



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)
BRESCIA

Via Bianchi, 9
25124 BRESCIA
(Italy)
Tel. + 39 30 22901
Fax: +39 30 2425251
C.F. - P.IVA 00284840170
N. REA CCIAA DI BRESCIA 88834

Brescia, 17/08/2011

N. PROT.

Da citare nelle risposte

Reparto Proteomica
Aggregato al Reparto Genomica
Laboratorio di Referenza OIE
per Rabbit Haemorrhagic Disease
Tel 0302290617 – Fax 0302290559
Email: lorenzo.capucci@izsler.it

Centro Nazionale di Referenza
per le Malattie Virali dei Lagomorfi
Tel. 0302290298 - Fax 0302290623
Email: antonio.lavazza@izsler.it



IZSLER

PROT. N. 22417 DEL 17/08/2011
8.4.0.0.0/2/2011 - AGD 983

Ai Direttori Sanitari
II.ZZ.SS Nazionali
Loro Sedi

e per cc

Dr. Giorgio Varisco
Direttore Sanitario
IZSLER
Sede

Oggetto: diagnosi di laboratorio dell'RHDV Fra 10, nuova variante dell'RHDV.

Premessa

Sul Veterinary Record del mese di febbraio è stato pubblicato un articolo dai colleghi della French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) riguardante l'identificazione di una nuova variante dell'RHDV (Le Gall-Reculé G. et al. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France, Veterinary Record, February 5, 2011 pp.137-138, doi: 10.1136/vr.d697). Il nuovo virus si differenzia significativamente dall'RHDV originale e dal sottotipo RHDVa sia geneticamente che antigenicamente. I dati dai focolai identificati in Francia depongono per un virus altamente patogeno che causerebbe malattia anche in allevamenti oggetto di normale profilassi vaccinale. Da comunicazioni personali con i colleghi francesi risulta che il virus fosse già presente nella primavera 2010 nella popolazione di conigli selvatici ove si è diffuso rapidamente divenendo il ceppo prevalente, sia nei selvatici che negli allevamenti industriali. Sebbene il virus causi certamente l'RHD classica nella sua forma acuta e letale, sia le informazioni dalla Francia che i primi dati sperimentali ottenuti presso il Centro di Referenza scrivente indicherebbero l'RHD non colpisce tutte le linee genetiche in ugual grado, ma in talune l'infezione decorrerebbe in forma significativamente più attenuata, con percentuali di mortalità inferiori. In parallelo ci sono anche prime osservazioni e prove che indicano che le popolazioni cunicole sensibili, sottoposte a vaccinazione con vaccini prodotti con ceppi "classici", sarebbero protette dall'RHD causata dalla variante Fra10 solo fra i 15 e 30 gg post vaccinazione con gli attuali vaccini e che quindi potrebbe essere necessaria lo sviluppo e la disponibilità di un vaccino omologo. Al momento e per quanto di conoscenza del Centro scrivente, in Italia sono stati identificati due casi di RHDVFra10 in allevamenti epidemiologicamente correlati della provincia di Udine.

LA DIAGNOSI DI LABORATORIO DELL'RHDV FRA10

Data la sua significativa distanza genetica ed antigenica dai ceppi di RHDV circolanti all'oggi sul territorio, la diagnosi di laboratorio richiede un aggiornamento per mantenere elevata la sensibilità analitica e diagnostica. Di seguito si forniscono alcune informazioni/suggerimenti.

In generale i test oggi disponibili sono in grado di rilevare il ceppo variato anche perché nei casi di malattia acuta la concentrazione del virus nel fegato è elevata.

Emoagglutinazione (HA)

I due isolati di Fra10 sono risultati HA positivi con titoli relativamente elevati simili a quelli dei ceppi noti (1/5120-1/10240). Si ricorda che per avere la massima sensibilità devono essere usate emazie umane di tipo "0". L'estratto al 10% di fegato viene diluito 1/10 e poi in base 2 in 0,1 ml di PBS pH 7,2 e aggiunto poi di 0,1 ml di emazie in PBS pH 7,2 all'1,4%. La micropiastra, che deve contenere un controllo negativo (estratto fegato negativo 10%) viene poi incubata a 4°C per 1-2 ore e quindi letta. Il campione è positivo se alla diluizione 1/40 o superiore le emazie risultano agglutinate. Il titolo è pari all'ultima diluizione ove si registra il 90-100% di agglutinazione. I campioni positivi RHDV hanno titoli medi fra 1/2560 e 1/10240 (o superiori).

ELISA

Il Centro di Referenza fornisce un ELISA in un formato simil-kit utilizzata da alcuni IZS nazionali. Data la significativa distanza antigenica del Fra10, la sensibilità dell'ELISA, sviluppata con reagenti immunologici per i ceppi correnti, è minore. In ogni caso data la presenza di un siero policlonale anti-RHDV adsorbito al pozzetto e di un pool di AcM fra cui alcuni cross reattivi, l'ELISA è in grado di rilevare il ceppo Fra10. E' in corso una modifica dell'ELISA corrente per aumentarne la sensibilità diagnostica nel confronti della variante francese.

PCR "tradizionale"

L'efficienza dipende ovviamente dalla sequenza dei primers. In relazione alla significativa differenza fra le sequenze del Fra10 e dei ceppi circolanti sul territorio si possono sviluppare PCR che rilevano tutti gli RHDV oppure specifiche per l'RHDVwt, RHDVa o RHDVFra10 (PCR differenziali). La Dr.ssa Cavadini, che opera nel Centro di Referenza sta sviluppando diversi tipi di PCR diagnostica.

Al momento si suggerisce l'uso delle seguenti coppie di primers, per PCR "tradizionale".

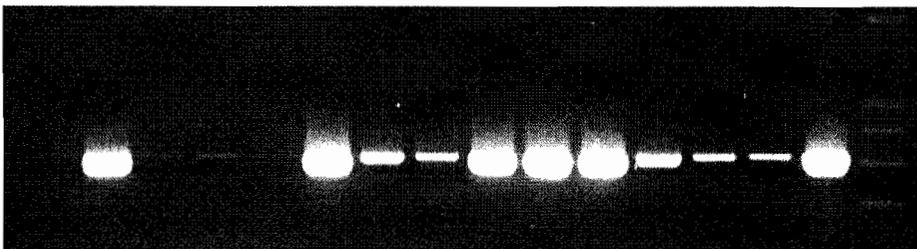
(A) Coppia in grado di identificare tutte le varianti RHDV note, incluso il Fra2010.

501-Dir 5'-CCAGATGGCTTTCCTGACATG-3'
9511-Rev 5'-GAACATGATGGGTGTGTTITT-3' I: Inosina

(B) Coppia che privilegia l'identificazione dell'RHDV classico e della variante RHDVa.

RHDV-F 5'-CCTGTTACCATCACCATGCC -3'
RHDV-R 5'-AACCTCCAGGTACTGGTTG -3'

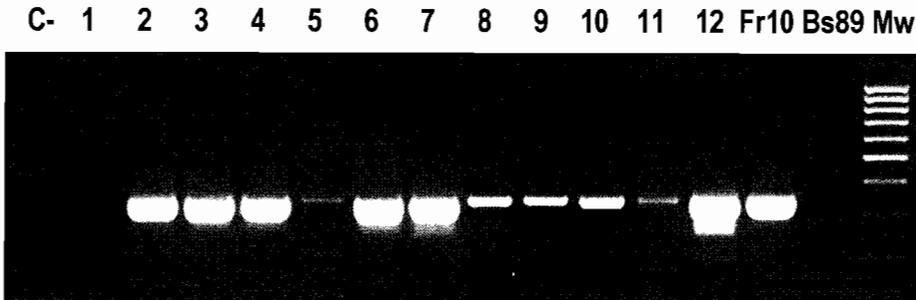
C- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 Fr10 Bs89 Mw



(C) Coppia che privilegia l'identificazione dell'RHDVFra2010.

Francia-F 5'-GTTACCCTGGAAGCAGTTCGT-3'

Francia-R 5'-CAAACAACCCGGCTGTTGCC-3'



Entrambi i gel sopra riportati a titolo di esempio sono stati eseguiti con i seguenti campioni:

- nelle lanes 1, 5, 8, 9, 10: RHDVwt
- nelle lanes 2, 3, 4, 6, 7, 12: RHDV Fra.
- nella lane 11: probabile campione apatogeno, in corso di approfondimento.

Come si può notare la specificità non è assoluta ma la differenza in reattività consente di diagnosticare con certezza la presenza dell'RHDVFra10.

Tabella riassuntiva delle condizioni di amplificazione mediante PCR

Primers	RHDV Wt	RHDV Fra10	T _a	T _{ext}	Prodotto PCR
(A) 501-Dir 9511-Rev	+	+	55°C	40"	390pb
(B) RHDV-F RHDV-R	++	+/-	58°C	30"	319bp
(C) Francia-F Francia-R	+/-	++	58°C	40"	350bp

35 cicli

Sierologia

Il Centro di Referenza fornisce un ELISA per competizione in un formato simil-kit utilizzata da alcuni IZS nazionali. L'ELISA è in grado di rilevare gli anticorpi indotti dall' RHDVFra10 ma con sensibilità inferiore (dalle 4 alle 8 volte) date la diversità antigenica. Come per l'ELISA virologica si sta sviluppando una versione specifica per la variante Francese. Un metodo alternativo è l'inibizione dell'HA che gode del vantaggio di una relativa facilità di sviluppo. In ogni caso l'IHA è consigliabile solo per quei laboratori che l'utilizzano o ne hanno buona esperienza.

Non appena sarà terminata la fase di aggiornamento delle metodiche ne verrà data comunicazione.

Il Centro di Referenza rimane a disposizione per ogni chiarimento e supporto.

Distinti saluti

Dr. Lorenzo Capucci
Laboratorio OIE RHD
L. Capucci

Dr. Antonio Lavazza
Centro di Referenza Nazionale
malattie vitali lagomorfi
A. Lavazza

