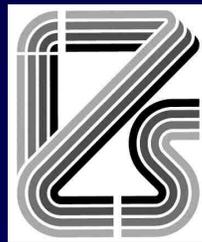


Aggiornamenti di Patologia Virale del Coniglio

Antonio LAVAZZA & Lorenzo Capucci

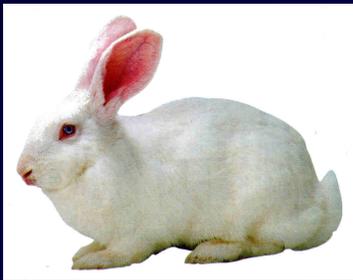


**Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia ed Emilia Romagna
- Brescia -**

MALATTIE EMORRAGICHE DEI LAGOMORFI

RHD/MEV Rabbit Haemorrhagic Disease

coniglio
domestico e selvatico
(*Oryctolagus cuniculus*)



CALICIVIRUS

EBHS European Brown Hare Syndrome

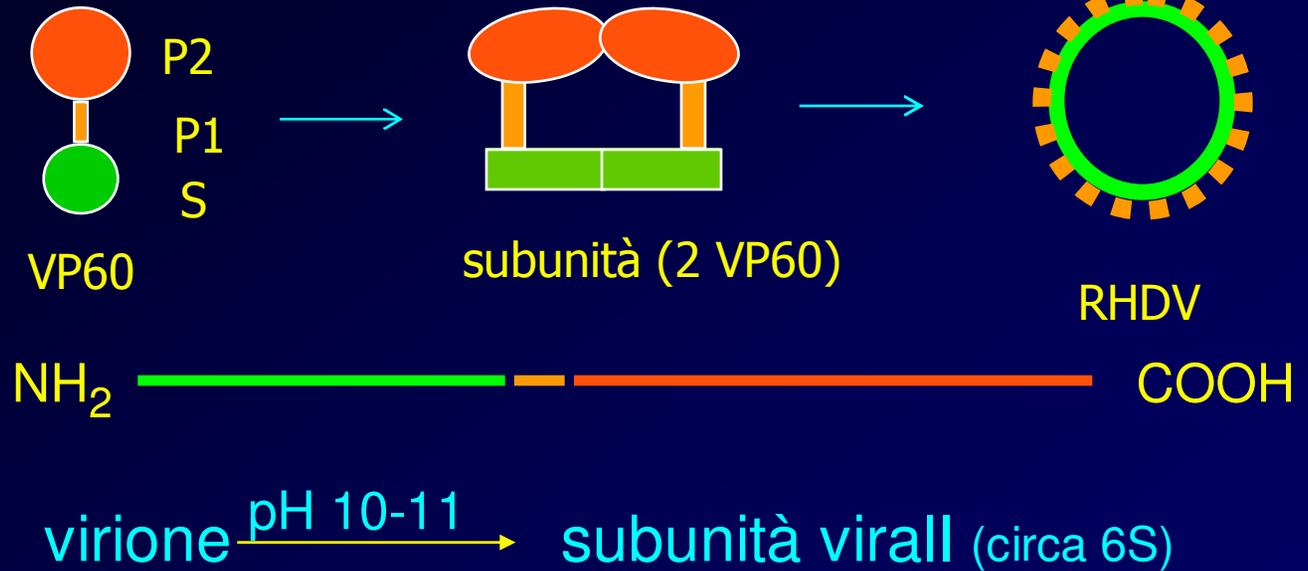
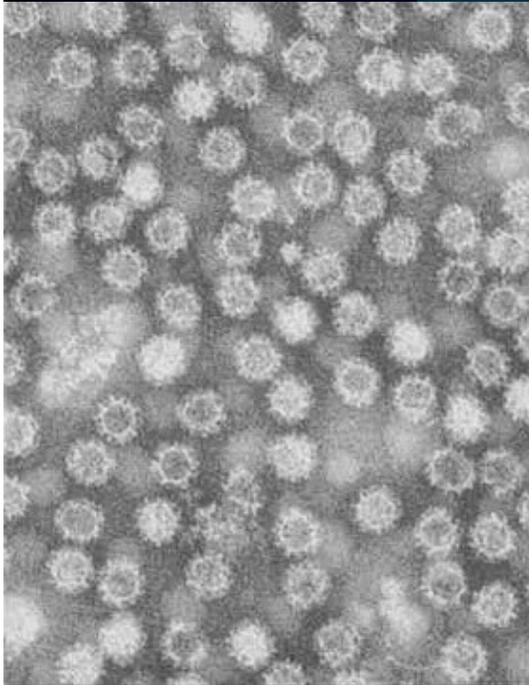
lepre bruna
selvatica e allevata
(*Lepus europaeus P.*)



CALICIVIRUS

antigenicamente correlati ma distinti
no cross-infezione

RHDV: UN CALICIVIRUS



ELEVATA VARIABILITÀ ANTIGENICA

ELEVATA RESISTENZA AMBIENTALE

RHDV era (o è) un virus enterico?

MEV / RHD - Diffusione

- ✓ Segnalata in più di 40 Paesi
- ✓ RHD è attualmente endemica in diverse parti del mondo: Asia, Europa, Centro America (Cuba), Oceania (Australia, Nuova Zelanda). In Messico, dove comparve nel 1989 è stata eradicata. Recentemente si è avuto un caso negli USA
- ✓ Animali di tutte le età si infettano ma la malattia clinica si osserva solo in quelli di età >40gg
- ✓ Morbilità 90-100%
- ✓ Mortalità 40-90%

MEV / RHD - Epidemiologia

VIE DI INFEZIONE: orale, nasale, congiuntivale

VIE DI ESCREZIONE: urine, feci, secrezioni nasali

TRASMISSIONE:

diretta

- ▣ conigli infetti
- ▣ contaminazione passiva da conigli convalescenti

indiretta

- ▣ contaminazione attrezzature, gabbie, veicoli
- ▣ ingestione di alimenti o acqua contaminati
- ▣ vettori animati passivi (uccelli, roditori, uomo, cani)
- ▣ disseminazione aerogena (?)

MEV / RHD - Sintomatologia

- ✓ **Non sempre osservabile (morte improvvisa)**
- ✓ **Nei selvatici:**
alterazioni comportamentali quali disorientamento, difficoltà di movimento, alterato riflesso di fuga, tendenza ad avvicinarsi a centri abitati
- ✓ **Nei soggetti allevati:**
apatia, disoressia, fasi di eccitazione con emissione di grida, difficoltà respiratorie, decubito laterale, fuoriuscita liquido siero-emorragico dalle narici

Evoluzione:

acuta: morte in 65-96 ore

subacuta/cronica: morte dopo 96 ore con comparsa di ittero, più spesso, sopravvivenza e guarigione

MEV / RHD - Decorso dell'infezione

% Mortalità

■ RHD

■ EBHSV



RHD 60-80 %

5-15 %

5-35 %

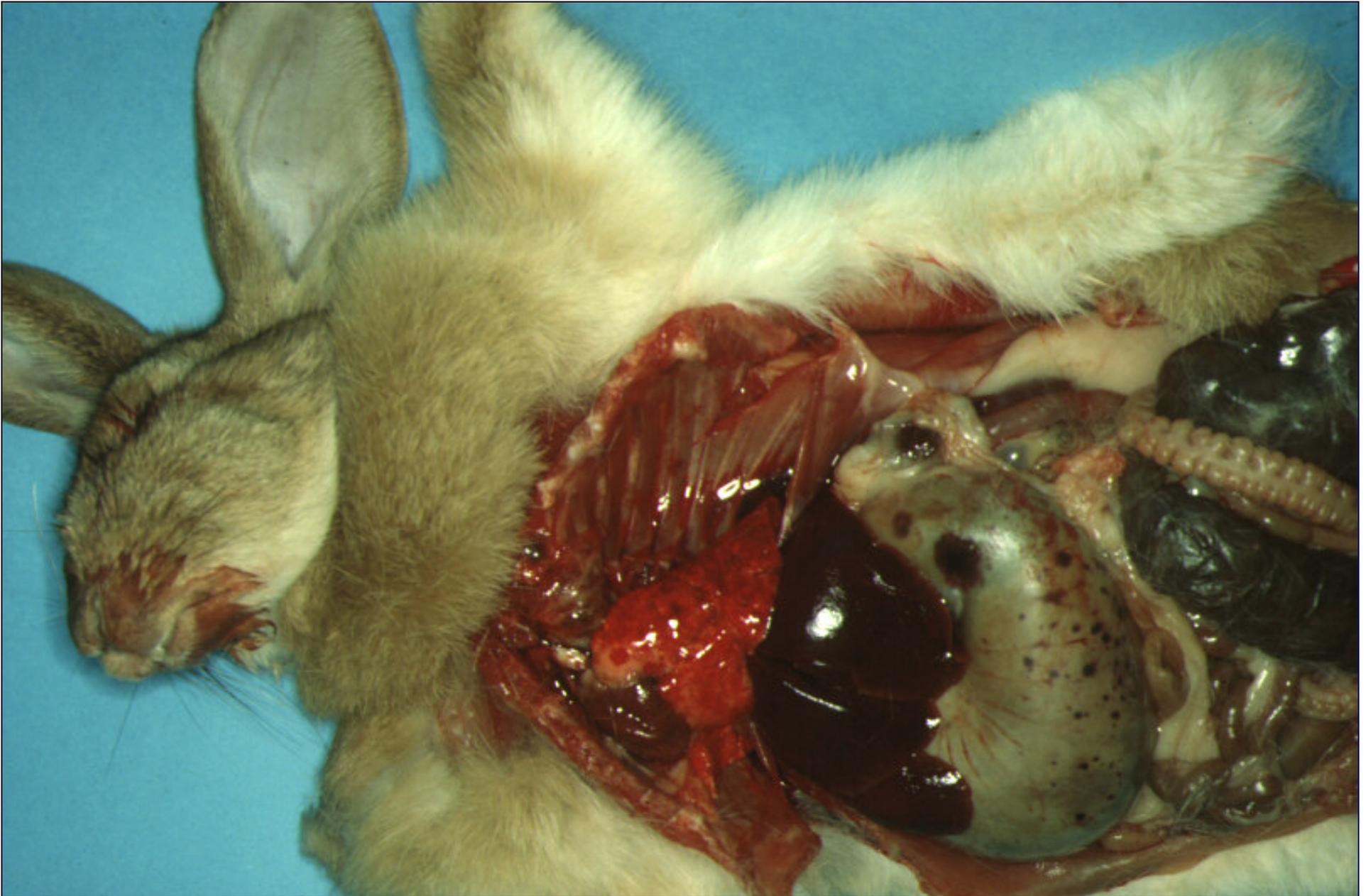
EBHS 10-60 %

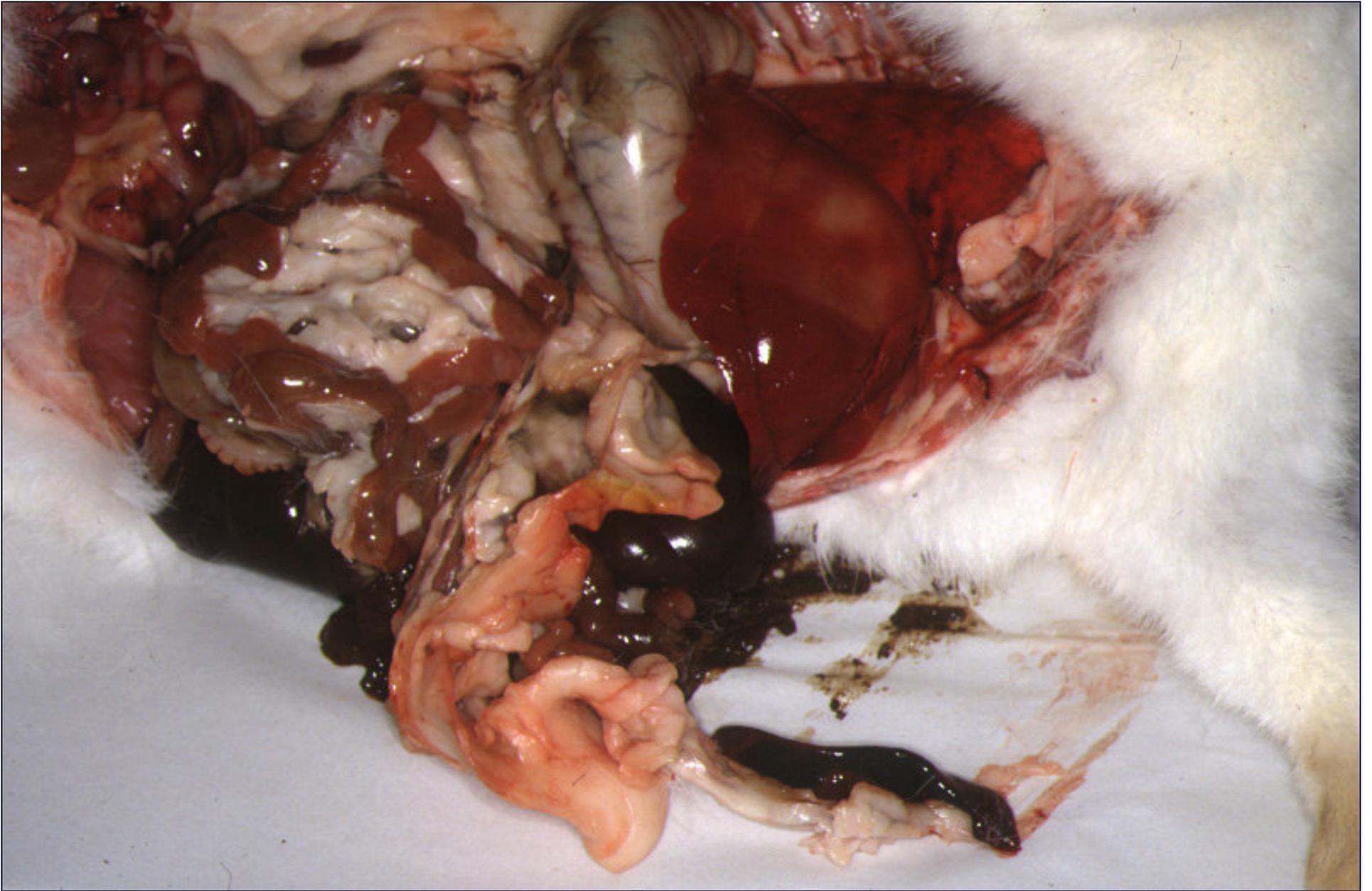
10-50 %

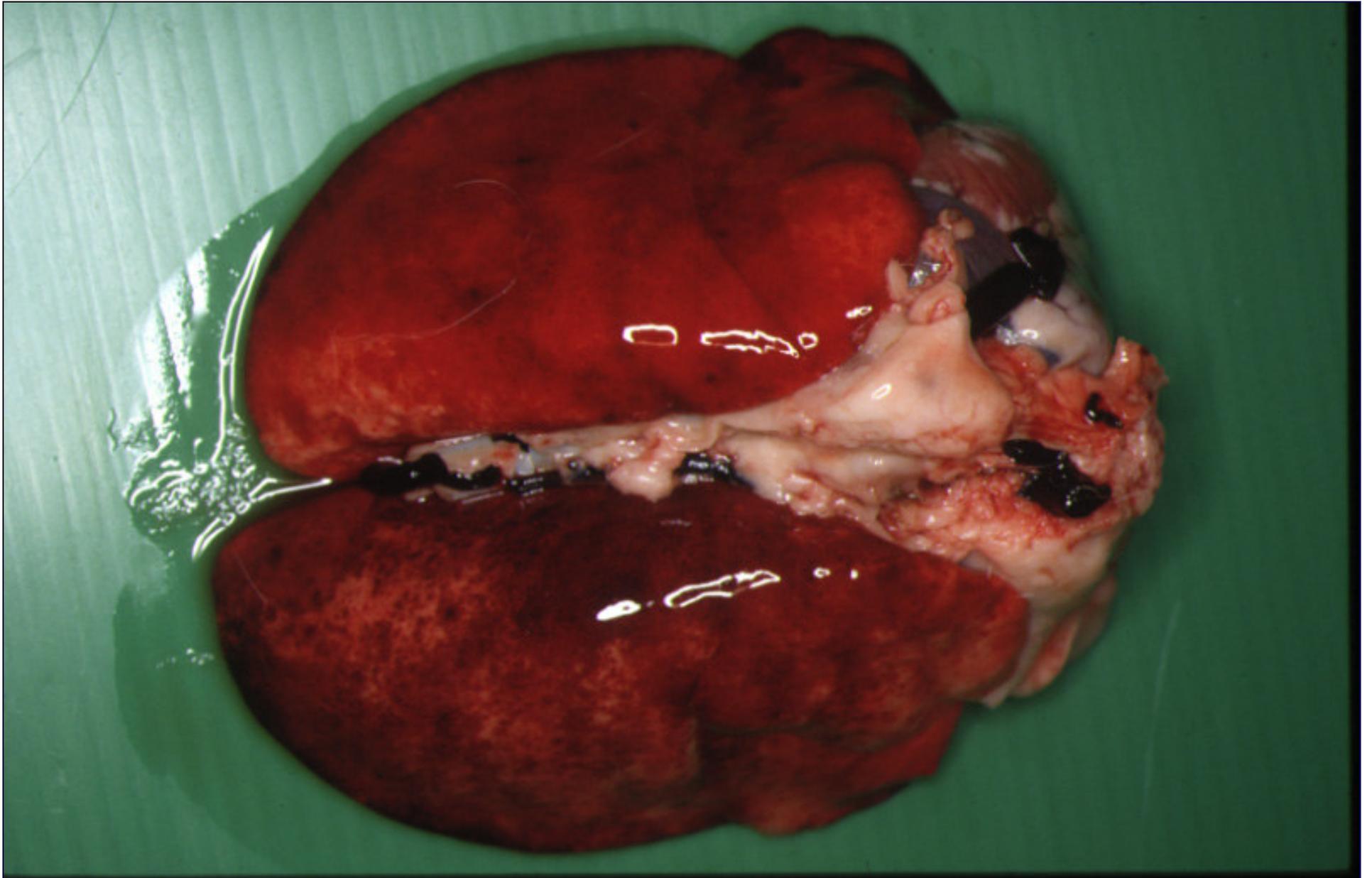
20-70 %

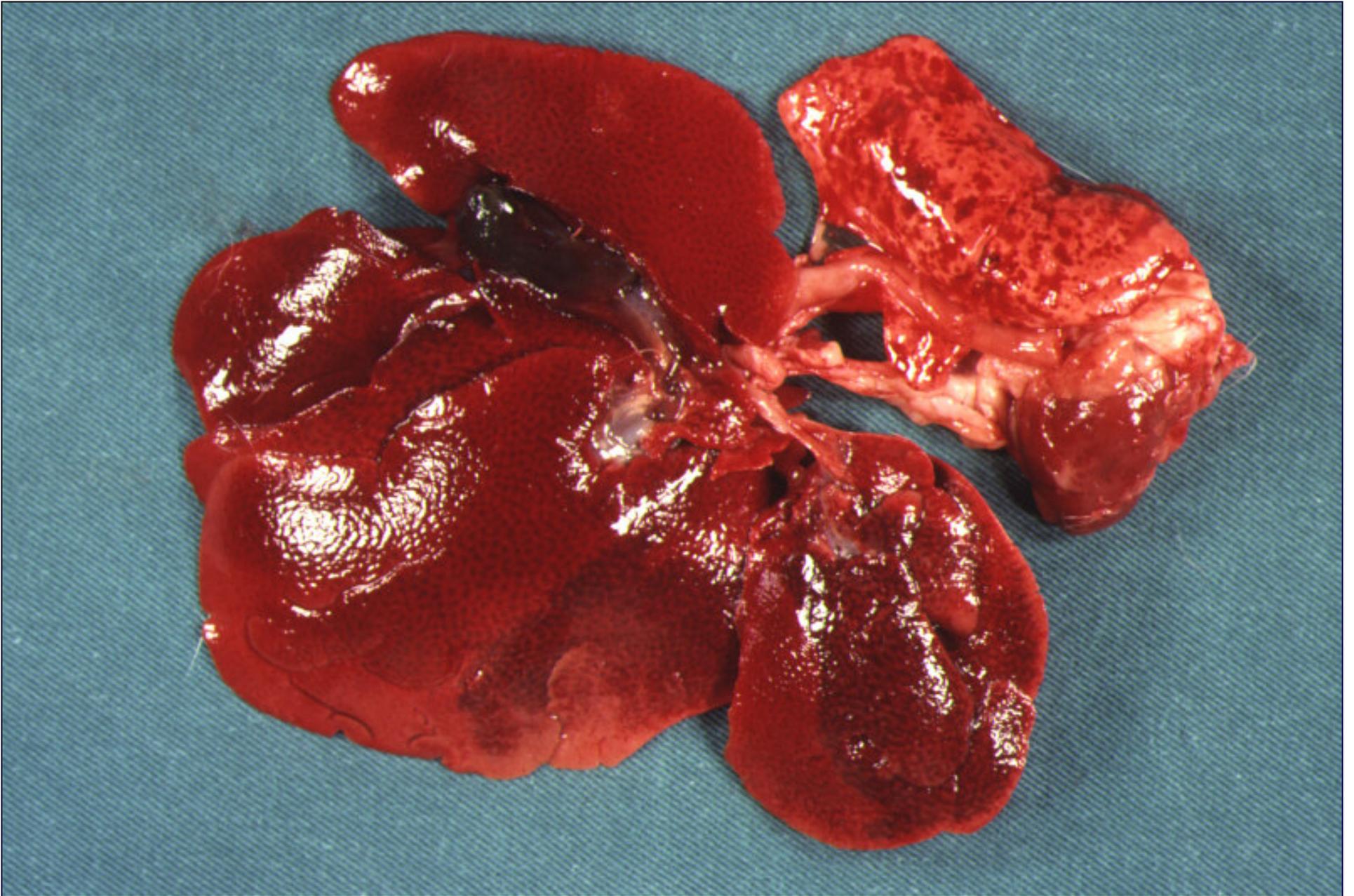
LESIONI MEV

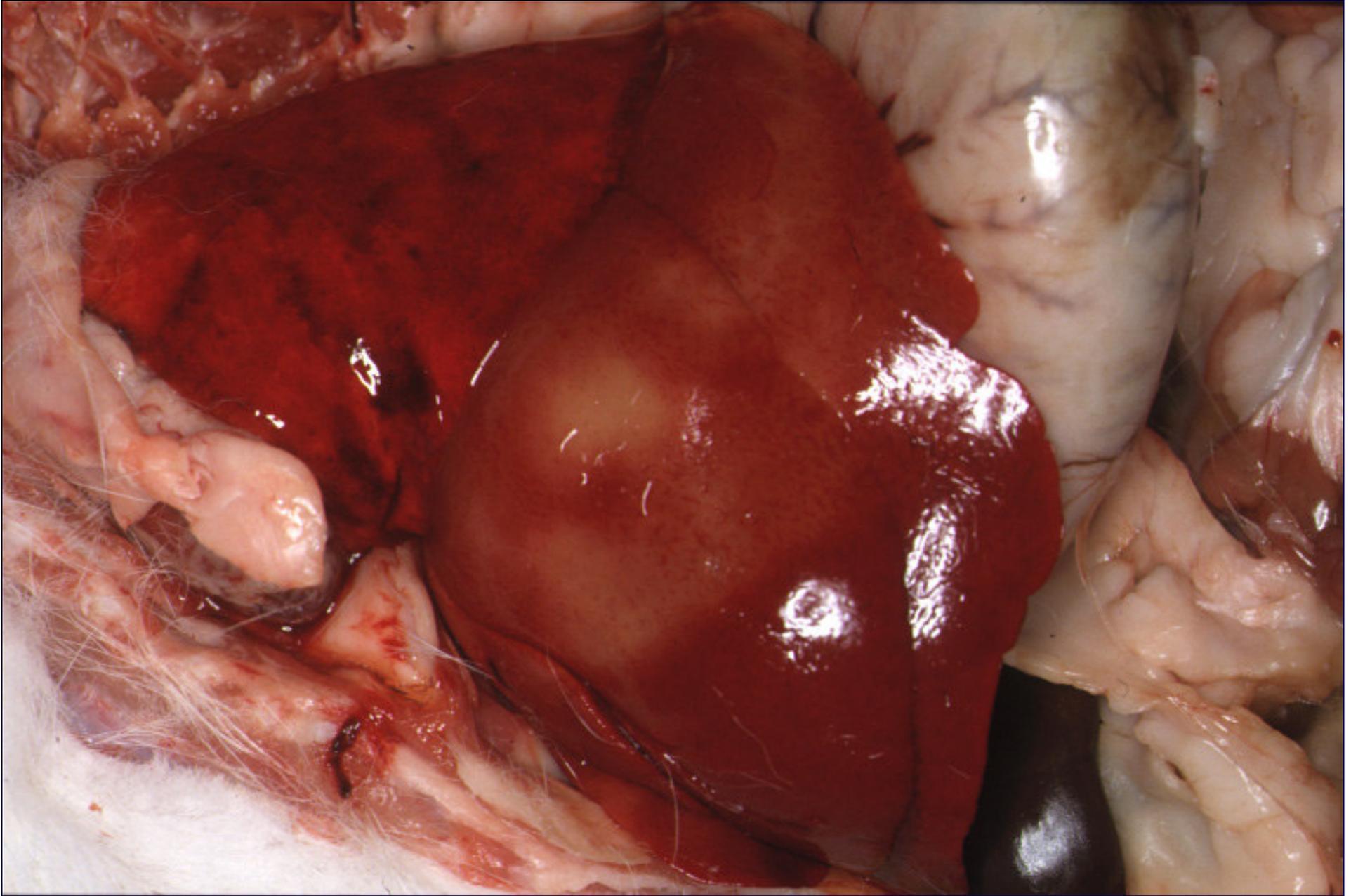


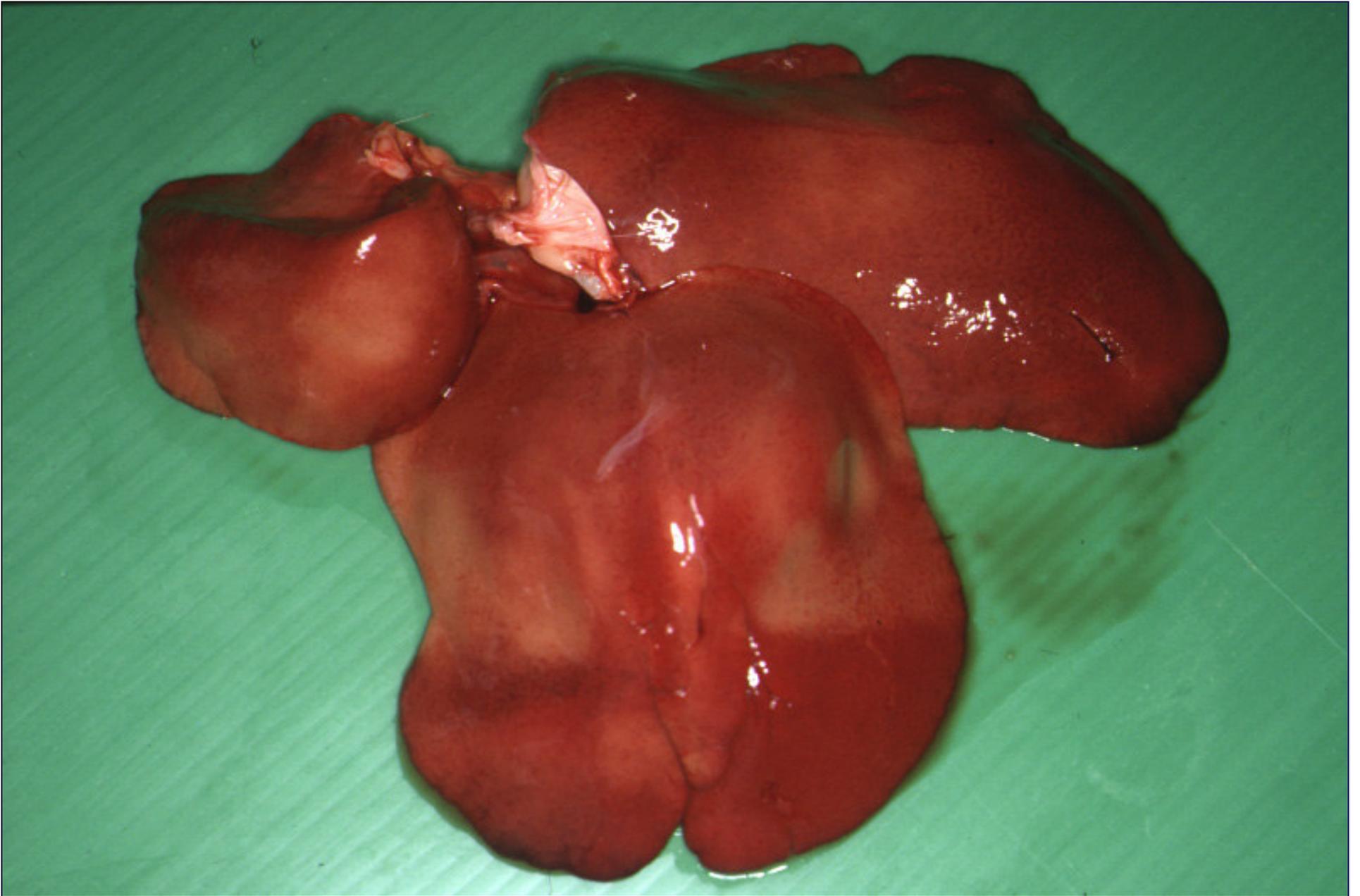


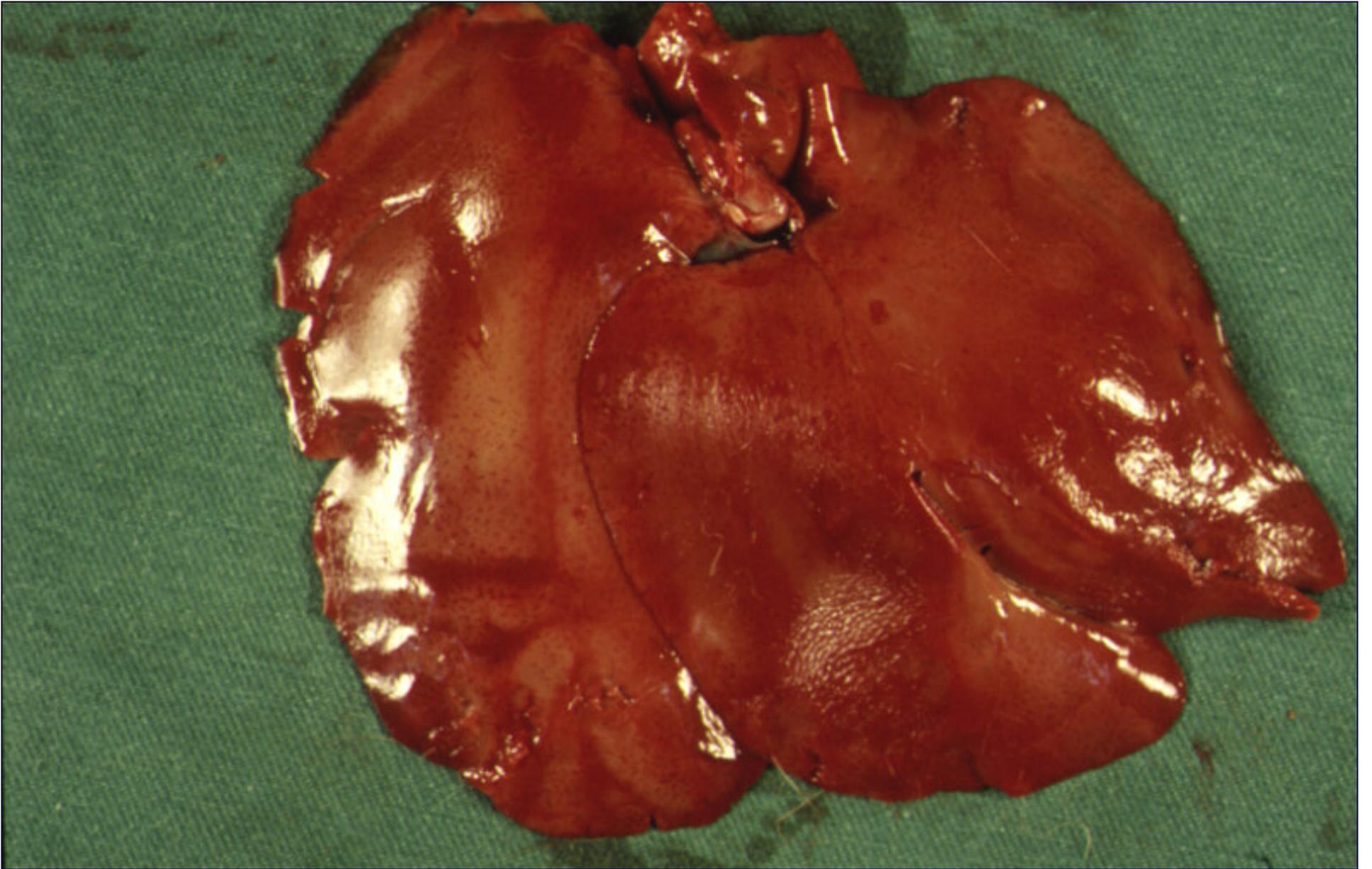


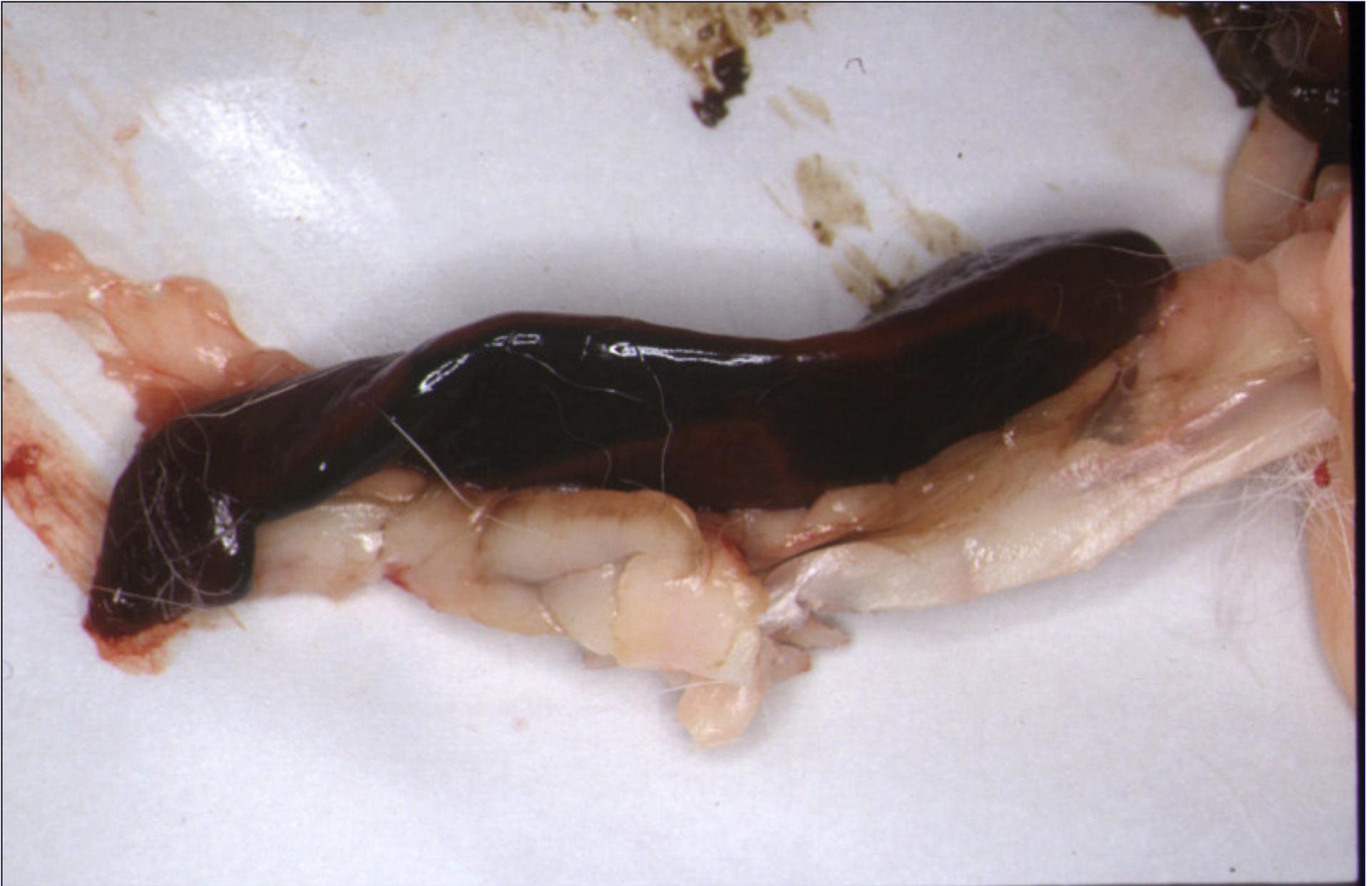




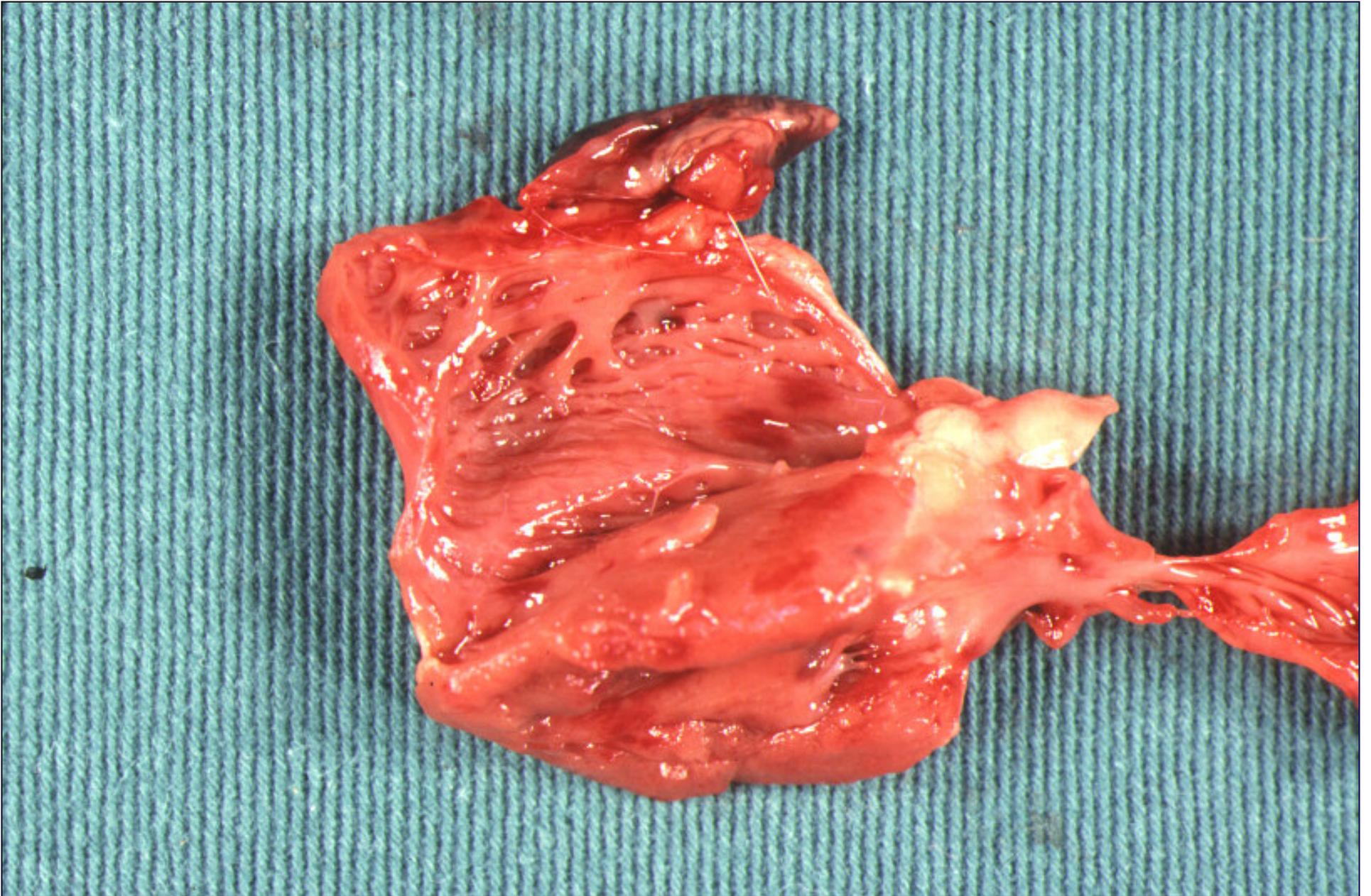






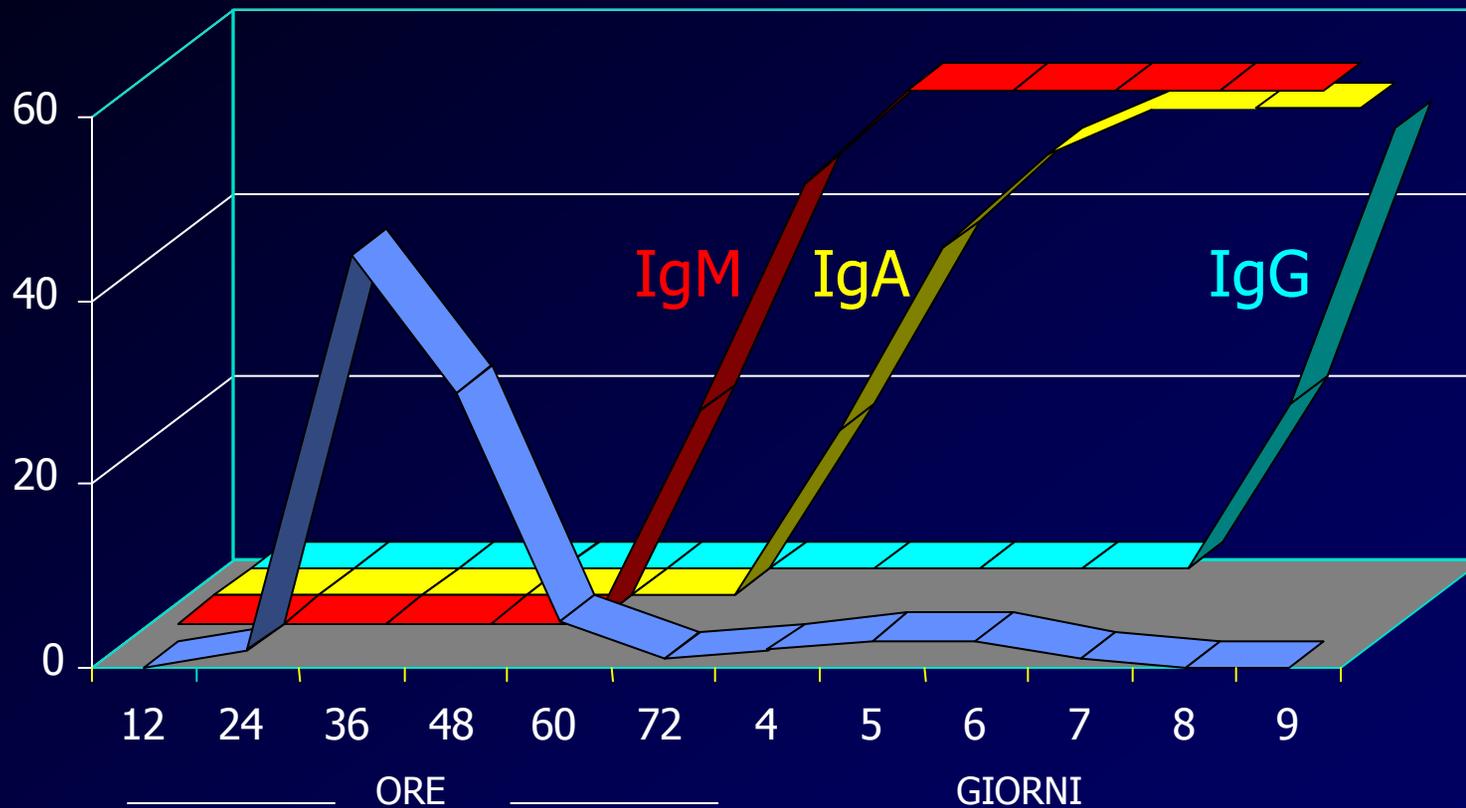






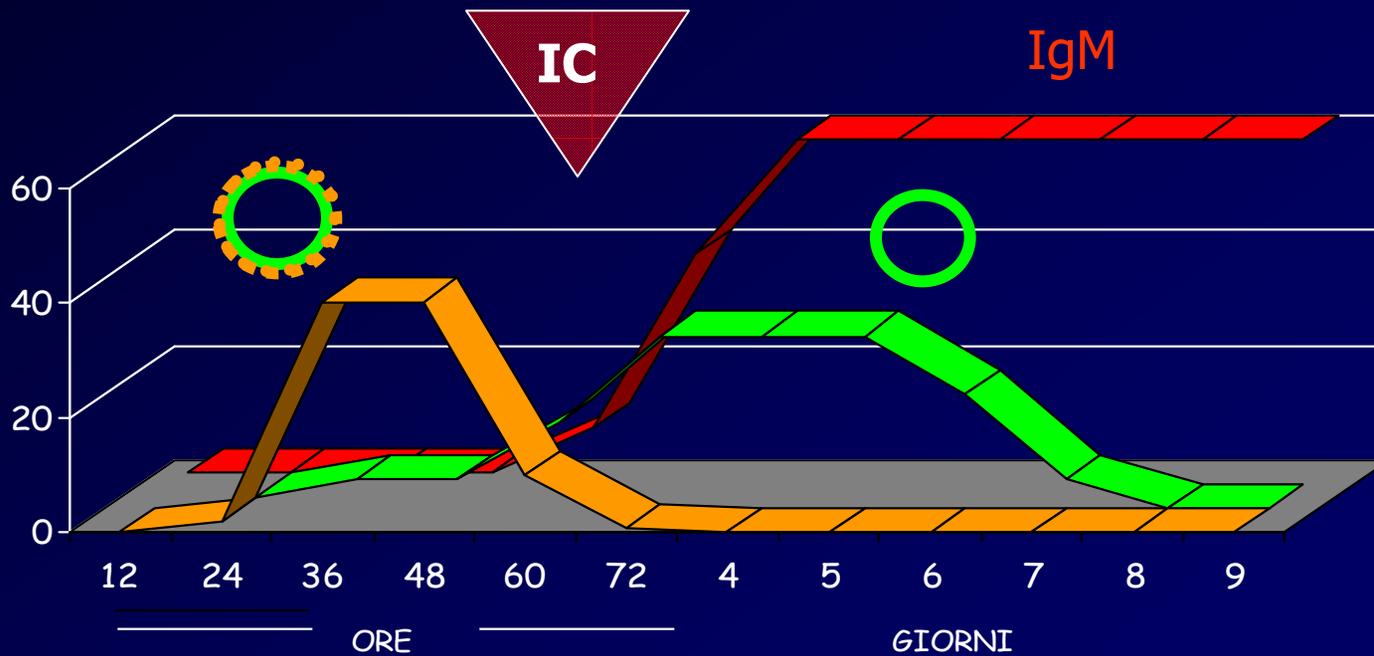
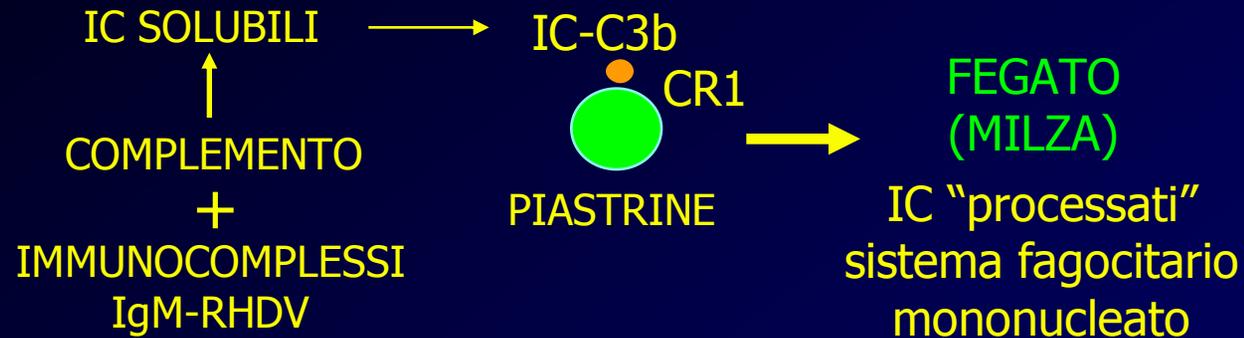
MEV / RHD - la risposta anticorpale

■ % Mortalità



Intervenendo precocemente la siero-terapia è efficace

Clearance degli immuno-complessi ?



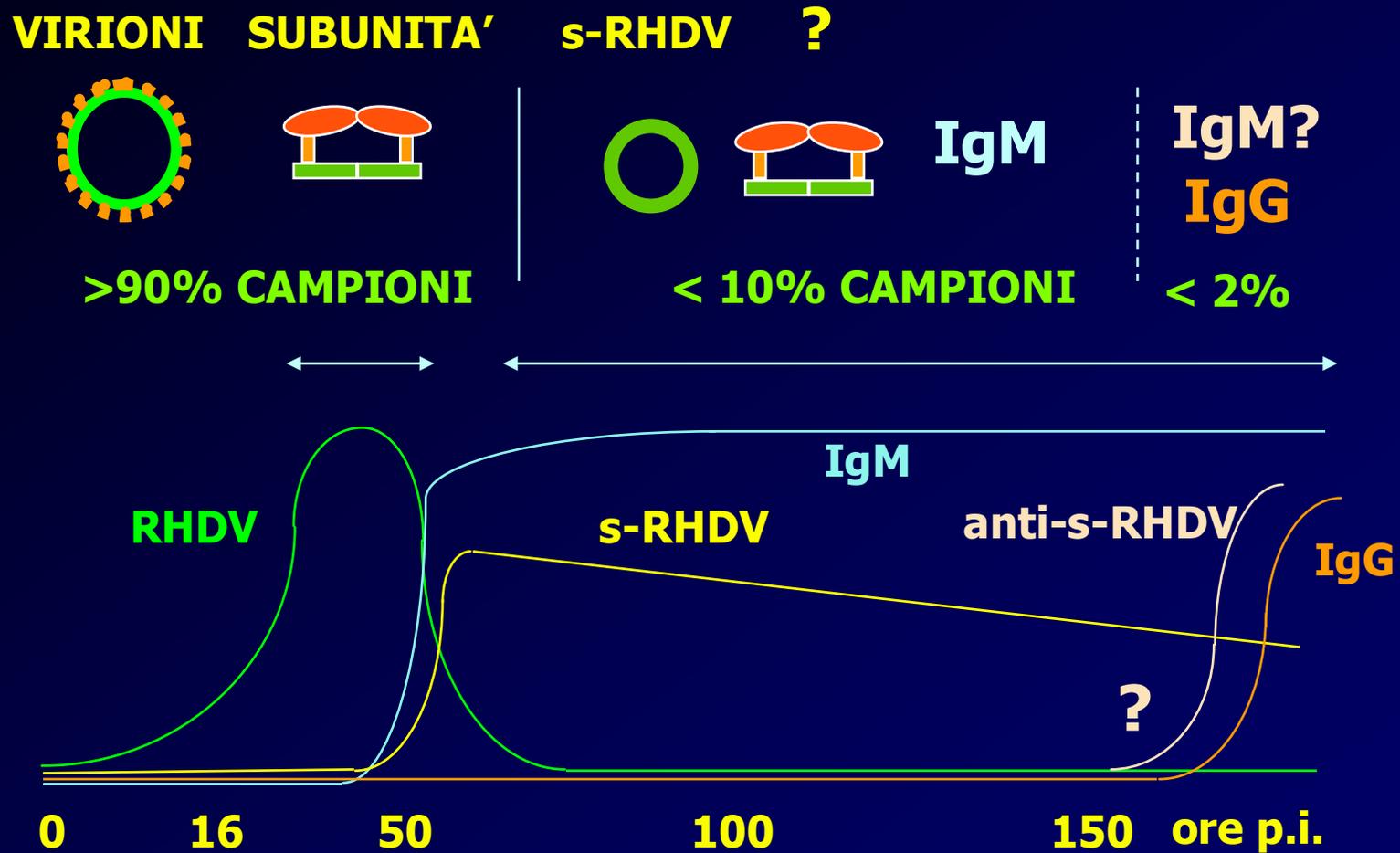
✓ Presuntiva:

- ✓ anamnesi (in allevamenti)
- ✓ sintomi
- ✓ lesioni

✓ Di certezza:

- ✓ identificazione del virus mediante esami di laboratorio

Diagnosi virologica di RHDV



Metodi diagnostici che utilizzano MAbs

Anti - RHDV
Anti - RHDVa
Anti – EBHSV

Anti rabbit-IgG
Anti rabbit-IgM
Anti rabbit-IgA

	Epitopo sulla superficie virale	EBHSV	Protezione in vivo	Epitopo continuo
1H8	Si	No	+++	-
6F9	Si	Si	+++	-
3H2	Si	No	+	-
6H6	Si	No	ND	+
3H6	Si	Si	neg.	+
6D6	Si / No	Si	neg.	+
6G2	No	Si	ND	-
5G3	No	Si	neg.	++++

SANDWICH ELISA TEST per identificazione virale

Basato sull'uso di anticorpi monoclonali (Mab) specifici anti-RHDV



✓ = Siero iperimmune di coniglio anti-RHDV
 ■ = Fegato (e milza) 10% estratto, dil. 1/10 -1/30

⊖ = MAb 1H8 HRP

⊖ = MAb 5G3, 6G2 HRP

93-95% of POSITIVI

>1.5 OD

>1.5 OD

4-5% of POSITIVI

0.1- 0.5 OD

>1.5 OD

98-99% of NEGATIVI

<0.25 OD

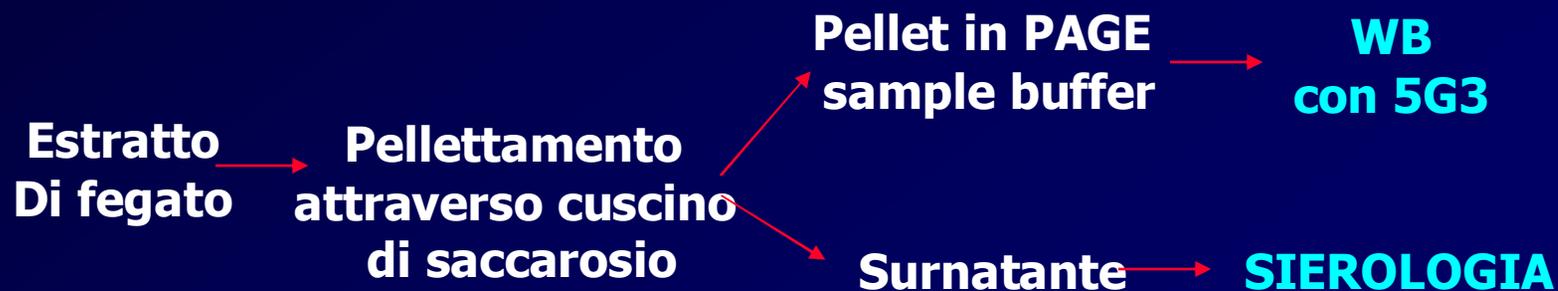
<0.25 OD

1-2%

?

0.3- 0.7 OD

0.3- 0.7 OD



ELISA test per diagnosi di routine di RHDV basato sull'uso di AcM specifici RHDV e RHDVa

		Camp. 1		Camp. 2		Camp. 3		Camp. 4		Camp. 5		Contr.		
		1/5	1/50	1/5	1/50	1/5	1/50	1/5	1/50	1/5	1/50	1/5	1/50	
Siero Iperimmune	anti X HRP 1:500											RHDV+	RHDV-	2 repliche
												RHDV+	RHDV-	2 repliche
Cross AcM	CR HRP 1/500											RHDV+	RHDV-	2 repliche
												RHDV+	RHDV-	2 repliche
αRHDV AcM	1H8 HRP 1/500											RHDV+	RHDV-	2 repliche
												RHDV+	RHDV-	2 repliche
αRHDVa AcM	3B12 HRP 1/500											RHDV+	RHDV-	2 repliche
												RHDV+	RHDV-	2 repliche
		NEG		RHDVa		RHDV		RHDVa		sRHDV		Contr.		

Monitoraggio epidemiologico

- ✓ E' stata attuata una **sorveglianza epidemiologica** volta sia alla definizione dei principali caratteri della malattia e dei fattori di rischio connessi, ma soprattutto alla definizione della mappa dei ceppi predominanti in senso spaziale e temporale.
- ✓ In passato si riteneva esistesse un solo sierotipo virulento di RHDV; e, infatti, gli **studi antigenici e genetici** condotti fino al 1996 non hanno evidenziato l'esistenza di differenze significative tra i vari ceppi.

MEV / RHD - Diagnostica epidemiologica

Variabilità antigenica

- 1994-96 → **CEPPI RHDV HA NEGATIVI**
(Positivi 4°C o pH 6,2)
UK (1995), Italy (1996),
Irlanda, Polonia, Spagna
- 1996-97 → **PRIMA VARIANTE ANTIGENICA: RHDVa**
Italia '96-97
Germania '96
USA 2000
Francia 2000
- 2004 → **SUB VARIANTE RHDVa (?)**
Italy

RHD - variabilità antigenica

RHDVa: Prima consistente variante antigenica

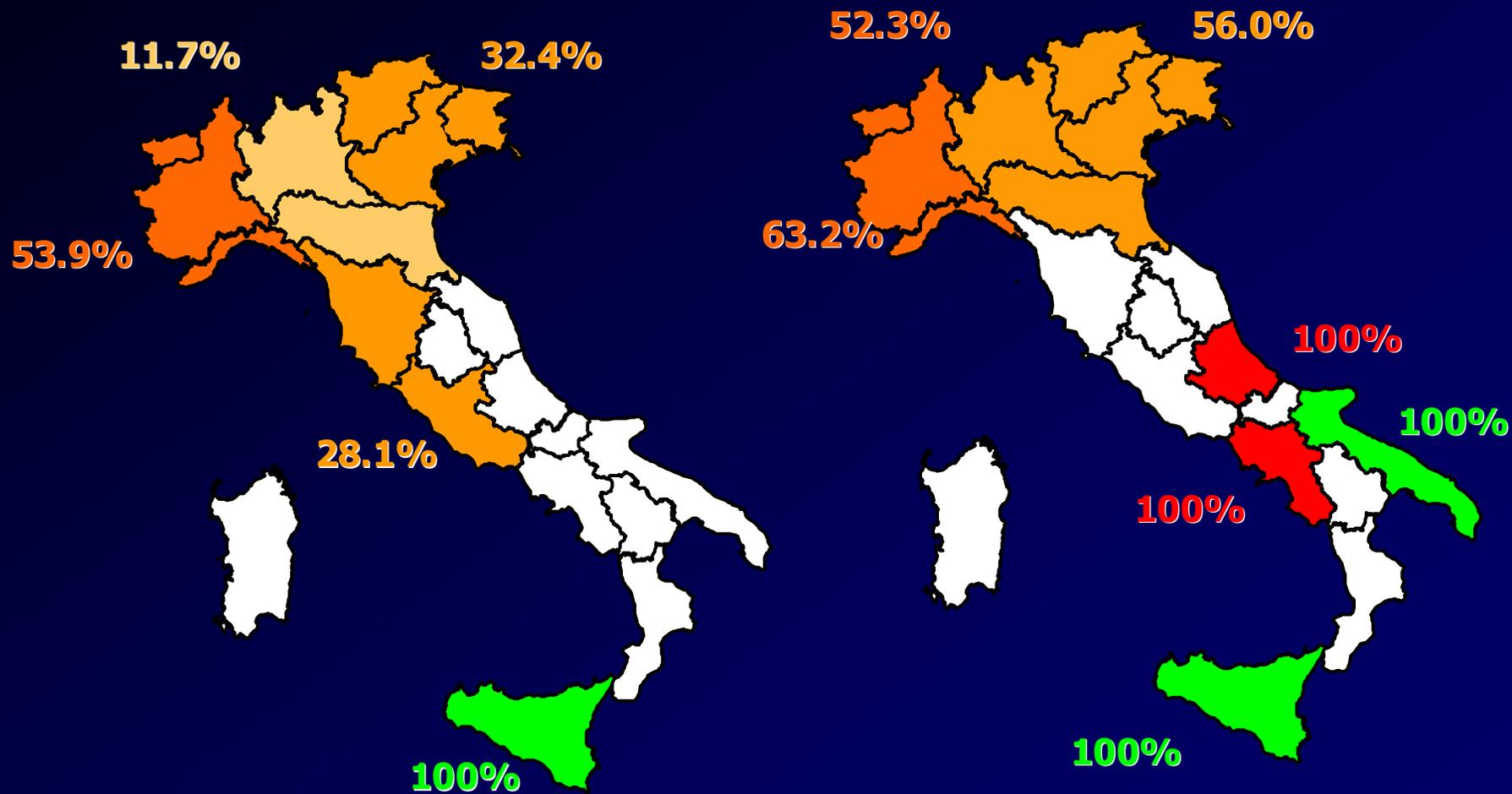
- HA e WB pos.
- AcM 1H8 negativo (ma altri epitopi sono preservati)
- Altamente virulento
- Geneticamente differente (6.6-6.9% sostituzioni aa)
- Conigli vaccinati per RHDV sono resistenti al challenge con RHDVa



Prevalenza di **RHD** e **RHDVa** in Italia (% su tutti i focolai di RHD)

1997-1999

2000-2003

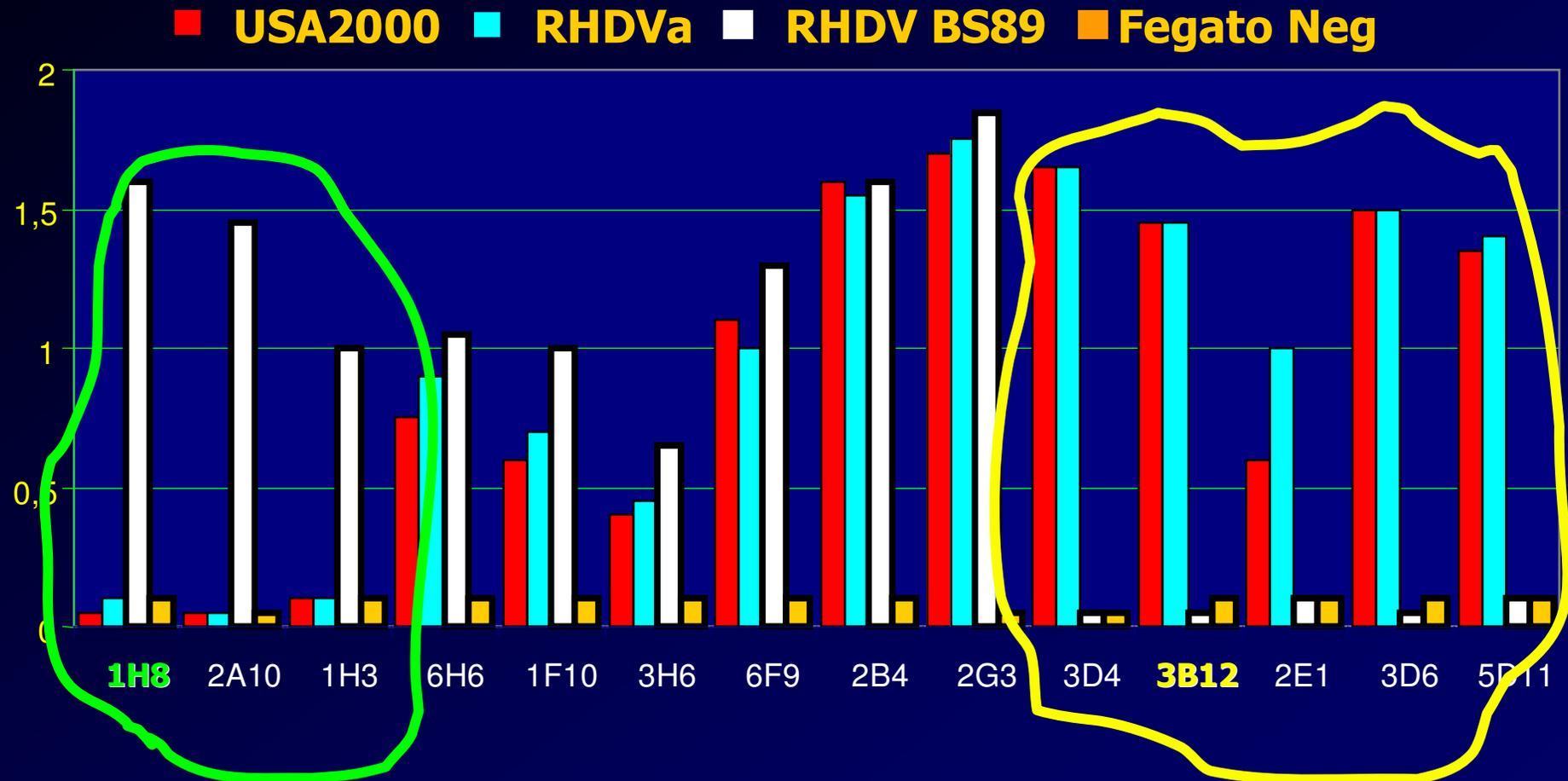


Focolai di RHD diagnosticati in Italia (1997-2006)

Year	Tot. examined	Total RHD pos. (%)	RHDV pos. (%)	RHDVa pos. (%)
1997	n.d.	211	191 (90.5%)	20 (9.5%)
1998	n.d.	80	66 (82.5%)	14 (17.5%)
1999	n.d.	65	39 (60.0%)	26 (40.0%)
2000	252	134 (53.2%)	89 (66.4%)	45 (33.6%)
2001	136	69 (50.6%)	25 (36.2%)	44 (63.8%)
2002	203	138 (67.9%)	61 (44.2%)	77 (55.8%)
2003	226	63 (25.9%)	12 (19.0%)	51 (81.0%)
2004	209	124 (59.9%)	32 (25.8%)	92 (74.2%)
2005	192	77* (40.1%)	32 (41.6%)	40 (51.9%)
2006	171	63 (36.8%)	27 (42.8%)	36 (57.2%)

* 5 (6.5%) samples not determined

Sandwich ELISA test per la tipizzazione di RHDV con un pannello di Mabs specifici

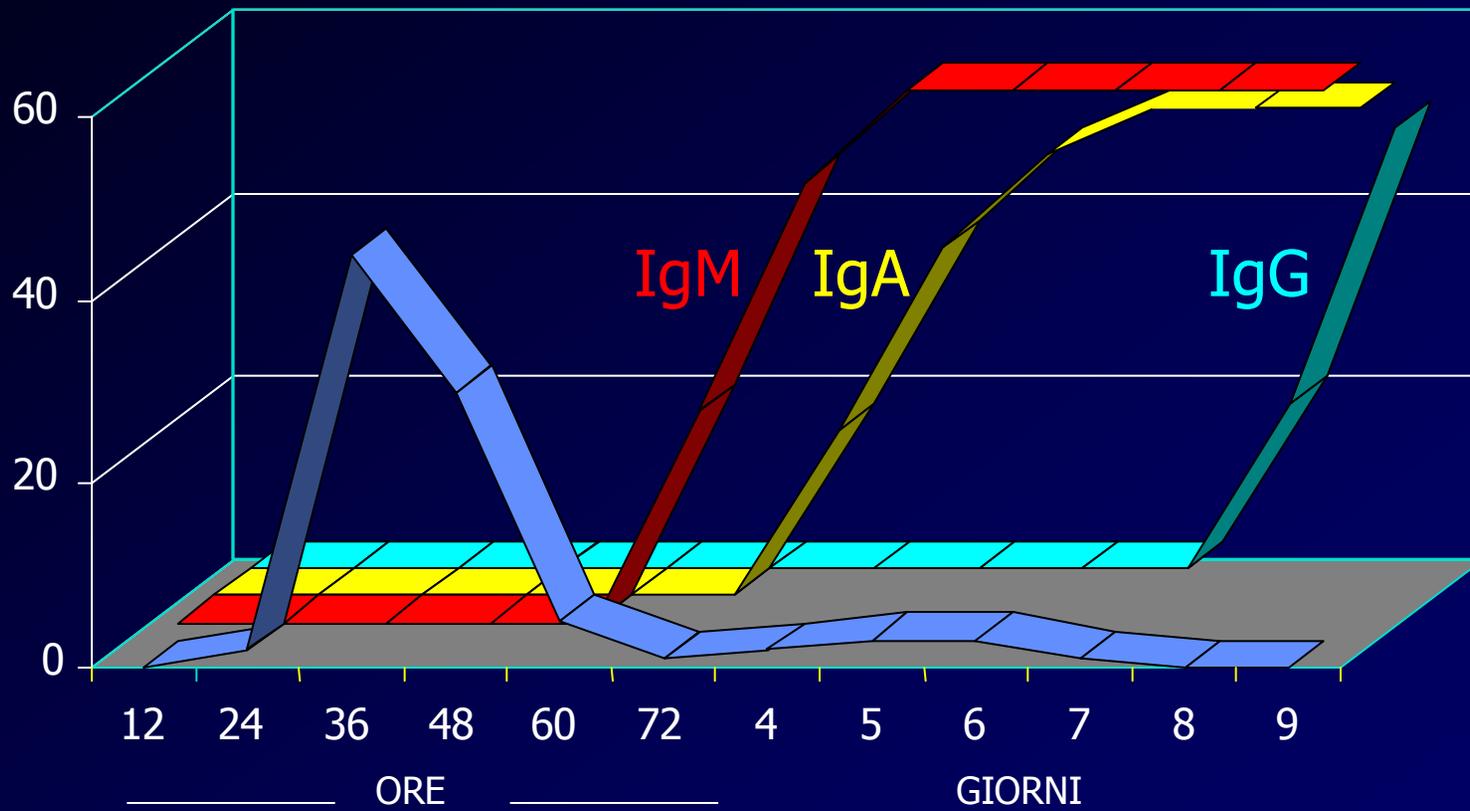


RHDVa all'estero

- ✓ La stessa variante è stata contemporaneamente identificata in **Germania** nel 1996
- ✓ RHDVa ha causato il primo focolaio di RHD in **USA** nella primavera del 2000 ed è stato identificato in **Francia** e nelle **Reunion Islands** durante il 1999-2000
- ✓ In Europa negli ultimi due anni è stato identificato in Germania, con regolarità, mentre in **Francia** nel 2004 ha causato circa il 10% dei focolai di RHD
- ✓ Dati molto recenti (fine 2004) indicano che il primo focolaio riscontrato in Sud America (**Uruguay**) è attribuibile alla variante.
- ✓ E' stato segnalato essere presente in **Ungheria** sin dal 2003 (Matiz et al., 2006)
- ✓ Nessun dato disponibile da **altri Paesi**

La risposta anticorpale

■ % Mortalità



ELISAs SIEROLOGICHE

Test standard e di referenza

ELISA competizione (cELISA)

- Misura principalmente gli anticorpi diretti verso i determinanti antigenici presenti sulla superficie del virus (legame ad alta avidità).
- Alta specificità.

ELISAs isotipi: (isoELISA)

- Permettono di titolare le IgA, IgM e IgG.
- I titoli dei diversi isotipi sono critici per definire e interpretare i dati sierologici di campo.

MEV / RHD - Risultati sieroepidemiologici

Conigli con titoli di 1/10 in cELISA sono PROTETTI da RHD

Conigli convalescenti 1/640 -1/20480

Conigli giovani (<35-40 dd old) 1/80 -1/320

Conigli vaccinati 1/160 -1/320

Sani  **negativi**
1/10 -1/320

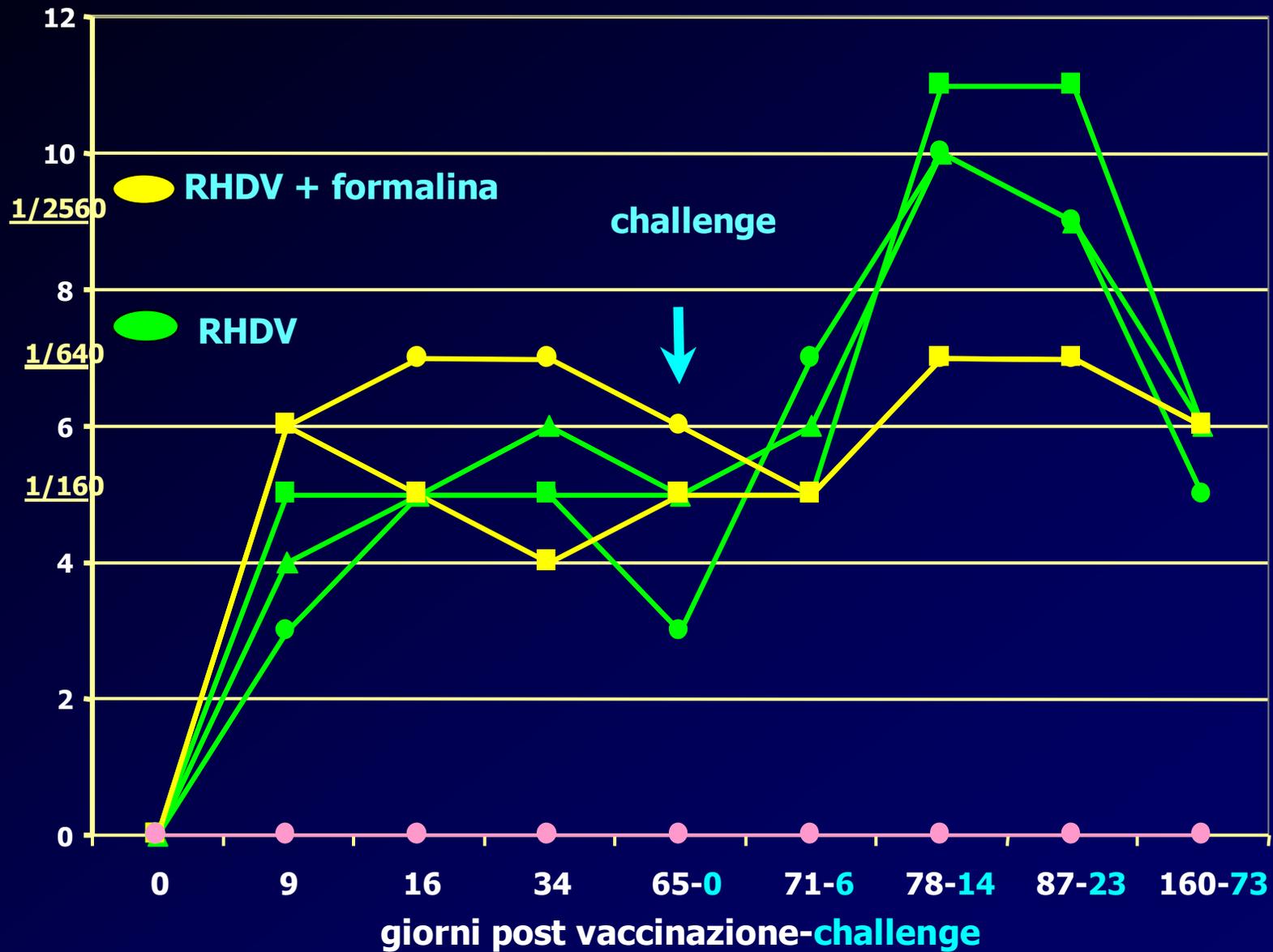
Table 5. Summary of different immunological classes developed on the basis of cELISA, isotypes titre and body weight

Class	Titre*				Notes
	cELISA	IgG	IgM	IgA	
Negative	-	-	-	-	
Pre-existing antibodies	± (rare)	+	-	-	
Maternal antibodies	+	+	-	-	Rabbits < 1300 g
Previously infected rabbits					
Recent infection	+	+	+	+	IgM > 640
Past infection	+	+	±	±	
Re-infected rabbits	+	+	-	+	IgA > 160

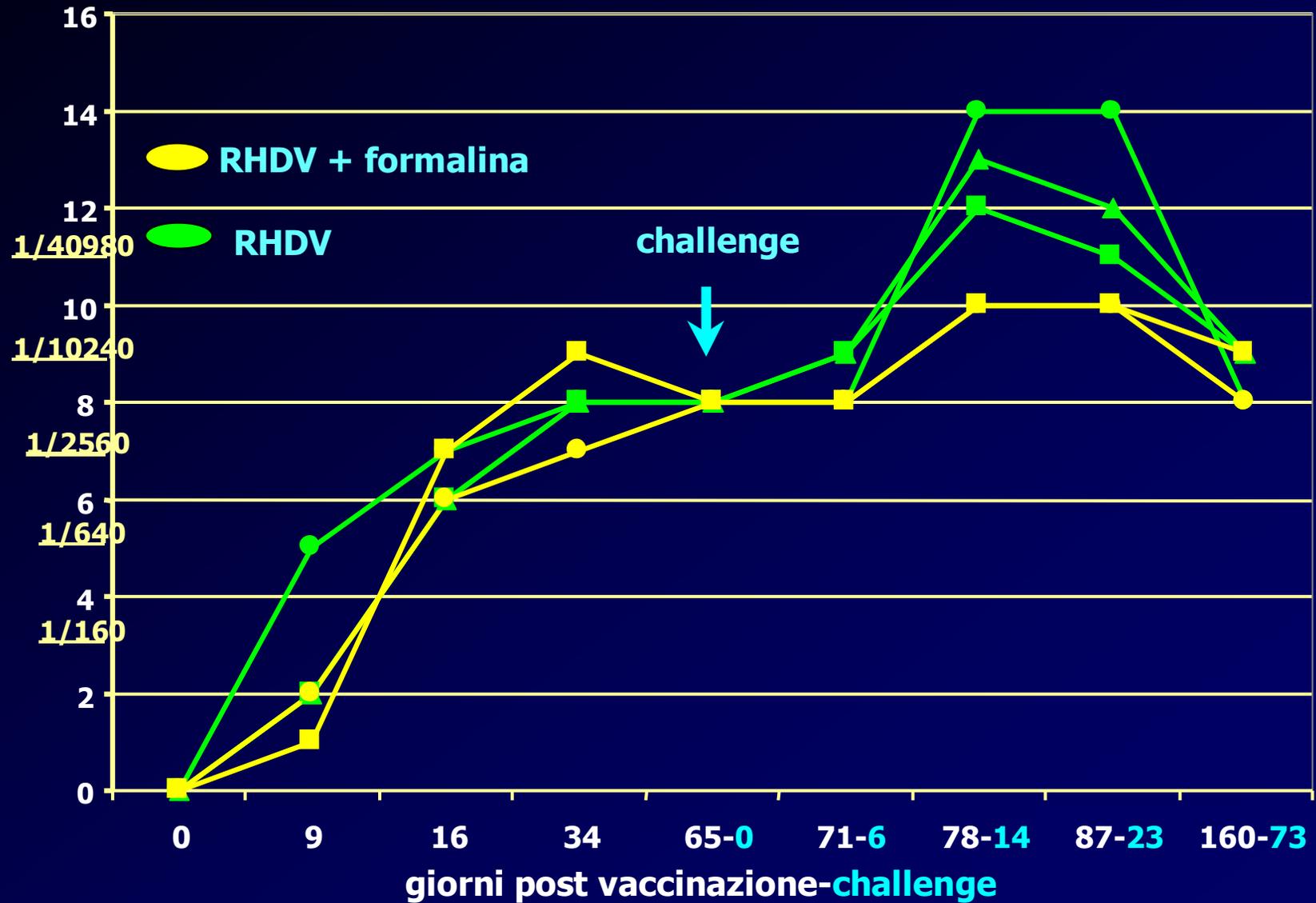
* +, high titre; +, low titre; -, no antibodies.

from Cooke B.D. et al., *Epidemiol Infect*, 124, 563-576 (2000)

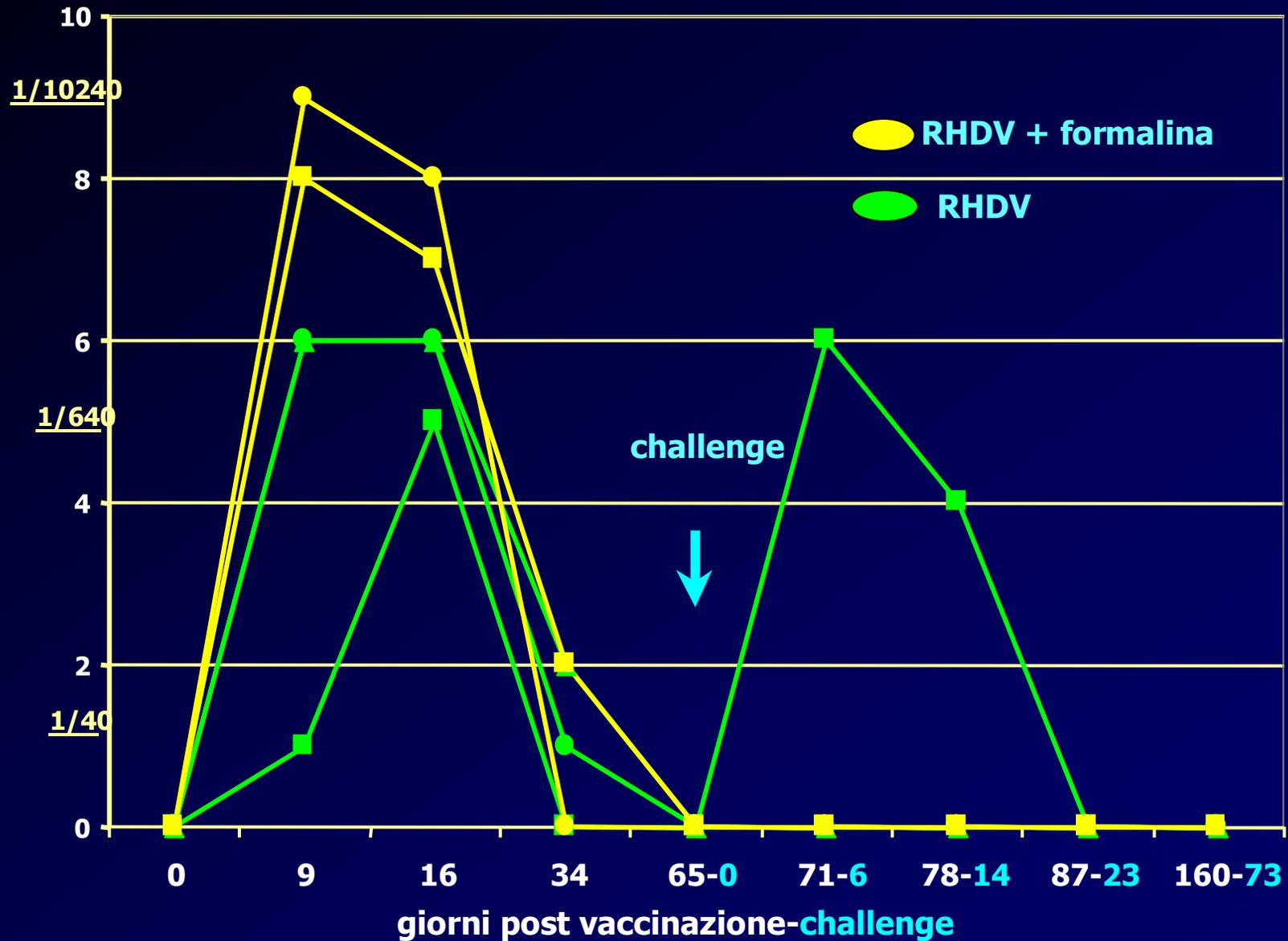
Conigli vaccinati e infettati **Ab totali**



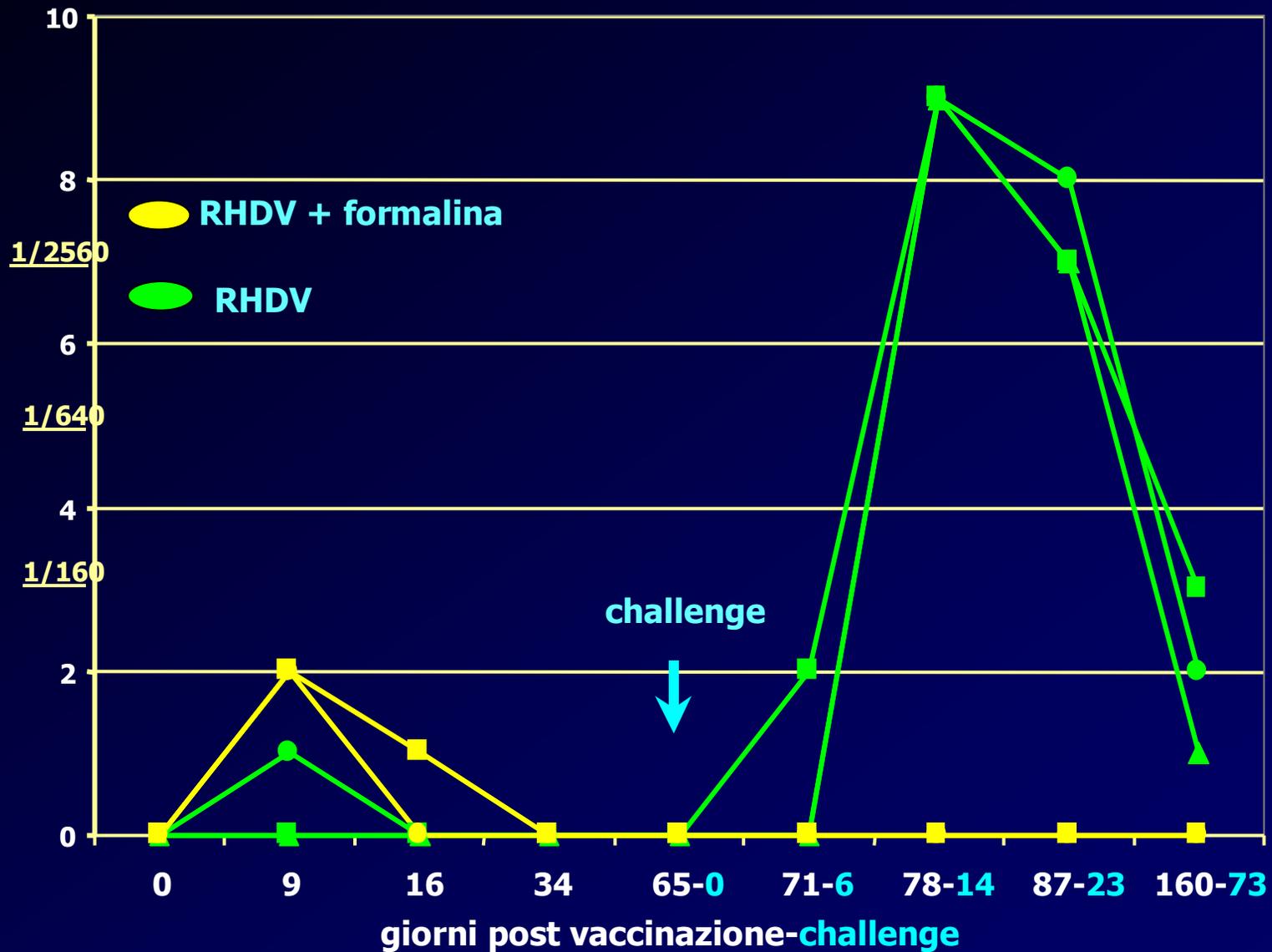
Conigli vaccinati e infettati IgG



Conigli vaccinati e infettati IgM



Conigli vaccinati e infettati **IgA**



MEV / RHD - Risultati sieroepidemiologici

Conigli con titoli di 1/10 in cELISA sono PROTETTI da RHD

Conigli convalescenti 1/640 -1/20480

Conigli giovani (<35-40 dd old) 1/80 -1/320

Conigli vaccinati 1/160 -1/320

Sani

negativi
1/10 -1/320

? – Altri virus correlati ?

Table 5. Summary of different immunological classes developed on the basis of cELISA, isotypes titre and body weight

Class	Titre*				Notes
	cELISA	IgG	IgM	IgA	
Negative	-	-	-	-	
Pre-existing antibodies	± (rare)	+	-	-	
Maternal antibodies	+	+	-	-	Rabbits < 1300 g
Previously infected rabbits					
Recent infection	+	+	+	+	IgM > 640
Past infection	+	+	±	±	
Re-infected rabbits	+	+	-	+	IgA > 160

* +, high titre; +, low titre; -, no antibodies.

from Cooke B.D. et al., *Epidemiol Infect*, 124, 563-576 (2000)

RCV - Virus non patogeno

L'ipotesi era basata su:

- ✓ L'osservazione di positività sierologiche
 - nel siero di conigli di laboratorio prelevati tra il 1975-1985, cioè 10 anni prima della comparsa della malattia in Europa.
 - in allevamenti in cui non era mai stata riportata la malattia.

- ✓ La sieroconversione spontanea di conigli allevati nel nostro stabulario senza la comparsa di sintomi specifici di RHD

- ✓ Il successo nel riprodurre il fenomeno in condizioni controllate

CZECH REP. 43 aziende (Rodak et al. J. Gen Virol 1990)	
POSITIVI (> 60% di conigli positivi)	19 (44%)
NEGATIVI (> 95% di conigli negativi)	10 (23%)
DUBBI (5-10% di conigli positivi)	14 (32%)

"RABBIT CALICIVIRUS - RCV"

Identificazione e isolamento di RCV

- ✓ RCV è stato identificato (mediante studi sieroepidemiologici, WB e PCR) ed il suo genoma è stato caratterizzato.
- ✓ La riproduzione sperimentale del fenomeno cui è seguito il reisolamento del virus.

Riasunto

- ✓ Virus non patogeno, enterico, altamente correlato con RHDV, in grado di "infettare persistentemente" aziende di conigli industriali.
- ✓ RCV potrebbe essere il progenitore di RHDV a funziona come vaccino naturale.

Indagini sieroepidemiologiche - 1

1999



PRIMA INDAGINE

in un macello situato in Lombardia
animali dalla Lombardia e dal Veneto.
39 gruppi di conigli da altrettante aziende.

Risultati sierologici	Criteri applicati	N. gruppi (%)
Positivi	> 75% di positivi	13 (33,3%)
Dubbi	5-10% di positivi	2 (5,2%)
	20-60% di positivi	0 (0%)
Negativi	> 95% di negativi	24 (61,5%)
Totale		39

titoli compresi tra 1/20-1/320

Indagini sieroepidemiologiche - 2

2002-3



SECONDA INDAGINE

Giugno 2002 - Marzo 2003
in 5 diversi macelli situati in Campania
conigli da Campania, Basilicata e Lazio.
45 gruppi di sieri da 21 diverse aziende,
ogni azienda controllata da 1 a 4 volte.

Risultati sierologici	Criteri applicati	N. gruppi (%)	
Positivi	> 75% di positivi	4	(19,1%)
Dubbi	5-10% di positivi	0	(0%)
	20-60% di positivi	5	(23,8%)
Negativi	> 95% di negativi	11	(52,4%)
Sieroconversione	da 0% a >75% di positivi	1	(4,7%)
Totale		21	

- ✓ I titoli erano compresi tra 1/20-1/320, ad eccezione di 7 sieri (1/640-1/1280).
- ✓ In 2 delle 4 aziende positività a seguito di 3 campionamenti in 5 mesi.
- ✓ In 1 azienda sieroconversione: neg. al 1° controllo e pos. dopo 6 mesi

Indagini sieroepidemiologiche - 3

2004



TERZA INDAGINE

in un macello delle Marche
conigli dalla stessa regione.
23 gruppi da altrettante aziende

Risultati sierologici	Criteri applicati	N. gruppi (%)	
Positivi	> 75% di positivi	12	(52,2%)
Dubbi	5-10% di positivi	2	(8,7%)
	20-60% di positivi	2	(8,7%)
Negativi	> 95% di negativi	7	(30,4%)
Totale		23	

I titoli positivi erano tra 1/20-1/640 con una > percentuale (19,4%) di 1/80

9 sieri avevano un titolo di 1/1280 e 2 un titolo di 1/2560

Anticorpi anti-isotipo

N. Azienda*	Tot sieri esaminati	IgA pos	Titolo IgA (1/..) in percentuale					IgM pos
			160	640	2560	10240	≥10240	
1	9	100%		11.1	55.6	22.2	11.1	0%
3	11	100%		36.4	36.4	9.1	18.1	0%
5	16	100%	18.7	37.5	43.8			37.5%
16	10	100%		60	20	20		10%

* 2° indagine

- ✓ Testati soli sieri positivi alla cELISA
- ✓ Presenza di anticorpi della sottoclasse IgA, in alcuni sieri anche ad elevato titolo
- ✓ Anticorpi riscontrati sono l'esito di una immunizzazione attiva
- ✓ Non anticorpi materni di origine passiva (di solito IgG)
- ✓ Non indotti da vaccinazione (essendo somministrato per via parenterale il vaccino non induce IgA)
- ✓ In due aziende sono state evidenziate IgM in associazione con titoli IgA bassi ma in fase di aumento

- La risposta anticorpale verso RHDV è presente in alcune popolazioni di conigli sani non vaccinati provenienti da diverse regioni italiane
- La distribuzione del virus RCV è radicata e costante sin dal 1999.
- Si ritiene che gli anticorpi indotti da RCV siano protettivi verso RHDV e possano interferire con l'infezione o il corso della malattia, agendo da "vaccini naturali"

Progetto di Ricerca Corrente Ministero della Salute Anno 2003 n. 25/03

IZSLER



MEV / RHD - Controllo e Profilassi

Misure efficaci per il controllo dei calicivirus nel coniglio e nella lepre possono essere attuate unicamente nel coniglio allevato industrialmente e nei selvatici (conigli e lepri) allevati in cattività

MEV / RHD - Controllo e Profilassi

DIRETTA

- Considerando l'elevata virulenza e diffusibilità di RHDV praticamente inapplicabile
- La presenza di conigli selvatici e di piccole unità rurali costituisce una sorgente continua di virus, molto difficile da controllare.
- Eradicazione senza uso di vaccinazione (Messico 1989) favorita dall'assenza di selvatici recettivi e dalla diagnosi primaria eseguita tempestivamente

MEV / RHD - Controllo e Profilassi

INDIRETTA

- ▣ Dove RHD è endemica, il controllo della malattia nell'allevamento industriale si attua mediante vaccinazione
- ▣ I vaccini oggi disponibili sono ancora quelli d'organo inattivati e adiuvati.
- ▣ Negli animali vaccinati si osserva una pronta risposta immunitaria umorale.
- ▣ La vaccinazione è considerata anche un valido trattamento post-esposizione

MEV / RHD - Controllo e Profilassi

INDIRETTA: La protezione verso RHD è dovuta in prevalenza alla IMMUNITA' UMORALE

CAMPAGNE DI VACCINAZIONE: Cina 1985, Europa 1988-90

TIPO: Fegati di animali infettati sperimentalmente

DOSE: 1 cc (adulti) 0.5 cc (svezzati)

VIA DI INOCULO: intramuscolare, sottocutanea

STABILITA': un anno a 4°C

MEV / RHD – Programma vaccinale

RIPRODUTTORI:

- ✘ 1° vaccinazione a 50-60 gg di età
- ✘ 2° vaccinazione dopo 6 mesi
- ✘ rivaccinazione ogni 6 mesi dell'effettivo

INGRASSO:

- ✘ Considerando il breve periodo di vita dei conigli da carne (77-80gg) e la naturale resistenza alla malattia fino a 40gg circa, di solito non vengono vaccinati.
- ✘ Tuttavia, in aree epidemiche o dopo un focolaio, è consigliabile vaccinare l'ingrasso per un certo periodo ed interrompere quindi la vaccinazione solo dopo successive prove su pochi soggetti.

MEV / RHD - Sierologia della vaccinazione

Tempo p.v.	Titolo sierico anti-RHDV	Protezione
2-3 gg	1/10-1/30 in ELISA non evidenziabili con HI solo IgM	NO
4-7 gg	1/80-1/160 soprattutto IgM	SI
15-21 gg	1/160-1/320 soprattutto IgG	SI
6-7 mesi	1/80-1/320 solo IgG	SI
9-12 mesi	1/40-1/160 solo IgG	SI

In caso di rivaccinazione o infezione con RHDV virulento l'effetto booster è:

- ☒ basso in animali vaccinati da 5-7 mesi (1/320-1/640)
- ☒ più alto in quelli vaccinati da più tempo (1/1280-1/5120)

NUOVI VACCINI MIXOVIRUS/RHD

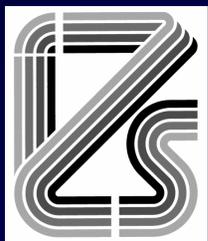
- ✓ **VACCINO COMBINATO** Mixo+RHD (somministrazione intradermica) registrato in Francia (Dercunimix[®] - Merial)
- ✓ **VACCINO RICOMBINANTE** (Mixovirus che esprime la proteina capsidica di RHDV), messo a punto in Spagna. Attenuato, diffonde orizzontalmente, stabile. Registrazione in corso
- ✓ **Altre prove di immunizzazione** sono state fatte con prodotti ottenuti facendo esprimere la proteina capsidica di RHDV in *E.coli* (Boga et al., 1994), in vaccinia virus (Bertagnoli et al, 1996), in un ceppo attenuato di mixomavirus (Bertagnoli et al, 1996) ed in baculovirus: Laurent et al, 1994 (F); Marin et al., 1995 (E), Nagesha et al, 1995 (AU), Plana Duran et al, 1996 (E); Sibilia et al, 1995 (I).

Nessuno di questi prodotti è per il momento registrato.

MEV / RHD – Il futuro

- ✓ Epidemiologia molecolare e antigenica dei nuovi ceppi (varianti)
- ✓ Nuove strategie di vaccinazione / nuovi vaccini
- ✓ Standardizzazione dei metodi sierologici per l'impiego in altre specie
- ✓ Studio dei meccanismi patogenetici e di resistenza legata all'età (e genetica ?)
- ✓ Sorveglianza epidemiologica delle popolazioni di conigli selvatici e delle specie collegate (*Lepus* spp. e *Sylvilagus* spp.)
- ✓ Acquisizione di maggiori informazioni sull'EBHS della *Lepus europeus* ed in particolare sulla sua diffusione nelle popolazioni a vita libera

*Grazie per
l'attenzione*



**Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia ed Emilia Romagna
"B. Ubertyni" - Brescia (Italy)**

