



IN QUESTI MESI

I principali avvenimenti di interesse epidemiologico in questi ultimi mesi in Italia ed in Unione Europea

RHDV2: un nuovo virus della malattia emorragica virale del coniglio

Origine e diffusione della MEV

La malattia emorragica virale (MEV) del coniglio è una delle due malattie dei lagomorfi notificabili all'OIE [1]. È una **patologia contagiosa e letale** dei coniglio descritta per la prima volta nel 1984 in Cina [2] ed in seguito comparsa nell'Est asiatico (1985-86), Italia (fine 1986), Europa continentale (1987-90), America Centrale (Messico 1988, Cuba 1994), Africa settentrionale e Isole dell'Oceano Indiano (1988-89), Medio-Oriente (1990), Gran Bretagna (1992), Oceania (1995), Stati Uniti e Sud America (2004-2005) e Canada (2011). Attualmente, risulta segnalata in più di 40 Paesi ed è endemica in Europa ed in tutto il bacino del Mediterraneo, in pratica dove vi è presenza dell'ospite selvatico naturale, il coniglio europeo (*Oryctolagus cuniculus*).

Eziologia

L'agente eziologico della MEV (RHDV dall'inglese *Rabbit Haemorrhagic Disease Virus*) è classificato come genere *lagovirus* nella famiglia *Caliciviridae* [3,4]. RHDV è virus a un RNA a singola catena provvisto di una consistente variabilità genetica e antigenica, grazie anche alla sua elevata diffusibilità e resistenza ambientale. Nonostante questo, fino al 1996 tutti i ceppi virali isolati sono risultati antigenicamente e geneticamente molto simili tra loro. Da allora, sono stati isolati dei ceppi "varianti" che, conservando la stessa patogenicità, presentavano delle caratteristiche emoagglutinanti (ceppi HA-) e antigeniche differenti (RHDVa), una buona correlazione sierologica con i ceppi classici e una discreta protezione indotta dalla vaccinazione. I ceppi RHDV sono così stati distribuiti su base filogenetica in 5 genogruppi con un andamento spaziale e temporale [5,6,7].

Caratteristiche di RHDV2

La convinzione dell'esistenza di un solo sierotipo virulento di RHDV è stata messa in discussione dall'identificazione in Francia nell'estate 2010, dapprima in conigli selvatici e in seguito anche in allevamenti industriali, di un ceppo avente caratteristiche significativamente differenti dai ceppi patogeni conosciuti [8]. In effetti, RHDVFra10 è un "nuovo" virus, originatosi verosimilmente in modo indipendente dall'RHDV "classico", dotato di **caratteristiche cliniche peculiari** rispetto alla MEV "classica", quali capacità di indurre malattia in soggetti all'ingrasso e in conigli lattanti di 15-20gg, oltre che in riproduttori adulti, anche sottoposti a profilassi vaccinale, tassi di mortalità più bassi ma variabili (5-60%), sia tra i selvatici che in aziende industriali e tempi di incubazione e decorso della malattia prolungati. Le analisi di laboratorio

hanno confermato la consistente differenza del nuovo virus, il cui nome proposto è “**RHDV2**”, da quelli circolanti fino al 2010. Differenza che è sia genetica, l'identità aminoacidica è circa 89,2% verso RHDV-RHDVa, e 76,7% verso EBHSV, che antigenica sulla base del profilo di reazione con un pannello di anticorpi monoclonali [9]. La differenza del corredo antigenico giustifica la protezione solo parziale e per tempi ridotti, indotta dalla vaccinazione effettuata con ceppi classici. Per questo RHDV2 può essere classificato ancora come sottotipo dell'RHDV ma vicino al limite del sierotipo (totale assenza di protezione). Un altro distintivo carattere fenotipico di RHDV2 riguarda lo spettro d'ospite: infatti, mentre il coniglio europeo è la sola specie sensibile alla MEV indotta da RHDV e nessun altro lagomorfo americano ed europeo del genere *Romerolagus*, *Lepus* e *Sylvilagus* si è dimostrato sperimentalmente recettivo, viceversa la osservazione in Sardegna nel 2011 di quadri di epatite acuta letale causati da uno stipe RHDV2, sia in conigli selvatici e allevati che in lepri sarde (*Lepus capensis subs mediterraneus*), ha permesso di accertare per la prima volta l'esistenza di un lagovirus in grado di causare una malattia del tutto sovrapponibile alla MEV sia in conigli che lepri [10]. Il ceppo RHDV2, oltre che in Francia e in Italia è stato a oggi identificato Spagna, Malta e Portogallo.

Comparsa e diffusione di RHDV2 in Italia

Il primo focolaio risale al giugno 2011 in un allevamento industriale in provincia di **Udine**, seguito a distanza di circa un mese da un caso secondario in un allevamento dello stesso proprietario a circa 10 km di distanza. Il virus isolato (RHDVUd2011) era assimilabile ma non identico al 100% ai ceppi RHDV2 isolati in Francia [9]. La mortalità registrata (circa 20% tra i riproduttori e 10% nell'ingrasso) non ha raggiunto né i valori tipici e peculiari dell'infezione da RHD “classica” (80-90%), né quelli riportati dai francesi per RHDV2 (fino al 60%). Ciò è probabilmente dipeso, oltre che all'intrinseca minor virulenza di tale virus, anche alla tempestiva **vaccinazione d'emergenza** su tutto l'effettivo (ingrasso compreso) e all'applicazione di rigide **misure igienico-sanitarie**. In tal modo, non solo si è potuto nell'allevamento del focolaio primario recuperare rapidamente (2-3 settimane) una situazione sanitaria “corretta” con tassi di mortalità entro la norma, ma anche presso il secondo allevamento epidemiologicamente correlato, l'applicazione delle medesime misure di profilassi diretta e indiretta, pur in assenza di quadri clinici evidenti di MEV, ha consentito di limitare totalmente le perdite (nessuno scostamento della mortalità) tanto che l'identificazione virale è stata fatta su un solo campione prelevato durante l'indagine epidemiologica.

In seguito della prima comparsa di RHDV2, il Ministero della Salute ha emanato una **Nota (prot. 14289 del 6/8/2011)**, riportante le indicazioni per fronteggiare la diffusione dell'infezione. Tra queste, la tempestiva segnalazione di eventuali casi sospetti di MEV e il conferimento agli IZZSS di campioni di carcasse o visceri per esami diagnostici e di tipizzazione antigenica e genica. Nel contempo, il CdR per le malattie virali dei lagomorfi si è immediatamente attivato per adeguare i metodi di laboratorio atti a ottenere una diagnosi differenziale sicura, sia in fase di accertamento del focolaio (ELISA virologica basata su anticorpi monoclonali specifici prodotti con il virus RHDV2 e protocolli di PCR differenziali) che per il monitoraggio in corso e nel post focolaio per facilitarne la risoluzione e chiusura (sistemi ELISA, in grado di differenziare gli anticorpi totali e appartenenti alle singole sottoclassi, indotti da ceppo RHDV classico rispetto a quelli indotti da RHDV2).

Uno degli effetti concreti dell'aumentata sorveglianza sul territorio da parte dei referenti istituzionali è stato, all'inizio del 2012, l'invio da parte dell'IZS della Sardegna in unico conferimento, di campioni di visceri di lagomorfi, accettati ed esaminati nel corso del 2011, tutti già risultati positivi al kit ELISA RHDV/EBHSV fornito dall'IZSLER. Come sopra anticipato, la successiva caratterizzazione antigenica e genomica degli stipi virali ha permesso di identificare RHDV2 sia in conigli selvatici e allevati sia in lepri sarde [10]. Qualche mese dopo (gennaio 2012) si è registrato, a **Trento**, in un piccolo allevamento rurale il terzo isolamento di RHDV2. La peculiarità di questo episodio, caratterizzato da una **mortalità elevata** (circa 60%), era il concomitante riscontro di un'evidente mortalità causata dal medesimo virus, nella popolazione di **conigli selvatici** presente nelle immediate vicinanze dei due recinti esterni nei quali erano ricoverati i **conigli rurali**. Data l'ovvia importanza dei dati epidemiologici, soprattutto in considerazione del naturale coinvolgimento di animali selvatici a vita libera, possibile preludio di un'ulteriore più ampia diffusione dell'infezione, il Ministero

della Salute ha provveduto come già in occasione del primo focolaio, a segnalare il caso all'OIE.

Prima di osservare nuovi casi di RHDV2 si è dovuto attendere il novembre 2012, quando, nel volgere di pochi giorni, il virus è stato identificato in due allevamenti in Regione **Lombardia**, uno industriale in provincia di Monza-Brianza (mortalità 4,5%) e l'altro rurale nell'Alto Lario in provincia di Como (mortalità 80%). Da quel momento in poi le positività per RHDV2 sono andate aumentando a dimostrazione di una **progressiva diffusione**, forse non ancora ai livelli di Francia e Spagna dove i casi attribuibili al nuovo ceppo rappresenterebbero pressoché il 100% dei casi di RHDV segnalati. Tuttavia il numero di casi era tale da suscitare attenzione e consigliare, soprattutto nella filiera industriale, l'adozione delle principali misure di prevenzione che sono sostanzialmente riassumibili in due concetti: vaccinazione e biosicurezza. In tabella 1 è riportato il numero di casi sospetti di MEV/RHD segnalati e conferiti al CdR per la diagnosi di prima istanza o di conferma, con indicazione delle positività riscontrate suddivise per origine e tipologia di animali. Dei 5 focolai da RHDV2 diagnosticati nel periodo 01/12/2012-31/3/2013, 2 si sono verificati in allevamenti familiari rispettivamente in provincia di **Cremona** e a **Padova** città, 2 in conigli selvatici, entrambi in **Sicilia** (province di Agrigento e Siracusa) ed uno in un allevamento industriale in provincia di **Cuneo** (mortalità tra 25-35%). Da notare che durante il medesimo periodo si sono continuati ad osservare casi di MEV indotti da ceppi "classici" ed in particolare 3 da RHDV e ben 21 da RHDVa. A questi casi, fino ad arrivare a settembre di quest'anno, ne vanno aggiunti altri 6 episodi notificati attribuibili a RHDV2: tre registrati ai ad aprile, rispettivamente in un allevamento intensivo in **Puglia**, in due allevamenti rurali in Campania e in provincia di **Varese**, uno a maggio in un allevamento industriale in provincia di **Cuneo**, uno a luglio in un piccolo allevamento rurale in provincia di **Pistoia** ed infine uno a settembre in un allevamento industriale in provincia di **Padova**.

Tabella 1. Casi sospetti di MEV esaminati presso l'IZSLER dall'1/12/2012 al 30/9/2013

Periodo	N° casi	Origine	RHD pos.	RHDV (classico)	RHDVa (variante)	RHDV2 (Fra2010)
01/01/2012 15/06/2012	28*	26F, 1I, 1S	14 50.0%	2 2 F	12 10F, 1I, 1S	0*
16/06/2012 30/11/2012	24^	16F, 5I, 3S	7 29.2%	0	5 4F, 1S	2 1F, 1I
01/12/2012 31/03/2013	21	9F, 10I, 2S	10 47.6%	1 1I	4 3F, 1I	5 2F, 1I, 2S
01/04/2013 30/09/2013	31	28F, 3I	10 32.2%	1 1F	3 3F	6 3F, 3I
Totale	104	79F, 19I, 6S	41 39.4%	4 3F, 1I	24 20F, 2I, 2S	13 6F, 5I, 2S

*non sono inclusi i primi casi di RHDV2 della Provincia di Trento e della Sardegna, ma ^sono inclusi i due casi in Lombardia sopra ricordati. S= selvatico; I = allevamento industriale, F = allevamento familiare/rurale

Misure di controllo in caso di focolai di MEV

A seguito di notifica di focolaio di MEV (Art 1 RPV), indipendentemente dal tipo di virus causale e tenuto conto del fatto che il RPV non prevede attualmente norme di intervento specifiche, sono state date **indicazioni differenziate** da attuarsi rispettivamente nei **piccoli allevamenti rurali/familiari**, vale a dire eliminazione di tutti i soggetti ancora presenti e la successiva pulizia e disinfezione degli ambienti, e nelle **aziende industriali**. In quest'ultimi casi, è fondamentale intervenire tempestivamente con la **vaccinazione**. Questa dovrebbe essere eseguita, almeno in emergenza, con ceppi omologhi rispetto al virus identificato come causa di focolaio. Ciò al fine di evitare che la protezione parziale, indotta dai vaccini eterologhi a base RHDV, verso l'RHDV2 "spinga" quest'ultimo verso la definitiva modifica antigenica a sierotipo, per il quale il vaccino RHDV sarebbe totalmente inefficace. Nei casi di focolaio da RHDV2 sarebbe quindi auspicabile poter intervenire con vaccini specifici e, in attesa della disponibilità di presidi immunizzanti registrati a base di RHDV2, questo può già ora essere effettuato con autovaccini (stabulogeni) nel rispetto della normativa vigente (D.Min. n. 287 del 17/3/1994). In aggiunta all'indicazione di

vaccinare immediatamente tutti i soggetti presenti (riproduttori, rimonte e degli animali all'ingrasso) sono state indicate le **seguenti norme di conduzione igienico sanitaria**:

- I) censimento degli animali presenti e registrazione quotidiana dei dati della mortalità al fine di rendere tracciabile l'evoluzione dello stato sanitario;
- II) rimozione controllata delle carcasse con stoccaggio in celle frigorifere ed eventuale smaltimento con automezzi autorizzati a tenuta;
- III) movimentazione in uscita dei conigli da ingrasso unicamente con invio "in vincolo" al macello, preavviso al Veterinario ufficiale competente per l'impianto di macellazione, trasporto esclusivo del gruppo su automezzi lavati e disinfettati prima del carico ed effettuazione della macellazione "a fine ciclo";
- IV) introduzione di animali da rimonta solo se certificati aver ricevuto almeno due vaccinazioni;
- V) pulizia e disinfezione degli ambienti, delle strutture delle attrezzature;
- VI) divieto d'uscita di mangimi, utensili, oggetti od altri materiali sospetti di contaminazione;
- VII) permesso di entrata e uscita dall'azienda di automezzi solo previa disinfezione delle ruote e della parte sottostante il veicolo e registrazione in apposito registro dell'entrata e uscita dall'azienda di automezzi e di persone;
- VII) accertamenti virologici per MEV/RHD, fino alla chiusura del focolaio, a campione su soggetti deceduti (soprattutto riproduttori) con lesioni sospette o comunque non chiaramente riferibili a patologie note;
- IX) stoccaggio delle deiezioni per un tempo di almeno 45 mesi prima dell'utilizzo per la concimazione. In alternativa, smaltimento immediato delle deiezioni attraverso ditte specializzate e trasporto in condizioni di sicurezza, con destinazione anche bioenergetica;
- X) utilizzo delle pelli di conigli appartenenti a partite inviate in vincolo al macello o comunque per partite di animali provenienti da zone sottoposte a provvedimenti sanitari, solo dopo trattamento di essiccazione (o congelamento) e inattivazione con formaldeide secondo quanto previsto dal **Code dell'OIE**.

Inoltre, in ambito territoriale qualora vi siano allevamenti che hanno una correlazione con il focolaio di tipo funzionale (filiera organizzata) o geografico/territoriale (aree ad elevata densità di allevamenti), è opportuno applicare **misure di controllo e prevenzione** similari. In particolare:

- I) un rafforzamento di tutte le misure di biosicurezza e delle normali prassi d'igiene e disinfezione già in atto;
- II) la registrazione quotidiana della mortalità per ciascuna categoria produttiva, al fine di rendere tracciabile l'evoluzione dello stato sanitario;
- III) l'esecuzione di accertamenti virologici per MEV/RHD su soggetti deceduti (soprattutto riproduttori) con lesioni sospette o comunque non chiaramente riferibili a patologie note;
- IV) l'applicazione dello stesso protocollo vaccinale del parco riproduttori e delle rimonte previsto per gli allevamenti sede di focolaio;
- V) l'istituzione di gruppi di animali "sentinella" non vaccinati nell'eventualità che si opti per la vaccinazione anche degli animali all'ingrasso, per verificare, attraverso l'analisi sierologica, la presenza di specifici anticorpi e l'eventuale circolazione virale;
- VI) l'introduzione in allevamento degli animali ai fini di rimonta solo se animali lattanti di età inferiore a 7gg o animali di qualsiasi età vaccinati almeno due volte.

Infine, la suscettibilità alla malattia di **lagomorfi selvatici**, non solo il coniglio selvatico ma anche come visto di almeno una specie di lepri, impone un **rafforzamento della sorveglianza passiva sul territorio**. A tal fine dovrebbe essere posta particolare attenzione a segnalare eventuali episodi di **mortalità** in tutti i lagomorfi selvatici, lepri incluse, favorendone il recupero ed il conferimento ai servizi veterinari e agli IZZSS localmente competenti, per l'esame delle carcasse e la determinazione delle cause di morte.

Conclusioni

Detto dei casi segnalati e riportati di RHDV2, non si può escludere che un certo numero di focolai di MEV verificatisi soprattutto nella filiera industriale, dalla primavera 2013 cioè da quando RHDV2 ha iniziato a diffondersi in modo consistente, non siano stati correttamente diagnosticati e notificati. Vi è ancora, Infatti, la tendenza ingiustificata a non segnalare i casi sospetti, ritenendo che la notifica, obbligatoria e prevista dal RPV, comporti conseguenze sanitarie e economiche “troppo” negative per l'allevatore. Viceversa l'esperienza di questi mesi, laddove si è potuto operare una corretta gestione dei focolai attuando le misure raccomandate, di concerto con gli allevatori, con il supporto veterinari aziendali e sotto l'egida delle Autorità competenti per territorio, ha dimostrato che è possibile attuare un adeguato e opportuno intervento per il risanamento degli allevamenti e ottenere una chiusura dei focolai in tempi ragionevoli, nel pieno rispetto delle produzioni. L'invito quindi è quello di non avere timori e di provvedere in modo appropriato e senza esitazioni a **segnalare eventuali casi sospetti** nella certezza che solo attraverso interventi tempestivi e mirati sarà possibile limitare l'ulteriore diffusione della malattia sul territorio nazionale.



Figura 1. Diffusione della MEV sostenuta da RHDV2 in Italia dal 2011 al 2013

Bibliografia

1. OIE's Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008) "Rabbit Haemorrhagic Disease" (chapter 2.6.2) Version adopted in May 2010.
2. Liu SJ, Xue XP, Pu BQ, Quian NH (1984). A new viral disease in rabbits. *Anim Husband Vet Med*, 16:253–255 (in Chinese).
3. Ohlinger VF, Haas B, Meyers G, Weiland F, Thiel HJ (1990). Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virol* 64:3331–3336.
4. Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ (1991). Rabbit hemorrhagic disease virus molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology*, 184:664–676
5. Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Laurent S, de Boisseson C, Portejoie Y, Rasschaert D (2003) Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterisation of RHDV antigenic variants. *Arch Virol*, 148:65–81.
6. Matiz K, Ursu K, Kecskeméti S, Bajmócy E, Kiss I (2006). Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) strains isolated between 1988 and 2003 in eastern Hungary. *Arch Virol*, 151:1659–1666.
7. Kerr PJ, Kitchen A, Holmes EC (2009). Origin and phylodynamics of rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol*, 83:12129–12138.
8. Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Boucher S, Le Normand B, Plassiart G, Portejoie Y, Decors A, Bertagnoli S, Guérin J-L, Marchandeau S (2011). Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet Rec* 168:137–138.
9. Le Gall-Reculé G, Lavazza A, Marchandeau S, Bertagnoli S, Zwingelstein F, Cavadini P, Martinelli N, Lombardi G, Guérin J-L, Lemaitre E, Decors A, Boucher S, Le Normand B, Capucci L. (2013). Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet Res*, 44:81.
10. Puggioni G, Cavadini P, Maestrone C, Scivoli R, Botti G, Ligios C, Le Gall-Reculé G, Lavazza A, Capucci L (2013). The new French 2010 rabbit hemorrhagic disease virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Vet Res*, 44:96.

--

A cura di:

Antonio Lavazza, Patrizia Cavadini, Lorenzo Capucci

Centro di Referenza Nazionale per le Malattie Virali dei Lagomorfi

Laboratorio di Riferimento OIE per la Malattia Emorragica Virale del Coniglio

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini"