

Descrizione di un caso clinico di morbo coitale maligno (MCM) in un focolaio di malattia in Italia

Massimo Scacchia⁽¹⁾, Cesare Cammà⁽¹⁾, Gabriella Di Francesco⁽¹⁾,
Andrea Di Provvido⁽¹⁾, Renato Giunta⁽²⁾, Mirella Luciani⁽¹⁾,
Anna Maria Fausta Marino⁽²⁾, Ilaria Pascucci⁽¹⁾ & Vincenzo Caporale⁽¹⁾

Riassunto

In Italia, nel maggio 2011, in seguito a controlli effettuati su uno stallone per la relativa approvazione alla monta, è stato di nuovo segnalato il morbo coitale maligno (MCM). Nel lavoro viene descritto il caso di una cavalla con sintomi clinici della malattia ritenuta verosimilmente all'origine dell'infezione dello stallone.

Parole chiave

Cavallo, Diagnosi, Italia, Morbo coitale maligno, Sicilia, *Trypanosoma equiperdum*.

Introduzione

In Italia, regione Sicilia, nel maggio 2011, in seguito a controlli effettuati su uno stallone per la relativa approvazione alla monta, è stato di nuovo segnalato il morbo coitale maligno (MCM). La presente comunicazione descrive i rilievi clinici, le lesioni anatomo-istopatologiche e i risultati degli accertamenti di laboratorio che hanno permesso di confermare la diagnosi di MCM in una cavalla presente in un'azienda siciliana, verosimilmente all'origine dell'infezione dello stallone.

Il MCM è stato eradicato in Italia negli anni '40. In seguito a una grave epidemia registrata a metà degli anni '70, la malattia è stata eradicata una seconda volta (3). L'ultima notifica ufficiale all'Organizzazione Mondiale

per la Sanità Animale (OIE) è stata effettuata dall'Italia nel 1996.

Materiali e metodi

La cavalla, oggetto dello studio, è stata importata dall'Olanda il 29 settembre 2009 in un'azienda della provincia di Caserta, successivamente a due movimentazioni in regione Campania, è stata trasferita in data 07 Febbraio 2011 in un'azienda del comune di Scordia, provincia di Catania. L'animale risultato positivo al test di fissazione del complemento (FdC), con titolo 1:2560, è stato abbattuto il 30 maggio 2011 a causa dell'aggravarsi della sintomatologia clinica riferibile a MCM.

All'esame clinico la cavalla è risultata cachettica, disidratata, in scadente stato di nutrizione e con ipotrofia muscolare generalizzata. I risultati dell'esame emocromocitometrico hanno evidenziato neutrofilia, linfocitopenia e valore ematocrito al 23,1%. Sulla cute opaca e ipoelastica, sono state evidenziate escoriazioni a livello delle prominente ossee, un'area depigmentata a livello di zona perineale e una lesione edematosa cutanea sulla coscia destra. La mammella destra, alla palpazione, è risultata calda e non dolente, è stata evidenziata linfadenomegalia generalizzata. L'esame neurologico ha permesso di rilevare difficoltà

(1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', Campo Boario, 64100 Teramo, Italia
m.scacchia@izs.it, i.pascucci@izs.it

(2) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia 'A. Mirri', Sezione di Catania, via Passo Gravina, 195,
91100 Catania, Italia

nella deambulazione con marcata atassia del treno posteriore e divaricamento degli arti.

L'esecuzione dell'esame anatomo-patologico ha permesso di evidenziare alla sezione della lesione cutanea, presente sulla coscia destra, edema di lieve entità localizzato al di sotto del derma. È stata rilevata adenomegalia del linfonodo popliteo drenante l'area cutanea interessata. Gli organi parenchimatosi sono risultati privi di lesioni ad eccezione della milza che ha mostrato congestione e iperplasia della polpa bianca. Abbondante liquido sinoviale è stato rinvenuto a livello dell'articolazione tarso-metatarsica destra. La palpazione della mammella destra ha permesso di rilevare aumento di consistenza dell'organo con lieve reattività dei linfonodi tributari. Contestualmente all'abbattimento, sono stati prelevati siero e campioni di organi e liquidi da analizzare per la ricerca di *Trypanosoma equiperdum* mediante metodiche tradizionali e biomolecolari. Le matrici di organo prelevate sono state sottoposte a esame istologico, mediante colorazione ematossilina-eosina, e indagini immunoistochimiche.

I campioni prelevati sono stati sottoposti a ricerca di *Trypanosoma* spp. mediante esame microscopico a fresco.

Contestualmente sono stati effettuate le analisi batteriologiche al fine di escludere la presenza di infezioni batteriche intercorrenti.

Per la ricerca del DNA di *Trypanosoma equiperdum* è stato utilizzato un metodo real-time PCR che amplifica una regione altamente ripetuta e specifica per il subgenere *Trypanozoon* (1).

L'esame istologico è stato eseguito su sezioni colorate con ematossilina-eosina, previa fissazione e inclusione in paraffina.

Su quelle di tessuto cutaneo sono stati eseguiti i test di immunoistochimica (IHC), impiegando siero positivo della cavalla in combinazione con anticorpo monoclonale-HRP anti-IgG equine, inserendo come controllo cute di animali sani.

Su liquido cefalorachidiano e siero è stata eseguita la ricerca di anticorpi per *T. equiperdum* mediante FdC. Lo stesso

campione di siero è stato analizzato mediante immuno-Western-blotting utilizzando antigene *T. equiperdum* OVI (5, 6).

Risultati

Tutte le matrici sottoposte all'esame microscopico a fresco hanno dato esito negativo alla ricerca di *Trypanosoma* spp. Gli accertamenti batteriologici hanno escluso la presenza di infezioni batteriche intercorrenti.

Alla Real-time PCR, sono risultati positivi: il tessuto mammario relativo a entrambe le mammelle, uno dei linfonodi tributari della mammella sinistra, la cute relativa la lesione presente sulla coscia destra, il linfonodo popliteo tributario, il liquido cefalorachidiano, il raschiato dalla fossa clitoridea, l'urina e il liquido articolare dell'articolazione tarso-metatarsica destra.

L'esame istologico ha permesso di evidenziare a carico della lesione cutanea un particolare quadro di dermatite pustolosa, caratterizzato da grave flogosi con magma di detriti di cellule infiammatorie. Tali cellule sono state identificate come granulociti eosinofili fannisti a presumibili corpi protozoari liberi, pertanto la lesione è stata definita "sabbia tripanosomica".

Le prove di immunoistochimica eseguite sulle stesse sezioni di tessuto cutaneo hanno consentito di rilevare la positività a *Trypanosoma* in corrispondenza proprio della zona di "sabbia tripanosomica".

La ricerca di anticorpi per *T. equiperdum*, mediante FdC, ha fornito risultati positivi con titoli rispettivi di +++ 1:20 per il liquido cefalorachidiano e 1:5120 per il siero. L'immuno-Western-blotting, pur fornendo risultati preliminari, ha evidenziato nel siero positivo dell'animale la presenza di bande del peso molecolare di circa 48-37, 25, 19-14 kDa. Tali bande non sono state identificate in sieri di animali negativi.

Discussione

I sintomi clinici e le lesioni riscontrate nell'animale concordano con quanto descritto in letteratura in casi di MCM. In particolare, la

sintomatologia nervosa e la presenza della lesione cutanea sono riferibili a quanto descritto nel secondo e terzo stadio evolutivo della malattia (2). La rilevanza diagnostica di tali osservazioni è avvalorata dalla presenza di anticorpi anti *Trypanosoma equiperdum* nel liquido cefalorachidiano e dal risultato positivo ai test di ricerca diretta (*Real-time* PCR e IHC) del parassita nel tessuto cutaneo.

Le lesioni cutanee analoghe a quella descritta sono state con frequenza riportate come caratteristiche nei casi clinici di malattia (2, 10) sebbene non siano disponibili in letteratura le relative descrizioni microscopiche. Pertanto, il quadro istologico definito in questo lavoro "sabbia tripanosomica", rappresenta una descrizione originale. Destano particolare interesse e necessitano di ulteriori approfondimenti la presenza del risentimento mammario monolaterale e la lesione articolare.

I risultati preliminari di immuno-Western-blotting necessitano di ulteriori approfondimenti.

La disponibilità di metodi ad elevata sensibilità, quale la *Real-time* PCR, ha permesso il rilievo del parassita anche a bassa concentrazione. Ciononostante, sono state confermate le incertezze sulla differenziazione di *T. equiperdum* all'interno del subgenere

Trypanozoon. Sulla base degli studi di caratterizzazione molecolare riportati in letteratura, infatti, non è possibile differenziare univocamente, dal punto di vista genetico, le due specie (4, 7, 8). Alcuni autori hanno dimostrato come gran parte dei ceppi isolati di *Trypanosoma equiperdum* presenterebbero caratteristiche molecolari sovrapponibili a quelle di *Trypanosoma evansi*, avvalorando l'ipotesi che entrambe le specie si siano originate da successive differenziazioni di *Trypanosoma brucei* (7, 8). I dati epidemiologici relativi al focolaio italiano del 2011 (prevalenze osservate nelle aziende, età degli animali, attività riproduttiva e correlazione tra soggetti coinvolti) hanno avvalorato l'ipotesi che all'origine del contagio vi fosse il contatto sessuale.

Tale via di trasmissione, peculiare di *Trypanosoma equiperdum*, non viene riportata in letteratura per *Trypanosoma evansi*, trasmesso principalmente da vettori meccanici e agente causale della surra, patologia che nel cavallo presenta aspetti clinici del tutto sovrapponibili al morbo coitale maligno (9, 10).

Bibliografia

1. Becker S., Franco J.R., Simarro P.P., Stich A., Abel P.M. & Steverding D. 2004. Real-time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **50**, 193-199.
2. Caporale G. 1946. Il Morbo coitale maligno. *Clinica Vet*, **69**, 23-32.
3. Caporale V., Bellani L. & Papalia S. 1980. Report on dourine epidemiological surveillance and research in Italy. In Expert consultation on research on trypanosomiasis. Food and Agriculture Organization, Rome, 16-18.
4. Claes F., Buscher P., Touratier L. & Goddeeris B.M. 2005. *Trypanosoma equiperdum*: master of disguise or historical mistake? *Trends Parasitol*, **21**, 316-321.
5. Giardina S., Paganico G., Urbani G. & Rossi M. 2003. A biochemical and immunological comparative study on *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi*. *Vet Res Commun*, **27** (4), 289-300.
6. Katz J.B., Chieves L.P., Hennager S.G., Nicholson J.M., Fisher T.A. & Byers P.E. 1999. Serodiagnosis of equine piroplasmiasis, dourine, and glanders using an arrayed immunoblotting method. *J Vet Diagn Invest*, **11** (3), 292-294.
7. Lai D.H., Hashimi H., Lun Z.R., Ayala F.J. & Lukeš J. 2008. Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**, 1999-2004.
8. Lun Z.-R., Lai D.-H., Li F.-J., Lukeš J. & Ayala F.J. 2010. *Trypanosoma brucei*: two steps to spread out from Africa. *Trends Parasitol*, **26**, 434-437.

9. World Organisation for Animal Health (Office International des Épizooties: OIE) 2008. Chapter 2.5.3.: Dourine. *In* Terrestrial manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, Paris, 845-851 (www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.03_dourine.pdf ultimo accesso 30 settembre 2011).
10. World Organisation for Animal Health (Office International des Épizooties: OIE) 2010. Chapter 2.1.17.: *Trypanosoma evansi* infection (surra). *In* Terrestrial manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, Paris (www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.17_trypano.pdf ultimo accesso 30 settembre 2011).