

“La gestione di specie e habitat per riqualificare i sistemi insulari “
“Management of species and habitats for the restoration of island ecosystems”

Portoferraio, 10 - 12 dicembre 2019 / 10 - 12 December 2019



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
“BRUNO UBERTINI”
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO
OIE Reference Laboratories for Rabbit
Haemorrhagic Disease and for Myxomatosis

OUR EXPERIENCE,
YOUR SAFETY.

REPORT SU ATTIVITA' DI CONTROLLO SANITARIO SU LEPRI PROVENIENTI DALL'ISOLA DI PIANOSA, ARCIPELAGO TOSCANO



Antonio LAVAZZA,
Patrizia CAVADINI, Lorenzo CAPUCCI, Valter TROCCHI, Francesca GIANNINI



- Le indagini diagnostiche sono state condotte su campioni di lepri provenienti dall'isola di Pianosa conferiti a partire dal 2015

- Il primo gruppo di 5 lepri (**2015/97270**) è pervenuto ad **aprile 2015**
 - Le carcasse all'esame necroscopico presentavano lesioni riferibili a predazione (lesioni lacerocontuse, emotorace etc.)
 - Tutte avevano una carica medio bassa di Coccidi
 - Le analisi per lagovirus (EBHS) sono risultate negative per la ricerca di virus e in un solo soggetto è stata rilevata una positività sierologica con titolo molto basso (1:20)



- A **dicembre 2015** sono stati conferiti 7 sieri (**2015/357451**) ed una carcassa (**2016/357303**)
 - L'analisi sierologica ha evidenziato la presenza a basso titolo (1:10-1:20) di anticorpi anti EBHSV in 5 lepri e di titoli per anticorpi anti-RHDV (cross reattivi?) in 3 animali
 - Alla necropsia della carcassa è stata evidenziata una polmonite con epatizzazione grigia dei lobi apicali e medi e splenomegalia.
 - L'esame virologico per lagvirus (EBHS) è risultato negativo mentre dall'intestino è stata rilevata **la prima positività (in RT-PCR con primer "lagovirus") per HaCV il ceppo non patogeno della lepre**, che è stato successivamente sequenziato e analizzato in confronto con gli altri HaCV isolati in Italia e all'estero dal 2012 al 2017, con i quali forma un cluster unico



- A **Marzo 2016** sono stati conferiti 18 sieri (**2016/71705**).
 - le analisi sierologiche per Brucellosi, Tularemia e Toxoplasma sono risultate costantemente negative.
 - l'analisi per anticorpi anti-EBHSV ha rilevato positività basse in 6 soggetti, quella per MEV/RHDV2 in due campioni e quella per RHDV "classico" in un solo campione
 - alcuni di questi soggetti erano positivi in un test ELISA per HaCV preparato con antigene specifico espresso in baculovirus



- Nel **2018** sono state conferite 9 lepri (**2018/103380**)
 - L'esame necroscopico ha evidenziato perlopiù lesioni traumatiche (ematomi sottocutanei, emotorace, emoperitoneo, lacerazioni cutanee e muscolari, fratture ossee) attribuibili a predazione
 - In due soggetti era presente polmonite, in due soggetti splenomegalia ed in una congestione poliviscerale.
 - L'esame batteriologico ha permesso l'isolamento di *Pasteurella* ssp dal polmone in un soggetto e un *E. coli* setticemico in un'altra lepre
 - Negativi gli esami parassitologici da intestino, virologici per EBHS da fegato e la ricerca di *Toxoplasma* da milza
 - Anche in questo caso un soggetto giovane (n°4) è risultato positivo per il lagovirus non patogeno HaCV



Ad **inizio 2019**

- Gruppo di 27 lepri del 2016 (**2019/55325**)
 - ricerca di anticorpi anti-EBHS con esito di positività con valori basi (1:10-1:40) in 12 soggetti su 26.
 - ricerca di virus non patogeno è risultata positiva in 1 campione su 9 testati
- Gruppo di 15 lepri del 2018 (**2019/55357**)
 - ricerca di anticorpi anti-EBHS sono con esito di positività con valori basi (1:10-1:40) in 5 soggetti su 15
 - ricerca di virus non patogeno con riscontro di un'ampia positività (12 su 15)



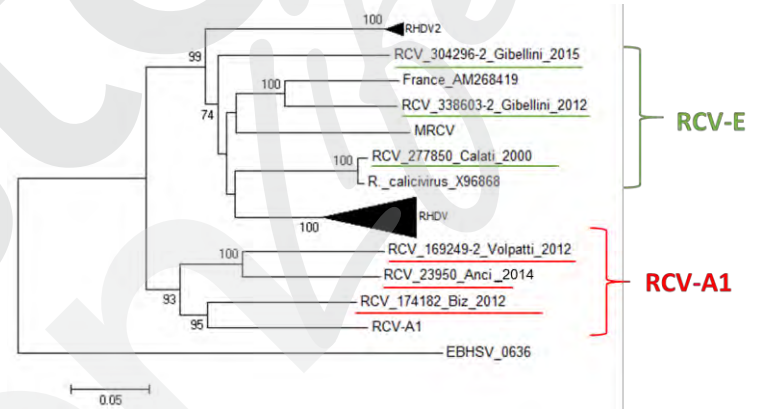
Lagovirus non-patogeno nella lepre



L'esistenza di lagovirus non patogeni nel coniglio in Europa (RCV-E), e Australia (RCV-A1) ha indotto a **ipotizzare** la possibile esistenza di un lagovirus non patogeno anche nelle lepri. Ipotesi suffragata da dati sierologici

Nel 2012 identificato per la prima volta in RT-PCR utilizzando primers universali per lagovirus [Strive et al., 2009 Virology, 384(1), 97-105] nell'intestino di lepri selvatiche e di allevamento in provincia di Brescia

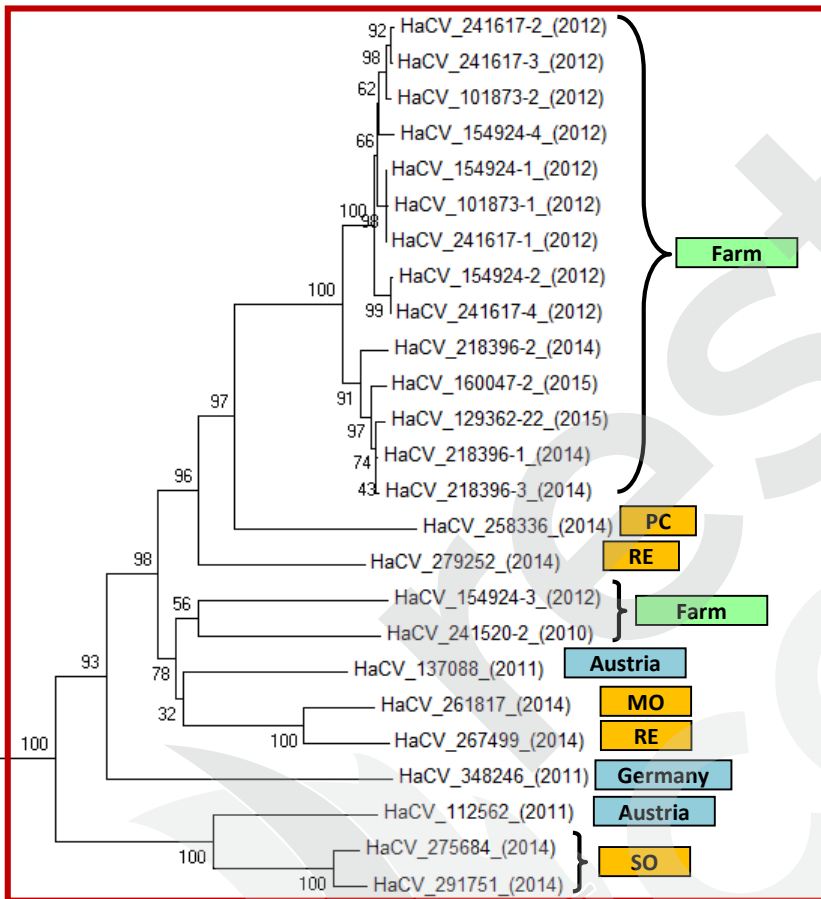
RCVs identificati in aziende industriali di conigli in Italia



Questo nuovo lagovirus è stato denominato “Hare Calicivirus (HaCV)”



Lagovirus non-patogeno nella lepre



L'analisi genomica e filogenetica indica che tutti i ceppi del nuovo virus si raggruppano insieme formando un ramo separato rispetto a EBHSV

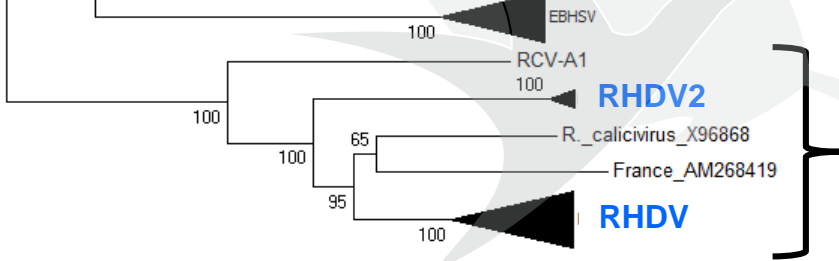
Identità con EBHSV
nt ~ 73%
aa ~ 82%

P2 sottodominio esterno



nt ~ 67%
aa ~ 73%

Nessun apparente evento di ricombinazione tra HaCV e altri lagovirus



Identità con RHDV
RCV-E1: ~ nt 85.0% aa 91.0%
RCV-A1: ~ nt 79.5% aa 86.2%

0.05



1. Sono probabilmente I precursori dei virus virulenti
 - 1984 (?) Conigli d'Angora dall'Europa alla Cina → primo caso di RHDV virulento
 - 1980 (~) Primo "improvviso" caso di EBHS in Paesi Scandinavi
2. Se questo è vero i possibili meccanismi sono [Esteves et al., (2015) PLoS Pathog 11(11): e1005087]:
 - Mutazioni adattative
 - Eventi di ricombinazione con altri lagovirus
 - A seguito di un "salto di specie" (es. minilepre)
3. Sono in grado di indurre livelli variabili di cross-protezione verso virus virulenti
 - Fine XIX sec: lagovirus(es) non patogeni in Europa e da qui all'Oceania/Sud America → evoluzione di lineaggi distinti più o meno capaci di indurre Abs cross-protettivi (RVC-E vs RCV-A1)
4. Possono avere un impatto sulla epidemiologia di RHD e EBHS
 - Particolarmente negli animali selvatici
5. Non può essere esclusa l'esistenza di "reservoir" (lagomorfi e/o altre specie)
 - Sono necessari metodi sierologici con più elevata sensibilità e capaci di distinguere i differenti anticorpi



Conclusioni



- Gli esami di laboratorio da noi condotti in questi hanno consentito di escludere sull'isola di Pianosa la presenza di lagovirus patogeni (EBHSV e RHDV/RHDV2)
- Al contrario sembra piuttosto diffuso nella popolazione locale un lagovirus non patogeno (HaCV) geneticamente molto simile ai ceppi presenti nel resto d'Italia e anche in Europa. Tale virus potrebbe dunque avere un'origine ancestrale ed essere presente nella popolazione isolana da moltissimo tempo
- Anche la sierologia depone per la presenza di titoli riconducibili alla presenza del lagovirus non patogeno, ancorché siano stati rilevati a basso titolo con test non specifici per altri lagovirus (EBHSV/ RHDV/RHDV2) e solo in alcuni casi confermati con un test ELISA indiretto basato sull'utilizzo di un antigene ricombinante HaCV
- L'esame necroscopico sulle carcasse pervenute non ha svelato quadri patologici peculiari ma anzi casi comuni a quanto si osserva comunemente in lepri a vita libera (polmoniti, setticemie, quadri di enterite)
- E' apparso altresì evidente che nella quasi totalità dei casi la morte degli animali era da attribuire a predazione