

Sieroprevalenza di *Encephalitozoon cuniculi* in allevamenti intensivi di conigli

**Santaniello A., Dipineto L., Rinaldi L., Borrelli L., Russo T.,
Cringoli G., Menna L.F., Fioretti A.**

Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Università di Napoli "Federico II", Italy

Corresponding Author: Antonio Santaniello, Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Università degli Studi di Napoli "Federico II", via della Veterinaria 1, 80137 Napoli, Italy - Tel. +39 081 2536281 - Fax: +39 081 2536282 -
Email: antonio.santaniello2@unina.it

ABSTRACT: Serological prevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in intensive farm rabbits. Rabbit sera (n = 400) from 20 commercial farms were submitted to a serological screening for *Encephalitozoon cuniculi* by a carbon immunoassay (CIA test). Antibodies anti-*E. cuniculi* were found in 126/400 (31.5%) sera analysed and all the farms (100%) resulted positive. Rabbits older than 4 months showed a significant higher seropositivity for *E. cuniculi* (chi-squared test: $p < 0.0001$) than rabbits under 4 months, *E. cuniculi* sero-prevalence showed an increasing trend in rabbits within the farm along with the increase of "no. of rabbit housed", this trend, however, was not significant (Spearman's correlation: $p = 0.073$). The findings of the present study confirms rabbit as main reservoir of *E. cuniculi*; they are of epidemiological relevance and immediate public health importance because of the recognized infectivity in humans by the microsporidium.

Key words: Carbon immunoassay, *Encephalitozoon cuniculi*, Farm rabbits, Zoonosis.

INTRODUZIONE – Negli ultimi anni lo studio dell'encefalitozoonosi ha suscitato particolare interesse sia in medicina umana che in medicina veterinaria (Valencakova *et al.*, 2008). Al genere *Encephalitozoon* appartengono tre specie riconosciute come parassiti opportunisti in pazienti HIV positivi (Weber *et al.*, 1994). Tra queste, *Encephalitozoon cuniculi*, è il microsporidio più studiato nei mammiferi poiché considerato responsabile di infezioni naturali in un ampio range di animali, inclusi i primati, uomo compreso (Mathis *et al.*, 2005). Infatti, *E. cuniculi* è una delle nove specie di microsporidi isolate in pazienti affetti da AIDS (Wasson e Peper, 2000). I conigli affetti da encefalitozoonosi, mostrano segni clinici che variano da forme asintomatiche fino alla morte. Il decorso della malattia può essere acuto o cronico e i segni clinici sono determinati da lesioni al sistema nervoso centrale, ai reni e agli occhi (Harcourt-Brown e Halloway, 2003). La via più frequente di trasmissione per *E. cuniculi* è probabilmente attraverso l'infezione delle spore eliminate con le urine degli animali infetti (Wasson e Peper, 2000), ma è segnalata anche la via verticale (Baneux e Pognan, 2003). Inoltre, si è assistito ad un incremento dell'infezione di *E. cuniculi* nei conigli pet. (Keeble e Shaw, 2006; Dipineto *et al.*, 2008; Künzel *et al.*, 2008; Valencakova *et al.*, 2008). Ad oggi sono disponibili pochi dati di prevalenza relativi all'allevamento industriale in questa specie. Pertanto, il presente studio è stato condotto con lo scopo di valutare la prevalenza di anticorpi specifici anti-*E. cuniculi* in conigli allevati con sistemi intensivi nel Sud Italia.

MATERIALI E METODI – Nel periodo gennaio-ottobre 2008, sono stati campionati 20 allevamenti cunicoli intensivi situati in Campania. Ciascun allevamento possedeva un numero di fattrici compreso tra 450 e 2000 e l'età dei conigli esaminati era compresa tra 2 mesi e 2 anni. Per ogni allevamento sono stati scelti 10 soggetti giovani (fino a 4 mesi di età) e 10 soggetti adulti (fattrici di età superiore a 4 mesi). I conigli erano in buone condizioni di salute, sebbene occasionalmente, alcuni soggetti mostravano segni indicativi di encefalitozoonosi quali torcicollo, paralisi, uveite e poliuria. Per ogni coniglio è stato effettuato un prelievo di sangue, pari a 2 ml, dalla vena marginale auricolare. Successivamente, dopo centrifugazione a 2500 rpm per 15 minuti, i sieri ottenuti venivano sottoposti a CIA test per la ricerca di anticorpi anti-*E. cuniculi* secondo le procedure consigliate dalla ditta produttrice (Medicago, Uppsala, Sweden). Il risultato è stato letto al microscopio ottico a 40x. Le particelle di carbone si legavano alle IgG dei campioni di siero evidenziando legami specifici tra gli anticorpi e le spore di *E. cuniculi*. Nei campioni positivi, dette spore si presentavano con una colorazione nero-grigiastra su un fondo di particelle di carbone, mentre, nei campioni negativi, il parassita appariva trasparente su un fondo uniformemente scuro. L'età dei conigli (giovani e adulti) è stata analizzata mediante analisi statistica univariata (test chi-quadro di Pearson per l'indipendenza) usando come variabile dipendente lo stato sierologico di *E. cuniculi* (positivo/negativo). Inoltre, è stata utilizzata l'analisi di correlazione non parametrica di Spearman al fine di sostenere l'associazione tra la variabile "numero di conigli per allevamento" (caratterizzato come segue: 1 = < 450; 2 = 500-999; 3 = 1000-1499; 4 = > 1500) e la sieroprevalenza dei conigli per ciascun allevamento. L'analisi statistica è stata effettuata usando il software SPSS 13 per Windows (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, IL, USA). La significatività è stata stabilita come $P < 0,05$.

RISULTATI E CONCLUSIONI – Nel presente studio, tutti gli allevamenti esaminati risultavano positivi per *E. cuniculi* (Tab. 1). Su 400 sieri di conigli, 126 erano positivi al CIA test (31,5%; 95% Intervallo di confidenza – CI = 29,3-33,9%). I conigli giovani mostravano una prevalenza del 15% (30/200; 95% CI = 12,6-17,7%), mentre i conigli adulti d'età superiore a 4 mesi mostravano una prevalenza più alta, 48,1% (96/200; 95% CI = 44,6-51,6%). Questa differenza è stata statisticamente significativa ($P < 0,0001$), in accordo con i risultati riportati da Dipineto *et al.* (2008) in conigli pet. Infatti, gli anticorpi materni verso *E. cuniculi* passano alla prole e sono presenti nei conigli fino a 4 settimane d'età (Lyngset, 1980); dalle 4 alle 8 settimane d'età gli animali sono sieronegativi. Nel presente studio, la maggior parte dei conigli giovani esaminati avevano circa 2 mesi d'età, e potrebbero appartenere a questa categoria. Inoltre, i risultati della correlazione di Spearman mostravano un aumento della sieroprevalenza di *E. cuniculi* direttamente proporzionale all'aumento del numero di conigli presenti (Tab. 2), sebbene questo trend non era significativo ($P = 0,073$). Questo risultato può essere spiegato considerando la principale via di infezione di *E. cuniculi*, che è rappresentata dall'ingestione di spore eliminate nelle urine degli animali infetti (Wasson e Peper, 2000) e, quindi, il numero di conigli allevati può influenzare la prevalenza del microsporidio nell'allevamento. La presenza di anticorpi anti-*E. cuniculi* nel 100% degli allevamenti e nel 31,5% degli conigli nel presente studio, dimostra che il parassita è uniformemente distribuito negli allevamenti della regione Campania, in accordo anche ad uno studio di sieroprevalenza (67,2%) nei conigli pet, condotto nella stessa regione (Dipineto *et al.*, 2008). Inoltre, la prevalenza riscontrata nella presente indagine, è anche in linea con quelle riportate in letteratura, 52% nel Regno Unito (Keeble e Shaw, 2006) e

16,5% in Nigeria (Okewole, 2000). In Italia, per contro, sono disponibili pochi dati in merito ai conigli d'allevamento, sebbene un recente studio abbia riportato 52 campioni positivi su 302 (17,2%) sieri di coniglio analizzati per *E. cuniculi* (Scala *et al.*, 2008). È importante sottolineare che nel presente studio la maggior parte dei conigli positivi (365/400 = 91,1%) erano sani e solo 11 (8,9%) mostravano segni clinici riferibili ad encefalitozoonosi. L'alta percentuale di conigli sieropositivi riscontrata suggerisce la necessità di effettuare screening di routine negli allevamenti per accertare il grado di circolazione di questo parassita, anche in considerazione del rischio che *E. cuniculi* possa trasmettersi all'uomo, come dimostrato dai recenti casi riportati da Mathis *et al.* (2005) e Rossi *et al.* (1998) in pazienti immunodepressi di Europa e USA.

Tabella 1 – Risultati sierologici del CIA test secondo l'età dei conigli analizzati.

Età e numero di conigli analizzati	Numero e % di positivi per <i>E. cuniculi</i>	95% CI	P*
Giovani (<i>n</i> = 200)	30/200 (15,0 %)	12,6-17,7	< 0.0001
Adulti (<i>n</i> = 200)	96/200 (48,1 %)	44,6-51,6	
Totale (<i>n</i> = 400)	126/400 (31,6%)	29,3-33,9	

* = Test chi-quadro di Pearson; *n* = numero di conigli analizzati

BIBLIOGRAFIA – **Baneux**, P.J., Pognan, F., 2003. In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. *Lab. Anim.* 37:132-138. **Dipineto**, L., Rinaldi, L., Santaniello, A., Sensale, M., Cuomo, A., Calabria, M., Menna, L.F., Fioretti, A., 2008. Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Italy. *Zoonoses Pub. Health* 55:173-175. **Harcourt-Brown**, F.M., Holloway, H.K., 2003. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *Vet. Rec.* 152:427-431. **Keeble**, E.J., Shaw, D.J., 2006. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. *Vet. Rec.*, 158:539-544. **Künzel**, F., Gruber, A., Tichy, A., Edelhofer, R., Nell, B., Hassan, J., Leschnik, M., Thalhammer, J.G., Joachim, A., 2008. Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Vet. Parasitol.* 151:115-124. **Lyngset**, A., 1980. A survey of serum antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in breeding rabbits and their young. *Lab. Anim. Sci.* 30:558-561. **Mathis**, A., Weber, R., Deplazes, P., 2005. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:423-445. **Okewole**, E.A., 2008. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in 30 domestic rabbits in Nigeria. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 75:33-38. **Rossi**, P., La Rosa, G., Ludovisi, A., Tamburrini, A., Gomez Morales, M.A., Pozio, E., 1998. Identification of a human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* type I from Italy. *Int. J. Parasitol.* 28:1361-1366. **Scala**, A., Mula, P., Giobbe, M., Ferraretto, Z., Marrosu, R., Tittarelli, C., Lavazza, A., 2008. A preliminary seroepidemiological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in rabbit farms in Sardinia (Italy). *Parassitologia* 50:158. **Valencakova**, A., Balent, P., Petrovova, E., Novotny, F., Luptakova, L., 2008. Encephalitozoonosis in household pet Nederland Dwarf rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Parasitol.* 153:265-269. **Wasson**, K., Peper, R.L., 2000. Mammalian microsporidiosis. *Vet. Pathol.* 37: 113-128. **Weber**, R., Bryan, R.T., Schwartz, D.A., Owen, R.L., 1994. Human microsporidial infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 7:426-461.