

Risultati di una indagine sieroepidemiologica sulla diffusione del calicivirus apatogeno del coniglio (RCV) in animali alla macellazione

A. Lavazza^{1,4}, G. Perugini², M. Cerioli¹, A. Cerrone³, G. Botti⁴, L. Capucci⁴

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Laboratorio di Microscopia Elettronica; ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche. Sezione Diagnostica di Macerata, via dei Velini 11, 62100 Macerata; ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, via della Salute 2, 80055 Portici (Na) Italy; ⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Centro di Referenza OIE per le Malattie Emorragiche dei Lagomorfi

Corresponding Author: Dr. Antonio Lavazza, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Laboratorio di Microscopia Elettronica, via Bianchi 9, 25124 Brescia (Italy). Tel. +39 030 2290298 – Fax: +39 030 2290535 – Email: alavazza@bs.izs.it.

ABSTRACT: Results of seroepidemiological surveys for the detection of natural anti-RHD antibodies induced by the non-pathogenic rabbit calicivirus (RCV) in growing rabbits. *Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) is a non-cultivable calicivirus that infects rabbit and causes outbreaks of an acute fatal hepatitis. Another virus, named rabbit calicivirus (RCV), related to the RHDV, was identified in healthy rabbits in Italy in 1996. This virus is non-virulent, replicates in the intestine at a low titre and presents a 92% genomic identity with RHDV. In order to check the diffusion of RCV in Italian rabbit farms we conducted, along a 5 years period, a survey respectively in 39 farms in North Italy, 23 farms in Central Italy and 21 farms in South Italy, by testing non-vaccinated 80 day old growing rabbits at slaughterhouse. The results indicate the presence of “natural antibodies” presumably induced by RCV, i.e. over 75% of animals showing titres $\geq 1/20$, in almost 30% of farms controlled in North and South Italy, and in 52.2% of the farms controlled in Centre Italy.*

Keywords: Rabbit Calicivirus (RCV), diagnosis, seroepidemiological surveys, ELISA.

INTRODUZIONE – La malattia emorragica del coniglio (RHD) è stata segnalata in Italia nel 1986, è causata da un calicivirus, colpisce il coniglio selvatico e domestico ed è caratterizzata da una elevata contagiosità e mortalità (Capucci *et al.*, 1991). La possibile esistenza di uno o più ceppi virali non patogeni correlati antigenicamente a RHDV, ipotizzata sulla base dalla evidenza di anticorpi naturali in Europa fin dal 1975, prima cioè della comparsa di RHD, e in allevamenti indenni e mai vaccinati (Rodak *et al.*, 1990), ha trovato conferma nella identificazione in conigli sani di un altro virus, correlato a RHDV, chiamato Rabbit Calicivirus (RCV) (Capucci *et al.*, 1997). RCV è diverso da RHDV in termini di patogenicità (è privo di potere patogeno), di titolo virale e tropismo (replica a basso titolo a livello intestinale) e per la sequenza primaria delle proteine strutturali (omologia genomica del 92%). Dal momento che gli anticorpi verso RCV potrebbero conferire un livello di protezione variabile verso RHD, è stato suggerito il possibile ruolo di questi virus apatogeni RHDV-like nel ridurre l'impatto della malattia emorragica virale (Cooke *et al.*, 2002). Per controllare la diffusione di

RCV negli allevamenti italiani, abbiamo condotto tre indagini sierologiche nell'arco di un quinquennio effettuando prelievi di sangue in conigli da carne al momento della macellazione.

MATERIALI E METODI - L'indagine sieroepidemiologica è stata condotta in tre periodi separati (1999-2004) in altrettante aree geografiche. Sono stati campionati conigli di circa 80 gg effettuando almeno 35 prelievi di sangue al macello per ogni gruppo. In ogni campionamento notevole attenzione è stata usata al fine di scegliere gruppi omogenei di animali i.e. conigli provenienti dalla stessa unità e dallo stesso capannone, e registrare per ogni gruppo una anamnesi dettagliata e una completa descrizione dell'azienda. Il primo studio è stato condotto nel 1999 in un macello situato in Lombardia dove afferiscono animali provenienti da allevamenti della Lombardia e del Triveneto. In totale sono stati campionati 39 gruppi di conigli da altrettante aziende. La seconda indagine è stata condotta tra giugno 2002 e marzo 2003 in 5 diversi macelli situati in Campania dove sono macellati conigli provenienti da allevamenti situati in Campania, Basilicata and Lazio. Un totale di 45 gruppi di sieri sono stati prelevati da 21 diverse aziende, ogni azienda è stata controllata almeno una volta, fino ad un massimo di 4 volte. Il terzo studio è stato condotto nel 2004 in un macello delle Marche che riceve conigli provenienti da allevamenti situati nella stessa regione. Ogni azienda è stata monitorata una volta ed in totale sono stati prelevati sieri da 23 gruppi.

Il test sierologico usato si basa su di una ELISA competitiva (cELISA) (Capucci e Lavazza, 2004). Il fatto che già durante la fase della standardizzazione di tale test si fosse evidenziata la presenza di sieri classificati come positivi nonostante gli animali sembrassero sani e che questi sieri fossero strettamente correlati e si trovassero ripetutamente in particolari gruppi, è stato determinante nell'ipotizzare e poi dimostrare l'esistenza di RCV (Capucci *et al.*, 1996; 1997). Il test cELISA, inizialmente usato per la sierologia dell'RHDV, riconosce anche gli anticorpi indotti da RCV e, considerata l'elevata correlazione tra i due virus, è possibile predire una infezione con RHDV dall'inferenza dei risultati sierologici, solo se i titoli ELISA risultano molto alti (>1:1.280), andamento questo tipico della fase convalescente ma mai osservato in conigli infettati con il ceppo non-patogeno. Ad ogni modo, al fine di interpretare correttamente il dato sierologico ed ottenere una corretta classificazione dello stato immunologico dei conigli campionati, sono state utilizzate anche altri sistemi ELISA in grado di rilevare le sottoclassi di immunoglobuline, cioè gli anticorpi specifici IgG, IgA e IgM (Cooke *et al.*, 2002).

RISULTATI E CONCLUSIONI - I risultati dell'indagine sieroepidemiologica sono schematicamente riportati in Tabella 1. Durante la prima indagine (1999, Nord Italia) quasi tutti i conigli testati (>95%) di 24 dei 39 gruppi campionati sono risultati negativi alla ricerca degli anticorpi anti-RHDV. Questo risultato sembrava scontato dal momento che i conigli da carne non vengono solitamente vaccinati e gli anticorpi materni sono presenti al massimo fino a 45-50gg di età (Cooke *et al.*, 2002). Invece, più del 60% degli animali di 13 gruppi sono risultati positivi con titoli compresi tra 1/20-1/320, ossia titoli medio/bassi simili a quelli indotti da un intervento vaccinale, sebbene i dati anamnestici confermassero che non era comparso nessun focolaio di malattia negli allevamenti di origine da oltre un anno, né che i conigli macellati erano vaccinati verso RHDV. Nei restanti 2 gruppi di animali la percentuale di sieropositività era bassa (circa

5-10%), fatto questo che rende difficile una spiegazione plausibile circa la natura e l'origine dei titoli sierologici.

I sieri risultati positivi durante la seconda indagine (2002-2003, Centro-Sud Italia) sono stati 516 su 1786 (28,9%) e, analogamente al primo studio, i titoli erano tutti compresi tra 1/20-1/320, ad eccezione di sette sieri che mostravano titoli di 1/640-1/1280. In 2 delle 4 aziende positive tale positività è stata confermata a seguito di 3 campionamenti consecutivi nell'arco di 5 mesi. Anche negli 11 allevamenti negativi, con la sola eccezione di uno, la negatività è stata confermata a seguito di 2-4 controlli nell'arco di 5 mesi. In un'azienda è stato possibile osservare una sierconversione in quanto completamente negativa al primo controllo e positiva al successivo 6 mesi dopo. In 5 allevamenti la percentuale di positività era compresa tra 20 e 60%, e mentre per 3 di questi tale sieroprevalenza potrebbe derivare dal fatto che si trattavano di gruppi misti composti da animali provenienti da piccole unità semi-industriali, nei 2 restanti casi non vi erano apparenti spiegazioni sulla natura e origine di tali anticorpi.

Nel corso della terza indagine (2004, Italia Centrale) sono stati esaminati 831 sieri di cui 474 (57,04%) sono risultati positivi. Dodici (52,2%) dei 23 allevamenti erano positivi (<75% dei capi sieropositivi) mentre 7 (30,4%) allevamenti erano negativi (100% animali sieronegativi). Anche in questa terza fase in 4 (17,4%) allevamenti si sono avuti risultati dubbi con una percentuale variabile di animali positivi: in 2 allevamenti il 5-10% e in altri 2 il 20-60%. I titoli positivi erano compresi tra 1/20-1/640 con una maggior percentuale di soggetti (19,4%) con un titolo di 1/80. Nove sieri avevano un titolo di 1/1280 e 2 un titolo di 1/2560.

Tabella 1: Risultati delle indagini sieropeidemiologiche per anticorpi anti-RCV

Risultati sierologici	Criteri applicati	N. gruppi (%)		
		Nord 1999	Centro-Sud 2002-03	Centro 2004
Positivi	> 75% di positivi	13 (33,3%)	4 (19,1%)	12 (52,2%)
Dubbi	5-10% di positivi	2 (5,2%)	0 (0%)	2 (8,7%)
	20-60% di positivi	0 (0%)	5 (23,8%)	2 (8,7%)
Sieroconversione	da 0% a >75% di positivi	0 (0%)	1 (4,7%)	0 (0%)
Negativi	> 95% di negativi	24 (61,5%)	11 (52,4%)	7 (30,4%)
Totale		39	21	23

I risultati ottenuti testando con i metodi ELISA anti-isotipo i soli sieri positivi alla cELISA (dati non mostrati) ed in modo particolare la presenza di anticorpi della sottoclasse IgA, in alcuni sieri anche ad elevato titolo, sono la prova inconfutabile, anche in assenza di identificazione diretta del virus RCV, che gli anticorpi riscontrati in conigli alla macellazione sono l'esito di una immunizzazione attiva da agente infettivo e non anticorpi materni di origine passiva (di solito IgG) o indotti da vaccinazione (essendo somministrato per via parenterale il vaccino non induce IgA). Da notare infine che in due aziende sono state evidenziate IgM, sempre in associazione con titoli IgA bassi ma presumibilmente in fase di aumento.

In conclusione, i risultati dell'indagine condotta al fine di investigare la sieroprevalenza verso il virus non-patogeno RCV mostrano chiaramente che la risposta anticorpale verso RHDV è presente in alcune popolazioni di conigli provenienti da diverse regioni italiane e che la distribuzione del virus RCV è radicata e costante sin dal 1999. Si ritiene che gli anticorpi indotti da RCV siano protettivi verso RHDV e possano interferire con

l'infezione o il corso della malattia: vi è infatti una chiara correlazione tra il titolo anticorpale e lo stato di protezione in quanto conigli con titoli anticorpali maggiori o uguali a 1/10 rilevati con cELISA, non mostrano alcun segno di malattia se infettati con un ceppo patogeno di RHDV (Lavazza e Capucci, osservazioni personali).

BIBLIOGRAFIA – **Capucci, L.**, Fusi, P., Lavazza, A., Pacciarini, M.L., Rossi C., 1996. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit haemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J. Virol.* 70: 8614–8623. **Capucci, L.**, Lavazza A., 2004. Chapter 2.8.3. "Rabbit Haemorrhagic Disease", in "Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals". 5° edizione. OIE, Paris pp. 950-962. **Capucci, L.**, Nardin, A., Lavazza, A., 1997. Seroconversion in an industrial unit of rabbits infected with a non-pathogenic rabbit haemorrhagic disease-like virus. *Vet. Rec.* 140: 647–650. **Capucci, L.**, Scicluna, M.T., Lavazza, A., 1991. Diagnosis of viral hemorrhagic disease of rabbits and European brown hare syndrome. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 10: 347-370. **Cooke, B.D.**, McPhee, S., Robinson, A.J., Capucci, L., 2002. Rabbit haemorrhagic disease: does a pre-existing RHDV-like virus reduce the effectiveness of RHD as a biological control in Australia?, *Wildl. Res.* 29: 673-682. **Rodak, L.**, Smid, B., Valicek, L., Vesely, T., Stepanek, J., Hampl, J., Jurak, E., 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus and determination of its major structural proteins. *J. Gen. Virol.* 71: 1075-1080.