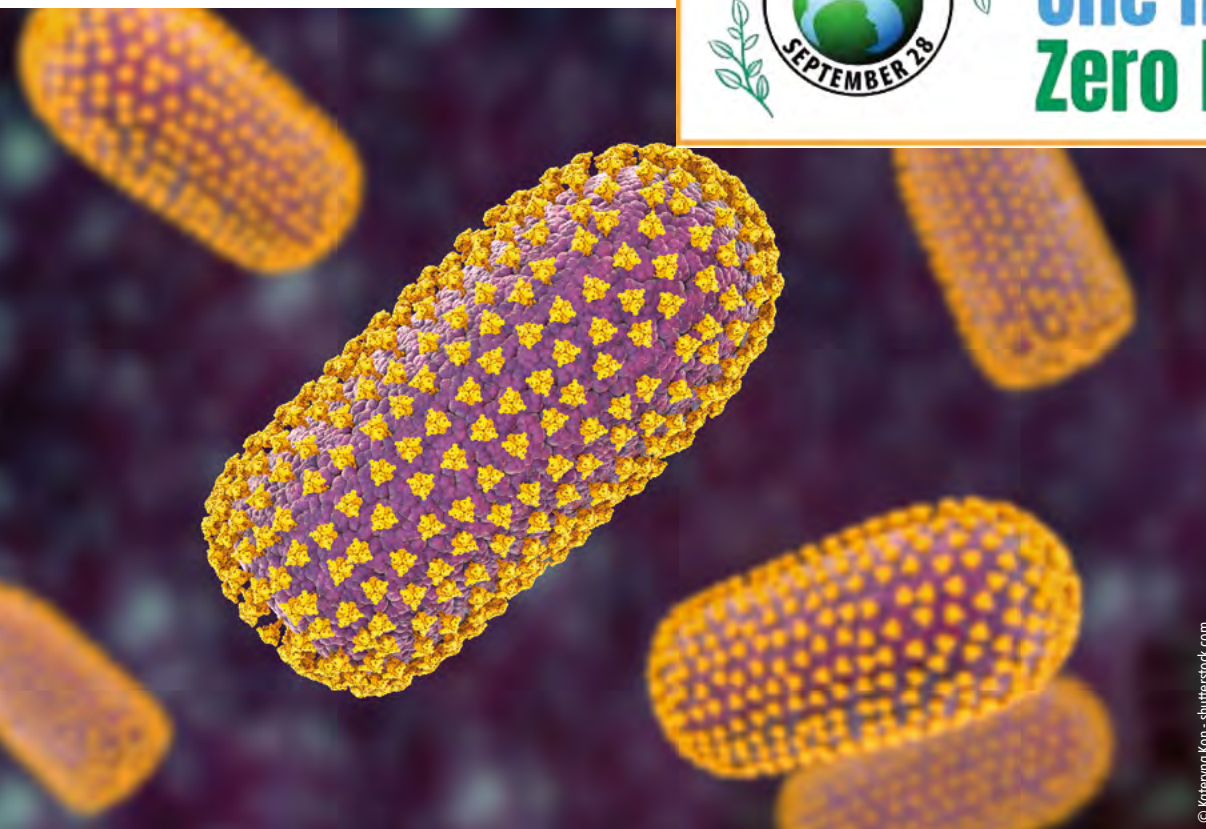


Evento dell'IZSve

RABBIA E LYSSAVIRUS, lo stato dell'arte della sorveglianza in Italia



© Kateryna Kon - shutterstock.com

Il 28 settembre 2022 si è celebrata la 16^a Giornata Mondiale contro la rabbia. Il tema di quest'anno "Rabies: One Health, Zero Deaths" ha messo in evidenza la connessione tra la salute dell'ambiente e quella delle persone e degli animali. A livello globale WOH, FAO e OMS hanno approvato il piano strategico "Zero by 30", che mira ad azzerare i decessi da rabbia mediata dal cane entro il 2030. Benché l'Unione Europea abbia raggiunto l'indennità da rabbia nella maggior parte dei suoi territori, la malattia è ancora un argomento di attualità per le conseguenze in sanità pubblica della sua circolazione nel serbatoio animale.

Oltre a prevenire la reintroduzione della rabbia nei territori degli Stati Membri, l'Europa si trova oggi a dover gestire la circolazione di numerosi Lyssavirus nella popolazione dei chiroteri.

L'Italia ha aderito all'iniziativa con un corso di formazione¹: "Rabbia e Lyssavirus. Stato dell'arte della sorveglianza", organizzato dal Centro di riferimento nazionale (CRN) per la rabbia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve), e rivolto agli operatori sanitari degli IZS nonché ai medici veterinari operanti nel pubblico e nel privato.

SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA DELLA RABBIA NEGLI ANIMALI SELVATICI E DOMESTICI

La dott.ssa Paola De Benedictis, direttore del Centro di riferimento nazionale per la Rabbia all'IZSve, ha illustrato lo stato dell'arte della sorveglianza epidemiologica della rabbia in Italia ed

L'Italia è ufficialmente indenne da rabbia, questo però non azzerava il rischio di registrare casi sospetti sul territorio. Ecco perché la sorveglianza rimane fondamentale: il Centro di riferimento nazionale per la rabbia dell'IZSve ha dunque promosso, nell'ambito delle iniziative della 16^a Giornata Mondiale contro la rabbia, un momento formativo per fare il punto della situazione di questa patologia tra i domestici e i selvatici.

Europa. In Europa, nel triennio 2019-2022 i casi autoctoni di rabbia nell'uomo sono stati quattro: due in Russia, uno in Georgia e un caso di EBLV-1 in Francia (diagnosi retrospettiva). Anche i casi importati, nell'uomo sono stati quattro, ma solo nel 2019, come conseguenza della riduzione dei viaggi in seguito alle restrizioni che la maggior parte degli Stati europei ha attuato in mitigazione di Covid-19.

L'obiettivo di raggiungere l'indennità da rabbia, nella UE nel 2020, non è stato purtroppo raggiunto dagli Stati membri.

La situazione epidemiologica negli animali selvatici presenta una generale flessione, dovuta al notevole incremento dei casi nella volpe rossa in Polonia e Romania, dal 2020, e alla recente introduzione dell'infezione anche in Ungheria. Le campagne di vaccinazione orale dei selvatici, che da sempre coinvolgono gli Stati membri infetti e di confine con il fronte infetto, nello scorso anno hanno registrato alcune criticità e l'impossibilità di Romania, Bulgaria e Grecia a proseguire l'attività.

Attualmente l'Italia è fra i Paesi a basso rischio di introduzione della rabbia nei selvatici, mentre rimane elevato nella regione balcanica dove la malattia è in larga parte non controllata.

È stata quindi illustrata la sorveglianza in Italia, dove la principale specie target testata per la sorveglianza è in assoluto la volpe rossa, seguita dal tasso e dai mustelidi. Si nota inoltre un incremento della sorveglianza in specie quali il lupo e lo sciacallo dorato, che hanno visto una notevole espansione negli ultimi anni e vengono pertanto tenuti monitorati. Ogni anno vengono sottoposti a sorveglianza circa 3.000 selvatici e lo sforzo è focalizzato soprattutto sulle aree a maggior rischio di introduzione, ovvero il Friuli Venezia Giulia e le Regioni del Nord Italia.

I casi di rabbia negli animali domestici dichiarati in Europa nel periodo 2019-2022 riguardano sempre il settore orientale, soprattutto Ucraina, Russia e Turchia, con una dozzina di casi anche in Polonia nel 2021. In Romania l'infezione è stata notificata in diversi capi bovini, sottolineando la necessità di un maggiore controllo della malattia nei selvatici.

In Italia, dove il rischio è molto basso, ogni anno vengono sottoposti a sorveglianza meno di 500 soggetti, prevalentemente cani e gatti. La sorveglianza sindromica dei domestici ha permesso l'identificazione nel 2020, dell'infezione da *West Caucasian Bat Lyssavirus* (WCBV) in un gatto domestico ad Arezzo. Il gatto, per la sua natura cacciatrice e la maggiore possibilità rispetto al cane di vagare senza la supervisione del proprietario, presenta un alto rischio di contrarre infezioni dai chiroteri. Per quanto riguarda la rabbia propriamente detta, invece, il rischio per l'Italia è rappresentato dalla movimentazione illegale (e in minor misura legale) di animali domestici. La frequenza di importazione di infezione dai Paesi del bacino del Mediterraneo, Nord Africa in testa, è molto alta, ma il rischio sussiste anche dall'Est Europa e dai Balcani.

L'EMERGENZA RIFUGIATI DALL'UCRAINA

Un capitolo a parte merita la situazione dell'Ucraina, uno dei Paesi maggiormente flagellati dalla rabbia. Nel triennio 2019-2021, prima della guerra, i casi di positività registrati nei domestici sono stati 389 nei cani, 325 nei gatti e 26 nei cani randagi, per un totale di 740 casi. Dopo lo scoppio della guerra, il rischio di portare la malattia in giro per l'Europa è aumentato sensibilmente. Per affrontare questa emergenza la Direzione generale sanità animale e farmaci veterinari (DGSAF) del Ministero della Salute, sentito il parere del CRN per la rabbia, ha disposto misure e raccomandazioni (nota n. 7257 del 21 marzo 2021) al fine di prevenire e controllare eventuali rischi per la salute dei profughi, degli animali a loro seguito e di tutte le persone presenti sul territorio nazionale. La difficile gestione di una situazione complessa e il rischio concreto di episodi sul nostro territorio sono stati uno stress-test per il sistema di sorveglianza.

Una recente inchiesta condotta dal Laboratorio di riferimento europeo per la rabbia (ANSES, Francia), ha messo in luce come gli Stati membri abbiano risposto in maniera sovrapponibile alla richiesta di accoglienza di tali animali a seguito di rifugiati, benché non ci sia stata una chiara disposizione a livello centrale da parte dell'Ue.

LA NUOVA NORMATIVA NAZIONALE PER LA SORVEGLIANZA DELLA RABBIA

Molto è stato fatto e molto rimane da fare nel sistema di sorveglianza italiano. Il gatto di Arezzo ha messo in luce alcune carenze soprattutto nella fase di intercettazione dei casi non prevedibili. Come evidenziato da Andrea Maroni Ponti, della DGSAF Ministero della Salute, uno dei punti critici è la capacità di individuare casi sospetti e l'adozione di eventuali misure preventive durante l'esecuzione delle visite cliniche in presenza di sintomi neurologici. A questo proposito è opportuno il riferimento al nuovo Dlgs 136 del 5/8/2022 che adegua la normativa nazionale in materia di controllo e prevenzione delle malattie animali al Reg. UE 2016/429 sulla sanità animale, e che rivoluziona l'architettura delle attività nei confronti della rabbia.

La prima novità è l'abrogazione completa del Regolamento di Polizia Veterinaria del 1954, ivi compresi gli articoli relativi alla rabbia (artt. 83-92). Un altro punto fondamentale è l'inclusione a tutti gli effetti del detentore degli animali da compagnia fra i soggetti a cui si applica la nuova normativa; ne consegue che tanto il detentore quanto il veterinario sono responsabili della sorveglianza, con obbligo di notifica del caso sospetto al veterinario ufficiale dell'ASL, entro 12 ore. In caso di mancato rispetto delle misure di controllo le sanzioni vanno da 1.000 a 10.000 euro.

La nozione di "caso sospetto" costituisce il perno attorno al quale rivalutare le attività di sorveglianza e controllo finora svolte, non solo in termini di corretta interpretazione delle manifestazioni cliniche visibili nell'animale, ma anche dal punto di vista operativo sul tipo di sorveglianza

Novità

ophPet®

**IL NUOVO BRAND
OFTALMICO**
studiato per
supportare il
benessere degli
occhi del cane e
del gatto



OPHPET RELIEF Spray



Ophpet Relief Spray è una soluzione sterile, isotonica e priva di conservanti, indicata per la detersione della zona oculare e perioculare di cani e gatti.

www.contentgroup.it/it/ophpet

da implementare: dove e come effettuarla e periodo di isolamento dell'animale, non da ultimo avvalendosi anche degli strumenti già disponibili come l'indagine epidemiologica e la conferma diagnostica.

LYSSAVIRUS E SORVEGLIANZA NEI CHIROTTERI

Lo status di Paese indenne da rabbia non azzerava il rischio di registrare casi sospetti sul nostro territorio. L'interesse verso i Lyssavirus nei chiroteri è cresciuto negli ultimi due anni soprattutto dopo l'episodio del gatto di Arezzo, primo caso confermato di spillover da pipistrello a gatto in Italia. Come è noto, il WCBV è stato isolato e identificato dal CRN rabbia in seguito a diagnosi di infezione effettuata nel gatto, non nei pipistrelli, nei quali sembra essere sfuggente. Una volta avviata l'indagine epidemiologica per comprendere il meccanismo dello spillover, il CRN per la rabbia si è ovviamente interrogato sul perché il virus non fosse stato trovato prima nei chiroteri. Il problema riguarda ancora una volta la sorveglianza, che necessita di un rafforzamento della rete dei laboratori e degli strumenti analitici che garantiscono una diagnosi corretta.

Come ha chiarito la dott.ssa Stefania Leopardi, veterinario dirigente del CRN, rabbia la sorveglianza in Italia è in crescita: si è passati dalle poche unità degli anni 2006-2012 al picco di circa 1.000 campioni del biennio 2020-2021 associato allo spillover di WCBV. Anche il coinvolgimento degli Istituti Zooprofilattici si è fatto via via più ampio. Tuttavia, le specie che dovrebbero essere target della sorveglianza sono ancora di gran lunga sottorappresentate e il CRN incoraggia tutti gli attori della sorveglianza nel rafforzare tale attività al fine di colmare questo gap.

Una delle peculiarità della famiglia dei Lyssavirus, che conta 17 specie tra cui il virus della rabbia (RABV), è che la maggior parte di essi sono presenti nei chiroteri. A fronte di una certa diversità genetica, si ritiene che tutti i Lyssavirus siano potenzialmente in grado di causare rabbia nei mammiferi; per questo motivo è fondamentale che le metodiche in uso presso i laboratori coprano l'intero genere Lyssavirus, e non specifici solo per rabbia, in modo da rendere possibile la diagnosi nei chiroteri.

È necessario poi garantire la qualità dei campioni: lo stoccaggio del campione per mesi e in alcuni casi anche per anni (anche a -80 °C) riduce la qualità, col rischio di non poter più sottoporre ad analisi lo stesso. Una riflessione importante riguarda infine il tipo di sorveglianza da attuare. Anche nei chiroteri è fondamentale la sorveglianza passiva, ossia la sorveglianza di tutti i soggetti deceduti, ritrovati morti, che presentano sintomatologia sospetta o anche sottoposti ad eutanasia presso i centri di recupero della fauna selvatica. In sintesi, nei mammiferi la diagnosi di rabbia si effettua esclusivamente *post mortem*, a partire da un campione di encefalo e tale si conferma anche se si parla di chiroteri.

La sorveglianza attiva, che si basa invece sulla



In oltre dieci anni di sorveglianza attiva, il CRN rabbia si è concentrato in particolare sulla sorveglianza di quattro specie di chiroteri, tra cui *Eptesicus serotinus* (per EBLV-1).

manipolazione e sul prelievo di matrici differenti, fornisce soltanto qualche informazione sulle dinamiche di circolazione dei virus nel serbatoio selvatico e non permette di rilevare nessun riscontro virologico. Ad oggi viene svolta solo dal CRN, sotto stretto controllo del Ministero della Transizione ecologica mediante il suo organo di controllo, l'Ispra, e del Ministero della Salute.

In oltre dieci anni di sorveglianza attiva, il CRN rabbia si è concentrato in particolare sulla sorveglianza di quattro specie di chiroteri e tre-quattro Lyssavirus: *Myotis myotis* e *Myotis blythii* (EBLV-1?), *Eptesicus serotinus* (EBLV-1) e *Miniopterus schreibersii* (WCBV-LLEBV).

Ciò che emerge è che chiroteri diversi presentano dinamiche diverse. *“La domanda per noi è capire se queste differenze dipendono dal virus, dalla specie o dall'ecologia, e per rispondere occorrono anni di osservazioni”*, ha spiegato Stefania Leopardi, *“per riuscire a recuperare informazioni utilizzabili a livello di sanità pubblica veterinaria la sorveglianza attiva necessita molta dedizione e lavoro”*. Mentre tale attività è fondamentale per capire le dinamiche di circolazione dei Lyssavirus nei chiroteri e riuscire a prevenire e mitigare eventuali spillover, il rafforzamento della rete degli IZS nella diagnosi virologica è fondamentale per garantire l'adeguatezza della sorveglianza passiva.

ARMONIZZAZIONE DELLA SORVEGLIANZA PASSIVA A LIVELLO NAZIONALE

La dott.ssa Petra Drzewnioková ha presentato l'aggiornamento effettuato dal CRN della metodica di realtime RT-PCR già distribuita agli IIZZSS nel 2020. È stata implementata la sensibilità della metodica diagnostica nei confronti dei Lyssavirus divergenti che circolano in Italia, quali WCBV e LLEBV e tutti gli IIZZSS sono pertanto chiamati ad adeguarsi.

Ha sottolineato inoltre come la conformità del campione costituisce un passaggio fondamentale della diagnostica: prelevare/inviare l'organo corretto (carcassa intera o cervello intero), analizzare il campione il prima possibile o conservarlo in congelatore fino al momento dell'analisi, oppure

in frigo per un breve periodo (massimo 1 giorno). Tale metodica, seppure molto sensibile, non risulta essere lo strumento più adeguato per effettuare sorveglianza attiva, alla luce della scarsa probabilità di ritrovare il virus nella saliva. A tal proposito il CRN si avvale di metodiche specie-specifiche anziché pan-Lyssavirus.

Le performance di tutti i laboratori appartenenti alla rete di sorveglianza nazionale sono valutate annualmente nell'ambito dei circuiti interlaboratorio per la diagnosi della rabbia (AQUA RV-D). Come relazionato dalla dott.ssa Barbara Zecchin, la partecipazione al circuito è stata buona, con un netto miglioramento delle performance, così come ottime sono state la competenza e la partecipazione al circuito dedicato alla sorveglianza dei chiroteri. Gli obiettivi da perseguire nei prossimi anni saranno il perfezionamento e il potenziamento delle tecniche di biologia molecolare per la diagnosi di rabbia/Lyssavirus nei chiroteri e di identificazione genetica della specie ospite, puntando in particolare al miglioramento nell'accuratezza del dato e all'aumento del numero di laboratori partecipanti.

STUDI DI PATOGENESI COMPARATA

Infine sono stati condotti alcuni studi di patogenesi comparata di rabbia (RABV) e Lyssavirus divergenti (WCBV e LLEBV) attraverso l'utilizzo di un modello animale (criceto dorato), presentati dalla dott.ssa Martina Castellan.

In un primo esperimento, WCBV presenta i classici segni clinici associati a rabbia e coinvolgimento multiorgano ma, a differenza di RABV, promuove lo sviluppo di una patologia furiosa con una più severa perdita di peso degli animali. Per quanto riguarda invece LLEBV, nonostante il virus sia stato rilevato nel sistema nervoso centrale di alcuni individui, nessun animale è deceduto o ha sviluppato sintomi clinici. Queste osservazioni suggeriscono che LLEBV è meno patogenico di WCBV nell'ospite non reservoir.

Lo stesso studio è stato utilizzato per valutare la risposta immunitaria nell'ospite occasionale e per la prima volta è stato ottenuto il profilo trascrittomico del sistema nervoso centrale di animali modello. I dati di trascrittomico mostrano come i virus RABV e non-RABV promuovano l'attivazione della risposta anti-virale cellulare e immunitaria.

La lezione che si può trarre da questi esperimenti è che la comprensione delle differenze in termini di patogenesi, distribuzione ecologica e interazione con l'ospite occasionale tra RABV e altri Lyssavirus divergenti rappresenta un importante punto di partenza per l'analisi del rischio di trasmissione di tali virus e per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche che possano essere “pan-Lyssavirus” e non focalizzate solamente sul RABV. |

Claudio Mantovani

1. 28/9/2022