

# Meningo-encefalite equina da *Halicephalobus gingivalis*: contributo casistico nell'ambito delle attività di sorveglianza della Febbre del Nilo occidentale (*West Nile disease*)

Gabriella Di Francesco<sup>(1)</sup>, Giovanni Savini<sup>(1)</sup>, Alessandro Maggi<sup>(2)</sup>, Nicola Cavaliere<sup>(3)</sup>, Anna Rita D'Angelo<sup>(1)</sup> & Giuseppe Marruchella<sup>(1)</sup>

## Riassunto

Un cavallo di 7 anni è stato abbattuto dopo aver manifestato una grave sindrome neurologica a rapida evoluzione. Campioni tessutali sono stati inviati al Centro Studi Malattie Esotiche dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" (Istituto G. Caporale) per gli accertamenti diagnostici del caso. Gli esami per le più comuni virosi neurologiche equine non hanno evidenziato la presenza di infezioni in atto. Istologicamente, si è osservata a livello encefalico la presenza di manicotti perivascolari e numerosi corpi parassitari, morfologicamente riferibili a *Halicephalobus gingivalis*. Il rinvenimento ha consentito di formulare la diagnosi di meningo-encefalite da *H. gingivalis*. Il caso riportato conferma che le encefaliti parassitarie devono essere annoverate nella diagnosi differenziale delle encefalopatie equine e sottolinea l'utilità dell'approccio diagnostico multidisciplinare.

## Parole chiave

Cavallo, Febbre del Nilo occidentale, *Halicephalobus gingivalis*, Italia, Meningo-encefalite, Parassita, Sorveglianza, *West Nile disease*.

## Introduzione

Le encefalopatie sono relativamente rare nella specie equina e possono essere sostenute da agenti eziologici di varia natura: virus (es. *Flavivirus*, *Herpesvirus*, *Alphavirus*), batteri (es. *Streptococcus equi*), protozoi (es. *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp.), parassiti (es. *Halicephalobus gingivalis*, *Setaria* spp., *Strongylus vulgaris*), sostanze tossiche (es. fumonisine), disordini metabolici (es. ipocalcemia, encefalopatia epatica) (20).

Nel corso degli ultimi anni è stata riservata particolare attenzione all'encefalomielite da virus della Febbre del Nilo occidentale (WND), in virtù del suo potenziale zoonosico e della sua progressiva espansione geografica. In Italia, la WND è stata descritta per la prima volta in Toscana nel 1998 (6). Dopo 10 anni il virus è ricomparso nel delta del fiume Po (17) interessando areali geografici sempre più vasti (11).

In Italia, l'ordinanza del Ministero della Salute del 4 agosto 2011 (2) ha previsto che gli Equidi con sospetta sintomatologia nervosa in atto o deceduti per sindrome neurologica vengano sottoposti a specifiche indagini sierologiche, virologiche e anatomo-patologiche, allo scopo

(1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", via Campo Boario, 64100 Teramo, Italia

g.difrancesco@izs.it

(2) Veterinary Practitioner, via Piave 78, 71121 Foggia, Italia

(3) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, via Manfredonia 20, 71121 Foggia, Italia

di confermare o escludere il sospetto di WND. Si riportano di seguito l'iter diagnostico e i risultati delle indagini condotte in un caso sospetto di WND che, recentemente, si è verificato in Italia meridionale.

## Materiali e metodi

Nel febbraio 2012, in una scuderia nella provincia di Foggia un cavallo maschio di 7 anni (purosangue arabo × *quarter horse*) ha manifestato una grave sindrome neurologica a rapida evoluzione e lesioni traumatiche a carico della testa. Impossibilitato a mantenere la stazione quadrupedale, il cavallo è stato sottoposto a eutanasia. In ottemperanza alla Normativa nazionale vigente (2), campioni tessutali di sangue, encefalo, midollo spinale cervicale e lombare, cuore e milza, refrigerati o fissati in formalina neutra tamponata al 10% (encefalo e midollo spinale), sono stati inviati al Centro Studi Malattie Esotiche dell'Istituto "G. Caporale" per gli approfondimenti diagnostici del caso.

### Indagini virologiche e sierologiche

Campioni di sangue, siero e plasma prelevati dal cavallo *intra vitam* e vari tessuti prelevati *post mortem* da encefalo, midollo spinale, cuore e milza sono stati sottoposti a indagini virologiche utilizzando linee cellulari sensibili (RK13, VERO, C6/36). Inoltre, sono state eseguite specifiche indagini biomolecolari nei confronti del virus della WND (24) e degli *Herpesvirus* equini tipo 1 e 4 (3).

Il siero è stato testato per la presenza di anticorpi nei confronti del virus della WND. Per rilevare le immunoglobuline di classe IgM è stato utilizzato un kit ELISA disponibile in commercio IgM WND (IDEXX, Montpellier), per quelle di classe IgG si è fatto ricorso a un test ELISA indiretta (22). La sieroneutralizzazione e il metodo della riduzione del numero di placche sono stati impiegati come test di conferma (11, 13, 14).

### Indagini istopatologiche

Campioni tessutali rappresentativi dei diversi distretti dell'encefalo e del midollo spinale sono stati inclusi in paraffina. Le sezioni ottenute al microtomo sono state colorate,

come di *routine*, mediante ematossilina-eosina e osservate al microscopio ottico. In seguito, parte della formalina impiegata per la fissazione del sistema nervoso centrale (SNC) è stata centrifugata (300 × g per 5 min). Il sedimento è stato successivamente eluito in tampone fosfato, posto su vetrini porta-oggetto, talvolta colorato con soluzione iododurata di *Lugol* e osservato al microscopio ottico.

## Risultati

### Indagini virologiche e sierologiche

L'isolamento virale e i saggi biomolecolari per evidenziare segmenti di acidi nucleici specifici di *Herpesvirus* equini e virus della WND sono risultati negativi. Le indagini sierologiche hanno dimostrato la presenza di IgG a titoli neutralizzanti (1:80) nei confronti del virus della WND. Non è stata dimostrata la presenza di IgM specifiche, generalmente non rilevabili a distanza di 3 mesi dall'infezione. I dati sierologici hanno indicato, pertanto, una pregressa e "non recente" infezione da virus della WND.

### Indagini istopatologiche

Istologicamente è stata osservata la presenza di manicotti perivascolari, particolarmente evidenti in corrispondenza del ponte e del mesencefalo. L'infiltrato infiammatorio è risultato costituito in prevalenza da linfociti e macrofagi, tendenti a organizzarsi in microgranulomi (Fig. 1), associati a rari granulociti eosinofili. All'interno dei vasi sanguigni, negli spazi perivascolari, più di rado liberi nel parenchima cerebrale, sono stati osservati numerosi corpi parassitari (Figg. 2-3) le cui caratteristiche morfologiche (forma e dimensioni) si sono dimostrate sovrapponibili a quanto descritto in letteratura per *H. gingivalis*. Nello spessore del parenchima cerebrale sono stati osservati piccoli spandimenti emorragici già evidenziati al momento della processazione dei campioni (Fig. 4). La presenza di parassiti e di una lieve reazione infiammatoria sono state riscontrate nello spessore delle meningi (Fig. 5).

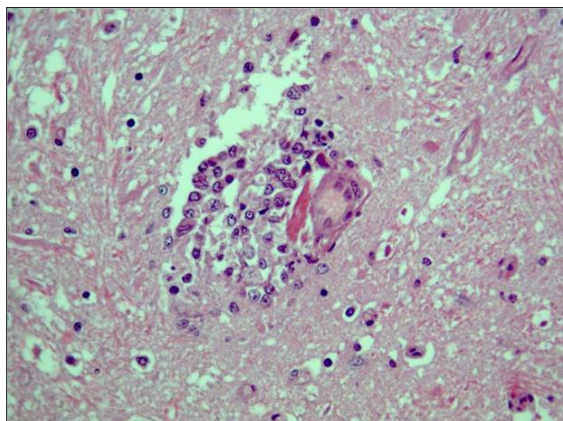


Figura 1  
Cavallo. Mesencefalo. Microgranuloma in  
prossimità di un vaso sanguigno  
Ematossilina-eosina (Ob.  $\times 40$ )

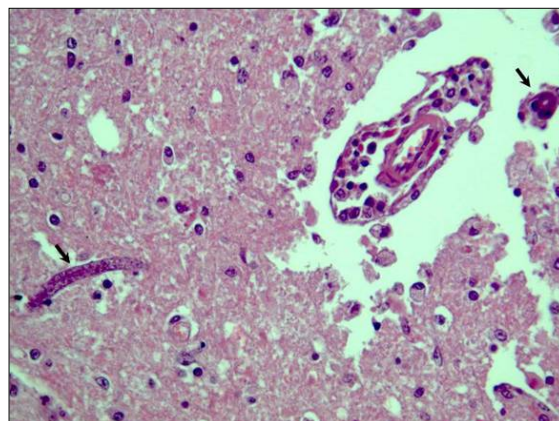


Figura 3  
Cavallo. Ponte. Presenza di vaso sanguigno,  
circondato da un'evidente reazione  
infiammatoria, e di due esemplari di  
*Halicephalobus gingivalis* (frecche), uno dei  
quali immerso nel parenchima cerebrale  
Ematossilina-eosina (Ob.  $\times 40$ )

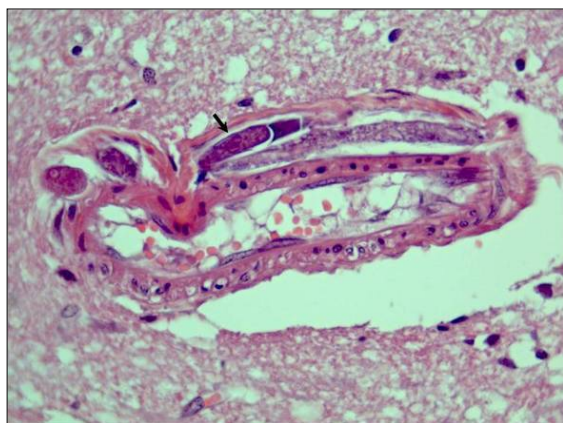


Figura 2  
Cavallo. Mesencefalo. Corpi parassitari, riferibili  
a *Halicephalobus gingivalis*, in prossimità di un  
vaso sanguigno  
All'interno di un parassita è possibile riconoscere  
l'utero contenente un uovo pienamente sviluppato,  
provvisto di nucleo ben evidente (freccia)  
Ematossilina-eosina (Ob.  $\times 63$ )



Figura 4  
Cavallo. Encefalo. Emorragie puntiformi sparse  
(frecche) nello spessore del parenchima  
cerebrale

Corpi parassitari morfologicamente riferibili a *H. gingivalis* sono stati facilmente identificati con l'osservazione al microscopio ottico del sedimento del liquido fissativo. I parassiti, in numero di 0-3/100  $\mu\text{l}$  di sedimento e delle dimensioni di 200-400  $\times$  15-20  $\mu\text{m}$ , hanno mostrato nel loro interno il caratteristico esofago rabditoide (Fig. 6 a-b). I risultati delle indagini riportate hanno consentito di formulare la diagnosi di meningo-encefalite da *H. gingivalis*.

## Discussione

Le infezioni da *H. gingivalis* sono ritenute molto rare nel cavallo e nell'uomo e del tutto eccezionali in altre specie animali (9, 10, 19). In Italia è stato descritto un numero esiguo di casi di halicephalobosi equina (5, 7, 15, 16), sono circa 50 i casi riportati nella letteratura scientifica mondiale (8).

*H. ingivalis* (sinonimi *Halicephalobus deletrix* e *Micronema deletrix*) è un nematode a diffusione cosmopolita appartenente all'ordine *Rhabditida*, solitamente conduce vita libera nel suolo e

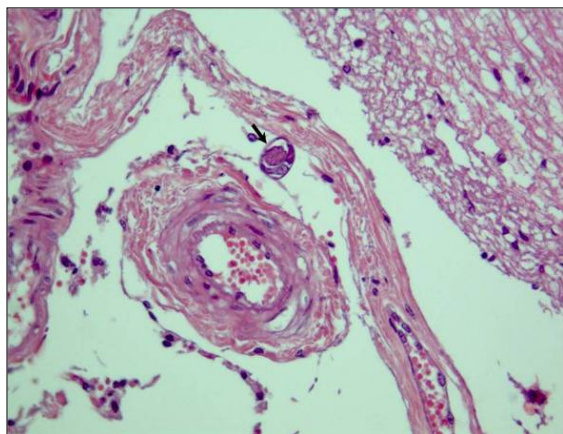


Figura 5  
Cavallo. Mesencefalo. Parassita (sezione trasversale) visibile nello spessore delle meningi in prossimità di un vaso  
Ematossilina-eosina (Ob.  $\times 40$ )

(a) Corpi parassitari in diversi stadi evolutivi (Ob.  $\times 40$ )



(b) All'estremità cefalica di un parassita è visibile la caratteristica dilatazione ampollare dell'esofago (freccia)



Figura 6  
Cavallo. Sedimento del liquido fissativo  
Colorazione con soluzione iodo-iodurata di Lugol  
(Ob.  $\times 40$ )

nelle sostanze organiche in decomposizione. Nell'ambiente esterno è nota l'esistenza di maschi e femmine di *Halicephalobus gingivalis* che si riproducono per via sessuale. Nei mammiferi infetti si osservano esclusivamente femmine partenogenetiche (18). La patogenesi dell'halicephalobosi equina è al momento sconosciuta. Verosimilmente, *H. gingivalis* infetta il cavallo penetrando attraverso le mucose e/o le soluzioni di continuo della cute, sebbene non si possano escludere altre modalità d'infezione (9, 23). Lesioni cutanee sono state evidenziate anche nel soggetto in esame, ma la loro evoluzione temporale ha indotto a ritenerle secondarie alla sintomatologia nervosa. Una volta penetrato nell'ospite, il parassita sembra si diffonda per via ematogena rendendosi responsabile di differenti forme clinico-patologiche e mostrando una particolare predilezione per il Sistema Nervoso Centrale (SNC) (4, 9). Anche nel caso riportato, la frequente dimostrazione del parassita all'interno e nelle immediate vicinanze dei vasi sembra supportare questa ipotesi (4, 5, 9, 12).

La meningo-encefalite da *H. gingivalis* ha rapida evoluzione e la distribuzione delle lesioni è variabile, coinvolgendo tutto l'SNC oppure, come nel caso descritto, specifici distretti encefalici. Il grado di compromissione del SNC determina l'intensità e la tipologia delle manifestazioni cliniche. Istologicamente, si osservano infiltrati infiammatori, a prevalente localizzazione perivascolare costituiti da macrofagi, cellule giganti multinucleate, linfociti, granulociti eosinofili, e plasmacellule variamente rappresentati (4, 5, 9, 15).

La diagnosi *intra vitam* di halicephalobosi è possibile per le lesioni accessibili dall'esterno (es. granulomi cutanei e della mucosa orale) e per il rinvenimento dei parassiti nel sedimento urinario in seguito a localizzazione renale (12). In quest'ultima evenienza, la diagnosi delle forme neurologiche di halicephalobosi necessita di indagini istopatologiche e viene, pertanto, formulata *post mortem* (3, 18). Si conferma, come già riferito da altri Autori (5, 12), la presenza di *H. gingivalis* nella formalina utilizzata per la fissazione del SNC, al punto che l'esame microscopico dello stesso liquido

fissativo potrebbe rappresentare un valido test diagnostico preliminare. A tal proposito, si ribadisce che il parassita possiede alcune peculiarità morfologiche che lo contraddistinguono nettamente dagli altri parassiti (es. *Angiostrongylus cantonensis*, *S. vulgaris*, *Setaria* spp., *Parelaphostrongylus tenuis*) anch'essi dotati di neurotropismo nella specie equina (1, 5, 8, 12, 15).

Le difficoltà diagnostiche *intra vitam* rendono impraticabile una terapia mirata delle forme nervose di halicephalobosi. Inoltre, i farmaci antiparassitari attualmente impiegati sono poco efficaci, probabilmente per l'incapacità di superare la barriera emato-encefalica e di penetrare all'interno delle lesioni granulomatose (21). Al momento, non esistono misure di prevenzione specifiche nei confronti dell'halicephalobosi equina. Tuttavia, è ragionevole ritenere che una corretta igiene ambientale e il trattamento delle lesioni cutanee possano contribuire a ridurre il rischio di infezione.

## Conclusioni

Le encefaliti parassitarie devono essere tenute in debita considerazione nella diagnosi differenziale delle encefalopatie equine. Si sottolinea l'utilità dell'approccio multidisciplinare per la risoluzione del quesito diagnostico. Ciò assume particolare impor-

tanza nelle aree geografiche interessate dalla circolazione di virus neurotropi e dotati di potere zoonosico. Si rimarca come nel cavallo oggetto di studio il sospetto diagnostico di WND sia stato avvalorato dalla sieropositività al virus e dalla pregressa circolazione del microrganismo nella provincia di Foggia. In questo contesto, le attività previste dalla normativa in vigore relativa a WND potrebbero contribuire notevolmente allo studio delle encefalopatie equine a partire dalle forme che per caratteristiche clinico-patologiche sono da ritenersi, al momento, sottostimate.

## Bibliografia

1. Anderson R.C., Linder K.E. & Peregrine A.S. 1998. *Halicephalobus gingivalis* (Stefanski, 1954) from a fatal infection in a horse in Ontario, Canada with comments on the validity of *H. deletrix* and a review of the genus. *Parasite*, **5** (3), 255-261.
2. Anon. 2011. Norme sanitarie in materia di encefalomyelite equina di tipo West Nile (West Nile disease) e attività di sorveglianza sul territorio nazionale Serie Generale. Ordinanza 4 Agosto 2011. *Gazz Uff*, **209**, 9-58.
3. Ataseven V.S., Dağalp S.B., Güzel M., Başaran Z., Tan M.T. & Geraghty B. 2009. Prevalence of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 infections in equidae species in Turkey as determined by ELISA and multiplex nested PCR. *Res Vet Sci*, **86**, 339-344.
4. Bryant U.K., Lyons E.T., Bain F.T. & Hong C.B. 2006. *Halicephalobus gingivalis*-associated meningo-encephalitis in a thoroughbred foal. *J Vet Diagn Invest*, **18** (6), 612-615.
5. Cantile C., Rossi G., Braca G., Vitali C.G., Taccini E. & Renzoni G. 1997. A horse with *Halicephalobus deletrix* encephalitis in Italy. *Eur J Vet Pathol*, **3** (1), 29-33.
6. Cantile C., Di Guardo G., Eleni C. & Arispici M. 2000. Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet J*, **32** (1), 31-35.
7. Casalone C., Iulini B., Pintore M.D., Maurella C., Bozzetta E., Cantile C., Gandini G., Capucchio M.T., Calistri A., D'Angelo A. & Caramelli M. 2011. Zoonoses surveillance in Italy (2000-2009): investigation

- on animals with neurological symptoms. In Non-flavivirus encephalitis (S. Tkachev, ed.). InTech Open Access, Rijeka, 29-58 (doi: 10.5772/1740).
8. Eydal M., Bambir S.H., Sigurdarson S., Gunnarsson E., Svansson V., Fridriksson S., Benediktsson E.T. & Sigurdardóttir O.G. 2012. Fatal infection in two Icelandic stallions caused by *Halicephalobus gingivalis* (Nematoda: Rhabditida). *Vet Parasitol*, **186** (3-4), 523-527.
  9. Hermosilla C., Coumbe K.M., Habershon-Butcher J. & Schöniger S. 2011. Fatal equine meningoencephalitis in the United Kingdom caused by the panagrolaimid nematode *Halicephalobus gingivalis*: case report and review of the literature. *Equine Vet J*, **43** (6), 759-763.
  10. Isaza R., Schiller C.A., Stover J., Smith P.J. & Greiner E.C. 2000. *Halicephalobus gingivalis* (Nematoda) infection in a Grevy's zebra (*Equus grevyi*). *J Zoo Wildl Med*, **31** (1), 77-81.
  11. Istituto "G. Caporale" 2012. West Nile disease. Istituto "G. Caporale", Teramo (sorveglianza.izs.it/emergenze/west\_nile/descrmalattia\_persapernedipiu\_wnd.html ultimo accesso 16 novembre 2012).
  12. Kinde H., Mathews M., Ash L. & St Leger J. 2000. *Halicephalobus gingivalis* (*H. deletrix*) infection in two horses in southern California. *J Vet Diagn Invest*, **12** (2), 162-165.
  13. Lelli R. 2002. Encefalite West Nile: diagnostica di laboratorio sugli animali. *Quaderni Igiene Pubblica Vet*, **14**, 87-91.
  14. Lelli R., Savini G., Deodori L., Filippini G., Di Gennaro A., Leone A., Di Gialleonardo L., Venturi L. & Caporale V. 2008. Serological evidence of Usutu virus occurrence in north-eastern Italy. *Zoonoses Public Health*, **55**, 361-367.
  15. Mandrioli L., Morini M., Bettini G., Torre F. & Marcato P.S. 2002. Encefalite granulomatosa da *Halicephalobus gingivalis* in un cavallo. *Ippologia*, **1**, 27-38.
  16. Marocchio L. & Mutinelli F. 1988. Nefrite granulomatosa da *Micronema deletrix* in un cavallo. *Clin Vet*, **111** (3), 149-153.
  17. Monaco F., Lelli R., Teodori L., Pinoni C., Di Gennaro A., Polci A., Calistri P. & Savini G. 2010. Re-emergence of West Nile virus in Italy. *Zoonoses Public Health*, **57** (7-8), 476-486.
  18. Nadler S.A., Carreno R.A., Adams B.J., Kinde H., Baldwin J.G. & Mundo-Ocampo M. 2003. Molecular phylogenetics and diagnosis of soil and clinical isolates of *Halicephalobus gingivalis* (Nematoda: Cephalobina: Panagrolaimoidea), an opportunistic pathogen of horses. *Int J Parasitol*, **33** (10), 1115-1125.
  19. Ondrejka S.L., Procop G.W., Lai K.K. & Prayson R.A. 2010. Fatal parasitic meningoencephalomyelitis caused by *Halicephalobus deletrix*: a case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med*, **134** (4), 625-629.
  20. Toth B., Aleman M., Nogradi N. & Madigan J.E. 2012. Meningitis and meningoencephalomyelitis in horses: 28 cases (1985-2010). *J Am Vet Med Assoc*, **240** (5), 580-587.
  21. Trostle S.S., Wilson D.G., Steinberg H., Dzata G. & Dubielzig R.R. 1993. Antemortem diagnosis and attempted treatment of (*Halicephalobus*) *Micronema deletrix* infection in a horse. *Can Vet J*, **34** (2), 117-118.
  22. Tsai T.F., Popovici F., Cernescu C., Campbell G.L. & Nedelcu N.I. 1998. West Nile encephalitis in southeastern Romania. *Lancet*, **352**, 767-771.
  23. Wilkins P.A., Wacholder S., Nolan T.J., Bolin D.C., Hunt P., Bernard W., Acland H. & Del Piero F. 2001. Evidence for transmission of *Halicephalobus deletrix* (*H. gingivalis*) from dam to foal. *J Vet Intern Med*, **15**, 412-417.
  24. World Organisation for Animal Health (Office International des Épizooties: OIE). 2008. West Nile fever, Chapter 2.1.20. In Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, OIE, Paris, 377-385.