



UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie
Corso di Laurea Specialistica a ciclo unico in Medicina Veterinaria

RINOPOLMONITE EQUINA: NON SOLO MALATTIA RESPIRATORIA

EQUINE HERPESVIRUS 1: NOT JUST A RESPIRATORY DISEASE

Relatore: Chiar. mo Prof. Sandro Cavarani

Laureanda:
Salomee Iacono

ANNO ACCADEMICO 2020/2021

A mio padre

INDICE

INDICE.....	1
ABSTRACT.....	3
RIASSUNTO	4
INTRODUZIONE.....	5
1 RINOPOLMONITE EQUINA	6
1.1 EZIOLOGIA	6
1.2 PATOGENESI EHV-1	8
1.2.1 VIA DI TRASMISSIONE	8
1.2.2 REPLICAZIONE NELLE VIE RESPIRATORIE SUPERIORI ..	9
1.2.3 REPLICAZIONE NEI LINFONODI E VIREMIA CELLULO- ASSOCIATA	10
1.2.4 LATENZA	11
1.2.5 REPLICAZIONE SECONDARIA	12
1.3 MUTAZIONE	14
2 EHV-1 NEUROPATHOGENO	16
2.1 LESIONI.....	16
2.2 SINTOMATOLOGIA	16
2.3 EVASIONE DEL SISTEMA IMMUNITARIO.....	19
2.3.1 LIMITATA REPLICAZIONE DI EHV-1 NELLE ALTE VIE RESPIRATORIE.....	20
2.3.2 MECCANISMO DI DIFFUSIONE DI EHV-1: “ <i>TROJAN HORSE</i> ”	22
2.3.3 EHV-1 DAI LEUCOCITI ALLE CELLULE ENDOTELIALI: FINE “ <i>TROJAN HORSE</i> ”	24

2.3.4	OSSERVAZIONI SULL'EVASIONE DEL SISTEMA IMMUNITARIO DA PARTE DI EHV-1	26
2.4	FATTORI DI RISCHIO PER L'INSORGENZA DI EHM	27
2.5	FOCOLAIO DI VALENCIA 2021	29
CAPITOLO 3 DIAGNOSI, TRATTAMENTO E PROFILASSI.....		33
3.1	DIAGNOSI	33
3.1.1	ANALISI DEL LIQUIDO CEREBROSPINALE	34
3.1.2	ISOLAMENTO DEL VIRUS	34
3.1.3	PCR.....	35
3.1.4	ESAME ISTOPATOLOGICO.....	36
3.1.5	ANALISI SIEROLOGICHE.....	36
3.2	TRATTAMENTO	38
3.3	PROFILASSI	41
3.3.1	VACCINAZIONE.....	41
3.3.2	MISURE PREVENTIVE PER RIDURRE IL RISCHIO DI INFEZIONE DA EHV-1	43
4	CONCLUSIONI.....	47
BIBLIOGRAFIA		49

ABSTRACT

Equine Herpesvirus (EHV) is a common pathogen affecting horses with a worldwide distribution; the two most frequently isolated pathogens are EHV-1 and EHV-4 and are etiological agents of "Equine Rhinopneumonitis".

EHV-1 is responsible for multiple clinical manifestations such as respiratory symptoms, abortion and neurological symptoms known as "Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy" (EHM).

The pathogenesis is characterized by a first replication of the virus in the upper respiratory tract, followed by a phase of latency and subsequent cell-associated viremia, which allows the spread of the virus to target organs, such as central nervous system (CNS) and / or pregnant uterus. Vasculitis and thrombosis develop in these structures, causing abortion and neurological disease. EHV-1, within lymphocytes, does not express viral proteins; consequently it is protected from the immune response.

The origin of EHM is associated with the A2254 → G2254 mutation in ORF30 which encodes the EHV-1 DNA polymerase. The symptoms, which are observed during EHM infection, range from temporary ataxia and paresis, up to paralysis and death of the animal. Neurological symptoms occur when viral excretion is reduced or absent; consequently the diagnostic tests, which search for the viral agent, can result as "false negatives".

Treatment of EHM is not specific, but is aimed at managing horses and reducing inflammation of the CNS, with the supply of corticosteroids since the inflammation is immunological.

Prophylaxis is vaccinal, even if the vaccines currently available have no preventive action against EHM. Furthermore, the preventive measures put in place to reduce the risks of EHV-1 infection are important.

RIASSUNTO

L'Herpesvirus Equino (EHV) è un patogeno comune dei cavalli con distribuzione mondiale; i due patogeni più frequentemente isolati sono EHV-1 ed EHV-4 e sono agenti eziologici della "Rinopomonte Equina".

EHV-1 è responsabile di più manifestazioni cliniche quali sintomatologia respiratoria, aborto e sintomatologia neurologica conosciuta come "*Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy*" (EHM).

La patogenesi è caratterizzata da una prima replicazione del virus nel tratto respiratorio superiore, segue una fase di latenza e successiva viremia cellulosa associata, che permette la diffusione del virus agli organi bersaglio, quali sistema nervoso centrale (SNC) e/o utero gravido. In queste strutture si sviluppano vasculite e trombosi che danno origine ad aborto e malattia neurologica. EHV-1, all'interno dei linfociti, non esprime le proteine virali; di conseguenza è protetto dalla risposta immunitaria.

L'origine di EHM è associata alla mutazione A2254→G2254 in ORF30 che codifica per la DNA polimerasi di EHV-1. La sintomatologia, che si osserva in corso di infezione da EHM, va da atassia e paresi temporanei, fino a paralisi e morte dell'animale. La sintomatologia neurologica si manifesta quando l'escrezione virale è ridotta o assente; di conseguenza i test diagnostici, che ricercano l'agente virale, possono risultare come falsi negativi.

Il trattamento nei confronti di EHM non è specifico, ma è volto alla gestione dei cavalli e a ridurre l'infiammazione del SNC, con somministrazione di corticosteroidi poiché l'infiammazione è su base immunologica.

La profilassi è vaccinale, anche se i vaccini attualmente disponibili non hanno azione preventiva nei confronti di EHM. Inoltre risultano essere importanti le misure preventive messe in atto per ridurre i rischi di infezione da EHV-1.

INTRODUZIONE

L'Herpesvirus Equino (EHV) è un patogeno comune dei cavalli (*Equus ferus caballus*) con distribuzione mondiale. I due herpesvirus più conosciuti e frequentemente isolati sono EHV-1 ed EHV-4.

Sebbene i due virus abbiano delle analogie dal punto di vista genetico ed antigenico, differiscono per quanto concerne lo spettro d'ospite e la patogenicità. EHV-4 interessa principalmente gli equidi, mentre EHV-1 è stato descritto anche in specie diverse da equidi quali daino (*Dama dama*), bovino (*Bos taurus*), antilope (*Antilope cervicapra*), lama (*Lama glama*), alpaca (*Vicugna pacos*) e gazzella (*Gazela*). (I.Z.S.L.T. CeRME, 2021)

La malattia causata da EHV-1 e EHV-4 prende il nome di “Rinopolmonite Equina”.

EHV-1 è responsabile di più manifestazioni cliniche. Può determinare l'insorgenza di una malattia respiratoria lieve, che colpisce cavalli di età inferiore ai due anni, aborto, che si verifica nel terzo trimestre di gravidanza e infine forme neurologiche, conosciute come “*Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy*”.

Nonostante l'elevata prevalenza di soggetti infetti, spesso l'infezione decorre in forma subclinica o con lieve sintomatologia respiratoria. Nell'ultimo decennio, però, negli Stati Uniti ed Europa si è registrato un incremento dei casi di mieloencefalopatia sostenuta da EHV-1, destando preoccupazione nell'ambiente veterinario e dei proprietari di cavalli. (Dunowska, A review of equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part B: pathogenesis and epidemiology, 2014)

Lo scopo di questo elaborato di tesi è di approfondire l'eziologia, la patogenesi e la risposta immunitaria indotta da EHV-1, con particolare interesse sulla forma neuropatogena.

1 RINOPOLMONITE EQUINA

1.1 EZIOLOGIA

L'agente eziologico della Rinopolmonite Equina è un virus a DNA, provvisto di envelope, appartenente alla famiglia *Herpesviridae*. Questa è costituita da tre sottofamiglie: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*, che si differenziano per morfologia e proprietà biologiche.

Gli *Alphaherpesvirinae* hanno un ciclo replicativo relativamente breve al quale può seguire un periodo di latenza nei neuroni sensoriali oppure nei linfociti dei loro ospiti. Durante il periodo di latenza, la patogenicità virale è assente. Nelle cellule infette, dove replicano, causano effetti citopatici e lo sviluppo di corpi inclusi eosinofili intranucleari.

I *Betaherpesvirinae* hanno un lungo ciclo replicativo e il loro rilascio, dalle cellule infette, è inefficace. L'infezione latente si stabilisce prevalentemente nei monociti o nei macrofagi.

I *Gammaherpesvirinae* sono virus a replicazione lenta e la latenza si sviluppa nei linfociti T e B. (Fatai S. Oladunni, 2019)

Negli equidi sono stati identificati nove sierotipi.

- EHV-1 sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* (rinopolmonite)
- EHV-3 sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* (esantema coitale)
- EHV-4 sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* (rinopolmonite)
- EHV-6 sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* (malattia respiratoria lieve nell'asino)
- EHV-8 sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* (malattia respiratoria moderata nell'asino)
- EHV-9 sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* (encefalite nella gazzella)
- EHV-2 sottofamiglia *Gammaherpesvirinae* (linfadenite a paratiroidi)
- EHV-5 sottofamiglia *Gammaherpesvirinae* (fibrosi polmonare letale)

- EHV-7 sottofamiglia *Gammaherpesvirinae* (pomonite ed encefalite)

EHV-1 e EHV-4 sono gli herpesvirus più rilevanti che colpiscono gli equidi e, fino al 1983, erano considerati sottotipi di una stessa specie di virus. Il DNA di entrambi i virus è in conformazione D-DNA, a doppio filamento lineare, composto da un'unica regione lunga (UL) e da un unico segmento corto (US). Il genoma di EHV-1 ha delle dimensioni di circa 150kbp e contiene almeno 76 geni distinti; quattro di questi geni risultano duplicati, per un totale di 80 ORF.

Il genoma di EHV-4 ha delle dimensioni leggermente inferiori, 146 kbp per un totale di 79 ORF. Tra EHV-1 e EHV-4 vi può essere un'analogia genetica che varia dal 55% (gene 76) all'84% (gene 42). Nonostante questo alto grado di somiglianza genetica, e quindi antigenica, presentano delle notevoli differenze circa la loro patogenesi. (Guanggang, Azab, & Osterrieder, 2013)

Dal punto di vista della sopravvivenza nell'ambiente esterno, EHV-1 e EHV-4 sono poco resistenti e labili ai trattamenti con detergenti, solventi lipidici, calore e comuni disinfettanti. Pertanto, si ritiene che il virus non sopravviva bene al di fuori del suo ospite. Tuttavia, sperimentalmente, EHV-1 essiccato su carta, legno o corda, è sopravvissuto fino a una settimana; fino a 35 giorni su crine di cavallo o su tela.

Quindi, nonostante la sua natura fragile, EHV-1 può rimanere infettivo su fomite per circa un mese. (Dunowska, A review of equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part B: pathogenesis and epidemiology, 2014)

1.2 PATOGENESI EHV-1

1.2.1 VIA DI TRASMISSIONE

L'esposizione dei cavalli a EHV-1 e/o EHV-4 si verifica molto presto; circa l'80-90% dei cavalli risulta essere infetto, da uno dei due patogeni, già a 2 anni di vita.

L'infezione da EHV-1 presenta un'elevata morbilità. La via di trasmissione del virus è respiratoria, e avviene attraverso il contatto con soggetti infetti in fase acuta, oppure con un cavallo nel quale si è avuta la riattivazione del virus.

Altre modalità di trasmissione sono il contatto con un feto abortito, una placenta ricca di particelle virali infette, ma anche materiali infettivi come fomite e aerosol.

Nella trasmissione di EHV-1, le cavalle e i puledri risultano essere degli importanti serbatoi. La trasmissione del virus può avvenire prima e dopo lo svezzamento, determinando nei puledri un'infezione nei primi trenta giorni di vita. Le cavalle infette, in particolar modo quelle che presentano EHV-1 in forma latente, fungono da continua fonte di esposizione virale ai puledri, stabilendo una trasmissione orizzontale durante l'allattamento. Le fattrici possono subire la recrudescenza di un'infezione virale latente a seguito dello stress derivante dalla gravidanza e dal parto. (Oladunni, Horohov, & Chambers, 2019)

1.2.2 REPLICAZIONE NELLE VIE RESPIRATORIE SUPERIORI

A seguito dell'infezione, la prima replicazione virale avviene nelle cellule del tratto respiratorio superiore, a livello, quindi, di cavità nasali, rinofaringe e trachea. La lesione che si osserva, a partire da 2-7 giorni post infezione, è la formazione di placche a carico dell'epitelio della mucosa respiratoria.

L'infezione primaria causa la distruzione delle cellule respiratorie, l'instaurarsi di un processo flogistico e una lieve sintomatologia clinica (stato febbrile e secrezione nasale sierosa) osservabile già dopo due giorni dall'infezione.

Nei cavalli adulti, la maggior parte delle infezioni da EHV-1 è autolimitante e i sintomi respiratori scompaiono nell'arco di 9-12 giorni.

I cavalli giovani, invece, possono sviluppare sintomi clinici più gravi, come febbre alta, linfadenomegalia dei linfonodi sottomandibolari e retrofaringei. La secrezione nasale può diventare mucopurulenta, per infezioni batteriche secondarie, e contribuire allo sviluppo della rinopolmonite.

Recenti studi hanno evidenziato che determinate circostanze ambientali stimolano la replicazione di EHV-1 nelle vie respiratorie superiori; ad esempio si è dimostrato che il polline delle piante contiene proteasi che alterano selettivamente ed irreversibilmente le giunzioni intercellulari delle cellule epiteliali respiratorie degli equini.

È interessante notare che le concentrazioni di polline nell'aria esterna raggiungono il picco tra la fine dell'inverno e la primavera, periodo che coincide con un'elevata incidenza di sintomi (malattie respiratorie, aborti e mieloencefalopatie) associati all'EHV-1 e osservati stagionalmente. (Laval, et al., 2021)

1.2.3 REPLICAZIONE NEI LINFONODI E VIREMIA CELLULO-ASSOCIATA

Dopo l'infezione dell'epitelio respiratorio, EHV-1 attraversa la membrana facendosi trasportare dai leucociti infetti. Le cellule interessate sono principalmente cellule CD172a+ (di origine mieloide), seguite da linfociti T e linfociti B. Dopo aver attraversato la membrana basale, i leucociti infetti da EHV-1 penetrano nei tessuti connettivi e raggiungono il flusso sanguigno e i linfonodi drenanti.

Entro le 24-48 ore post infezione, gli antigeni di EHV-1, così come il virus, possono essere rilevati nei linfonodi sottomandibolari, retrofaringei e bronchiali. L'infezione si amplifica per via dell'immissione di leucociti infetti nella circolazione sanguigna, attraverso la linfa efferente. Ne segue una viremia cellulo-associata nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC). La viremia cellulo-associata è un prerequisito per la diffusione dell'EHV-1 agli organi bersaglio come il sistema nervoso centrale (SNC) e/o l'utero gravido. In corso di viremia si manifesta linfadenomegalia e febbre. (Laval, et al., 2021)

I leucociti infetti da EHV-1 diffondono il virus a vari organi. L'infezione delle cellule endoteliali dei vasi sanguigni nell'utero gravido e nel SNC provoca una grave vasculite e trombosi multifocale, che si ritiene siano responsabili, rispettivamente, dell'aborto e delle malattie neurologiche. I fattori, che sono importanti per l'inizio dell'infezione delle cellule endoteliali da parte di leucociti EHV-1-positivi, non sono ancora chiari. Il processo può essere facilitato dai cambiamenti delle molecole di superficie cellulare espresse dalle cellule endoteliali dell'utero gravido, che si manifestano nelle fasi successive della gravidanza.

Altri meccanismi, non ancora identificati, permettono la traslocazione di EHV-1 alle cellule endoteliali del SNC.

In entrambi i casi, la capacità di infettare le cellule endoteliali comprende un'importante caratteristica biologica del virus, poiché gli isolati EHV-1 virulenti sono più endoteliotropici degli isolati EHV-1 a bassa virulenza. (Dunowska, A review of equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part B: pathogenesis and epidemiology, 2014)

1.2.4 LATENZA

La latenza degli alphaherpesvirus è un'importante strategia epidemiologica che garantisce la sopravvivenza e la diffusione del virus all'interno della popolazione ospite. (Patel & Heldens, 2005)

In fase di latenza, gli animali non mostrano segni clinici della malattia, non diffondono il virus e la viremia è assente. Segno distintivo della latenza è la restrizione dell'espressione genica virale che culmina nella mancata sintesi dei fattori virali e nell'assenza di particelle virali infettive. Il virus è in grado di stabilire latenza in diverse sedi, come linfociti T CD5+/CD8+ e corpi delle cellule nervose sensoriali all'interno dei gangli del trigemino. (Fatai S. Oladunni, 2019).

Queste cellule neuronali hanno assenti o bassi livelli di espressione di MHC di classe I, e non sono soggetti a normali meccanismi di sorveglianza immunitaria. (Favoreel, Nauwynck, & Pensaert, 2000)

Oltre a queste sedi, EHV-1 stabilisce latenza nei tessuti linfoidei mandibolari, retrofaringei e bronchiali che sono associati alle vie respiratorie.

Situazioni stressanti possono riattivare il virus dopo mesi o anni dall'infezione primaria. Si verifica la replicazione di EHV-1 e le particelle si diffondono, dai linfociti T infetti o dai neuroni del ganglio del trigemino infetti, all'epitelio respiratorio dove ha inizio l'infezione. La presenza di un recettore EHV-1 situato sull'epitelio respiratorio è un vantaggio per il virus per legare e infettare efficacemente le cellule epiteliali dopo la riattivazione.

I cicli di latenza e riattivazione di EHV-1 nei cavalli portano alla diffusione del virus infettivo e alla trasmissione a nuovi ospiti, consentendo il mantenimento del virus nella popolazione. Inoltre, le cellule infette latenti sfuggono alla sorveglianza immunitaria e costituiscono un serbatoio permanente del virus, che è difficile da eliminare con le terapie antivirali convenzionali e i piani vaccinali. Si stima che la maggior parte dei cavalli (>60%) presenti un'infezione da EHV-1 in forma latente. (Laval, et al., 2021)

1.2.5 REPLICAZIONE SECONDARIA

Nella circolazione sanguigna, i leucociti infetti possono aderire e successivamente trasferire l'EHV-1 alle cellule endoteliali (EC) che rivestono i vasi sanguigni degli organi bersaglio, come l'utero gravido o il SNC. L'infezione dell'EC, localizzato nel sistema vascolare dell'utero gravido tardivo o del SNC, è mediata da contatti cellula-cellula tra PBMC infetti ed EC. Le molecole di adesione presenti sulla superficie dell'EC [ad esempio molecola di adesione intracellulare E-selectin e P-selectin] e dei leucociti [ad esempio integrine $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_L\beta_2$, e $\alpha_V\beta_3$] hanno dimostrato un ruolo importante nell'infezione dell'endotelio vascolare.

La replicazione secondaria nell'EC dell'utero gravido provoca vasculite e trombosi multifocale che colpiscono, in particolare, i piccoli rami arteriolarari nello strato ghiandolare dell'endometrio alla base dei microcotiledoni.

La replicazione secondaria nelle EC che rivestono i vasi sanguigni del SNC può causare vasculite, con o senza emorragia locale, e necrosi trombo-ischemica nel cervello e nel midollo spinale. La mancanza di nutrienti e ossigeno, e gli elevati livelli di citochine infiammatorie, causano la degenerazione dei neuroni, generando la mieloencefalite da EHV-1.

Infine, nei cavalli infetti, la replicazione secondaria di EHV-1 nel sistema vascolare dell'occhio può causare lesioni corioretiniche multifocali. Questo

tipo di lesione è causato da un danno endoteliale, con conseguente danno ischemico alla corioretina. (Laval, et al., 2021)

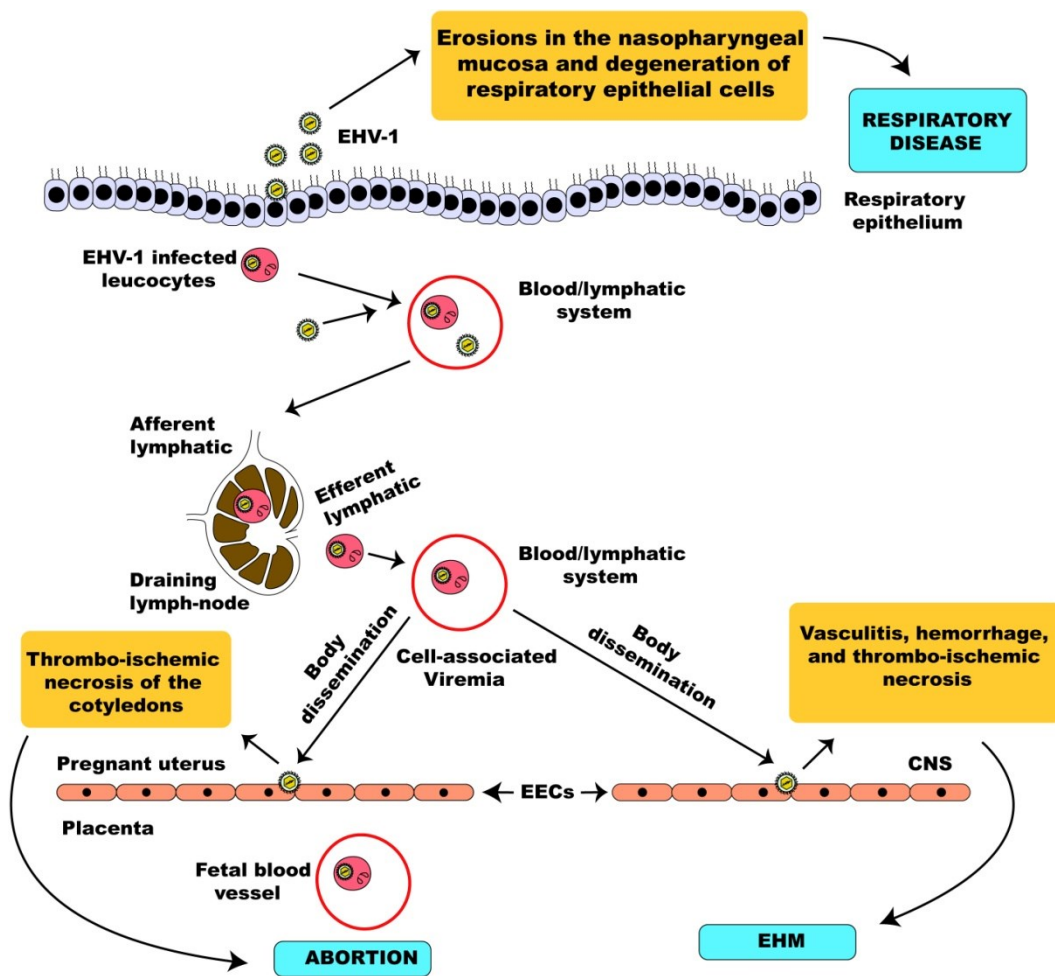


Figura 1 Illustrazione schematica della patogenesi di EHV-1 (Oladunni, Horohov, & Chambers, 2019)

1.3 MUTAZIONE

Nei cavalli domestici focolai di malattie, simili a mieloencefalopatie da EHV-1 (EHM), sono registrati da secoli. Ad oggi, l'incremento del numero di casi di EHM ha reso necessario classificarla come malattia emergente nel cavallo.

Un incremento dei numeri di focolai si è registrato soprattutto nell'America del Nord e in Europa, ma anche in Africa, Asia e Oceania sono stati segnalati dei casi.

La recente maggiore incidenza di EHM durante le epidemie di EHV-1 fa supporre che il ceppo neuropatogeno EHV-1, attualmente in circolazione, si sia evoluto in un ceppo più patogeno, determinando un tasso di morbilità e mortalità superiore al passato. (Oladunni, Horohov, & Chambers, 2019)

I segni neurologici di EHM vanno da atassia e paresi temporanei, fino a paralisi e morte dell'animale. Le epidemie possono avere conseguenze devastanti in termini di mortalità animale, chiusura di strutture con equidi e restrizioni alla movimentazione dei cavalli. (Nugent & Paillot, 2009)

L'origine dell'EHM è associata alla mutazione A2254→G2254 in ORF30 che codifica per la DNA polimerasi di EHV-1. Generalmente, i ceppi non neuropatogeni possiedono l'asparagina in posizione 752 della DNA polimerasi; questa è sostituita da acido aspartico in ceppi neuropatogeni. (Oladunni, Horohov, & Chambers, 2019)

Di conseguenza il ceppo non neuropatogeno viene definito variante N752, mentre il ceppo neuropatogeno variante D752. È stato dimostrato che oltre l'86% di focolai neuropatogeni sono causati dalla variante D752, e che più del 95% dei focolai non neuropatogeni hanno origine dalla variante N752. (Laval, et al., 2021)

Studi sperimentali sulle infezioni hanno dimostrato che il potenziale patogeno e la capacità di indurre segni neurologici della variante N752 di EHV-1 DNA

polimerasi, è inferiore rispetto alla variante D752. Questa ridotta virulenza è associata a livelli più bassi di viremia. Si ritiene che la viremia di EHV-1, associata ai leucociti, sia un aspetto importante della progressione dell'infezione e dell'instaurarsi della mieloencefalopatia. A seguito dell'infezione delle cellule endoteliali, il processo flogistico che ne segue provoca un danno tromboischemico del tessuto neuronale con sequele neurologiche.

Gli studi hanno dimostrato che la variante D752, infettante i linfociti T CD4+, può essere rilevante per il potere patogeno di EHV-1. Questi linfociti svolgono ruoli chiave sia nelle risposte infiammatorie, ma anche nella fase litica e di latenza dell'infezione.

Si è inoltre osservato che il periodo infettivo, negli animali infetti con la variante D752, è più lungo; può essere che la risposta immunitaria mucosale e sistemica, nei confronti della variante N752, sia più efficace rispetto alla variante D752; in questo modo si riduce il periodo di escrezione del virus.

Tuttavia, nei primi due giorni di infezione, è stato riscontrato che, nelle secrezioni nasali, la concentrazione della variante N752 aveva valori simili alla variante D752. Questi risultati suggeriscono che la variante N752 mostra diminuzione della gravità della malattia e della mortalità, senza una sostanziale riduzione della diffusione e trasmissione del virus, coerentemente con la sua maggiore prevalenza. (Goodman, et al., 2007)

In conclusione, l'infezione da ceppi neuropatogeni non comporta inevitabilmente una manifestazione clinica neurologica. L'esito clinico, all'interno di un focolaio, è modulato da diversi fattori quali l'età, l'immunità dell'ospite, la dose infettante e lo stato ormonale. Di conseguenza, la prevalenza di casi con sintomi neurologici, in corso di infezione da un ceppo neuropatogeno, varia per ogni focolaio. (J.Nugent, et al., 2006)

2 EHV-1 NEUROPATOGENO

2.1 LESIONI

L'endotelio vascolare del SNC funge da sito preferenziale per la replicazione secondaria di EHV-1. L'invasione delle cellule endoteliali e la flogosi che ne segue sono fondamentali per la sindrome neurologica da EHV-1.

La vasculite, risultante dall'infezione, può essere il risultato di due diversi eventi; in primo luogo il danno diretto all'endotelio vascolare durante la replicazione di EHV-1 e, in secondo luogo, la formazione di immunocomplessi tra EHV-1 e anticorpi.

Caratteristiche comuni della forma neurologica di EHV-1 sono lo sviluppo di vasculite, con o senza emorragia, e necrosi trombo-ischemica del microcircolo del cervello o SNC. In effetti, la capacità di alcuni ceppi di EHV-1 di infliggere danni al SNC non riflette il loro tratto neurotropico, ma un attributo endoteliotropico. (Oladunni, Horohov, & Chambers, 2019)

2.2 SINTOMATOLOGIA

A seguito dell'infezione da parte di EHV-1, è possibile osservare una sintomatologia neurologica. Si avranno, quindi, casi di aborto dovuti all'infezione da EHV-1, ma anche manifestazioni sporadiche o focolai di EHM. La causa di infezione può essere esogena, diffusione di EHV-1, oppure endogena, per riattivazione di un virus in fase di latenza. Per tale motivo è difficile definire il periodo di incubazione di EHM, perché l'infezione primaria di EHV-1 potrebbe essere avvenuta mesi prima della manifestazione neurologica. (Dunowska, 2014)

Nelle infezioni naturali e sperimentali, i segni neurologici compaiono da 6 a 10 giorni dopo l'infezione per via intranasale.

L'esordio della sintomatologia può essere preceduto o accompagnato da segni clinici che interessano le alte vie respiratorie, febbre, inappetenza o edema degli arti posteriori; ma, in molti casi, nessun sintomo è segnalato.

Tuttavia, nella mandria, dove si riscontrano casi di EHM, è possibile osservare uno o più dei seguenti segni clinici: infezione delle vie respiratorie, febbre, inappetenza, edema dell'arto distale, aborto, morte neonatale, diarrea del puledro.

I cavalli colpiti solo occasionalmente presentano uno stato febbrile all'inizio della malattia neurologica. I segni neurologici, generalmente, hanno un esordio acuto o iperacuto, dopodichè tendono a stabilizzarsi rapidamente e, generalmente, non progrediscono dopo il primo o secondo giorno. Atassia e paresi degli arti sono i segni più comuni, insieme ad ipotonia della coda e dell'ano.

I segni clinici sono generalmente bilaterali e simmetrici, sebbene emiparesi o insorgenza improvvisa di zoppia unilaterale, di arto anteriore o posteriore, che progredisce verso atassia, paresi e decubito, sono stati segnalati. In alcuni di questi casi sono state osservate lesioni ai nervi periferici o al midollo spinale.

Generalmente gli arti posteriori, rispetto agli arti anteriori, sono colpiti in modo più grave e precoce. Nei cavalli, che presentano una sintomatologia lieve, è possibile osservare atassia transitoria e rigidità degli arti pelvici o perdita di gocce di urina, secondaria a traboccamento da vescica atonica distesa.

I deficit propriocettivi coscienti possono essere notati come riluttanza a muoversi, goffaggine, trascinamento delle dita e/o nocche, inciampo, perno e circonduzione su uno o più arti durante il giro, con spasticità evidenti in alcuni casi; questi segni sono spesso lievi e possono passare inosservati.

I cavalli più gravemente colpiti mostrano una profonda debolezza degli arti e ondeggiamento del treno posteriore. Una piccola parte mostra una paralisi completa degli arti colpiti, che si manifesta con paraplegia e *dog sitting*

(cavallo seduto con arti posteriori estesi in avanti), decubito completo o tetraplegia.

La distensione della vescica urinaria è comune e può causare segni di coliche o gocciolamento di urina, che spesso provoca erosione nella zona del perineo, alle gambe ed altre aree.

La cistite è una complicanza frequente, in particolare quando è necessario eseguire dei frequenti cateterismi per alleviare la distensione della vescica. Gli stalloni e i cavalli castrati, affetti da EHM, possono sviluppare flaccidità del pene e parafimosi o erezioni ripetute; nelle fattrici si manifesta flaccidità vulvare.

Gli stalloni possono manifestare riduzione della libido e tumefazione dei testicoli. In presenza di edema degli arti posteriori, è possibile la presenza di edema dello scroto.

I deficit sensoriali sono rari, ma casi di analgesia o ipoalgesia perineale sono stati descritti; in un cavallo è stato segnalato analgesia della metà caudale del corpo.

I riflessi flessori sono normali e quelli perineali preservati, poiché vi è coinvolgimento della sostanza bianca. Nei cavalli in decubito, i riflessi spinali tendinei possono essere aumentati. L'atrofia raramente si osserva, anche nelle fasi successive della malattia.

I cavalli affetti, di solito, sono vigili e non sono inappetenti, sebbene alcuni mostrino modesta depressione. La grave depressione, quando si manifesta, è spesso dovuta a complicanze secondarie rispetto al coinvolgimento cerebrale primario.

Segni inequivocabili di malattie del cervello sono rari, sebbene l'infarto del tronco cerebrale possa causare depressione del sensorio, alterazione del comportamento e danni ai nervi cranici che portano a segni vestibolari e paresi linguale, mandibolare, faringea che può manifestarsi come disfagia.

Occasionalmente sono stati osservati strabismo, nistagmo, movimento di maneggio ed *head tilt*.

I cavalli affetti mostrano una progressione variabile dei segni clinici; quelli che sono lievemente colpiti si stabilizzano rapidamente, in un periodo variabile che va da ore a pochi giorni, tempo necessario per il riassorbimento dell'edema e dell'emorragia. Il recupero completo si avrà nell'arco di giorni o settimane.

Se si verifica il decubito, di solito si manifesta nelle prime 24 ore con paralisi motoria completa; il cavallo non è in grado di alzare la testa.

I cavalli gravemente colpiti, nei primi giorni, possono mostrare una progressione della sintomatologia con possibile morte per coma, convulsioni oppure essere soppressi a causa di complicazioni secondarie. (Wilson, 1997)

2.3 EVASIONE DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Le strategie di evasione immunitaria, utilizzate da EHV-1, includono l'interferenza e la modulazione della lisi delle cellule natural killer, l'alterazione delle citochine che regolano le risposte dei linfociti B e T, l'alterazione della rete delle chemochine.

Le conseguenze sono: perdita di una presentazione efficiente dell'antigene e della chemioattrazione delle cellule immunitarie, inibizione della citotossicità anticorpo-dipendente, induzione delle cellule T-regolatrici e alterazione delle risposte dei linfociti T citotossici.

Tutti questi meccanismi possono contribuire e spiegare l'immunità di breve durata a seguito di infezione. È fondamentale comprendere gli effetti delle strategie di evasione immunitaria virale sul sistema immunitario, a seguito di infezione, affinché possano essere bersagli chiavi per approcci terapeutici o preventivi di successo. (Pusterla & Hussey, 2014)

2.3.1 LIMITATA REPLICAZIONE DI EHV-1 NELLE ALTE VIE RESPIRATORIE

Studi recenti hanno dimostrato che EHV-1 sfrutta le *equine β -defensins* (eBD) per avviare la replicazione virale e la sua diffusione all'interno delle alte vie respiratorie. Il pretrattamento delle cellule epiteliali respiratorie con eBD aumenta il legame del virione EHV-1 e l'infezione delle cellule.

Studi in vivo e in vitro hanno dimostrato che la replicazione del virus, nei primi tratti respiratori, è limitata; ciò rappresenta una strategia virale per controllare le risposte immunitarie innate nel sito primario di infezione.

Questa strategia consente ad un numero limitato di particelle EHV-1, presenti nell'epitelio, di raggiungere i corpi cellulari del ganglio del trigemino e stabilire latenza. Il virus è anche in grado di modulare il reclutamento di leucociti circolanti nelle alte vie respiratorie. Inoltre, la limitata replicazione del virus previene l'insorgenza di una forte risposta immunitaria che potrebbe essere dannosa per l'ospite.

Il sistema dell'interferone (IFN) è il meccanismo più efficace della risposta innata contro infezioni virali, incluso EHV-1.

Sperimentalmente è stato dimostrato che EHV-1 modula la risposta antivirale di IFN, in modo specifico, per ceppo virale; difatti, si è osservato, che la replicazione dei ceppi EHM era più efficiente negli espianti trattati con Ruxolitinib, un inibitore della segnalazione dell'INF, rispetto agli espianti non trattati. Al contrario, la replicazione dei ceppi non neurovirulenti non è stata alterata a seguito di trattamento con Ruxolitinib.

Diversi studi ex vivo e in vitro hanno ulteriormente caratterizzato le risposte immunitarie innate all'infezione di EHV-1 dell'epitelio respiratorio. Si è dimostrato che EHV-1 induce la up-regulation dei recettori toll-like 3 e 9, nonché di citochine (ad esempio IL-1, IL-6 e TNF- α) e chemochine infiammatorie (ad esempio IL-8, MCP-1).

Negli espianti di mucosa nasale, già dopo 24 ore dall'infezione di EHV-1, si è evidenziata la produzione di chemochine volte ad attirare i monociti CD172a+ bersaglio.

È probabile che i ceppi neurovirulenti di EHV-1 favoriscano una rapida infezione delle cellule immunitarie, piuttosto che una diffusione efficiente attraverso l'epitelio. Finora, si è dimostrato che due glicoproteine di EHV-1 (gG e gp2) controllano il reclutamento di leucociti nelle vie respiratorie del cavallo.

EHV-1 gG è una proteina legante un'ampia gamma di chemochine, come IL-8 e CXCL1; al legame segue il blocco dell'attività delle chemochine.

Si è visto che in vivo, EHV-1 gG deleto induce una risposta infiammatoria più pronunciata rispetto al virus non deleto. EHV-1 gG è anche in grado di inibire la migrazione dei neutrofili. Usando un test di migrazione cellulare funzionale, è stato dimostrato che l'infezione dell'epitelio respiratorio, con EHV-1 gG deleto, aumenta, nel sito infetto, la migrazione di monociti e linfociti.

La proteina precoce EHV-1 pUL56 (codificata da EHV-1 ORF-1) modula le risposte delle citochine sia in vivo che in vitro; pUL56 svolge un ruolo importante nella down-regulation del complesso maggiore di istocompatibilità di tipo I (MHC I) sulla superficie cellulare delle cellule infette. L'infezione con un virus ORF1 deleto parzialmente ripristina l'espressione di MHC I e aumenta, significativamente, l'espressione di chemochine e chemiotassi di cellule infiammatorie.

Si pensa che pUL56 abbia una doppia funzione durante l'infezione. Da un lato la proteina modula il reclutamento di leucociti nel sito primario di infezione; dall'altro, determina down-regulation dell'espressione di MHC I sulla superficie delle cellule infette, consentendo al virus di eludere la lisi cellulare mediata da linfociti T citotossici.

Questo può spiegare perché il virus possa causare una viremia nell'ospite, in presenza di precursori di linfociti T citotossici. (Laval, et al., 2021)

2.3.2 MECCANISMO DI DIFFUSIONE DI EHV-1: “TROJAN HORSE”

Precedenti studi, in vivo ed ex vivo, sulla patogenesi di EHV1 hanno dimostrato che il virus oltrepassa la membrana basale, dei tessuti connettivi, facendosi trasportare dai leucociti.

È stato dimostrato che, in queste cellule, l'espressione delle proteine gC e gD tardive non avviene nelle prime fasi dell'infezione; quindi i leucociti circolanti non presenteranno le proteine tardive.

Questi studi suggeriscono che, un blocco precoce nel ciclo di replicazione di EHV-1, protegge i leucociti infetti dal riconoscimento da parte del sistema immunitario.

Questo meccanismo, denominato “*Trojan Horse*”, consente ai leucociti infetti di diffondersi nella circolazione sanguigna, nonostante la presenza di anticorpi neutralizzanti il virus. Tuttavia, la minoranza di PBMC, che esprime le glicoproteine virali sulla superficie cellulare, risulta essere resistente agli anticorpi, suggerendo che EHV-1 utilizza altre strategie per eludere la lisi cellulare anticorpo-dipendente.

Studi hanno dimostrato che EHV-1 entra nei leucociti CD172a⁺ attraverso un meccanismo di endocitosi che richiede colesterolo, attività tirosin-chinasica, polimerizzazione dell'actina, attività della dinamina e acidificazione endosomiale, indicando un meccanismo di fagocitosi.

La formazione di protrusioni sulla superficie delle cellule CD172a⁺, mediate dalla polimerizzazione dell'actina, può facilitare l'uptake di EHV-1 nella cellula e proteggere il virus da anticorpi neutralizzanti.

Nella patogenesi di EHV-1, le cellule CD172a⁺ sono le protagoniste del meccanismo denominato “*Trojan Horse*”, mentre i linfociti T sono importanti

per la diffusione virale. EHV-1 infetta prevalentemente i linfociti T (CD4+); i ceppi non neurovirulenti infettano il doppio delle cellule (~10%) rispetto ai ceppi neurovirulenti.

Entrambi i ceppi replicano in modo efficiente nei linfociti T, con l'espressione di tutte le classi di proteine virali. Tuttavia, le glicoproteine virali si aggregano sulla membrana plasmatica dei linfociti T, formando aggregati.

È stato anche scoperto che i capsidi virali si accumulano nel nucleo cellulare e che il rilascio dei virioni della progenie è ostacolato.

Si suppone che l'aggregazione delle proteine virali, legate alla superficie cellulare, e il blocco dell'assemblaggio del virus rappresentino due nuovi meccanismi immunitari evasivi che l'EHV-1 utilizza per prevenire un riconoscimento efficiente delle cellule infette da parte degli anticorpi. È interessante notare che il contatto dei linfociti T infetti con un altro linfocita T, o con una cellula CD172a+, attiva l'assemblaggio virale e la sua fuoriuscita.

Il trasferimento del virus infettivo, dal linfocita T alla cellula bersaglio, è stata mediato dalla polarizzazione del centro di organizzazione dei microtubuli e dall'accumulo, nel sito di contatto, di *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA1).

Questi eventi hanno portato alla formazione di una sinapsi virologica tra le due cellule. Studi hanno dimostrato che EHV-1 dirotta le proteine motorie della dineina, per catalizzare il trasporto della progenie virale lungo la rete di microtubuli, che collega il nucleo cellulare alla sinapsi virologica.

Questi risultati mostrano che la diffusione da cellula a cellula è un meccanismo virale essenziale per diffondersi all'interno dell'ospite, eludendo l'immunosorveglianza. (Laval, et al., 2021)

2.3.3 EHV-1 DAI LEUCOCITI ALLE CELLULE ENDOTELIALI: FINE “*TROJAN HORSE*”

La sintomatologia indotta da EHV-1 è il risultato della diffusione virale dai leucociti infetti alle cellule endoteliali che rivestono i vasi sanguigni degli organi bersaglio.

EHV-1 si basa anche sulla diffusione da cellula a cellula per bypassare le risposte immunitarie mediate da anticorpi e per una trasmissione efficiente all'endotelio.

Recentemente, la ricerca si è concentrata sulla comprensione del meccanismo molecolare di trasmissione di EHV-1 dai leucociti alle cellule endoteliali. Si è dimostrato che l'infezione da EHV-1 aumenta, in modo significativo, l'adesione delle cellule CD172a+ all'endotelio cellulare degli equidi.

Si ritiene che l'interazione tra la glicoproteina gD EHV-1 e l'integrina $\alpha V\beta 3$, espressa sulla superficie delle cellule CD172a+ , attivi le vie di segnalazione PI(3)K ed ERK/MAPK. Questo evento media l'ingresso di EHV-1 nelle cellule CD172a+, all'inizio dell'infezione. Successivamente, integrine attivate, espresse su cellule CD172a+ infette, interagiscono con i ligandi dell'endotelio cellulare, facilitando l'adesione delle cellule immunitarie all'endotelio.

La via di segnalazione PI3K svolge un ruolo importante nella risposta infiammatoria. L'isoforma PI3K γ è altamente espressa nei leucociti e innesca il reclutamento, mediato da chemochine, e l'attivazione, nei siti di infiammazione, delle cellule immunitarie innate.

EHV-1 induce attività procoagulante nei monociti degli equini. Il fattore tissutale (TF) è l'attivatore primario della coagulazione, ed è prodotto principalmente dai monociti in stato infiammatorio. Si pensa che l'aumento dell'espressione di TF dei monociti promuova la loro adesione all'endotelio e che, questo processo, possa essere coinvolto nella trombosi associata a EHV-1.

L'adesione di cellule CD172a+, infettate da EHV-1, all'endotelio cellulare è correlato con la produzione, nel microambiente, di citochine pro-infiammatorie, come TNF- α .

È probabile che il processo di adesione crei un ambiente infiammatorio che facilita il reclutamento di ulteriori monociti nell'endotelio. Questa cascata infiammatoria può promuovere l'infezione dell'endotelio cellulare. Ulteriori fattori, presenti nell'ambiente endoteliale, possono influenzare l'adesione dei leucociti e il trasferimento del virus alle cellule endoteliali.

I contatti cellula-cellula attivano la trascrizione e la traduzione di proteine virali nelle cellule CD172a+ infette; inoltre facilitano il trasferimento della progenie di nuovi virioni alle cellule endoteliali. Anche i linfociti T infetti possono trasferire virioni alle cellule endoteliali.

Tuttavia, questo trasferimento sembra, molto spesso, essere non produttivo.

Studi suggeriscono che non tutti i leucociti infetti trasferiscono EHV-1 alle cellule endoteliali, non tutti i trasferimenti portano a una diffusione efficace all'interno dell'endotelio e non sempre le infezioni delle cellule endoteliali provocano l'infezione dei tessuti circostanti.

Inoltre, è stato dimostrato che l'infezione da EHV-1 inibisce la risposta IFN di tipo I nell'endotelio cellulare in vitro. Dopo un'iniziale induzione di IFN di tipo I, EHV-1 sopprime la produzione di IFN aumentando l'espressione, nelle cellule endoteliali, dei geni virali tardivi.

Lo squilibrio, tra risposte immunitarie antivirali e pro-infiammatorie, ha dimostrato di svolgere un ruolo importante nell'esito clinico di infezione da alphaherpesvirus in vivo. È probabile che l'inibizione, mediata da EHV-1, delle risposte IFN di tipo I nelle cellule endoteliali promuova direttamente un'efficiente replicazione virale e diffusione nell'endotelio. A sua volta, questo evento favorisce l'induzione di un ambiente proinfiammatorio che contribuisce allo sviluppo della malattia indotta da EHV-1. (Laval, et al., 2021)

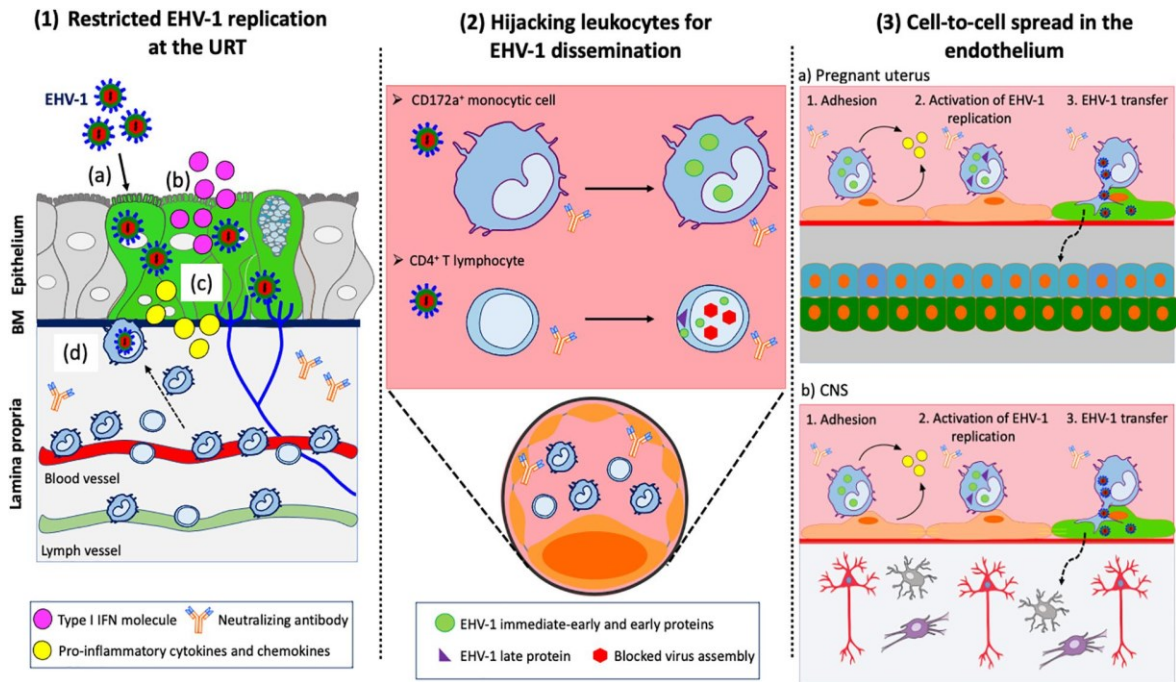


Figura 2. Immagine 1 limitata replicazione nelle alte vie respiratorie. Immagine 2 meccanismo di diffusione di EHV-1. Immagine 3 Diffusione cellula-cellula nell'endotelio degli organi bersaglio (Laval, et al., 2021)

2.3.4 OSSERVAZIONI SULL'EVASIONE DEL SISTEMA IMMUNITARIO DA PARTE DI EHV-1

EHV-1 ha elaborato strategie multiple per evadere il sistema immunitario.

Non vi è dubbio che EHV-1 possa causare viremia in presenza di anticorpi virus-specifici e precursori di linfociti T citotossici; ciò indica, chiaramente, che EHV-1 è effettivamente in grado di superare il suo riconoscimento da parte del sistema immunitario del cavallo. Di conseguenza, l'obiettivo dei ricercatori di EHV-1 è di individuare le ulteriori strategie, che EHV-1 adotta per eludere la risposta immunitaria. (Meulen, Favoreel, Pensaert, & Nauwynck, 2006)

Nonostante EHV-1 sia stato riconosciuto per la prima volta oltre 80 anni fa, non è stato ancora completamente compreso come l'interazione del virus con la risposta immunitaria dell'ospite possa essere sfruttata per lo sviluppo di immunoterapie più efficaci. (Oladunni, Horohov, & Chambers, 2019)

2.4 FATTORI DI RISCHIO PER L'INSORGENZA DI EHM

Il meccanismo alla base di EHM è poco conosciuto. Studi sulla valutazione dei fattori di rischio, associati allo sviluppo di EHM, sono stati eseguiti in Europa e in Nord America. (Gulati, Anagha, Riyesh, & Khurana, 2016)

Differenze individuali tra i cavalli, in termini di sistema immunitario (stato immunitario, vaccinazione, linfociti T citotossici, MHC), stress (allattamento, cofattori, doppie infezioni, l'attività sportiva) ed età, sono considerati importanti fattori di rischio per lo sviluppo di EHM. Questi fattori dell'ospite dovrebbero essere considerati in parallelo con la caratterizzazione genetica del virus isolato da diversi focolai. (Borchers, Thein, & Sterner-Kock, 2006)

Concordemente con quanto detto, è stato dimostrato che il rischio di sviluppo di EHM è più alto nei cavalli anziani, nelle fattrici gravide e fattrici che accudiscono puledri. (Dunowska, 2014).

L'infezione sperimentale ha dimostrato che i cavalli anziani sono più predisposti allo sviluppo di malattie neurologiche rispetto ai cavalli giovani e giovani/mezza età. I cavalli adulti possono sviluppare una viremia 100 volte superiore a quella dei cavalli giovani e la probabilità di sviluppare la malattia è otto volte superiore. (Gulati, Anagha, Riyesh, & Khurana, 2016)

Tuttavia, nella maggior parte delle segnalazioni di focolai di EHM, tutti i cavalli erano gestiti in condizioni simili, rendendo difficile la valutazione dei fattori che influiscono sull'insorgenza dell'infezione da EHV-1.

Le segnalazioni più frequenti di EHM sono tra i cavalli in scuderia rispetto a quelli al pascolo, ciò può essere correlato a condizioni che favoriscono la trasmissione di eventuali agenti infettivi, con conseguenza aumento di numero di cavalli clinicamente colpiti.

I fattori interessati sono una maggiore movimentazione di persone e cavalli dentro e fuori dalle aree delle scuderie e l'uso comune di attrezzature, che possono fungere da fomite. È anche più probabile che i cavalli in stalla si

allenino e competano e, quindi, sono presumibilmente più stressati rispetto a quelli al pascolo, il che può facilitare la riattivazione dell'EHV-1 latente.

Alcuni studi, sulla base dell'analisi di sei focolai di EHM nei Paesi Bassi, hanno identificato il sesso (femmine) e la stagione (inverno-primavera) come fattori associati ad aumento dei rischi per EHM. (Dunowska, 2014)

Alcuni autori hanno suggerito l'esistenza di predisposizione di razza per lo sviluppo di EHM. Nello studio di Barbic, et al, si riportano i dati osservati in due focolai epidemiologicamente collegati, perché causati da EHV-1 geneticamente simili. Nell'allevamento di Quarter Horse sono stati descritti prevalentemente malattie neurologiche, mentre nell'allevamento di cavalli di razza Lipizzano sono stati registrati fenomeni di aborto. (Barbic, et al., 2012)

Tuttavia, altri ricercatori non confermano queste osservazioni.

È stato anche suggerito che animali, diversi dai cavalli, possano svolgere un ruolo importate nell'epidemiologia di EHV-1; ad esempio asini (*Equus asinus*) e muli (*Equus asinus x Equus caballus*) possano fungere da portatori asintomatici in un focolaio di EHM nei cavalli. Di conseguenza dovrebbero essere presi in considerazione nei piani di gestione delle epidemie.

Casi di aborto e sintomatologia neurologica, ascrivibili ad infezione da EHV-1, sono stati descritti anche in zebre (*Equus quagga*) e in onagri (*Equus hemionus onager*).

Complessivamente, le incongruenze dei dati, sia virologici che sierologici, indicano che sono necessarie ulteriori ricerche per comprendere meglio l'epidemiologia di EHV-1 nelle diverse popolazioni equine. (Dunowska, 2014)

2.5 FOCOLAIO DI VALENCIA 2021

Uno dei focolai di EHV-1 più gravi in Europa è stato riportato a seguito dell'International CES Valencia Spring Tour (Spagna) nel febbraio del 2021, a cui hanno partecipato 752 cavalli.

A seguito della morte di 17 cavalli e del segnalamento di disturbi neurologici, immediatamente sono state attuate le norme di quarantena in Spagna e in altri paesi Paesi dell'Unione Europea, per prevenire un'ulteriore diffusione (19 marzo 2021).

Tuttavia, il ceppo virulento di EHV-1 si è diffuso oltre la Spagna, dando origine a focolai in nove paesi (Aggiornamenti FEI 2021). (Vereecke, Carnet, Pronost, Vanschandevijl, Theuns, & Nauwynck, 2021)

A seguito del focolaio registrato a Valencia, il Ministero della Salute – Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari, in data 08/03/2021, ha richiesto un protocollo di intervento al CNR per le malattie degli equini presso l'IZS del Lazio e della Toscana.

A seguito della richiesta, l'IZS del Lazio e della Toscana ha emanato un documento, raccomandando i seguenti comportamenti:

- Verificare se nelle ultime tre settimane il cavallo è stato a contatto con altri cavalli infetti o sospetti di infezione;
- In caso affermativo, sottoporre ad isolamento il cavallo e procedere al prelievo di tamponi nasale per la diagnosi molecolare per EHV-1. In alternativa, il cavallo può essere sottoposto ad isolamento per tre settimane, alla fine del quale si procede al prelievo di un tampone nasale;
- In caso di positività, proseguire con l'isolamento del cavallo fino ad esito negativo a due prelievi successivi di tampone nasale, eseguiti a distanza di due settimana;
- Qualora il cavallo non fosse venuto a contatto con cavalli infetti e sospetti, si procede comunque all'esame clinico ed al rilievo

termometrico. In presenza di sintomi respiratori, neurologici o aborti e/o febbre, si procede come al secondo punto;

- Qualora si rileva una sintomatologia respiratoria, neurologica o abortigena, vanno comunque tenuti in conto altri agenti eziologici responsabili di queste forme cliniche;
- I cavalli infetti sono posti in isolamento in modo da assicurare che non ci sia contatto diretto (ad esempio droplets prodotti in seguito a tosse o espettorato) o indiretto (ad esempio finimenti, mangiatoie ed abbeveratoi) con altri cavalli presenti presso il luogo in cui è presente il cavallo;
- Gli ambienti in cui sono presenti i cavalli infetti da EHV-1 devono essere frequentemente puliti a fondo e disinfettati con dei prodotti idonei (ad esempio, una parte di ipoclorito di sodio, ad uso domestico, con 9 parti di acqua);
- Il personale che accudisce gli animali sospetti od infetti deve utilizzare degli indumenti monouso o diversi da quelli usati per gli animali sani. I cavalli sospetti o infetti vanno accuditi dopo gli animali sani;
- In caso di sospetto e conferma della positività da EHV-1, devono essere informate le autorità veterinarie ufficiali competenti per territorio;
- L'utilizzo della vaccinazione è raccomandata in cavalli sani, non sospetti, con i protocolli previsti sotto la supervisione di un medico veterinario;
- Le azioni di intervento sono coordinate dai veterinari ufficiali competenti per territorio insieme ai veterinari curanti;
- I campioni che risultano positivi possono essere inviati al Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini per gli approfondimenti diagnostici. (IZS del Lazio e della Toscana, 2021)

Il focolaio di Valencia ha rappresentato l'evento più rilevante registrato in Europa negli ultimi anni.

Figura 3 Situazione epidemiologica di EHV-1 in Europa; ultimo aggiornamento 13/07/2021 (IZS del Lazio e della Toscana-CeRME, 2021)

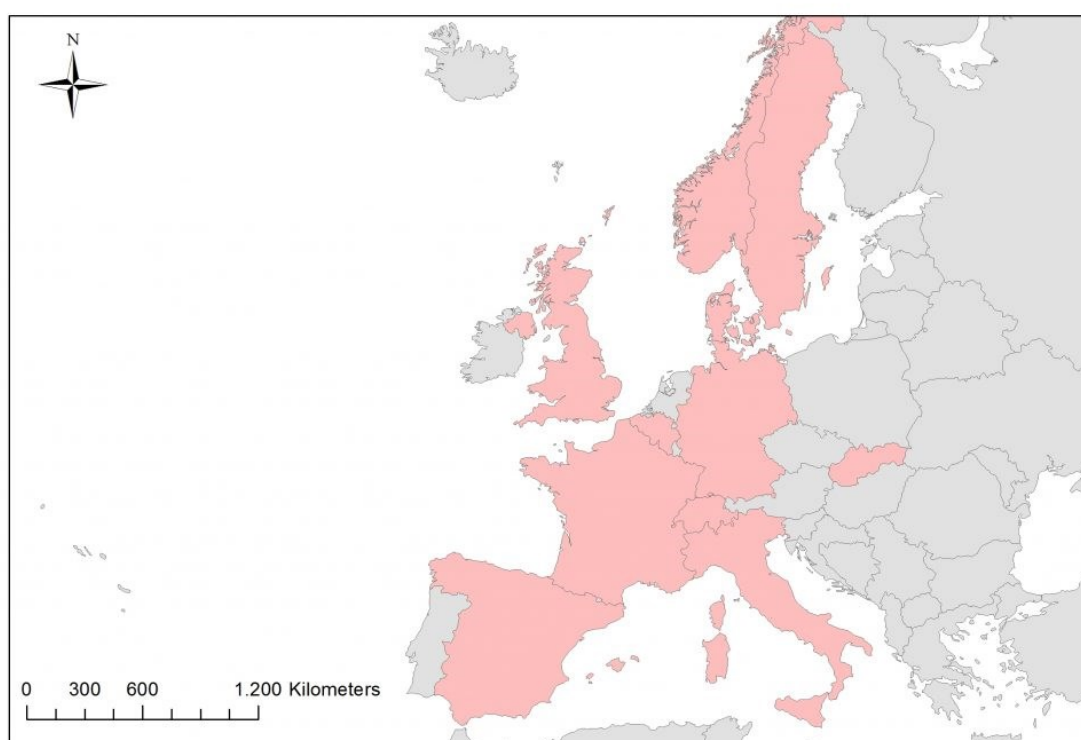




Figura 4 Situazione epidemiologica di EHV-1 in Italia; aggiornamento 13/07/2021 (IZS del Lazio e della Toscana-CeRME, 2021)

CAPITOLO 3 DIAGNOSI, TRATTAMENTO E PROFILASSI

3.1 DIAGNOSI

La distribuzione multifocale delle lesioni causate da EHM determina una notevole variabilità delle manifestazioni cliniche, determinando la necessità di fare delle diagnosi differenziali.

Queste includono mieloencefalite da protozoo equino, mielopatia da stenosi cervicale, instabilità vertebrale cervicale (sindrome di "Wobbler"), frattura vertebrale cervicale o altro trauma del SNC, neurite della cauda equina, infarto fibrocartilagineo, migrazione parassitaria anomala, mielopatia degenerativa, encefalite da *Togaviridae*, rabbia, botulismo, ascessi del SNC e diverse intossicazioni vegetali e chimiche. (Pusterla, Wilson, Madigan, & Ferraro, 2009)

La diagnosi *ante mortem* dell'infezione da EHV-1 pone una serie di difficoltà, strettamente legate alle caratteristiche biologiche del virus. La rilevazione di animali asintomatici, con infezione latente, può essere difficile perché non vi è alcuna diffusione del virus infettivo e il numero di cellule con infezione latente può essere bassa oppure potrebbe non essere facilmente accessibile per il campionamento.

Non sono disponibili dati sui livelli di anticorpi specifici per EHV-1 prodotti da cavalli con infezione latente. Quindi, è possibile che i titoli di EHV-1 in tali cavalli possano essere inferiori ai limiti di rilevabilità degli esami diagnostici disponibili; ne segue che l'infezione latente non può essere completamente esclusa in un cavallo che risulta sierologicamente negativo. (Dunowska, A review of equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part A: clinical presentation, diagnosis and treatment, 2014)

Diversi sono i metodi diagnostici disponibili per il rilevamento di EHV-1. (Tabella 1)

3.1.1 ANALISI DEL LIQUIDO CEREBROSPINALE

L'analisi del liquido cerebrospinale rivela tipicamente xantocromia, un'aumentata concentrazione proteica (100–500 mg/dl) e un aumento dei valori di albumina; ciò dipende dalla vasculite che determina perdita di proteine nel liquido cerebrospinale. La conta delle cellule nucleate nel liquido cerebrospinale è generalmente normale (0-5 cellule/mL), ma occasionalmente può essere aumentata. (Pusterla & Hussey, 2014)

Se possibile, il liquor va prelevato dallo spazio lombosacrale; tuttavia, riscontri analoghi sono prevedibili anche in caso di prelievo dallo spazio atlanto-occipitale. Anche se l'incremento dei livelli di proteine nel liquor può essere notevolmente aumentato (superiore a 600 mg/dl), la presenza di livelli proteici normali non esclude la malattia. L'aumento delle concentrazioni proteiche nel liquor non è necessariamente correlato alla gravità dei segni clinici o all'esito della malattia. (Donaldson & Sweeney, 1997)

3.1.2 ISOLAMENTO DEL VIRUS

L'isolamento del virus è considerato il *gold standard test* per fare diagnosi di laboratorio di infezione da EHV-1. Durante focolai di EHM, dovrebbe essere effettuato in concomitanza con l'uso di test diagnostici rapidi, come la reazione a catena della polimerasi quantitativa (qPCR), per ottenere una caratterizzazione biologica e molecolare dell'isolato virale. (Pusterla & Hussey, 2014)

Per aumentare le possibilità di isolamento del virus vivo, i tamponi devono essere effettuati durante le primissime fasi febbrili delle malattie respiratorie. Dopo la raccolta, il tampone deve essere rimosso e trasportato immediatamente al laboratorio di virologia in 3 ml di medium virale di trasporto freddo (non congelato). (OIE, 2017)

I risultati dell'isolamento del virus possono, tuttavia, essere negativi perché il picco di diffusione del virus di solito è passato nel momento in cui compaiono i segni neurologici, oppure perché il virus può essere eliminato in modo intermittente o perché gli anticorpi locali possono interferire con il prelievo del virus. (Pusterla, Wilson, Madigan, & Ferraro, 2009)

3.1.3 PCR

I migliori campioni per la diagnosi PCR sono i tamponi nasofaringei in caso di segni respiratori, sangue, campioni di tessuto di feto abortito in caso di aborto e liquido cerebrospinale o, nel *post mortem*, campioni di cervello e midollo spinale in caso di segni neurologici.

Il tampone nasofaringeo è il campione più adatto per rilevare la diffusione del virus nella secrezione nasale; questo deve essere preferito al tampone nasale poiché, nelle cavità nasali, la quantità e la durata della diffusione del virus potrebbero essere ridotte.

Anche i tempi di raccolta del campione, dopo l'infezione da EHV-1, sono molto importanti per l'accuratezza della diagnosi. La presenza di EHV-1, nel tratto respiratorio, potrebbe essere rilevato mediante qPCR a partire dal primo giorno post-infezione fino a 2-3 settimane successive.

La viremia, associata alle cellule, potrebbe essere rilevata nel sangue circa 5 giorni post-infezione, fino a 2-3 settimane successive.

In entrambi i casi, il rilevamento del virus dipende dal livello di infezione e dello stato immunologico al momento dell'infezione. (Carvelli, Nielsen, Paillot, Broglia, & Kohnle, 2022)

La crescente applicazione della PCR nel rilevamento di EHV-1 ha presentato nuovi dilemmi sull'interpretazione dei risultati, poiché tali saggi non sono in grado di differenziare il virus in fase replicante (litico), non replicante o latente. I progressi tecnologici e l'uso di nuove piattaforme di PCR, come la

real time PCR (RT-PCR), consentono la quantificazione delle cariche virali. (Pusterla, Wilson, Madigan, & Ferraro, 2009)

3.1.4 ESAME ISTOPATOLOGICO

L'esame istopatologico del cervello e del midollo spinale è essenziale per la conferma di infezione da EHV-1 in un cavallo con sospetta EHM. Le lesioni istopatologiche che si evidenziano nel midollo o nel cervello sono vasculite e trombosi dei vasi sanguigni.

Il rilevamento dell'antigene del virus nel SNC si ottiene utilizzando l'immunoistochimica, l'immunofluorescenza diretta e la PCR. (Pusterla & Hussey, 2014)

3.1.5 ANALISI SIEROLOGICHE

L'esame sierologico, che dimostra un aumento di almeno quattro volte del titolo anticorpale sierico tra campioni raccolti in fase acuta e convalescente, fornisce prove di una infezione. L'intervallo di tempo che deve intercorrere tra i due prelievi può andare dai 7 ai 21 giorni. (Pusterla & Hussey, 2014)

I test sierologici utilizzati sono la fissazione del complemento (FC), la sieroneutralizzazione (SN) e il test ELISA.

Molti cavalli con EHM, tuttavia, non mostrano un aumento di 4 volte del titolo di SN, poiché i titoli aumentano rapidamente e potrebbe aver raggiunto il picco prima della comparsa dei segni neurologici.

L'interpretazione della sierologia è complicata dal fatto che i test di SN, CF ed ELISA, in uso presso la maggior parte dei laboratori diagnostici, non distinguono tra anticorpi contro EHV-1 e EHV-4. (Pusterla, Wilson, Madigan, & Ferraro, 2009)

Tabella 1 Metodi diagnostici disponibili per la diagnosi di EHV-1 e loro finalità (OIE, 2017)

Metodo	Conferma caso clinico	Prevalenza post-infezione	Stato immunitario post-vaccinazione	Contributo politiche eradicazione
Identificazione dell'agente				
Isolamento del virus	+++	-	-	-
PCR	+++	-	-	-
Rilevazione dello stato immunitario				
SN	+++	+++	+++	+
ELISA	++	+++	+	+
FC	+++	-	-	-

Legenda: +++ metodo raccomandato, ++ metodo idoneo, + può essere utilizzato in alcune situazioni, ma costo, affidabilità o altri fattori ne limitano notevolmente l'applicazione;

3.2 TRATTAMENTO

EHV-1 è un'infezione contagiosa e potenzialmente devastante; per tale motivo i cavalli sospettati di essere infetti dovrebbero essere prontamente e rigorosamente isolati fino a quando la presenza del virus non viene esclusa attraverso esami diagnostici.

Non è disponibile alcun trattamento specifico; quindi, la gestione dei cavalli con EHM è diretta verso l'assistenza infermieristica, la cura nutrizionale e la riduzione dell'infiammazione del sistema nervoso centrale.

I cavalli che non sono in decubito dovrebbero essere incoraggiati a rimanere in stazione quadrupedale, inoltre è importante che il posizionamento di cibo e acqua sia in luogo accessibile e ad un'altezza adeguata rispetto al livello del suolo.

I pazienti che sono in decubito, invece, devono essere mantenuti in posizione sternale su un cuscino spesso di lettiera assorbente e asciutta e dovrebbero essere girati frequentemente (almeno ogni 2 o 4 ore) per ridurre il rischio di sviluppo di mionecrosi e ulcere da decubito. Quando possibile, dovrebbero essere sollevati e sostenuti in posizione eretta, aiutandosi con un'imbracatura adattata. Le imbracature sono più utili per cavalli con sintomatologia lieve e che, quindi, sono troppo deboli per alzarsi, ma sono in grado di mantenere la posizione eretta con minima assistenza.

I cavalli con EHM, di solito, non soffrono di disoressia, anche quando sono in decubito; alcune volte, però, può essere necessaria l'alimentazione manuale per incoraggiare i cavalli a mangiare.

Il mantenimento dell'idratazione è importante e la fornitura di una dieta lassativa o la somministrazione di lassativi come pure di crusca, olio minerale o psyllium possono essere necessari per ridurre l'occlusione intestinale.

Il fabbisogno calorico e idrico dei pazienti anoressici può essere soddisfatto somministrando pappe di mangimi a base di erba medica o mangimi pellettati,

simili ai precedenti, reidratati in acqua o soluzione elettrolitica bilanciata tramite sondino nasogastrico.

Se l'assunzione orale di acqua è insufficiente per soddisfare il fabbisogno giornaliero (60-80 ml/kg di peso corporeo/giorno), l'idratazione può essere mantenuta mediante somministrazione endovenosa di soluzioni elettrolitiche bilanciate. Anche la nutrizione parenterale, parziale o totale, può essere utilizzata per soddisfare il fabbisogno calorico dei cavalli anoressici in decubito.

Se i cavalli colpiti non sono in grado di stare in piedi per urinare o se la funzione della vescica è significativamente compromessa, può essere necessario lo svuotamento manuale della vescica mediante l'applicazione di pressione attraverso il retto. Se queste misure non apportano successo, è consigliato un cateterismo urinario che deve essere eseguito in modo asettico, con il tubo di raccolta collegato ad una sacca sterile chiusa, per ridurre al minimo il rischio di infezione del tratto urinario.

La cistite è, tuttavia, una complicanza frequente, in particolare nei cavalli in decubito e può portare a necrosi della parete vescicale, rottura della vescica e setticemia.

Le erosioni da urina possono diventare un grave problema, in particolare nelle cavalle che gocciolano urina. La prevenzione implica lavaggio regolare del perineo, della coda e delle zampe posteriori con acqua; applicazione di unguenti idrorepellenti; intrecciare o avvolgere la coda per semplificare la pulizia. Per promuovere la defecazione possono essere necessari la somministrazione di clisteri o lo svuotamento manuale del retto. (Wilson, 1997)

Il trattamento medico dei cavalli con EHM si concentra principalmente sulla diminuzione dell'infiammazione associata alla vasculite. Dal momento che vasculite, emorragia ed edema, che sono le lesioni precoci di EHM, possono avere una base immunologica, si raccomanda un trattamento precoce con

corticosteroidi. Tuttavia, non sono disponibili dati oggettivi per convalidare l'efficacia di questi o altri farmaci antinfiammatori e, quindi l'efficacia dell'uso di corticosteroidi rimane controversa. Un trattamento con corticosteroidi, come prednisolone acetato o desametasone, per 2-3 giorni è spesso raccomandato per animali gravemente colpiti.

L'antinfiammatorio non steroideo flunixin meglumine è indicato per il trattamento della vasculite del SNC ed è usato per trattare l'EHM. Dimetilsolfossido (DMSO), somministrato endovena (EV) come soluzione al 10-20% in soluzione fisiologica o soluzione glucosata al 5% una volta al giorno per un massimo di 3 giorni, è comunemente usato per trattare cavalli con sospetto trauma del SNC o malattia infiammatoria, come EHM.

Sebbene l'efficacia del DMSO nel trattamento di EHM non sia stata confermata, la sua capacità di inibire aggregazione piastrinica ed eliminare i radicali liberi fa sì che venga utilizzato.

A causa dell'alto rischio di sviluppare cistite e altre infezioni batteriche secondarie, si consiglia la somministrazione di antimicrobici ad ampio spettro, come sulfamidici potenziati o ceftiofur, in particolare quando si accompagnano al trattamento con corticosteroidi. La scelta degli antimicrobici per il trattamento dell'infezione batterica secondaria delle vie urinarie, delle vie respiratorie o di altre aree dovrebbe basarsi sui risultati dei test colturali.

Aciclovir, un analogo nucleosidico purinico sintetico con attività inibitoria contro diversi herpesvirus umani, è stato recentemente utilizzato nel trattamento e nella prevenzione di infezione da EHV-1. Ci sono, tuttavia, dati limitati che descrivono l'efficacia in vivo di aciclovir contro l'infezione da EHV-1 e devono ancora essere condotti studi clinici controllati. L'apparente vantaggio della terapia con aciclovir è supportata dal successo del trattamento dell'infezione congenita da EHV-1 e da una riduzione dell'incidenza di EHM

nei cavalli trattati profilatticamente con aciclovir durante le recenti epidemie. (Pusterla, Wilson, Madigan, & Ferraro, 2009)

Valaciclovir, un analogo nucleotidico, è un antivirale che, nel cavallo, ha una farmacocinetica migliore rispetto all'aciclovir e potrebbe essere un'opzione per il trattamento antivirale per EHM nei cavalli infetti. (Dunowska, A review of equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part A: clinical presentation, diagnosis and treatment, 2014)

I cavalli infetti, che mantengono la stazione quadrupedale, hanno una buona prognosi e il miglioramento è evidenziabile entro pochi giorni; per i cavalli con gravi deficit neurologici, la guarigione potrebbe richiedere diverse settimane o anche un anno. In alcuni cavalli possono persistere dei deficit neurologici permanenti, tra cui incontinenza urinaria e atassia. (Pusterla & Hussey, 2014)

3.3 PROFILASSI

3.3.1 VACCINAZIONE

I vaccini attualmente disponibili non bloccano in modo affidabile l'infezione, lo sviluppo di viremia, l'instaurarsi di latenza; inoltre EHM è stata osservata in cavalli regolarmente vaccinati contro EHV-1.

La significativa riduzione della diffusione virale, osservata nei cavalli vaccinati, fornisce una ragionevole giustificazione per la vaccinazione di richiamo dei cavalli non esposti a rischio di infezione, per ridurre la diffusione virale in caso di esposizione a EHV-1.

L'obiettivo dell'immunità di gregge è di ridurre, nella popolazione a rischio, la quota di virus infettivo circolante. Questo approccio si basa sull'ipotesi che il sistema immunitario della maggior parte dei cavalli adulti sia stato stimolato da una precedente esposizione agli antigeni EHV-1, attraverso l'infezione sul campo, o dalla vaccinazione; sistema immunitario che può

essere, entro 7-10 giorni, potenziato dalla somministrazione di una dose di vaccino. (Pusterla & Hussey, 2014)

Tuttavia, nessuno dei vaccini attualmente disponibili ha azione di prevenzione nei confronti di EHM e non impedisce l'instaurarsi della latenza, a seguito di infezione da EHV-1.

Quindi, anche i cavalli regolarmente vaccinati possono essere infettati in forma latente da EHV-1 e il virus può riattivarsi se si manifestano condizioni specifiche, quali alti livelli di stress o immunosoppressione. (Dunowska, A review of equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part A: clinical presentation, diagnosis and treatment, 2014)

Il programma vaccinale nei puledri prevede il priming a non oltre i 3-5 mesi di età; il booster è raccomandato entro 4-6 settimane. Al fine di potenziare l'immunità, si suggerisce una singola dose di vaccino ogni 3 o 6 mesi.

Si raccomanda di vaccinare le cavalle gravide al quinto, settimo e nono mese di gravidanza.

Al momento, i vaccini maggiormente utilizzati sono quelli inattivati; ad esempio Duvaxyn® è un vaccino inattivato di EHV-1 e EHV-4, adiuvato con carbomer.

I vaccini virali inattivati iniziano ad essere sostituiti da vaccini a subunità; questi sono costituiti da uno o più antigeni puri o semi-puri, purificati dal patogeno o prodotti da un sistema di espressione di baculovirus utilizzando cellule di insetto.

Anche i vaccini vivi attenuati sono utilizzati nella profilassi vaccinale di EHV-1; la loro somministrazione è intranasale o intramuscolare. Tuttavia, il rischio di tale vaccinazione, è la possibilità di ripristinare la virulenza. (Khusro, Aarti, Rivas-Caceres, & Pliego, 2020)

I vaccini attuali stimolano alcune risposte immunitarie protettive, in particolar modo si evidenziano elevati titoli di anticorpi neutralizzanti circolanti. Tuttavia, la maggior parte degli attuali vaccini non stimola la produzione di

linfociti T citotossici, i quali causano la lisi delle cellule infette, in particolare i linfociti; in questo modo limitano la diffusione virale a siti di replicazione secondaria come utero gravido e midollo spinale.

Le strategie vaccinali future dovrebbero mirare a stimolare gli elementi CD8+ e CD4+ dell'immunità cellulo-mediata e allo stesso tempo massimizzare la stimolazione degli anticorpi neutralizzanti della mucosa e del plasma. (Kydd, Townsend, & Hannant, 2006)

3.3.2 MISURE PREVENTIVE PER RIDURRE IL RISCHIO DI INFEZIONE DA EHV-1

Ci sono notevoli difficoltà nell'applicazione di metodi di prevenzione e controllo dell'infezione da EHV-1 nei cavalli; questo perché l'infezione si verifica spesso nei primi mesi di vita e gli animali tendono ad ospitare il virus per anni in forma latente.

Tali caratteristiche rendono improduttivi i test diagnostici sui cavalli asintomatici.

In secondo luogo, la tendenza del virus alla recrudescenza, durante i periodi di stress, rende estremamente problematica l'identificazione di probabili fonti di infezione.

Diverse strategie, oltre alla profilassi vaccinale, sono necessarie per prevenire l'introduzione di EHV-1 e controllare la diffusione di questo virus durante focolai neurologici e non neurologici. (Pusterla, Wilson, Madigan, & Ferraro, 2009)

- **Attuazione di pratiche preventive nella gestione della mandria**

Il potenziale di perdita di cavalli durante un focolaio di EHV-1 è direttamente correlato alle dimensioni della mandria. La strategia di suddividere la popolazione di cavalli a rischio in gruppi più piccoli e il mantenimento di

questi gruppi come unità chiuse e fisicamente separate ha un impatto sul controllo dell'entità della malattia epidemica di EHV-1.

Di conseguenza, la mancata trasmissione virale del virus tra gruppi di cavalli fa sì che la sintomatologia da EHV-1 sia limitata unicamente nel gruppo infetto.

I cavalli dovrebbero essere separati in gruppi con caratteristiche simili, evitando di mescolare cavalli giovani con anziani, cavalle gravide con non gravide, cavalli con asini e così via; inoltre la presenza di una barriera spaziale tra i diversi paddock riduce il rischio di trasmissione, per via aerosol, tra i diversi gruppi.

Per evitare la manifestazione della malattia in un gruppo chiuso, è necessario evitare l'introduzione di un soggetto infetto; difatti il contatto con un altro cavallo infetto è la fonte esogena più frequente di inizio di focolaio in un gruppo chiuso.

Il rischio maggiore, per l'infezione esogena, risiede nell'introduzione di nuovi cavalli in gruppi consolidati; ciò avviene, soprattutto, se i cavalli provengono da situazioni, quali vendite, spettacoli, gare etc., che permettono l'assembramento di cavalli di allevamenti diversi.

I cavalli, indipendentemente dalla presenza o meno di sintomatologia, devono essere considerati come potenziali portatori di EHV-1 e per tale motivo dovrebbero essere posti in isolamento per 21 giorni.

Poiché EHV-1 è endemico, spesso si osservano casi di malattia in gruppi chiusi di cavalli che non sono entrati in contatto con animali esterni.

La maggior parte dei cavalli presenta l'infezione di EHV-1 in forma latente; nel tempo vi può essere riattivazione del virus con conseguente escrezione. In questo modo i puledri che si infettano diventano nuovi ospiti del ciclo biologico del virus.

La riattivazione del virus avviene a seguito di fattori stressanti quali affollamento, cattivo stato nutrizionale, infestazione da parassiti, trasporti di

lunga durata, svezzamento, stati patologici; per questo motivo è fondamentale il controllo di tali fattori per ridurre la frequenza di riattivazione di EHV-1.

- **Gestione e controllo di un focolaio di EHV-1**

In corso di focolaio è fondamentale una diagnosi precoce perché l'epidemia di EHV-1 evolve rapidamente e richiede un intervento immediato.

L'obiettivo è di impedire un'ulteriore diffusione dell'infezione in gruppi di cavalli posti nelle vicinanze o al di fuori dei locali interessati.

In presenza di un focolaio, le cavalle che manifestano aborti, i neonati ammalati e i cavalli che manifestano piressia, secrezione nasale e andatura anomala devono essere rimossi dal gruppo e tenuti in isolamento, fino a quando non risultano più essere fonte di infezione.

La creazione di spazi e barriere sanitarie intorno al focolaio di infezione è importante per il controllo del trasferimento indiretto del virus per via aerea e attraverso oggetti inanimati.

Inoltre è fondamentale l'utilizzo di disinfettanti chimici per inattivare il virus presente su mani, indumenti, scarpe del personale venuto a contatto con gli animali infetti; ma anche strumenti veterinari, secchi per acqua e cibo, corde e altri fomite che possono fungere da veicoli per la diffusione del virus.

Il personale addetto alla cura degli animali posti in isolamento dovrebbe essere istruito sulle procedure specifiche da utilizzare per il controllo della diffusione dell'infezione. Dovrebbe, inoltre, indossare indumenti protettivi, guanti in lattice usa e getta; il tutto dovrebbe essere rimosso dopo aver lasciato l'area di isolamento.

Idealmente, il personale che si occupa dei cavalli in isolamento non dovrebbe entrare in contatto con altri gruppi di cavalli.

Tutti i cavalli entrati in contatto con animali infetti o che ne hanno condiviso le strutture dovrebbero essere considerati esposti al virus; di conseguenza devono essere posti in quarantena nel proprio paddock.

La restrizione di movimentazione di cavalli, sia in entrata che in uscita, riduce al minimo il numero di animali esposti al ceppo epidemico circolante.

- **Gestione del post-focolaio**

Un focolaio di EHV-1 si può considerare terminato quando per 21 giorni, che corrispondono a tre volte il periodo normale di escrezione del virus, non si sono verificati ulteriori casi di malattia; tuttavia, nei focolai di aborto, le cavalle gravide dovrebbero restare in quarantena fino al *post-partum*.

La decontaminazione delle superfici ambientali delle strutture, in cui si è verificata un'epidemia di EHV-1, può essere ottenuta mediante una prima un'accurata pulizia con detersivo e acqua, seguita da una rigorosa disinfezione chimica con composti fenolici o iodofori.

L'inattivazione di EHV-1 nell'ambiente esterno avviene naturalmente con il passare del tempo; dopo un periodo di 21 giorni, senza la presenza di cavalli, le strutture possono essere considerate sicure per il ripopolamento dei cavalli senza rischio di infezione. (Allen, 2002)

4 CONCLUSIONI

La Rinopolmonite Equina è una malattia endemica presente nella popolazione equina di tutto il mondo. Le manifestazioni cliniche sono sintomatologia respiratoria, aborto e sintomatologia neurologica; quest'ultima è causata da una mutazione in ORF30, che codifica per la DNA polimerasi.

Nonostante l'elevata prevalenza di EHV-1, le manifestazioni neurologiche sono sporadiche, anche se negli ultimi anni si è riscontrato un aumento dei casi.

Le caratteristiche principali del virus sono: eludere la risposta immunitaria e instaurare latenza. Difatti, in corso di infezione, EHV-1 infetta i linfociti T, permettendo la diffusione del virus agli organi bersaglio ed impedendone la lisi da parte delle cellule del sistema immunitario. La latenza, invece, si instaura nelle cellule nervose sensoriali, come il ganglio del trigemino, nei linfociti T e nel tessuto linfoide. Il virus, in questa fase, sfugge alla sorveglianza immunitaria e costituisce un serbatoio permanente del virus.

Di conseguenza, un cavallo infetto potrà albergare il virus per anni non mostrando sintomatologia e diventare escretore a seguito di riattivazione del virus. Questo rende difficile il controllo delle infezioni di EHV-1 all'interno della popolazione equina, anche perché i cavalli infetti in fase latente non risultano positivi agli esami diagnostici.

Risulta fondamentale la profilassi che consiste nella vaccinazione e nell'adozione di misure preventive volte a ridurre il rischio di infezione da EHV-1.

Le misure di controllo messe in atto hanno l'obiettivo di evitare la diffusione del virus da un focolaio ad una zona indenne; in queste, però, rientrano anche le misure volte a ridurre le situazioni stressanti che determinano la riattivazione del virus dalla fase di latenza.

La vaccinazione permette di ridurre la prevalenza dell'infezione; tuttavia i vaccini attualmente disponibili non hanno potere preventivo nei confronti di

EHM. Inoltre, la maggior parte degli attuali vaccini presenta un limite che è rappresentato dalla mancata stimolazione di produzione di linfociti T citotossici, che causano la lisi delle cellule infette.

L'auspicio è che gli studi futuri si concentrino sulla realizzazione di vaccini che stimolino l'immunità cellulo-mediata, al fine di ridurre la diffusione del virus agli organi bersaglio. Inoltre l'interazione tra virus e risposta immunitaria, che ad oggi risulta essere ancora non del tutto chiara, potrebbe essere oggetto di ulteriori studi.

BIBLIOGRAFIA

(2021). Tratto il giorno 04 2022 da IZS del Lazio e della Toscana-CeRME: <https://www.izslt.it/cerme/2021/03/08/situazione-epidemiologica-equine-herpesvirus-1-ehv-1-europa-agg-08-03-21/>

Allen, G. P. (2002). Epidemic disease caused by Equine herpesvirus-1: recommendations for prevention and control. *EQUINE VETERINARY EDUCATION* , 136-142.

Barbic, L., Lojkic, I., Stevanovic, V., Bedekovic, T., Starešina, . V., Lemo, N., et al. (2012, 01 18). *Two outbreaks of neuropathogenic equine herpesvirus type 1 with breed-dependent clinical signs*. Tratto il giorno 04 2022 da BVA Journals: <http://veterinaryrecord.bmj.com/>

Borchers, K., Thein, P., & Sterner-Kock, A. (2006). Pathogenesis of equine herpesvirus-associated neurological disease: a revised explanation. *EQUINE VETERINARY JOURNAL* , 283-287.

Carvelli, A., Nielsen, S. S., Paillot, R., Broglia, A., & Kohnle, L. (2022). Clinical impact, diagnosis and control of Equine Herpesvirus-1 infection in Europe. *Efsa Journal* .

Donaldson, M. T., & Sweeney, C. R. (1997). *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* .

Dunowska, M. (2014). A review of equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part A: clinical presentation, diagnosis and treatment. *New Zealand Veterinary Journal* , 171-178.

Dunowska, M. (2014). A review of equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part B: pathogenesis and epidemiology. *New Zealand Veterinary Journal* , 62(4), 179–188.

Fatai S. Oladunni, e. a. (2019, 12 03). *frontiers in Microbiology*. Tratto il giorno 04 2022 da <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02668/full>

Favoreel, H. W., Nauwynck, H. J., & Pensaert, M. B. (2000). Immunological hiding of herpesvirus-infected cells. *Archives of Virology* , p. 1269-1290.

Goodman, L., Loregian, A., Perkins, G. A., Nugent, J., Buckles, E. L., Mercorelli, B., et al. (2007). *PLOS PATHOGENS*. Tratto il giorno 04 28, 2022 da A Point Mutation in a Herpesvirus Polymerase: <https://pdfs.semanticscholar.org/7363/acc222ec2bbfd3589508d15b0a8a9425b2d1.pdf>

Guanggang, Azab, & Osterrieder. (2013). Equine herpesviruses type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)—Masters of co-evolution and a constant threat to equids and beyond. *Veterinary Microbiology* , 123-134.

Gulati, B. R., Anagha, G., Riyesh, T., & Khurana, S. K. (2016). EMERGENCE OF EQUINE HERPES VIRUS 1 MYELOENCEPHALOPATHY: A BRIEF REVIEW. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* .

I.Z.S.L.T. CeRME. (2021, 05 28). Tratto il giorno 04 2022 da Herpesvirus equini 1 e 4: <https://www.izslt.it/cerme/>

IZS del Lazio e della Toscana. (2021, 03 08). Tratto da https://www.izslt.it/cerme/wp-content/uploads/sites/7/2021/03/ALLEGATO_3.pdf

IZS del Lazio e della Toscana-CeRME. (2021). Tratto il giorno 04 2022 da <https://www.izslt.it/cerme/2021/03/08/situazione-epidemiologica-equine-herpesvirus-1-italia/>

J.Nugent, Birch-Machin, I., Smith, K. C., Mumford, J. A., Swann, Z., Newton, J. R., et al. (2006). Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a Point Mutation of the DNA Polymerase Strongly Associated with Neuropathogenic versus Nonneuropathogenic Disease Outbreaks. *JOURNAL OF VIROLOGY* , 4047–4060.

Khusro, A., Aarti, C., Rivas-Caceres, R. R., & Pliego, A. B. (2020). Equine herpesvirus-I infection in horses: Recent updates on its pathogenicity, vaccination, and preventive management strategies. *Journal of Equine Veterinary Science* .

Kydd, J. H., Townsend, H. G., & Hannant, D. (2006). The equine immune response to equine herpesvirus-1: The virus and its vaccines. *Veterinary Immunology and Immunopathology* , 15-30.

Laval, K., Poelaert, K., Van Cleemput, J., Zhao, J., Vandekerckhove, A. P., Gryspeerdt, A. C., et al. (2021, 03 04). *Frontiers in Microbiology*. Tratto il giorno 04 2022 da The Pathogenesis and Immune Evasive Mechanisms of Equine Herpesvirus Type 1: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.662686/full>

Meulen, K. M., Favoreel, H. W., Pensaert, M. B., & Nauwynck, H. J. (2006). Immune escape of equine herpesvirus 1 and other herpesviruses of veterinary importance. *Veterinary Immunology and Immunopathology* , 31-40.

Nugent, J., & Paillot, R. (2009). Equine herpesvirus myeloencephalopathy: Unravelling the enigma. *The Veterinary Journal* , 271-272.

OIE. (2017). Equine rhinopneumonitis (infection with equid herpesvirus-1 and -4). In *Terrestrial Manual* (p. capitolo 2.5.9).

Oladunni, F., Horohov, D., & Chambers, T. (2019, 12 03). *Frontiers in Microbiology*. Tratto il giorno 04 2022 da <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02668/full>

Patel, J. R., & Heldens, J. (2005). Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology. *The Veterinary Journal* , 14-23.

Pusterla, N., & Hussey, G. S. (2014). Equine Herpesvirus 1 Myeloencephalopathy. In *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* (p. 489-506).

Pusterla, N., Wilson, W., Madigan, J. E., & Ferraro, J. L. (2009). Equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy: A review of recent developments. *The Veterinary Journal* , 279–289.

Vereecke, N., Carnet, F., Pronost, S., Vanschandevijl, K., Theuns, S., & Nauwynck, H. (2021, 05 20). *Genome Sequences of Equine Herpesvirus 1 Strains from a European Outbreak of Neurological Disorders Linked to a Horse Gathering in Valencia, Spain, in 2021*. Tratto il giorno 04 2022 da Microbiology Resource Announcements.

Wilson, W. D. (1997). Equine Herpesvirus 1 Myeloencephalopathy. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* , 53-72.