

Meeting Zoom
LE MALATTIE VIRALI DEI CONIGLI E ALTRI LAGOMORFI
Giovedì 20 marzo ore 20.00



EZIOLOGIA, CLINICA E DIAGNOSI DELLE MALATTIE VIRALI DEI CONIGLI E DELLE LEPRI

WOAH Reference Laboratory
for Rabbit Haemorrhagic Disease



WOAH Reference Laboratory
for Myxomatosis



Antonio LAVAZZA

in collaborazione con Lorenzo CAPUCCI e Patrizia CAVADINI

Conigli & Virus

Table 1
Viral infections of rabbits

	Disease Caused
• Viruses of Major Clinical Significance	
Rabbit hemorrhagic disease virus	Rabbit hemorrhagic disease
Myxoma virus	Myxomatosis
• Viruses of Minor Clinical Significance	
Rabbit fibroma virus (Shope fibroma virus)	Rabbit fibromatosis
Lapine rotavirus	Rotaviral infection (Rotaviral diarrhea)
Cottontail rabbit papillomavirus (Shope papillomavirus)	Rabbit papillomatosis
Rabbit oral papillomavirus	Oral papillomatosis
Herpesvirus: Herpes simplex	Herpes encephalitis
Herpesvirus: Leporid-4	Systemic herpesvirus infection
• Viruses of Laboratory Significance	
Astrovirus	Enteric disease (?)
Bornavirus	Borna disease
Rabies virus	Rabies
Vaccinia virus	Rabbitpox (Rabbit plague)
Pleural effusion disease virus (infectious cardiomyopathy virus)	Pleural effusion disease and cardiomyopathy
Rabbit enteric coronavirus	Coronaviral enteritis

Peter J. Kerr (2013) Viral Infections of Rabbits. Vet Clin Exot Anim 16:437-468

Le principali malattie virali del coniglio

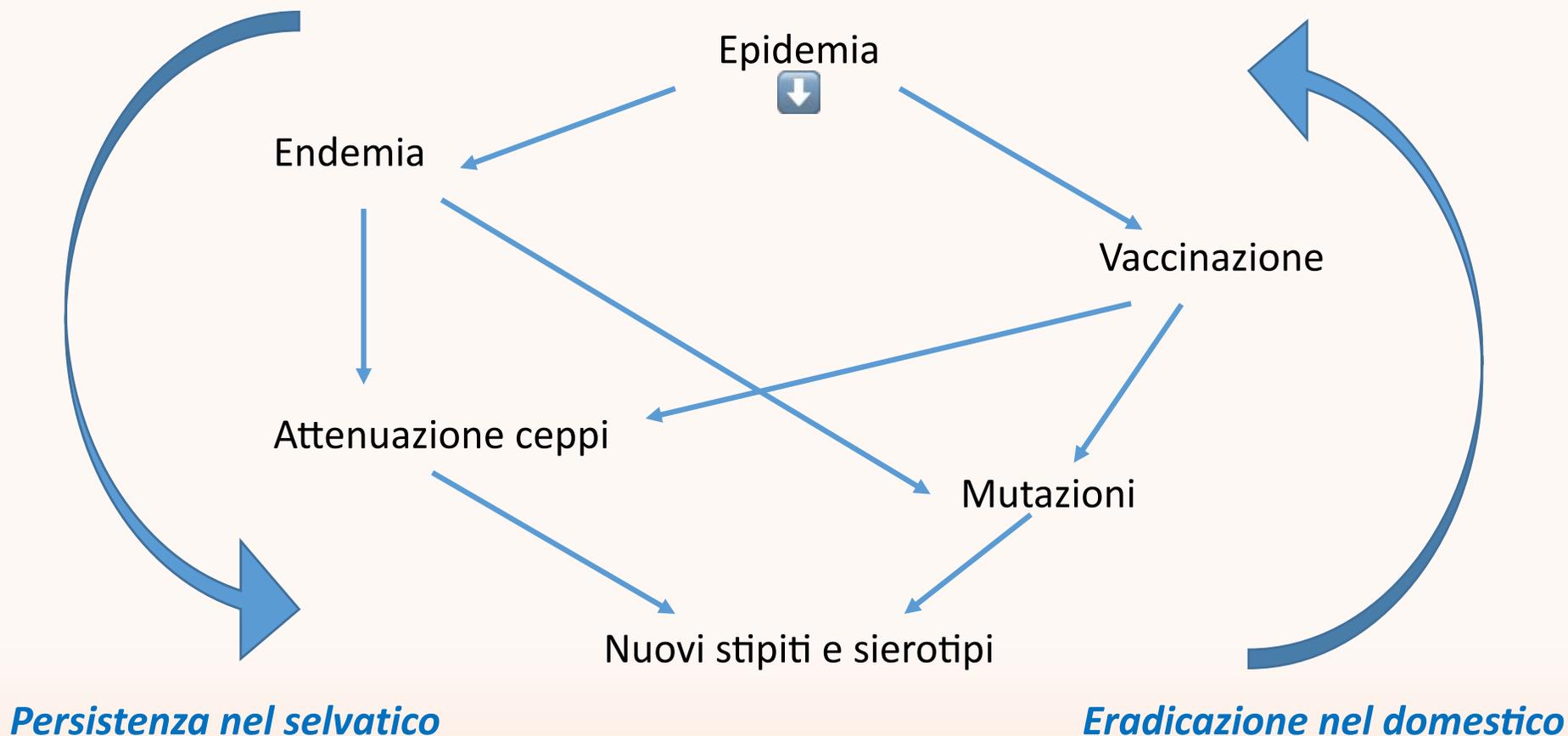
"A host can survive without its viruses, but viruses cannot survive without a host"

Mixomatosi

inizio anni '50

Malattia Emorragica Virale – RHD

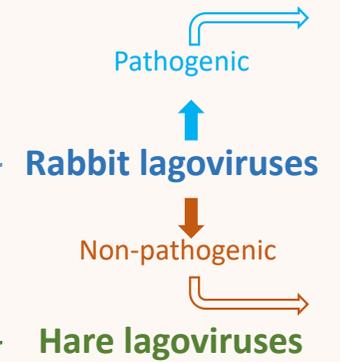
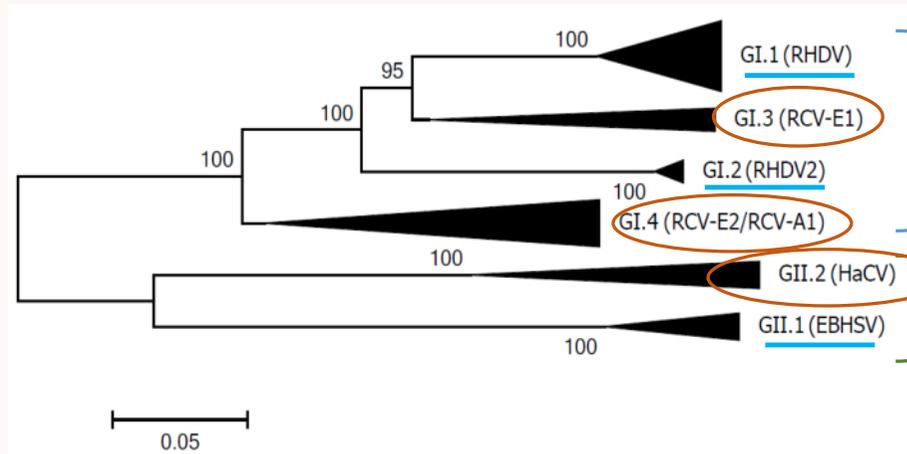
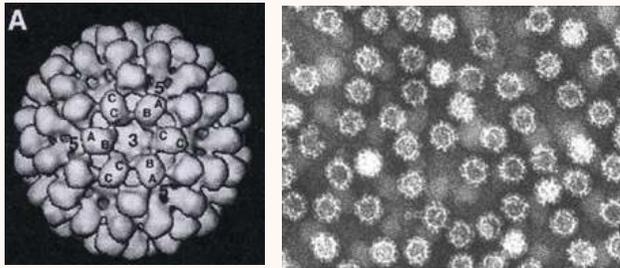
metà anni '80



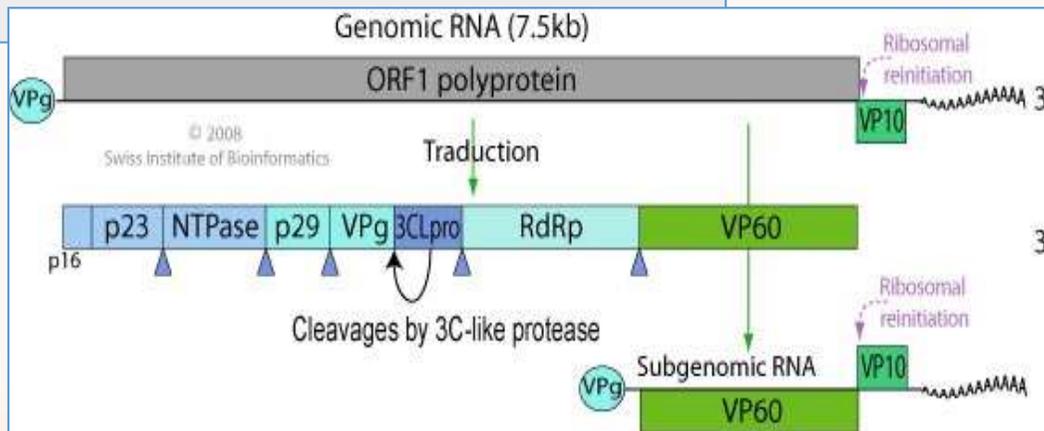
**INFEZIONI DA LAGOVIRUS:
LA MALATTIA VIRALE EMORRAGICA
DEL CONIGLIO (MEV/RHD)
E LA SINDROME DELLA LEPRE
BRUNA DELLA LEPRE (EBHS)**

Caratteristiche dei Lagovirus

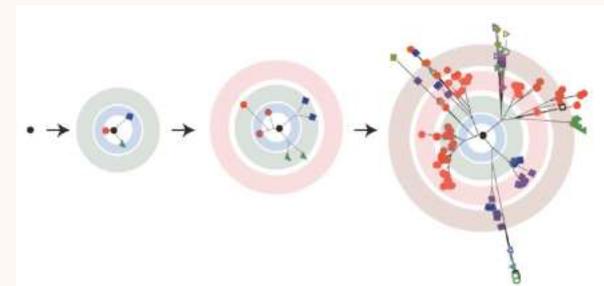
- ❖ Genus *Lagovirus*
- ❖ Family *Caliciviridae*
- ❖ RNA SS+ virus



GENOME: SS-RNA, positive sense



I calicivirus hanno un'alta frequenza di mutazioni durante il processo di replicazione virale



Alto tasso di mutazioni genetiche

La ricombinazione è considerata uno dei principali fattori dell'evoluzione dei lagovirus

Lagoviruses: quanti sono ? L'iceberg virologico



PATOGENI

- RHDV (solo coniglio)
- EBHSV (solo lepre)
- RHDV2 (coniglio – lepre – silvilago, altri lagomorfi)

NON PATOGENI

- RCV Europa (E1 e E2 in coniglio)
- RCV Australia (A1-A3 – coniglio, anche in Eu)
- HaCV (diversi stipiti nella lepre)

Lagovirus che sono stati individuati dal 1986 al 2022

Virus	Anno	Specie ospite	Dove	Virulenza
RHDV	1984/90	CONIGLIO	Cina 1984 - Europa 1986	si
RHDVa	1996/97	CONIGLIO	Europa 1997	si
EBHSV	1989	LEPRE	Svezia 1991	si
RCV	1995	CONIGLIO	Italia 1991/1995	no
ASHINGTON	1998	CONIGLIO	UK 1998	? (no)
MRCV	2001	CONIGLIO	Michigan (USA) 2001	? (no)
06-11	2006	CONIGLIO	Francia 2006	no
RCV-A1	2007	CONIGLIO	Australia 2007	no
RHDV2	2010	CONIGLIO/LEPRE	Francia 2010	si
HaCV	2015	LEPRE	Italia 2014	no

Tutti replicano a livello intestinale



ricombinazione

NSPxx

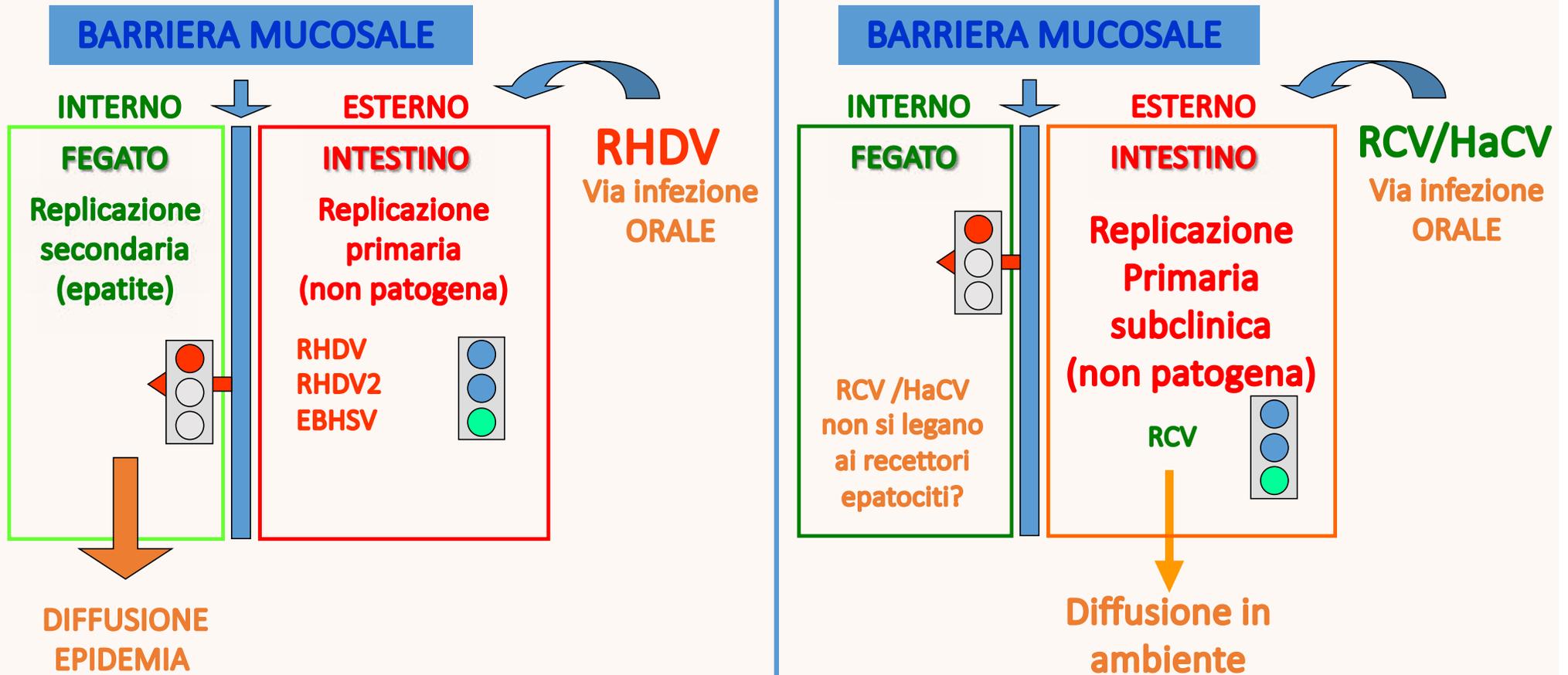
VP60 RHDV2



Patogenesi

lagovirus patogeni

lagovirus non patogeni



Malattie Emorragiche dei Lagomorfi

~ 1980-85

RHD/MEV Rabbit Haemorrhagic Disease

Lista WOAHA – malattia non più denunciabile

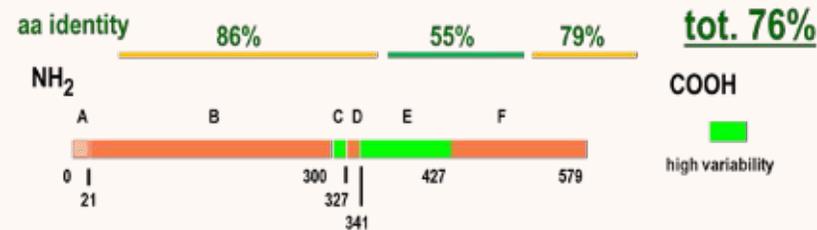
coniglio
domestico e selvatico
(*Oryctolagus cuniculus*)



EBHS European Brown Hare Syndrome

No lista WOAHA – non denunciabile, ma norme d'importazione

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



- Antigenicamente correlati ma distinti → no cross-infezione
 - Elevata morbilità e mortalità (fino a 80-90%)
 - Epatite necrotizzante acuta
 - Malattia negli adulti (>60-90gg)

Sintomatologia e decorso dell'infezione

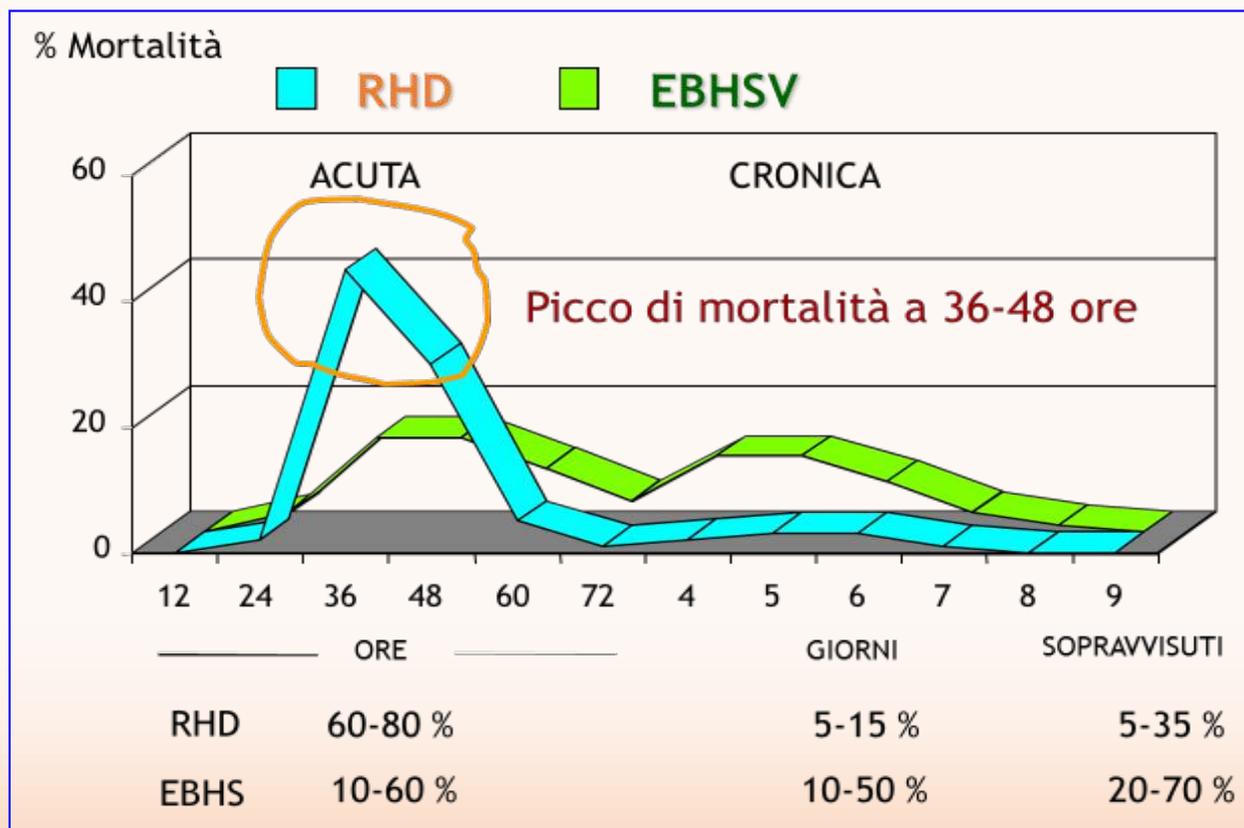
Non sempre osservabile (morte improvvisa)

Nei selvatici:

alterazioni comportamentali quali disorientamento, difficoltà di movimento, alterato riflesso di fuga, tendenza ad avvicinarsi a centri abitati

Nei soggetti allevati/domestici:

apatia, disoressia, fasi di eccitazione con emissione di grida, difficoltà respiratorie, decubito laterale, fuoriuscita liquido siero-emorragico dalle narici



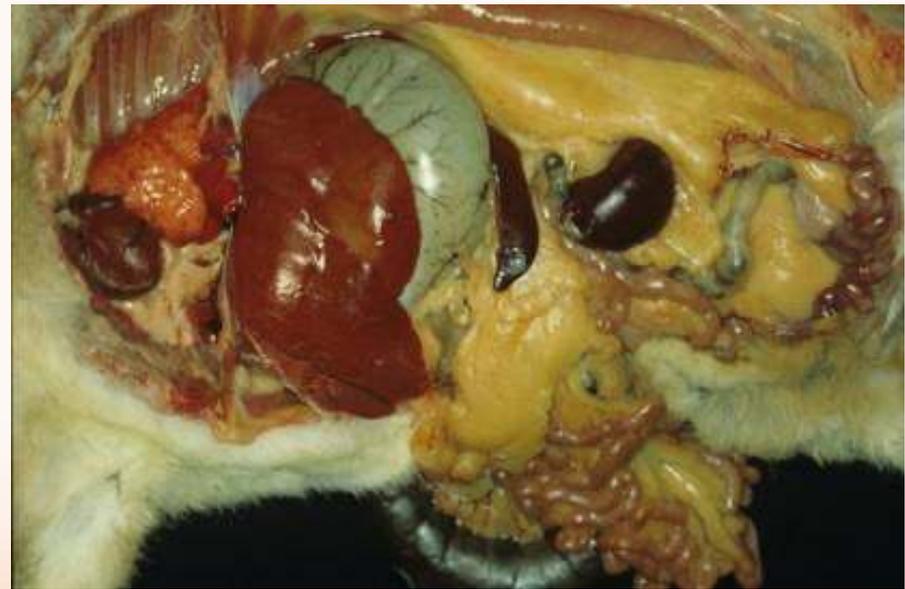
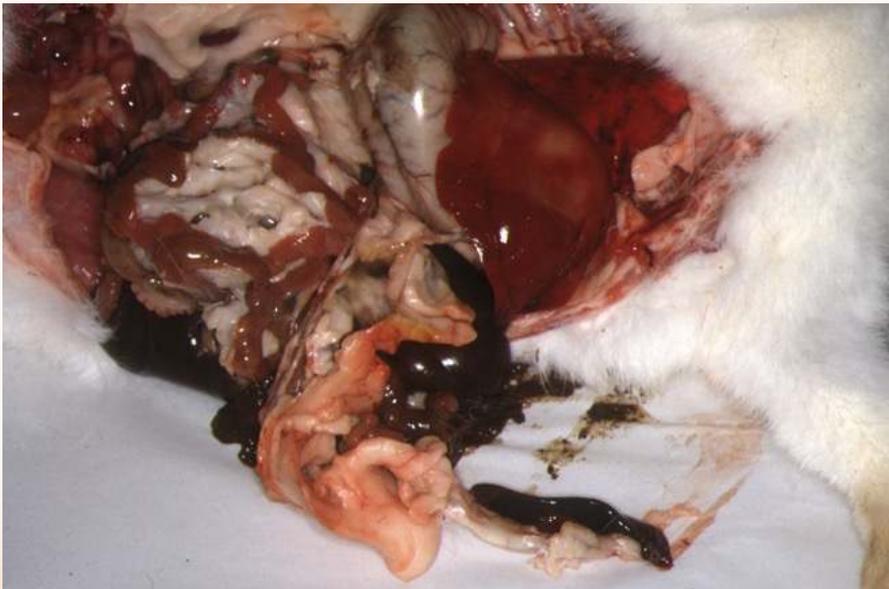
Evoluzione:

Iperacuta/acuta: morte in 36-72 ore conigli, 65-96 ore lepri

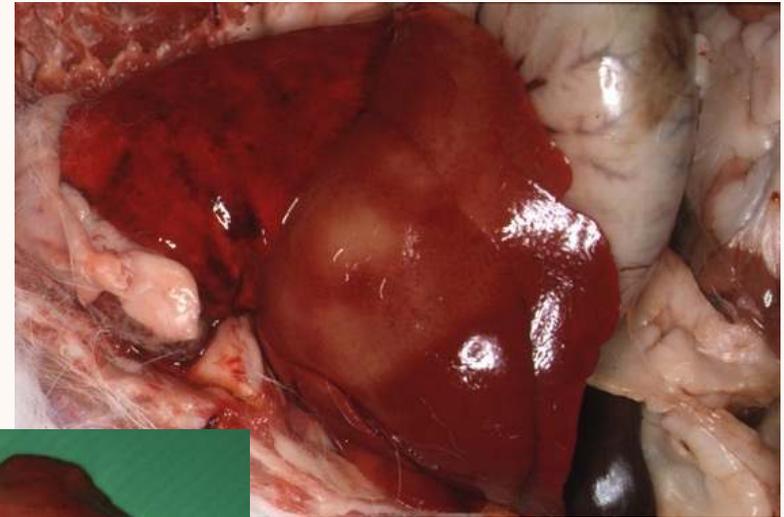
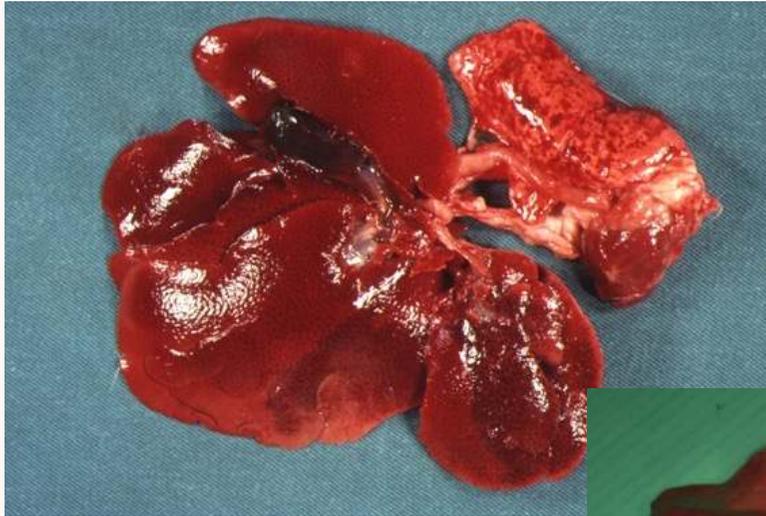
subacuta/cronica:

morte oltre le 72-96 ore, e anche dopo diversi giorni con comparsa di ittero, ma anche sopravvivenza e guarigione

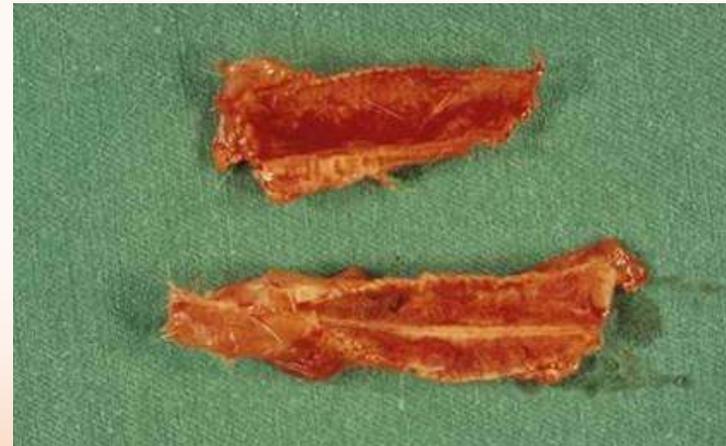
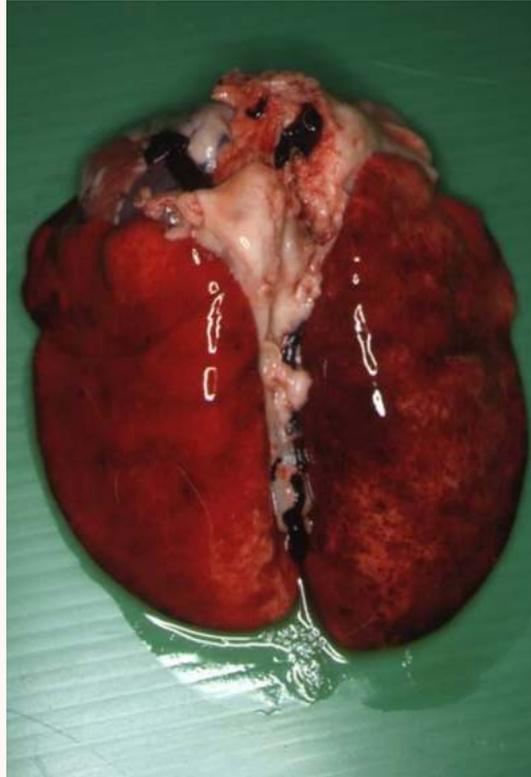
Lesioni RHD/MEV (carcassa)



Lesioni RHD/MEV (fegato)



Lesioni RHD/MEV (organi interni)

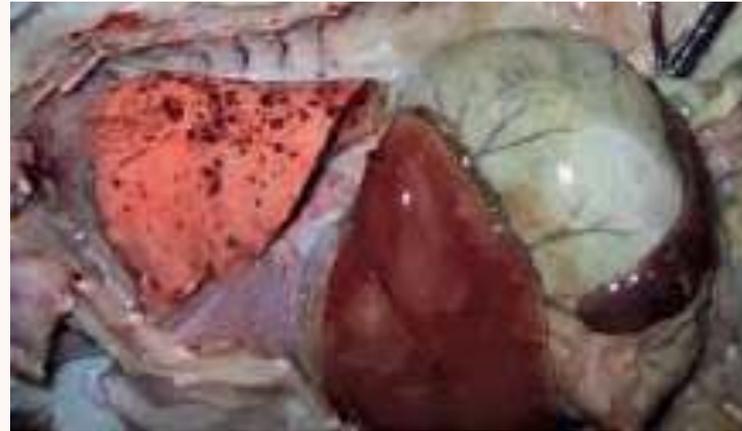


Lesioni RHD/MEV (milza)



La comparsa di RHDV2

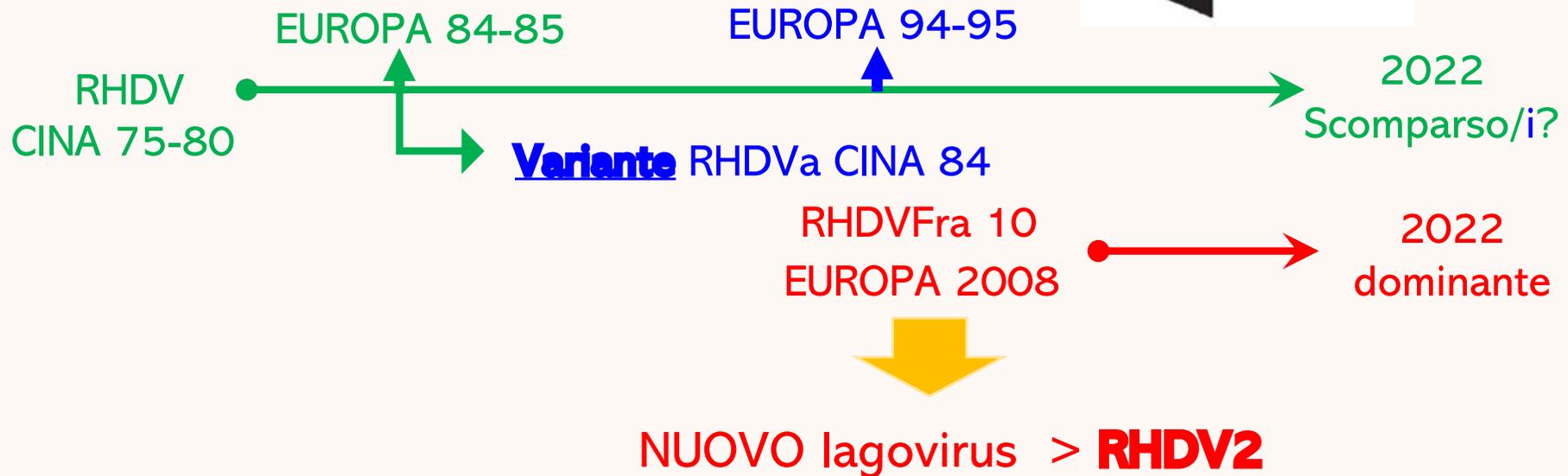
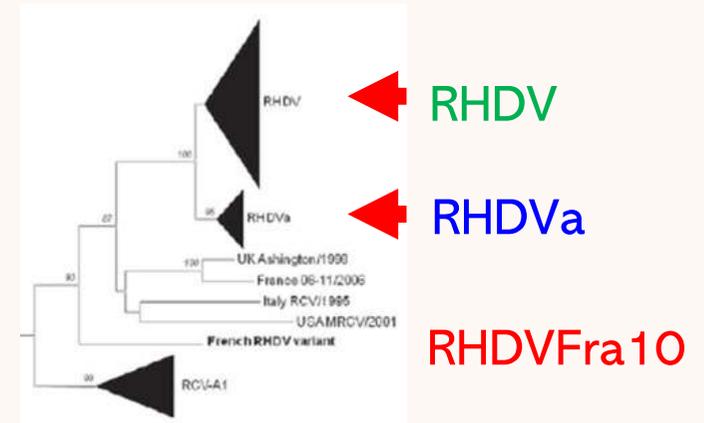
La storia dell'RHDV2 inizia con questo articolo...



- 1) Mortalità elevata per RHD in popolazioni di conigli selvatici e di allevamento dalla fine dell'estate del 2010 nel nord, nord-ovest della Francia
- 2) Morbilità e lesioni come RHDV, ma si registra anche in:
 - conigli vaccinati per RHDV
 - **conigli all'ingrasso di poche settimane di età**
- 3) Il virus isolato è geneticamente correlato all'RHDV, ma il grado di omologia della VP60 è solo dell'85%

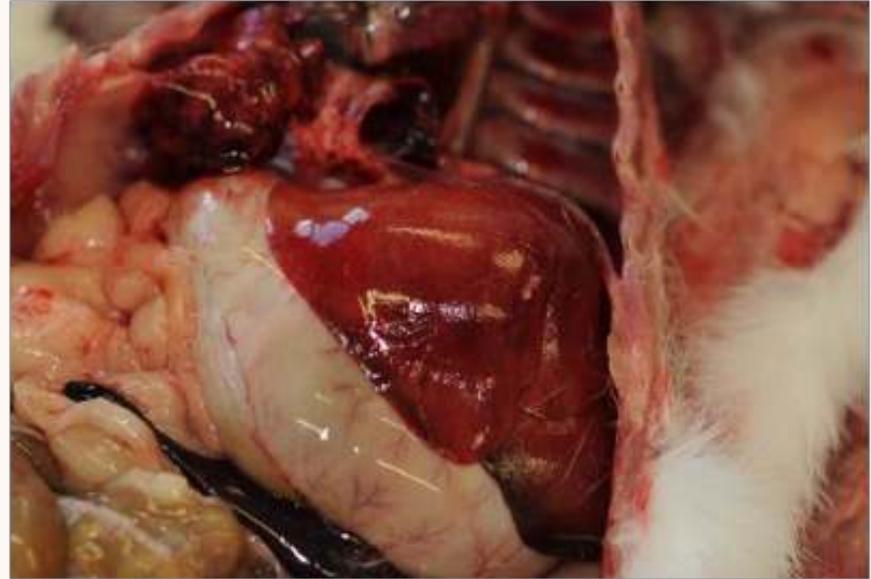
1/15

L'evoluzione di RHDVs



Profilo genetico e antigenico distinto da RHDV/RHDVa "classico" → Abs distinguibili → vaccinazione poco o nulla cross-protettiva → può essere considerato un "nuovo" sierotipo

Lesioni da RHDV2 in coniglietti di 35gg



Evoluzione della patogenicità RHDV2

- × Infezioni sperimentali di conigli con isolati RHDVFra10 del 2010 - 2011: **mortalità varia dallo 0 al 50%** (~ 20%)
- × Osservazioni da focolai in Francia negli anni 2011-2012: **mortalità media fra 20-30%** (B. Le Normand com. pers)



Primi isolati di RHDV2 sono moderatamente patogeni

Increased pathogenicity in rabbit haemorrhagic disease virus type 2 (RHDV2)

L. Capucci, P. Cavadini, M. Schiavitto, G. Lombardi, A. Lavazza

Veterinary Record | 10.1136/vr.104132

% mortalità

RHDV > 80%

RHDV2 > 80%

decorso

RHDV ~ 68 hours

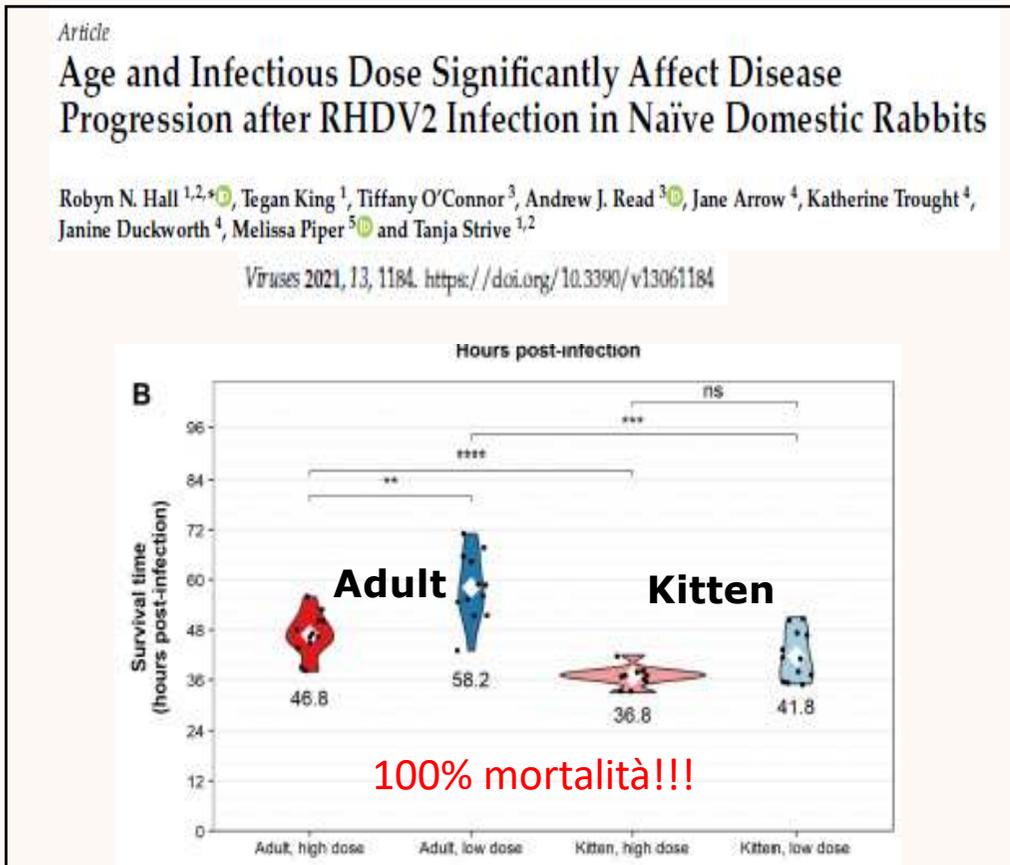
RHDV2 ~ 80 hours

		Hours post infection					
		0-36	48	72	96	AT	
RHDV Bs89	1						68
	2						
	3						
	4						
	5						
RHDV2 Ta14	1						75
	2						
	3						
	4						
	5						
RHDV2 Ch15	1						86
	2						
	3						
	4						
	5						



Nel 2014-2015 la patogenicità di RHDV2 evolve da moderata ad alta

Aumento della virulenza in RHDV2 recenti



- ✗ I ceppi di RHDV-2 che circolano oggi si sono evoluti a partire dai ceppi a media patogenicità identificati nel 2010-2011
- ✗ L'alta patogenicità è un tratto fenotipico sottoposto a selezione positiva
- ✗ Il tasso evolutivo del gene VP60 per RHDV2 è stato stimato in $3,93 \times 10^{-4}$ sostituzioni/sito/anno → data origine luglio 2008, 2 anni prima della sua identificazione

Questo tasso evolutivo è > quello di RHDV e di EBHSV, la cui evoluzione in senso patologico è durata più a lungo. Potrebbe quindi spiegare la rapida acquisizione della fitness in termini di virulenza di RHDV2

RHDV2 in Italia

Giugno 2011. Primo focolaio RHDV2 in Italia in un allevamento industriale (I) a UD, Friuli



Lettera MinSal 06/08/2011 prot. 0014289-P "*Malattia Emorragica Virale del Coniglio (RHDV) – Conferma di nuova variante patogena*"

Ottobre – Marzo 2011. Sardegna diverse località sia selvatici (S) che rurali/familiari (F)

Gennaio 2012, Trento città (F) e a seguire diversi casi in coniglio selvatici «a contatto»

Novembre 2012 – Settembre 2013; Focolai in provincia di CO (F), MB (I), CR (F), AG (S), PD (F), SR (S), CN (I), NA (F), FG (I), VA (F), CN (I), PT (F), PD (I)

- *Dal 2013 in poi RHDV2 presente in forma endemico in tutta Italia*
- *Evoluzione dei ceppi con aumento di virulenza*
- *Alcune ondate epidemiche in conigli allevati industrialmente, le più recenti nel 2018-19*
- *Sempre presente in conigli rurali e da alcuni anni frequente anche in domestici/pet*
- *99,9% RHDV2 ma presenti ancora saltuariamente RHDV/RHDVa*

Lo spettro d'ospite di RHDV2

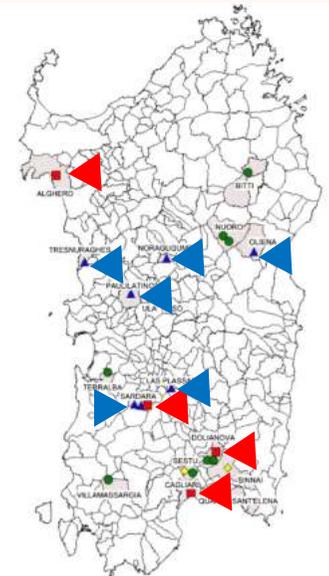
Durante la sua rapida diffusione in tutto il mondo, RHDV2 ha rivelato un'ulteriore caratteristica distintiva: lo spettro ospite...

Nel 2012 campioni di coniglio da IZS Sardegna per la caratterizzazione virale da casi di RHD... E campioni di lepri (*Lepus capensis*) raccolti nell'autunno 2011 per diagnosi di EBHS



Conigli positivi RHDV2

Lepri sarde positive RHDV2



Puggioni et al. *Veterinary Research* 2013, 44:96
<http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/96>

VR VETERINARY RESEARCH

SHORT REPORT Open Access

The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*)

Giantonella Puggioni¹, Patrizia Cavadini², Caterina Maestrale¹, Rosario Scivoli¹, Giuliana Botti², Griaco Ligios¹, Ghislaine Le Gall-Reculé^{3,4}, Antonio Lavazza⁵ and Lorenzo Capucci^{6*}

E poi, a seguire.....

- European brown hares (*Lepus europaeus*)
- Italian hare (*Lepus corsicanus*)
- Irish hare (*Lepus timidus hibernicus*)
- Mountain hares (*Lepus timidus*)
- Iberian hare (*Lepus granatensis*)

Transboundary and Emerging Diseases

ORIGINAL ARTICLE

Spillover Events of Infection of Brown Hares (*Lepus europaeus*) with Rabbit Haemorrhagic Disease Type 2 Virus (RHDV2) Caused Sporadic Cases of an European Brown Hare Syndrome-Like Disease in Italy and Spain

R. Velarde^{1,2}, P. Cavadini^{3,4}, A. Neimans^{5,6}, O. Cabezon^{1,3}, M. Chiar², A. Gaffuri², S. Lavin¹, G. Grilli⁶, D. Gavier-Widén^{3,4}, A. Lavazza⁷ and L. Capucci^{8*}

Research in Veterinary Science

Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and Italian hare (*Lepus corsicanus*)

A. Camarda^{1,2,3}, N. Pugliese^{4,5}, P. Cavadini^{6,7}, E. Cirella⁸, L. Capucci⁹, A. Camilli¹⁰, M. Legrenzi¹¹, E. Malla¹², A. Lavazza¹³

Research Article

Large-scale lagovirus disease outbreaks in European brown hares (*Lepus europaeus*) in France caused by RHDV2 strains spatially shared with rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)

Ghislaine Le Gall-Reculé^{1,2}, Evelynne Lemaitre³, Stéphanie Bertagnol⁴, Céline Hubert⁵, Sokunthea Top⁶, Anouk Decors⁷, Stéphane Marchandoux⁸ and Jean-Sebastien Guitton^{9*}

Rapid Communication

Spillover event of recombinant Lagovirus europaeus/GI.2 into the Iberian hare (*Lepus granatensis*) in Spain

Rosario Velarde¹, Joana Abrantes, Ana M. Lopes, Josep Estruch, Jukka Y. Côté-Real, Pedro J. Esteves, Ignacio García-Bocanegra, Jordi Ruiz-Olmo, Carlos Rouco

Short Communication

Detection of RHDV2 in European brown hares (*Lepus europaeus*) in Australia

R. N. Hall, D. E. Peacock, J. Kovalski, J. E. Mahar, R. Mourant, M. Piper, T. Strive

Research Article

Overcoming species barriers: an outbreak of Lagovirus europaeus GI.2/RHDV2 in an isolated population of mountain hares (*Lepus timidus*)

Alekija S. Neimans^{1,2}, Hari Ahluja³, Ulrika Larsson-Pettersson⁴, Ana M. Lopes⁵, Joana Abrantes⁶, Samak Zohari⁷, Pedro J. Esteves^{8,9} and Dolores Gavier-Widén^{10*}

RHDV2 colonizza le Americhe

Dal 2000 rari focolai di **RHDVa**... probabili introduzioni puntiformi multiple

Virology Journal 2007 4:98

A pandemic strain of calicivirus threatens rabbit industries in the Americas

Michael T McIntosh*¹, Shawn C Behan¹, Fawzi M Mohamed¹, Zhiqiang Lu², Karen E Moran¹, Thomas G Burrage², John G Neilan², Gordon B Ward¹, Giuliana Botti³, Lorenzo Capucci³ and Samia A Metwally¹

RHDV2 è stato segnalato per la prima volta in Nord America nel 2016 in Quebec, Canada, e di nuovo nel 2018 e 2019 sull'isola di Vancouver e poi in California e Messico



Emerging Risk Notice

October 2019

Rabbit Hemorrhagic Disease Virus, Serotype 2

Abstract

... Given its rapid spread, pathogenic nature, and potential to further evolve, possibly broadening its host range to include other genera native to the Americas, **RHDVa** should be regarded as a threat.....

Received: 1 August 2021 | Revised: 29 August 2021 | Accepted: 5 September 2021
DOI: 10.1111/bed.14315

ORIGINAL ARTICLE

Transboundary and Emerging Diseases WILEY

Early circulation of rabbit haemorrhagic disease virus type 2 in domestic and wild lagomorphs in southern California, USA (2020–2021)

Javier Asin¹ | Daniel Rejmanek² | Deana L. Clifford³ | Andrea B. Mikolon⁴ | Eileen E. Henderson¹ | Akinyi C. Nyaoke¹ | Melissa Macias-Rioseco⁵ | Nicolas Streitenberger¹ | Juliann Beingsesser¹ | Leslie W. Woods² | Antonio Lavazza⁶ | Lorenzo Capucci⁶ | Beate Crossley² | Francisco A. Uzal¹



California

Lo spettro d'ospite di RHDV2 in Nord America

Antelope jackrabbit (*Lepus alleni*) Black-tailed jackrabbit (*Lepus californicus*) Desert cottontail (*Sylvilagus audubonii*) Mountain cottontail (*Sylvilagus nuttallii*) Eastern cottontail (*Sylvilagus floridanus*)



From Wikipedia, the free encyclopaedia



RHDV2 è oggi endemico nel Nord e Centro America

Transboundary and Emerging Diseases

ORIGINAL ARTICLE

Comparative susceptibility of eastern cottontails and New Zealand white rabbits to classical rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) and RHDV2

Fawzi Mohamed, Thomas Gidlewski, Mary L. Berninger, Heather M. Petrowski, Alexa J. Bracht, Carla Bravo de Rueda, Roger W. Barrette, Meredith Grady, Emily S. O'Hearn, Charles E. Lewis, Karen E. Moran, Tracy L. Sturgill, Lorenzo Capucci, J. Jeffrey Root ... See fewer authors

First published: 05 November 2021 | <https://doi.org/10.1111/tbed.14381> | Citations: 1

RHDV2 in altri lagomorfi / specie

- ✘ I lagomorfi in Europa (soprattutto la lepre bruna che è la più diffusa) e nel Nord e Centro America spesso **condividono con il coniglio lo stesso habitat**
- ✘ Le popolazioni di lepri e lagomorfi sono sottoposte anni ad una **forte pressione infettante con RHDV2** durante le ondate epidemiche
- ✘ Esigua barriera di specie esistente tra i differenti lagomorfi



Lo spettro d'ospite di RHDV2 è molto più ampio rispetto all'RHDV (e EBHSV) ma tra i lagomorfi il coniglio europeo rimane il principale

Altri lagomorfi (ad oggi 17 specie su 83) possono infettarsi con RHDV2 ed anche morire con con lesioni che nelle lepri sono srapponibili all'EBHS (necessaria DD)

Ed inoltre....studi recenti, ancora da confermare, indicano che RHDV2 potrebbe infettare alcune specie di mammiferi (tassi, roditori)

Ricombinazione virale

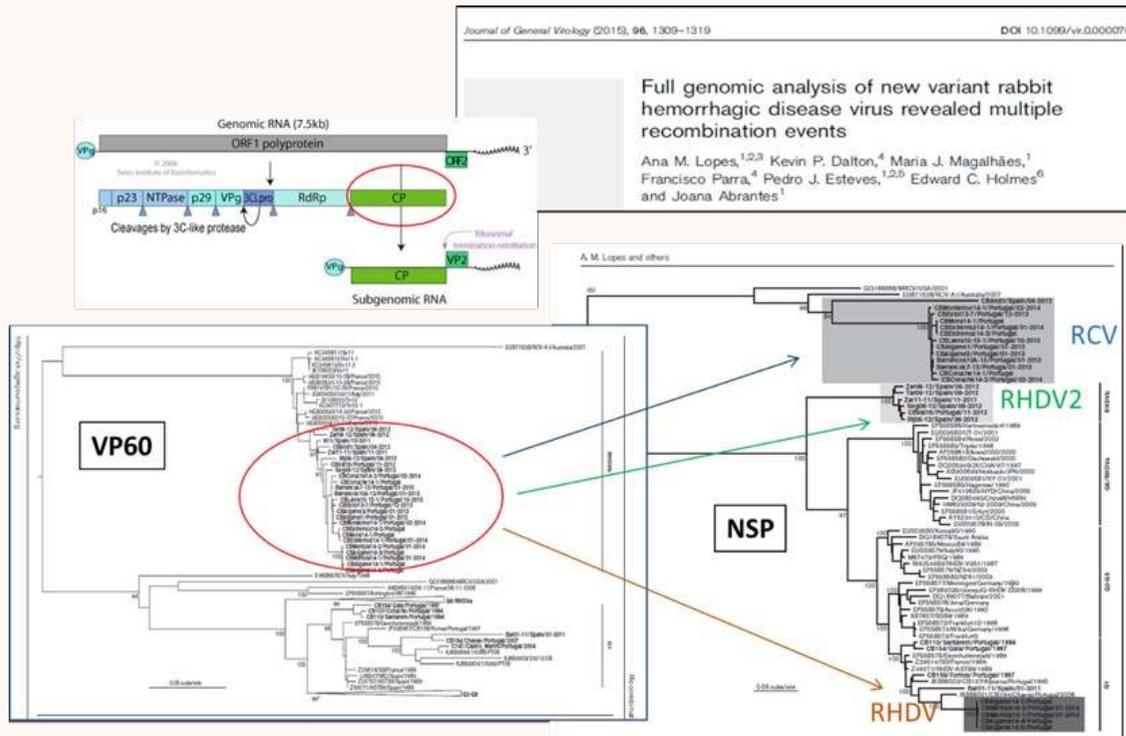


Infezione contemporanea stesso animale
(replicazione RHDVx ed y nelle stesse le cellule)



Concreta possibilità di «emersione» di nuovi lagovirs

Ruolo della ricombinazione nell'evoluzione virale



- ✗ L'analisi filogenetica delle sequenze di genoma complete dei ceppi RHDV2 circolanti dal 2010 mostra **frequenti eventi di ricombinazione**
- ✗ 2 tipi principali di ricombinanti sia in Europa che in Australia, entrambi con le **proteine strutturali VP60 originate da ceppi RHDV2**, e non strutturali VP10 originate rispettivamente dalla variante «classica» RHDVG1 (non più circolante in Europa) o il ceppo non patogeno RCV-A1 Australiano.

Su oltre 100 ceppi di RHDV2 identificati in tutta Italia dal 2011 al 2018

9

RHDV(G1)/RHDV2 ricombinanti

1

RCV/RHDV2 ricombinante

Cavadini et al., 3rd National Congress of the Italian Society for Virology, 10-12 September 2019, Padua (Italy)

Ruolo dei Lagovirus non-patogeni

1. Sono probabilmente I precursori dei virus virulenti

- 1984 (?) Conigli d'Angora dall'Europa alla Cina → primo caso di RHDV virulento
- 1980 (~) Primo “improvviso” caso di EBHS in Paesi Scandinavi

2. Se questo è vero i possibili meccanismi sono [Esteves et al., (2015) PLoS Pathog 11(11): e1005087]:

- Mutazioni adattative
- Eventi di ricombinazione con altri lagovirus
- A seguito di un “salto di specie” (es. minilepre)

3. Sono in grado di indurre livelli variabili di cross-protezione verso virus virulenti

- Fine XIX sec: lagovirus(es) non patogeni in Europa e da qui all'Oceania/Sud America → evoluzione di lineaggi distinti più o meno capaci di indurre Abs cross-protettivi (RVC-E1,2 vs RCV-A1,-3)

4. Possono avere un impatto sulla epidemiologia di RHD e EBHS

- Particolarmente negli animali selvatici, interpretazione dei dati di sierosorveglianza

5. Non può essere esclusa l'esistenza di “reservoir” (lagomorfi e/o altre specie)

- Sono necessari metodi sierologici con più elevata sensibilità e capaci di distinguere i differenti anticorpi

Rabbit Calicivirus (RCVs)

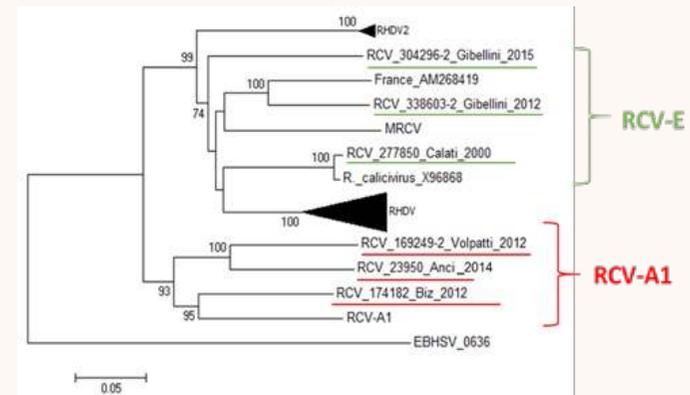
RCVs identificati in aziende industriali di conigli in Italia

JOURNAL OF VIROLOGY, Dec. 1996, p. 8614-8623
0022-538X/96/\$04.00+0
Copyright © 1996, American Society for Microbiology

Vol. 70, No. 12

Detection and Preliminary Characterization of a New Rabbit Calicivirus Related to Rabbit Hemorrhagic Disease Virus but Nonpathogenic

LORENZO CAPUCCI, PAOLA FUSI, ANTONIO LAVAZZA,
MARIA LODOVICA PACCIARINI, AND CESARE ROSSI*
*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e
dell' Emilia, 25124 Brescia, Italy*



- ✗ Identificati per la prima volta da noi in Italia [Capucci L. et al. (1996). J Virol, 70 (12): 8614-8623] e poi nel resto del mondo in conigli domestici e selvatici (F, UK, Australia)
- ✗ Su base sierologica ampiamente diffusi In Italia (30-50% aziende controllate)
- ✗ Studio di caratterizzazione dei ceppi RCV circolanti in Italia periodo 2000-2022

scientific reports

OPEN Two decades of occurrence of non-pathogenic rabbit lagoviruses in Italy and their genomic characterization

Cavadini Patrizia^{1,2,3}, Alice Vismarra^{1,3}, Francesca Merzoni^{1,2}, Vittoria Di Giovanni^{1,2},
Maria Beatrice Boniotti¹, Lorenzo Capucci^{1,2,4} & Antonio Lavazza^{1,2,4}

Scientific Reports | (2024) 14:29234

| <https://doi.org/10.1038/s41598-024-79670-y>

nature portfolio

- 168 pool di feci e 77 duodeni da conigli domestici e selvatici
- 26,5% di prevalenza
- co-circolazione di RCV-E1 e RCV-E2 (Australian-like)

Lagovirus non-patogeno nella lepre

L'esistenza di lagovirus non patogeni nel coniglio in Europa (RCV-E), e Australia (RCV-A1) ha indotto a ipotizzare la possibile esistenza di un lagovirus non patogeno anche nelle lepri. Ipotesi suffragata da dati sierologici



Nel 2012 identificato per la prima volta in RT-PCR utilizzando primers universali per lagovirus nell'intestino di lepri selvatiche e di allevamento in provincia di Brescia



Questo nuovo lagovirus è stato denominato "Hare Calicivirus (HaCV)"



- ✗ Positività in *L. europaeus* ma anche in *L. europaeus meridiei* dall'isola di Pianosa e in *L. corsicanus* dalla provincia di Lucca
- ✗ Nessun apparente evento di ricombinazione tra HaCV e altri lagovirus
- ✗ HaCV circola in Europa tra le popolazioni di lepre selvatiche e la sua presenza è stata confermata in Francia e Australia

Epidemiologia delle malattie da lagovirus

Modalità d'infezione: oro-nasale e congiuntivale

Vie di escrezione: urine, feci, secrezioni nasali

Modalità di trasmissione:

x via diretta:

- animali infetti (anche asintomatici, in incubazione)
- animale convalescente vettore passivo (no portatore)

x via indiretta (più frequente):

- contatto con alimenti od oggetti ed attrezzature contaminate,
- trasporto passivo da parte di animali (incluso uomo),
- **possibile ruolo di animali predatori (carnivori) e «scavengers» (inclusi uccelli)**
- conseguenza di abitudini igieniche e sociali
- via aerogena (?)



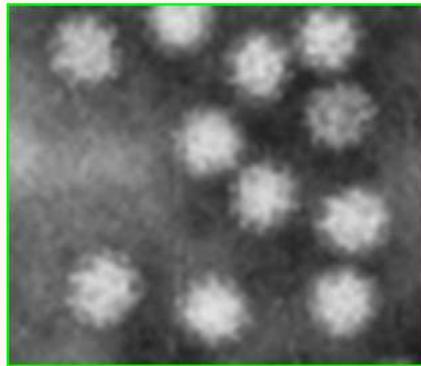
Resistenza ambientale molto elevata

Ma nel concreto.....cosa succede quando ...

RHDV

“incontra”

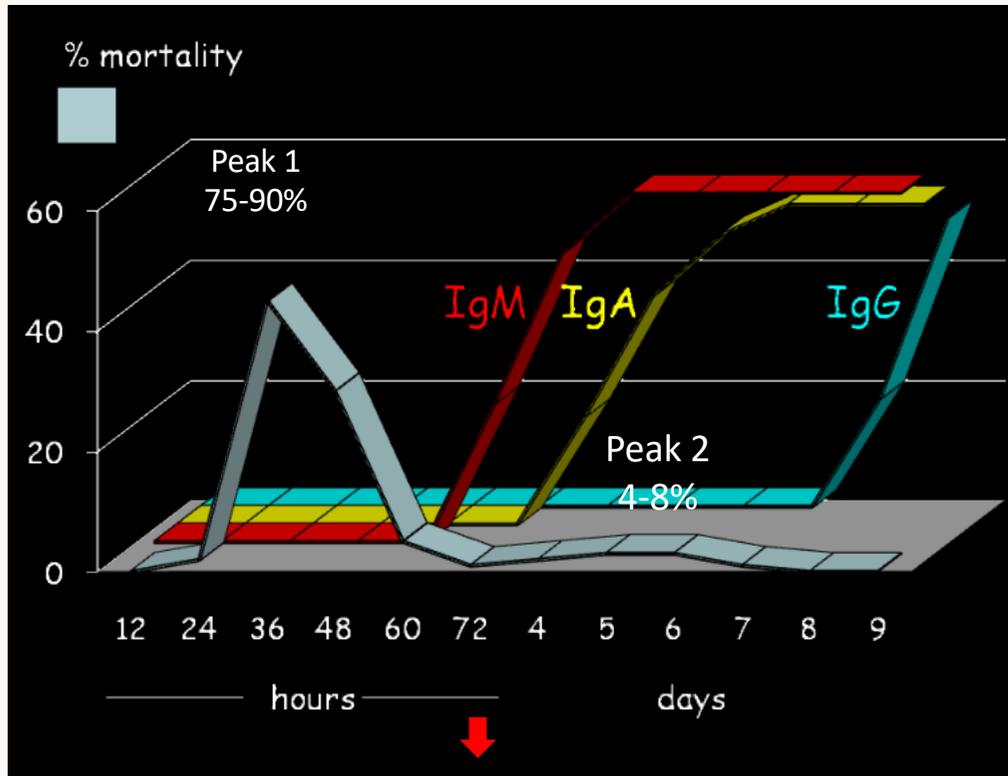
un coniglio...



Compare sempre la malattia (RHD) ?

L'esito dell'infezione da RHDV

(100 conigli – produzione di vaccini)



Immunocomplessi
IgM – virioni in quantità enorme → Al fegato e alla milza
ELIMINAZIONE VIRUS

Dopo l'infezione, inizia una vera e propria corsa tra il virus che si replica nel fegato e il sistema immunitario che produce anticorpi...

.....gli animali che producono Ab molto rapidamente sono in grado di sopravvivere, e questo si verifica in circa il 5-15% degli infetti, che poi mostrano titoli anticorpali molto elevati (1/5120-1/20480).....

.....ne consegue che anche bassi livelli di anticorpi specifici contro RHDV2 proteggono il coniglio da RHD...

.....pertanto, gli anticorpi sono il mezzo più importante di difesa contro la RHD

Diagnosi diretta

Presuntiva:

- anamnesi (in allevamenti e nel domestico)
- sintomi
- lesioni

Di certezza:

- identificazione del virus mediante esami di laboratorio (HA, ME, **MAb-ELISA**, WB, **RT-PCR**)

Diagnosi differenziale



Lesioni emorragiche
Pasteurellosi setticemica
(**coniglio, lepre**)

Splenomegalia
Tularemia, Toxoplasmosi,
Pseudotubercolosi (**lepre**)



Diagnosi diretta (virologica)

ELISA "sandwich"

- basata su reagenti specifici (MAbs) x RHDV, RHDVa, EBHS e RHDV2
- di facile e rapida esecuzione, molto specifico e sensibile

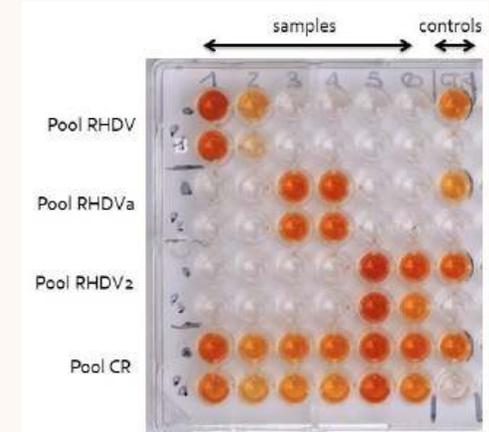
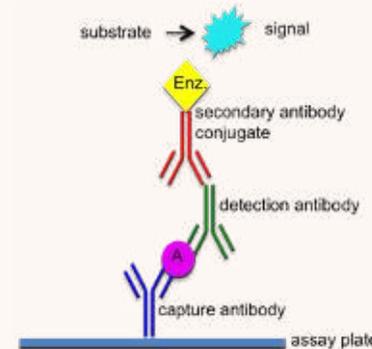
Western blot analysis

- utile in caso di degradazione virale (casi cronici)
- diagnosi di conferma in casi dubbi

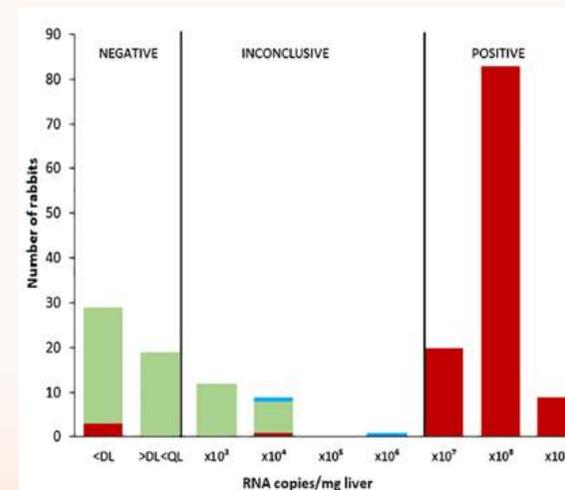
RT-PCR

- molto sensibile
- protocolli x lagovirus sia generici che differenziali
- utile in indagini epidemiologiche molecolari, per studi di patogenesi e per identificare la presenza del virus in soggetti giovani, in ospiti non specifici (serbatoi) e vettori, per la tipizzazione genomica dei diversi ceppi

MAbs-ELISAs sviluppata e utilizzata per la diagnosi presso il laboratorio di riferimento WOAH per RHD



RT-PCR quantitativa

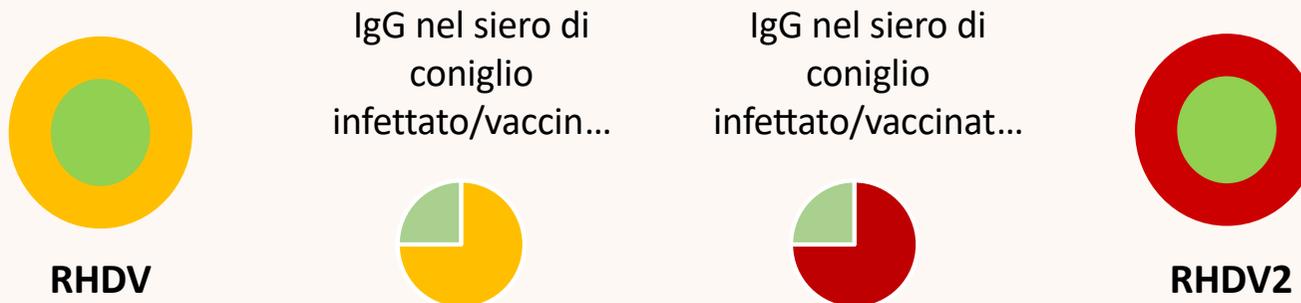


Copie di RNA/mg di fegato

Journal of Small Animal Practice (2020) 61, 487–493 DOI: 10.1111/jsap.13180

Diagnosi indiretta di RHD

Diagnosi sierologica di RHD... un po' più complicata



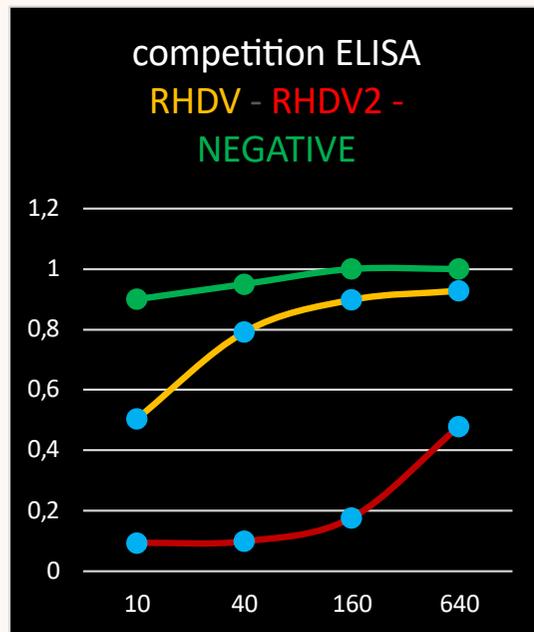
la percentuale di IgG specifiche e cross-reattive nel siero varia...

- tra gli animali
- in relazione al tempo trascorso dall'infezione o dalla vaccinazione
- in caso di infezioni di animali vaccinati
- in caso di reinfezioni
- in caso di reinfezione con un virus diverso dall'originale (es. conigli infettati da RHDV e poi da RHDV2)
- In caso di vaccinazione con vaccino bivalente o trivalente

Diagnosi indiretta di RHD

Diagnosi sierologica di RHD... un po' più complicata

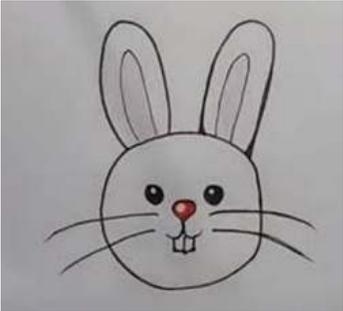
il metodo migliore è l'ELISA ma con l'antigene (il virus) incubato nella fase liquida (non adsorbito alla fase solida della piastra ELISA) cioè ELISA competizione (inibizione)



	RHDV	RHDV2	RT2	Infettato da..
<i>Titolo del Siero</i>	1/10	1/640	64	RHDV2
	1/1280	1/20	0,016	RHDV
	1/80	1/160	2	?
	RT value			
	< 0,25		> 4	
	infetto/vaccinato RHDV		infetto/vaccinato RHDV2	
	??? (between 0,25 and 4)			

11/xx

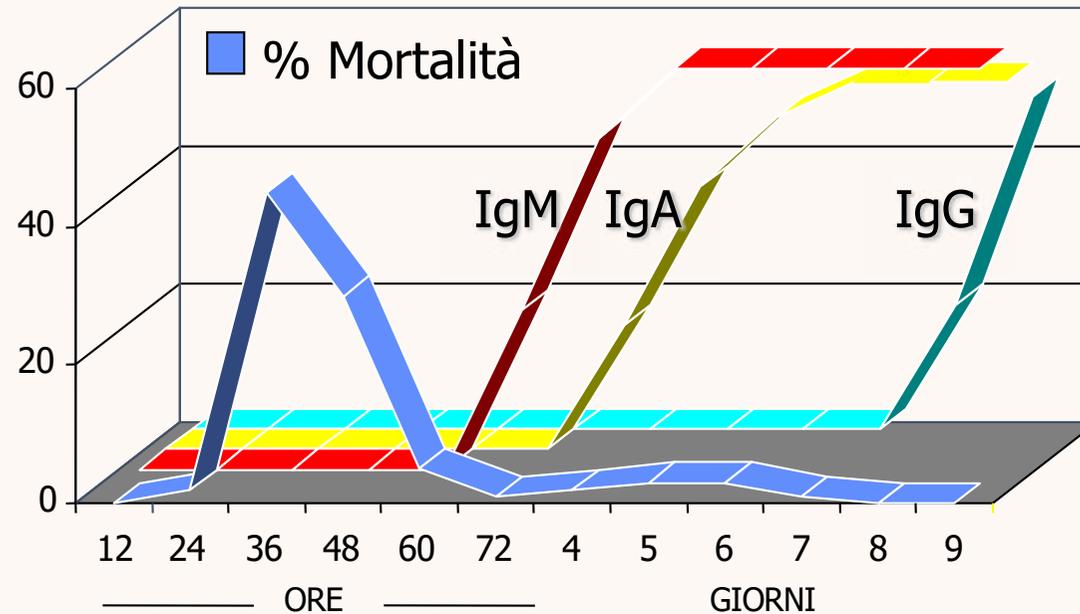
Possibile origine degli anticorpi RHDV2



Un coniglio può avere anticorpi anti RHDVs in circolo...

- ✓ Conigli sopravvissuti all'RHD...
- ✓ Conigli nati da madri con IgG anti RHDV per le prime 3-6 settimane di vita
- ✓ Conigli vaccinati per RHDV e/o RHDV2
- ✓ Conigli infettati da Rabbit Calicivirus (RCV non patogeni)

La sierologia come strumento epidemiologico



- ✓ **IgM:** sono marcatori di **infezione primaria** recente (persistono circa 1 mese p. i.)
- ✓ **IgA:** sono marcatori di **infezione naturale** (persistono fino a 3 mesi p.i.). Con IgM negative sono **marker di reinfezione**
- ✓ **IgG:** persistono per diverse settimane-mesi-anni a seconda della loro origine (compresi gli Abs materni) e del numero di reinfezioni. In assenza di IgM e IgA, nei conigli non vaccinati, sono marcatori di assenza di infezioni da RHDV da > 1-2 mesi.

Immunità materna e naturale per la protezione RHD



Resistenza naturale a RHD:

Con anticorpi materni:

	<i>Infezione da</i>	
	RHDV	RHDV2
<i>Resistenza naturale a RHD:</i>	YES	NO
<i>Con anticorpi materni:</i>	YES	YES

- Alla nascita, il titolo anticorpale del coniglio è identico a quello della madre: più alto è il titolo delle madri, più a lungo gli anticorpi persistono dopo lo svezzamento e più lunga è la protezione contro RHD da RHDV2
- Tuttavia, gli anticorpi materni possono interferire con la vaccinazione, riducendone l'efficacia
- Pertanto, se la situazione epidemiologica suggerisce di vaccinare anche conigli giovani (es. dopo un focolaio per alcuni cicli riproduttivi), ciò dovrebbe essere fatto in assenza di anticorpi materni (dopo i 35-45 gg di età)

Baratelli M., et al., 2020. Characterization of the maternally derived antibody immunity against RHDV-2 after administration in breeding does of an inactivated vaccine. *Vaccines* 2020, 8, 484; doi:10.3390/vaccines8030484

Diagnosi indiretta (sierologica)

ELISA competizione (cELISA)

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

Conigli convalescenti 1/640 -1/20480

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

Conigli vaccinati 1/160 -1/320

Sani  **negativi**
1/10 -1/320 → **virus correlati non patogeni**

Disponibili test sierologici cELISA e anti-isotipo (igM, IgA, IgG) ELISA
sia per **RHDV** che per **RHDV2**



≠ **SIEROTIPI** → **DIAGNOSI SIEROLOGICA DIFFERENZIALE**
titolo omologo 4-8 volte > eterologo

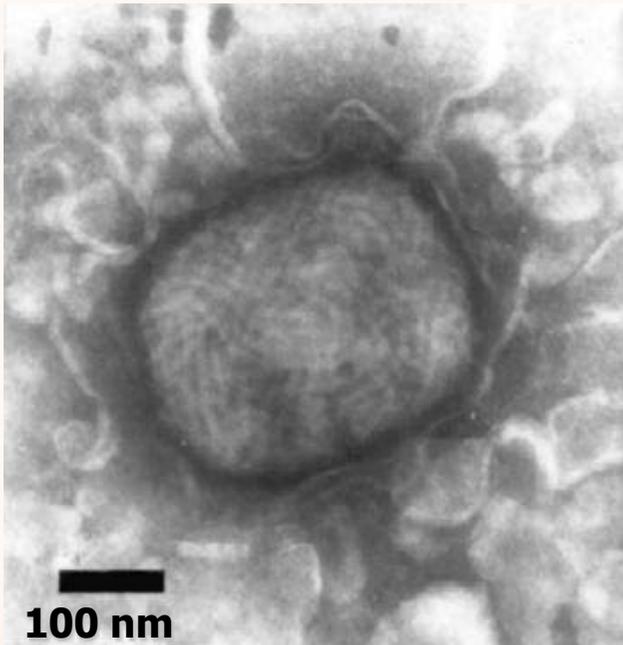
Utilità della sierologia

- ✗ A supporto della diagnosi virologica
- ✗ Per esecuzione di indagini sieroepidemiologiche
- ✗ Per controllare lo stato sanitario di conigli introdotti (es. riproduttori)
- ✗ Per valutare il tipo, entità e durata della risposta immunitaria alla vaccinazione
- ✗ Per determinare la necessità di (ri)vaccinazione
- ✗ Per valutare la presenza di virus apatogeno (RCV)
- ✗ Per tracciare la circolazione virale nel post-focolaio ed arrivare alla risoluzione e chiusura (sentinelle)

LA MIXOMATOSI DEL CONIGLIO E DELLA LEPRE

Una “vecchia” malattia, endemica in Europe e in Italia da oltre 75 anni.....ma con problematiche attuali:

- Patogenesi e patogenicità
- Diagnostica virologica e sierologica
- Profilassi vaccinale
- Gestione dei focolai
- Normativa inadeguata



Eziologia

Fam. Poxviridae, Genere Leporipoxvirus

Virus a DNA di circa 162 kb

Le caratteristiche principali del mixomavirus è la notevole resistenza agli agenti chimico-fisici soprattutto se inglobato in materiale organico essiccato:

- *30gg a T° ambiente*
- *220 gg sul pelo di conigli morti*
- *10 mesi su pelli*

Spettro d'ospite



- Malattia virale altamente contagiosa e diffusiva del **coniglio domestico e selvatico**
- Il **coniglio europeo** (*Oryctolagus cuniculus*) è la specie maggiormente colpita, mentre le specie americane (*Sylvilagus spp.* o “**minilepre**”) sono più resistenti (serbatoio)
- La **lepre**, colpita occasionalmente si può infettare ma non si ammala con i ceppi classici
- Nel 2018 segnalazione di un ceppo mutato adattato alla **lepre iberica** in Spagna e alla **lepre europea** in nord Europa

Leporipoxvirus dei lagomorfi

Virus	Reservoir	Lagomorfi che sviluppano lesioni infettanti	Lagomorfi che sviluppano lesioni non infettanti	Lagomorfi non recettivi	Area geografica
Virus del mixoma (Brasile)	Sylvilagus brasiliensis	S. audobonii	S. bachmani S. floridanus S. nuttallii O. cuniculus L. europaeus*	L. californicus	Centro e Sud America
Virus del Mixoma (California)	Sylvilagus bachmani	O. cuniculus	S. idahoensis S. floridanus S. nuttallii S. audobonii L. europaeus	S. brasiliensis L. californicus	Ovest USA
Virus del Fibroma del coniglio	Sylvilagus floridanus		<i>O. cuniculus</i>	S. bachmanii S. audobonii S. nuttallii L. europaeus	Est USA
Virus del Fibroma della Lepre	Lepus europaeus	L. californicus			Europa
Virus del fibroma della lepre africana**	Lepus europaeus	?	?	?	Kenya

Legenda: * lesioni estremamente rare; ** non è stato dimostrato che sia un *Leporipoxvirus*.

Organizzazione genomica

Cameron, C. et al., The complete DNA sequence of myxoma virus. Virology. 1999, 264(2):298-318. doi: 10.1006/viro.1999.0001

Genoma: ds DNA

170 geni

- 158 OPEN READING FRAME unici
- 12 geni duplicati nei TIRs

Le regioni periferiche (11 kb) codificano per i fattori di patogenicità (implicati nella **modulazione della risposta dell'ospite infettato**)



Geni coinvolti nella interazione virus-ospite

Specifici del MYXV

Geni coinvolti nella replicazione ed assemblamento del virus

Geni altamente conservati tra i poxovirus

Fattori di virulenza

Il virus della Myxomatosi possiede dei geni “**immuno modulatori**” (o “**guastatori**”?) = proteine che intralciano (rallentano o aboliscono) il divenire dei processi immunologici sia nativi che adattativi.

M-T1 = inibisce il richiamo dei monociti/macrofagi
M-T2 = recettore TNF e inibitore apoptosi linfociti
M-T5 = antiapoptosi, causa disseminazione virale
M11L = antiapoptosi macrofagi/monociti
M153 interferisce nella produzione del MHC-1 e del CD4



IMMUNOSOPRESSIONE



MYXOMATOSI

Eziopatogenesi

Segni clinici variano a seconda di: ceppo virale, virulenza, attenuazione naturale (mutazioni) o per passaggi in laboratorio

- Ceppi Californiani:** forma iperacuta, SNC, diatesi emorragica, rari segni cutanei
- Ceppi SudAmericani:** (Losanne e Moses) forma cutanea (noduli orecchie, testa e genitali), respiratoria, blefarocongiuntiviti)
- Attenuati:** (derivati dai Sud Americani) meno virulenti
- Laboratorio:** Neuromixoma (dal Moses,1937), MSD/B (dal California,1970), Losanna derivato (1980)
- Virulenza:** Ceppi **lentogeni e velogeni**

Patogenicità dei ceppi europei della myxomatosi

Un solo sierotipo, ma ceppi diversi con patogenicità differente

Carattere	Velogeni		Mesogeni	Lentogeni	
	I	II	III	IV	V
Comparsa lesioni	3 gg	3 gg	3 gg	3 gg	5 gg
Forma lesioni primarie	convesse ed ulcerate, regolari, non delimitate		convesse, ± regolari, ± delimitate	± piatte, irregolari ± delimitate	piatte, irregolari ± delimitate
Essudazione	++++	++++	+++	++	+
Cute	Ulcerata	Ulcerata	Necrotica	Necrotica	Necrotica
Generalizz. Cutanea	++++	++++	++	++	+
Generalizz. Occhio	4° giorno	5° giorno	10° giorno	18° giorno	±
Tasso mortalità %	99	95	90	65	23
Tempo medio sopravvivenza(gg)	<12,5	12,6-16,5	20	33	40

da Fenner & Ratcliffe, 1965

Patogenesi

INGRESSO:

inoculazione

mucose



REPLICAZIONE:

massiva nei linfonodi regionali



VIREMIA:

cellulo associata (linfociti)

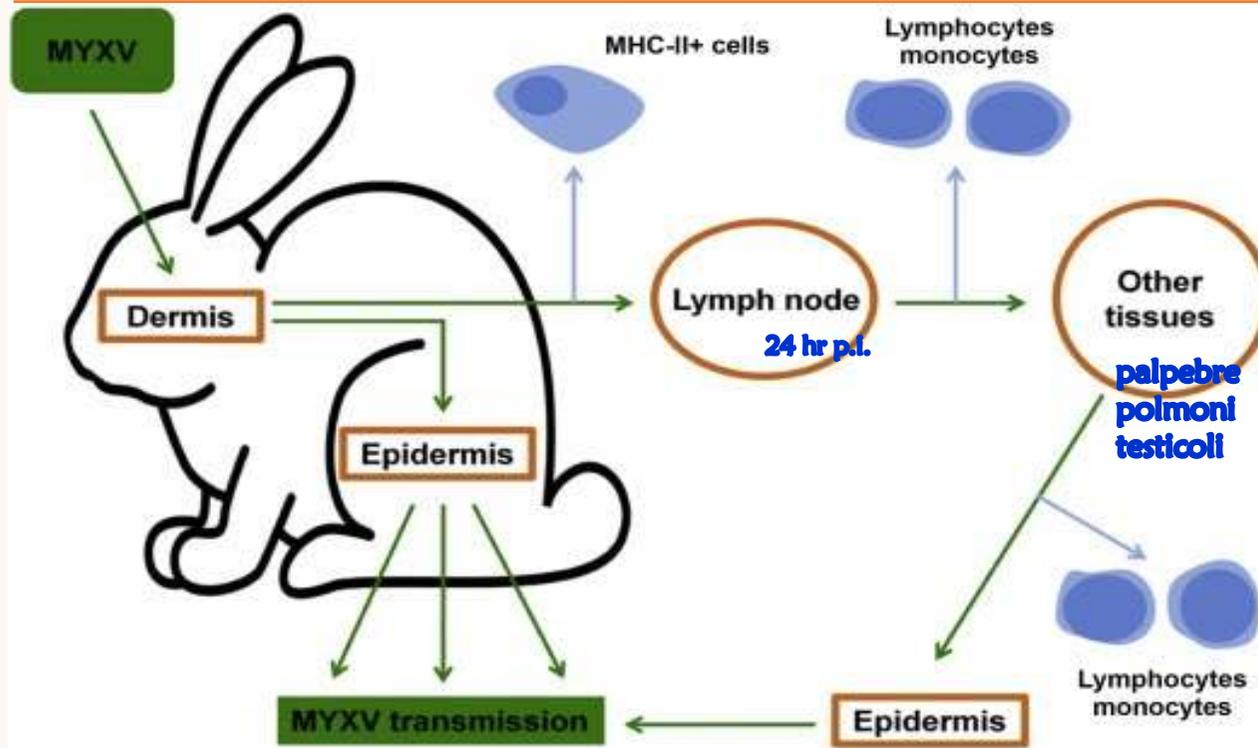


LOCALIZZAZIONE:

genitali, cute

cav. nasali,
congiuntiva,
genitali, cute

Patogenesi



Tessuti maggiormente interessati: **la pelle e i tessuti linfoidei** ove si riscontra la maggior concentrazione di virus

Virus non rintracciabile libero nel sangue ma nei globuli bianchi circolanti

NON riportate significative dimostrazioni di “**persistenza**” (no stato carrier) ma.....

VIRUS LATENTE = equilibrio dinamico tra risposta immune e replicazione virale

Immunità

- Durante l'infezione si sviluppano alti titoli anticorpali (IgM e IgG) neutralizzanti *in vitro* ma molto poco protettivi *in vivo*
- Conferme della **ridotta capacità protettiva dell'immunità umorale** vengono anche a esperimenti di protezione passiva e da animali con anticorpi materni
- Nei guariti, però, gli anticorpi proteggono da re-infezioni

MAGGIOR PESO IMMUNITA' CELLULARE: perche?

- i geni “guastatori” hanno come bersaglio il sistema cellulare
- il virus è quasi sempre intracellulare
- l'immunità umorale è ridotta
- vi è un'ampia variabilità individuale in termini di entità e durata
- i vaccini inattivati non funzionano

Risposta anticorpale utilizzabile a fini diagnostici !!!

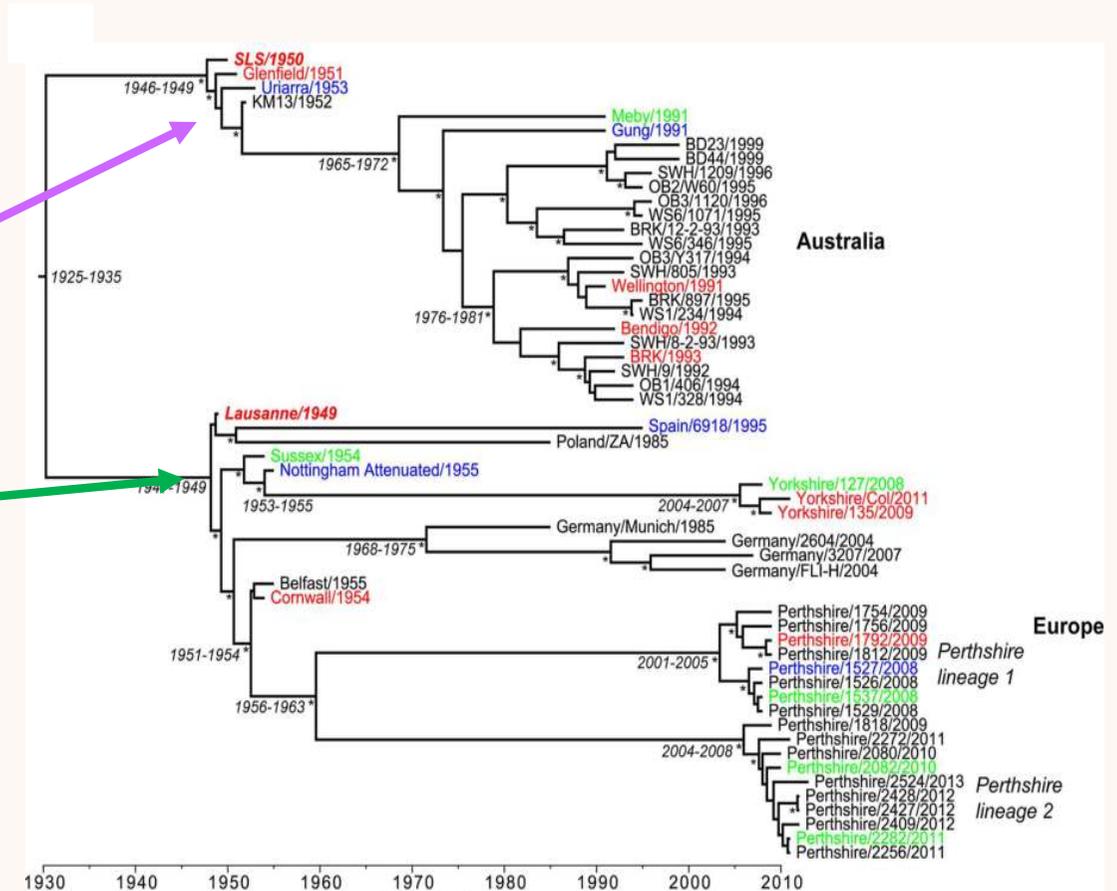
Storia

- 1896 SANARELLI Uruguay
- 1927 ARAGAO
- 1930 Epidemia in California
- 1950 **Australia**
- 1952 **Francia**
- 1953 Belgio, Spagna, Lussemburgo,
Olanda, Germania, Inghilterra
- 1954 Italia



Malattia denunciabile
(O.ACIS 15/9/1955)

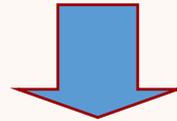
"Norme per la profilassi
della Mixomatosi"



Epidemiologia

Quadro epidemiologico variabile

- da Paese a Paese
- nel tempo



Forma enzootica con **microepizootie regionali** che risentono di:

- condizioni climatiche
- tipo di allevamento
- grado di immunità di popolazione
- densità di animali

Metodi di trasmissione e fonti di contagio

DIFFUSIONE

- INDIRETTA insetti ematofagi
- DIRETTA contatto animale malato/sano

FONTE DI CONTAGIO

- animali malati
- animali portatori
 - *incubazione*
 - *guariti X 2-3 settimane*

MATERIALI CONTAMINATI

- secrezioni oculo-nasali +++
- essudato ulcere mixomatose +++
- sangue +/-
- urine +/-

Diffusione indiretta

INSETTI EMATOFAGI: solo vettori passivi, no trasmissione transovarica, no replicazione virale

- zanzare (*Culex, Aedes, Anopheles*) (**Australia, Europa**)
 - si infettano dopo un pasto e restano infettanti anche x 220gg
 - diffondono la malattia da primavera ad autunno
 - possibile conservazione del virus anche d'inverno
- pulci (*Spilopsillus, Chtenocephalides*) (**GB**)
 - mantiene l'infezione nel coniglio selvatico, anche durante l'inverno
 - capace di spostamenti direzionali alla ricerca dell'ospite
- simulidi (**Francia**)
- pidocchio del coniglio
- zecche ed acari

Diffusione diretta

Gioca ruolo essenziale nella "forma atipica respiratoria"

- **PORTA D'INGRESSO**

- cute lesa
- mucosa oculo-congiuntivale
- mucose ano-genitali
- via respiratoria
- via digerente

- **FONTE D'INFEZIONE**

- animali ammalati o portatori da allevamenti non controllati o senza quarantena
- ricoveri contaminati
- contaminazione alimentare con pelli o carcasse di conigli morti non distrutte, lasciate sulle concimaie
- iatrogena, con siringhe infette
- trasporto passivo da parte di animali (faine, volpi), uomo e mezzi di trasporto per contaminazione ambientale

Epidemiologia – coniglio selvatico in natura

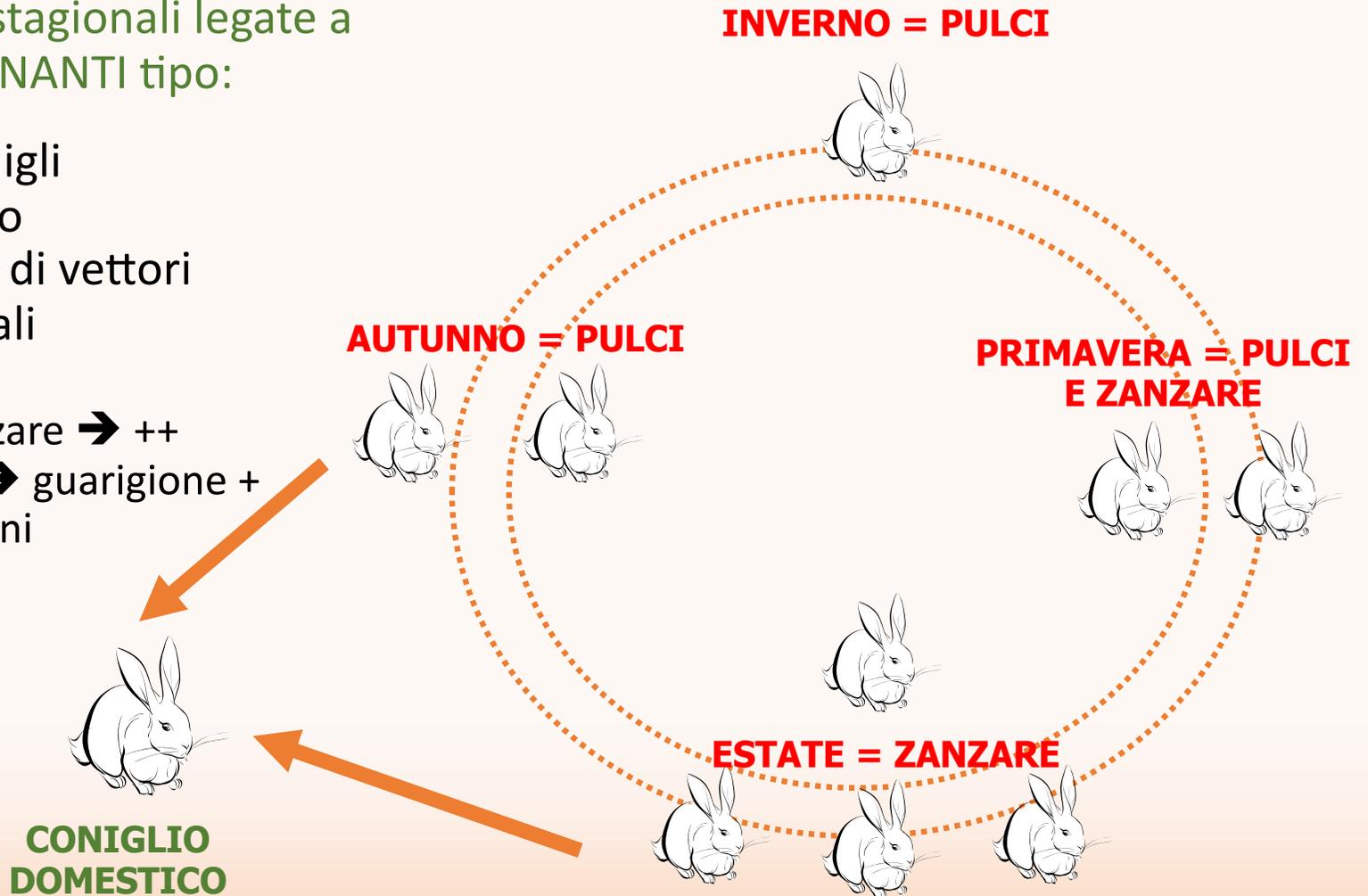
TRASMISSIONE INDIRETTA PER VETTORI

- Mixo delle tane → invernale (pulci)
- Mixo delle conigliere → estate/autunno (zanzare)

Variazioni annuali stagionali legate a FATTORI CONDIZIONANTI tipo:

Abbondanza di conigli
Stato immunologico
Abbondanza e tipo di vettori
Virulenza ceppi virali
Clima

- se umido > di zanzare → ++
- se caldo e secco → guarigione + rapida, tanti giovani



Quadri clinici ed andamento epidemiologico

RURALE, SELVATICO, DOMESTICO

TRASMISSIONE INDIRETTA PER VETTORI

- Forma classica nodulare
- Epizootie estive

ALLEVAMENTO INTENSIVO (DOMESTICO)

TRASMISSIONE INDIRETTA E DIRETTA (x contatto)

- Forma amixomatosa (respiratoria)
- Persistenza tutto l'anno
 - Passaggio adulti/coniglietti
 - Ceppi virali attenuati
 - Infezione latente

FONTE DI CONTAGIO

animali malati
animali portatori
incubazione
guariti X 2-3 settimane

MATERIALI CONTAMINATI

secrezioni oculo-nasali +++
essudato ulcere mixomatose +++
sangue +/-
urine +/-

Forme cliniche della malattia

Classica (Nodulare)

- noduli (myxomi) su orecchie, cute, congiuntiva, naso, mucosa genitale
- colpiti soprattutto gli all. rurali
- trasmissione indiretta (insetti)
- serbatoio nei selvatici
- tarda estate
- incubazione breve
- alta mortalità
- facile da diagnosticare

Atipica (Respiratoria)

- a partire dagli anni '80, ceppi attenuati
- all. industriale
- contatto diretto
- durante tutto l'anno
- latenza (infezioni sub-cliniche)
- periodo d'incubazione più lungo
- aborti, mortalità neonatale
- infezioni secondarie (*Pasteurella* spp.)
- diagnosi più difficile

Forma classica: sintomatologia ed evoluzione

Forma ACUTA

Fase di debutto (3-9gg)

- comparsa di **mixomi primari** (tumefazioni cutanee) nel punto di inoculo del virus, generalmente localizzato alle zone glabre e alle mucose apparenti
- nella **regione palpebrale** reazioni infiammatorie evidenti con edema dei tessuti (blefaro-congiuntivite acuta) → le palpebre divengono tumefatte con abbondante essudazione catarrale-purulenta che in poco tempo impedisce l'apertura delle rime oculari.

Forma classica: sintomatologia ed evoluzione

Forma ACUTA

Fase di stato

- Dopo 2-3 giorni dall'inizio della sintomatologia, localizzazione delle lesioni a **livello ano-genitale**.
- In questi distretti i tessuti si presentano edematosi, caldi, doloranti e di colore che varia dal rosa al rosso-violaceo.

Fase terminale

- In ultimo si ha la comparsa di **mixomi secondari** sul dorso e sul muso, facendo assumere all'animale un aspetto classico da "*facies leonina*".
- I mixomi secondari sono freddi ed elastici al tatto, sono indolori e si possono trovare isolati oppure confluenti
- Morte in 8-15gg oppure guarigione con formazione di cicatrici cutanee

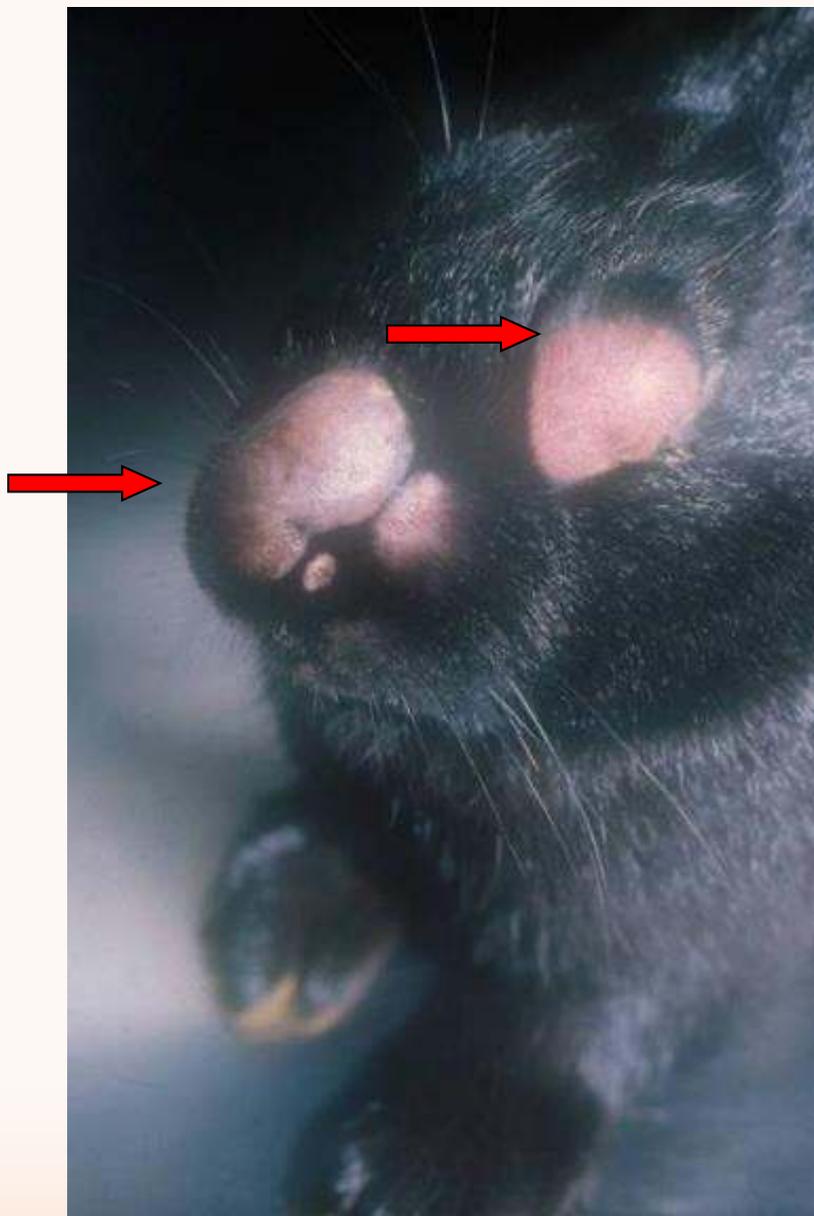
Forma classica: lesioni anatomo-patologiche

- Le sedi cutanee colpite presentano un edema di aspetto gelatinoso mentre nelle forme più attenuate la consistenza è maggiore
- Costante è l'interessamento dei linfonodi regionali e della milza che si presentano aumentati di volume
- Il virus, essendo epiteliotropo, colpisce oltre che i genitali esterni anche l'endometrio e le linee seminali maschili che giustificano l'infertilità e gli aborti riscontrati nei conigli infetti.

Forma classica



Forma classica



Forma classica



Forma classica



Forme cliniche della malattia

Classica (Nodulare)

- noduli (myxomi) su orecchie, cute, congiuntiva, naso, mucosa genitale
- colpiti soprattutto gli all. rurali
- trasmissione indiretta (insetti)
- serbatoio nei selvatici
- tarda estate
- incubazione breve
- alta mortalità
- facile da diagnosticare

Atipica (Respiratoria)

- a partire dagli anni '80, ceppi attenuati
- all. industriale
- contatto diretto
- durante tutto l'anno
- latenza (infezioni sub-cliniche)
- periodo d'incubazione più lungo
- aborti, mortalità neonatale
- infezioni secondarie (*Pasteurella* spp.)
- diagnosi più difficile

Forma atipica: sintomatologia ed evoluzione

- Si manifesta principalmente con sintomi respiratori e con lesioni a carico dei genitali e degli occhi con tumefazioni delle palpebre e congiuntivite e del naso con scolo muco-purulento
- I noduli fibrotici, tipici della forma classica, possono essere scarsamente presenti o del tutto assenti
- L'interessamento dei genitali è patognomonico, anche se spesso l'esame clinico a tale livello viene trascurato

Forma atipica: sintomatologia ed evoluzione

- Evoluzione (acuta, subacuta o cronica) in funzione del grado di virulenza del ceppo.
 - La **forma acuta** si conclude quasi sempre con la morte dell'animale colpito
 - Le **forme sub-acuta e cronica** possono concludersi con la guarigione dell'animale, sempre se non intervengono infezioni batteriche secondarie che sono comunque molto frequenti

Forma atipica: sintomatologia ed evoluzione

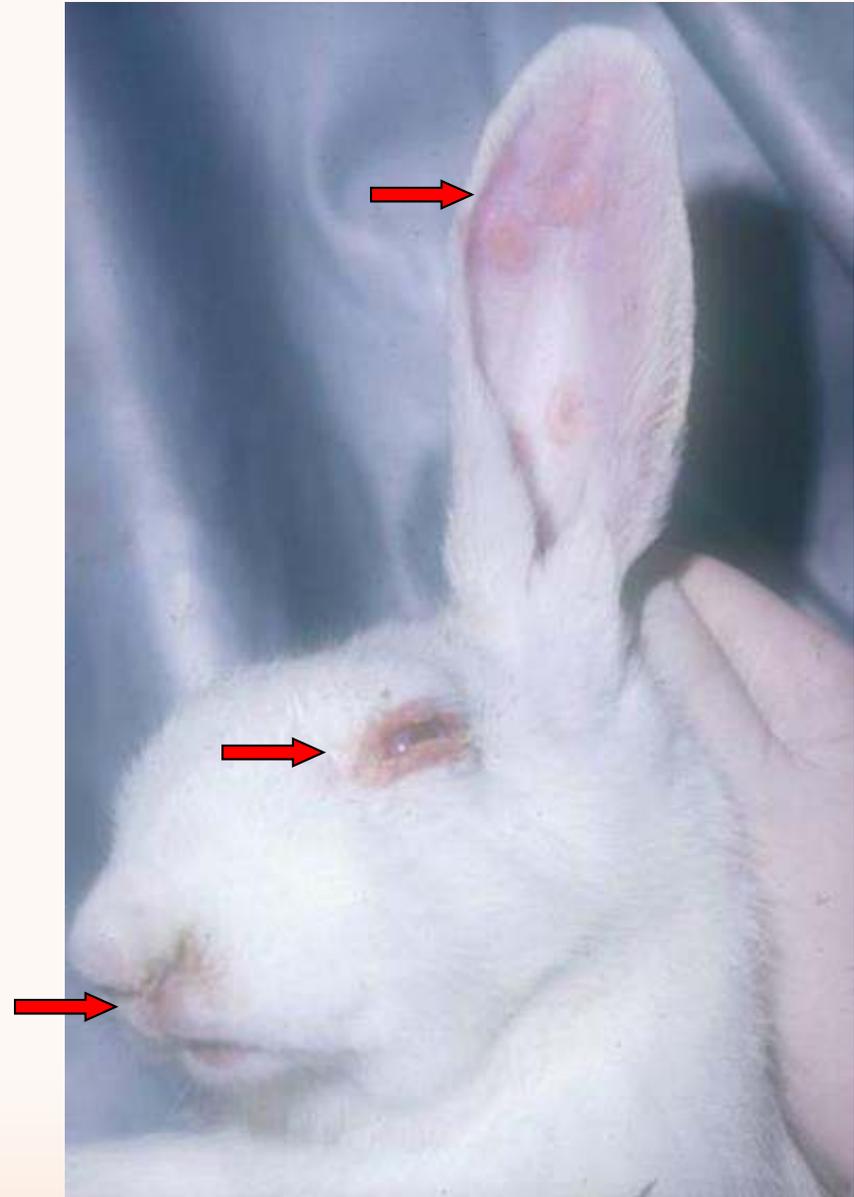
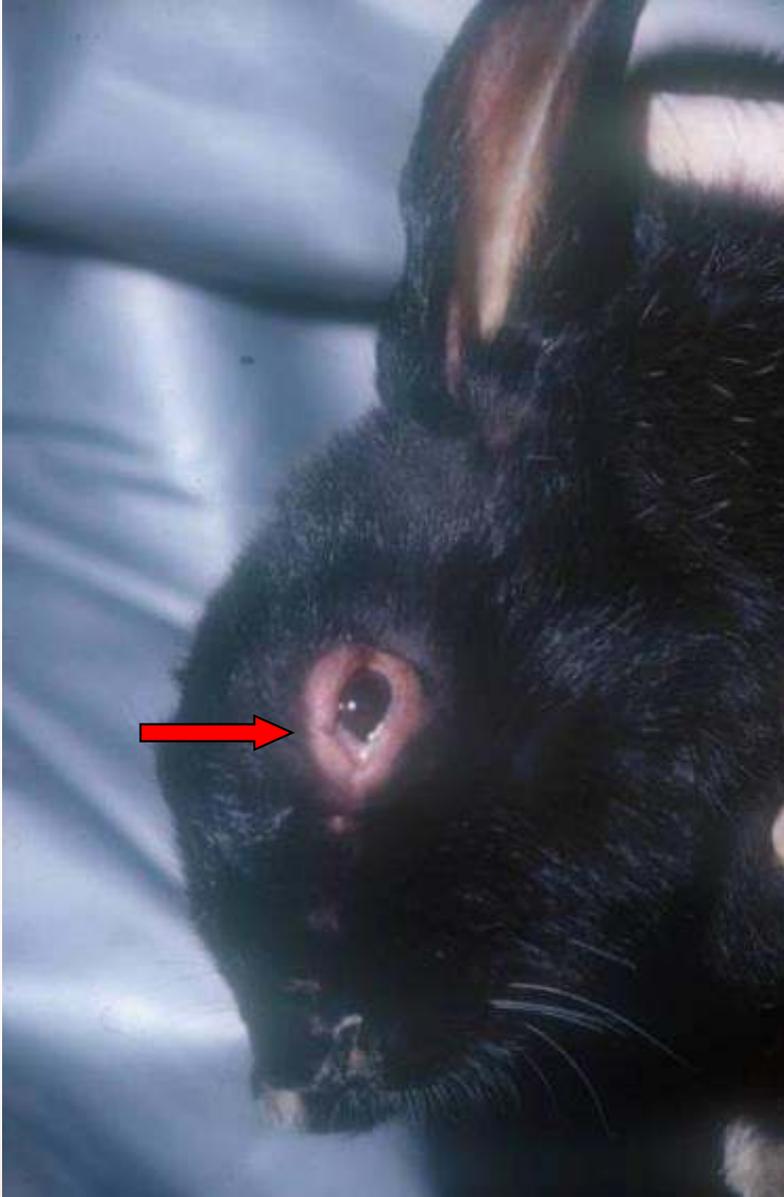
Forma ACUTA (ceppi attenuati-respiratori)

- Periodo di incubazione 1-3 sett.
No localizzazione cutanea delle lesioni, no mixomi
- *Fase di debutto e di stato*
Essenzialmente oculare (tumefazioni) genitale e nasale
- *Fase terminale*
Complicanze respiratorie

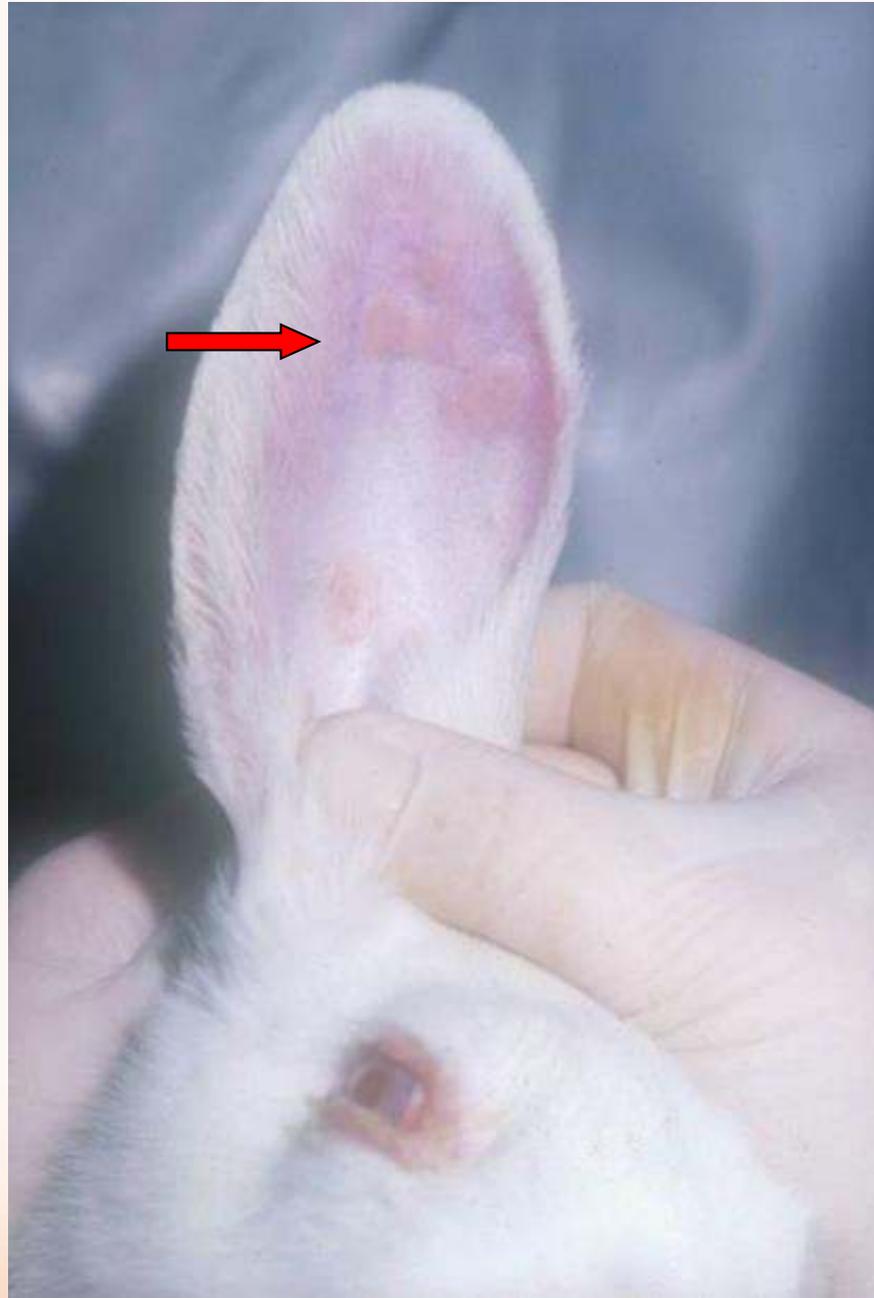
Forma SUBACUTA/CRONICA

Chiazze congestizie orecchie (non noduli) → croste → cicatrici

Forma atipica



Forma atipica



Forma atipica



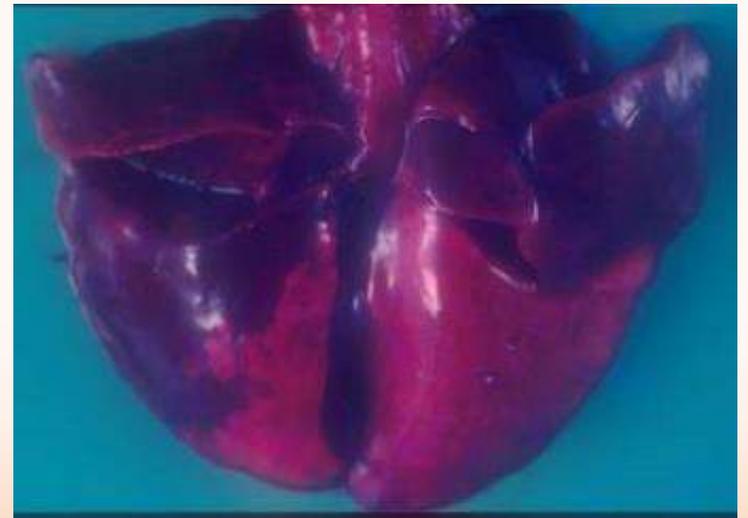
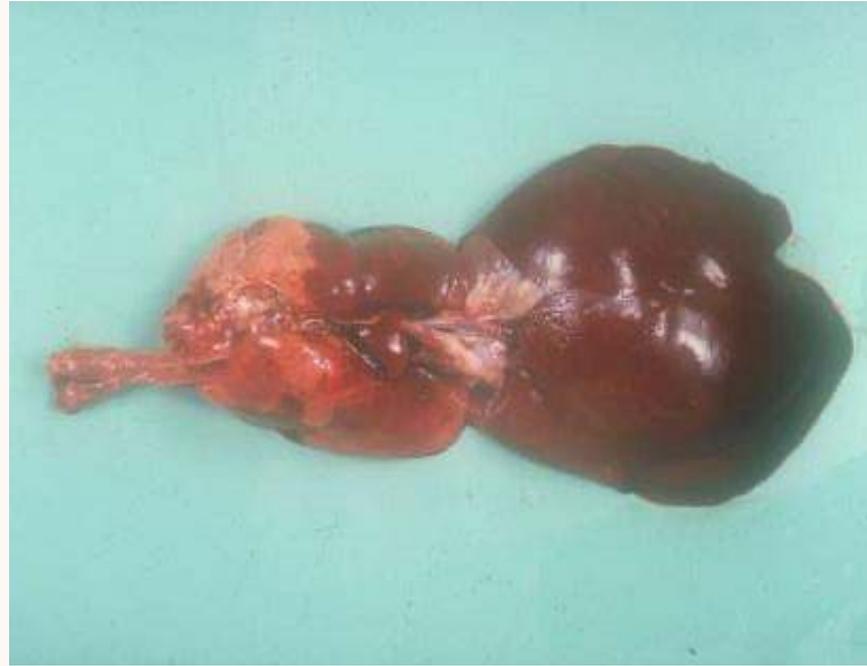
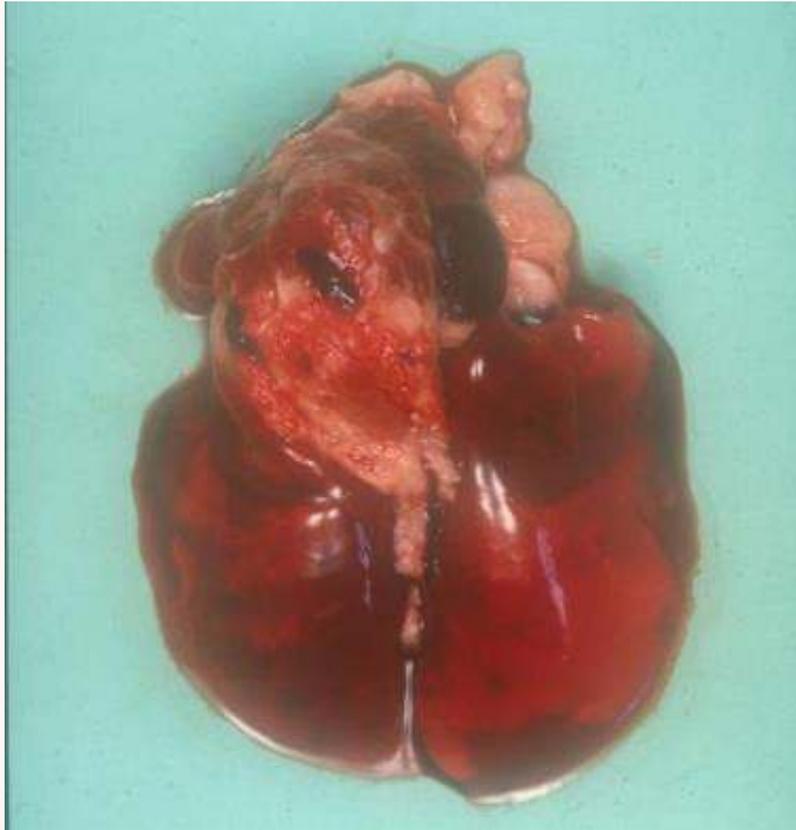
Forma atipica



Forma atipica



Forma atipica



Polmonite fibrinosa da *Pasteurella multocida*



Riassumendo.....

FORMA CLASSICA	FORMA AMIXOMATOSA
Mixomi prominenti (testa)	Mixomi ridotti o assenti
Lesioni auricolari (ptosi)	Poche lesioni alle orecchie (macchie)
Tumefazione palpebre e <i>variabile</i> congiuntivite	Tumefazione palpebre e <i>sempre</i> congiuntivite p.
Difficoltà respiratorie <i>tardive</i>	Corizza mucopurulenta <i>grave</i>
Edema genitale <i>tardivo</i>	Edema genitale <i>costante</i>

Riassumendo.....

- **PATOGENICITA'**: legata al grado di virulenza (+ virulenti = + diffusibili)
- **DIFFUSIBILITA'**: legata alla virulenza e tropismo
- **RECETTIVITA'**: legata alla razza (linee geneticamente resistenti)
- **INSORGENZA**: in un territorio è condizionata dalla densità di allevamenti e dal n° di animali recettivi (giovani)
- **EVOLUZIONE**: legata all'ambiente inteso come: condizioni stagionali, clima, tasso igrometrico e piovosità
- **INFETTIVITA'**: dei diversi sierotipi è legata anche alla temperatura ambientale (in allevamento resiste + a lungo)

Conferma diagnostica

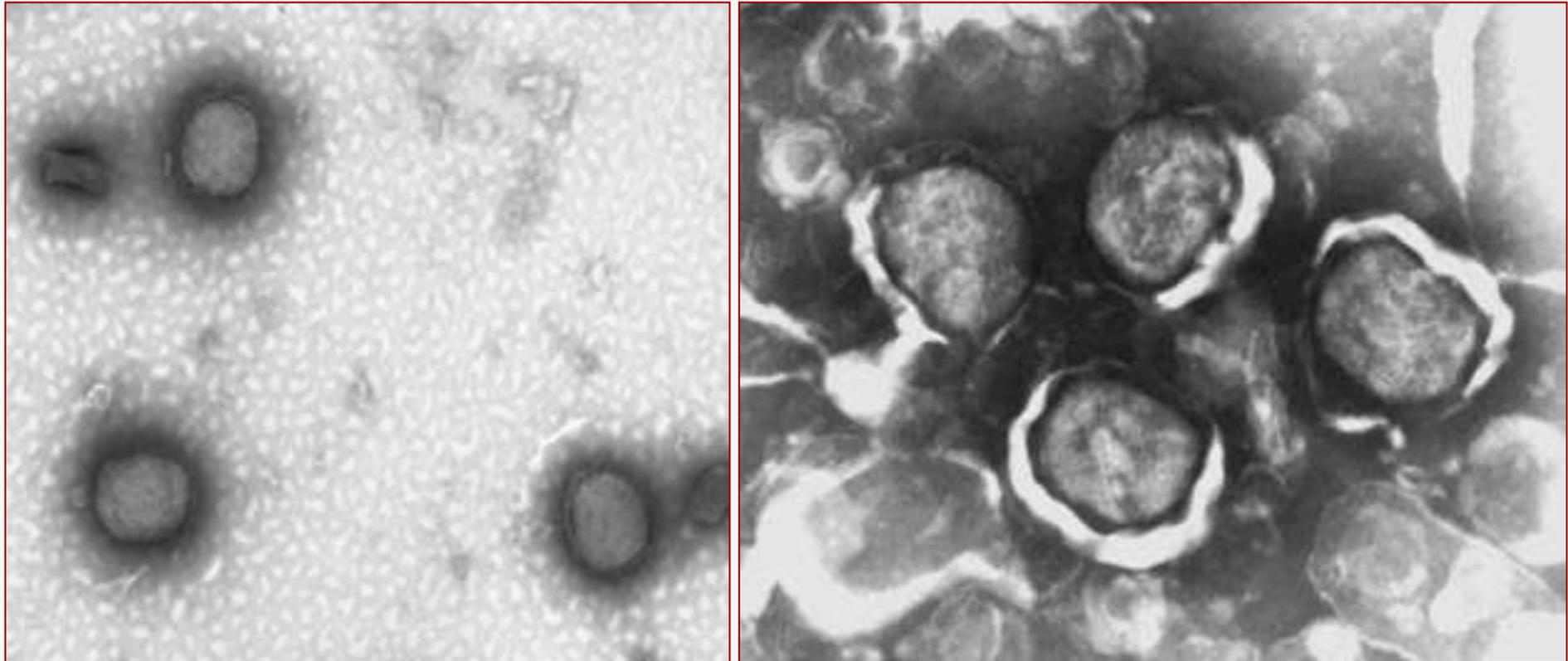
Ricerca antigene

- Microscopia Elettronica
- Immunofluorescenza, DIF-ET (Eye test)
- AGID, ELISA, FdC
- Isolamento (uovo embrionato MCA, cellule Vero o RK13)
- Immunoperossidasi
- PCR
- Sequenziamento NGS

Esame sierologico

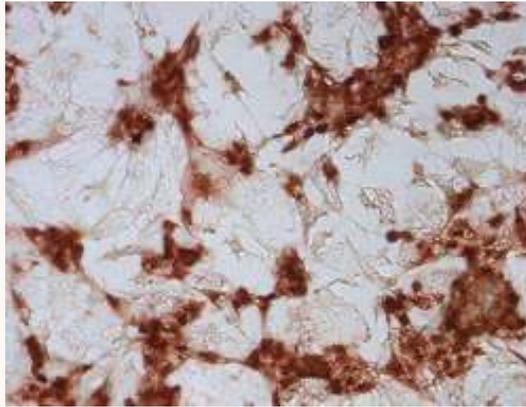
- AGID
- FdC
- IFI
- ELISA

Microscopia Elettronica in colorazione negativa

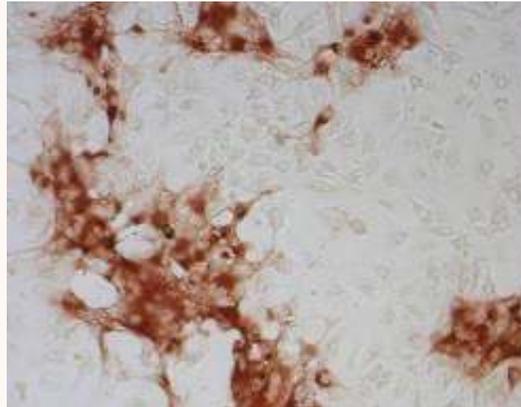


Immunoperossidasi

MAbs 6B1 o 5D12, 5G6 e 5B4 in pool, usati per diagnosi (IF e IP)



Da palpebra 1° p. 316

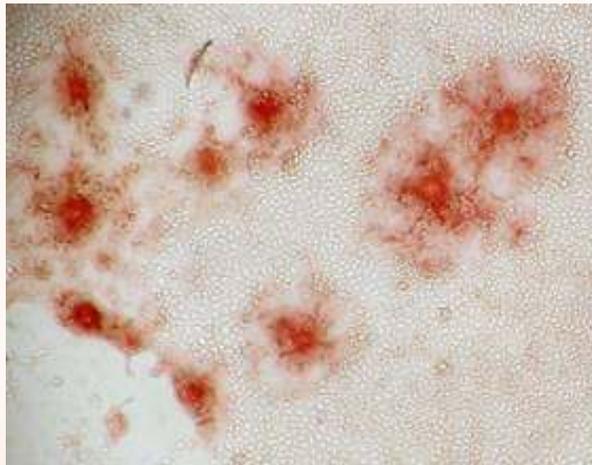


MV Moses

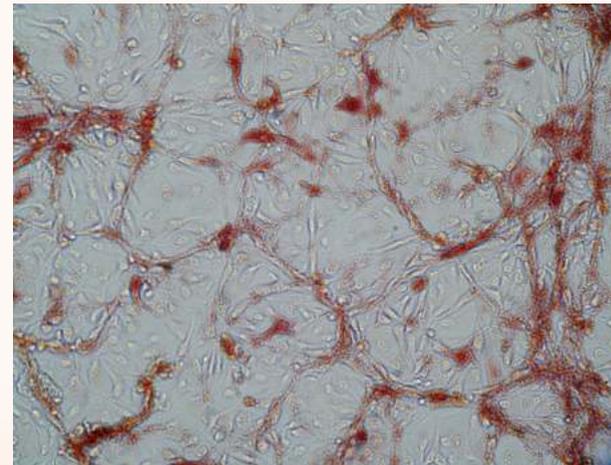


MV SG33 vaccino

MAb 1E5 in immunoperossidasi (IP) su Cellule RK13



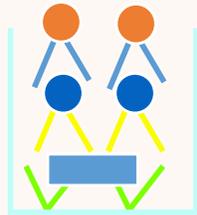
Vaccino Borghi



1° passaggio ceppo campo

*Courtesy from
Lorenzo Capucci
IZSLER Brescia*

ELISA sandwich con MAbs



✓ = Siero iperimmune di coniglio anti-Myxomatosi

■ = Organo (cute, fegato, polmone, etc) 10%, dil. 1/10 -1/30

● = MAbs 1C1/1E5

● = HRP

- Adsorbito siero di coniglio immune anti-Myxoma virus
- Tutti MAbs positivi in immunoperossidasi
- MAbs 1C1 e 1E5 con il più alto livello di competizione da parte di sieri anti MV
- HRP: IgG coniglio anti IgG topo

Courtesy from Lorenzo Capucci IZSLER Brescia

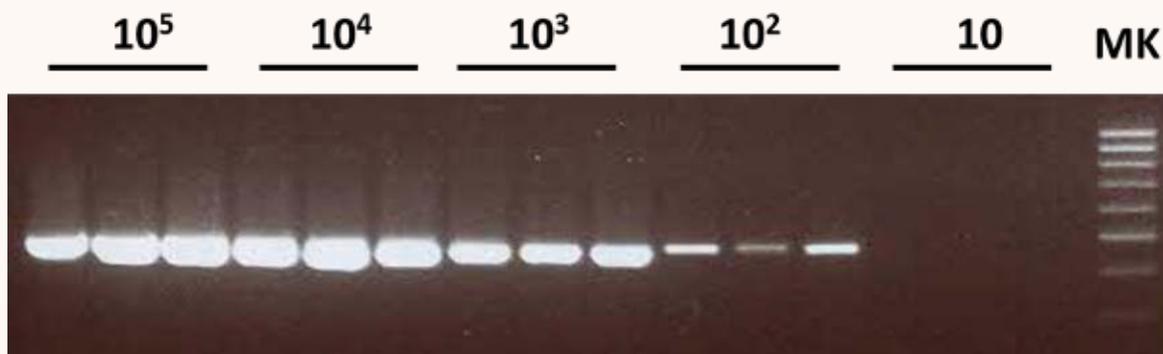
Diagnosi molecolare (genomica)

Caratterizzazione molecolare dei ceppi vaccinali

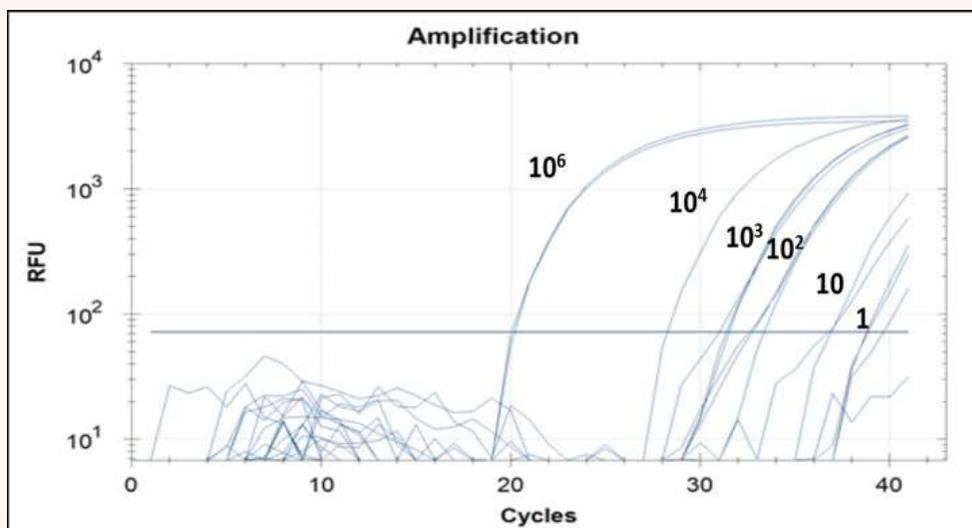
Reazioni PCR in grado di:

- Identificare la presenza del MYXV anche a basso titolo (latenza)
- Discriminare tra campioni naturalmente infettati (da ceppi di campo) da quelli vaccinati
- Differenziare i ceppi vaccinali Borghi e SG33

Diagnosi molecolare – M071L



PCR END
POINT



PCR Real Time

Diagnostica specialistica

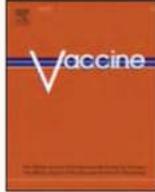
PRC2008003 Vaccine 28 (2010) S414–S420

Contents lists available at ScienceDirect



Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine



Molecular characterization of SG33 and Borghi vaccines used against myxomatosis

Patrizia Cavadinia^{a,*}, Giuliana Bottia, Ilaria Barbieria, Antonio Lavazza^b, Lorenzo Capuccia

^aReparto di Genomica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia 25124, Italy ^bLaboratorio di Microscopia Elettronica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia 25124, Italy

Caratterizzazione molecolare dei ceppi vaccinali Borghi e SG33

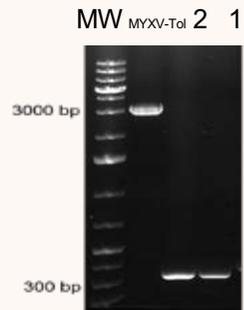
- Ha portato allo sviluppo di nuovi saggi molecolari diagnostici

Identificazione di marcatori molecolari polimorfici per la tipizzazione dei ceppi circolanti sul suolo italiano

- Non sono state ancora trovate delle correlazioni nette tra genotipo e fenotipo
- Attenuazione e virulenza possono essere causati da mutazioni fini, ma anche coinvolgere effetti epistatici multipli
- Esistenza di percorsi evolutivi multipli che conducono allo stesso fenotipo

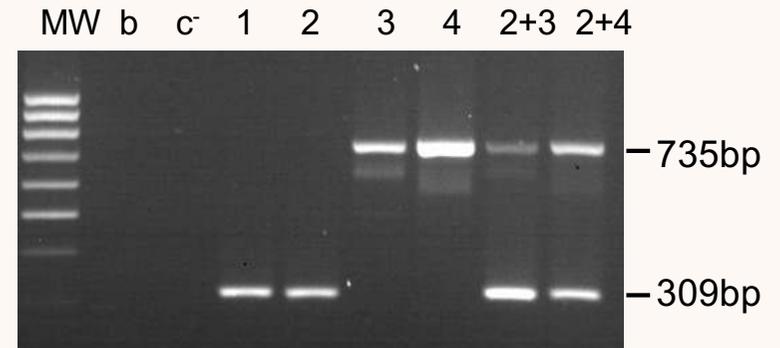
PCR differenziale

MYXV-Tol ins

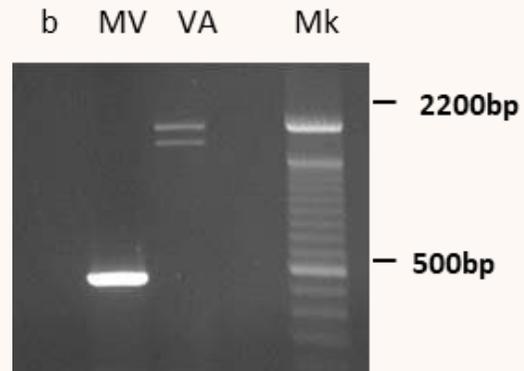


- 1 Ceppo di campo
- 2 Moses
- 3 Borghi
- 4 SG33

M140F/M140R and VAXF/144R

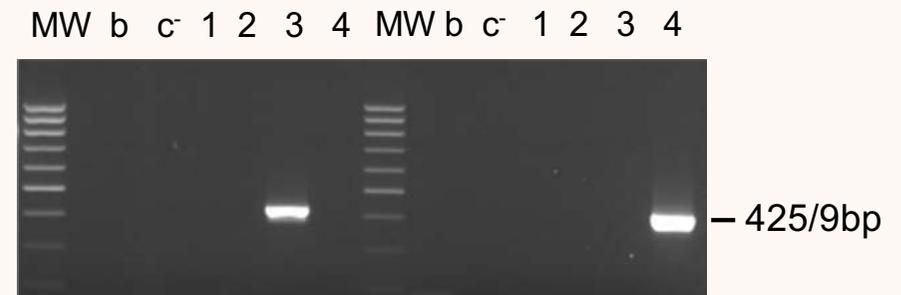


Field MYXV vs Nobivac Myxo-RHD Plus



VAXF/BorghiR

VAXF/SG33R



Caratterizzazione molecolare MYXV NGS

Sequenziamento dell'intero genoma di ceppi circolanti in Italia
rappresentativi delle varie regioni, collezionati in arco temporale esteso

MiniSeq Illumina



seq complete

MinION Nanopore



In corso

Diagnosi sierologica

ELISA competitiva

- MAb 1E5 – 1E5 HRP oppure Siero immune anti MV – 1E5 HRP
- Antigene: tessuto cultura concentrato

IgG ELISA

- Adsorbito 1E5 o siero coniglio immune
- Antigene ELISA (T.C.)
- Sieri in diluizione
- MAb ANTI IgG CONIGLIO HRP

	Pre sieri		28 gg post vaccino		12 gg post challenge	
	cELISA	IgG ELISA	cELISA	IgG ELISA	cELISA	IgG ELISA
A1	D	N	1/40	1/640	1/10240	>1/10240
A2	D	N	D	N	D	1/160
A3	N	N	1/10	1/160	1/640	1/10240
A4	N	N	1/10	1/160	1/20	1/320
A5	N	N	1/80	1/640	1/20480	>1/10240
B1	D	N	N	N	1/160	1/640
B2	N	N	1/40	1/640	1/40	1/1280
B3	N	D	<1/10	D	1/20	1/160
B4	N	N	N	N	1/1280	>1/10240
B5	N	N	N	N	1/1280	>1/10240
C1	< 1/10	N	N	D	D	N
C2	N	N	N	N	1/2560	>1/10240
C3	N	N	N	N	1/20	1/160
C4	N	N	N	D	1/1280	>1/10240
C5	N	N	N	D	1/640	>1/10240



ANIMALI VACCINATI 1/10 - 1/640

ANIMALI CONVALESCENTI 1/640 - 1/10240

Utilità della sierologia

- Verifica dello stato sanitario (allevamenti indenni, no vaccinazione)
- Verifica dell'efficacia di vaccinazione (allevamenti a rischio, vaccinazione)
- Diagnosi indiretta di infezione in base al titolo (allevamenti infetti)
- Gestione di un focolaio (allevamenti infetti, vaccinazione con sentinelle)

ALTRE VIROSI DEL CONIGLIO

Conigli & Virus

Esistono altri virus nel coniglio oltre a Myxo e MEV?

SI

Quali sono ?

**rotavirus, parvovirus, coronavirus, herpesvirus,
adenovirus, calicivirus, enterovirus-like, astrovirus, hepevirus**

Causano problemi ?

**con alcune eccezioni (coronavirus sistemico e herpesvirus)
non sono agenti primari di malattia**

Conigli & Virus

Table 1
Viral infections of rabbits

	Disease Caused
• Viruses of Major Clinical Significance	
Rabbit hemorrhagic disease virus	Rabbit hemorrhagic disease
Myxoma virus	Myxomatosis
• Viruses of Minor Clinical Significance	
Rabbit fibroma virus (Shope fibroma virus)	Rabbit fibromatosis
Lapine rotavirus	Rotaviral infection (Rotaviral diarrhea)
Cottontail rabbit papillomavirus (Shope papillomavirus)	Rabbit papillomatosis
Rabbit oral papillomavirus	Oral papillomatosis
Herpesvirus: Herpes simplex	Herpes encephalitis
Herpesvirus: Leporid-4	Systemic herpesvirus infection
• Viruses of Laboratory Significance	
Astrovirus	Enteric disease (?)
Bornavirus	Borna disease
Rabies virus	Rabies
Vaccinia virus	Rabbitpox (Rabbit plague)
Pleural effusion disease virus (infectious cardiomyopathy virus)	Pleural effusion disease and cardiomyopathy
Rabbit enteric coronavirus	Coronaviral enteritis

Peter J. Kerr (2013) Viral Infections of Rabbits. Vet Clin Exot Anim 16 437-468

Enteriti virali del coniglio

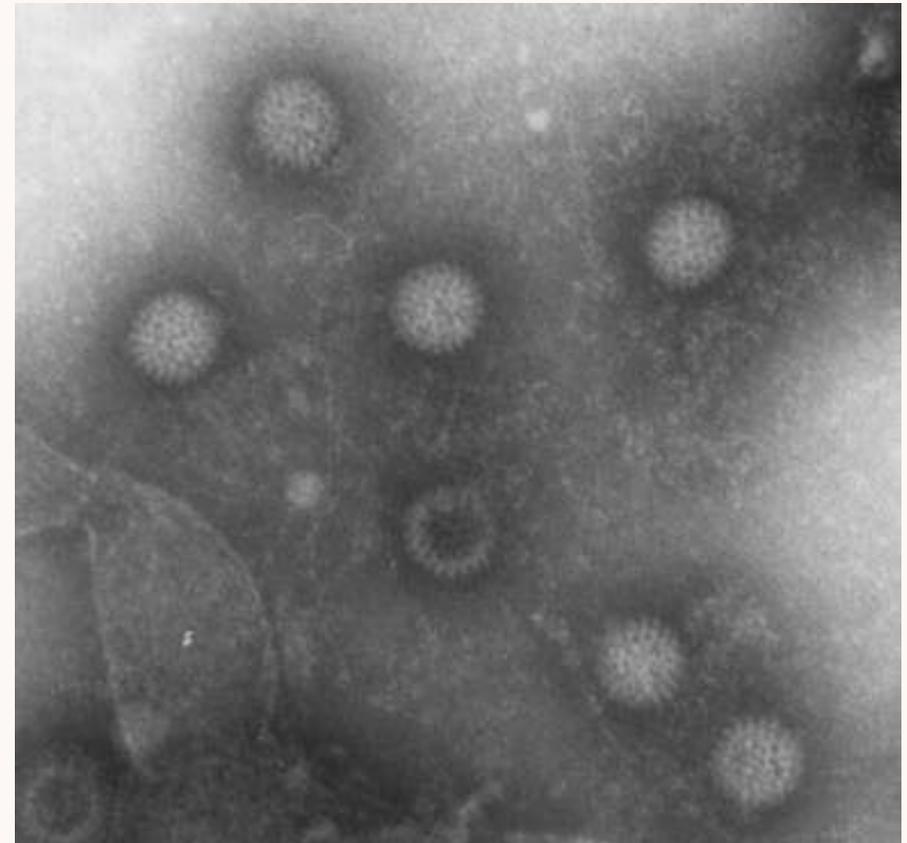
Quale è il ruolo dei virus nelle enteriti del coniglio?

Alcuni virus vengono elencati tra le possibili concause della complessa sindrome gastroenterica del coniglio svezzato e della Enterocolite epizootica del coniglio (ERE)

Le enteriti virali favoriscono la comparsa o possono essere associate a enteriti batteriche (es. *E. coli* e *Clostridium* sp.) e parassitarie (*Eimeria* sp.)

Rotavirus

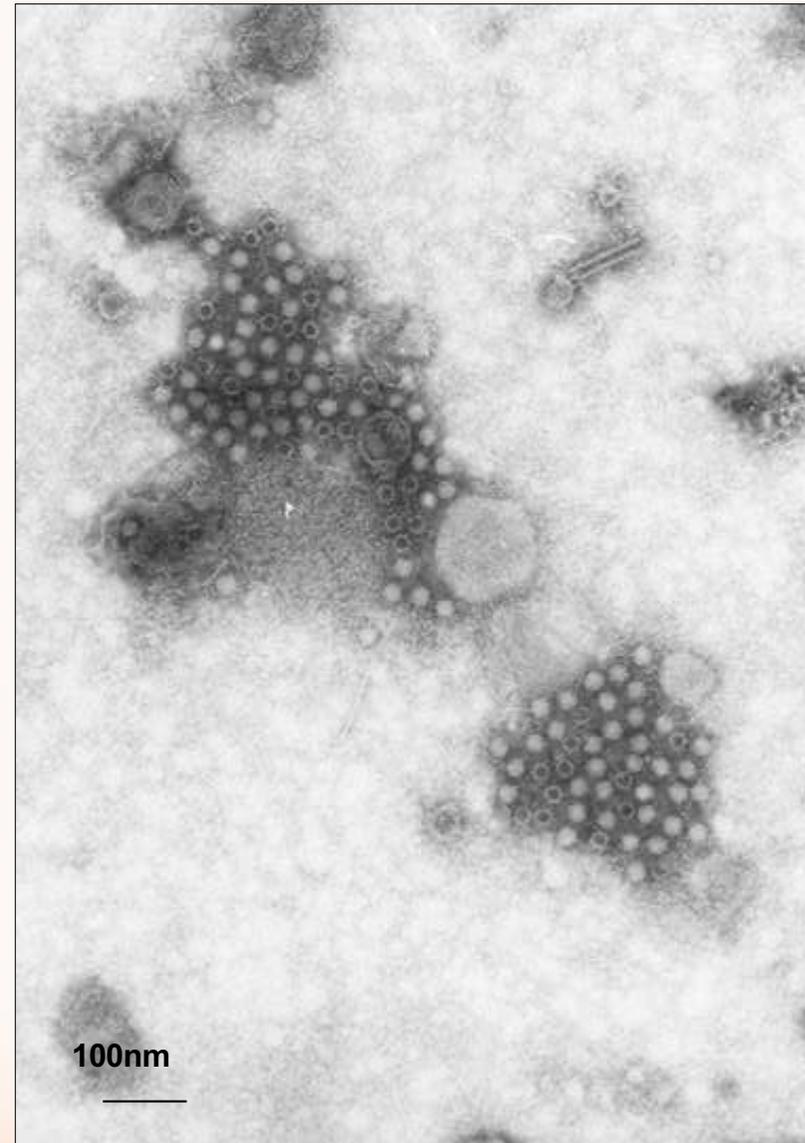
- Più frequentemente isolato da conigli all'ingrasso di 35-50 gg
- Animali diarroici, nessuna lesione tipica
- Breve escrezione (3-4 gg)
- Soprattutto nel piccolo intestino
- Effetto dose/dipendente
- Associati con *E.coli*, clostridia, protozoa
- **Più importante agente virale, causa di enterite**



Parvovirus

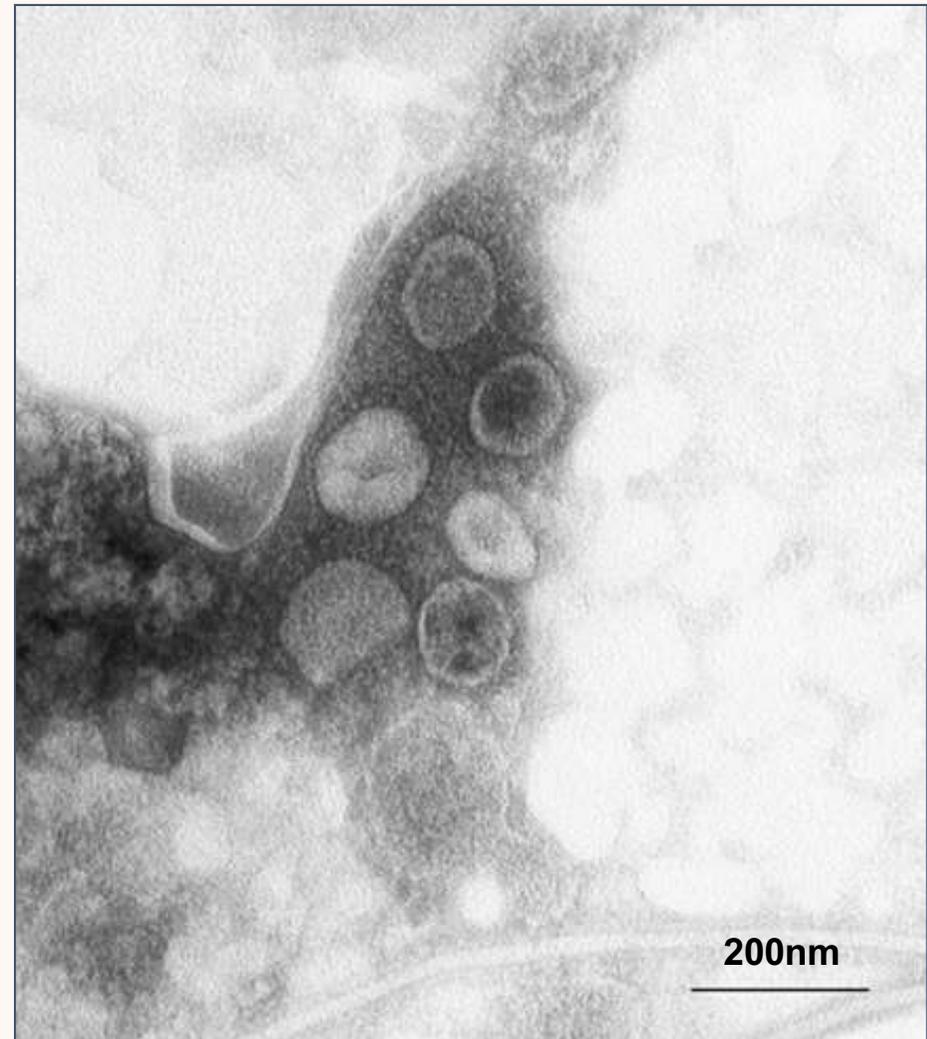
- Considerato non patogeno e comune
- Isolato anche da conigli con enterocolite (in Spagna)
- Associato con *E.coli*, clostridi e protozoa
- Frequentemente associato ad altri virus (infezioni multiple)
- **Aumentata incidenza negli ultimi anni**

*Possibile ≠ antigenicità (?) =
differente virulenza (?)*



Coronavirus

- Non ancora classificato definitivamente: membro non assegnato del genere Coronavirus (BetaCoV?)
- Descritto come agente causale di malattia sistemica ed enterica
- Ruolo patogeno non definito
- Frequentemente associato con altri virus
- **Ampiamente diffuso. Elevata sieroprevalenza (100% aziende, 3-40% animali)**



Dimostrata a seguito di infezione sperimentale la suscettibilità del coniglio al SARS-CoV-2, in forma asintomatica con eliminazione di virus infettante dal naso e con saliva. Rilevate infezioni naturali con bassa sieroprevalenza.

Altri virus enterici del coniglio

ADENOVIRUS

- Molto raro, poche segnalazioni
- Diarrea post-svezzamento

ENTEROVIRUS-LIKE

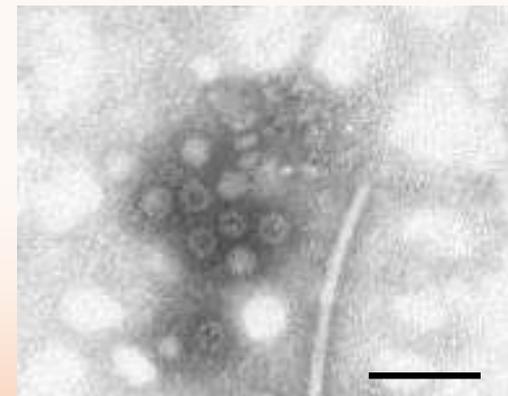
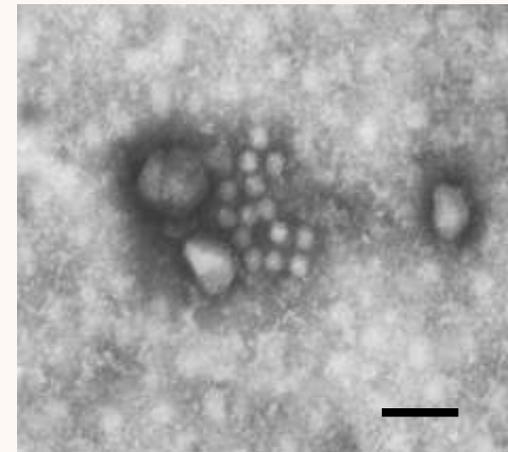
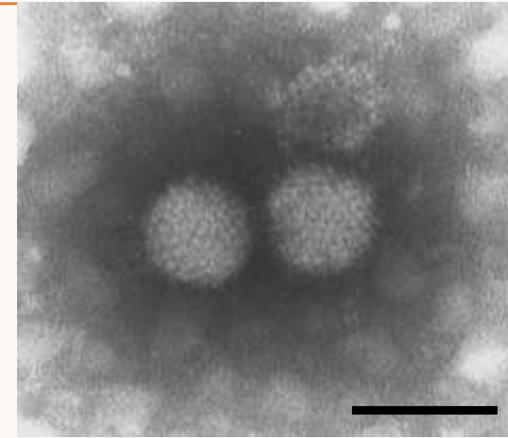
- Segnalati di recente, raramente descritti e poco caratterizzati
- Ruolo patogeno non definito

CALICIVIRUS (VESIVIRUS)

- Isolati da conigli con diarrea (Martin Alonso et al., 2005)
- Correlato al virus dell'esantema vescicolare ed al calicivirus del cane e del gatto

ASTROVIRUS

- Identificato di recente (Martella et al., 2011)
- Ruolo patogeno non definito
- Frequenza > in animali con enterite



Altri virus sistemici del coniglio

PAPILLOMAVIRUS

Due tipi di papillomi infettivi, rari, a risoluzione spontanea

1. papilloma orale: piccoli noduli sulla superficie della lingua o del pavimento della bocca.
2. papillomavirus della minilepre (Shope): verruche cornee su collo, spalle, orecchie o addome.

HERPESVIRUS

1. Herpes Simplex: **4 casi naturali di forme encefaliche da uomo a coniglio**
2. Herpesvirus Leporid-4 (simile a BHV2) infezione sistemica, altamente letale
3. Herpesvirus leporid 1, 3 (LHV-1, e LHV-3) presenti in *S. floridanus*
4. Herpesvirus leporidi 2 (LHV-2) provoca infezioni asintomatiche di conigli domestici.

HEPEVIRUS

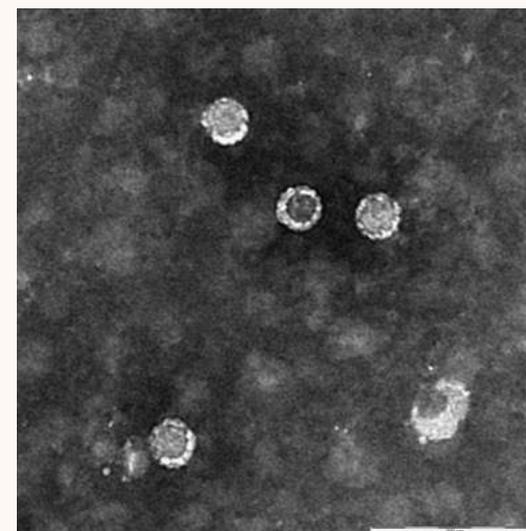
- Possibile reservoir di HEV anche per l'uomo (zoonosi)
- Localizzazione in fegato e bile
- Prevalenze variabili

BORNAVIRIDAE

- Malattia neurologica di ovini e equidi
- Descritti casi naturali anche nei conigli in tutto il mondo

RHABDOVIRIDAE

- Infezione relativamente rara sia nei conigli pet che selvatici
- Entrambe le forme di rabbia furiosa e paralitica sono state segnalate; tuttavia, la seconda sembra più comune



Grazie per l'attenzione.....



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

Headquarter Brescia
Via Bianchi, 9 - 25124 Brescia - Italy
T. +39 030 2290.1 - F. +39 030 2425251
info@izsler.it - www.izsler.it

alavazza0@gmai.com