durata (4–6 mesi). Abbiamo già affermato che il virus dopo un primo contatto può permanere in forma latente localizzandosi anche per lungo tempo nelle cellule della serie bianca, pronto a rivirulentarsi in caso di stress, trasporti, surmenage atletico, gravidanza e/o parto: in queste occasioni il cavallo diventa escretore per periodi variabili dai 7 fino ai 28 giorni, con o senza sintomatologia concomitante.

La forma neurologica è prevalentemente causata da una mutazione neuropatogena del gene ORF30 di un ceppo del tipo 1 (denominato D752) che lo rende dotato di spiccato neurotropismo. Va considerato che anche alcuni ceppi 4 e il ceppo 1 senza mutazione (chiamato N752) possono comunque determinare, in soggetti predisposti, questa grave complicanza.

Test sierologici

Metodica ELISA su siero

La produzione di anticorpi circolanti (IgM ed IgG) avviene dopo circa una settimana dal contatto virale, conseguentemente alla prima viremia. Molti soggetti vengono in contatto con il virus addirittura al momento del parto o dello svezzamento sviluppando lunghi periodi di latenza, quindi per una corretta diagnosi sierologica dobbiamo valutare l'eventuale *sieroconversione*, ovvero il deciso aumento del titolo in un arco temporale di 14–21 giorni, indice di

contatto e replicazione virale recente, procedendo come segue:

- un primo prelievo in fase acuta, ovvero tra 1 e 3 giorni dall'insorgenza dei primi sintomi respiratori
- un secondo prelievo in fase convalescente (dalle 2 alle 4 settimane dopo il primo prelievo)
- confronto del titolo anticorpale: deve essere aumentato di almeno di 2 volte.

Una semplice positività, anche a titolo elevato superiore alla soglia data dal laboratorio, non permette una diagnosi di sicurezza.

Nella forma abortiva non è possibile effettuare una sieroconversione in quanto l'espulsione del feto avviene successivamente alla forma respiratoria e quindi il siero prelevato in questo momento è da considerarsi già convalescente.

Isolamento virale

PCR su tampone nasale

Si tratta della metodica che permette di stabilire se un soggetto – anche asintomatico – possa essere escretore del virus: viene infatti rilevata la presenza di parti di DNA virale sulla mucosa nasale che, come sappiamo, è sia la porta di ingresso che di escrezione del virus nell'animale malato. È possibile utilizzare un normale tampone da batteriologia, avendo cura di NON immergerlo nell'apposito contenitore con il medium, ma di tagliarlo ed immergerlo in una provetta vuota / contenitore sterile (tappo rosso o nero), senza alcuna aggiunta.

Si tratta di una PCR qualitativa e non è possibile quantizzare il carico virale: le linee guida di biosicurezza europee (ECEIM – BEVA) prevedono comunque la quarantena di un positivo escretore, a prescindere dall'entità dell'escrezione.

Metodica di esecuzione:

- pulire le narici per evitare contaminazione da polvere o sporcizia
- introdurre il tampone profondamente in entrambe le narici, avendo cura di evitare la falsa narice
- girare il tampone più volte, avendo cura di toccare le pareti del meato nasale in tutte le direzioni, in modo da permettere alle secrezioni di imbibire il cotone
- estrarre il tampone e introdurlo nel contenitore a secco

È possibile utilizzare un tampone per singola narice: i due tamponi verranno conteggiati come singolo test (ovviamente se appartenenti al medesimo soggetto).

Laboklin dispone di un pacchetto PCR apposito comprendente sia EHV1 (con la differenziazione del ceppo neuropatogeno) che EHV4 a prezzo particolarmente conveniente.

PCR su sangue in EDTA

Il sangue rappresenta un materiale idoneo se utilizzato su animali sintomatici con febbre e viremia, oppure per i cavalli colpiti dalla forma neurologica che possono non mostrare sintomi respiratori. La ricerca del DNA virale viene effettuata lisando le cellule della serie bianca.

Metodica di esecuzione: si tratta di effettuare un normale prelievo di sangue in EDTA come per un esame emocromocitometrico, non sussistono particolari raccomandazioni per la conservazione del campione e questo materiale può essere spedito senza ulteriori accorgimenti.

PCR su liquor

L'esecuzione di questo test su liquido cefalorachidiano è indicata per i cavalli affetti dalla forma neurologica, sia in vita che post-mortem.

La presenza del virus in questo materiale non è frequente anche in presenza di sintomatologia nervosa grave, in quanto il danno vascolare ed immunomediato interessa prevalentemente i vasi perineuronali e la penetrazione del virus nel tessuto nervoso si verifica solo con un danno endoteliale importante con formazione di microtrombi, microemorragie, edema e necrosi ischemica massiva del tessuto nervoso.

Per questo motivo si consiglia di abbinare alla PCR anche un esame completo del liquor, a integrazione della procedura diagnostica, con particolare attenzione per la rilevazione di:

- iperproteinemia con conta cellulare normale
- xantocromia (per denaturazione dell'eme)
- presenza di eritrociti, anticorpi e leucocitosi ma solamente quando il danno vascolare è molto esteso.

PCR su feto ed invogli

In caso di aborto è possibile inviare al laboratorio parti di tessuti patologici come invogli fetali e placenta, immettendoli in soluzione fisiologica oppure effettuando tamponi a secco sulle lesioni riscontrabili, in parallelo ad uguale materiale immerso in formalina per l'istologia. I tessuti fissati non possono essere sottoposti a PCR ma possono confermare la presenza delle caratteristiche lesioni necrotico-ischemiche (corpi inclusi intranucleari eosinofili) sia a livello di timo, polmone, fegato, milza del puledro che degli invogli.

PCR su tessuti da necropsia

Nei soggetti adulti, venuti a morte, affetti dalla forma respiratoria o abortiva, le indicazioni per la raccolta dei tessuti diagnostici sono gli stessi elencati per i feti abortiti, sia per quanto riguarda l'esecuzione di PCR che per l'istologia.

Per i soggetti colpiti dalla forma neurologica sono indicati invece un esame del liquor (biochimico ed una eventuale PCR), una PCR su tessuti nervosi immessi in soluzione fisiologica ed un esame istologico di parti di tessuto cerebrale e midollo allungato posti in formalina al 5%. Le lesioni tipiche di questo distretto sono costituite da un'encefalomalacia necrotica causata dalla vasculite trombotica dei piccoli vasi con estesi manicotti perivascolari di infiltrati linfocitari causata dal virus.

La possibilità di effettuare una veloce ed affidabile diagnosi dei casi conclamati, unitamente all'attuazione di stretti protocolli di isolamento degli infetti con un'attenta igiene nella gestione delle scuderie, oltre alla predisposizione di un'idonea quarantena con controllo della temperatura (sospetta oltre i 38,3°C), in parallelo all'esecuzione di tamponi o test sierologici ad intervalli di 7/14 giorni nei soggetti anche asintomatici, permette di arginare la diffusione del virus.

Per ulteriori indicazioni si consiglia di visionare le apposite note ECEIM e CeRMe che forniscono chiare direttive logistiche per il controllo della diffusione degli Herpesvirus equini.