



---

# **Ruolo dei virus nelle patologie enteriche della moderna conigliocoltura**

**Monica CERIOLI & Antonio LAVAZZA**

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale della  
Lombardia e dell'Emilia Romagna  
- Brescia -**



## “Conigli & Virus”

---

⌋ Quali virus sono importanti ?

**MIXOMATOSI - MEV - ROTAVIRUS**

⌋ Che danni causano ?

**Ingenti i primi due, inferiori il terzo**

⌋ E' possibile controllarli ?

**SI, ma con attenzione e professionalità**

⌋ Qual è la profilassi migliore ?

**Igienico sanitaria e vaccinale associate**



# “Conigli & Virus”

---

⌋ **Esistono altri virus nel coniglio ?**

**SI**

⌋ **Quali sono ?**

**parvovirus, coronavirus, herpesvirus  
adenovirus, calicivirus, enterovirus-like**

⌋ **Causano problemi ?**

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



# Enteriti del coniglio

## fattori predisponenti

- ⌋ Il complesso delle enteriti o **Sindrome enterica post svezzamento** è una tipica malattia condizionata multifattoriale
- ⌋ Sono favorite da particolari condizioni di allevamento:
  - *sovraffollamento*
  - *squilibri alimentari (cambio di dieta, dieta non bilanciata)*
  - *fattori stressanti ambientali e manageriali (cambiamenti climatici, sbalzi di temperatura, >NH3)*
  - *carenti condizioni igienico-sanitarie*
  - *trattamenti terapeutici non corretti*
  - *selezione genetica spinta*



# Enteriti del coniglio

---

## agenti eziologici

- ☾ **L'enteriti del coniglio sono spesso associate ad una serie di agenti eziologici che presentano uno scarso potere patogeno e possono agire da opportunisti**



# Enteriti del coniglio

---

## agenti eziologici

### ☾ Quale è il ruolo dei virus ?

**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* and clostridia) e parassitarie (coccidia)**



## Il “problema” Enterocolite Epizootica/1

STUDI per determinare l'agente eziologico sono iniziate nella seconda metà del 1997



### IPOSTESI VIRALE:

- malattia contagiosa, trasmissibile, riproducibile (sperimentalmente con estratti intestinali e di polmone, per contatto con animali malati o attraverso contaminati)
- esami batteriologici non indicativi, antibiotici pressoché inefficaci
- immunità indotta
- conservazione a basse temperature
- danni maggiori in soggetti immunodepressi
- carattere delle lesioni istologiche polmonari e intestinali



## Il “problema” Enterocolite Epizootica/2

### INDAGINI DI LABORATORIO

- **Colture cellulari** = Negative
- **ME** = presenza dubbia di particelle non identificate a RNA con envelope in varia quantità
- **Purificazione** = diversi metodi utilizzati, più di 30 campioni (intestinali e polmonari) → ME senza risultati certi
- **Biologia molecolare**
  - Due librerie di cDNA da RNA estratto dalle frazioni purificati, più di 6000 cloni, nessuno con sequenza riconducibile a virus animali
  - PCR con primer noti ha evidenziato solo presenza di rotavirus
  - Nessun risultato conclusivo







## Il “problema” Enterocolite Epizootica/3

### IPOSTESI EZIOPATOGENETICA (Dr. Badiola, Spain)



Azione di un batteriofago ad azione litica (come tale trasmissibile da animale ad animale).



Ceppo di *E. coli*, anche banale (ovvero non dotato di caratteri di virulenza), in fase lisogenica (in pratica va incontro a distruzione)



Dalla lisi del ceppo batterico si libera una tossina



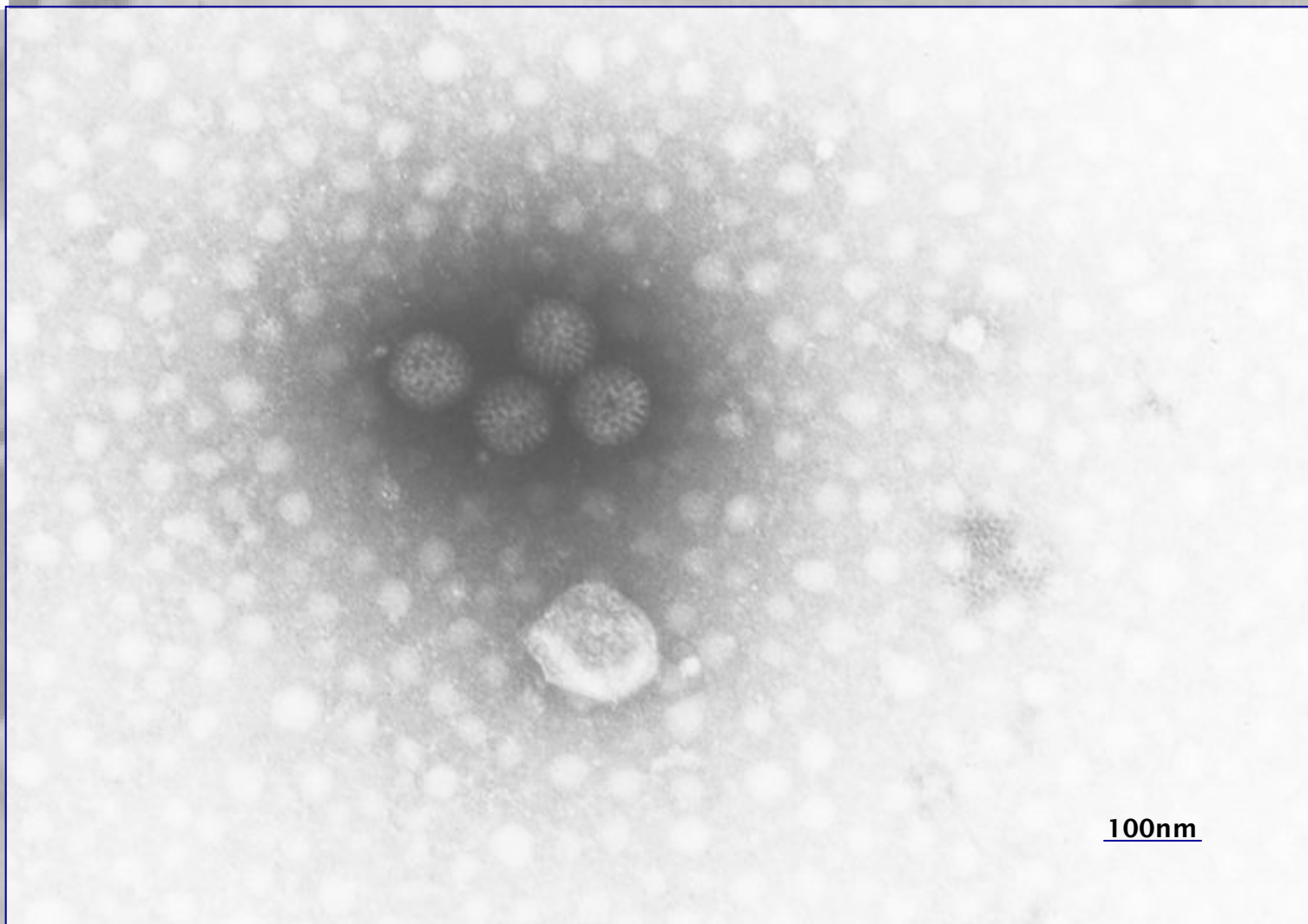
La produzione di tossine potrebbe essere geneticamente trasmessa dal batteriofago



Si ha un'azione tossica sull'intestino (paralisi ?)



# Rotavirus



100nm



# 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**

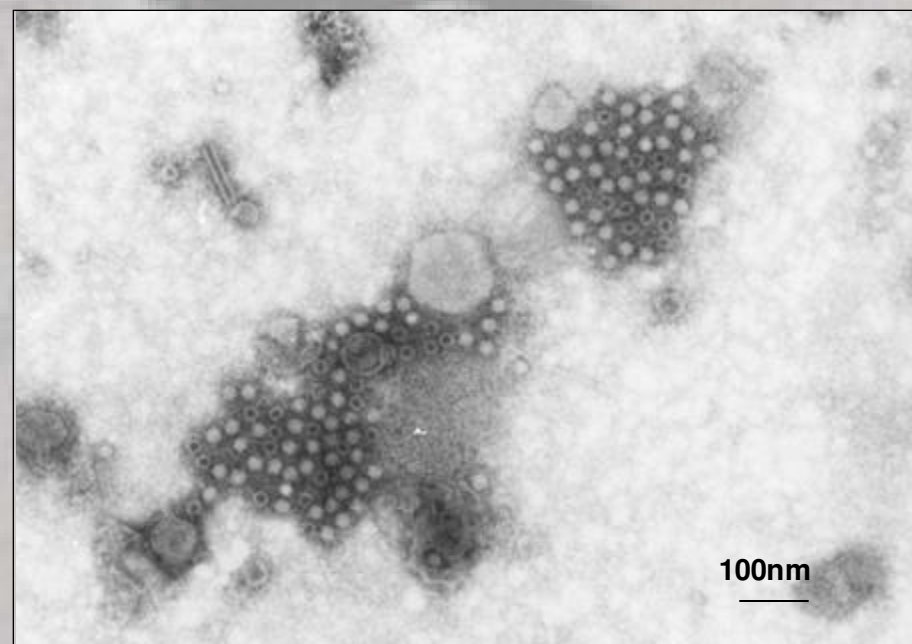
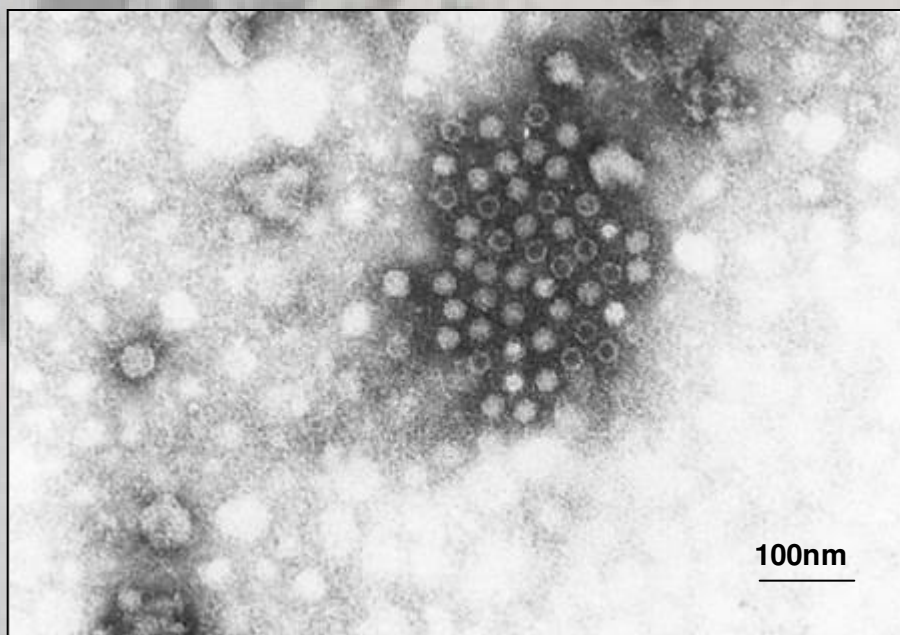
Anno	Totale campioni	Rotav.	
		(n.)	(%)
1982-85	334	47	14,07
1990	59	4	6,78
1991	24	3	12,50
1992	41	3	7,32
1993	52	3	5,77
1994	53	7	13,21
1995	83	8	9,64
1996	182	49	26,92
1997	82	19	23,17
1998	98	20	20,41
1999	59	12	20,34
2000	49	5	10,20
2001	73	9	12,33
<b>TOT</b>	<b>1189</b>	<b>189</b>	<b>15,90</b>

*Ceppo prevalente recentemente identificato in Italia G3P[22]*

*(Martella et al., 2005)*



# Parvovirus (IEM)





# 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**

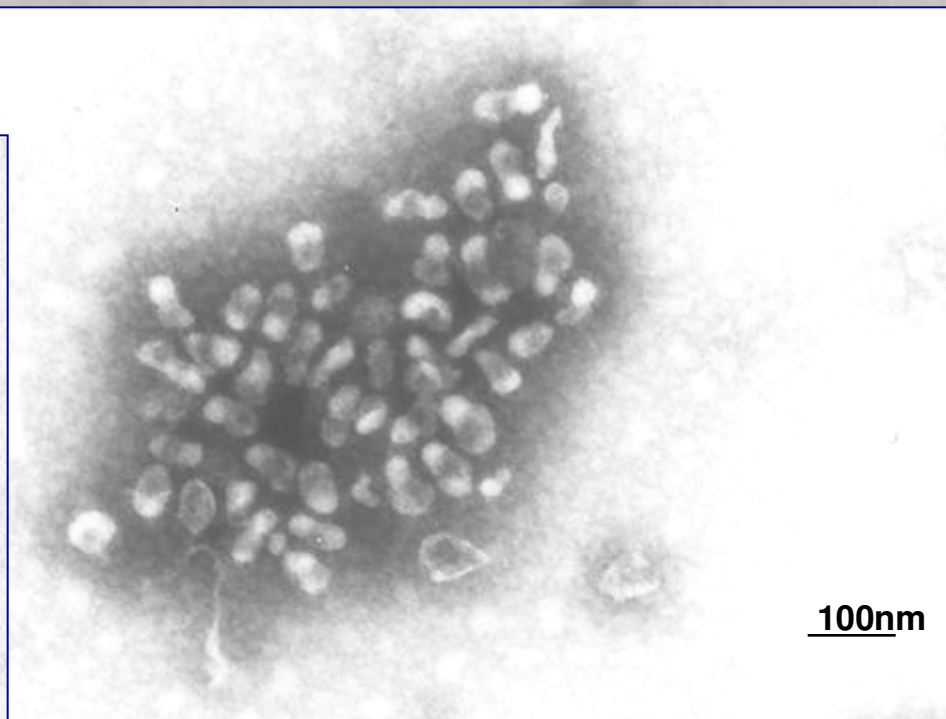
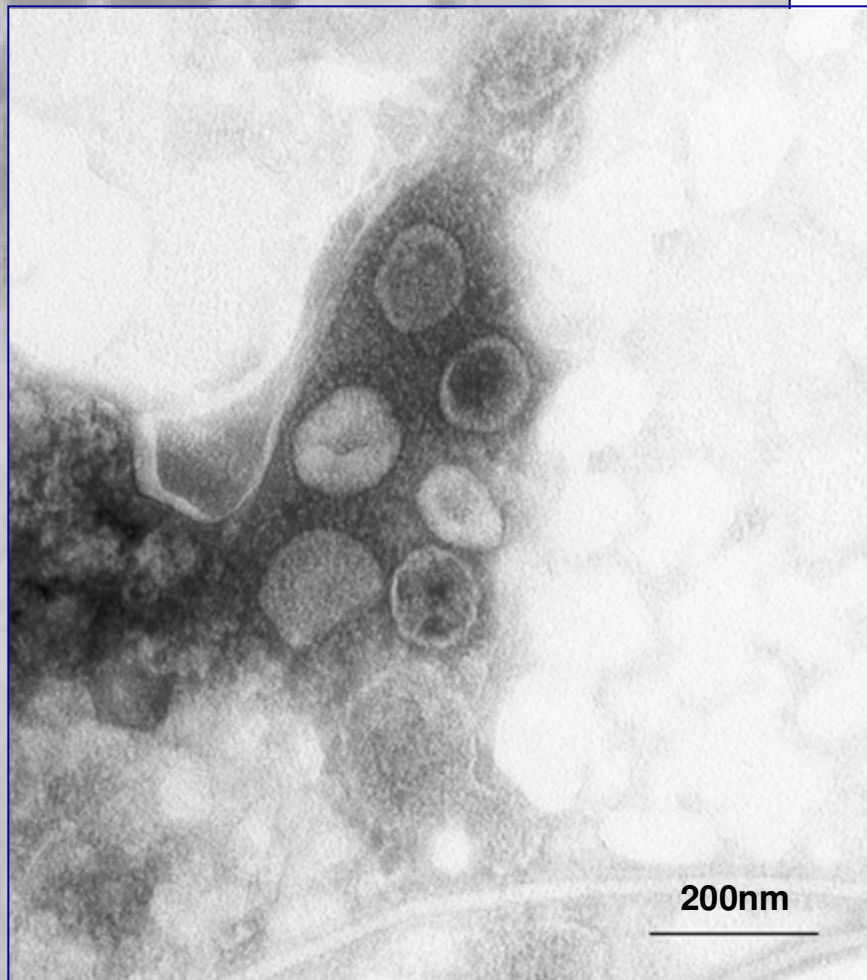
Anno	Totale campioni	Parvov.	
		(n.)	(%)
1982-85	334	30	8,98
1990	59	6	10,17
1991	24	3	12,50
1992	41	7	17,07
1993	52	3	5,77
1994	53	7	13,21
1995	83	4	4,82
1996	182	12	6,59
1997	82	6	7,32
1998	98	8	8,16
1999	59	2	3,39
2000	49	6	12,24
2001	73	20	27,40
TOT	1189	114	9,59

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



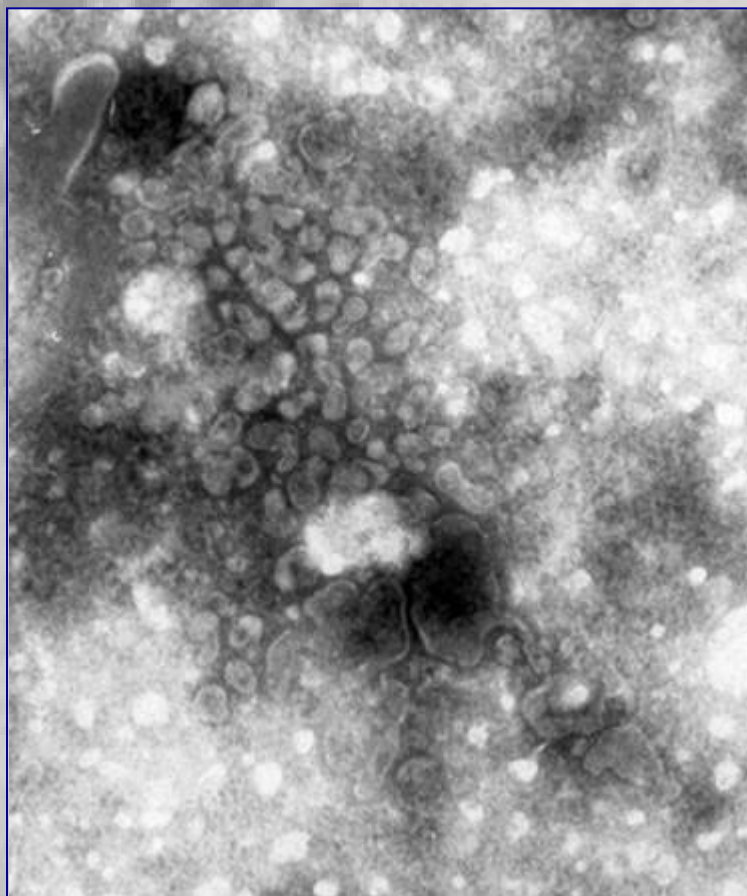


# Coronavirus

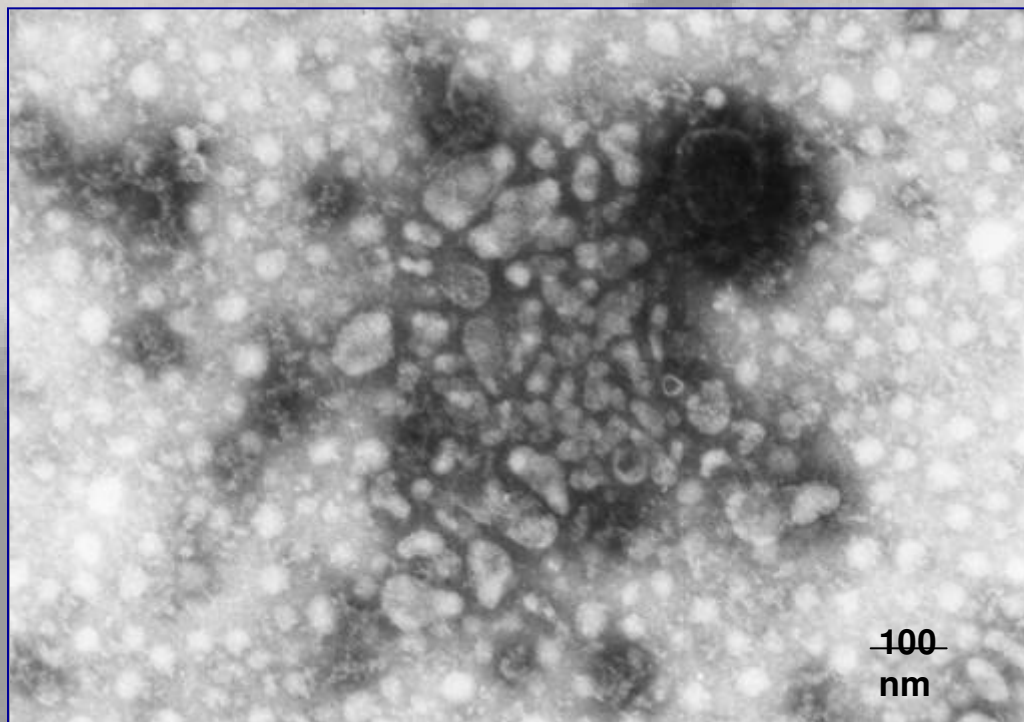




# Coronavirus



Virioni isolati su culture cellulari HRT18 (3° passaggio)



IEM con siero convalescente



# Coronavirus

- ⌋ Non ancora classificato definitivamente: membro non assegnato del genere Coronavirus (gruppo 2?)
- ⌋ 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)**

Anno	Totale campioni	Coronavirus	
		(n.)	(%)
1982-85	334	15	4,49
1990	59	15	25,42
1991	24	2	8,33
1992	41	2	4,88
1993	52	6	11,54
1994	53	4	7,55
1995	83	6	7,23
1996	182	29	15,93
1997	82	10	12,20
1998	98	10	10,20
1999	59	8	13,56
2000	49	6	12,24
2001	73	12	16,44
<b>TOT</b>	<b>1189</b>	<b>125</b>	<b>10,05</b>

*Abbiamo realizzato alcuni studi su questo virus.....*





# Coronavirus – indagini di campo

---

## test sierologici e virologici per coronavirus

- ⌋ Tre allevamenti (31 sieri)
- ⌋ ELISA sierologica basato sull'uso di reagenti cross-reattivi verso Bovine Corona Virus (BoCV)

**E**

- ⌋ 16 campioni di contenuto intestinale positivi al M.E.
- ⌋ Sandwich ELISA per BoCV
- ⌋ Isolamento in vitro (cellule HRT 18)
- ⌋ Test di Emoagglutinazione



# Coronavirus – indagini di campo

---

## risultati

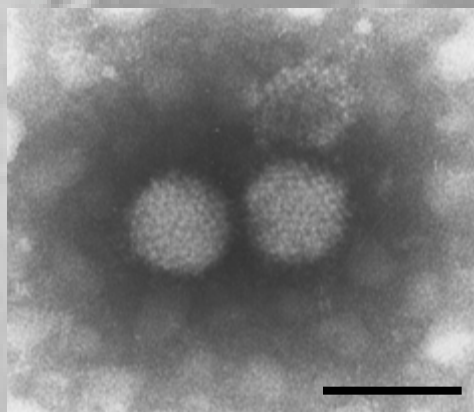
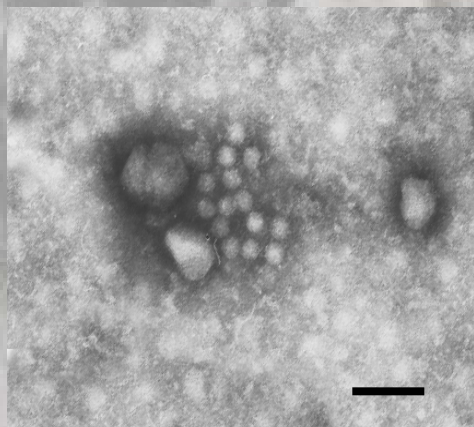
- Ⓒ Diffusa sieroprevalenza mediante test ELISA sierologico
- Ⓒ Debole positività in ELISA di 6 contenuti intestinali (O.D.=0.4-0.5)
- Ⓒ Isolamento in vitro di un coronavirus al 3° passaggio
- Ⓒ Emoagglutinazione di globuli rossi di topo ma non di coniglio



**Il ruolo patologico e il significato del coronavirus del coniglio sono ancora in discussione e meritevoli di ulteriori indagini**



## Altri virus enterici del coniglio



Totale	Totale campioni	Enterolike		Reov.		Caliciv.		Adenov.	
		(n.)	(%)	(n.)	(%)	(n.)	(%)	(n.)	(%)
1982-85	334	12	3,59	0	0,00	0	0,00	0	0,00
1990	59	2	3,39	0	0,00	0	0,00	0	0,00
1991	24	2	8,33	0	0,00	0	0,00	0	0,00
1992	41	4	9,76	1	2,44	0	0,00	0	0,00
1993	52	0	0,00	0	0,00	1	1,92	0	0,00
1994	53	2	3,77	0	0,00	0	0,00	0	0,00
1995	83	7	8,43	0	0,00	0	0,00	0	0,00
1996	182	9	4,95	0	0,00	0	0,00	1	0,55
1997	82	2	2,44	0	0,00	0	0,00	2	2,44
1998	98	3	3,06	0	0,00	0	0,00	0	0,00
1999	59	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
2000	49	1	2,04	0	0,00	0	0,00	0	0,00
2001	73	1	1,37	0	0,00	0	0,00	1	1,37
<b>TOT</b>	<b>1189</b>	<b>45</b>	<b>3.08</b>	<b>1</b>	<b>0.01</b>	<b>1</b>	<b>0.01</b>	<b>4</b>	<b>3.07</b>

☾ Riconcontro sporadico

☾ Ruolo patogeno non definito



## 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)

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



## Alcuni dati originali

### materiali e metodi

- ⌋ Focolai di enterite verificatisi tra il Gennaio 2002 e il Dicembre 2005
- ⌋ 98 allevamenti di conigli
- ⌋ 171 casi di enterite
  - 249 campioni (i.e. uno o più campioni di contenuto intestinale)
  - Inclusi soprattutto conigli all'ingrasso (40-65 gg) ma anche lattanti e femmine on produzione

	2002	2003	2004	2005	TOT
<b>N. aziende</b>	26	28	22	22	98
<b>N. casi</b>	35	34	46	56	171
<b>N. campioni</b>	44	40	66	99	249



## Metodo M.E. "Airfuge"



1) DILUIZIONE dei CAMPIONI FECALI  
o OMOGENIZZAZIONE DEGLI ORGANI  
(1:5 w/v in acqua bidistillata)

2) CENTRIFUGAZIONI BASSA  
VELOCITA' (6000 e 10000 rpm x 30 min.)

3) ULTRACENTRIFUGAZIONE con  
AIRFUGE BECKMAN (21 psi x 15 min)

4) COLORAZIONE NEGATIVA  
2% NaPt, pH 6.8 x 1,5 min

5) OSSERVAZIONE con un TEM  
PHILIPS CM10 - 80 kV 19000-34000x

IEM step  
INCUBAZIONE  
con SIERO  
a 37°C per 1hr







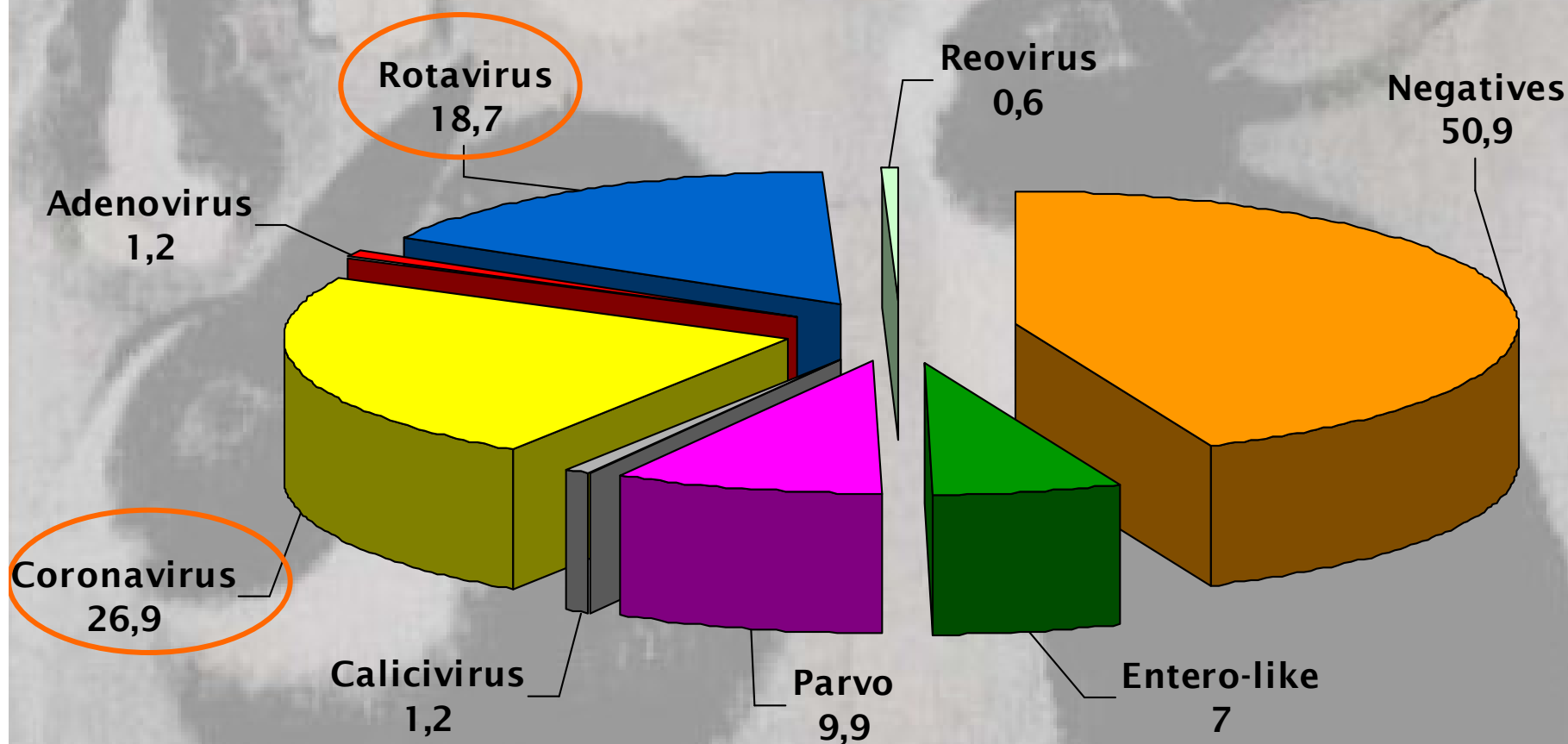
# Distribuzione della positività virale per anno e tipo di virus

Anno	Totale	Negativi		Totale
	casi	n.	%	virus
2002	35	17	48,6	26
2003	34	17	50,0	24
2004	46	27	58,7	19
2005	56	26	46,4	21
<b>Totale</b>	<b>171</b>	<b>87</b>	<b>50,9</b>	<b>90</b>

Anno	Rotavirus		Parvovirus		Coronavirus		Enterolike		Adenovirus		Calicivirus		Reovirus	
	n.	%	n.	%	n.	n.	%	%	n.	%	n.	%	n.	%
2002	9	25,7	5	14,3	8	22,9	2	5,7	1	2,9	1	2,9	0	0,0
2003	8	23,5	4	11,8	8	23,5	3	8,8	0	0,0	1	2,9	0	0,0
2004	4	8,7	3	6,5	12	26,1	5	10,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0
2005	11	19,6	5	8,9	18	32,1	2	3,6	1	1,8	0	0,0	1	1,8
<b>Totale</b>	<b>32</b>	<b>18,7</b>	<b>17</b>	<b>9,9</b>	<b>46</b>	<b>26,9</b>	<b>12</b>	<b>7,0</b>	<b>2</b>	<b>1,2</b>	<b>2</b>	<b>1,2</b>	<b>1</b>	<b>0,6</b>



# Particelle virali identificate nell'intestino di conigli con enterite dal 2002 al 2005







# Infezioni miste osservate al ME

Tipo di associazione	1996	1997	1998	1999	2000	2001	Total
Parvo + Coronalike	3	1	2	0	2	3	11
Rota + Parvo	3	4	0	0	0	1	8
Coronalike + Enterolike	4	1	1	0	1	0	7
Rota + Coronalike	1	1	1	0	0	1	4
Rota + Enterolike	2	0	1	0	0	0	3
Parvo + Enterolike	1	0	1	0	0	0	2
Rota + Adeno	0	1	0	0	0	0	1
Coronalike + Adeno	0	1	0	0	0	0	1
Rota + Coronalike + Enterolike	1	0	0	0	0	0	1
Rota + Parvo + Adenovirus	0	0	0	0	0	1	1
Enterolike + Coronalike + Parvo	0	0	0	0	0	1	1
<b>Totale</b>	<b>15</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>40</b>

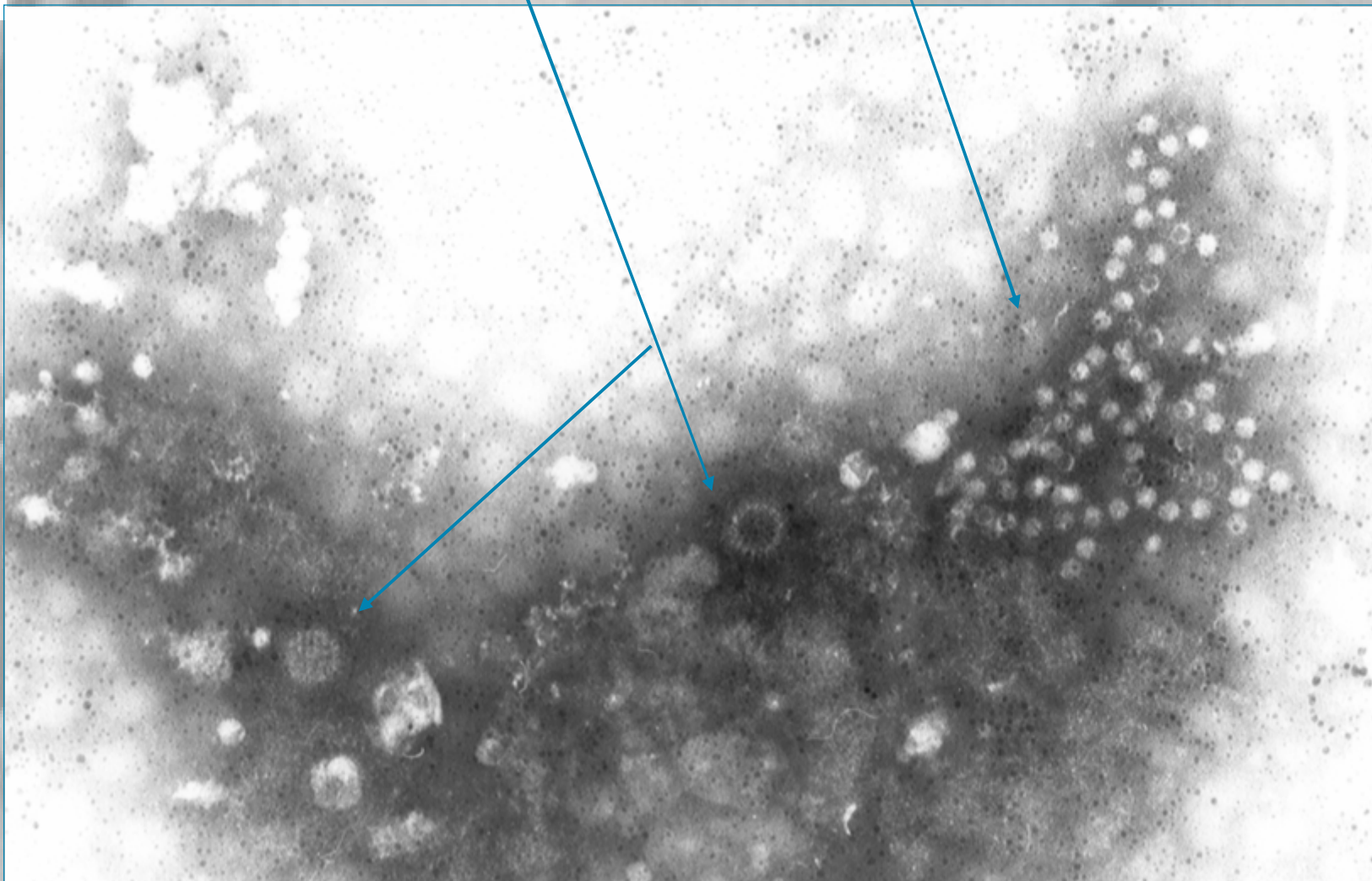
**1996-2001**  
19,3% di tutti i campioni è risultato positivo

Tipo di associazione	2002	2003	2004	2005	Totale
Rotavirus + Coronavirus	3	3	0	4	10
Parvovirus + Coronavirus	1	2	1	0	4
Enterovirus-like + Coronavirus	0	1	1	1	3
Rotavirus + Enterovirus-like	1	0	0	1	2
Rotavirus + Parvovirus	0	0	1	0	1
Parvovirus + Enterolike	1	0	0	0	1
Rotavirus + Calicivirus	0	1	0	0	1
Coronavirus + Adenovirus	0	0	0	1	1
Reovirus + Coronavirus	0	0	0	1	1
Rotavirus + Enterovirus-like + Coronavirus	0	0	1	0	1
Rotavirus + Coronavirus + Calicivirus	1	0	0	0	1
<b>Totale</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>26</b>

**2002-2005**  
30,9% di tutti i campioni è risultato positivo



# Rotavirus + Parvovirus





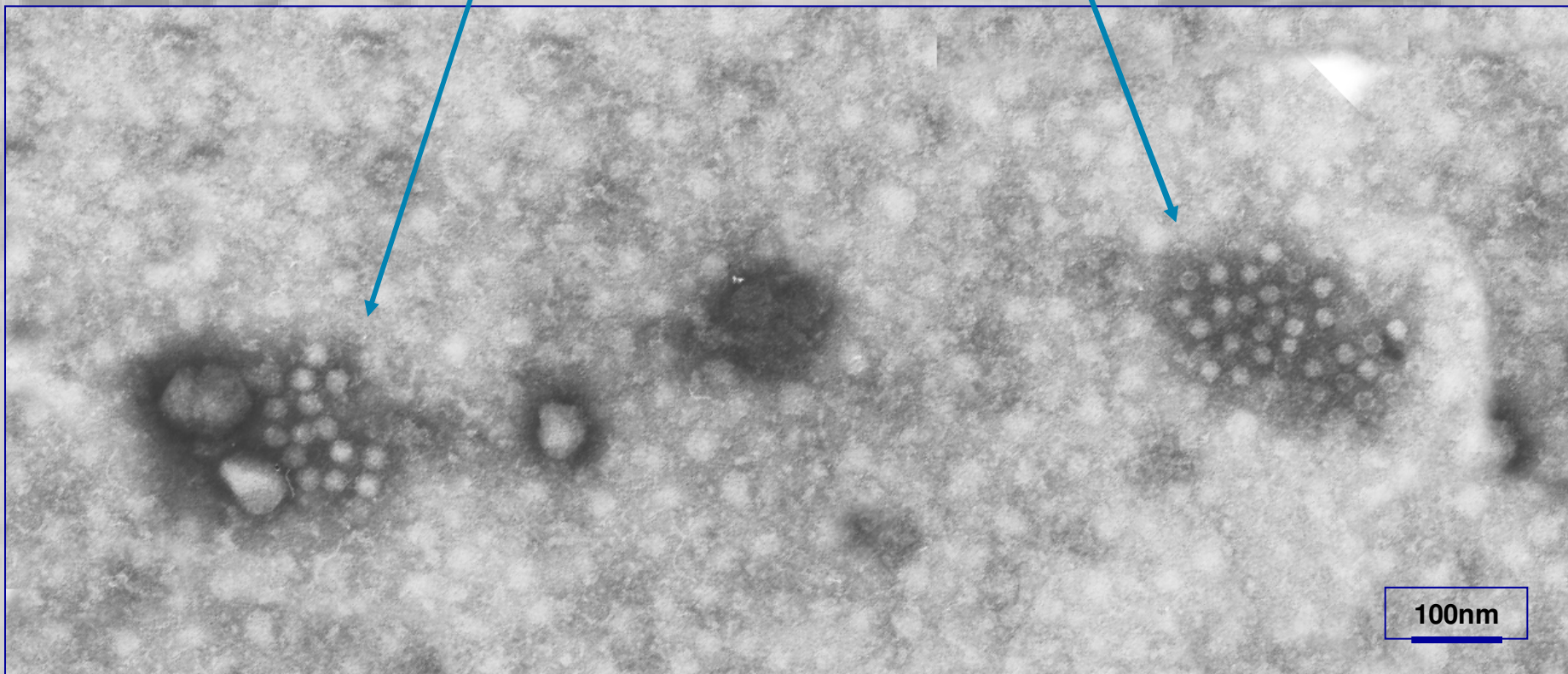
## Coronavirus-like + Parvovirus







## Enterovirus-like + Parvovirus





## **Presenza di più agenti patogeni in corso di enterite**

---

- ⌋ **Nuovo sistema di registrazione dei campioni introdotto all'IZSLER nel 2002**
- ⌋ **Valutazione dell'intero set di dati provenienti da tutto l'IZSLER**
- ⌋ **Report che includono i risultati dell'esame batteriologico (non solo relativo al contenuto intestinale) e dell'esame parassitologico**
- ⌋ **Correlazione della presenza di virus con altri agenti patogeni come batteri e protozoi**



# Altri agenti patogeni associati ad enterite nel coniglio - 2002-2005

ESAME BATTERIOLOGICO		VIRUS POS 84	VIRUS NEG 87
NEG		5	5
Non eseguito (n.d.)		7	7
<i>E.Coli</i>		33	47
<i>E.Coli +</i>	<i>Clostridium spp.</i>	3	0
	<i>Cl. perfringens</i>	6	4
	<i>Cl. perfringens</i> + Bordetella	0	1
	<i>Cl. spiriforme</i>	12	9
	<i>Cl. spiriforme</i> + <i>P.multocida</i>	0	1
	<i>Staph. aureus</i>	1	3
	<i>Staph. aureus</i> + <i>P. multocida</i>	1	1
	<i>P. multocida</i>	7	1
	<i>Klebsiella</i>	1	0
	<i>Yersinia</i>	1	0
	<i>Salmonella spp.</i>	0	1
	<i>Streptococcus spp.</i>	0	2
	<i>Bordetella</i>	0	1
	<i>P. multocida</i>	2	1
<i>Proteus</i> + <i>Cl. spiriforme</i>	1	0	
<i>Salmonella spp</i>	1	0	
<i>Streptococcus spp.</i>	0	1	
<i>Staph. aureus</i>	3	2	
Coccidia (associati a batteri)	19	22	

Campioni associati con *E.coli* o con altri batteri

**Virus pos 77.4%**

**Virus neg 81.6%**



# Sierotipizzazione *E.coli*

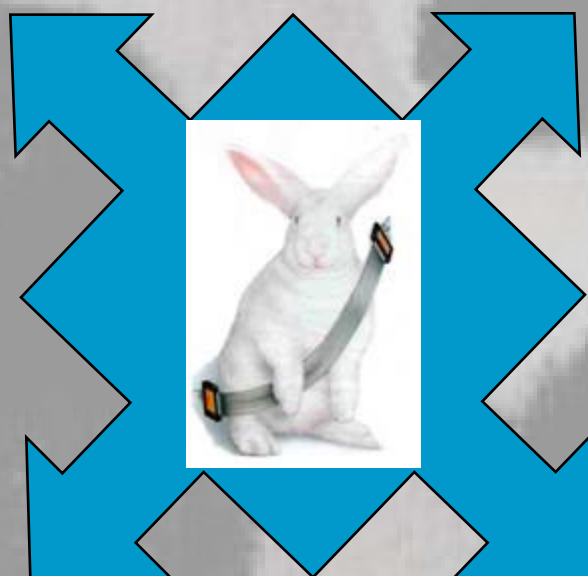
Sierotipo	VIRUS POS		VIRUS NEG	
	+ E.coli	gene EAE +	+ E.coli	gene EAE +
O2	3	neg	2	neg
O8	0		1	neg
O15	0		1	neg
O49	1	neg	2	pos
O86	2	1 neg 1 pos	1	neg
O103	6	5 pos  1 n.d.	9	7 pos 1 neg 1 n.d.
O141	1	n.d.	1	neg
O6	1	neg	1	neg
O64	0		1	neg
O73	0		2	1 pos 1 neg
O83	1	neg	1	neg
O139	0		1	neg
O157	0		1	neg
Ag O per il quale non è stata possibile la tipizzazione (autoagglutinazione)	19	17 neg  2 pos	15	10 neg 2 pos 3 n.d.
<b>TOT.</b>		<b>34</b>		<b>39</b>
<b>Non eseguito (n.d.).</b>		<b>50</b>		<b>51</b>



# Profilassi delle enteriti virali

IGIENE DEI  
RICOVERI

CONTROLLO  
DEI FATTORI  
STRESSANTI



ACQUISTO  
MADRI  
NEGATIVE

ALIMENTAZIONE  
CORRETTA





*Grazie per  
l'attenzione*