

Myxomatosi del coniglio: il contributo del laboratorio diagnostico alla gestione e controllo della malattia sul territorio

Capucci L.¹, Cavadini P.¹, Botti G.¹, Brivio R.², Grilli G.³, Lavazza A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini" Reparto di Proteomica e Centro Nazionale di Referenza per le Malattie Virali dei Lagomorfi, Brescia, Italy. ²Servizio SATA, Regione Lombardia, Italy.

³Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Milano, Italy

Corresponding Author: Lorenzo Capucci, Reparto Proteomica, IZSLER, Via Bianchi 9, 25124 Brescia, Italy - Tel. +39 030 2290671 - Fax: +39 030 2290 559 - Email: lorenzo.capucci@izsler.it

ABSTRACT: Rabbit Myxomatosis: the role of the diagnostic laboratory for the managing and control of the disease on the field. Myxomatosis still represents one of the main health problems of farmed, wild and rural rabbits. This is also due to the complexity of its aetiological agent; in fact, only recent studies have partially shown the genomic organization and function of the 171 proteins, which the myxomavirus, a member of the Poxviridae family, genus *Leporipoxvirus*, expresses during the various stages of infection. These data have direct and positive effects on the improvements of diagnostic methods. In particular, molecular biology and genotyping techniques make possible to quickly get diagnostic results and to precisely differentiate vaccine from wild strains.

Key words: Genotyping, Laboratory diagnosis, Myxomatosis, Serology.

INTRODUZIONE – La storia della myxomatosi in Europa data al 1952, quando il virus fu deliberatamente rilasciato in Francia per ridurre l'elevata e dannosa presenza di conigli selvatici. Per lo stesso motivo la malattia era già stata introdotta in Australia nel 1950. L'esperienza acquisita sul campo ha poi mostrato come il continuo rapporto virus-ospite porti alla selezione sul campo di ceppi del virus della myxomatosi meno virulenti e di una popolazione cunicola geneticamente più resistente all'infezione. La conseguenza è l'attuale circolazione sul territorio di ceppi a diverso grado di patogenicità che, in relazione alle caratteristiche della popolazione cunicola (genetica, situazione immunitaria, densità, ecc) e ambientali (stagione, umidità, ecc), si alternano negli anni. Per esempio, proprio quest'anno nel Nord Italia si è registrato un inusuale elevato numero di focolai di mixomatosi (oltre 45 positività accertate) nella popolazione selvatica, rurale e presumibilmente, pur in assenza di denunce, anche negli allevamenti industriali, con elevati tassi di mortalità. Alla base del "problema" myxomatosi, vera e continua minaccia e talora piaga per gli allevamenti del settore, vi sono le caratteristiche del suo agente eziologico; infatti, tra tutti i virus, l'agente della myxomatosi (famiglia *Poxviridae*, genere *Leporipoxvirus*) è fra i più complessi ed evoluti. Il genoma del virus è a DNA ed è costituito da 171 geni. All'incirca 70 di questi codificano per proteine non essenziali per la replicazione del virus ma fondamentali per la regolazione dei rapporti con l'ospite. Queste proteine sono suddivise, sulla base della funzione nell'ospite, in diverse sottofamiglie che interferiscono con: 1) la risposta immunitaria dell'ospite riducendone l'efficacia; 2) il processo di apoptosi (suicidio della cellula), che s'innesci naturalmente non appena le cellule vengono infettate dai virus al fine di

limitarne la replicazione/sopravvivenza; 3) l'attività di macrofagi e linfociti T, cellule fondamentali sia per l'attivazione dell'immunità innata che specifica. La presenza di queste proteine e la loro azione sinergica e modulata, sono causa prima dei meccanismi di patogenesi dell'infezione e del decorso della malattia in termini più o meno gravi. Infatti, la fase finale dell'infezione è spesso caratterizzata da mortalità, legata all'immunosoppressione complessiva e protratta dell'animale, che favorisce l'istaurarsi d'infezioni batteriche, causa ultima di morte. E' quindi facile dedurre che anche la diagnosi della mixomatosi, nel senso avanzato del termine e non della mera diagnosi di malattia, sia un processo complesso. Di seguito si espone sinteticamente quanto è oggi possibile fare in termini di diagnosi di laboratorio quale supporto e aiuto per il controllo e la gestione della malattia in campo.

MATERIALI E METODI – Per i dettagli metodologici essenziali su gli esempi diagnostici riportati si veda la legenda delle figure.

RISULTATI E CONCLUSIONI – Sierologia della myxomatosi. Il livello serico di anticorpi specifici per il virus della mixomatosi non è indice di protezione dalla malattia come invece lo è, per esempio, nel caso della malattia emorragica virale. Nonostante ciò, l'analisi sierologica mantiene una sua indubbia utilità diagnostica, quantomeno a due livelli: 1) consente di monitorare l'efficacia della profilassi vaccinali, nei meri termini di controllo di un'avvenuta risposta immunitaria specifica; 2) nei casi di allevamenti, vaccinati e non, in cui è subentrato il virus patogeno, in congiunzione con la clinica, può essere d'aiuto nel definire il rapporto infetti/malati e quindi stimare il grado di "patogenicità" del ceppo virale o, nel caso di animali vaccinati, il livello complessivo di protezione acquisito dalla popolazione. Dal punto di vista metodologico le tecniche ELISA, potenziate dall'utilizzo di Anticorpi Monoclonali (AcM), sono quelle più utilizzate. Attualmente la reazione in uso presso il CReMaViLa è una reazione di competizione verso la proteina 71L (proteina immunodominante dell'envelope) fra le più immunogene e per la quale si dispone di AcM specifici (Botti *et al.*, 2007). La reazione ha un'elevata specificità e sensibilità e consente in una buona parte dei casi e sulla base dei titoli rilevati, di distinguere gli animali con infezione recente da quelli vaccinati (Lavazza *et al.*, 2004). Diagnosi classica. La ricerca del virus per la diagnosi eziologica di myxomatosi dispone di vari metodi, tutti di sufficiente sensibilità diagnostica e ciò poiché nelle lesioni classiche (noduli) il virus è presente in concentrazioni elevate. Metodi diretti sono l'immunofluorescenza sul tessuto o impronte congiuntivali, come pure reazioni ELISA entrambe basate anche sull'uso di AcM specifici. L'osservazione al microscopio elettronico in colorazione negativa è pure metodo affidabile grazie alle dimensioni e alla tipica morfologia del virus. L'amplificazione del virus su colture cellulari idonee rimane uno dei metodi più sensibili da utilizzarsi anche per ricerca di virus a concentrazioni ridotte come, per esempio, nei casi di myxomatosi atipica, anche partendo da tamponi



Figura 1 – Virus della mixomatosi evidenziato in immuno-perossidasi.

Isolato da campo amplificato su cellule RK13. Dopo fissazione, le cellule sono incubate prima con un pool di AcM anti-myxomavirus e successivamente con un anti-IgG topo HRP.

oculari. Il metodo è però costoso e “lento” poiché prevede, in relazione alla concentrazione del virus e del ceppo, ripetuti passaggi cellulari che richiedono nel complesso sino a 5-6 giorni di lavoro ed osservazione. La specificità dell’amplificazione del virus su cellule può essere poi confermata con metodi immunologici, il più classico ed immediato dei quali è l’immunoperossidasi. Anche in questo caso l’utilizzo di AcM specifici è assai vantaggioso in termini specificità e sensibilità (Figura 1). Diagnostica virologica avanzata. Come per gli altri sistemi virali, anche nel caso della myxomatosi l’introduzione delle tecniche di biologia molecolare costituisce un potente strumento sia per la diagnosi ma ancor di più per il successivo studio di caratterizzazione degli isolati. Infatti, l’ampio genoma di DNA del virus, la cui sequenza completa è disponibile in banca dati per i ceppi Lausanna e per il ceppo vaccinale SG33 e in parte per il ceppo vaccinale Borghi, si presta ad amplificazioni *in vitro* dirette sia mediante le classiche PCR che in Real-Time PCR. Nel primo caso il frammento di DNA che si ottiene può essere direttamente sequenziato per conferma diagnostica o studi di caratterizzazione, mentre con la Real-Time, oltre a diminuire i rischi di contaminazione fra campioni in analisi, è possibile quantizzare il numero di genomi presenti nel campione (titolazione virale). In figura 2 è riportato un esempio applicativo. A seguito del sequenziamento del genoma del virus tra i geni M143-M144, sono state identificate più mutazioni specifiche del solo genoma dei ceppi vaccinali SG33 e Borghi. Di conseguenza è stato possibile sviluppare una PCR diagnostica in grado di differenziare i ceppi di virus di campo dai ceppi vaccinali. I risultati sono stati ottenuti con la coppia di primers: A) specifici per il gene M071 amplificabile in tutti i ceppi; B) specifici per il ceppo vaccinale SG33; C) specifici per il ceppo vaccinale Borghi.

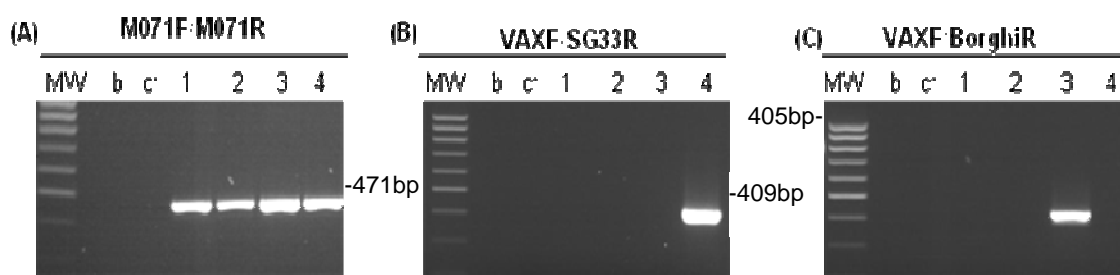


Figura 2 – Uso della PCR nella diagnosi differenziale della myxomatosi (Linee 1-4: prodotti ottenuti dall’amplificazione di DNA estratto da: 1) un ceppo del campo, 2) ceppo di riferimento Moses, 3) ceppo vaccinale Borghi, 4) ceppo vaccinale SG33. MW. Markers, b: bianco, c: controllo negativo. Con la PCR: (A) si amplifica un frammento di 471bp in tutti i campioni analizzati (PCR diagnostica per la presenza del virus); (B) si amplifica un frammento di 409bp per il solo ceppo vaccinale SG33; (C) si amplifica un frammento di 405bp per il solo ceppo vaccinale Borghi).

BIBLIOGRAFIA – Botti, G., Lavazza, A., Cristoni, S., Brocchi, E., Capucci, L., 2007. Sviluppo e standardizzazione di un test ELISA per la sierologia della mixomatosi. In: Atti Giornate di Coniglicoltura ASIC 2007, Forlì, Italy, p. 139. Cavadini, P., Botti, G., Barbieri, I., Lavazza, A., Capucci, L., 2010. Molecular characterization of SG33 and Borghi vaccines used against myxomatosis. *Vaccine* 28:5414-5420. Lavazza, A., Graziani, M., Tranquillo, V.M., Botti, G., Palotta, C., Cerioli, M., Capucci, L., 2004. Serological evaluation of the immunity induced in commercial rabbits by vaccination for Myxomatosis and RHD. In: Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico, pp. 569-575. Stanford, M.M., Werden, S.J., McFadden, G., 2007. Myxoma virus in the European rabbit: interaction between the virus and its susceptible host. *Vet. Res.* 38:299-318.