

L'encefalite equina da virus West Nile. Una zoonosi "riemergente" nel bacino del mediterraneo

MARCO TAMBA, SILVIA DELL'ANNA
ANDREA LUPPI, PAOLO BONILAURI
GIANLUCA RUGNA, MICHELE DOTTORI
PAOLO CORDIOLI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "B. Ubertini", Brescia
E-mail: marco.tamba@izsler.it

A dieci anni dalla prima segnalazione, il Virus West Nile è stato nuovamente rilevato sul territorio nazionale. La conoscenza dell'epidemiologia di questa zoonosi trasmessa da vettori che si manifesta in uomini e cavalli, ma che riconosce in altre specie animali il proprio serbatoio, è essenziale per scegliere gli strumenti più appropriati per il suo controllo.

RIASSUNTO

Il virus West Nile (WNV) è un flavivirus trasmesso da zanzare. È ampiamente diffuso in Africa, nel Bacino del Mediterraneo (Medio Oriente e Sud Europa) e in Asia. Dal 1999 è presente anche in Nord America. Gli uccelli sono implicati nel ciclo di trasmissione come ospiti amplificatori, ma il WNV è in grado di infettare diverse specie di mammiferi, anfibi e rettili. Gli uomini e i cavalli, che talvolta mostrano sintomatologia clinica, sono considerati ospiti accidentali a fondo cieco. Sono comunque stati registrati casi di trasmissione interumana attraverso emotrasfusioni, trapianti di organo, allattamento al seno e per via verticale. In diversi Paesi Europei, tra cui l'Italia, sono attivi sistemi di sorveglianza su persone, cavalli, avifauna e vettori in grado di rilevare la presenza del WNV in aree considerate a rischio. Ad ogni modo, l'ecologia e il ciclo naturale di trasmissione del virus in Europa sono ancora in gran parte non chiariti e così la maggior parte degli episodi di encefaliti da WNV rimangono imprevedibili e difficili da controllare.

(English summary p. 9)

PAROLE CHIAVE: West Nile, virus, cavallo, epidemiologia, zoonosi.

Dieci anni dopo la sua prima segnalazione [2] il virus West Nile (WNV) si è manifestato nuovamente in Italia. In Emilia-Romagna tra agosto e ottobre 2008 sono stati segnalati 24 casi clinici (3 decessi) in equini delle Province di Ferrara, Bologna e Modena. Il WNV è stato isolato da una gazza (*Pica pica*) e da una ghiandaia (*Garrulus glandarius*) abbattute e positività in PCR sono state rilevate in due pool di zanzare (*Culex pipiens*) prelevate nelle medesime province. Per la prima volta, infine, sono stati segnalati casi umani di malattia (dati non pubblicati). Tra gli episodi italiani del 1998 e del 2008 si è verificata in Nord America una drammatica epidemia che ha trasformato la febbre da WNV da arboviroso minore a problema rilevante di Sanità Pubblica e Sanità Pubblica Veterinaria [11]. Nella presente nota vengono riportati gli aspetti essenziali della malattia e allo scopo di facilitarne la diagnosi. La sorveglianza passiva, infatti appare lo strumento più efficiente per riconoscere le aree interessate dalla circolazione virale.

IL VIRUS WEST NILE

Il WNV è un RNA-virus del genere *Flavivirus*, famiglia *Flaviridae*. Appartiene al complesso antigenico della Encefalite Giapponese (JE) che comprende diversi patogeni umani, quali il virus dell'Encefalite Giapponese in Asia, quello dell'Encefalite della Valle del Murray in Australia e dell'Encefalite di Saint-Louis in America (figura 1). Il virus Kunjin, segnalato in Australia, è risultato essere strettamente correlato al WNV in studi filogenetici [9]. Al gruppo della JE appartengono anche altri virus, quali i virus africani Koutango, Usutu e Yaounde. Anche questi virus possono dare reazioni sierologiche crociate con il Virus West Nile. In particolare va rilevato che sieropositività per il virus Usutu sono state recentemente segnalate in Italia, in provincia di Ravenna nel 2007 [6]. Il WNV è considerato endemico nel bacino del Mediterraneo, è stato isolato in molti Paesi europei e nordafricani dagli anni sessanta agli anni ottanta,



Figura 1. Distribuzione mondiale dei virus appartenenti al complesso dell'Encefalite Giapponese [12].

comunque solamente negli ultimi 15 anni sono stati registrati diversi focolai di una certa rilevanza [4]; nella tabella 1 sono riassunti i dati essenziali di questi episodi.

IL CICLO DI TRASMISSIONE

Il ciclo di trasmissione naturale del WNV coinvolge zanzare, come serbatoio e vettore biologico, e uccelli come ospiti amplificatori (figura 2). Il WNV è stato isolato da 11 generi diversi di zanzare, non tutte però dimostrano la medesima competenza vettoriale, in Europa e nel Bacino del Mediterraneo tale ruolo viene principalmente svolto da zanzare ornitofile del genere *Culex* (*Cx. pipiens*, *Cx. modestus*). I vettori si infettano e trasmettono l'infezione durante il pasto di sangue [4].

Si pensa che il virus entri in una nuova area attraverso gli uccelli migratori, pertanto non deve sorprendere che la maggior parte degli episodi di malattia

si manifesti in aree umide o in zone vicine al delta di fiumi, dove c'è convivenza tra avifauna stanziale e migratoria e abbondante presenza del vettore. Tra gli uccelli vi sono comunque diffe-

renze di competenza, il WNV è in grado di infettare centinaia di diverse specie di uccelli, ma solamente alcune sviluppano viremia di durata (da 1 a 6 giorni post-infezione) e con titolo virale tale ($>10^5$ PFU/ml di siero) da essere infettante per il vettore. Attraverso infezioni sperimentali i passeriformi sembrano essere i più efficienti ospiti amplificatori (figura 3, [5]). Tra questi il passero domestico e lo storno potrebbero svolgere il ruolo di "ponte" tra il ciclo silvestre e quello urbano. Nelle specie di uccelli competenti vi è anche una possibilità di trasmissione diretta del virus. Il WNV è infettante per via orale ed è stato riscontrato in tamponi orali e cloacali degli uccelli infetti. È probabile pertanto che pratiche quali l'accoppiamento, l'alimentazione dei nidiacei, il cannibalismo, la predazione e la necrofagia possano permettere l'ulteriore diffusione del virus [5].

Molte specie di mammiferi sono sensibili all'infezione. Tutti, compreso l'uomo e il cavallo, sono però considerati ospiti a fondo cieco, in quanto in questi animali la viremia è di breve durata e con un titolo considerato non infettante per il vettore.

Anche i rettili (alligatori, serpenti e tartarughe) e le rane possono essere infettate dal WNV. Si pensa che queste specie, a causa della lunga viremia e del fatto che si ibernano, siano anche in

Anno	Paese	Casi Umani		Casi in cavalli		Periodo
		Casi	Decessi	Casi	Decessi	
1994	Algeria	50	2			Ago-Set
1996	Marocco	1	1	94	42	Ago-Ott
1996	Romania	393	17			Metà Lug- metà Ott
1997	Tunisia	173	8			Set-Nov
1998	Italia			14	6	Metà Ago-inizio Ott
1999	Russia	318	40			fine Lug-Set
1999	Israele	2	2			Fine Ago
2000	Francia			76	21	Metà Ago-inizio Nov
2000	Israele	417	35	76		Ago-Ott
2000	Russia	56				
2001	Russia	64	(5-10%)			
2003	Marocco			8	5	Set.
2003	Francia	7		7	1	Metà ago-fine Set
2006	Francia			6		

Da Zeller e Schuffenecker, 2004, aggiornata.

Tabella 1. Focolai di West Nile nel Bacino del Mediterraneo e in Europa: periodo 1994-2006.

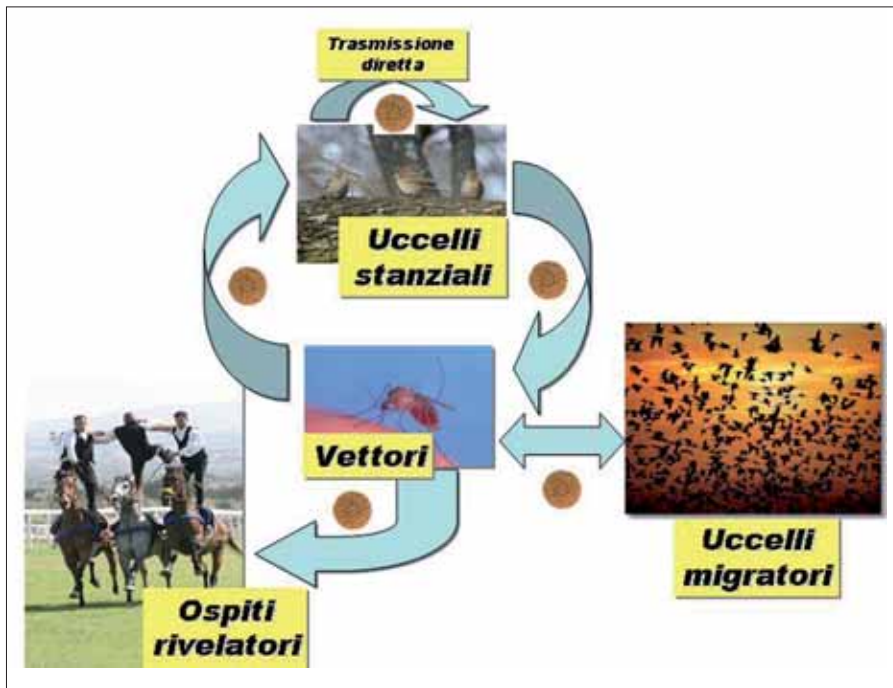


Figura 2. Schema del ciclo naturale del WNV.

dell'infezione da WNV attraverso la placenta, l'allattamento al seno, le emotrasfusioni e i trapianti di organo [11].

Cavallo

Anche nel cavallo la maggior parte delle infezioni da WNV ha decorso asintomatico. In poco meno del 10% dei casi però i cavalli infetti mostrano sintomatologia nervosa [2, 3]. Il periodo di incubazione è compreso tra i 3 e i 15 giorni post-infezione (g.p.i.), sintomi più comunemente descritti sono paresi, atassia, cadute improvvise, difficoltà nell'andatura, fascicolazione dei muscoli, digrignamento dei denti, cecità, ptosi delle labbra, ipereccitabilità o letargia [10]. La sintomatologia nervosa è diversa da soggetto a soggetto e dipende dall'area del sistema nervoso centrale in cui insorgono le lesioni infiammatorie (polioencefalo-mielite non suppurativa) legate alla presenza del virus. La maggior parte dei soggetti che si ammala guarisce spontaneamente; di norma il tasso di letalità (percentuale di animali malati che muoiono o vengono sottoposti a eutanasia) rimane compreso tra il 30% e il 40% [2, 10]. In cavalli sottoposti a infezione sperimentale, tutti i soggetti, anche quelli che non hanno mostrato viremia, hanno sieroconvertito. Le IgM rilevate mediante ELISA sono comparse a 7 g.p.i. e hanno raggiunto il picco a 13

grado di svolgere un ruolo nel mantenimento del WNV nell'ambiente. Una volta infatti passato dall'avifauna migratoria a quella stanziale, il WNV si dimostra in grado di ripresentarsi negli anni successivi. I meccanismi per l'*overwintering* non sono chiariti, il virus potrebbe superare l'inverno in ospiti a lunga viremia (es. rettili) o in zanzare adulte infette svernanti. È inoltre stata dimostrata la trasmissione trans-ovarica del virus [11].

In sostanza il ciclo di trasmissione del WNV è piuttosto complesso e non ancora completamente chiarito. Implica una complessa catena di eventi, tra i quali non sono secondari l'abbondanza degli ospiti amplificatori e dei vettori, fattori climatici e stagionali e l'uso del territorio. Tutto ciò fa in modo che le epidemie da WNV siano, almeno in Europa, di limitata entità sia spaziale sia temporale, erratiche e sostanzialmente imprevedibili [4].

LA MALATTIA

Uomo

Nell'uomo la maggior parte delle infezioni ha decorso asintomatico. In un 15-20% dei casi invece si manifesta, dopo

un periodo di incubazione di 3-15 giorni, una sindrome influenzale (febbre, mal di testa, mialgia nausea e vomito). La sindrome dura di norma 2-3 giorni. In meno dell'1% dei casi invece la malattia si manifesta con sintomi neurologici (meningite o meningoencefalite o mielite) associati a febbre elevata. I decessi sono registrati soprattutto nei soggetti di età più elevata. Sono stati segnalati casi di trasmissione diretta

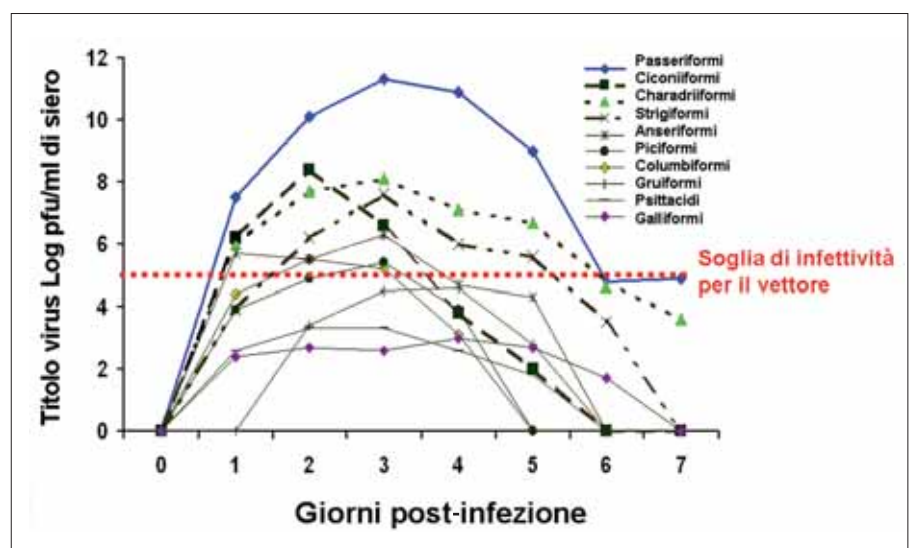


Figura 3. Andamento della viremia da WNV in 10 ordini di uccelli [5].

g.p.i., mentre gli anticorpi neutralizzanti (IgG) sono comparsi tra gli 8 e i 10 g.p.i., raggiungendo il picco tra i 9 e i 13 g.p.i.. Una viremia è stata rilevata tra 1 e 6 g.p.i. e non ha mai superato le 10^3 PFU/ml di siero (figura 4, [3]).

Uccelli

Ad eccezione di un episodio registrato in Israele nel 1998 nel quale mostrarono sintomatologia nervosa e morirono cicogne e oche domestiche, in Europa l'infezione da WNV negli uccelli decorre di norma in modo asintomatico [4]. Al contrario, mortalità elevate di uccelli sono state registrate in Nord America, dove il virus è stato segnalato per la prima volta nel 1999 [5]. Tra gli ordini di uccelli quelli che svolgono il ruolo di ospiti amplificatori sono i Charadriiformi (gabbiani, sterne, beccacce, chiurli) e i Passeriformi, tra i quali particolare importanza nell'ecologia del WNV rivestono soprattutto i ploceidi (passeri), gli sturnidi (storni) e i corvidi (gazze, cornacchie). Tra gli uccelli domestici un certo ruolo possono svolgere gli Anseriformi, mentre Galliformi e Columbiformi mostrano viremie di breve durata e con titoli virali non elevati. Sono quindi in grado di mantenere il virus nell'ambiente, ma non sembrano svolgere un ruolo di amplificazione [1, 5].

Altri mammiferi

Il WNV infetta molte specie di mammiferi. È stato isolato da pipistrelli, scoiattoli, cani, gatti, conigli, foche e da diverse specie di ruminanti [4]. In queste specie l'infezione decorre in genere in modo asintomatico, ma gli animali infetti sierocodono e ciò può essere di ausilio in indagini sieroepidemiologiche.

DIAGNOSI DI LABORATORIO

Diagnosi diretta

I materiali più adatti all'isolamento virale sono rappresentati dal sistema nervoso centrale (encefalo, midollo allungato, midollo spinale, liquido cefalorachidiano) di cavalli sintomatici. Per gli uccelli gli organi dai quali è più facile l'isolamento sono cuore, cervello, fegato e rene. Per l'isolamento vengono

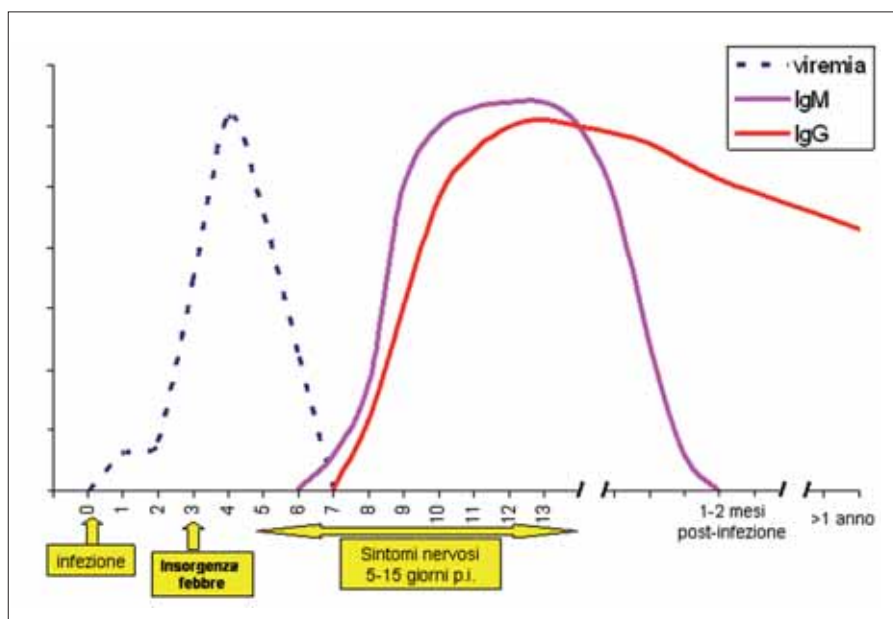


Figura 4. Andamento della viremia da WNV e del titolo anticorpale nei cavalli [3].

usate in genere tessuti colture di rene di coniglio (RK-13) o di macaco verde (VERO). In genere è richiesto più di un passaggio prima che il virus mostri effetto citopatico. Sugli stessi materiali può essere anche eseguite tecniche di biologia molecolare per evidenziare il genoma virale: le più usate sono la RT-nPCR (*reverse-transcription nested polymerase chain reaction*) [7] o la PCR *real time* [8]. L'RNA virale può anche essere evidenziato in campione di siero o sangue addizionato con EDTA, ma la breve durata della viremia permette ciò solamente nelle prime fasi dell'infezione.

Diagnosi indiretta

I test sierologici di riferimento sono l'Equine IgM capture ELISA per i sieri equini e il test di riduzione del numero delle placche (*plaque reduction neutralization test* - PRNT) per i sieri di tutte le specie, il titolo soglia per la positività è 1:10 [7]. L'ELISA IgM è particolarmente utile per evidenziare le infezioni recenti, nel cavallo infatti le IgM sono generalmente rilevabili 7-10 g.p.i. fino a 1-2 mesi post-infezione [7].

PIANO NAZIONALE DI SORVEGLIANZA

Dal 2002 è istituito sul territorio nazionale un Piano di Sorveglianza nei con-

fronti della WND, attualmente regolamentato dal D.M. 29/11/2007. Tale piano viene svolto con l'obiettivo di rilevare precocemente la circolazione virale attraverso attività di sorveglianza passiva e attiva. Il piano nazionale presenta però alcune criticità che ne minano l'efficacia, in particolare:

1. individua come aree da monitorare una quindicina di zone umide sparse sul territorio nazionale. Queste, pur essendo tutte aree che per le loro caratteristiche ecologiche sono considerate idonee per la presenza e la propagazione del WNV, non rappresentano tutte le possibili porte di ingresso del virus sul territorio nazionale;
2. prevede come attività di sorveglianza passiva l'analisi dell'avifauna selvatica rinvenuta morta, quando, a differenza di quanto si verifica in Nord America, nel Bacino del Mediterraneo gli episodi di mortalità da WN negli uccelli selvatici sono registrati raramente;
3. prevede come principale attività di sorveglianza attiva l'impiego di polli sentinella.

Per verificare l'efficacia del sistema di sorveglianza, nelle aree a rischio, è stato inoltre previsto l'impiego di cavalli "stanziali" da utilizzare come animali sentinella. Questi vanno controllati sierologicamente due volte l'an-

no: all'inizio (febbraio-marzo) e alla fine (novembre-dicembre) della stagione di attività del vettore. Anche la sorveglianza passiva sindromica sui cavalli viene utilizzata allo scopo di valutare l'efficacia del piano. Quest'ultima attività di sorveglianza passiva, che ha permesso di rilevare la presenza del WNV sia nel 1998 [2] sia nel 2008, sarebbe invece opportuno che venisse estesa a tutto il territorio nazionale.

PREVENZIONE

Le misure di prevenzione, come per tutte le malattie trasmesse da vettori, sono finalizzate a impedire il contatto tra gli animali suscettibili e i vettori infetti. A tal fine sono buone pratiche: il ricovero notturno dei cavalli all'interno delle strutture, l'uso di ventilatori, spegnere le luci all'interno delle strutture, mantenendone al contempo altre accese lontane dalle strutture di ricovero degli animali, mantenere gli uccelli fuori dalle scuderie e impedire la loro nidificazione in vicinanza o all'interno delle scuderie. Utile è anche la lotta al vettore attraverso trattamenti periodici, ma più efficaci possono essere azioni quali la rimozione di possibili luoghi di riproduzione delle zanzare (raccolte di acqua stagnante, stagni, tombini ecc.), la pulizia e lo sfalcio della vegetazione circostante le strutture. Solamente per la specie Equina sono stati sviluppati vaccini (spenti o ricombinanti) con una buona efficacia nei confronti della malattia clinica [4]. (NdA: ora esiste un vaccino spento registrato in Italia che dovrebbe essere disponibile da giugno sul mercato).

CONCLUSIONI

Il WNV è agente di una zoonosi, endemica nel Bacino del Mediterraneo, che per motivi non ancora chiariti può improvvisamente manifestarsi verso la fine dell'estate in uccelli, cavalli e/o persone. In considerazione delle notevoli implicazioni che questa malattia ha per la Sanità Pubblica, le attività di sorveglianza nei confronti di questo agente dovrebbero essere mantenute, da

giugno a ottobre, su tutto il territorio nazionale, soprattutto nelle aree adiacenti a zone umide dove transitano o nidificano uccelli migratori. A tale scopo maggiore importanza dovrebbe essere data alla sorveglianza attiva sull'avifauna stanziale e alla sorveglianza passiva sui cavalli, in quanto si sono dimostrati strumenti validi per rilevare la circolazione di ceppi patogeni. In particolare, per rendere questa ultima attività più efficace dovranno essere dedicate risorse alla formazione e motivazione degli ippatri.

BIBLIOGRAFIA

- Allison AB, Mead DG, Gibbs SEJ, Hoffman DM, Stallknecht DE. (2004). West Nile virus viremia in wild rock pigeons. *Emerg. Infect. Dis.* 10(12): 2252-2255.
- Autorino GL, Battisti A, Deubel V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A, Lelli R, Murri S, Scicluna MT. (2002). West Nile virus epidemic in horses, Tuscany Region, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 8(12): 1372-1378. *Emerg. Infect. Dis.* 8(12): 1372-1378
- Bunning ML, Bowen RA, Cropp CB, Sullivan KG, Davis BS, Komar N, Godsey MS, Baker D, Hettler DL, Holmes DA, Biggerstaff BJ, Mitchell C. (2002). Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 8(4): 380-386
- Dauphin G, Zientara S, Zeller H, Murgue B, (2004). West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 27:343-355.
- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M. (2003). Experimental infection of North America birds with the New York 1999 strain of West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 9(3): 311-322
- Lelli R., Savini G., Teodori L., Filipponi G., Di Gennaro A., Leone A., Di Galleonardo L., Venturi L. Caporale V. (2008). Serological evidence of Usutu virus occurrence in North-Eastern Italy. *Zoonoses Public Health*, 55, 361-367
- OIE (2008). *Terrestrial Manual*; Chapter 2.1.20 West Nile fever. <http://www.oie.int>
- Papin JF, Vahrson W, Dittmer DP. (2004). SYBR Green-Based Real-Time Quantitative PCR Assay for Detection of West Nile Virus Circumvents False-Negative Results Due to Strain Variability. *J. Clin. Microbiol.*, 42(4): 1511-1518
- Poidinger M, Hall RA, Mackenzie JS. (1996). Molecular characterization of the Japanese encephalitis serocomplex of the flavivirus genus. *Virology*, 218(2):417-21
- Ward MP, Schuermann JA, Highfield LD, Murray KO. (2006). Characteristics of an outbreak of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. *Vet. Microbiol.* 118: 255-259.
- Zeller HG, Schuffenecker I (2004). West Nile Virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean Basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.*, 23: 147-156.
- www.cdc.gov/ncidod/dvbid/west-nile/map.htm

WEST NILE DISEASE. A "RE-EMERGING" ZOOZINOSI IN THE MEDITERRANEAN BASIN

Summary West Nile virus (WNV) is a mosquito-transmitted flavivirus. It is widely distributed in Africa, the Middle East, southern Europe, and Asia and was recently introduced to North America. Birds are involved in the cycle of transmission as amplifying hosts, but WNV can infect many species of mammals, as well as amphibians and reptiles. Humans and horses are considered accidental dead-end hosts, but transmission through blood donations, organ transplants, and the intrauterine route have been reported. In Europe, an enhanced surveillance of WN infection in humans, horses, birds, and vectors may reveal the presence of the virus in different locations. However, very little is known of the ecology and natural history of WN virus transmission in Europe and most WN outbreaks in humans and animals remain unpredictable and difficult to control.

KEY WORDS: West Nile, virus, horse, epidemiology, zoonosis.