



# CRemaViLa - News -

N° 4 - 18/04/2013



Centro di Referenza Nazionale per le Malattie Virali dei Lagomorfi  
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA  
"BRUNO UBERTINI" - Via Bianchi, 9 25124 BRESCIA (Italy)

## Sommario

1. Positività per MEV/RHDV da inizio anno e aggiornamento sulla presenza del ceppo RHDV2
2. Positività per EBHS in Italia: segnalazione focolai
3. Progetti di Ricerca attivi presso il CdR
4. Myxomatosi: contributi del CdR presentati al Convegno ASIC
5. Aggiornamenti bibliografici

### 1. POSITIVITÀ PER MEV/RHDV E AGGIORNAMENTO SULLA PRESENZA DEL CEPPLO RHDV2

Nell'ultima newsletter si segnalava come, nel nostro Paese, dopo i primi tre focolai attribuibili al ceppo RHDV2, registrati rispettivamente a giugno-luglio 2011 in provincia di Udine (due allevamenti industriali collegati), tra ottobre 2011 e gennaio 2012 in Sardegna (conigli selvatici e domestici, lepri sarde) e febbraio 2012 in provincia di Trento (allevamento rurale e conigli selvatici), si era dovuto attendere nove mesi prima di registrare nuovamente e nel volgere di pochi giorni due focolai di malattia (ad oggi entrambi "chiusi") attribuibili a tale ceppo, in due allevamenti in Regione Lombardia, uno industriale in provincia di Monza Brianza e l'altro rurale in provincia di Como.

Da quel momento in poi le positività per RHDV2 sono andate aumentando, a dimostrare un trend in espansione di tale virus, forse non ancora ai livelli di Francia (dove i casi attribuibili al nuovo ceppo rappresentano pressoché il 100% dei casi di RHDV segnalati) e Spagna (non si hanno dati certi ma il numero di casi sembrerebbe comunque elevato), ma certo tale da suscitare attenzione e consigliare l'adozione delle principali misure di prevenzione già ricordate per esteso nella newsletter n° 3, che possiamo riassumere in due parole: **vaccinazione e biosicurezza**.

Nella seguente tabella si riporta 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 (S= selvatico; I = allevamento industriale, F = allevamento familiare/rurale).

Periodo	Casi esaminati	Origine	Casi RHD positivi	Casi RHDV1 (classico)	Casi RHDVa (variante)	RHDV2 (Fra2010)
01/01/2012 15/06/2012	28*	26F, 1I, 1S	14 50,0%	2 2F	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
<b>Totale</b>	<b>73</b>	<b>51F, 16I, 6S</b>	<b>31 42,5%</b>	<b>3 2F, 1I</b>	<b>21 17F, 2I, 2S</b>	<b>7 3F, 2I, 2S</b>

\*Non sono inclusi i primi casi di RHDV2 ricordati all'inizio (Provincia di Trento e Sardegna)

^Sono inclusi anche i due casi lombardi sopra menzionati

### Casi di RHD in allevamenti industriali :

- Veneto (VI - RHDVa - mag12)
- Lombardia (MI - RHDV2 - nov12)
- Lombardia (BS - RHDV - feb13)
- Piemonte (CN - RHDVa - gen13)
- Piemonte (CN - RHDV2 - mar13)

### Casi di RHD in conigli selvatici

- Sicilia (CT - RHDV1 - gen12)
- Lombardia (BS -RHDVa - ago12)
- Sicilia (AG - RHDV2 - nov12)
- Sicilia (SR - RHDV2 - gen13)

### Dettaglio dei 5 focolai da ceppo RHDV2 (Fra2010) diagnosticati nel periodo 01/12/2012-31/3/2013:

1. Inviato da prof. Grilli (UNIMI) ad inizio dicembre 2012. Allevamento familiare in provincia di Milano Circa 50 soggetti. Aumento improvviso della mortalità in soggetti vaccinati da circa 1 mese
2. Inviato da Dr.ssa Guercio (IZSPalermo) - Coniglio selvatico trovato morto in Provincia di Agrigento
3. Inviato da Dr. Bano IZSTreviso - Piccolo allevamento familiare sito a Padova città
4. Inviato da Prof. Camarda (UNIBA) - Coniglio selvatico trovato morto (insieme a molti altri) in provincia di Siracusa
5. Allevamento industriale in provincia di Cuneo. Comparsa di malattia in adulti e piccoli a partire da 25-30gg. Mortalità tra 25-35% (dati ancora provvisori).

A questi casi descritti e riportati in tabella ne vanno aggiunti altri due recentissimi (primi di aprile), sempre causati da ceppo RHDV2 nel Sud del Paese, rispettivamente in un allevamento intensivo in Puglia e in un allevamento rurale in Campania.

Detto dei casi segnalati e riportati, vi è tuttavia la sensazione è che non si tratti della totalità dei casi verificatosi e che vi sia ancora da più parti, la tendenza ingiustificata a non segnalare i casi sospetti, ritenendo che la notifica, obbligatoria e prevista dal RPV con inserimento nel sistema SIMAN, comporti conseguenze "troppo" negative per l'allevatore.

Viceversa l'esperienza di questi mesi, laddove si è potuto operare una corretta gestione dei focolai, 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 ed 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 tempestivo e senza esitazioni a segnalare eventuali casi sospetti nella certezza che solo attraverso interventi tempestivi e mirati sarà possibile limitare la diffusione della malattia sul territorio nazionale.**

Proprio al fine di rendere chiari e facilmente comprensibili i caratteri della malattia, la sua natura, le modalità di prevenzione, controllo e gestione, anche previste dalla normativa vigente, abbiamo voluto preparare una brochure (vedi allegato) di due pagine da divulgare tra gli allevatori e addetti ai lavori. Questa è stata realizzata in collaborazione con l'IZSPLV di Torino, come espressione di attività prevista da un Progetto di Ricerca Corrente finanziato dal Ministero della Salute (vedi sotto).

## 2. POSITIVITÀ PER EBHS IN ITALIA: SEGNALAZIONE FOCOLAI

Rispetto ai due periodi precedenti, di cui si è data comunicazione nelle newsletter n° 2 e 3 (vedi tabella), dalla metà novembre 2012 alla fine di marzo 2013, sono stati conferiti ed esaminati

campioni provenienti da un totale di 66 casi sospetti, di cui 6 in allevamenti. Le positività totali sono risultate 11, di cui 3 da allevamenti (un allevamento è risultato infetto in due momenti separati a distanza di 3 mesi circa) localizzati in Nord Italia (Piemonte e Veneto).

Da segnalare le positività per EBHS in lepri selvatiche, registrate in autunno/inverno in Emilia Romagna, nelle provincie di Ravenna, Ferrara e Rimini, con un andamento simil-epidemico. Queste, infatti, si accompagnavano alla segnalazione di analoghi focolai in allevamenti delle Marche, Abruzzo e più in generale del Centro-Sud Italia, come riferitoci dal Dr. P.M. Mangili dell'IZS dell'Umbria e Marche. A tal fine dall'IZS di Perugia ci sono stati inviati oltre 40 campioni provenienti da svariati focolai per una studio antigenico e molecolare dei ceppi. A questi va aggiunta una segnalazione di positività in *Lepus corsicanus* da parte del Prof. Camarda dell'Università di Bari, che ha provveduto ad inviarci dei campioni positivi per una analoga caratterizzazione antigenica e molecolare del virus causale.

Periodo	Totale casi esaminati	Totale casi in lepri selvatiche	Totale casi in allevamenti	Totale casi positivi	Casi positivi in lepri selvatiche	Casi positivi in allevamenti
01/01/2012 15/06/2012	56	45	11	9	5 (1PV, 1PC, 1BS, 2BO)	4
16/06/2012 15/11/2012	49	38	11	1	1 (RE)	0
16/12/2012 31/03/2013	66	60	6	11	7 (2RA, 2FE, 1BG, 1RN, 1PV)	4

### 3. PROGETTI DI RICERCA ATTIVI PRESSO IL CdR

Nella sottostante tabella sono riportati in modo sintetico i progetti in cui è in questo momento coinvolto il CdR. Si tratta sia di progetti di ricerca correnti finanziati direttamente dal Ministero della Salute, sia progetti finanziati dal Ministero nell'ambito del un programma europeo EMIDA-ERAnet.

Anno	Tipologia	Codice Interno IZSLER	Committente	Titolo	Responsabile Scientifico	Data Inizio	Data Fine	Ruolo CdR
2011	Corrente	PRC 2011104	MINSAN	Sviluppo di protocolli diagnostici e gestionali a sostegno del settore cunicolo	Dr. Alessandro Dondo (IZSPLV)	01/10/2012	30/09/2014	U.O.
2011	Corrente	PRC 2011006	MINSAN	Messa a punto di protocolli diagnostici innovativi da applicare allo studio dell'epidemiologia e della genetica di rotavirus del coniglio e delle specie aviari	Dr. Antonio Lavazza (IZSLER CdR Lagomorfi)	01/11/2012	31/10/2014	Capofila
2011	Corrente	PRC 2011007	MINSAN	Produzione e caratterizzazione di "virus like particle" (VLP) del Rabbit haemorrhagic disease virus mediante tecnologie ricombinanti avanzate e produzione di MAb verso la variante RHDV Fra10	Dr. Lorenzo Capucci (IZSLER CdR Lagomorfi)	10/12/2012	09/12/2014	Capofila
2011	Altro tipo	EMIDA-APHAEA	CE	Harmonised Approaches in monitoring wildlife Population Health, And Ecology and Abundance	Dr.ssa Silvia Gennero IZSPLV	01/05/2012	30/04/2015	U.O.

In particolare:

1. Il primo di questi progetti, che ha come Capofila e Responsabile Scientifico il dr. Alessandro Dondo della Diagnostica di Torino dell'IZS del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, ha obiettivi di interesse collettivo molto ampi e contestualizzati in una realtà produttiva, come quella piemontese e lombarda, di elevata importanza zootecnica.

Gli obiettivi specifici che il progetto si pone sono: i) la corretta quantificazione del patrimonio

cunicolo in Piemonte e Lombardia mediante registrazione degli allevamenti in anagrafiche regionali e la classificazione degli allevamenti (*score system*) attraverso le loro diverse caratteristiche di base; ii) la sorveglianza epidemiologica (incidenza, prevalenza, *risk factor*, dinamiche di infezione) e l'elaborazione di strategie gestionali, modelli e protocolli diagnostici, piani di profilassi e interventi strutturali utili per il miglioramento dell'efficienza produttiva dell'allevamento e delle condizioni di benessere del coniglio; iii) il progressivo e concreto coinvolgimento, in un'ottica di cooperazione e condivisione di attività, degli operatori sanitari della filiera (veterinari ASL e Liberi Professionisti) e di figure istituzionali di riferimento, anche attraverso l'organizzazione di incontri a carattere formativo e divulgativo; iv) una implementazione del servizio diagnostico reso all'Utenza sia pubblica che privata con recupero dell'efficienza dell'attività diagnostica attraverso la rapidità e l'appropriatezza degli interventi e l'ottimizzazione dell'utilizzo delle risorse; v) la predisposizione di linee guida di comportamento e di misure specifiche da adottare in caso di malattie a carattere endemico o verso cui siano disponibili nuove acquisizioni diagnostiche, anche al fine di produrre esperienze e dati utili per le auspiccate revisioni e/o aggiornamenti della normativa nazionale vigente.

2. Il secondo progetto ha carattere più tecnico ed è incentrato su desiderio di aggiornare e migliorare le conoscenze disponibili sui rotavirus del coniglio. In particolare per ciò che riguarda l'epidemiologia e la dinamica d'infezione, la diagnosi di laboratorio anche mediante applicazione di metodiche biomolecolari, la sorveglianza molecolare dei ceppi circolanti. Vi è infatti la volontà di aumentare la consistenza della banca dati circa le caratteristiche genetiche dei rotavirus del coniglio e aggiornare i dati relativi alla trasmissione interspecifica e ai fenomeni di riassortimento genetico, con particolare attenzione alle eventuali implicazioni zoonosiche per riassortimento con ceppi di origine umana.

Tuttavia ciò non potrà essere realizzato senza ***il contributo di tutti gli operatori del settore sia che lavorino in campo che nei laboratori di Istituti pubblici e Università***. A loro chiediamo, infatti, di contribuire alla raccolta dei campioni da prelevare nel corso di focolai di enterite ogni qualvolta possa essere sospettato il coinvolgimento del rotavirus. Inoltre, sempre con la loro disponibilità potranno essere programmati ed eseguiti in "allevamenti problema" degli studi longitudinali per verificare la dinamica di infezione ed escrezione virale. Ovviamente tutti gli esami per la ricerca, quantificazione e tipizzazione di rotavirus verrebbero eseguiti a titolo gratuito nell'ambito del progetto stesso.

3. Il terzo progetto di ricerca corrente, di cui è Responsabile Scientifico il Dr. Lorenzo Capucci del reparto di proteomica dell'IZSLER, prende lo spunto dalla più recenti novità che riguardano i lagovirus, vale a dire la comparsa del nuovo sierotipo RHDV2, più noto come RHDVFra2010, e la identificazione anche in Europa di ceppi apatogeni simili ai ceppi identificati in Australia (RCV-A1-like). Gli obiettivi principali del progetto, appena iniziato, sono: i) studiare due sistemi di produzione di proteine ricombinanti ("virus-like particle" -VLP), al fine di poter poi scegliere il migliore in funzione delle necessità di produzioni delle diverse proteine. A tal fine si prevede l'utilizzo di due sistemi di espressione a confronto: il sistema Baculovirus (già patrimonio delle capacità metodologiche del laboratorio) e il sistema *Pichia pastoris* (da sviluppare come nuovo sistema); ii) approfondire le conoscenze sulla struttura del capsido di RHDV sia in termini di struttura della VP60 che di antigenicità. In aggiunta si verificherà, in via preliminare, il possibile uso del capsido dell'RHDV quale carrier di peptidi/proteine eterologhe; iii) studiare l'antigenicità della variante RHDV2 anche mediante MAb specifici; iv) disporre quindi di nuovi reagenti che consentano di aggiornare i metodi di laboratorio alle esigenze nuove diagnostiche.
4. L'ultimo progetto vede il CdR agire come U.O. in supporto all'IZSPLV (Dr.ssa Gennero) e all'Università di Torino (Prof. Ferroglio). Esso ha un respiro molto più ampio, trattando in generale le patologie degli animali selvatici, e in questo ambito le attività specifiche del CdR sono concentrate sui lagomorfi selvatici (lepre, coniglio e minilepre). Gli obiettivi del progetto includono: i) la determinazione di metodi armonizzati per stimare l'abbondanza di specie

selvatiche “chiave” in Europa; ii) lo sviluppo di metodi armonizzati e standardizzati per la raccolta e analisi di campioni utili alla diagnosi dei principali e più importanti agenti patogeni degli animali selvatici in Europa; iii) il fornire dati e informazioni sull’applicazione pratica e sul valore aggiunto dell’uso di metodi standardizzati attraverso una loro applicazione sul campo su alcuni binomi specie-patogeno in Europa; iv) la creazione di un network Europeo sulle malattie dei selvatici nel quale siano adottati metodi armonizzati per la stima di abbondanza delle specie e per la diagnosi dei principali agenti patogeni di malattia nelle specie selvatiche di maggior rilievo in Europa.

#### 4. MYXOMATOSI: CONTRIBUTI DEL CDR PRESENTATI AL CONVEGNO ASIC

Nel corso delle recenti “Giornate di Coniglicoltura ASIC 2013”, che si sono svolte a Forlì in occasione di Fieravicola 2013, il CdR ha presentato due contributi, entrambi dedicati a studi sulla Myxomatosi.

Gli atti completi delle “Giornate di Coniglicoltura ASIC 2013” sono pubblicati sul sito dell’ASIC al seguente indirizzo: <http://www.asic-wrsa.it/atti2013.php>

Riportiamo di seguito autori, titolo e abstract dei due contributi.

**Cavadini P., Lavazza A., Botti G., Brivio R., Capucci L.**

*Molecular diagnosis of Myxomavirus and characterization of strains detected in Italy during 2010-2011*

**Abstract:** Myxomatosis, a lethal systemic disease of European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), is caused by Myxoma Virus (MV). The entire genome of the MV has been sequenced, allowing a systemic survey of the functions of a large number of putative pathogenic factors. The data present in literature have shown that myxoma virus is characterized by a high degree of genetic stability. Aim of this study was to identify molecular markers, on MV genome, for characterizing the isolates circulating in Italy during epidemiological studies. As a first step a PCR-based assay was established to rapidly diagnose the presence of myxoma virus in biological samples isolated from naturally infected rabbits. Twelve isolates collected during 2010-2011 from different Italian regions (wide ranging geographic locations), were then partially sequenced. Based on the sequence analysis we found nucleotides substitutions, deletions and insertions randomly present on the MV genome. We identified at least 6 different strains circulating in Italy during that time. In particular, one strain was identified in 5 samples (Cluster 1), another one in 3 samples (Cluster 2) and the remaining strains in single samples. Since three point mutations common to Cluster 1 can be identified with PCR-RFLPs analysis, these markers could be easily used to perform epidemiologic studies. Interestingly, one strain from Sicily region (South Italy) has shown 100% nt identity with the Borghi vaccine strain, with a region of the genome suggesting a possible in vivo recombination between a circulating wild virus and a Borghi vaccine strain.

**Lavazza A., Grilli G., Cavadini P., Castellina C., Ardizio M., Sacco S., Capucci L.**

*Full diagnostic approach aimed to eradicate Myxomatosis from an industrial farm*

**Abstract:** An integrated approach was used in a rabbit commercial farm during a case of Myxomatosis. The collaborative activity of various actors was finalised to eradicate the disease accomplishing those rational sanitary measures provided by the law but without stopping the production. Myxomatosis was definitively eradicated, thanks to repeated sampling of sera and naso-conjunctival swabs to detect respectively antibodies by cELISA and viral antigen by using PCR. This work emphasizes that, in association with early diagnosis performed with sensitive and specific methods, cooperation, application of strict hygienic and biosecurity measures and vaccination programs are essential to recover from Myxomatosis. Indeed, there is the urgent need to define new and updated standard measures applicable for an effective control of this disease, endemic in Italy since 1955.

## 5. AGGIORNAMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Alejandro Bertó-Moran, Isabel Pacios, Emmanuel Serrano, Sacramento Moreno, and Carlos Rouco *Coccidian and nematode infections influence prevalence of antibody to myxoma and rabbit hemorrhagic disease viruses in European rabbits*. J. Wild. Dis., 49 (1): 10-17 doi: 10.7589/2011-12-343  
Abstract: L'interazione fra diversi parassiti nel coniglio Europeo (*Oryctolagus cuniculus*) è un elemento basilare per il benessere dell'ospite e nell'epidemiologia della Malattia Emorragica Virale e della Myxomatosi. Entrambe queste malattie sono note per aver causato una significativa riduzione delle popolazioni di conigli selvatici nella Penisola Iberica. La maggior parte degli studi si sono incentrati sulla epidemiologia e patogenesi di ciascuna malattia virale in modo esclusivo, senza cioè tenere conto delle possibili interazioni tra questi virus ed altri patogeni/parassiti. Utilizzando i dati di un programma sperimentale di reintroduzione e ripopolamento in Spagna, sono stati analizzati e determinati gli effetti di infestazioni da nematodi e coccidi sulla possibilità di avere anticorpi specifici anti-MEV e anti-Myxomatosi, nel coniglio Europeo selvatico. Sono così stati rilevati i dati di abbondanza dei conigli e di carica parassitaria (coccidi e nematodi) per 14 mesi in tre nuclei di ripopolamento. Mentre la carica di coccidi e nematodi spiegava la prevalenza stagionale per anticorpi anti-Myxomatosi, il pattern era meno chiaro per la MEV. Contrariamente a quanto atteso, il titolo anticorpale per Myxomatosi era inversamente proporzionale alla carica coccidica, mentre i nematodi sembravano avere una importanza minore. Questi risultati si ripercuotono sull'epidemiologia delle malattie virali e sulla gestione delle malattie allo scopo di aumentare le popolazioni di conigli in quelle aree dove assumono una funzione fondamentale nella conservazione degli ecosistemi.

Sottoponiamo, inoltre, alla Vostra attenzione, quattro pubblicazioni dedicate alla vaccinazione per RHDV con vaccini biotecnologici

1. Wang X, Qiu L, Hao H, Zhang W, Fu X, Zhang H, He S, Zhang S, Du E, Yang Z. **Adenovirus-based oral vaccine for rabbit hemorrhagic disease**. Vet Immunol Immunopathol. 2012 Jan 15;145(1-2):277-82. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.11.014. Epub 2011 Nov 25.
2. Cheng Y, Chen Z, Li C, Meng C, Wu R, Liu G. **Protective immune responses in rabbits induced by a suicidal DNA vaccine of the VP60 gene of rabbit hemorrhagic disease virus**. Antiviral Res. 2013 Mar;97(3):227-31. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.12.028. Epub 2013 Jan 4.
3. Yuan D, Qu L, Liu J, Guo D, Jiang Q, Lin H, Si C. **DNA vaccination with a gene encoding VP60 elicited protective immunity against rabbit hemorrhagic disease virus**. Vet Microbiol. 2013 May 31;164(1-2):1-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.01.021. Epub 2013 Feb 1.
4. Qiu L, Wang X, Hao H, Mu G, Dang R, Wang J, Zhang S, Du E, Yang Z. **Oral administration of attenuated Salmonella typhimurium containing a DNA vaccine against rabbit haemorrhagic disease**. J Virol Methods. 2013 Mar;188(1-2):108-13. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.12.007. Epub 2012 Dec 24.

Per ulteriori informazioni e richieste contattare:

*Antonio Lavazza*

Tel. 0302290298 - Fax 0302290623

Email: antonio.lavazza@izsler.it

*Lorenzo Capucci*

Tel 0302290617 – Fax 0302290559

Email: lorenzo.capucci@izsler.it