



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E
SALUTE

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in Medicina
Veterinaria

Studio di alcune infezioni nei cinghiali del Parco
Regionale dei Colli Euganei

Relatore
Prof. Marco Martini
Correlatore
Dott. Giorgio Ziron

Laureando
Federico Franchini
Matricola n.
612450

ANNO ACCADEMICO 2013/2014

INDICE:

INTRODUZIONE	6
1. IL CINGHIALE (<i>Sus scrofa</i>)	8
1.1 SISTEMATICA E DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA	8
1.2 MORFOLOGIA E CARATTERISTICHE DI SPECIE	10
1.3 ECOLOGIA E STRUTTURA SOCIALE	12
1.4 DETERMINAZIONE DELL'ETA'	14
2. L'AREA DI STUDIO.....	18
2.1 IL PARCO REGIONALE DEI COLLI EUGANEI	18
2.2 IL CINGHIALE DEI COLLI EUGANEI	19
2.3 ALLEVAMENTI DI SUINI NELL'AREA DI STUDIO	22
3. PSEUDORABBIA-MALATTIA DI AUJESZKY	24
3.1 EZIOLOGIA	24
3.2 EPIDEMIOLOGIA.....	26
3.3 PATOGENESI	30
3.4 SEGNI CLINICI E LESIONI.....	31
3.5 IMMUNITA'	35
3.6 DIAGNOSI	35
3.7 PREVENZIONE E CONTROLLO.....	37
4. SINDROME RIPRODUTTIVA E RESPIRATORIA SUINA (PRRS)	40
4.1 EZIOLOGIA.....	40
4.2 EPIDEMIOLOGIA.....	41
4.3 PATOGENESI.....	45
4.4 SEGNI CLINICI E LESIONI.....	46
4.5 IMMUNITA'	49
4.6 DIAGNOSI	50
4.7 PREVENZIONE E CONTROLLO.....	52
5. EPATITE E	55
5.1 EZIOLOGIA.....	55
5.2 EPIDEMIOLOGIA.....	56
5.3 PATOGENESI.....	60

5.4 SEGNI CLINICI E LESIONI	60
5.5 IMMUNITA'	61
5.6 DIAGNOSI.....	62
6. LEPTOSPIROSI.....	65
6.1 EZIOLOGIA	65
6.2 EPIDEMIOLOGIA	67
6.3 PATOGENESI	72
6.4 SEGNI CLINICI E LESIONI	73
6.5 IMMUNITA'	75
6.6 DIAGNOSI.....	75
6.7 PREVENZIONE E CONTROLLO	77
7. MATERIALI E METODI.....	79
7.1 CAMPIONAMENTO	79
7.2 PROCESSAZIONE.....	80
7.3 ANALISI SIEROLOGICHE	81
7.4 ANALISI STATISTICHE	82
8. RISULTATI	84
9. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	92
BIBLIOGRAFIA:	100
SITOGRAFIA:	111
RINGRAZIAMENTI.....	113

INTRODUZIONE

Il presente studio sulla popolazione di cinghiali del Parco Regionale dei Colli Euganei rappresenta una riproposizione dell'indagine condotta nel 2008 nella medesima area (Lucchese, 2008), con la finalità di valutare l'evoluzione nel corso del tempo della situazione sanitaria. Il cinghiale nel Parco Colli, dalla sua introduzione abusiva nell'area a fine anni '90, è cresciuto, come popolazione, in maniera indisturbata e incontrollata fino al 2003, anno in cui è iniziato il programma di controllo di tale popolazione tramite abbattimento. Nell'area di studio vi è la possibilità di contatto tra suini ivi allevati e i cinghiali stessi.

Le analisi sierologiche, i cui risultati sono oggetto di questo studio, sono volte all'eventuale identificazione della presenza della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina (PRRS), della malattia di Aujeszky, dell'epatite E e della leptospirosi nella popolazione di cinghiali presente nel Parco. PRRS ha un forte impatto economico nell'ambito della suinicoltura ed è un'infezione di difficile controllo e gestione una volta introdotta in un territorio. La malattia di Aujeszky oltre all'impatto economico sulla produzione suina, e oltre ad essere mortale in tutte le specie escluse *Sus scrofa* e i primati, è stata eradicata in molti Paesi dell'Unione Europea ed è sottoposta in Italia ad un Piano Nazionale di Controllo. L'epatite E e la leptospirosi non erano state indagate nello studio effettuato nel 2008, ma considerata la natura di zoonosi emergenti di queste due infezioni, è sembrato adeguato includerle tra le infezioni oggetto della ricerca.

1. IL CINGHIALE (*Sus scrofa*)

Classe: Mammiferi

Superordine: Ungulati (*Ungulata*)

Ordine: Artiodattili (*Artiodactyla*)

Sottordine: Suiformi (*Suiformes*)

Famiglia: Suidi (*Suidae*)

Sottofamiglia: Suini (*Suinae*)

Genere: *Sus*

Specie: *Sus scrofa*



1.1 SISTEMATICA E DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA

Il cinghiale è un mammifero appartenente alla specie *Sus scrofa*, così come il suino domestico, da cui si differenzia per il numero di cromosomi, 38, anziché 36, ma con cui può incrociarsi generando individui fertili (Massei & Genov, 2000). Questa parentela rende il cinghiale, un ospite suscettibile alle infezioni e malattie parassitarie che interessano il suino domestico (Ruiz-Fons et al., 2008a).

Sus scrofa rappresenta la specie a più vasta distribuzione geografica tra le specie del genere *Sus*: l'areale di questo animale, infatti, copre gran parte del continente eurasiatico ed include anche l'Africa settentrionale. Inoltre dalla seconda metà dell'800, *Sus scrofa* ha colonizzato ampie aree del Nuovo Mondo, l'Australia e alcune isole del Pacifico: questo grazie all'importazione in queste zone di cinghiali provenienti dal nostro continente e dal ritorno allo stato selvatico di suini domestici, introdotti dagli europei (Massei & Toso, 1993).

La sistematica del cinghiale, a livello di suddivisione in sottospecie, risulta fortemente influenzata dall'incrocio di cinghiali con suini domestici e dall'incrocio tra forme evolutesi in aree geografiche ed ambienti differenti, in seguito ad introduzioni operate dall'uomo. Questo ha portato alla nascita di prole dalle caratteristiche morfologiche e genetiche intermedie (Massei & Genov, 2000; Massei & Toso, 1993). Queste relazioni tra cinghiale e suino, oltre ad aumentare la possibilità di diffusione di agenti patogeni tra le due specie, ha portato all'instaurarsi di una maggiore efficienza riproduttiva negli "ibridi" con conseguente

maggiore incremento della popolazione di cinghiali e del loro impatto ambientale (Roic et al., 2012, in Croazia, hanno rilevato che, in media, una femmina di cinghiale partorisce 7,7 suinetti per figliata). Oltre al cinghiale vero e proprio, va sottolineata, inoltre, l'esistenza di "maiali selvatici", presenti soprattutto in USA in maniera consistente: essi derivano dall'incrocio tra cinghiali importati dall'Europa e suini rilasciati nell'ambiente. Gli ibridi derivanti sono simili nell'aspetto ad un vero cinghiale (Müller et al., 2011).

La distribuzione del cinghiale in Europa sembra essere limitata solo dalla presenza di inverni molto rigidi, caratterizzati da molti giorni ad elevato innevamento, che impediscono agli animali spostamenti efficaci e reperimento di cibo in sufficiente quantità.

Il cinghiale, nell'ultimo trentennio, è andato incontro ad una esplosione demografica in tutto il territorio europeo. Questo si può spiegare, oltre che grazie alla grande adattabilità ecologica di questa specie e alla capacità di sfruttare ambienti anche fortemente antropizzati, prendendo in considerazione diversi fattori: l'abbandono delle campagne che ha portato ad un miglioramento delle condizioni ambientali locali necessarie alla specie, mancanza di predatori naturali, foraggiamento artificiale e limitazione della pressione venatoria (Massei & Toso, 1993). Questa grande espansione numerica delle popolazioni di cinghiali in Europa (e non solo) porta alla ribalta questi animali come possibili fonti d'infezione per la controparte domestica: se da un lato, le norme di biosicurezza e la tipologia dell'allevamento suino moderno rendono altamente improbabile un contatto tra animali selvatici e domestici, dall'altro lato, soprattutto nei Paesi mediterranei, l'allevamento estensivo, all'aperto ed allo stato brado del suino, per la produzione di prodotti tipici della tradizione locale, rende queste popolazioni altamente a rischio di contrarre infezioni dai cinghiali. Ci sono diversi studi effettuati sul cinghiale come possibile *reservoir* di infezioni trasmissibili al suino, ma, nonostante vi siano state riscontrate le più importanti malattie infettive del suino, non si è ancora giunti all'identificazione di un ruolo chiaro del cinghiale nell'epidemiologia di alcune infezioni: se per la Peste Suina Classica esso è accertato essere un *reservoir*, per altre infezioni come la Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina il suo ruolo deve ancora essere indagato a fondo.

Per quanto riguarda il cinghiale in Italia, esso in tempi storici era diffuso in gran parte del territorio nazionale, ma, dalla fine del 1500, la persecuzione di cui venne fatto oggetto, ne portò alla progressiva rarefazione ed estinzione a livello locale. Esso scomparve dal Trentino nel XVII secolo, dal Friuli e dalla Romagna nel XIX secolo e dalla Liguria nel 1814; tra gli anni

1930 e 1950 scomparvero le ultime popolazioni viventi sul versante adriatico dell'Italia. Nel secondo dopoguerra si è assistito ad un fase di forte crescita della popolazione di cinghiali anche in Italia. Nel nostro Paese, tuttavia, un ruolo fondamentale nell'incremento demografico di *Sus scrofa*, lo ha avuto l'introduzione di grossi contingenti di animali provenienti dalla cattura soprattutto in Ungheria, Cecoslovacchia e Polonia. Questi esemplari si sono incrociati con i residui cinghiali autoctoni e con le locali popolazioni di maiali bradi e, successivamente, con cinghiali provenienti da allevamenti nel frattempo sviluppatisi (per la produzione di animale da carne o da ripopolamento) (Massei & Toso, 1993). In Italia la specie è distribuita, senza soluzione di continuità, dalla Valle d'Aosta sino alla Calabria, in Sardegna, in Sicilia come frutto di immissioni assai recenti e, con modalità più frammentarie e discontinue, in alcune zone prealpine e montane in Lombardia, Veneto, Trentino e Friuli (Massei & Genov, 2000). Nella nostra penisola, ad oggi, sarebbero presenti non meno di 600.000 capi (Carnevali et al., 2011).

1.2 MORFOLOGIA E CARATTERISTICHE DI SPECIE



Figura 1: Esemplare adulto di cinghiale.

Il cinghiale è un animale robusto e resistente, dal corpo tozzo, dagli arti corti, dotati di zoccoli tipici degli ungulati (evoluzione del terzo e quarto dito che costituiscono gli zoccoli più grossi e robusti, mentre i due zoccoli laterali, evoluzione del secondo e quinto dito, sono più corti e poggiano solo quando l'animale cammina su terreni soffici o fangosi), e con

spostamento del peso sul treno anteriore, più basso del posteriore soprattutto nel maschio. La testa, dall'aspetto allungato e di notevoli dimensioni, è sorretta dalla possente muscolatura del collo e termina con il grifo, o grugno, cartilagineo, che poggia su un disco muscolare, assicurandogli così grande mobilità e precisione. L'animale utilizza il grifo, grazie all'olfatto e alla sensibilità tattile molto sviluppati, per la ricerca del cibo e per scavare (Massei & Genov, 2000).

La durata di vita si attesta su un massimo di 12 anni, ma nelle zone in cui sono specie oggetto di caccia la vita media si attesta sui 23 mesi (Massei & Genov, 2004).

Gli adulti pesano tra 35 e 200 kg a seconda dell'areale di distribuzione (gli individui più piccoli nei Paesi mediterranei, i più grossi nelle aree situate più a nord-est dell'areale di distribuzione della specie) con differenze tra i sessi: il maschio adulto può avere un peso variabile dagli 80 kg ai 200 kg per un'altezza al garrese di 75-115 cm, mentre la femmina adulta, di dimensioni più piccole, può pesare dai 60 kg ai 150 kg per un'altezza al garrese di 60-105 cm. Le dimensioni corporee sono uno dei principali caratteri distintivi tra i sessi insieme ai canini a crescita continua (coti i canini superiori, zanne o difese gli inferiori, che si presentano molto sviluppati nel maschio) e al ciuffo di peli (pennello penico) con cui termina la guaina del pene nel maschio.

La cute è spessa e ricoperta da un mantello di colore bruno più o meno scuro, con ampia variabilità individuale di tonalità, costituito da setole lunghe e ispide e da un folto sottopelo. La colorazione del manto varia a seconda dell'età: i piccoli fino a quattro mesi sono riconoscibili per la caratteristica striatura sul dorso a strisce longitudinali color crema (da cui la denominazione di "striati"), mentre i giovani fino ad un anno di età presentano una colorazione rossiccia, che viene mantenuta fino alla primavera successiva a quella di nascita (da cui la denominazione "rossi"). Dalla sommità della testa dell'animale a metà della lunghezza del tronco è presente, inoltre, una criniera con setole lunghe fino a 15 cm che può venire alzata in caso di pericolo o nei combattimenti tra maschi, per dare all'animale un aspetto più minaccioso.



Fig. 2: Esemplare con colorazione rossiccia del mantello (un "rosso").

Il cinghiale è un monogastrico onnivoro dalla spiccata capacità di adattamento. La sua dieta è costituita, per l'80-90%, da frutti, semi, bacche, radici, bulbi e tuberi, ma si nutre anche di invertebrati, piccoli vertebrati, uova e, occasionalmente in caso di scarsità di cibo, di carogne di altri animali. Ha una dentatura bunodonte costituita da 44 denti definitivi, 22 superiori e 22 inferiori, con formula dentaria 3I-1C-4P-3M (Massei & Genov, 2000).

1.3 ECOLOGIA E STRUTTURA SOCIALE

I cinghiali europei sono tipici abitatori dei boschi ben maturi ed in particolare dei querceti, mentre le sottospecie africane ed asiatiche sembrano preferire le aree aperte e paludose: in generale il cinghiale si dimostra però assai adattabile in termini di habitat, e colonizza praticamente ogni tipo di ambiente a disposizione. Nei territori occupati dai cinghiali deve tuttavia essere sempre presente una fonte d'acqua, dalla quale l'animale non si allontana mai molto.

Il cinghiale è un animale gregario, nomade e attivo soprattutto di notte; vive in gruppi con struttura sociale gerarchica costituiti da più femmine, spesso imparentate, con i loro piccoli. Intorno ai 18 mesi di età i giovani maschi lasciano il branco, andando a formare piccoli gruppi non gerarchici, soprattutto in autunno e in inverno, mentre i maschi adulti con più di tre anni conducono, generalmente, una vita solitaria. Il distacco dei giovani maschi dal gruppo delle femmine può avvenire quando le femmine adulte hanno avuto i piccoli o, più tardi, quando sono le femmine giovani a partorire; ad ogni modo rimangono inizialmente all'interno dell'area nativa, iniziando a disperdersi solo durante la stagione successiva, compiendo

rapidamente spostamenti di più di 15 km. I maschi adulti tendono ad essere più sedentari e a non lasciare il loro territorio (5.000-10.000 ha) se non nella stagione riproduttiva, durante la quale possono coprire notevoli distanze.

Quando le giovani femmine di cinghiale arrivano al primo parto, possono rimanere nel gruppo o unirsi fra di loro a formarne uno nuovo, rimanendo comunque all'interno dell'*home range* originale. Individui all'interno di un'area non si associano, generalmente, con altri provenienti da fuori. Normalmente, i gruppi di femmine vivono all'interno di aree di 500-1.000 ha. L'*home range* può aumentare per i gruppi di femmine, come per i maschi, se aumenta la pressione venatoria, ma è un fenomeno temporaneo legato solo alla stagione di caccia (Massei & Genov, 2000). Quando il cibo scarseggia, i cinghiali possono coprire distanze di 100-150 km alla ricerca di fonti alimentari (Massei & Genov, 2004).

Lo sviluppo riproduttivo viene raggiunto in entrambi i sessi intorno ai 16-18 mesi d'età, ma generalmente le femmine si accoppiano a partire dai 2 anni d'età, mentre nei maschi la completa maturità sessuale si raggiunge a 4-5 anni. Nel periodo riproduttivo, che va da novembre a maggio, un solo verro può unirsi al gruppo delle femmine per accoppiarsi; il calore si presenta sincronizzato tra i soggetti appartenenti allo stesso branco, consentendo di sincronizzare le nascite, in modo da rendere più facile alle scrofe la comune gestione e difesa della prole. I cinghiali si riproducono normalmente una sola volta l'anno: ad una fase di riposo sessuale segue l'estro che si verifica tra novembre e gennaio. In caso invece di abbondanza alimentare, l'anestro si riduce notevolmente e si verificano due stagioni riproduttive (in settembre e in aprile-maggio) (Massei & Toso, 1993).

Ove si è verificato, l'incrocio con il maiale ha avuto come conseguenza un aumento del numero di piccoli per parto e uno sfasamento del normale periodo di accoppiamento, per cui si possono avere parti in qualsiasi mese, talvolta più di una volta per anno (Massei & Genov, 2000).

La gestazione dura in media 115 giorni e il numero dei piccoli può variare da 2 a 10, a seconda dell'età della femmina e della disponibilità di cibo: il numero di nati per parto è infatti influenzato dallo sviluppo ponderale della madre. Alla nascita i cinghiali pesano 0,8-0,9 kg. Lo svezzamento termina intorno ai 4 mesi d'età. La mortalità nei giovani è molto alta: fino al 48% nei nuovi nati e fino al 36% nel secondo anno d'età. Questi tassi sono fortemente influenzati dalla disponibilità alimentare e dalle condizioni climatiche (Massei & Toso, 1993).



Fig. 3: Esempio femmina di cinghiale con prole (striati).

Per quanto riguarda la crescita demografica annua, i tassi di accrescimento possono variare dal 90 al 180% della popolazione (Massei & Toso, 1993), e se la popolazione cala, si assiste ad una compensazione riproduttiva e la popolazione si ricostituisce velocemente (Boadella et al., 2012c).

Se gli animali non vengono cacciati o la pressione venatoria è bassa, l'associazione tra le femmine può portare alla formazione di gruppi superiori ai 30-40 individui dopo i parti. Al contrario, quando la pressione venatoria è alta, si osservano più frequentemente gruppi di non più di 5-10 individui.

1.4 DETERMINAZIONE DELL'ETA'

Oltre ad avvalersi della colorazione del mantello, per una stima precisa dell'età, su capi abbattuti, ci si basa sull'esame della dentatura: grazie a questo si può determinare l'età del soggetto fino ai tre anni e mezzo d'età, con un'approssimazione di pochi mesi.

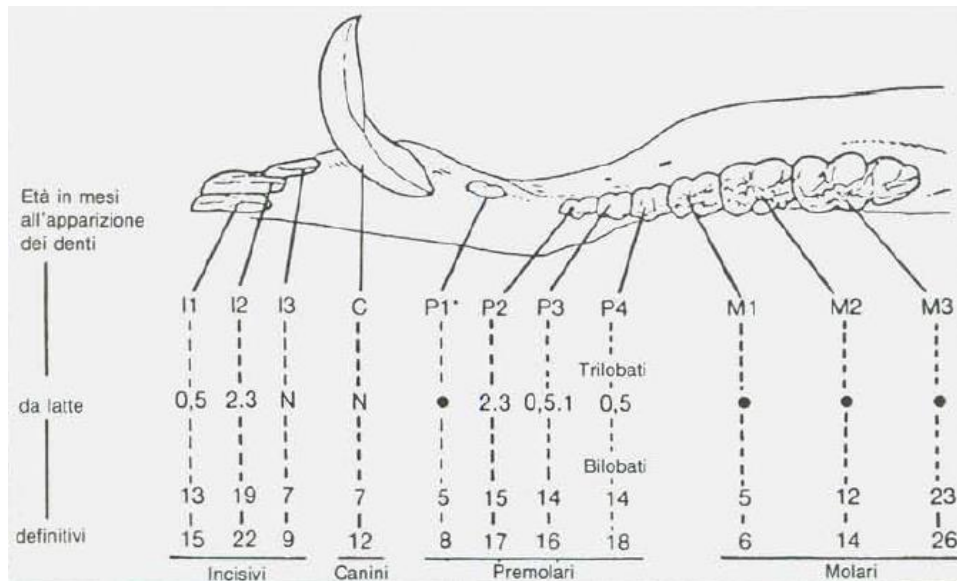


Fig. 4: Schema dei tempi di eruzione e di cambio della dentatura del cinghiale. Alla nascita sono presenti I3 e C1; P1 M1 M2 M3 compaiono come denti definitivi. (Massei & Toso, 1993).

Il cinghiale possiede una dentatura permanente di 44 denti eterodonti con formula dentaria I 3/3 C 1/1 P 4/4 M 3/3. Alla nascita sono già presenti 8 denti da latte (I_{d3} e C_{d1}), a tre mesi la formula dentaria è I_d 2/2 C_d 1/1 P_d 2/2. In seguito sono distinguibili tre classi d'età:

- fino a 10-12 mesi la dentizione è quella da latte (ad eccezione dei molari) e si compone di 3 incisivi, 1 canino, 4 premolari e 1 o 2 molari. Il primo premolare (p1) può non essere presente, mentre il quarto (p4) presenta 3 creste;
- fra i 15 e i 21 mesi erompono gli incisivi e i premolari (dopo 19 mesi il p4 ha solo 2 creste), in più erompono, in successione, secondo e terzo molare;
- dopo i 27 mesi la dentizione è completa (Massei e Genov, 2000).

L'eruzione dei molari avviene in modo graduale a partire dal primo molare (M1) all'età di un anno. M2 spunta a 14-15 mesi e pareggia a due anni. M3 spunta a circa 26 mesi e pareggia a tre anni. Per individui oltre i tre anni e mezzo, si valuta l'usura progressiva dei molari per stimare l'età (anche se questo parametro non è generalizzabile, in quanto influenzato dalla dieta del singolo individuo) (Massei & Toso, 1993).

	INCISIVI				CA NINI	PREMOLARI				MOLARI			TOTALE
NASCITA			3°	C									N°8 LATTE
			3°	C									
3-4 MESI	1°	2°	3°	C		2°	3°	4°					N° 28 LATTE
	1°	2°	3°	C		2°	3°	4°					
6-8 MESI	1°	2°	3°	C		2°	3°	4°	1°				N° 28 LATTE N° 4 DEF.
	1°	2°	3°	C		2°	3°	4°	1°				
12 MESI CIRCA	1°	2°	3°	C	1°	2°	3°	4°	1°	2°			N° 26 LATTE N° 14 DEF.
	1°	2°	3°	C	1°	2°	3°	4°	1°	2°			
15-18 MESI	1°	2°	3°	C	1°	2°	3°	4°	1°	2°			N° 40 DEF.
	1°	2°	3°	C	1°	2°	3°	4°	1°	2°			
20 MESI	1°	2°	3°	C	1°	2°	3°	4°	1°	2°			N° 40 DEF.
	1°	2°	3°	C	1°	2°	3°	4°	1°	2°			
24 MESI	1°	2°	3°	C	1°	2°	3°	4°	1°	2°	(3°)		N°40- 44 DEF.
	1°	2°	3°	C	1°	2°	3°	4°	1°	2°	(3°)		
30 MESI	1°	2°	3°	C	1°	2°	3°	4°	1°	2°	(3°)		N°40- 44 DEF.
	1°	2°	3°	C	1°	2°	3°	4°	1°	2°	(3°)		
36 MESI	1°	2°	3°	C	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°		N° 44 DEF.
	1°	2°	3°	C	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°		

Tabella 1: Tempistica eruzione e cambio denti.

2. L'AREA DI STUDIO

2.1 IL PARCO REGIONALE DEI COLLI EUGANEI

Il Parco Regionale dei Colli Euganei, istituito con L.R. 10/10/1989, comprende 15 comuni (Abano Terme, Arquà Petrarca, Baone, Battaglia Terme, Cervarese Santa Croce, Cinto Euganeo, Este, Galzignano Terme, Lozzo Atestino, Monselice, Montegrotto Terme, Rovolon, Teolo, Torreglia, Vò), totalmente o in parte, e copre una superficie di 18.694 ettari. Il Parco comprende i maggiori rilievi collinari della Pianura Padana, che si ergono a sud-ovest di Padova, di cui il Monte Venda, con i suoi 601 metri di altezza sul livello del mare, costituisce il picco più alto.



Fig. 5: Il Parco Regionale dei Colli Euganei.

Il paesaggio euganeo è dovuto alla presenza di due categorie di rocce: vulcaniche e sedimentarie. Un'erosione selettiva di milioni di anni ha prodotto un paesaggio tormentato e vario.

Per quel che riguarda la fauna, il Parco ospita una notevole varietà di specie animali: mammiferi (carnivori quali volpi, donnole, faine, tassi; piccoli mammiferi come ricci, talpe, toporagni e varie specie di chiroterti; tra i roditori troviamo ghiri e moscardini; importati dall'uomo e nel tempo divenuti infestanti sono i daini e, soprattutto, i cinghiali), avifauna (comprendente oltre 120 specie tra uccelli stanziali, migratori e di passo), rettili, anfibi, pesci e invertebrati (Progetto Flora e Fauna, Parco Regionale dei Colli Euganei). Da sottolineare il fatto che il Parco non ospita predatori naturali del cinghiale.

Nei Colli Euganei è presente un numero sorprendente di specie vegetali, tra loro molto diverse e adattate a diversi ambienti: questo grazie all'origine geologica dei terreni, la morfologia dei rilievi, responsabile di microclimi e biotopi contrastanti, l'isolamento da altri gruppi montuosi e le alterne vicende climatiche legate ai cicli glaciali.



Fig. 6: Localizzazione Parco Regionale dei Colli Euganei nella Regione Veneto.

2.2 IL CINGHIALE DEI COLLI EUGANEI

Il cinghiale è una specie alloctona rispetto al territorio euganeo, in quanto allo stato selvatico non vi era più presente da decenni. La presenza degli attuali cinghiali nei Colli Euganei si è resa manifesta a fine anni '90 come conseguenza di introduzioni abusive. Tali esemplari sono

frutto di incroci tra animali naturalmente presenti nel territorio nazionale e individui importati dall'estero o allevati, e di ibridazione con suini domestici (Scacco et al., 2011).

L'amministrazione provinciale di Padova sollecitò un parere da parte dell'INFS (ora ISPRA, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale), in merito alla gestione dei cinghiali, che si espresse a favore dell'eradicazione della specie dal territorio euganeo. Fino all'anno 2001 non fu attuata nessuna misura di controllo o monitoraggio della specie, favorendone l'espansione numerica e territoriale, supportata da un ambiente idoneo, una totale mancanza di predatori e, molto probabilmente, da ulteriori immissioni non autorizzate (Matteazzi et al., 2010).

La presenza del cinghiale in tale territorio, fortemente urbanizzato e sfruttato dal punto di vista agricolo, ha portato, di pari passo con l'incremento della popolazione di tale animale, ad un aumento dei danni alle colture (non solo legati al consumo alimentare da parte del cinghiale stesso, ma anche alle azioni di scavo, calpestio e scorrecciamento), dei danni all'ambiente naturale e ad un aumento di rischio per l'incolumità pubblica legata all'attraversamento delle strade da parte degli animali. Nel periodo 2000-2008, la richiesta di risarcimenti, per danni operati dai cinghiali alle colture, ammonta a 355.330,75€. Nello specifico, i danni maggiori, pari al 72% del totale, sono operati a carico delle colture di mais e uva (Scacco et al., 2011).

Nell'ottobre del 2003 è stata stipulata una convenzione tra l'Ente Parco, la Provincia di Padova e il Corpo Forestale dello Stato nell'ambito di un vero e proprio progetto per il controllo del cinghiale nell'area del Parco. A partire dalla stipulazione della convenzione sono state intraprese una serie di iniziative volte alla gestione del problema, che si sono concretizzate principalmente nella gestione di alcune trappole mobili autoscattanti (chiusini) fornite in parte dalla Provincia di Padova e in parte dall'Ente Parco. Dal 2004 ad aprile del 2007 la gestione dei chiusini era affidata ai proprietari dei fondi che ne facevano richiesta e presso cui le trappole erano installate. Dall'anno 2007 la gestione delle trappole è stata affidata ad una squadra appositamente formata dall'Ente Parco (Matteazzi et al., 2010).

Un censimento della popolazione dei cinghiali (specie che presenta delle difficoltà in tal senso, essendo animali elusivi e attivi soprattutto nelle ore notturne) è stato effettuato dall'ISPRA nel 2007 e nel 2008: si stima un numero di animali pari 432 capi nel 2007 e 469 capi nel 2008 (Scacco et al., 2011).

Riguardo all'accrescimento della popolazione, la raccolta di dati riguardanti l'apparato riproduttore delle femmine catturate ed abbattute all'interno del territorio del Parco nel 2008, ha portato ad una stima di incremento minimo della popolazione dei cinghiali nell'anno 2009 rispetto al 2008 del 172% (Scacco et al., 2011).

Dall'analisi dei tratti riproduttivi delle femmine abbattute è stato possibile ricavare dati relativi alla fertilità della popolazione di cinghiali dei Colli Euganei: 85% delle femmine fertili dai 12 ai 24 mesi d'età, 96% oltre i 24 mesi. La sopravvivenza embrionale si attesta sull'88% oltre i 24 mesi d'età delle femmine. La classe d'età minima osservata di femmine gravide è stata di 9-12 mesi, mentre la fertilità è stata riscontrata già nella classe dei 7-8 mesi. Dai dati analizzati è emersa una classe di peso minima per le femmine gravide di 31-40 kg e un peso minimo per le femmine fertili di 25,6 kg. Le nascite si distribuiscono lungo tutto l'arco dell'anno con picco nei mesi di marzo e aprile (Matteazzi et al., 2010).

E' stato rilevato un rapporto pressoché paritario tra maschi e femmine, con un leggero sbilanciamento a favore delle femmine, probabilmente determinato dalle classi più adulte. Per quanto riguarda l'età dei soggetti abbattuti, si rileva un netto sbilanciamento verso gli individui di età inferiore ai 12 mesi (che costituiscono l'86% degli animali abbattuti nel periodo 2007-2009), che rispecchia la selettività nell'ambito delle classi sociali derivante dall'utilizzo dei chiusini (Matteazzi et al., 2010).

Considerato che il numero di capi abbattuti all'anno, negli ultimi anni, risulta superiore alla stima della popolazione eseguita nel 2007-2008 (815 capi abbattuti nel 2012, 670 nel 2013, Bollettino cinghiali del Parco Colli Euganei), e che il cinghiale ha tassi di crescita della popolazione elevati, che aumentano ancora di più se la popolazione stessa subisce pressioni negative come lo è l'abbattimento, sarebbe utile un nuovo censimento della popolazione.



Fig. 7: Veduta del Parco Regionale dei Colli Euganei.

2.3 ALLEVAMENTI DI SUINI NELL'AREA DI STUDIO

Per meglio rendersi conto del potenziale ruolo del cinghiale nell'epidemiologia delle infezioni prese in esame nel seguente studio, sono state consultate le banche dati del CREV (Centro Regionale Epidemiologia Veterinaria), aggiornate al 31/03/2014, al fine di ottenere informazioni riguardo agli allevamenti di suini presenti nell'area del Parco Colli Euganei. Nel territorio dei Comuni, che, parzialmente o in toto, fanno parte del Parco, sono presenti 310 allevamenti di maiali, di cui solo l'1,61% sono destinati alla riproduzione. Alla data dell'ultimo censimento il 56,13% di questi allevamenti non risulta avere capi presenti. Degli allevamenti con capi presenti nel periodo dello studio, il 65,31% risulta avere un numero di capi ≤ 5 , e solo 7 allevamenti hanno un numero di animali superiore a 20. Media, moda e mediana, del numero di animali presenti negli allevamenti, sono, rispettivamente, di 15,73, 2 e 3.

3. PSEUDORABBIA-MALATTIA DI AUJESZKY

La pseudorabbia (PR) fu descritta per la prima volta nel 1813, in vacche che soffrivano di prurito incoercibile. Aladar Aujeszky, il cui nome fu usato per denominare la malattia, determinò che l'agente causale era filtrabile, cioè non di origine batterica, e condusse studi sulla malattia nel cane e nel gatto. Nel 1909 l'agente causale di tale malattia venne riconosciuto per la prima volta da Weiss, in suini (e nel 1910 in pecore, da Schmiedhoffer). Nel 1934 Sabin e Wright identificarono il virus come un herpesvirus, più tardi chiamato herpes virus suino 1 (SHV-1) o virus della pseudorabbia (PRV) (Straw et al., 2006).

Gli ospiti primari di PRV sono i membri della famiglia *Suidae*, di cui il maiale ed il cinghiale sono gli esponenti più diffusi, i quali fungono da *reservoir* dell'infezione stessa, essendo le uniche specie in grado di sopravvivere all'infezione. Dagli anni '70, la pseudorabbia ha raggiunto un'importanza mondiale: si passò da una malattia sporadica e mortale dei bovini ad una malattia dei suini con enormi risvolti economici negativi. Questo cambiamento fu determinato dalle nuove modalità di allevamento del suino: si passò infatti ad una produzione concentrata in grandi aziende/allevamenti, spesso localizzate vicine l'una all'altra. A questo va aggiunta una sempre maggiore movimentazione di animali di questa specie e di prodotti da loro derivati. Al giorno d'oggi, oltre alla perdita economica legata alla malattia vanno considerate anche le perdite legate alle restrizioni per il controllo di PRV (Straw et al., 2006).

3.1 EZIOLOGIA

PRV appartiene alla sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* della famiglia *Herpesviridae*. PRV è strettamente correlato a bovine herpesvirus 1 (BHV-1), equine herpesvirus 1 (EHV-1) e varicellozoster virus: ciò ha portato all'assegnazione del PRV al genere *Varicellovirus* della sottofamiglia *Alphaherpesvirinae*.

Gli alphaherpesvirus sono caratterizzati da una rapida crescita litica in colture cellulari, neurotropismo, latenza in neuroni e una grande varietà di ospiti. Sono stati descritti numerosi ceppi di PRV i quali differiscono tra loro per virulenza, infettività, quantità e durata dell'eliminazione virale durante l'infezione (Straw et al., 2006).

PRV ha la tipica architettura di un virione della famiglia *Herpesviridae*: sono di forma pressoché sferica, con un diametro di 150-180 nanometri. Il virus è composto da una nucleoproteina centrale che contiene il genoma, un capsido icosaedrico di 162 capsomeri, uno strato di tegumento proteico, ed un *envelope* lipidico di due strati derivante dalle membrane cellulari che contengono le proteine codificate dal virus. L'*envelope* deriva dalle membrane di vescicole intracellulari. L'*envelope* contiene 11 glicoproteine le quali, eccetto la gG, sono proteine strutturali.

Il genoma di PRV è composto da un DNA a doppio filamento, lineare, di circa 150 kilobasi. Il genoma consiste di una regione lunga (UL) e una regione corta (US) (Straw et al., 2006).

Le proteine che determinano la virulenza possono essere divise in glicoproteine di membrana, enzimi codificati dal virus e proteine non essenziali del capsido. Gli enzimi codificati dal virus, coinvolti nel metabolismo degli acidi nucleici, sono il maggior elemento determinante la virulenza dell'herpesvirus: una loro inattivazione, infatti, porta ad una attenuazione virale. La delezione del gene codificante per la glicoproteina gE porta anch'essa ad un significativo decremento della virulenza di PRV: questa glicoproteina sembra, infatti, giocare un'importante ruolo nella disseminazione del virus nel sistema nervoso sia nella via trigeminale che olfattoria. Un'assenza della gE porta a un'infezione ridotta del tessuto nervoso (Straw et al., 2006).

L'infezione delle cellule inizia con l'attacco dei virioni liberi alle cellule target, seguito dalla fusione dell'*envelope* virale e della membrana citoplasmatica cellulare. Il primo contatto tra virus e cellula coinvolge la gC che interagisce con i proteoglicani della superficie cellulare. La fusione tra membrana citoplasmatica cellulare ed *envelope* virale coinvolge gB, gH/gL e gD. Se manca una di queste glicoproteine la fusione non avviene. Il nucleocapside una volta entrato nella cellula è trasportato verso la membrana nucleare e si va a situare vicino ai pori nucleari. Il trasporto avviene lungo i microtubuli. Il DNA entra nel nucleo cellulare dopo aver lasciato il virione ed entra nel nucleo, dove avviene la trascrizione del DNA in RNA messaggero che codifica per le proteine virali. L'assemblaggio delle particelle nel nucleo determina la formazione dei caratteristici corpi inclusi eosinofili degli herpesvirus (Straw et al., 2006).

Nelle colture cellulari, PRV induce un effetto citopatico che appare normalmente in 24-72 ore (ma le colture potrebbero dover essere incubate per 5-6 giorni prima di osservare l'effetto). Il

monstrato sviluppa un accumulo di cellule birifrangenti, seguito dal completo distacco dello strato cellulare. Si sviluppano inoltre sincizi cellulari (Straw et al., 2006).

3.2 EPIDEMIOLOGIA

PRV è distribuito in tutto il mondo, particolarmente nelle aree ad alta densità di popolazione suina (Sud America, Europa e Asia). Nei Paesi ove PRV non circola, la vaccinazione è proibita. Nelle aree in cui i suini domestici siano esenti dalla circolazione virale, il virus, spesso, circola nelle popolazioni di cinghiali e di suini selvatici (Lipowski & Pejsak, 2002). Questo è motivo di preoccupazione in quanto la trasmissione dell'infezione da cinghiali e suini, e viceversa, è stata dimostrata.

Finora sono stati identificati quattro genotipi circolanti nelle popolazioni di suini: genotipo I, rinvenuto soprattutto in USA ed Europa centrale, genotipo II e III, che circolano in nord Europa e in Europa centrale, e genotipo IV che è limitato all'Asia (Müller et al., 2011). I virus circolanti nelle popolazioni di cinghiali in Europa sono di genotipo I mentre nei suini attualmente sono di genotipo II, il quale è più recente (Boadella et al., 2012a; Capua et al., 1997a). Questo porta alla considerazione, che la trasmissione dell'infezione da suini a cinghiali non è avvenuta recentemente.

Il suino è l'ospite principale del virus ma un'ampia varietà di specie può essere infettata naturalmente e sperimentalmente (bovini, pecore, capre, cani, gatti, volpi, ratti, topi). Nelle specie al di fuori di *Sus scrofa*, l'infezione causa una malattia neurologica e porta a morte. I primati superiori, incluso l'uomo, non sono suscettibili all'infezione da PRV (Straw et al., 2006).

Il suino e il cinghiale, essendo l'unica specie in grado di sopravvivere all'infezione da PRV, fungono da *reservoir*. Questo significa, che anche eradicando PRV dalle popolazioni di suini domestici, il virus continuerà a circolare indipendentemente nei maiali selvatici e nei cinghiali, con possibilità di reinfezione dei suini *free* (Lipowski & Pejsak, 2002). Le popolazioni di cinghiali e di suini selvatici sono soggette all'infezione da PRV praticamente ovunque nel mondo. Le mandrie di suini allevati all'aperto costituiscono la popolazione più a rischio di trasmissione del patogeno da parte dei cinghiali, e in Francia questi ultimi sono riportati come responsabili di episodi di Pseudorabbia in suini (Ruiz-Fons et al., 2008a).

Nel suino, la morbilità e la mortalità dipendono dall'età del soggetto. I suinetti e i maiali giovani sono le categorie più a rischio. La maggior parte dei fattori di rischio (quali densità di popolazione, numero di riproduttori, numero di soggetti all'ingrasso, introduzione di scrofette di rimonta) sono legati direttamente od indirettamente al numero di maiali suscettibili nella popolazione.

Il virus è trasmesso primariamente tramite contatto *nose-to-nose* tra suini. La trasmissione comunque può avvenire anche durante l'accoppiamento, per esposizione a mucosa vaginale o seme contaminati, per via transplacentare durante la gravidanza o tramite contatto con carcasse infette di ratti o altri animali. Se le circostanze sono favorevoli, il virus può anche diffondersi tramite aerosol (Straw et al., 2006). La trasmissione di PRV nei cinghiali avviene per via respiratoria, per via venerea e tramite consumo di carcasse infette, anche di conspecifici (Ruiz-Fons et al., 2007). La via venerea sembra essere la via di trasmissione principale nei maiali selvatici.

La trasmissione tra maiale e cinghiale può avvenire tramite contatto diretto ma non va esclusa la possibilità di trasmissione tramite altre specie, come i roditori, e tramite carcasse di ratti o altri animali infetti (Müller et al., 2011).

La suscettibilità all'infezione dipende da vari fattori, inclusa la virulenza del ceppo virale, la dose e la via di esposizione, l'età del soggetto, lo stress e le condizioni dell'animale. Per l'infezione per via orale sono richieste maggiori quantità di virus rispetto all'infezione per via nasale. PRV non è molto contagioso e quest'affermazione è supportata dal fatto che, solitamente, non tutti i suini all'interno di un allevamento si infettano. La percentuale di animali infetti varia dal 10% al 90%. La diffusione dell'infezione all'interno di un allevamento dipende dalla possibilità di contatto diretto tra gli animali (Straw et al., 2006).

Per quel che riguarda la sieroprevalenza di PRV nei cinghiali, essa è legata all'età, all'aggregazione spaziale, alla densità della popolazione. La trasmissione è soprattutto diretta e spesso collegata alla stagione riproduttiva (Boadella et al., 2012c). Sono stati eseguiti vari studi che riportano un'ampia varietà di sieroprevalenza nei cinghiali, da nulla fino al 60%: 60,6% di sieroprevalenza su 284 animali (Ruiz-Fons et al., 2006), 59% su 2.428 animali (Boadella et al., 2012c), 45,9% su 185 sieri e 30,6% di positività alla presenza di DNA virale (Ruiz-Fons et al., 2007), 36,63% di sieroprevalenza su 1.714 animali (Ruiz-Fons et al., 2008b), 49,6% su 1.659 animali (Boadella et al., 2012a) in Spagna; 1,2% sieropositività su 5.508 cinghiali allevati e 5,5% su 6.517 animali cacciati in Francia (Albina et al., 2000); 30,7%

sieropositivi su 342 animali (Montagnaro et al., 2010), 9,9% su 283 campioni (Ferroglia et al., 2003), 51% su 152 animali e 41% positività per antigeni virali nelle tonsille (Lari et al., 2006), 9,3% di sieroprevalenza su 430 animali (Ercolini et al., 1995), 2,8% su 1.750 animali (Piano monitoraggio selvatici regione Lombardia, 2014), 19,5% su 5.783 animali (Cordioli, 2013) in Italia; 38,5% su 556 soggetti in Croazia (Roic et al., 2012); 11,26% su 1.221 campioni (Kaden et al., 2009), 8,9% su 3.143 sieri (Müller et al., 1998) in Germania; 26% su 427 animali in Slovenia (Vengust et al., 2005); 23,7% su 93 animali in Turchia (Albayrak et al., 2013); zero positività su 303 animali allevati in Finlandia (Hälli et al., 2012).



Fig. 8: sieroprevalenze riportate dagli studi effettuati nelle popolazioni di cinghiali in Europa. Gli Stati in verde rappresentano popolazioni di cinghiali positivi a PRV; gli Stati in blu, quelli in cui le popolazioni di cinghiali indagate sono risultate negative a PRV; quelli in arancione sono Stati in cui sono avvenuti episodi di Pseudorabbia in cani da caccia al cinghiale, ma in cui la prevalenza dell'infezione nel cinghiale è sconosciuta. Tratto da: Gavier-Widen D., Meredith A. & Duff P. 2012. (Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe. Wiley-Blackwell).

Nei cinghiali si riscontrano più sieropositività nelle femmine rispetto ai maschi (Ruiz-Fons et al., 2007; Boadella et al., 2012c; Ruiz-Fons et al., 2008a). Questo può essere spiegato dal comportamento della specie: le femmine formano gruppi sociali tra loro e la loro prole, fattore che aumenta il contatto tra animali. I maschi invece tendono a vivere da soli diminuendo la possibilità di contatto con altri individui. Contatti tra maschi e femmine

avvengono in autunno durante la stagione riproduttiva, quando può avvenire la riattivazione del virus latente a causa dello stress causato dall'accoppiamento, che porta a conseguente trasmissione venerea (via principale di trasmissione nel cinghiale e maiale selvatico). Gli studi effettuati mostrano come la sieroprevalenza nei cinghiali aumenti con l'età degli stessi (Ruiz-Fons et al., 2007; Ruiz-Fons et al., 2006; Albina et al., 2000; Kaden et al., 2009; Albayrak et al., 2013; Boadella et al., 2012c; Müller et al., 1998; Vengust et al., 2005; Ruiz-Fons et al., 2008a; Ferroglio et al., 2003; Lari et al., 2006): questa situazione è associata all'aumentata probabilità di esposizione dei soggetti a PRV all'aumentare del tempo di vita. Da questo si evince come, per una corretta sorveglianza di tale infezione nei cinghiali, dovrebbero essere indagati soggetti adulti (Vengust et al., 2005; Ferroglio et al., 2003).

Uno studio di dieci anni (2000-2010) condotto in Spagna (Boadella et al., 2012a), indica come la situazione epidemiologica dell'infezione da PRV sia attualmente stabile (quantomeno nell'area di studio) nel cinghiale, con sieroprevalenze che subiscono cicliche variazioni ma che hanno raggiunto uno *steady state*. Questo nonostante, nella stessa area, la percentuale di suini domestici sieropositivi fosse scesa dal 70% del 2003 all'1,7% del 2010: il trend temporale nel cinghiale è dunque indipendente dalla situazione epidemiologica nei suini, aggiungendo evidenze all'ipotesi che il mantenimento di PRV in cinghiali sia indipendente dalla situazione nei suini.

Il virus può essere isolato da tamponi nasali di maiali infetti per 8-17 giorni post-infezione, con un massimo di titolo virale tra $10^{5,8}$ e $10^{8,3}$ TCID₅₀. Per quanto riguarda i tamponi orofaringei, il virus può esservi isolato per 18-25 giorni con un titolo virale fino a 10^6 TCID₅₀. Al picco di escrezione virale, un maiale può eliminare fino a $10^{5,3}$ TCID₅₀ nell'aria, in 24 ore. Il virus si ritrova nelle secrezioni vaginali e nell'eiaculato fino a 12 giorni e per 2-3 giorni nel latte. L'escrezione virale inizia prima dell'inizio dei sintomi clinici (Straw et al., 2006). Nei cinghiali l'eliminazione virale, tramite le vie respiratorie e genitali, avviene nelle prime due settimane della fase acuta dell'infezione (Lari et al., 2006).

PRV è stabile in molte condizioni di temperatura e pH, ed è considerato un virus resistente nell'ambiente. Il virus sopravvive in media per 30 giorni d'estate e per 46 giorni in inverno. È stabile a pH compreso tra 4 e 12. PRV è relativamente resistente al calore (inattivato in 30-60 minuti a 60°C) mentre è molto stabile a temperature ambientali ed al freddo (Straw et al., 2006).

A proposito dell'infezione da PRV in cinghiali, va sottolineato come questi possano trasmettere l'infezione ad animali selvatici che se ne predano (o ad animali domestici alimentati con carne di cinghiale infetta, soprattutto se cruda). Questa trasmissione, sebbene non epidemiologicamente rilevante nel mantenimento dell'infezione o nella trasmissione al suino, può mettere ulteriormente a repentaglio la sopravvivenza di alcune specie già a rischio, in quanto la Pseudorabbia ha esiti mortali in questi animali. Ad esempio è stata documentata la mortalità nella pantera della Florida (*Felis concolor*) e nella lince iberica (*Lynx pardinus*) della Sierra Morena in Spagna. In Slovenia, ed altri paesi europei, ADV può essere tra le cause del numero decrescente di lince eurasiatica (*Lynx lynx*) (Vengust et al., 2005). A rischio sono anche gatti selvatici (*Felis silvestris*), orsi (*Ursus arctos*) e lupi (*Canis lupus*) (per questi ultimi, il cinghiale è la principale fonte alimentare) (Lari et al., 2006; Boadella et al., 2012a). Questa preoccupazione è supportata da studi (Lari et al., 2006; Capua et al., 1997b), che hanno riportato la morte di cani e gatti alimentati con carne di cinghiale (risultata a posteriori positiva per la presenza di PRV), i quali mostrarono una sintomatologia (sindrome neurologica acuta, ipersalivazione, vomito, prurito, depressione e coma) e lesioni istopatologiche (encefalite non suppurativa) tipiche di malattia di Aujeszky in tali animali (infezione confermata anche da esame immunostochimico).

3.3 PATOGENESI

A seguito di un'esposizione oronasale, la replicazione primaria del virus avviene nell'epitelio delle prime vie respiratorie. Successivamente, segue l'infezione delle tonsille e dei polmoni e il virus è disseminato nell'organismo, sia in forma libera che tramite leucociti infetti. In aggiunta a ciò, il virus entra nelle terminazioni del nervo trigemino ed olfattivo e invade il sistema nervoso centrale. La replicazione di PRV nel sistema nervoso centrale è caratterizzata da una meningoencefalite non suppurativa, che causa disordini nervosi gravi. Per quanto riguarda l'invasione del tessuto nervoso, la proteina chiave è la glicoproteina gE: la delezione di tale glicoproteina attenua fortemente PRV. La presenza di gE non è essenziale per permettere al virus di entrare nei neuroni primari e di replicare negli epitelii delle prime vie respiratorie, ma la sua assenza impedisce il trasferimento del virus ai neuroni secondari, riducendo in maniera drastica la neuroinvasività (Straw et al., 2006).

PRV è in grado di instaurare latenza, condizione in cui è presente DNA virale ma non sono prodotti virioni infettanti. La maggior parte dei suini esposti a grandi quantità di virus può diventare *carrier* latentemente infetto, con possibilità di riattivazione virale e conseguente eliminazione del virus e diffusione dell'infezione ad individui suscettibili: questo rappresenta una grossa sfida per il successo dei piani di controllo ed eradicazione dell'infezione (Straw et al., 2006).

I maggiori siti di latenza del PRV sono il ganglio trigeminale, il bulbo olfattorio e le tonsille. In questi organi si può rinvenire DNA virale in assenza di produzione di virus infettante. L'unico modo affidabile in campo per verificare se un soggetto ha PRV latente, è la somministrazione di grandi dosi di corticosteroidi con l'intento di riattivare l'infezione e l'eliminazione virale (Straw et al., 2006). Sembra ci sia una correlazione tra la precolonizzazione dei gangli trigeminali e l'incapacità di un ceppo superinfettante a instaurare latenza. Questo suggerisce che il numero di neuroni in cui può instaurarsi latenza sia limitato e che un neurone già occupato resista alla superinfezione. Questo porta all'ipotesi che un vaccino vivo attenuato, con un alto potenziale di stabilire latenza, possa prevenire la latenza e la superinfezione da parte di un ceppo di campo (Straw et al., 2006).

Maiali selvatici, infettati sperimentalmente, presentavano PRV in tonsille, polmoni, midollo spinale e ponte. Cinghiali infettati naturalmente presentano PRV in tonsille e, soprattutto, nel ganglio sacrale e trigeminale (Ruiz-Fons et al., 2007).

3.4 SEGNI CLINICI E LESIONI

Il periodo di incubazione della Pseudorabbia varia da 1 a 11 giorni (più frequentemente 2-6 giorni). In animali giovani e suinetti il periodo è più breve che in animali di età maggiore. La gravità clinica dell'infezione dipende dall'età del soggetto, dalla via d'infezione, dalla virulenza del ceppo infettante e dallo stato immunitario dell'animale. I suinetti sono altamente suscettibili, con tassi di mortalità fino al 100% nelle prime due settimane di vita e fino al 50% nella terza e quarta settimana di vita. In questi soggetti si osservano gravi problemi neurologici (Straw et al., 2006).

Ci sono differenze sensibili nel decorso della malattia: la pseudorabbia può diffondersi rapidamente coinvolgendo suini di tutte le età oppure possono essere assenti segni clinici e l'infezione si riscontra solo tramite indagini sierologiche. Il decorso clinico è più grave in

popolazioni *naïve*. In assenza di suinetti neonati e specialmente nel periodo tra i parti, il corso dell'infezione è solitamente inapparente. In riproduttori o nei capannoni di finissaggio, PRV provoca una lieve sintomatologia respiratoria (Straw et al., 2006).

I suinetti nati infetti sono depressi, anoressici e, in 24 ore, atassici e sviluppano convulsioni. Suinetti infettati con PRV mostrano febbre (fino a 41°C), tremori, ipersalivazione, incoordinazione, atassia, nistagmo, opistotono e attacchi simil-epilettici gravi. Vomito e diarrea sono presenti. Nei suinetti con sintomi neurologici la morte avviene in 24-36 ore dall'inizio di tali segni (Straw et al., 2006).

Se le scrofe gravide sono infettate con il virus in vicinanza al parto, i suinetti nascono deboli, mostrano primariamente segni neurologici e muoiono in 1-2 giorni dalla nascita.

Nei suinetti svezzati (3-6 settimane di vita) i segni clinici sono simili ai neonati ma meno gravi e la sintomatologia nervosa, che porta a coma e morte, non si manifesta così spesso. La mortalità può arrivare al 50% ma di solito è più bassa. La maggior parte dei soggetti si riprende in 5-10 giorni ad eccezione di quelli che mostrano sintomi neurologici, i quali spesso muoiono. Questi animali, rispetto ai non infetti di pari età, raggiungono il peso di mercato con ritardo di 1-8 settimane (Straw et al., 2006).

Nei suini all'ingrasso e in fase di finissaggio, i sintomi respiratori sono il reperto più frequente. La morbilità può essere anche del 100% in un gruppo, ma la mortalità si attesta sull'1-2%. I sintomi neurologici si verificano solo sporadicamente. L'infezione in questi animali porta alla perdita di una settimana nel ciclo produttivo (Straw et al., 2006).

Scrofe e verri sviluppano sintomi respiratori. PRV può attraversare la placenta e infettare e portare a morte i feti in utero. Nelle femmine gravide, l'aborto accade spesso e può essere il primo segno di pseudorabbia. Le scrofe infettate nel primo trimestre di gravidanza possono andare incontro a riassorbimento fetale e tornare in estro. Nel secondo e terzo trimestre di gravidanza, l'infezione si manifesta con aborto o natimortalità e/o nascita di suinetti deboli. La mortalità negli adulti supera raramente il 2% (Straw et al., 2006).

Per quel che riguarda la sintomatologia nei cinghiali, Müller et al. (2001) hanno osservato solo lievi aumenti di temperatura, scolo nasale, sternali e congiuntiviti lievi in animali infettati sperimentalmente con un virus ottenuto da cinghiali. In seguito a trattamento immunosoppressivo i cinghiali mostrarono gravi sintomi respiratori e alcuni giunsero a morte. Secondo Hahn et al. (1997), i ceppi di virus della Pseudorabbia derivanti da cinghiali sono attenuati se comparati a quelli circolanti nei suini domestici. È stato riportato un

focolaio di malattia clinica in cinghiali (Gortazar et al., 2002), con mortalità del 7,5% in adulti e del 14% in soggetti sotto l'anno. I soggetti avevano buone condizioni di salute generale ma mostravano comportamento anormale, inabilità alla stazione, tremori, incoordinazione. Va sottolineato però, come questi animali (tranne uno) presentassero alla necropsia granulomi da tubercolosi, malattia che può aver inficiato la risposta immunitaria verso PRV.

Nel suino, lesioni macroscopiche sono spesso assenti o ridotte al minimo; si possono vedere cheratocongiuntiviti, riniti sierose o fibrinonecrotiche, laringiti, tracheiti e tonsilliti necrotiche. La vaccinazione riduce i sintomi clinici e le lesioni microscopiche (Straw et al., 2006).

Le lesioni alle basse vie respiratorie variano da edema polmonare a piccoli foci disseminati di necrosi, emorragie e/o polmonite. Sul fegato e sulla milza si possono rinvenire foci necrotici di 2-3 mm, soprattutto nei suini giovani carenti di immunità passiva, nei neonati e nei feti abortiti. Nelle scrofe che abortiscono, si rinviene endometrite ed una parete uterina ispessita e edematosa. Una placentite necrotica si accompagna all'aborto o al parto. I feti abortiti possono essere macerati o mummificati. In aggiunta a ciò si possono trovare foci necrotici emorragici in polmoni e tonsille (Straw et al., 2006).

Le lesioni microscopiche si rinvengono più frequentemente nel sistema nervoso centrale. Queste lesioni includono: meningoencefalite non suppurativa, ganglioneurite nella materia grigia e bianca, cuffing perivascolare composto da cellule mononucleate e scarsi granulociti. Picnosi e carioressi delle cellule mononucleate sono spesso presenti. Le meningi che coprono le aree interessate, sia nel cervello che nel midollo spinale, possono essere ispessite a causa dell'infiltrazione ad opera di cellule mononucleate. Si osservano corpi inclusi intranucleari in neuroni, astrociti e oligodendroglia (Straw et al., 2006).

Nei polmoni si osservano alveoliti, bronchioliti e bronchiti necrotiche. Spesso ci sono emorragie ed essudato fibrinoso per il coinvolgimento del tessuto connettivo e degli endoteli (Straw et al., 2006).

Le lesioni necrotiche focali sono simili in tutti i tessuti coinvolti. Si ritrovano più frequentemente in milza, fegato, linfonodi e ghiandole surrenali. Nel tratto riproduttivo maschile ci può essere degenerazione dei tubuli seminiferi e foci necrotici nella tunica albuginea dei testicoli. Si osservano anomalie degli spermatozoi. Nell'intestino si sviluppano necrosi focali dell'epitelio mucosale, che coinvolgono anche la *muscularis mucosa* e la tonaca muscolare. Si osservano vasculiti necrotizzanti delle arteriole, venule e vasi linfatici attorno

alle tonsille e ai linfonodi mandibolari. Nelle cellule endoteliali colpite si osservano corpi inclusi intracellulari (Straw et al., 2006).

Da uno studio effettuato su 152 cinghiali (Lari et al., 2006), è stata rilevata un'alterazione del tessuto linfoide in alte percentuali: iperplasia di milza e linfonodi, deplezione del tessuto linfoide, infiammazione delle tonsille da lieve a grave. Nel 15% dei soggetti è stata riscontrata una polmonite interstiziale. Le tonsille del 41% animali erano positive alla presenza di antigeni virali. Tuttavia antigeni virali sono stati raramente rinvenuti in linfonodi di questi animali.

Nel focolaio clinico riportato da Gortazar et al., 2002, alla necropsopia, i cinghiali presentavano ematomi sottocutanei temporali e frontali, edema dello spazio sottomandibolare e del torace, infiammazione delle tonsille e congestione vasale in encefalo e meningi. Linfonodi toracici e addominali mostravano una congestione intensa. Due animali avevano petecchie emorragiche intestinali, e un soggetto edema polmonare e congestione. Una lieve, diffusa meningoencefalite non suppurativa con un elevato numero di leucociti intravascolari era presente nell'encefalo. Non sono stati rinvenuti corpi inclusi intranucleari tipici degli herpesvirus. Da non tralasciare il fatto che tutti i soggetti analizzati, tranne uno, mostravano granulomi da tubercolosi. In un altro focolaio di casi clinici in cinghiali (Schulze et al., 2010), due soggetti furono abbattuti in seguito a sintomatologia clinica (disturbi neurologici, disorientamento, tremori testa e arti, perdita di paura nei confronti dell'uomo). I due cinghiali mostravano una panencefalite non suppurativa caratterizzata da necrosi neuronale, corpi inclusi intranucleari eosinofili nei neuroni necrotici, spongiosi del neuropilo, cuffing perivascolare ad opera di linfociti, plasmacellule e granulociti eosinofili (all'immunoistochimica, antigeni di PRV sono stati trovati nelle aree encefaliche che presentavano lesioni). Entrambi i soggetti avevano un'età di 7-8 mesi.

Questi report di casi clinici in cinghiali indicano che questa specie, in determinate condizioni non ancora chiarite (stress sociale, passaggio da immunità passiva ad attiva, suscettibilità individuale, condizioni ambientali), possa mostrare sporadicamente e in condizioni naturali la malattia clinica.

3.5 IMMUNITA'

L'infezione da PRV provoca la produzione di anticorpi e di un'immunità cellulo-mediata nei suini. L'immunità, comunque, non è totale e in caso di reinfezione il virus può moltiplicarsi in maniera limitata.

Anticorpi contro proteine strutturali e non strutturali di PRV sono stati ritrovati in animali infetti, e tra questi, i più potenti anticorpi neutralizzanti, indipendenti dal complemento, sono diretti contro gC e gD. Questi anticorpi agiscono impedendo l'attacco del virus alla cellula (anti-gC) o la penetrazione nella stessa (anti-gD). Vaccini che contengono gC e gD, e anche quelli con subunità gB, portano alla formazione di un'immunità protettiva. Le glicoproteine sono considerate essere il target primario dell'immunità cellulo-mediata anti-PRV (Straw et al., 2006).

Una scrofa immune all'infezione da PRV trasferisce anticorpi ai suoi suinetti tramite il colostro, anticorpi che persistono per 4 mesi (Williams & Barker, 2001). L'immunità materna è in grado di proteggere i neonati contro la malattia clinica, limitando la replicazione virale nel sistema nervoso centrale (Straw et al., 2006). Poiché la prevalenza di anticorpi nelle popolazioni di cinghiali e maiali selvatici è alta, questa porta ad un'alta prevalenza di anticorpi in animali di pochi mesi. Dal momento che nelle popolazioni domestiche, la manifestazione clinica dell'infezione si ha principalmente in animali di pochi mesi, l'alta prevalenza di immunità materna potrebbe essere un'altra spiegazione della quasi totale assenza di malattia clinica riportata nelle popolazioni selvatiche (Williams & Barker, 2001).

Nel cinghiale, la comparsa di livelli rilevabili di anticorpi nel sangue periferico è ritardata nel tempo rispetto all'infezione. Quindi test sierologici eseguiti su animali infettati di recente possono risultare negativi (Ruiz-Fons et al., 2007).

3.6 DIAGNOSI

La diagnosi clinica di pseudorabbia in singoli suini è difficile, se non impossibile: per una diagnosi affidabile va preso in considerazione l'intero allevamento. Caratteristico della pseudorabbia è che morbilità e mortalità decrescano con l'aumentare dell'età dei soggetti. Un ulteriore sospetto può essere instaurato dall'osservazione di sintomi in cani o gatti a contatto con i suini o dal rinvenimento di cani e gatti morti nei pressi dell'allevamento.

Comunque la diagnosi basata sulla sintomatologia clinica e sulle lesioni anatomopatologiche, non è una diagnosi definitiva (Straw et al., 2006).

La diagnosi laboratoristica si basa sull'isolamento di PRV dalle secrezioni orofaringee e nasali (tamponi) o dalle biopsie tonsillari di maiali vivi o da campioni di soggetti morti. Per l'isolamento *post mortem* sono preferibili campioni di tonsille e cervello. Nei suini latentemente infetti, il ganglio del trigemino è il sito d'elezione per l'isolamento virale. Nelle colture cellulari, il virus induce un effetto citopatico che compare in 24-72 ore (a volte può essere, però, necessaria un'incubazione per 5-6 giorni). Comunque, il mancato isolamento di PRV non garantisce in maniera assoluta l'assenza dell'infezione. Colorando con ematossilina ed eosina le cellule, si possono inoltre evidenziare i corpi inclusi intranucleari. L'identità del virus va poi confermata con immunofluorescenza, immunoperossidasi o test di neutralizzazione con antisiero specifico (Straw et al., 2006).

La PCR può essere usata per identificare il virus nelle secrezioni o in campioni di organi. Questa tecnica accorcia notevolmente i tempi necessari alla conferma della presenza del virus. L'immunofluorescenza è usata per rilevare PRV o suoi antigeni in sezioni di tessuto o in strisci per impressione.

La virus-neutralizzazione era riconosciuta come metodo d'elezione per la sierologia ma negli ultimi anni è stata rimpiazzata dall'ELISA, per la sua praticità d'impiego su larga scala. L'ELISA può essere applicata su siero così come su tessuto omogeneizzato. La sensibilità dell'ELISA è superiore a quella della virus-neutralizzazione. I test ELISA in commercio sono volti ad identificare, per via diretta o con tecniche competitive, gli anticorpi. Alcuni di questi kit possono differenziare animali vaccinati da quelli infettati da virus di campo (Straw et al., 2006).

Nei suinetti l'interpretazione dei risultati può essere difficile: gli anticorpi materni possono, infatti, essere presenti fino a quattro mesi d'età dando come risultato animali positivi a causa dell'immunità materna (Straw et al., 2006).

La difficoltà nella diagnosi di PRV è data dalla latenza: suini latentemente infetti possono essere sieronegativi.

Da uno studio effettuato su cinghiali (Ruiz-Fons et al., 2007), il 45% dei soggetti, positivi alla presenza del virus in tonsille e/o ganglio del trigemino tramite PCR, era risultato negativo ai test sierologici. Questo deve essere fonte di riflessione, in quanto si possono andare a movimentare (ad es. per motivi venatori, come avviene in Spagna) animali ritenuti negativi

grazie ai test sierologici e andare ad introdurli in aree che possono essere negative per la presenza del virus, portando così alla diffusione di PRV. Questi soggetti poi sono particolarmente a rischio, in quanto lo stress correlato alla movimentazione può portare alla riattivazione del virus latente. Va inoltre notato come, dallo stesso studio, sia risultato che un alto numero di animali sieropositivi fosse negativo alla presenza del virus tramite PCR. Ciò può avere diverse spiegazioni: capacità del cinghiale di eliminare efficientemente l'infezione da PRV; latenza del virus nelle cellule del ganglio sacrale nei casi d'infezione per via venerea; mancanza di specificità della metodica sierologica usata. Tuttavia essendo i ceppi circolanti nei cinghiali attenuati rispetto a quelli circolanti nei maiali, l'ipotesi più verosimile è che l'infezione latente sia limitata ai gangli sacrali nei casi d'infezione per via venerea (Ruiz-Fons et al., 2007).

Lari et al., 2006, indicano l'IHC su sezioni di tonsille come efficace nella diagnosi di PRV in cinghiali.

3.7 PREVENZIONE E CONTROLLO

A livello di allevamento suinicolo, un requisito essenziale per il controllo e la prevenzione della Pseudorabbia è l'obbligo di notifica, mentre la risposta all'eventuale scoperta della presenza d'infezione va scelta in base a considerazioni locali e regionali: va considerato se l'infezione era già presente o meno, se è un processo in corso, se l'area è indenne o se viene messa in atto la vaccinazione come opzione di controllo. In caso di allevamento infetto le misure possono comprendere *stamping out*, restrizioni alle movimentazioni di animali, contenimento e trattamento di animali morti, decontaminazione di materiali infetti, disinfezione di ambienti, attrezzature e veicoli, incremento del controllo della presenza di ratti (Straw et al., 2006).

Persone non autorizzate, gatti e cani dovrebbero essere tenuti fuori dagli allevamenti, mentre il personale, che ha accesso agli animali, dovrebbe seguire rigide procedure di biosicurezza. Tali regole dovrebbero essere applicate anche a stalle di sosta ed esposizioni e nel trasporto di suini.

L'obiettivo ultimo nel controllo della Pseudorabbia è l'eradicazione, che prevede, come primo passo, una sistematica e intensiva campagna di vaccinazione, il controllo sierologico dei suini per anticorpi gE-specifici, la selezione dei riproduttori. Una volta che l'infezione non circoli più, la vaccinazione dovrebbe essere abolita (Straw et al.,

2006).

Il più importante passo avanti per il controllo e l'eradicazione della malattia è stato lo sviluppo di vaccini geneticamente modificati e dei rispettivi test ELISA. L'uso di vaccino DIVA tramite delezione (la delezione più diffusa è nei confronti del gene codificante per gE) consente, infatti, di distinguere animali infetti da vaccinati, giacché suini che presentano anticorpi contro gE devono essere stati infettati, necessariamente, da un ceppo di campo. La vaccinazione non elimina, comunque, la possibilità di infezione degli individui: essa aumenta la carica virale necessaria perché si instauri l'infezione e riduce, ma non previene completamente, l'eliminazione del virus e l'instaurarsi di latenza (Straw *et al.*, 2006).

In Italia è in atto dal 1997 un Piano di Controllo Nazionale, che reca indicazioni riguardanti norme di biosicurezza, controlli sierologici annuali in allevamenti suini, vaccinazione obbligatoria di tutti i suini allevati con vaccino gE-deleto secondo il seguente protocollo vaccinale:

- riproduttori: vaccinazioni tre volte l'anno. I nuovi nati vaccinati due volte a distanza di 3-4 settimane, con il primo intervento tra 60 e 90 giorni di vita;
- verretti e scrofette: entro 180 giorni di vita va eseguito un richiamo vaccinale;
- suini all'ingrasso: due vaccinazioni a 3-4 settimane di distanza tra loro, con primo intervento tra 60 e 90 giorni di vita. Se macellati dopo il settimo mese di età, va eseguito un altro vaccino tra sei e sette mesi.

Nel Piano di Controllo è inoltre prevista la possibilità per l'allevamento di fare richiesta per la qualifica di allevamento ufficialmente indenne da malattia di Aujeszky.

4. SINDROME RIPRODUTTIVA E RESPIRATORIA SUINA (PRRS)

Alla fine degli anni '80 negli Stati Uniti d'America, episodi epidemici di una malattia, allora sconosciuta, ebbero luogo negli allevamenti di suini. Il quadro clinico includeva grosse perdite riproduttive, polmoniti post-svezzamento diffuse, riduzione delle performance di accrescimento e aumentata mortalità. In Europa, i primi casi simili a quelli riportati negli USA avvennero nel 1990 in Germania, per poi diffondersi rapidamente nel continente nei seguenti quattro anni. In Asia episodi di tale malattia furono riportati in Giappone nel 1988 e in Taiwan nel 1991 (Straw et al., 2006).

L'agente eziologico fu identificato nel 1991 in Olanda: un virus a RNA sconosciuto. Successivamente venne isolato anche in USA e in Canada. Il virus fu chiamato *porcine reproductive and respiratory syndrome* (PRRS) virus o anche *swine arterivirus* (Straw et al., 2006).

4.1 EZIOLOGIA

Il virus causale di PRRS (PRRSV) è un piccolo virus ad RNA a filamento positivo. PRRSV appartiene alla famiglia *Arteriviridae*, la quale, unitamente alla famiglia *Coronaviridae*, forma l'ordine *Nidovirales* (Straw et al., 2006). PRRSV è strettamente correlato al *lactate dehydrogenase-elevating virus* (LDV) del topo, anch'esso un *Arterivirus*.

PRRSV è un virus dotato di *envelope* con un diametro di 50-65 nanometri, una superficie relativamente liscia, e un nucleocapside cuboidale con un diametro di 25-35 nanometri.

PRRSV è altamente ospite-specifico, crescendo primariamente nei macrofagi alveolari suini e in macrofagi di altri tessuti. PRRSV può inoltre replicare nelle cellule germinali testicolari (spermatidi, spermatociti, cellule giganti multinucleate) di verri infetti. Il PRRSV entra nella cellula ospite mediante endocitosi (Straw et al., 2006).

Il genoma del virus è, approssimativamente, di 15 kilobasi, con otto *open reading frames* (ORFs). ORF 1a e 1b comprendono l'80% del genoma e codificano per l'RNA replicasi necessaria per la replicazione virale. ORF 1a e 1b sono tradotti come un'unica proteina, che viene poi processata in proteine non strutturali più piccole. Le proteine non strutturali di

PRRSV, oltre alla loro funzione, hanno un ruolo potenziale nella diagnostica e nella risposta immunitaria dell'ospite. I sei ORFs (2, 3, 4, 5, 6, e 7), localizzati al terminale 3' del genoma, codificano per le proteine strutturali. Le tre proteine strutturali più importanti sono GP5, M e N. La proteina N interagisce con l'RNA virale nell'assemblaggio delle particelle infettanti. La proteina N rappresenta il 20-40% del contenuto proteico totale di un virione. La proteina M è una proteina dell'*envelope* ed è quella geneticamente più conservata tra tutte le proteine di PRRSV. Essendo una proteina di matrice, M è importante nell'assemblaggio e nella gemmazione del virus. La proteina M induce anticorpi PRRSV-neutralizzanti. Unitamente al complesso M-GP5, la proteina M contribuisce all'attacco del virus ai recettori *heparin-like* dei macrofagi alveolari suini. GP5 è la proteina primaria dell'*envelope* ed è coinvolta nel riconoscimento dei recettori (Straw et al., 2006).

I ceppi di PRRSV sono eccezionalmente variabili per quanto riguarda la presentazione clinica della malattia, le differenze nella virulenza riproduttiva e/o respiratoria, le differenze antigeniche, le differenze nelle sequenze dell'RNA.

4.2 EPIDEMIOLOGIA

PRRSV si può rinvenire ovunque si trovino i maiali nel mondo. Nelle aree in cui circola il virus, si arriva a un 60-80% di allevamenti di suini infetti. L'uso di vaccini vivi modificati ha reso difficile stimare la prevalenza: gli anticorpi contro il virus vaccinale non sono facilmente differenziabili da quelli contro il virus di campo e inoltre i virus vaccinali stessi si diffondono e sono trasmessi in campo.

Esistono attualmente due genotipi differenti, uno proveniente dal Nord America ed uno dall'Europa che hanno tra loro una omologia nucleotidica del 60% (Ruiz-Fons et al., 2008a).

Presumibilmente, PRRSV è arrivato al suino domestico tramite una specie selvatica non ancora identificata (secondo Plagemann, 2003, il cinghiale). I suini selvatici e i cinghiali sono suscettibili all'infezione da PRRSV ma la sieroprevalenza in questi animali è bassa, com'è confermato da numerosi studi: nessuna positività alla ricerca di RNA virale e una sola sieropositività, con valori dubbi, in 203 animali testati (Hammer et al., 2012), 3,82% di sieropositività in 1.221 animali (Kaden et al., 2009) in Germania; nessuna positività alla presenza del virus e nessuna sieropositività in 90 cinghiali in Russia (Kukushkin et al., 2008); sette sieropositività (2,04%) e nessuna positività alla presenza del virus in 294 animali

(Rodríguez Prieto et al., 2013), nessuna positività in 123 animali (Ruiz-Fons et al., 2006), 2,2% di sieroprevalenza in 407 cinghiali (Boadella et al., 2012b) in Spagna; sieroprevalenza del 0,4% in 252 animali in Svizzera (Wu et al., 2011); sieroprevalenza del 6,3% in 556 animali in Croazia (Roic et al., 2012); 3,64% di sieroprevalenza in 906 animali in Francia (Albina et al., 2000); 2,2% di sieroprevalenza in 93 animali in Turchia (Albayrak et al., 2013); sieroprevalenza del 1,5% e positività del 3,0% per antigeni virali in 267 animali in Corea (Choi et al., 2012); nessuna sieropositività su 303 cinghiali allevati in Finlandia (Hälli et al., 2012).

In contrasto a quanto appena elencato, sono state riscontrate positività del 15,9% alla presenza di RNA virale in 521 animali in Germania (Reiner et al., 2009) e sieroprevalenza del 37,7% in 342 cinghiali in Italia (Montagnaro et al., 2010). Va notato però che nell'area di studio di Montagnaro et al. (Campania, Italia) ci sono molti allevamenti rurali di suini, di piccole dimensioni: questa tipologia di allevamento favorisce maggiormente il contatto tra cinghiali e suini.

Nonostante il basso tasso d'infezione, è possibile teoricamente che i cinghiali fungano da fonte marginale di PRRSV nelle zone in cui sono in contatto con suini domestici (Straw et al., 2006). La trasmissione di PRRSV sarebbe favorita in popolazione di cinghiali ad alta densità, ma l'assenza dell'infezione (o tassi di sieroprevalenza molto bassi) in gruppi di questo tipo, suggerisce che la trasmissione del virus dai maiali ai cinghiali non avviene o avviene sporadicamente (attualmente è più probabile la trasmissione di PRRSV dal maiale al cinghiale che viceversa (Ruiz-Fons et al., 2008a)).

Secondo Kukushkin et al. (2008) la diffusione del virus ai cinghiali è limitata da:

- gli allevamenti industriali moderni sono fatti in modo tale per cui i suini sono tenuti in luoghi chiusi e confinati, limitando in questo modo il contatto con animali selvatici;
- il suino è il vettore principale e l'unico ospite biologico del virus;
- PRRSV non è stabile nell'ambiente;
- nell'organismo suino PRRSV si trova al massimo per cinque mesi.

I bassi tassi d'infezione rinvenuti sono tali perché, probabilmente, l'infezione rimane confinata al singolo individuo e si diffonde difficilmente, essendo i contatti diretti rarefatti rispetto all'allevamento di suini domestici, ed essendo la trasmissione indiretta meno efficace (Rodríguez Prieto et al., 2013).

Plagemann (2003) postula che un virus mutante dal LDV possa originariamente aver infettato cinghiali nell'Europa centrale, i quali abbiano svolto la funzione di ospite

intermedio nel passaggio ed adattamento del virus mutante al suino domestico. L'importazione negli USA, nel 1912, di cinghiali infettati da tale virus ha portato la diffusione di quest'ultimo nei suini nord-americani, nei quali per primi è stata osservata l'infezione dal poi così nominato PRRSV. In Europa si è andato evolvendo parallelamente il virus, portando così alla formazione dei due genotipi attuali, il Nord-Americano e l'Europeo. Questa ipotesi spiegherebbe perché i virus isolati da Reiner et al. (2009) da cinghiali in Germania siano correlati maggiormente al genotipo Nord-Americano rispetto all'Europeo. Inoltre le basse positività a PRRSV, riscontrate nei cinghiali dagli studi effettuati, potrebbero essere spiegate con l'inadeguatezza dei test sierologici a rilevare anticorpi verso il virus mutante dal LDV, che potrebbe ancora circolare nei cinghiali, in quanto tali test sono basati sul virus causale di PRRS nel suino.

La prevalenza di PRRSV, nel cinghiale, non è correlata all'età né al peso dei soggetti. Da alcuni studi, inoltre, non emerge una correlazione tra la densità di suini domestici e cinghiali per area e la prevalenza di PRRSV nei secondi, in contrasto con quanto ragionevolmente ci si potrebbe aspettare (Reiner et al., 2009). Ciò porta alla conclusione che l'infezione nei cinghiali sia un aspetto sporadico più che un evento sistematico (Reiner et al., 2009).

Da tutto questo si arriva alla conclusione che i cinghiali potrebbero non giocare un ruolo importante come *reservoir* di PRRSV o potrebbero avere una resistenza naturale a tale patogeno (Hammer et al., 2012). Considerate queste basse prevalenze più d'un autore conclude che il cinghiale non sia coinvolto significativamente nell'epidemiologia di PRRS (Ruiz-Fons et al., 2008a; Hammer et al., 2012; Kukushkin et al., 2008; Rodríguez Prieto et al., 2013; Reiner et al., 2009; Ruiz-Fons et al., 2006).

Per quel che riguarda altre specie, è stata riportata la suscettibilità solo nel Germano Reale (Straw et al., 2006).

Nella specie suina, gli animali infetti eliminano il virus tramite saliva, secrezioni nasali, urine, seme e feci. Femmine gravide infettate in tarda gravidanza eliminano il virus anche nelle secrezioni mammarie. Si può rinvenire RNA virale nel seme fino a 92 giorni dall'inizio dell'infezione (Straw et al., 2006).

I suini sono suscettibili al PRRSV per diverse vie di esposizione: intranasale, intramuscolare, orale, intrauterina e vaginale. La dose infettante del virus cambia secondo la via d'ingresso e la via per la quale gli animali sono più suscettibili è l'esposizione parenterale (rottura della barriera cutanea). È presente anche la trasmissione indiretta del virus da parte di oggetti

inanimati (strumenti, vestiti, ecc.), sostanze (es. cibo, acqua), vettori animati (insetti quali zanzare e mosche), aerosol e anche da parte del personale a contatto con suini infetti. PRRSV è trasmesso da madri viremiche, per via transplacentare, ai feti, portando a morte fetale o a nascita di suinetti infetti che risultano deboli o apparentemente normali. PRRSV di solito infetta i feti nell'ultimo trimestre di gravidanza in quanto ad età gestazionali precedenti il virus non è in grado di diffondersi efficacemente tramite la placenta (Straw et al., 2006).

La trasmissione tra cinghiale e suino domestico può avvenire per diverse vie: la via prevalente, probabilmente, è costituita dal liquame infetto e da scarti alimentari. Contatti diretti si suppongono essere molto rari (Kaden et al., 2009).

PRRSV produce un'infezione cronica e persistente nei suini. Il virus replica nelle cellule suscettibili di animali *carrier*, clinicamente sani, per molti mesi. L'infezione persistente non è dipendente dall'età dell'animale al momento dell'infezione. Il meccanismo tramite cui il virus è capace di persistere nonostante un sistema immunitario attivo è sconosciuto (Straw et al., 2006).

PRRSV è labile nell'ambiente e viene rapidamente inattivato dal calore e dall'essiccamento. Il virus può restare infettivo per un periodo prolungato se presenti determinate temperature, pH e umidità: è stabile per mesi/anni a temperature di -70°C/-20°C. A 4°C, circa il 90% dell'infettività del virus è persa in una settimana. A pH compreso tra 6,5 e 7,5, il virus è stabile, ma a valori inferiori o superiori l'infettività è persa rapidamente (Straw et al., 2006).

Il virus tende a circolare continuamente all'interno di un allevamento. L'endemicità sembra essere data dalla presenza d'infezione in animali *carrier* unitamente alla continua disponibilità di animali suscettibili (nascite, perdite d'immunità) (Straw et al., 2006).

Per la trasmissione tra allevamenti, è cruciale la movimentazione di animali infetti e l'uso di seme contaminato. Le Potier et al., 1997, hanno stimato che il 56% delle aziende studiate acquisì l'infezione tramite l'introduzione di maiali infetti, il 20% tramite il seme, il 21% tramite i liquami. Il virus, inoltre, si può facilmente diffondere tra allevamenti tramite strumenti e oggetti comunemente usati in ambito lavorativo. Fondamentali risultano quindi, nell'ottica di prevenzione dell'infezione, le misure di biosicurezza.

La prossimità tra mandrie è un altro fattore di rischio riconosciuto per l'infezione. È documentata l'infezione in allevamenti a partire da una fonte distante 500 metri. La diffusione aerea è legata ad aerosol o a insetti vettori (Straw et al., 2006).

Con l'aumento dell'uso del sequenziamento genetico, si è arrivati alla constatazione che ceppi geneticamente diversi di PRRSV possono coesistere all'interno della stessa azienda. Contemporaneamente, i sequenziamenti hanno portato alla rilevazione che ceppi di genotipo europeo circolano in aree prima considerate esclusive per circolazione di ceppi di genotipo americano e viceversa. Pertanto nella stessa area, due distinti genotipi di PRRSV, che condividono solo parzialmente una cross-protezione, possono essere rinvenuti. Il sequenziamento ha inoltre permesso di verificare che i vaccini attenuati hanno la capacità di rivirulentarsi (Straw et al., 2006).

4.3 PATOGENESI

A seguito dell'esposizione, la replicazione virale avviene primariamente nei macrofagi locali e poi rapidamente si diffonde ad organi linfoidi, polmoni e in minor parte ad altri tessuti. I ceppi più virulenti di PRRSV causano viremia già 12 ore dopo la penetrazione in alcuni soggetti, in tutti a 24 ore post-inoculazione (assieme all'infezione di tessuti linfoidi e polmoni). Il titolo virale cresce rapidamente e si ha un picco in siero, linfonodi e polmoni a 7-14 giorni. I titoli virali più alti si rinvergono nei polmoni (Straw et al., 2006).

PRRSV replica primariamente in cellule ben differenziate, derivate dai monociti, le quali posseggono un recettore glicoproteico, al quale il virus si lega, permettendo la penetrazione nella cellula per endocitosi mediata da recettori. Le cellule differenziate, in grado di supportare la replicazione virale, includono i macrofagi alveolari polmonari, i macrofagi intravascolari nei polmoni ed i macrofagi nei tessuti linfoidi. La maturità e/o l'attivazione dei macrofagi è richiesta per la replicazione di PRRSV. I macrofagi raccolti da esemplari giovani permettono la replicazione di PRRSV in maggior quantità rispetto a quelli di suini adulti. PRRSV è inoltre in grado di replicare nelle cellule della microglia (Straw et al., 2006).

Solitamente, la malattia clinica e le lesioni maggiori corrispondono ai siti ed al picco del titolo virale, cioè a 7-14 giorni post-infezione in linfonodi e polmoni. Nei nati morti e nei neonati congenitamente infetti, le lesioni si ritrovano soprattutto negli organi linfoidi, non nei polmoni.

Dopo il picco, il titolo virale sierico diminuisce rapidamente. La maggior parte dei suini non è più viremica a 28 giorni post-inoculazione anche se si riscontra RNA virale nel siero fino a 251 giorni tramite rt-PCR. Nei soggetti congenitamente infetti la viremia dura di più (isolamento

virale fino a 48 giorni post nascita). I suini congenitamente infetti o infettati post-nascita risultano persistentemente infetti, con il virus che si localizza nelle tonsille e/o nei linfonodi (soprattutto nei linfonodi sternali e/o inguinali). Il virus in questi soggetti è continuamente prodotto in basse dosi nei tessuti linfoidei come conseguenza di una continua replicazione a bassi livelli (Straw et al., 2006).

Le lesioni e le manifestazioni cliniche causate dalla replicazione di PRRSV nelle cellule e tessuti target sono causate da: apoptosi di cellule infette, apoptosi di cellule prossime alle infette (ma non infette esse stesse) (apoptosi indiretta), induzione delle citochine infiammatorie, induzione dell'attivazione di cellule B policlonali, riduzione della fagocitosi batterica e distruzione dei macrofagi (che porta ad una aumentata suscettibilità alle setticemie) (Straw et al., 2006).

La causa dell'apoptosi nei macrofagi infettati da PRRSV potrebbe essere il prodotto del gene ORF5 mentre la causa di apoptosi indiretta è probabilmente il rilascio di sostanze da parte dei macrofagi infetti (citochine apoptogeniche, ROS, monossido di azoto). La replicazione di PRRSV in organi linfoidei porta all'attivazione di cellule B policlonali: macroscopicamente, questo appare come una iperplasia linfoide nodulare e microscopicamente come un'iperplasia linfoide follicolare (Straw et al., 2006).

4.4 SEGNI CLINICI E LESIONI

La presentazione clinica di PRRS varia grandemente tra allevamenti, passando da forme asintomatiche a sintomatologie devastanti. I segni clinici possono inoltre essere mascherati o aumentati da infezioni concomitanti. Non esiste una caratteristica ben precisa e costante nell'infezione da PRRSV. I segni clinici sono influenzati dal ceppo virale, dallo stato immunitario dell'ospite, dalla suscettibilità dell'ospite, da infezioni concomitanti e da fattori di management. La malattia clinica nell'allevamento di suini è primariamente la conseguenza della viremia acuta negli individui e della trasmissione transplacentare, che risulta in problemi riproduttivi (Straw et al., 2006).

Scoppi epidemici della malattia avvengono quando PRRSV entra in un allevamento immunologicamente *naïve* e individui di tutte le età sono colpiti. PRRS in forma endemica si verifica in allevamenti che hanno un'immunità verso il ceppo circolante di PRRSV. La PRRS endemica si rende evidente clinicamente nelle sottopopolazioni suscettibili ovvero in suinetti

alla diminuzione dell'immunità materna, in scrofe e scrofette di rimonta non ancora venute a contatto col ceppo di PRRSV circolante nella nuova realtà e conseguentemente nella loro progenie, congenitamente infetta (Straw et al., 2006).

La variabilità antigenica dei ceppi di PRRSV esistenti fa sì che, in mandrie endemicamente infette con un ceppo di PRRSV, un nuovo ceppo non correlato al precedente possa causare uno scoppio epidemico della malattia.

Nelle epidemie di PRRS la prima fase dura due o più settimane ed è caratterizzata da anoressia e letargia nel 5-75% degli animali (di tutte le età) come risultato della viremia. Inizia in una categoria di suini del ciclo produttivo e si diffonde rapidamente, in 3-7 giorni, a tutte le categorie produttive. I pazienti clinicamente affetti possono essere linfopenici, piretici (temperatura rettale di 39-41°C), tachipnoici e dispnoici, hanno iperemie cutanee transienti a macchie e cianosi delle estremità. La seconda fase inizia alla fine della malattia acuta e dura per 1-4 mesi: questa fase è caratterizzata da insuccessi riproduttivi (soprattutto in scrofe che erano nel loro terzo trimestre di gravidanza) e da alta mortalità pre-svezzamento. Quando questi parametri ritornano a livelli normali, l'infezione endemica nell'allevamento continua (Straw et al., 2006).

Nelle scrofe, durante la fase acuta della malattia, l'1-3% delle figliate può essere perso in scrofe dal 21° al 109° giorno di gestazione. La mortalità nelle scrofe è dell'1-4% ed è associata a volte ad edema polmonare e/o cistite/nefrite. In alcuni casi ci sono mortalità del 10%, aborti fino al 50% e sintomi nervosi (atassia, *circling*, paresi). L'insuccesso riproduttivo a lungo termine inizia ad una settimana e dura per quattro mesi. Non tutte le scrofe risultano malate clinicamente nella fase acuta, ma il 5-80% di esse partorisce a 100-118 giorni figliate composte da suinetti normali, deboli e piccoli, morti, nati morti, mummificati parzialmente o totalmente. Le scrofe negli accoppiamenti successivi avranno ritorni in estro ritardati e bassi tassi di concepimento.

Nei verri, oltre ad anoressia, letargia e sintomi respiratori, si riscontra un calo della libido e una riduzione della qualità del seme. Inoltre eliminano il virus nel seme.

Nei suinetti pre-svezzamento, si assiste ad un alta mortalità (fino al 60%) di quei soggetti nati prematuramente. In questi individui si riscontra abbattimento, emaciazione, postura *splay-legged*, tachipnea, dispnea, tremori, anemia, trombocitopenia (con conseguenti emorragie) e aumento di poliartriti e meningiti batteriche.

Nei suini svezzati e all'ingrasso l'infezione acuta è caratterizzata da anoressia, letargia, iperemia cutanea, tachipnea e dispnea, pelo ispido, riduzione dell'accrescimento giornaliero (riduzione molto variabile tra individui). Si rileva un aumento di altre malattie ed una mortalità del 12-20%.

Non sono stati descritti casi clinici nei cinghiali, nei quali la sintomatologia rimane sconosciuta. Si può supporre che i disordini riproduttivi e respiratori avvengano anche nei cinghiali, ma il basso tasso di circolazione del virus, suggerisce che l'infezione non abbia un'influenza significativa in questa specie (Ruiz-Fons et al., 2008a).

Per quel che riguarda le lesioni anatomo-patologiche, PRRSV causa una polmonite interstiziale ed un aumento di dimensione dei linfonodi in suini di tutte le classi d'età. Queste lesioni sono suggestive di infezione da PRRSV ma non sono diagnostiche, in quanto lesioni simili sono causate da un gran numero di batteri e virus. La gravità e la distribuzione delle lesioni variano a seconda della virulenza del ceppo infettante. Lesioni macroscopiche e microscopiche si osservano da 4 a 28 giorni post-infezione in polmoni e linfonodi. Da 7 a 14 giorni post-infezione si iniziano ad osservare lesioni microscopiche a reni, cervello, cuore, utero, testicoli. Il virus in queste lesioni si rinviene nelle cellule endoteliali e nei macrofagi perivasali ed intravascolari. Nei suini di età inferiore a 13 giorni si osservano inoltre edema perioculare, scrotale e sottocutaneo (Straw et al., 2006).

A livello polmonare le lesioni si localizzano ai lobi craniali o, in alternativa, sono diffuse. Il parenchima colpito è elastico, compatto, non collassa, chiazzato di grigio-marrone ed essudante. Microscopicamente, i setti alveolari sono espansi da macrofagi, linfociti e plasmacellule e possono essere delimitati da pneumoniti iperplastici di tipo II. Gli alveoli contengono macrofagi necrotici, detriti cellulari e fluido sieroso. I linfociti e le plasmacellule formano "manicotti" attorno alle vie aeree ed ai vasi sanguigni (Straw et al., 2006).

I linfonodi sviluppano lesioni da 4-28 giorni post-infezione; essi si ingrandiscono di 2-10 volte le normali dimensioni. Le lesioni microscopiche sono soprattutto a carico dei centri germinativi, i quali, precocemente in corso d'infezione, sono necrotici e depleti; successivamente risultano ingranditi e composti da linfociti blastici. Microscopicamente ci può essere necrosi linfoide, deplezione e/o iperplasia nel timo, nelle cinture linfoidi periarteriolari della milza, linfomi delle tonsille e delle placche del Peyer (Straw et al., 2006).

Possono svilupparsi vasculite, miocardite, encefalite a livello di cervelletto, cervello e tronco encefalico, *cuffing* perivascolare ad opera di macrofagi e linfociti, gliosi multifocale. I reni

occasionalmente hanno lievi aggregati linfocitici periglomerulari e peritubulari (14-42 giorni post-infezione). Nell'utero, il miometrio e/o l'endometrio si presentano. Nei verri, si osserva atrofia dei tubuli seminiferi e deplezione delle cellule germinali (Straw et al., 2006). Le lesioni sono più significative nei nati vivi ma infetti, che non sopravvivono ai primi giorni di vita: essi mostrano edema perirenale e del legamento splenico ed edema mesenterico, ascite, idrotorace e idroperitoneo. Una lesione rara ma discriminante per la diagnosi è l'ingrandimento segmentale emorragico del cordone ombelicale fino a tre volte il normale diametro (dato da vasculite linfocitica segmentale necrosuppurativa) (Straw et al., 2006).

4.5 IMMUNITA'

Non è ancora del tutto chiara la risposta immunitaria verso l'infezione da PRRSV. La risposta immunitaria inizia con una risposta antivirale attenuata nel citoplasma dei macrofagi infetti. La *down-regulation* di IFN-alpha favorisce la replicazione di PRRSV, in quanto questa molecola è una inibitrice della replicazione del virus stesso. Questa risposta innatamente debole compromette la susseguente elaborazione di una immunità antigene-specifica (Straw et al., 2006).

Nel siero IgM specifiche per PRRSV appaiono a 5-7 giorni post-infezione e scendono a livelli non rilevabili dopo 2-3 settimane. IgG anti-PRRSV sono rilevabili 7-10 giorni post-infezione, hanno un picco a 4 settimane, rimangono costanti per mesi e poi declinano a bassi livelli a 300 giorni (Straw et al., 2006).

Gli anticorpi diretti contro la proteina nucleocapsidica (N) sono i più abbondanti e sono usati nella diagnostica per rilevare gli animali infetti, ma non sono neutralizzanti.

Gli anticorpi virus-neutralizzanti (VN) appaiono nel siero dopo tre settimane dall'inizio dell'infezione e sono mantenuti per lunghi periodi ma a bassi livelli; essi sono prodotti contro le glicoproteine GP4 e GP5 e contro la proteina di matrice (M) (Straw et al., 2006).

La risposta umorale si presume giochi un ruolo importante nella resistenza alla reinfezione e nella prevenzione o riduzione della trasmissione virale tra individui (Straw et al., 2006).

Per quel che riguarda la risposta cellulo-mediata, si rinvia una risposta a cellule T PRRSV-specifica 2-8 settimane post-infezione. Questa risposta verso PRRSV è, però, molto variabile

e transitoria. La debole risposta delle cellule T contribuisce probabilmente al realizzarsi dell'infezione prolungata da PRRSV (Straw et al., 2006).

PRRSV persiste per settimane o mesi nei tessuti linfoidei. La persistenza del virus nei polmoni e nei linfonodi nonostante la presenza di anticorpi neutralizzanti e di immunità cellulo-mediata porta alla conclusione che altri fattori, come una alterazione dei macrofagi ed un'immunità innata, possano essere importanti nel controllo dell'infezione da PRRSV.

Maiali infetti o vaccinati con vaccini vivi sono resistenti agli effetti riproduttivi di PRRSV quando sono nuovamente esposti a virus omologhi.

PRRSV è in continua evoluzione e perciò i ceppi vaccinali sono sempre differenti da quelli isolati in campo. Vaccini vivi attenuati sono efficaci nel ridurre la gravità della malattia, la durata della viremia, l'eliminazione virale e la frequenza di infezione con PRRSV eterologhi (Straw et al., 2006).

Scrofe immuni forniscono una protezione materna ai suinetti. L'immunità materna è comunque breve. Uno studio (Melnichouk et al., 2005) dimostra che il 12-44% dei suinetti ha anticorpi materni a 3 settimane d'età ma solo il 2-16% li ha ancora a 5 settimane d'età. Nella scrofa, un'immunità già presente riduce ma non elimina completamente il rischio d'infezione transplacentare (Straw et al., 2006).

4.6 DIAGNOSI

La diagnosi di PRRSV si basa su rilievi soggettivi (anamnesi, segni clinici, lesioni macroscopiche e microscopiche) e su rilievi oggettivi (registri della produzione dell'allevamento, rilevamento del virus, sierologia).

Una diagnosi preventiva di PRRSV può essere suggerita da problemi respiratori presenti in soggetti di tutte le età e da problemi riproduttivi nei riproduttori.

Campioni di polmone, linfonodi, cuore, cervello, timo, milza e reni possono essere fissati in formalina e valutati al microscopio e con immunoistochimica (IHC). Combinando queste due tecniche si possono visualizzare cellule contenenti antigeni virali, vicino o all'interno delle lesioni microscopiche. Queste tecniche sono più sensibili nella fase acuta (4-14 giorni post-infezione), ma virus infettante si può trovare in lavaggi polmonari, tonsille e linfonodi per molte settimane dopo la fine della fase viremica (Straw et al., 2006).

Gli antigeni virali si possono trovare anche usando anticorpi fluorescenti (FA) usando sezioni di tessuto congelato. Per FA si usano principalmente campioni di polmone. Sia FA che IHC vanno a trovare antigeni virali del nucleocapside, presenti nel citoplasma cellulare di cellule infette. Gli antigeni virali sono più facilmente rilevabili al picco di replicazione virale (4-7 giorni post-infezione) (Straw et al., 2006).

L'isolamento di PRRSV da colture cellulari, seguito dall'uso di anticorpi fluorescenti o da immunoistochimica, è il gold standard per rilevare la presenza di virus infettante (Straw et al., 2006).

Il virus può anche essere trovato usando tecniche di isolamento virale, anticorpi fluorescenti (FA) e PCR in colture indirette di macrofagi alveolari raccolti da lavaggi polmonari di suini vivi o in corso di necropsia. L'isolamento virale è più efficace usando siero, polmone, linfonodi e tonsille raccolti a 4-28 giorni post-infezione.

Le tecniche PCR mirano ad individuare acidi nucleici virali in siero, seme, omogeneizzati di tessuti, raschiati orofaringei e fluidi di lavaggio polmonare. La PCR oltre ad essere più sensibile e specifica rispetto ad altre tecniche permette il ritrovamento di RNA virale sia in fase acuta che nei soggetti persistentemente infetti e in campioni di feti autolitici oltre che in campioni, quali feci e seme, che sono tossici per le colture cellulari. Inoltre i risultati sono disponibili in 1-3 giorni e i prodotti della PCR possono essere usati per il sequenziamento virale. Lo svantaggio principale è che questa tecnica non differenzia tra virus infettante e non. I test PCR hanno come target soprattutto ORF6 e ORF7 ovvero le sequenze più consistenti in nucleotidi tra i diversi ceppi di PRRSV. Se invece il sequenziamento è usato per monitorare l'evoluzione virale nell'allevamento, si usa ORF5 come target. Il sequenziamento è fatto di norma su ORF5 e ORF6. ORF5 è altamente variabile mentre ORF6 è conservato e serve come controllo nel sequenziamento (Straw et al., 2006).

La diagnosi sierologica è ancora ampiamente utilizzata. Sierologicamente, per diagnosticare l'infezione da PRRSV va dimostrata la sieroconversione. La sierologia non è però un valido metodo per la diagnosi di PRRSV in allevamenti in cui si è verificata l'infezione, o si è praticata la vaccinazione in passato, in quanto non differenzia tra anticorpi risultanti dalla infezione iniziale, dalla nuova infezione o dalla vaccinazione (Straw et al., 2006).

La tecnica IFA (*indirect fluorescent antibody*) va a trovare IgM e IgG già a 5 e 9-14 giorni post-infezione, rispettivamente. Le IgM persistono fino a 21-28 giorni post-infezione mentre le IgG, che hanno un picco a 30-50 giorni post-infezione, non sono più rilevabili a 3-5 mesi post-

infezione. Non esiste cross reazione tra ceppi Nord-Americani ed Europei usando IFA. Questa tecnica si usa, di solito, per confermare una positività risultata da test ELISA (Straw et al., 2006).

I test ELISA commerciali sono il gold standard per il rilievo di anticorpi verso PRRSV. La tecnica è sensibile, specifica, standardizzata e rapida. Il test ha come target anticorpi diretti contro il nucleocapside di ceppi virali sia Nord-Americani che Europei. Gli anticorpi si rilevano già a 9 giorni post-infezione, hanno un picco a 30-50 giorni e declinano a livelli non rilevabili a 4-12 mesi post-infezione. I risultati dell'ELISA sono interpretati come positivi ($S/P \geq 0,4$) o negativi ($S/P < 0,4$)¹. Campioni negativi all'ELISA, possono esserlo perché: i suini non sono infetti; i suini si sono infettati recentemente e non hanno ancora sierconvertito; i suini sono persistentemente infetti ma sono diventati sieronegativi; i suini hanno eliminato l'infezione e sono tornati allo stato di sieronegativi; i suini risultano negativi a causa di una bassa sensibilità del test (Straw et al., 2006).

La virus-neutralizzazione sierica ricerca anticorpi capaci di neutralizzare una quantità costante di virus in colture cellulari. Il test è altamente specifico ma gli anticorpi non si sviluppano fino a 1-2 mesi post-infezione (per questo il test è meno sensibile di IFA ed ELISA) (Straw et al., 2006).

4.7 PREVENZIONE E CONTROLLO

L'obiettivo dei programmi di prevenzione nei confronti di PRRSV è sia evitare di introdurre il virus in allevamenti negativi alla sua presenza, sia evitare di introdurre nuovi ceppi virali in allevamenti già infetti. Fondamentale per questo, sono le norme di biosicurezza, che partono dalla localizzazione dell'allevamento in aree isolate. Cruciali nelle prassi di biosicurezza, sono le procedure che coinvolgono le movimentazioni di oggetti, persone ed animali in entrata ed in uscita dall'azienda.

Tutti gli esemplari da rimonta che arrivano in un allevamento negativo per la presenza di PRRSV devono provenire da allevamenti a loro volta negativi. In aggiunta a ciò, i nuovi individui vanno tenuti in quarantena per una trentina di giorni minimo e poi testati prima

¹ $S/P = \frac{\text{densità ottica allo spettrofotometro (OD) del campione} - \text{OD controllo negativo}}{\text{OD controllo positivo} - \text{OD controllo negativo}}$

della definitiva introduzione. Il seme per l'inseminazione artificiale deve provenire da verri negativi per PRRSV.

Non essendo disponibili trattamenti per PRRSV, il controllo si basa sulla limitazione degli effetti negativi dell'infezione nelle varie categorie produttive. La circolazione del virus in riproduttori sfocia nella produzione di suinetti infetti. Perciò il primo passo per interrompere la circolazione virale nelle scrofe è usare animali da rimonta che siano stati precedentemente esposti al PRRSV circolante nella nuova azienda, in modo che sviluppando un'immunità, i segni clinici si stabilizzino e ci sia un miglioramento dei parametri produttivi. L'acclimatamento delle scrofette permette la loro introduzione nella fase riproduttiva quando hanno ormai sviluppato un'immunità verso PRRSV (Straw et al., 2006).

Un metodo ulteriore per minimizzare gli effetti dell'infezione da PRRSV è l'interruzione temporale nell'introduzione di animali di rimonta (2-4 mesi). In questo modo si raggiunge una sorta di stabilizzazione nella situazione dell'allevamento (il virus comunque non viene eliminato).

Per controllare la diffusione dell'infezione ai suinetti recentemente svezzati da parte dei suini più grandi d'età si usa il sistema tutto-pieno/tutto-vuoto. Lasciando degli spazi vuoti, e utilizzando il vuoto per lavaggi e disinfezioni, per un determinato tempo, nelle strutture dell'allevamento si blocca la trasmissione laterale del virus (Straw et al., 2006).

Per quel che riguarda la vaccinazione, vaccini vivi attenuati forniscono un'immunità maggiormente efficace rispetto ai vaccini inattivati. Il problema dei vaccini vivi attenuati è che si comportano come il virus di campo, diffondendosi e trasmettendosi come esso, ed esiste la possibilità di rivirulentazione del virus vaccinale (Straw et al., 2006). A tal proposito, Choi et al., nel 2012, hanno rilevato come la sequenza ORF7 isolata da cinghiali, di virus di genotipo 2, fosse identica a quella di un virus vaccinale usato a livello mondiale. È possibile che il virus vaccinale attenuato si sia diffuso ai cinghiali pertanto.

5. EPATITE E

Il virus dell'epatite E (HEV) è l'agente causale dell'epatite E, un importante problema di salute pubblica in molti Paesi in Africa ed Asia. Il tasso di mortalità associato all'infezione da HEV nell'uomo è generalmente basso (inferiore all'1%), ma può raggiungere valori fino al 25% in gravidanza. Benché nei paesi industrializzati siano diagnosticati solo casi sporadici di epatite E acuta, è stata riportata un'alta prevalenza di anticorpi contro HEV nella popolazione (dal 17% al 25%, fino al 50% in categorie di lavoratori a contatto con i suini). Questo fatto ha portato al sospetto dell'esistenza di un *reservoir* animale per questa infezione ed alla conseguente conclusione che l'epatite E sia una zoonosi (Straw et al., 2006). La prima evidenza sperimentale di un'infezione da HEV nei suini, è stata riportata da Balayan et al. (1990), i quali hanno infettato sperimentalmente maiali domestici con un ceppo di HEV umano isolato nel continente asiatico. Nel 1995, Clayson et al. hanno riportato la presenza di IgG anti-HEV in 18 suini (sui 55 presi in considerazione) e la presenza di RNA virale nel siero e nelle feci di 3 (su 47) suini. Successivamente Meng et al. (1997) hanno isolato e caratterizzato il primo ceppo animale di HEV, ovvero il virus dell'epatite E suina, da maiali negli Stati Uniti.

La scoperta dell'esistenza del virus dell'epatite in suini e la capacità di tale virus di trasmettersi tra specie diverse ha portato preoccupazione relativamente ai potenziali problemi per la sicurezza alimentare, la salute pubblica e per i xenotrapianti con organi e cellule di origine suina (Straw et al., 2006).

La presenza del virus dell'epatite E è stata appurata anche in popolazioni di cinghiali, tramite indagini sierologiche e molecolari. È stata, inoltre, descritta e documentata la capacità dell'HEV di trasmettersi all'uomo tramite il consumo di carne cruda o poco cotta di cinghiali e cervi (Ruiz-Fons et al., 2008a).

5.1 EZIOLOGIA

HEV è stato recentemente classificato nella famiglia *Hepeviridae*. L'HEV è un virus sferico, non provvisto di *envelope*, di 32-34 nanometri di diametro, con depressioni a coppa sulla superficie, simili a quelle dei *calicivirus*. La morfologia dell'HEV suino non è nota ma ci si

aspetta sia simile a quella sopra descritta. Come l'HEV umano, anche quello suino non è efficacemente coltivabile in colture cellulari (Straw et al., 2006).

Il genoma dell'HEV è costituito da RNA ad elica singola a senso positivo, di circa 7,2 kilobasi di lunghezza. Il genoma dell'HEV suino contiene tre *open reading frames* (ORFs), una breve regione 5' non codificante (NCR) e una breve regione 3' NCR. La regione ORF1, localizzata all'estremità 5' del genoma, codifica per una poliproteina, che viene in seguito clivata in proteine non strutturali; ORF2 per la proteina immunogenica del capsido; ORF3, che si sovrappone parzialmente sia a ORF1 sia a ORF2, codifica per una piccola proteina con funzioni sconosciute. Nell'HEV umano, ORF3 codifica per una fosfoproteina associata al citoscheletro, che potrebbe essere coinvolta nella replicazione virale (Straw et al., 2006).

5.2 EPIDEMIOLOGIA

L'infezione da HEV suino è ubiquitaria nei maiali a livello mondiale, sia nei paesi in via di sviluppo sia in quelli industrializzati, indifferentemente dal fatto che HEV sia endemico o meno nelle rispettive popolazioni umane. L'HEV suino infetta inoltre il cinghiale (Straw et al., 2006).

I maiali infetti hanno generalmente una viremia transitoria, di durata di 1-2 settimane, ed eliminano il virus nelle feci per 3-7 settimane. L'infezione da HEV, nel maiale, avviene, solitamente, a 2-3 mesi di vita, poco dopo che gli anticorpi materni finiscono di avere funzione protettiva. Gli animali adulti, nonostante siano comunemente positivi per IgG anti-HEV, non sono eliminatori del virus (Straw et al., 2006).

Nel cinghiale tuttavia la situazione è differente, in quanto sono state riscontrate positività alla ricerca dell'RNA virale, suggestive di infezione in atto, anche in soggetti adulti o comunque oltre l'anno di età (Martelli et al., 2008; Rutjes et al., 2010; Kaba et al., 2010; Schielke et al., 2009; Sato et al., 2011). Questo suggerisce che nei cinghiali l'infezione possa diventare cronica, forse per una incompleta immunità protettiva, o che si verificano continue re-infezioni permesse da una immunità di breve durata (Martelli et al., 2008).

Le analisi dei virus suini isolati finora hanno rivelato l'esistenza di due genotipi diffusi a livello mondiale, il genotipo 3 ed il 4: nell'uomo questi due genotipi sono cause di casi sporadici di epatite E (Straw et al., 2006). Il genotipo 3 è diffuso globalmente ad esclusione dell'Africa, il 4, che si riteneva esclusivo dell'Asia, ad oggi è stato isolato anche in Europa (Angeloni, 2014).

I genotipi 3 e 4 sono in grado di infettare, oltre ad uomo e suino, cinghiali, cervi e conigli. Esclusivi dell'uomo sono invece HEV di genotipo 1 e 2, spesso associati ad epidemie di epatite E , generalmente legate al consumo di acqua contaminata, nei paesi in via di sviluppo. Nel 2001, negli Stati Uniti, è stato isolato un ulteriore genotipo, circolante nelle specie aviare (avian HEV). Tuttavia gli uccelli non sono suscettibili a genotipi umani e suini e uomo e maiali non sono suscettibili al genotipo aviare (Angeloni, 2014).

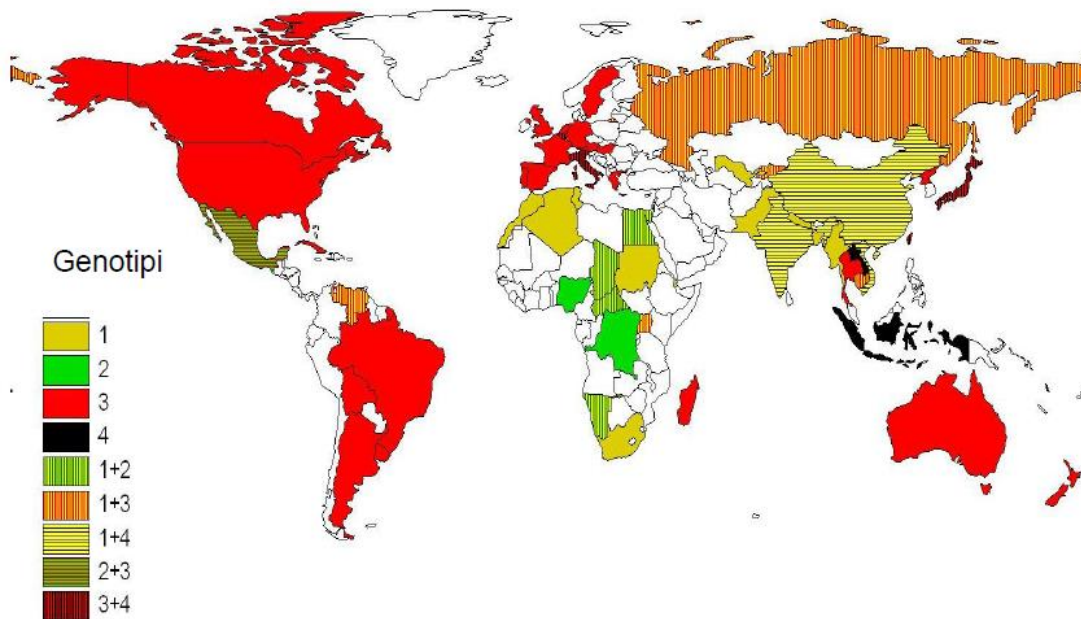


Fig. 9: Distribuzione dei diversi genotipi di HEV nel mondo. I colori utilizzati evidenziano la predominanza dei vari genotipi umani e animali (principalmente di origine suina). (Angeloni G. 2014).

L'HEV suino, oltre ad infettare maiali e cinghiali, è sospettato di poter infettare altre specie. È stata dimostrata anche la possibilità di infezione sperimentale con HEV suino in scimpanzé e macachi. Inoltre indagini sierologiche hanno evidenziato la presenza di anticorpi anti-HEV in cervi, manguste, cani, gatti, bovini, cavalli, roditori, pecore, capre e pollame (Rutjes et al., 2010).

Questo dimostra la capacità dell'HEV di infettare e di trasmettersi tra specie animali diverse, incluso l'uomo: l'infezione da HEV è dunque da considerarsi una zoonosi emergente, i cui *reservoir* non sono ancora totalmente noti, ma tra i quali vanno annoverati suini domestici e cinghiali. A supporto della possibile trasmissione, tra uomo e suino, dell'infezione, è stato dimostrato sperimentalmente la capacità di un HEV umano, di genotipo 3, di causare viremia

e di far avvenire una sieroconversione in maiali *specific pathogen free* (SPF) (Straw et al., 2006).

Diversi studi sottolineano come l'HEV suino sia in grado di infettare esseri umani. Hsieh et al., nel 1999, hanno rilevato, in Taiwan, una positività per anticorpi anti-HEV del 27% in coloro che lavorano a contatto coi maiali (rispetto all'8% nei soggetti di controllo). Meng et al. (2002) hanno testato 465 veterinari statunitensi per IgG anti-HEV: il 23% era positivo (rispetto ad una positività del 17% in una popolazione controllo). In Moldavia, Drobeniuc et al. (2001) hanno rilevato una positività ad anticorpi anti-HEV del 51% in allevatori di suini, paragonata al 25% di positività in una popolazione di controllo non esposta occupazionalmente al contatto con maiali. Un altro studio (Withers et al., 2002) ha riportato, in North Carolina, una prevalenza del 10,9% per anticorpi anti-HEV in lavoratori in ambito suinicolo rispetto ad un 2,4% in soggetti di controllo². Questo suggerisce come una modalità di trasmissione dell'infezione all'uomo, sia l'esposizione a secreti provenienti da animali infetti.

La trasmissione virale avviene presumibilmente per ciclo oro-fecale. Le feci di suini infetti sono la maggior fonte di virus per la trasmissione. Si ritiene che i suini si infettino tramite contatto diretto o tramite l'ingestione di alimento o acqua contaminati dalle feci (Straw et al., 2006). L'infezione per via oro-fecale necessita però di esposizioni ripetute ed elevate cariche virali. È stata ipotizzata anche la trasmissione del virus tramite l'utilizzo di uno stesso ago per più animali durante pratiche di allevamento (vaccinazioni, somministrazione di farmaci) (Angeloni, 2014).

A causa del ciclo oro-fecale, focolai epidemici derivanti da acque contaminate sono caratteristici di infezioni nell'uomo. Feci suine possono contaminare le acque di irrigazione o le acque costiere portando alla possibile contaminazione delle produzioni vegetali o dei molluschi bivalvi. A tal riguardo, ceppi di HEV di origine suina sono stati rinvenuti in acque di scarico (Straw et al., 2006). La trasmissione nell'uomo si può realizzare anche per trapianti con organi infetti o trasfusioni di sangue infetto (raro), ed anche la trasmissione verticale è riportata frequentemente in Paesi ad alta endemicità (Angeloni, 2014).

Nel 2003, Yazaki et al. hanno riportato, che alcuni casi sporadici di epatite E in Giappone erano epidemiologicamente collegati al consumo di fegati suini poco cotti, circa 2-8

²Da questi dati, si può inoltre evincere come lavorare a stretto contatto con i suini sia un fattore di aumento del rischio per contrarre l'infezione. Questa considerazione può essere estrapolata anche per quanto riguarda i cinghiali, permettendo così di individuare delle categorie a rischio (cacciatori, macellatori, allevatori, ecc.).

settimane prima dell'inizio della malattia. Inoltre sequenze parziali di HEV suini isolati da fegati di maiali sono stati rilevati essere strettamente correlati o identici a virus isolati da pazienti umani: questo fornisce ulteriore prova della natura zoonosica dell'infezione da epatite E ed estende la possibilità di trasmissione del virus anche tramite consumo di alimenti di origine suina (Straw et al., 2006). La possibilità di contrarre l'infezione da parte dell'uomo tramite il consumo di carni crude o poco cotte, anche di cinghiale, è stata documentata (Tamada et al., 2004; Matsuda et al., 2003; Li et al., 2005) ed inoltre si sospetta che anche l'esposizione diretta al sangue di animali infetti costituisca un'ulteriore fattore di rischio per la trasmissione all'uomo di HEV (Kaba et al., 2010).

Vari studi hanno verificato la suscettibilità del cinghiale all'infezione da HEV, e la stretta correlazione tra i ceppi virali isolati dai cinghiali ed i ceppi isolati da pazienti umani provenienti dalla stessa area geografica, supporta la tesi che anche il cinghiale costituisca un *reservoir* dell'infezione.

La prevalenza dell'infezione nel cinghiale varia secondo l'area di studio e la metodica utilizzata: 25% di positività (22 positività su 88 campioni di bile analizzati con metodica RT-PCR) (Martelli et al., 2008), 10,2% di sieropositività su 2211 cinghiali, ma nessuna positività alla presenza di RNA (Martinelli et al., 2013) in Italia; 12% di sieropositività (1029 campioni di siero analizzati con metodiche ELISA) e 8% di positività alla presenza di RNA virale (real-time RT-PCR su campioni di siero, feci, fegato e/o muscolo) in cinghiali olandesi (Rutjes et al., 2010); nessuna sieropositività in animali abbattuti in Turchia (Albayrak et al., 2013); 2,5% di positività alla presenza di virus (campioni di fegato analizzati con real-time RT-PCR) in Francia (Kaba et al., 2010); 14,9% di positività (fegati analizzati con RT-PCR) in Germania (Schielke et al., 2009); 8,1% di sieropositività e 3,3% di positività alla presenza di RNA virale (campioni di siero e fegato) (Sato Y., 2011), 11,4% di sieropositività e 4,2% di positività alla presenza di RNA virale in siero e/o fegato (Takahashi et al., 2014), 4,86% di positività alla presenza di RNA virale in sieri (Nakano et al., 2013) in Giappone; 26,33% di sieroprevalenza in 942 animali in Spagna (Boadella et al., 2012b). Le minori positività riscontrate con la ricerca di RNA virale rispetto alle sieropositività possono essere spiegate dalla breve viremia, dalla breve persistenza del virus nel fegato (al massimo fino a 50 giorni post-infezione), e dal fatto che sono più indicati campioni di bile rispetto a campioni di fegato (il virus potrebbe non avere una omogenea distribuzione in quest'organo, portando al campionamento di un'area negativa) (Martinelli et al., 2013).

Tutti i ceppi virali isolati da cinghiali europei sono risultati appartenenti al genotipo 3, situazione uguale a quanto si riscontra nel suino (Rutjes et al., 2010; Kaba et al., 2010; Schielke et al., 2009). Inoltre studi effettuati comparando le sequenze virali ottenute dai cinghiali con quelle ottenute da suini e persone provenienti dalla medesima area geografica hanno evidenziato sovrapposibilità genomiche dall'85% al 100%: questo indica come all'interno di una stessa zona circolino, in specie diverse, gli stessi ceppi virali, che variano da area ad area (Rutjes et al., 2010; Schielke et al., 2009; Martelli et al., 2008).

5.3 PATOGENESI

La patogenesi dell'infezione da HEV suino è largamente sconosciuta. Si ritiene che il virus penetri nell'ospite per via orale, tramite materiale contaminato da feci infette. Il sito primario di replicazione non è conosciuto. La replicazione nel fegato è stata dimostrata in primati e maiali infettati sperimentalmente. Dal fegato si suppone che il virus sia rilasciato nella cistifellea da parte degli epatociti, e da qui viene escreto con le feci. Sono stati identificati siti di replicazione extra-epatica dell'HEV: piccolo e grosso intestino, colon, linfonodi epatici e mesenterici, tonsille, milza e reni. Nonostante non si conosca il significato clinico e patologico di tali siti di replicazione, si suppone che l'HEV suino possa replicarsi primariamente nel tratto intestinale per poi diffondersi all'organo target, il fegato, durante la viremia primaria (Straw et al., 2010). Questa ipotesi è supportata dal fatto che l'RNA virale è riscontrabile prima nelle feci che nella bile ed in quantità circa 10 volte superiore rispetto a quest'ultima (Angeloni, 2014).

Nell'uomo, è stato riportato come la gravidanza aumenti la gravità e la mortalità (fino al 25%) della malattia. Nonostante questo, l'infezione sperimentale di animali gravidi non ha portato al riscontro di evidenze simili a quanto avviene nella specie umana, pertanto il meccanismo di sviluppo di epatite E fulminante nella donna gravida è ancora sconosciuto (Straw et al., 2006).

5.4 SEGNI CLINICI E LESIONI

I suini infettati sperimentalmente e naturalmente con HEV suino sono asintomatici. Il periodo di incubazione, dal momento dell'infezione all'eliminazione del virus con le feci, va da una a quattro settimane. La percentuale di maiali infetti all'interno di un gruppo di

animali può essere molto alta, ma la morbilità e la mortalità dell'infezione sono ancora sconosciute (Straw et al. 2006).

Da studi effettuati su suini infettati naturalmente e sperimentalmente, non è stata riscontrata evidenza di sintomatologia clinica e le uniche lesioni macroscopiche riscontrate sono state un aumento di dimensione, da lieve a moderato, dei linfonodi epatici e mesenterici, da 7 a 55 giorni post-infezione. Microscopicamente sono state riscontrate evidenze di epatite linfoplasmocitaria multifocale e periportale, da lieve a moderata, e necrosi epatocellulare focale. L'infiammazione e la necrosi raggiungono il picco di gravità a 20 giorni post-infezione. Sono state riscontrate inoltre lievi enteriti linfoplasmocitarie e nefriti linfoplasmocitarie, interstiziali, multifocali e lievi. Da 3-27 giorni post-infezione si può riscontrare l'RNA virale nelle feci, fegato e bile (Straw et al., 2006).

Dodici scrofe, infettate sperimentalmente con HEV suino a vari stadi di gestazione, hanno sviluppato l'infezione ed hanno eliminato il virus nelle feci ma non hanno mostrato segni clinici di epatite o innalzamento dei livelli ematici di enzimi epatici. Non sono stati riscontrati effetti significativi del virus sui feti e sul loro sviluppo, né sui suinetti nati e sul loro accrescimento. Non sono inoltre state riscontrate lesioni macroscopiche nelle madri, nei feti e nei suinetti nati; a livello microscopico si sono rilevate evidenze di epatite come sopra descritte (Straw et al., 2006).

Similmente a quanto riscontrato nel maiale, anche nel cinghiale l'infezione da HEV si realizza in forma subclinica: non si rilevano infatti differenze statisticamente significative nelle caratteristiche biometriche dei soggetti infetti rispetto ai non infetti (Martelli et al., 2008).

5.5 IMMUNITA'

Nei suini, la risposta immunitaria all'infezione da HEV suino è caratterizzata da una comparsa transiente di IgM anti-HEV seguite dalla comparsa di IgG anti-HEV, le quali permangono per lungo tempo ed appaiono tardivamente nel corso della viremia e dell'eliminazione fecale del virus. Sia nell'HEV umano sia in quello suino, la proteina del capsido è immunogena e induce un'immunità protettiva. È stato dimostrato che la proteina del capsido codificata da ORF2 dell'HEV suino condivide epitopi antigenici con l'HEV umano. Tutti i ceppi di HEV finora identificati (inclusi i genotipi 3 e 4 dell'HEV suino) appartengono ad un singolo sierotipo (Straw et al., 2006). Malgrado l'esistenza di un unico sierotipo, l'immunità, che si sviluppa

negli animali in seguito ad infezione, non è protettiva e questi possono andare incontro a reinfezioni nel corso della vita (Angeloni, 2014).

Gli anticorpi anti-HEV sono trasferibili dalla scrofa ai suinetti i quali conseguentemente risultano sieropositivi per 7-9 settimane dalla nascita. Si ritiene che l'immunità materna trasferita ai suinetti sia protettiva nei confronti dell'infezione da HEV (Straw et al., 2006).

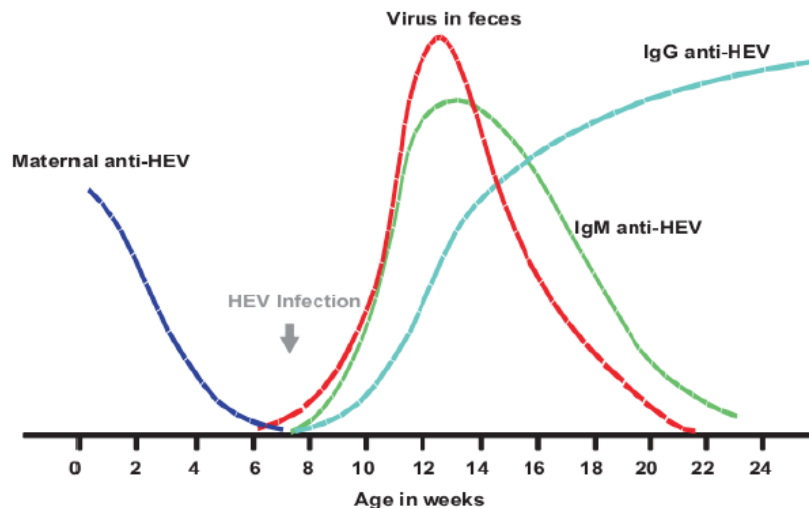


Fig. 10: Ciclo naturale di infezione da HEV nel suino (Angeloni G. 2014).

5.6 DIAGNOSI

La diagnosi di HEV suino si basa primariamente su metodiche PCR ed ELISA. Sia antigeni del capsido dell'HEV suino che umano, possono essere usati per la diagnosi con un test ELISA: infatti gli antigeni del capsido di virus umani cross-reagiscono bene con anticorpi contro il virus suino, ed antigeni del capsido del virus suino sono strettamente correlati con quelli del virus umano. Non esiste però un test specifico per differenziare tra infezione da virus suino e virus umano (Straw et al., 2006).

La valutazione sierologica di anticorpi anti-HEV non è adeguata come metodica diagnostica in caso di infezione acuta, in quanto le IgG anti-HEV compaiono nel maiale minimo due settimane dopo l'infezione: dunque animali sieronegativi alla metodica sierologica potrebbero essere viremici ed eliminatori (Straw et al., 2006). La ricerca di IgM, che aumentano durante la fase acuta della malattia e permangono fino a 3-5 mesi post-infezione, presenta il problema della bassa sensibilità nella loro rilevazione, portando a numerosi falsi negativi (Angeloni, 2014).

Una RT-PCR sensibile e specifica è stata sviluppata con successo e permette l'identificazione dell'HEV suino in animali infetti usando, come campioni, siero, feci, bile od organi (fegato, linfonodi, intestino). Nonostante questo, i ceppi di HEV variano in modo consistente nelle loro sequenze genomiche a seconda dell'area geografica dalla quale provengono, ed esistono diversi genotipi. Inoltre considerando che i genotipi 3 e 4, di origine umana o suina, sono indistinguibili geneticamente, una valutazione diagnostica che li differenzi non è possibile (Straw et al.,2006).

6. LEPTOSPIROSI

La leptospirosi è un'infezione causa di perdite riproduttive in allevamenti suini. L'infezione è presente in tutto il mondo ma l'incidenza e l'impatto economico maggiori sono riportati nell'emisfero boreale e in Australia, Nuova Zelanda, Argentina e Brasile.

La presenza di un'infezione endemica nell'allevamento suino non dà grosse evidenze cliniche, ma, se è invece introdotta per la prima volta in un allevamento suscettibile, o in periodi d'immunità calante, può causare grosse perdite in termini di aborto, natimortalità, nascita di suinetti deboli con scarsa vitalità, e infertilità.

La leptospirosi è, inoltre, una zoonosi, di cui persone che lavorano a contatto con animali infetti, o prodotti da loro derivati, costituiscono categorie a rischio: allevatori di suini, cacciatori, per quel che riguarda la fauna selvatica, macellatori e operatori del settore della carne.

Le sieropositività a leptospira, riportate da diversi studi, in popolazioni di cinghiali, dimostrano come questi siano suscettibili a tale infezione e che, quindi, possano costituire una fonte di infezione per l'uomo e per gli animali domestici (Meng et al., 2009).

Le leptospire persistono nei reni e tratti genitali di individui *carrier* e sono escrete tramite urina e secrezioni genitali. La sopravvivenza al di fuori dell'ospite è favorita da condizioni di calore e umidità. La trasmissione può avvenire per contatti indiretti o diretti con i soggetti *carrier*. L'interruzione di tale trasmissione è il punto cruciale per il controllo dell'infezione.

6.1 EZIOLOGIA

La leptospirosi del suino è una malattia causata da una varietà di piccole, mobili, aerobie spirochete appartenenti al genere *Leptospira*, famiglia *Leptospiraceae*, simili morfologicamente ma distinte geneticamente e antigenicamente. Esse sono organismi gram-negativi, elicoidali, sottili, mobili e che terminano spesso a uncino, in una o entrambe le estremità. Le leptospire ruotano costantemente lungo il loro asse maggiore. In termini di lunghezza, variano da 6 a 20 μm , con una larghezza di circa 0,1-0,15 μm e una lunghezza d'onda di circa 0,5 μm . Si riproducono per scissione binaria. Si colorano poco con coloranti all'anilina e le cellule non colorate sono visibili solo tramite microscopia in campo oscuro.

Per la loro coltura, richiedono *media* speciali, che contengano siero di mammiferi o albumine (Straw et al., 2006).

Le componenti strutturali più importanti sono un *envelope* esterno, che circonda una parete cellulare o complessi di peptidoglicani, e due endoflagelli polari (che originano in posizione sub-terminale ad entrambe le estremità) (Straw et al., 2006).

La tassonomia delle leptospire è in continua evoluzione, comunque per ora è riconosciuto un singolo genere *Leptospira* nella famiglia *Leptospiraceae*; il genere è suddiviso in due gruppi: le leptospire trovate in animali (ceppi parassiti) e quelle trovate nelle acque (ceppi saprofiti). Questi due gruppi, ai quali ci si riferisce come complessi *interrogans* e *biflexa*, rispettivamente, possono essere differenziati in base ai fabbisogni di crescita ed alle reazioni biochimiche. Solo i ceppi parassiti sono di interesse medico e veterinario (Straw et al., 2006). Ad oggi il gruppo *L. interrogans* contiene 8 specie patogene, con più di 230 sierovarianti, in base all'eterogeneità strutturale della componente carboidratica dell'LPS: *Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. alexanderi*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. alstoni*, *L. weilii* e *L. santarosai* (Martino, 2014). La definizione di specie si basa su un livello di omologia DNA-DNA di, al minimo, 70%, e di 5%, o meno, di divergenza nella relazione tra DNA (Straw et al., 2006).

SPECIE SAPROFITE	SPECIE PATOGENE*	SPECIE A INCERTA PATOGENICITÀ
<i>L. biflexa</i>	<i>L. interrogans</i>	<i>L. inadai</i>
<i>L. wolbachii</i>	<i>L. kirschneri</i>	<i>L. broomii</i>
<i>L. kmetyi</i>	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. fainei</i>
<i>L. meyeri</i>	<i>L. santarosai</i>	<i>L. wolffii</i>
<i>L. vanthielii</i>	<i>L. noguchii</i>	<i>L. licerasiae</i>
<i>L. terpstrae</i>	<i>L. weilii</i>	
<i>L. yanagawae</i>	<i>L. alexanderi</i>	
	<i>L. alstoni</i>	

* più di 230 sierovarianti

Tab. 2: Attuale classificazione delle leptospire (Martino P.A., 2014).

Le leptospire sono state divise in sierogruppi sulla base delle relazioni antigeniche determinate tramite reazioni di cross-agglutinazione e ulteriormente suddivise in serovar tramite pattern di agglutinazione-assorbimento. Sono stati riconosciuti 23 sierogruppi contenenti approssimativamente 212 serovar. Il termine "tipo" è usato per indicare differenze di ceppi a livello di *sub-serovar* (Straw et al., 2006).

SPECIE	SIEROVARIANTE	SIEROGRUPPO
<i>L. interrogans</i>	<i>australis</i>	<i>australis</i>
	<i>autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>
	<i>bataviae</i>	<i>bataviae</i>
	<i>bratislava</i>	<i>australis</i>
	<i>canicola</i>	<i>canicola</i>
	<i>grippotyphosa</i>	<i>grippotyphosa</i>
	<i>hardjo</i>	<i>sejroe</i>
	<i>icterohaemorrhagiae</i>	<i>ictcrohaemorrhagiae</i>
<i>L. alexanderi</i>	<i>manhao 3</i>	<i>manhao</i>
<i>L. weillii</i>	<i>celledoni</i>	<i>canicola</i>
	<i>Hainan</i>	<i>canicola</i>

Tab. 3: Esempio di classificazione delle leptospire (Martino P.A., 2014).

Il genere *Leptospira* è caratterizzato da un rapporto guanina più citosina (G+C) del 35-41% nel suo DNA cromosomale, con due cromosomi circolari di circa 4 megabasi e 300 kilobasi. La dimensione del genoma varia tra 3100 e 5000 kilobasi (Martina, 2014).

Ci sono differenze nella distribuzione globale di alcune delle specie di *Leptospira*: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. kirschneri* hanno distribuzione mondiale, *L. noguchii* e *L. santarosai* si ritrovano principalmente in Nord e Sud America, *L. weillii* soprattutto in Cina e Asia dell'Est. I ceppi che causano malattia nel suino appartengono soprattutto alle specie *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* (Straw et al., 2006).

6.2 EPIDEMIOLOGIA

L'epidemiologia della leptospirosi suina è molto complicata, poiché i maiali possono essere infettati da ogni serovar patogeno. Ogni serovar tende ad essere mantenuto in un ospite specifico. Perciò, in una specifica area, i suini saranno infettati dai serovar mantenuti dai suini stessi o da quelli mantenuti da un'altra specie animale presente nell'area. La rilevanza di queste infezioni incidentali è determinata da tutti i fattori che favoriscono il contatto e la trasmissione delle leptospire al suino da altre specie animali.

I maiali agiscono come ospiti di mantenimento per i serovar appartenenti ai sierogruppi *Pomona*, *Australis* e *Tarassovi* mentre i ceppi appartenenti ai sierogruppi *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* e *Grippotyphosa* sono tra quelli più comunemente identificati nelle infezioni incidentali dei maiali (Straw et al., 2006).

Il serovar *pomona* è quello più comunemente isolato nel mondo da maiali. Molti ceppi di questo serovar, soprattutto quelli di tipo *kennewicki* trovati in USA e Canada, sono adattati al suino. Il serovar *pomona* è la causa di diffuse manifestazioni cliniche della leptospirosi nei maiali in Nord e Sud America, Australia, Nuova Zelanda, parti dell'Asia, Europa centrale e dell'est ed è endemico in molte di queste aree. Non tutti i ceppi di questo serovar sono comunque adattati al suino né lo sono altri serovar del sierograppo *Pomona*, ma hanno come ospiti i roditori (Straw et al., 2006).

Le leptospire hanno una particolare affinità per i reni dei suini infetti, dove persistono, si moltiplicano e sono eliminate con l'urina. L'infezione può essere introdotta in un allevamento tramite tre possibili vie: introduzione capi infetti, esposizione ad un ambiente contaminato o contatto con un'altra specie animale infetta. Animali da rimonta infetti sono comunque la via d'introduzione più importante (Straw et al., 2006).

L'importanza di animali selvatici, come fonte di *pomona*, dipende dall'area geografica. In America settentrionale, ad esempio, le moffette sono sospettate di essere la fonte d'infezione in alcuni focolai epidemici della malattia in maiali.

Una volta che leptospire del serovar *pomona* sono introdotte in una popolazione suina, si instaura un'alta prevalenza dell'infezione. Sono necessarie basse dosi infettanti per la trasmissione dell'infezione. Oltre al contatto diretto, la trasmissione può avvenire tramite acque o terreni contaminati. L'umidità è fondamentale per la trasmissione indiretta, in quanto l'organismo non può sopportare l'essiccamento; se, però, urine infette sono rilasciate in terreni umidi o acqua con pH leggermente alcalino, l'organismo può sopravvivere per tempi relativamente lunghi (Straw et al., 2006). Oltre all'urina, altre vie di trasmissione sono la via sessuale, invasione transplacentare, ingestione, o contatto con latte e tessuti infetti.

Durante l'infezione iniziale, la malattia clinica si può rendere evidente in scrofe di ogni età. Una volta superata questa fase, si stabilisce un ciclo endemico tipico di una popolazione di mantenimento. I suinetti sono protetti dall'immunità passiva, assunta dalla madre, se infetta, tramite colostro, nelle prime settimane di vita. L'infezione da leptospira si rende evidente nei suinetti dalle 12 settimane di vita e, all'età di macellazione, fino al 90% dei soggetti può risultare infetto. L'intensità dell'eliminazione nelle urine delle leptospire è massima nelle prime 3-4 settimane d'infezione, dopo le quali declina e diventa intermittente. In allevamenti con una situazione di endemicità dell'infezione, la malattia clinica è limitata solitamente alle scrofette di recente introduzione (provenienti da un

allevamento negativo alla presenza dell'infezione, o che sono state tenute in isolamento fino all'età d'introduzione nel gruppo delle riproduttrici) (Straw et al., 2006).

Per quel che riguarda il serovar *tarassovi*, il maiale funge da ospite per alcuni ceppi in Europa dell'est ed in Australia. Questo serovar non si diffonde così velocemente quanto *pomona*, ma l'infezione endemica è comunque facilmente mantenuta. Molti ceppi di *tarassovi* sono stati isolati da animali selvatici, quali ad esempio, negli USA, procioni, moffette e opossum (Straw et al., 2006).

Al sierogruppo *Australis*, appartengono i serovar *bratislava* e *muenchen*, i quali sono emersi recentemente come responsabili di molteplici infezioni da leptospire mantenute da suini. Analisi sierologiche indicano che *bratislava* è diffusamente presente in Germania, UK, Repubblica Ceca, Olanda, Svezia, Danimarca, USA, Canada, Austria, Australia, Brasile, Sudafrica. L'epidemiologia di questi ceppi non è ben chiara: ve ne sono di adattati al suino, alcuni mantenuti da maiali, cavalli, cani e ricci, e ceppi isolati solo da animali selvatici. Nonostante anche per questi serovar si stabilisca lo stato di *carrier* a livello renale, l'eliminazione nelle urine è molto bassa rispetto a *pomona* e la trasmissione è molto meno efficiente. Altri siti di persistenza del microrganismo sono stati identificati nei tratti genitali superiori di scrofe e verri, suggerendo che l'infezione per via venerea giochi un ruolo importante per *bratislava* (Straw et al., 2006).

Le leptospire appartenenti al sierogruppo *Canicola* sono state isolate dal suino, ma l'ospite di mantenimento è il cane (è comunque possibile una trasmissione tra suini, suggerita dal lungo periodo di leptospiruria e dalla relativamente lunga sopravvivenza di leptospire nelle urine di maiali) (Straw et al., 2006).

Leptospire appartenenti al sierogruppo *Icterohaemorrhagiae* (che comprende i serovar *copenhageni* e *icterohaemorrhagiae*) sono state isolate, ma raramente, da maiali. L'ospite di mantenimento di queste leptospire è il ratto bruno (*Rattus norvegicus*), le cui urine infette sono la via d'introduzione dell'infezione in allevamenti suini. La trasmissione tra suini è inefficiente (Straw et al., 2006).

Il serovar *grippotyphosa* è mantenuto da animali selvatici e infezioni incidentali del suino portano a basse sieroprevalenze dell'infezione (riportata soprattutto in Europa centrale e dell'est e in USA). Il serovar *hardjo* è mantenuto dai bovini e l'infezione si trasmette ai maiali, dove sono presenti contatti tra queste due specie (la trasmissione tra suini è improbabile). Il

serovar *sejroe* è mantenuto da piccoli roditori ed è stato isolato da suini in Europa. Il serovar *balcanica* è stato isolato da suini nell'ex USSR (Straw et al., 2006).

SIEROGRUPPO/SEROVAR	OSPITE DI MANTENIMENTO
<i>Australis/Bratislava</i>	Ratto, riccio, suino, equino
<i>Australis/Jalna</i>	
<i>Canicola/Canicola</i>	Cane
<i>Grippotyphosa/Grippotyphosa</i>	Topo
<i>Icterohaemorrhagiae/Icterohaemorrhagiae</i>	Ratto
<i>Icterohaemorrhagiae/Copenhageni</i>	Ratto
<i>Pomona/Pomona</i>	Suino
<i>Sejroe/Hardjo</i>	Bovino, ovino
<i>Sejroe/Saxkoebing</i>	
<i>Sejroe/Sejroe</i>	Roditori, animali selvatici

Tab. 4: Principali serovar diffusi in Italia (D'Incau M. 2014. Il ruolo del cane nell'epidemiologia della leptospirosi. Supplemento a *La Settimana Veterinaria* n°877, 4 giugno 2014).

La leptospirosi può inoltre essere trasmessa all'uomo, tramite contatto con acqua o terreni contaminato da urine infette o per contatto diretto con animali infetti. Le categorie più a rischio sono allevatori, macellatori e cacciatori: a tal proposito, Deutz et al., 2008, hanno riportato una sieropositività alle leptospirosi, in un gruppo di 147 cacciatori, del 10% (un gruppo di persone di controllo presentava sieropositività dello 0%). Un altro problema emergente è l'ipotesi di xenotrapianti da suini all'uomo, pertanto i suini usati come donatori dovrebbero essere esenti da leptospirosi (Straw et al., 2006). L'uomo costituisce un ospite a fondo cieco, in quanto molto raramente trasmette l'infezione sia ai suoi conspecifici sia ad altri animali (Slavica et al., 2008).

Il cinghiale è un ospite suscettibile all'infezione da leptospira come testimoniano i valori, anche alti (fino al 45%), di sieropositività riscontrativi: 6% di sieropositività su 562 sieri (serovar *bratislava* e *icterohaemorrhagiae*) (Ebani et al., 2003), 2,6% su 342 sieri (serovar *copenhageni*, *bratislava* e *tarassovi*) (Montagnaro et al., 2010) in Italia; positività verso serovar *pomona* del 5,2%, *bratislava* 4,7%, *grippotyphosa* 1,7%, *pyrogenes* 1,25%, *copenhageni* 0,6%, *autumnalis* 0,6%, *icterohaemorrhagiae* 0,6% su 174 cinghiali (Espì et al., 2010), 12% su 78 animali (*L. interrogans* serovar *pomona*) (Vicente et al., 2002) in Spagna; 18% sieroprevalenza su 141 soggetti (*pomona* e *bratislava* i più frequenti) (Jansen et al., 2007), 24% sieropositività in 245 cinghiali (*bratislava*, *copenhageni* e *australis* le più frequenti) (Schönenberg et al., 1999), una sola positività in 130 campioni (test di fissazione

del complemento) (Von Walburga et al., 1997) in Germania; 20,4% positività su 308 cinghiali allevati (i più frequenti *hardjo*, *copenhageni* e *pomona*) in Brasile (Fornazari et al., 2011); 15,2% di presenza di DNA di leptospire tramite metodica PCR su 145 reni di cinghiali (*L. interrogans* e *L. borgpetersenii*) in Giappone (Koizumi et al., 2009); 3,1% sieroprevalenza su 386 cinghiali (*bratislava* e *icterohaemorrhagiae*) in Svezia (Boqvist et al., 2012); 31,9% positività su 351 campioni (*australis* e *pomona* i più frequenti) (Slavica et al., 2010), 34,88% in 215 sieri (i più frequenti serovar: *australis*, *grippotyphosa* e *tarassovi*) (Milas et al., 2013), 35,03% positività in 431 animali (serovar più frequenti: *australis*, *pomona*, *sejroe*, *icterohaemorrhagiae* e *grippotyphosa*) (Slavica et al., 2008) in Croazia; nessuna positività in 303 cinghiali in Finlandia (Hälli et al., 2012); 25,2% sieropositività su 107 sieri in Polonia (Krawczyk, 2000); 45,5% positività su 437 animali (serovar più frequente *tarassovi*) in Slovenia (Vengust et al., 2008); 30% sieropositività in 108 cinghiali (serovar più frequente *bratislava*) in Austria (Deutz et al., 2008); 19,9% in 307 cinghiali (tutti serovar *L. grippotyphosa*) (Tremel et al., 2003), 14,28% positivi su 165 animali (test di microagglutinazione-lisi) (Tremel & Nensalova, 1993) in Repubblica Ceca; 20% di sieroprevalenza in 195 maiali selvatici in Australia, serovar *pomona* il più frequente (Mason et al., 1998)³. I cinghiali sono ospiti a rischio di contrarre la leptospirosi, considerate le loro abitudini comportamentali e alimentari: condividono gli habitat con i roditori, i quali possono contaminare le acque, che fungono da fonte di infezione per i cinghiali; possono nutrirsi direttamente di piccoli roditori (Slavica et al., 2010); spesso sguazzano nel fango per termoregolare, abitudine che può aumentare la trasmissione intraspecifica; il grifo viene frequentemente a contatto con il terreno portando ad un aumento dell'esposizione della mucosa nasale ad eventuali leptospire (Koizumi et al., 2009). La trasmissione tra cinghiali è comunque bassa rispetto a quella tra suini viste le differenti densità delle popolazioni negli ambienti in cui vivono (Boqvist et al., 2012).

È stata notata una maggiore sieropositività in cinghiali adulti rispetto a soggetti di età inferiore l'anno (Slavica et al., 2010; Tremel et al.; 2003) e questo può essere spiegato con il fatto, che in questi ultimi è presente un'immunità materna non specifica, e con la ridotta possibilità di incontrare l'agente patogeno nel corso di pochi mesi di vita rispetto ad un animale di maggiore età.

³ Ove non indicato diversamente il test usato per le analisi sierologiche è il MAT (*microscopic agglutination test*).

La diversità dei serovar più frequentemente riportati dai vari studi, è spiegata dal fatto che nel cinghiale si rinvencono le leptospire che circolano nel territorio in esame (Tremel et al., 2003). Negli ultimi anni, comunque, il trend generale evidenziato dagli studi, mostra come il serovar *australis* sia quello più frequentemente rinvenuto nei cinghiali, e questo costituisce un cambiamento, in quanto nei primi anni '90 si ritrovava per lo più *L. interrogans pomona* (Slavica et al., 2008). Il cinghiale potrebbe fungere da *reservoir* di leptospire di serovar *bratislava*, *pomona* e *australis*, fatto supportato dai bassi titoli anticorpali che si riscontrano (e che indicano una bassa patogenicità di questi serovar nel cinghiale), ma, finché uno studio non avrà isolato questi serovar dai reni di cinghiali, questa rimane solo una ipotesi (Milas et al., 2013). In generale il cinghiale è potenzialmente un *reservoir* di leptospirosi ma ad oggi è più una specie infettata a sua volta da ospiti di mantenimento (piccoli roditori), e quindi gioca un ruolo marginale nell'epidemiologia di tale infezione (Tremel et al., 2003; Tremel & Nesnalova, 1993; Ebani et al., 2003). La trasmissione dell'infezione dal cinghiale all'uomo avviene a bassi tassi (Jansen et al., 2007), e il cinghiale ha un ruolo più importante per la circolazione dell'infezione in ambito selvatico che in ambito antropico, attualmente (Slavica et al., 2008). Il ruolo del cinghiale potrà assumere tuttavia maggiore importanza di pari passo con la crescita della popolazione di tale animale, considerato anche come si stia spostando ad habitat sinantropici.

6.3 PATOGENESI

La principale via naturale d'infezione non è stata identificata, ma si ritiene che l'infezione avvenga tramite le membrane mucose di occhi, bocca o naso, ed è inoltre possibile l'infezione per via vaginale o tramite la cute (bagnata o abrasa). La trasmissione di leptospire da una madre infetta alla prole tramite il latte è stata dimostrata sperimentalmente. Un periodo di batteriemia, che può durare per una settimana, inizia 1-2 giorni dopo l'infezione: durante questo periodo, le leptospire possono essere isolate dalla maggior parte degli organi e dal liquor cefalorachidiano. Questa fase di batteriemia primaria termina con la comparsa di anticorpi circolanti, che sono rilevabili dopo 5-10 giorni dall'infezione. Una seconda batteriemia, dopo 15-26 giorni, è stata riportata in infezioni sperimentali con serovar *hardjo* (Straw et al., 2006).

Agglutinine anti-leptospira appaiono, a livelli rilevabili nel sangue, 5-10 giorni dopo l'inizio dell'infezione e raggiungono un picco attorno alle 3 settimane. Dopo, il titolo decresce, ma può restare a bassi livelli per anni (Straw et al., 2006).

Dopo la batteriemia, le leptospire si localizzano nei tubuli renali prossimali, dove si moltiplicano e da dove sono escrete nelle urine. La durata e l'intensità dell'eliminazione urinaria varia da soggetto a soggetto e in base al serovar. Nel caso di *pomona*, durante il primo mese l'eliminazione è massima (più di un milione di batteri per millilitro di urina), poi si instaura un periodo di eliminazione intermittente, a basse dosi, che può durare fino a due anni. Il meccanismo immunologico tramite il quale l'infezione è eliminata definitivamente dal rene è ancora ignoto (Straw et al., 2006).

Le leptospire si localizzano, inoltre, nell'utero di scrofe gravide, causando aborto e natimortalità, e la leptospirosi neonatale è, frequentemente, il risultato di un'infezione intrauterina avvenuta nella seconda metà del periodo gestazionale. L'aborto e la natimortalità avvengono 1-4 settimane dopo l'infezione della madre. La patogenesi dell'infezione riproduttiva è poco chiara, ma si ritiene sia la conseguenza di un'infezione transplacentare, che avviene durante il periodo di batteriemia materna. Questo è vero per *pomona*, ma per infezioni con *bratislava*, in cui si rinvencono bassi titoli anticorpali in scrofe che abortiscono feti infetti, si propende per l'ipotesi secondo la quale l'infezione avvenga in seguito ad una diminuita immunità uterina, che porta ad una infezione transplacentare causata leptospire già presenti nel tratto genitale. La possibilità d'infezione transplacentare aumenta con l'età gestazionale. L'aborto è probabilmente iniziato dal rilascio di prodotti tossici dai feti morti e autolitici a seguito della setticemia che vi sviluppa (Straw et al., 2006).

Per le infezioni con serovar *bratislava*, esiste la possibilità della persistenza di leptospire negli ovidutti e nell'utero di scrofe non gravide, e nei tratti genitali di verri.

6.4 SEGNI CLINICI E LESIONI

La maggior parte delle infezioni da leptospira nel suino sono subcliniche. I soggetti più a rischio di manifestare la malattia clinica sono i giovani suinetti e le scrofe gravide.

La leptospirosi acuta coincide con il periodo di batteriemia. In infezioni sperimentali è stata riportata anoressia transiente, piressia e depressione (sintomi che in infezioni naturali possono non essere riconosciuti, vista la loro lievità). È stato riportato qualche caso di ittero

ed emoglobinuria in infezioni naturali di suinetti, sotto i tre mesi di età, con ceppi appartenenti al sierogruppo *Icterohaemorrhagiae*, ma questa forma di malattia è rara. La maggior parte dei soggetti, inoltre, si riprende spontaneamente in una settimana (Straw et al., 2006).

Per quel che riguarda la leptospirosi cronica, aborti, natimortalità e nascita di suinetti deboli e di scarsa vitalità sono i segni principali dell'infezione, soprattutto con serovar *pomona*, che portano a rilevanti perdite economiche. Nonostante le scarse informazioni al riguardo, la leptospirosi è una causa comune di aborto, anche nei Paesi in cui si pratica la vaccinazione, che può incidere per il 3-6% sugli aborti totali. Inoltre episodi epidemici possono portare a percentuali di aborto del 20% in un allevamento (Straw et al., 2006).

A seguito dell'aborto causato da *pomona*, non sembrano esserci conseguenti limitazioni sulle performance riproduttive, anche in suini che rimangono infetti per lungo periodo. L'infertilità è invece una caratteristica dell'infezione con serovar *bratislava* (Straw et al., 2006).

Le principali lesioni sono le stesse per tutte le infezioni: danno alle membrane delle cellule endoteliali dei piccoli vasi sanguigni.

Nella leptospirosi acuta non ci sono lesioni anatomopatologiche macroscopiche patognomoniche. Si possono rinvenire emorragie petecchiali o ecchimosi a livello polmonare e all'esame istologico, danni lievi ai tubuli renali, necrosi epatica focale, infiltrazione linfocitica delle ghiandole surrenali, meningoencefalite con un infiltrato linfocitico perivascolare (Straw et al., 2006).

Nella leptospirosi cronica, le lesioni sono confinate ai reni e consistono di piccoli foci grigi diffusi, spesso circondati da un alone di iperemia: queste lesioni, ad un esame microscopico, si rivelano essere nefrite interstiziale focale progressiva. In alcune aree è presente un massivo infiltrato leucocitico (consistente di linfociti, macrofagi e plasmacellule). I danni focali possono coinvolgere i glomeruli e i tubuli renali. Alcuni glomeruli sono rigonfi, altri atrofici, altri ancora fibrotici. La capsula di Bowman può essere ispessita e contenere materiale eosinofilo granulare. I cambiamenti tubulari consistono in atrofia, iperplasia e la presenza di detriti necrotici nel loro lume. Occasionalmente, si riscontrano petecchie emorragiche negli spazi interstiziali (Straw et al., 2006).

Lesioni più vecchie consistono di fibrosi e infiltrazione interstiziale. Lesioni croniche accompagnate da infiammazione acuta sono rilevabili fino a 14 mesi post-infezione.

La leptospira può anche invadere la ghiandola mammaria, producendovi una mastite lieve, focale e non suppurativa.

La lesioni di feti abortiti in seguito a infezione con *pomona* non sono specifiche: edema di vari tessuti, versamenti cavitari sierosi o emorragici, petecchie nella corticale del rene. L'ittero si può rilevare in alcuni suinetti abortiti. Un frequente reperto è la necrosi focale del fegato. All'istologia si rilevano piccoli foci di nefrite interstiziale (Straw et al., 2006).

Nei cinghiali si riscontrano lesioni simili al suino: Jansen et al., 2007, hanno riportato che il 17,88% di reni di animali sieropositivi presentava, all'esame istologico, un'inflammatione interstiziale linfoplasmocitaria, grave e cronica del tessuto renale.

Nell'uomo la leptospirosi causa danni vascolari diffusi a tutto l'organismo, che possono portare, in casi gravi, a meningite, danni epatici, ittero, insufficienza renale, shock e morte. Le forme subcliniche sono caratterizzate da febbre, cefalea, vomito, dolore addominale, mialgie ed ipotensione. La malattia è inoltre caratterizzata, in una seconda fase, da vasculiti causate dalla deposizione di immunocomplessi antigene-anticorpo.

6.5 IMMUNITA'

Gli anticorpi rilevati con MAT, a seguito di esposizione a leptospire, non sono protettivi e scompaiono in pochi mesi, ma gli anticorpi protettivi, serovar-specifici possono persistere per diversi anni. Nonostante questo, l'infezione renale, e la susseguente eliminazione con le urine di leptospire, può avvenire anche con alti titoli di anticorpi neutralizzanti. La risposta immunitaria che segue la vaccinazione è più debole e meno duratura rispetto a quella che segue l'infezione naturale, ma può dare una protezione serovar-specifica fino ad un anno (Williams & Barker, 2001).

6.6 DIAGNOSI

I segni clinici lievi, se non, spesso, inapparenti, di leptospirosi acuta rendono la diagnosi difficile: perciò, essa si basa solitamente su metodiche laboratoristiche.

I test sierologici sono la metodica più largamente usata per la diagnosi di leptospirosi e il MAT (*microscopic agglutination test*) è il test standard. Il MAT dovrebbe utilizzare i ceppi più rappresentativi di tutti i sierogruppi circolanti nell'area, più quelli mantenuti dai maiali a livello globale. Il MAT è usato primariamente come test diagnostico d'allevamento. Sul

singolo animale è utile in corso di infezione acuta, poiché rileva l'aumento del titolo anticorpale. Trovare anticorpi nel siero fetale è diagnostico di aborto leptospirico. Il MAT presenta grosse limitazioni nella diagnosi di infezione cronica, durante la quale gli animali possono avere titoli anticorpali al di sotto del limite significativo minimo (Straw et al., 2006).

Altri test sierologici, come ELISA, possono essere usati, ma sono meno affidabili.

L'isolamento di leptospire, o la dimostrazione della loro presenza, da organi interni (es. fegato, polmone, cervello) o da fluidi corporei (sangue, liquor cefalorachidiano, liquido toracico o peritoneale) di animali clinicamente affetti porta a diagnosi definitiva di leptospirosi acuta (o in caso di un feto, di aborto leptospirico). La presenza di leptospire nel tratto genitale di maschi o femmine, nei reni o nelle urine, porta a diagnosi di infezione cronica (in assenza di evidenze di infezione generalizzata). La mancata rilevazione di leptospire nelle urine non esclude la possibilità che l'animale sia un *carrier* (Straw et al., 2006).

L'isolamento di leptospire è il metodo più sensibile di dimostrarne la presenza (a patto che il campionamento e la conservazione della matrice siano stati eseguiti in maniera corretta). Le colture dovrebbero avvenire in un terreno semisolido (0,1-0,2% agar) di siero e albumine bovini, contenente Tween 80 o Tween 80 e Tween 40, e 0,4-2% di siero di coniglio se va isolata *bratislava*. Le colture vanno incubate a 29-30°C per almeno 12 settimane (preferibilmente, 26 settimane) e vanno esaminate tramite microscopia a campo oscuro ogni 1-2 settimane (Straw et al., 2006).

L'esame microscopico in campo oscuro di urine e fluidi fetali può essere un utile strumento, ma deve essere eseguito da personale con esperienza. La dimostrazione di leptospire tramite test di immunoistochimica è di più facile interpretazione ma se i microorganismi presenti nella matrice sono pochi, la sensibilità è bassa. Inoltre non fornisce informazioni riguardo al serovar. L'immunofluorescenza è la metodica migliore per la diagnosi di leptospirosi fetale (Straw et al., 2006).

La PCR è un metodo applicato e validato, ha come target il gene *lipL32* e consente la ricerca delle sole leptospire patogene. La sensibilità della PCR però si riduce se le leptospire stazionano a lungo nel campione biologico e la carica batterica si abbassa. Per ovviare a questo problema, servono precauzioni nel campionamento e trasporto. Campioni di tessuto e sangue sono più adatti rispetto a campioni di urine, per questa metodica (Tagliabue, 2014).

6.7 PREVENZIONE E CONTROLLO

Il punto critico nel controllo della trasmissione dell'infezione da leptospira è l'interruzione della trasmissione da maiali, o altri animali, a maiali. Per fare questo ci si basa su tre strategie: terapia antibiotica, vaccinazione e management.

La vaccinazione induce un'immunità all'infezione di relativamente breve durata, circa 3 mesi. L'immunità alla malattia clinica sembra durare di più, ma non è conosciuta esattamente. La vaccinazione riduce notevolmente la prevalenza dell'infezione in allevamento ma non la elimina del tutto (Straw et al., 2006).

Gli antibiotici, usati senza altre misure di controllo, non eliminano l'infezione da leptospire mantenute da suini e non sono un valido metodo di controllo dell'infezione in allevamento. Per eliminare l'infezione renale si possono usare streptomina, tetraciclina, ossitetraciclina, tilosina o eritromicina (Straw et al., 2006).

Il fattore manageriale più importante nel controllo della leptospirosi è la prevenzione di contatti diretti o indiretti con animali selvatici, che fungono da vettori, e con altri animali domestici. La biosicurezza e il controllo dei roditori nell'area dell'allevamento sono fondamentali. L'uso dell'inseminazione artificiale è un importante strumento per il controllo delle infezioni da *bratislava* (Straw et al., 2006).

7. MATERIALI E METODI

7.1 CAMPIONAMENTO

I campioni esaminati sono stati raccolti da 272 cinghiali abbattuti dal 27/03/14 al 18/07/14 nell'ambito del programma di controllo demografico della popolazione dei cinghiali dei Colli Euganei.

Gli animali venivano catturati per mezzo di chiusini, ovvero trappole auto-scattanti, attivati a rotazione. Nel territorio del Parco sono dislocati una trentina di chiusini.

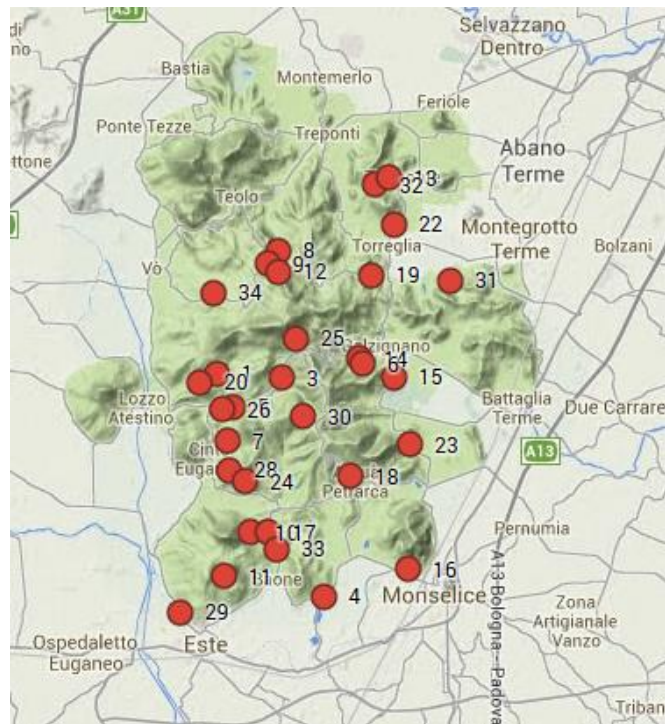


Fig. 11: Dislocazione dei chiusini nei territori del Parco dei Colli Euganei. La numerazione riportata è quella fornita dal Parco, non è progressiva.

Nei giorni antecedenti l'attivazione dei chiusini, veniva posto dell'alimento all'interno degli stessi in modo da attirare i cinghiali. Una volta attivati, quando l'animale entra, rimane intrappolato all'interno. I cinghiali entravano nei chiusini nel corso della notte, essendo animali ad attività prevalentemente notturna. La mattina seguente si andavano a controllare i chiusini attivati il giorno prima e ove presenti animali, si provvedeva al loro abbattimento. I cinghiali venivano abbattuti dal personale del Parco formato, per mezzo di una carabina. In seguito gli animali venivano iugulati ed eviscerati, sempre ad opera del personale del Parco

formato a tale compito. Contestualmente alla iugulazione, venivano raccolti i campioni di sangue dagli animali, da cui, dopo processazione, ottenere il siero. Il sangue veniva raccolto dalla ferita della iugulazione.

Nel caso di cattura, nello stesso chiusino, di un numero elevato di animali di giovane (inferiore ai sei mesi di vita) e pari età, si è optato per campionare il 50% dei soggetti: questo in valutazione della scarsa probabilità in pochi mesi di vita di un loro contatto con gli agenti patogeni ricercati successivamente e dato che le condizioni ambientali e di vita di giovani rinvenuti assieme si assumevano essere le stesse per l'intera figliata.

Alcuni animali venivano inoltre abbattuti nel corso di uscite notturne previste nel piano di controllo demografico della popolazione di cinghiali, sempre ad opera del personale formato del Parco. La modalità di raccolta dei campioni da tali animali è analoga a quanto sopra descritto.

Per ogni campione, sono stati registrati su un'apposita scheda i seguenti dati:

- Numero identificativo dell'animale
- Data della cattura
- Luogo della cattura (localizzazione chiusino)/località
- Sesso
- Età
- Peso
- Stato di salute generale
- Eventuali commenti

L'età degli animali è stimata tramite la valutazione della tavola dentaria (vedi capitolo determinazione dell'età nel cinghiale).

I cinghiali abbattuti venivano conferiti al macello di Agna (PD).

I campioni venivano conservati per qualche giorno presso la sede del Parco Colli Euganei a temperatura di refrigerazione (4°C), per poi essere trasportati in laboratorio per la processazione.

7.2 PROCESSAZIONE

In laboratorio le provette sono state centrifugate a 2000G per 10 minuti al fine di ottenere il siero. Sono state raccolte due aliquote di siero per campione, ognuna da 750 microlitri, ove possibile, una per le analisi, una di stoccaggio.

Le aliquote sono state conservate a -20°C fino alle analisi.

Le aliquote provenienti da uno stesso animale sono state rinumerate, rispetto alla numerazione assegnata dagli operatori del Parco, con numero progressivo da 1 a 272. I campioni si presentavano mediamente in buono stato con la presenza di qualche campione emolitico.

7.3 ANALISI SIEROLOGICHE

Le indagini sierologiche volte alla ricerca di anticorpi verso PRV sono state condotte utilizzando il kit ELISA competitivo “ID Screen®AUJESZKY GE Competition” (ID.vet). Tale test ELISA è volto alla ricerca di anticorpi specifici anti gE, permettendo così di identificare solo i soggetti infettati con virus di campo, non anche quelli vaccinati. Per ogni campione viene calcolata la percentuale di competizione:

$$S/N = (\text{OD campione}^4 / \text{OD controllo positivo}) \times 100.$$

Campioni con S/N superiore al 70% sono considerati negativi, campioni con S/N inferiore o uguale al 60% sono considerati positivi, campioni con S/N tra 60 e 70% sono considerati dubbi.

Le analisi sierologiche per l'infezione da PRRSV sono state condotte utilizzando il kit ELISA “Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Antibody Test Kit” (Idexx Laboratories). Questo test ELISA di tipo indiretto ha una sensibilità del 97,4% ed una specificità del 99,5%, secondo il fornitore del kit. Il risultato del singolo campione esaminato viene espresso attraverso il calcolo del rapporto di densità ottica (S/P), calcolato rispetto al controllo positivo usando la seguente formula:

$$S/P = \text{OD corretta (campione)} / \text{OD corretta (controllo positivo)}.$$

Il campione viene classificato come positivo se il valore S/P è maggiore o uguale a 0,4 e negativo se il valore S/P è minore di 0,4.

Le analisi volte all'identificazione di anticorpi contro HEV sono state condotte tramite l'utilizzo di un test ELISA, di tipo trapping, indiretta. I campioni sono considerati negativi con una percentuale di positività inferiore a 10, positivi con una percentuale di positività superiore a 10. La percentuale di positività viene calcolata secondo la seguente formula:

$$\% \text{positività} = (\Delta \text{DO del siero in esame} / \Delta \text{DO del siero controllo positivo}) \times 100.$$

⁴ OD= densità ottica

Il ΔDO è la differenza tra l'assorbanza del pozzetto in presenza di antigene e l'assorbanza del pozzetto in assenza di antigene.

Le analisi sierologiche per leptosirosi sono state condotte mediante test di microagglutinazione (MAT), in altre parole reazione tra antigene ed anticorpo visibile al microscopio in campo oscuro. I sieri sono stati testati per le seguenti leptospire: sierogruppo *Icterohaemorrhagiae* sierovariante *Icterohaemorrhagiae*, sierogruppo *Canicola* sierovariante *Canicola*, sierogruppo *Icterohaemorrhagiae* sierovariante *Copenhageni*, sierogruppo *Pomona* sierovariante *Pomona*, sierogruppo *Sejroe* sierovariante *Hardjo hardjoprajitno*, sierogruppo *Australis* sierovariante *Bratislava*. Ogni siero viene messo a contatto con le nove sierovarianti alla diluizione iniziale di 1:100. I sieri che presentano una agglutinazione inferiore al 50% nei confronti di tutti gli antigeni sono considerati negativi, quelli che presentano una agglutinazione superiore al 50% verso uno o più antigeni sono considerati positivi e vengono titolati a successive diluizioni per raddoppio fino alla diluizione limite. Si considera il titolo del siero, per un dato antigene, la più alta diluizione dello stesso nel cui pozzetto si osserva una reazione positiva, secondo quanto sopra descritto.

7.4 ANALISI STATISTICHE

Le analisi statistiche, tramite l'uso del test statistico del Chi quadro, sono state condotte per verificare l'eventuale esistenza di una associazione tra le variabili, mese di abbattimento, fascia d'età, sesso, comune d'abbattimento, e la positività alla presenza di anticorpi verso *Leptospira*. Il risultato dei test non ha evidenziato alcuna associazione statisticamente significativa tra le positività e le variabili sopra elencate (si è considerata la soglia di $P \leq 0,05$). Tramite la costruzione di un modello di regressione logistica, si è poi verificato se le positività riscontrate potessero essere spiegate da una o più delle variabili sopra elencate (con l'aggiunta del peso, variabile continua), considerate tutte insieme, tenendo quindi conto delle eventuali correlazioni tra loro. Il risultato indica come non sia possibile associare la positività a nessuna variabile.

8. RISULTATI

La distribuzione dei cinghiali campionati, in base all'età e al sesso, è riportata nei grafici 1 e 2. Il rapporto maschi/femmine è pari a 1,27, in contrasto con Matteazzi et al., 2010, i quali hanno riportato un rapporto tra sessi pressoché paritario dei soggetti abbattuti nell'area del Parco Regionale dei Colli Euganei. Il dato ottenuto dai cinghiali presi in esame nel presente studio, potrebbe essere tale per un campionamento non casuale dei soggetti di pochi mesi d'età, in quanto, per questi ultimi, si è optato per campionarne solo la metà in caso in un chiuso ne fossero stati rinvenuti in alto numero e di pari età (vedi capitolo 7.1). Escludendo, infatti, i soggetti di età compresa tra 1 e 12 mesi, il rapporto maschi/femmine si attesta sullo 0,93, in linea con i dati riportati da Matteazzi et al., 2010.

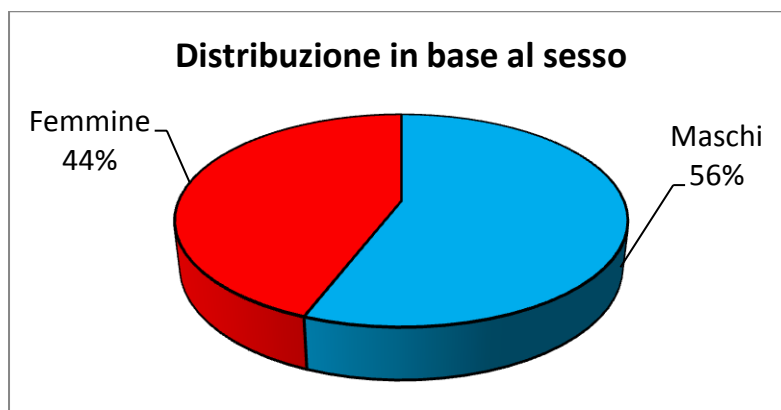


Grafico 1: Distribuzione dei cinghiali campionati in base al sesso.

Per quanto riguarda l'età, i soggetti sono stati raggruppati in tre fasce d'età per facilitare lo studio: gli individui con età comprese tra 1 e 12 mesi sono classificati come giovani, quelli tra 12 e 24 mesi come subadulti, quelli oltre i 24 mesi come adulti.

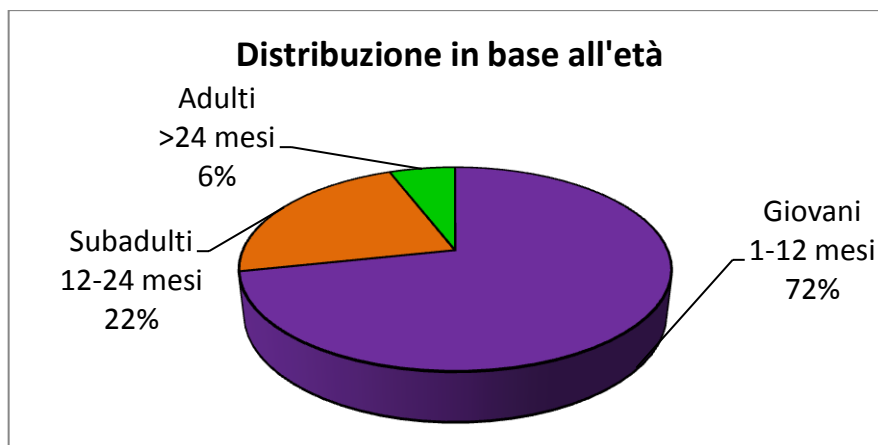


Grafico 2: Distribuzione dei cinghiali campionati in base all'età.

Il grafico 3 riporta i cinghiali abbattuti per Comune. Sul numero di individui abbattuti per Comune, incide il numero di chiusini dislocati nell'area comunale, le aree preferenziali per gli abbattimenti nel corso delle uscite notturne, e l'incidenza del ritrovamento in uno stesso chiusino di un numero elevato di soggetti (sono stati ritrovati fino a 10 soggetti in uno stesso chiusino nel corso dello studio, in quanto i giovani animali tendono a spostarsi in gruppo).

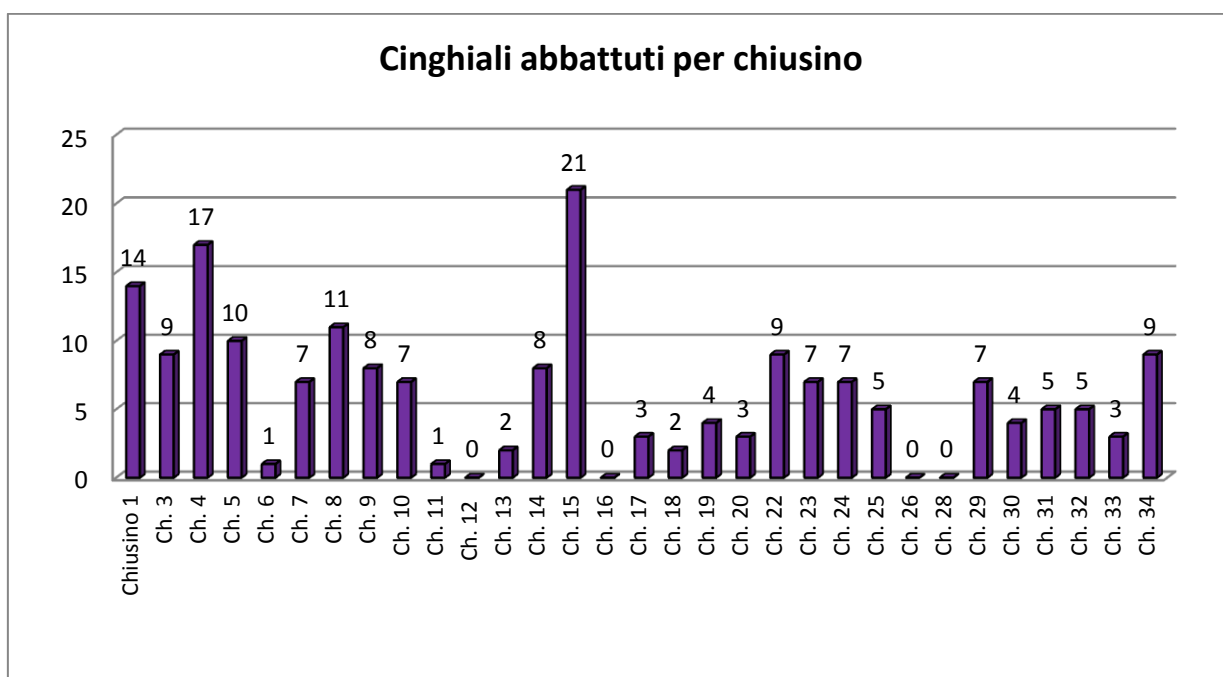


Grafico 3: Distribuzione dei cinghiali in base al chiusino di cattura.

Il numero di animali, abbattuti in seguito a cattura per mezzo di chiusino, è pari a 189. I restanti 83 cinghiali sono stati abbattuti nel corso delle uscite notturne.

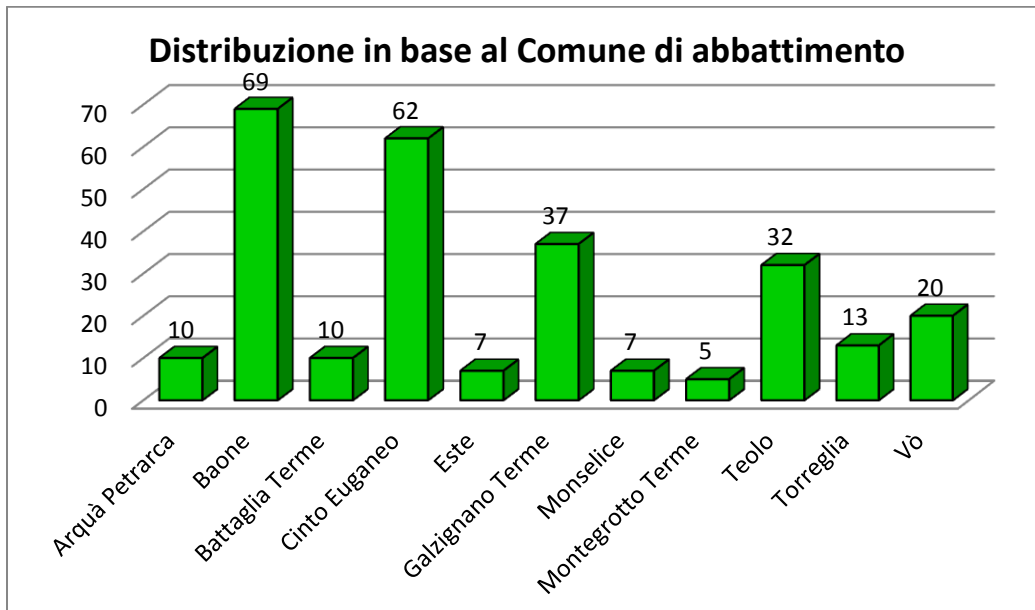


Grafico 4: Distribuzione dei cinghiali in base al Comune dove è avvenuto l'abbattimento.

Lo stato di salute generale dei soggetti campionati era buono, ad eccezione di due femmine (una subadulta ed una adulta), che si presentavano in scadenti condizioni corporee, probabilmente come conseguenza dell'allattamento (fatto compatibile con la stagione nel quale è avvenuto il campionamento), e di un maschio, che presentava gli esiti di una vecchia frattura all'arto anteriore destro. Sono stati catturati, in numero ridotto, soggetti infestati di zecche e tre femmine gravide, due con 5 feti ed una con 7 feti. Le due femmine con 5 feti avevano un'età stimata di 12-13 mesi, mentre quella con 7 feti, un'età superiore ai 38 mesi. Da segnalare il fatto, che nel chiusino 1, situato nel territorio di Cinto Euganeo, sia stato catturato un soggetto, di età superiore ai 38 mesi, di evidente ibridazione con il maiale domestico, sulla base delle caratteristiche fenotipiche.

La tabella 5 fornisce un riassunto delle caratteristiche degli individui abbattuti nello stesso Comune, in base a sesso ed età.

COMUNE	SESSO		CLASSE D'ETA'		
			1-12 MESI	12-24 MESI	>24 MESI
Arquà Petrarca (2, 3)	F	6	2	3	1
	M	4	1	1	2
Baone (4, 10, 11, 17, 24, 33)	F	37	22	6	9
	M	32	22	10	0
Battaglia Terme	F	4	1	3	0
	M	6	5	1	0
Cinto Euganeo (1, 3, 5, 7, 20, 26, 28, 30)	F	23	17	6	0
	M	39	32	6	1
Este (29)	F	4	2	2	0
	M	3	2	1	0
Galzignano Terme (6, 14, 15, 18, 25)	F	16	15	1	0
	M	21	18	3	0
Monselice (16)	F	3	0	2	1
	M	4	1	3	0
Montegrotto Terme (31)	F	2	2	0	0
	M	3	3	0	0
Teolo (9, 12, 13, 32)	F	10	5	5	0
	M	22	16	4	2
Torreglia (19, 22)	F	6	6	0	0
	M	7	7	0	0
Vò (8, 34)	F	9	8	1	0
	M	11	8	3	0
N°. Totale Cinghiali	272		272		

Tab. 5: Tabella riassuntiva dei cinghiali abbattuti per Comune, in base al sesso e all'età. Tra parentesi, dopo il Comune, sono indicati i numeri dei chiusini dislocati nel suo territorio.

Le indagini sierologiche volte all'identificazione di anticorpi verso PRV hanno dato esito totalmente negativo.

Un solo campione ha dato esito positivo per la presenza di anticorpi verso PRRSV, ma con bassi valori di positività ($S/P=0,73$), che rendono tale positività verosimilmente una falsa positività. Considerando comunque la positività come vera, la prevalenza dell'infezione risulta essere del 0,37%.

Data Cattura	Località Abbattimento	Sesso	Età	Fascia Età	Peso (Kg)	Stato Salute Gen.	S/P
11/07/14	Baone	Maschio	2-3 mesi	Giovane	13	Buono	0,73

Tab. 6: Dati relativi al soggetto risultato positivo alla presenza di anticorpi verso PRRSV.

Dieci animali sono risultati debolmente positivi alla presenza di anticorpi verso il virus dell'epatite E. Considerata la debole positività, è stato ripetuto il test ELISA sul siero di questi animali blandamente positivi, ed a questa seconda analisi sono risultati tutti negativi.

Ventisette animali sono risultati positivi alla presenza di anticorpi verso leptospire, dando una prevalenza dell'infezione del 9,93%. Delle nove sierovarianti usate nel test, sono state riscontrate positività verso sierovariante *Icterohaemorrhagiae* (sieroprevalenza del 9,56%), verso sierovariante *Copenhageni* (prevalenza del 3,31%), entrambe appartenenti al sierogruppo *Icterohaemorrhagie*, verso sierovariante *Grippotyphosa* (sieroprevalenza del 3,31%) del sierogruppo *Grippotyphosa*, verso sierovariante *Ballum* (prevalenza del 0,37%) del sierogruppo *Ballum* e verso sierovariante *Hardjo hardjoprajitno* (prevalenza del 0,37%) del sierogruppo *Sejroe*.

Dei 27 animali positivi, il 44,44% mostra un titolo anticorpale verso una singola sierovariante, il 55,56% ha un titolo verso due o più sierovarianti. I titoli anticorpali variano da 1:100 a 1:1600, ma la maggior parte si attesta su valori bassi.

Dalle analisi statistiche effettuate, non è emersa nessuna correlazione tra la positività a leptospirosi nel singolo individuo e i fattori considerati (sesso, età, mese di abbattimento, Comune di abbattimento e peso).

La percentuale di maschi sieropositivi (10,53%) è pressoché uguale a quella delle femmine (9,17%), non evidenziando una differenza tra sessi. La sieroprevalenza aumenta invece con l'aumento dell'età: il 18,75% degli adulti sono positivi rispetto al 13,11% dei subadulti ed al 8,21% dei giovani. Questa differenza nella sieropositività per anticorpi contro leptospire non è comunque statisticamente significativa, al pari di tutte quelle osservate tra soggetti di diverso sesso, comune e mese di cattura. Anche il modello di regressione logistica generato per cercare di spiegare la sieropositività non ha individuate alcuna delle variabili studiate come specifico significativo fattore di rischio.

Data Cattura	Comune	Sesso	Età	Fascia Età	Peso (Kg)	Stato Salute Gen.	Leptospirosi: Sierovariante e titolo
27/03/14	Vò	M	9-12 mesi	Giovane	37,5	Buono	IH 1:100
03/04/14	Teolo	M	2-3 mesi	Giovane	11,5	Buono	IH 1:1600 COP 1:800

03/04/14	Teolo	F	2-3 mesi	Giovane	12	Buono	IH 1:800 COP 1:800
13/05/14	Teolo	M	9-12 mesi	Giovane	47,5	Buono	IH 1:100
13/05/14	Galzignano T.	F	9-12 mesi	Giovane	32,5	Buono	IH 1:100
15/05/14	Baone	F	38 mesi	Adulto	49	Buono	IH 1:100
20/05/14	Monselice	F	19-22 mesi	Subadulto	52	Buono	IH 1:100
20/05/14	Cinto Euganeo	M	12-13 mesi	Subadulto	46,5	Buono	IH 1:200
27/05/14	Baone	F	24-26 mesi	Subadulto	64,5	Buono	IH 1:100 COP 1:100
29/05/14	Baone	M	2-3 mesi	Giovane	12	Buono	IH 1:100
03/06/14	Cinto Euganeo	M	2-3 mesi	Giovane	12	Buono	IH 1:100 GRI 1:200 BALL 1:200
10/06/14	Arquà Petrarca	M	>38 mesi	Adulto	91,5	Buono	IH 1:100 HAR 1:100
12/06/14	Baone	F	14-15 mesi	Subadulto	37,5	Buono	IH 1:100 GRI 1:200
18/06/14	Este	M	2-3 mesi	Giovane	12,5	Buono	IH 1:800
19/06/14	Baone	F	5-6 mesi	Giovane	41	Buono	GRI 1:100
23/06/14	Battaglia T.	M	7-8 mesi	Giovane	28	Buono	IH 1:200 GRIP 1:200
26/06/14	Baone	M	2-3 mesi	Giovane	14	Buono	IH 1:100 GRI 1:100
02/07/14	Torreglia	F	7-8 mesi	Giovane	31	Buono	IH 1:100 GRI 1:200
08/07/14	Cinto Euganeo	M	22-24 mesi	Subadulto	86,5	Buono	IH 1:100 COP 1:100 GRI 1:200
08/07/14	Baone	M	18-19 mesi	Subadulto	72	Buono	IH 1:200 COP 1:200 GRIP 1:400
08/07/14	Cinto Euganeo	F	2-3 mesi	Giovane	7,5	Buono	IH 1:100

08/07/14	Cinto Euganeo	M	2-3 mesi	Giovane	8,5	Buono	IH 1:100
10/07/14	Cinto Euganeo	F	18-19 mesi	Subadulto	38,5	Magra	IH 1:100 COP 1:100
10/07/14	Baone	M	7-8 mesi	Giovane	18	Buono	IH 1:100 COP 1:100
15/07/14	Arquà Petrarca	F	18-19 mesi	Subadulto	39	Buono	IH 1:100 COP 1:100
16/07/14	Vò	M	2-3 mesi	Giovane	16	Buono	IH 1:100
17/07/14	Teolo	M	31-37 mesi	Adulto	83,5	Buono	IH 1:100 COP 1:100 GRIP 1:100

Tab. 6: Dati relativi ai soggetti positivi per anticorpi verso leptospira. IH=sierovariante *Icterohaemorrhagiae*;

COP=sierovariante *Copenhageni*; GRI=sierovariante *Grippotyphosa*; BAL=sierovariante *Ballum*;

HAR=sierovariante *Hardjo hardjoprajitno*.

9. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il cinghiale si presta bene, tra gli animali selvatici, ad indagini epidemiologiche: è un animale che condivide agenti infettivi e parassitari con il suino domestico; è distribuito a livello mondiale; permette il campionamento di numero rilevante di soggetti, che grazie alla grande efficienza riproduttiva vengono velocemente sostituiti nella popolazione; l'ecologia e la struttura sociale della specie favoriscono i contatti intraspecifici, soprattutto per quel che riguarda la femmine ed i giovani (Ruiz-Fons et al., 2008a). Nonostante questo, è un animale selvatico e, come tutti gli animali selvatici, è elusivo e di non facile "accesso", e dunque è difficile osservare manifestazioni cliniche di infezioni avvenute in condizioni naturali, una stima stessa della popolazione nell'area di studio presenta difficoltà e, conseguentemente, mortalità e morbilità di un'infezione restano ignote (Artois et al., 2001).

Pur non essendo disponibile un censimento recente della popolazione dei cinghiali in esame, il numero di soggetti campionati (272) è sufficiente, con limiti fiduciali del 95%, per poter valutare l'eventuale presenza di un'infezione presente con una prevalenza $\geq 1,1\%$ in una popolazione teorica di 3000 individui, sicuramente più ampia di quella studiata.

Dato il metodo di abbattimento, i campioni di sieri sono stati raccolti casualmente, ovvero dai soggetti che giocoforza si rinvenivano nei chiusini, e dunque il campione della popolazione non è stato costruito in maniera programmata per essere rappresentativo. Nonostante ciò, ritengo che la rappresentatività del campione possa essere buona e affidabile, alla luce delle considerazioni che seguono.

Come riportato dal grafico 2, il 72% dei soggetti abbattuti è sotto l'anno di età, e questo sottolinea come la cattura tramite chiusini sia piuttosto selettiva verso individui di giovane età: tramite questo metodo si catturano, infatti, soggetti giovani in percentuale superiore alla loro presenza nella popolazione (Monaco et al., 2010). Va inoltre notato, come i mesi di campionamento del presente studio, siano coincisi con la stagione dei parti dei cinghiali, fatto che può portare ad un effettivo aumento di soggetti di giovane età nella popolazione dell'area. Inoltre, visto l'alto turn over della popolazione causato dagli ingenti abbattimenti annui, l'età media è presumibilmente bassa. Quindi nonostante la selettività del metodo di campionamento, le percentuali d'individui per fascia d'età è con alta probabilità rappresentativa dell'effettivo stato della popolazione.

La popolazione di cinghiali residente nel Parco Regionale dei Colli Euganei rappresenta un'eccezione rispetto ad altre popolazioni: essa infatti è isolata geograficamente da cinghiali presenti in altre aree d'Italia e quindi contatti con questi non dovrebbero essere presenti.

La totale assenza di sieropositività nei confronti di PRV nei cinghiali del Parco Colli è in contrasto con quanto riportato da studi condotti in Europa, nei quali sono state descritte sieroprevalenze che arrivano fino al 60,6% (Ruiz-Fons et al., 2006), ed in generale comprese tra il 20% ed il 50% (Ruiz-Fons et al., 2007; Ruiz-Fons et al., 2008b; Boadella et al., 2012a; Montagnaro et al., 2010; Roic et al., 2012; Vengust et al., 2005; Albayrak et al., 2013). Nella stessa Italia, tutti gli studi finora condotti, volti ad identificare la presenza dell'infezione da PRV nei cinghiali, hanno sempre dato esito positivo (Montagnaro et al., 2010; Ferroglio et al., 2003; Lari et al., 2006; Ercolini et al., 1995), arrivando a descrivere sieroprevalenze del 51% (Lari et al., 2006). Dagli studi è emersa una positività crescente con l'aumento d'età dei soggetti campionati (Ruiz-Fons et al., 2007; Ruiz-Fons et al., 2006; Albina et al., 2000; Kaden et al., 2009; Albayrak et al., 2013; Boadella et al., 2012c; Müller et al., 1998; Vengust et al., 2005; Ruiz-Fons et al., 2008a; Ferroglio et al., 2003; Lari et al., 2006) e, dato che nel presente studio il 72% degli animali studiati ha un'età inferiore ai 12 mesi, si potrebbe pensare che eventuali positività siano potute sfuggire. D'altra parte va sottolineato come in tutti gli studi anche i soggetti con meno di un anno di età presentassero qualche positività, cosa che non è stata riscontrata nei cinghiali del Parco dei Colli Euganei: va dunque esclusa la possibilità di una negatività dei campioni data da un campionamento non corretto.

Negli allevamenti di suini presenti nell'area del Parco, sono state riscontrate in passato positività a PRV nel corso delle indagini ufficiali per il Piano di Controllo Nazionale, ma la prevalenza nei suini è molto bassa. Questo non dovrebbe essere motivo di preoccupazione, in quanto le norme di biosicurezza dovrebbero impedire qualunque contatto tra suini domestici e cinghiali, ma il rinvenimento in un chiusino di un animale frutto evidente di incrocio tra domestici e selvatici, lascia intendere come i contatti tra le due popolazioni, seppur in minima parte, esistono. Allo stato attuale di prevalenza dell'infezione da PRV nell'allevamento suinicolo italiano, e considerato anche che la vaccinazione è obbligatoria, difficilmente l'infezione si può trasmettere ai cinghiali. Tuttavia qualora la vaccinazione non fosse più obbligatoria e la prevalenza dell'infezione nel suino domestico si alzasse, non si può escludere un'eventuale trasmissione del virus al cinghiale. Una volta introdotta in ambito selvatico, l'infezione diventa difficile da debellare, come dimostrato da Boadella et al., 2012a,

i quali hanno evidenziato come, nonostante un drastico calo della prevalenza di PRV nel suino (dal 70% all'1,7%) nel corso degli anni, la situazione epidemiologica nel cinghiale sia rimasta stabile. Questa preoccupazione resta, però, soprattutto teorica, in quanto i virus circolanti nelle popolazioni di cinghiali europei sono di genotipo I mentre nei suini attualmente sono di genotipo II (Boadella et al., 2012a; Capua et al., 1997a): la trasmissione dunque non è avvenuta di recente, o se avviene, si limita a singoli individui, pertanto il ciclo di PRV rimane indipendente nei suini rispetto ai cinghiali.

L'assenza dell'infezione nella popolazione di cinghiali dei Colli Euganei, può essere spiegata con:

- l'isolamento geografico dei cinghiali del Parco Colli rispetto ad altre popolazioni selvatiche in cui circola l'infezione;
- assenza di contatti con suini domestici;
- contatti con suini domestici, i quali però non sono infetti;
- contatti con suini infetti, ma l'infezione si trasmette in maniera inefficace nella popolazione di cinghiali.

Considerando come i contatti con i suini domestici non possano essere esclusi e dato che, come dimostrato da vari studi, nei cinghiali l'infezione si trasmette in maniera efficace, l'assenza dell'infezione può essere spiegata dalla natura isolata della popolazione in esame rispetto ad altre. A tal riguardo, un pericolo non irrilevante, è la possibile introduzione abusiva di cinghiali provenienti da altre aree, cosa che non può essere esclusa nel futuro, poiché la stessa popolazione del Parco Colli è oggi presente come frutto d'intromissioni abusive nell'area.

La situazione epidemiologica nell'area è comunque stabile: in linea con quanto rilevato in questa tesi, un precedente studio effettuato sui cinghiali del Parco Colli (Lucchese, 2008) aveva evidenziato positività nulle a PRV.

Dato il forte impatto di PRV sulla suinicoltura e considerato che in Italia la pseudorabbia è sottoposta ad un Piano di Controllo Nazionale, andrebbe eseguita una sorveglianza regolare nei cinghiali e, come indicato da altri autori (Vengust et al., 2005; Ferroglio et al., 2003) tale sorveglianza andrebbe condotta esaminando soggetti adulti.

Per quel che riguarda l'infezione da PRRSV, è stato riscontrato un solo animale positivo per la presenza di anticorpi, ma con valori di positività molto bassi, il che lo rende verosimilmente un falso positivo. Il precedente studio (Lucchese, 2008) condotto nell'area del Parco Colli

Euganei aveva riscontrato una prevalenza dell'infezione dell'1,3%. Anche considerando come realmente positivo l'animale campionato in questo studio, la prevalenza dell'infezione risulta essere dello 0,37%, valore non discordante da quanto riportato da Lucchese, 2008, evidenziando una situazione epidemiologica stabile, se non un calo del tasso di prevalenza dell'infezione, nell'area. Questo risultato è in linea con quanto rilevato dagli studi condotti sulle popolazioni di cinghiali, nei quali le sieroprevalenze variano da nulle (Hammer et al., 2012; Kukushkin et al., 2008; Ruiz-Fons et al., 2006; Hälli et al., 2012) al 6,3% come massimo (Roic et al., 2012). Considerate le basse prevalenze nei cinghiali, e considerato anche, che non emerge una correlazione tra la densità di suini domestici e cinghiali per area e la prevalenza di PRRSV nei secondi (Reiner et al., 2009), si può ragionevolmente concludere che il cinghiale non sia epidemiologicamente rilevante nell'infezione da PRRSV (Ruiz-Fons et al., 2008a; Hammer et al., 2012; Kukushkin et al., 2008; Rodríguez Prieto et al., 2013; Reiner et al., 2009; Ruiz-Fons et al., 2006), e che è più probabile che sia il suino domestico ad infettare il cinghiale (piuttosto che il contrario), e anche ove questo avvenga sia un fatto sporadico più che sistematico (Reiner et al., 2009).

Va però considerato come, in contrasto con questo e con gli altri studi effettuati, siano state riportate relativamente alte prevalenze da Reiner et al., 2009, e da Montagnaro et al., 2010, rispettivamente del 15,9% e del 37,7%. Questi due risultati sono difficilmente spiegabili alla luce delle conoscenze attuali e andrebbero svolte indagini più approfondite nel cinghiale, considerando anche l'ipotesi di Plagemann (2003), secondo la quale il cinghiale sia l'ospite principale di un virus intermedio dal punto di vista evolutivo tra l'LDV dei topi e il PRRSV dei suini, e che quindi le metodiche diagnostiche volte ad identificare PRRSV nel maiale siano inadatte nel cinghiale, avendo un target non corretto.

I cinghiali del Parco Colli sono risultati tutti negativi alla ricerca di anticorpi verso il virus dell'epatite E. Gli studi condotti finora riportano sieroprevalenze da nulle (Albayrak et al., 2013) al 26,33%, rinvenuto in Spagna (Boadella et al., 2012b), anche se la maggior parte degli autori hanno rilevato una sieropositività che si attesta tra l'8% e il 12% (Martinelli et al., 2013; Rutjes et al., 2010; Sato, 2011; Takahashi et al., 2014). Con i test sierologici attualmente disponibili, e data la tempistica di comparsa di immunità in seguito all'infezione, i soggetti con in corso una infezione acuta risultano sieronegativi (Straw et al., 2006), ma se l'infezione circola in una popolazione risulta difficile pensare di campionare solo soggetti che non siano mai venuti in contatto con il virus e/o soggetti con infezione acuta in atto.

Pertanto si può concludere che, considerata la natura di popolazione isolata dei cinghiali dei Colli Euganei, l'infezione non vi circoli. Andrebbe però condotta una sorveglianza sistematica nei confronti dell'epatite E sia nei suini presenti nell'area sia nei cinghiali, i quali potrebbero contrarre l'infezione dalla controparte domestica o dall'immissione non autorizzata di cinghiali provenienti da altre aree (anche italiane, in quanto l'infezione da HEV è presente nel territorio nazionale), soprattutto considerata la natura zoonosica dell'infezione che pone il personale dedicato al controllo della popolazione dei cinghiali a forte rischio di contrarre infezioni dai cinghiali.

La prevalenza della leptospirosi nella popolazione di cinghiali esaminata è risultata essere del 9,93%. Questo risultato è in linea con quanto riportato da altri studi, in cui le sieropositività da nulle (Hälli et al., 2012) arrivano fino al 45,5% (Vengust et al., 2008), con la maggior parte degli studi che hanno rilevato positività comprese tra il 15% e il 35% (Jansen et al., 2007; Schöenberg et al., 1999; Fornazari et al., 2011; Slavica et al., 2008; Milas et al., 2013; Krawczyk, 2000; Deutz et al., 2008; Tremml et al., 2003; Mason et al., 1998). Dal presente studio emerge come la sieroprevalenza aumenti con l'età dei soggetti (18,75% degli adulti, 13,11% dei subadulti, 8,21% dei giovani), confermando quanto rinvenuto da altri autori (Slavica et al., 2010; Tremml et al., 2003): questo si può spiegare con il fatto che nei giovani è presente un'immunità materna, e con il fatto che la probabilità di venire in contatto con l'agente infettivo aumenta all'aumentare del tempo di vita. Le analisi statistiche effettuate non hanno, però, evidenziato una correlazione tra l'età dei soggetti e le sieropositività.

I serovar più frequenti rilevati in questo studio sono *icterohaemorrhagiae* (9,56%), *copenhageni* (3,31%) e *grippotyphosa* (3,31%) (per i serovar *ballum* e *hardjo* è stata trovata una prevalenza del 0,37%, per entrambi). Dagli studi finora effettuati i serovar più frequentemente osservati in cinghiali sono stati *pomona*, *bratislava* e *australis* (Ebai et al., 2003; Montagnaro et al., 2010; Espi et al., 2010; Vicente et al., 2002; Jansen et al., 2007; Schöenberg et al., 1999; Fornazari et al., 2011; Boqbi et al., 2012; Slavica et al., 2010; Milas et al., 2013; Slavica et al., 2008; Deutz et al., 2008; Mason et al., 1998). Comunque esiste una notevole variabilità nei serovar maggiormente rilevati nei differenti studi, è questo può essere spiegato con il fatto che nel cinghiale si rinvergono le leptospire circolanti nel territorio in esame (Tremml et al., 2003), anche se si può evidenziare un trend generale in cui il serovar *australis* è quello più frequentemente isolato attualmente, rispetto agli anni '90 in cui era *pomona* il serovar prevalente.

Nel presente studio, i serovar con più alte prevalenze (*icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *grippotyphosa*) sono tutti serovar, i cui ospiti di mantenimento sono topi e/o ratti. Questo sta ad indicare come nell'area di studio il cinghiale sia un ospite occasionale di leptospire che interessano topi e ratti, i quali contaminano l'ambiente, dal quale, viste le caratteristiche comportamentali del cinghiale, quest'ultimo si può infettare. Considerate le basse prevalenze riscontrate non è opportuno considerare il cinghiale come un *reservoir* di leptospirosi (ruolo che comunque a livello mondiale è ancora in discussione, in quanto non sono state ancora isolate leptospire da reni di questi animali (Milas et al., 2013), anche se si suppone possano fungere da ospite di mantenimento del serovar *australis*). Piuttosto, la presenza di leptospira nel cinghiale è spia di una circolazione del patogeno nell'ambiente in esame, fatto che deve destare preoccupazione soprattutto sotto l'aspetto della trasmissione all'uomo. A maggior rischio sono gli operatori del Parco destinati al controllo demografico della popolazione di cinghiali, ma anche i macellatori, e, considerata la natura del Parco Colli di zona escursionistica, chi frequenta i Colli Euganei per turismo.

Per quel che riguarda l'allevamento suino, vista la bassa prevalenza, il cinghiale non costituisce allarme come fonte di trasmissione, quanto, piuttosto, vale il contrario, in quanto se leptospira circola, verosimilmente sarà presente anche in allevamenti di suini (anche se i programmi di controllo degli infestanti dovrebbero prevenire il contatto tra i roditori in questione e il maiale), dove visto lo stretto contatto tra animali la diffusione dell'infezione risulta più facile.

Concludendo, la popolazione dei cinghiali del Parco Regionale dei Colli Euganei non presenta, al momento, problemi sanitari relativi alle infezioni prese in esame, e pertanto non costituisce fonte di preoccupazione per una possibile trasmissione di queste infezioni ai suini allevati nell'area.

Per quel che riguarda l'inserimento del presente studio nel contesto dei risultati ottenuti da altri studi effettuati nel cinghiale, vanno considerati due fatti che rendono la popolazione in esame un caso eccezionale rispetto ad altre popolazioni di cinghiali: l'area in cui vivono è isolata e previene ogni contatto con loro simili di altre aree, ad eccezione di possibili, ulteriori intromissioni non autorizzate di cinghiali (la qual cosa, per motivi storici locali, non può essere esclusa), che potrebbero introdurre agenti infettivi; la consistenza di capi negli allevamenti suini presenti nell'area è bassa, essendo per lo più animali allevati per consumo personale, e in questa situazione è difficile che un'infezione diventi endemica nella

popolazione suina vista la scarsa densità e gli scarsi contatti tra individui, e anche se presenti contatti con cinghiali, infezioni da trasmettere non ci sono; la popolazione in questione è soggetta ad altissimo turn-over, vista la pressione negativa che subisce nell'ambito del controllo demografico, e questo porta ad una durata di vita media molto bassa, rendendo difficile che il singolo individuo possa venire in contatto con un agente infettivo, e anche avvenisse ciò, che poi possa eliminarlo a lungo infettando altri individui.

Nonostante quanto appena discusso, la presenza del cinghiale rimane fortemente negativa nel Parco Regionale dei Colli Euganei, per gli ingenti danni alle colture e per l'impatto ambientale in un'area ricca di biodiversità, messa a rischio da questo animale da considerare come infestante. L'eradicazione del cinghiale resta un obiettivo primario, ma la sua realizzazione tramite cattura con chiusini e abbattimenti non sarà probabilmente attuabile, se non con l'ausilio di qualche metodica, ad es. sterilizzazioni farmacologiche, che deve ancora essere studiata per l'effettiva messa in pratica.

BIBLIOGRAFIA:

- -1997. Decreto legislativo 01.04.1997. Piano nazionale di controllo della malattia di Aujeszky nella specie suina. Gazzetta ufficiale n.103, serie generale, 06/05/1997.
- Albayrak H., Ozan E. & Cavunt A. SPRINGER. (2013). A serological survey of selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in northern Turkey. *European Journal of Wildlife Research*, 59(6), 893-897.
- Albina E., Mesplede A., Chenut G., Le Potier M. F., Bourbao G., Le Gal S. & Leforban Y. (2000). A serological survey on classical swine fever (CSF), aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Veterinary Microbiology*, 77(1-2), 43-57.
- Angeloni G. 2014. Sorveglianza dell'infezione da virus dell'epatite E (HEV) in Italia: from farm to table. Relatore Ostanello F. Correlatore Ruggeri. F.M., Correlatore Di Bartolo I. Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Scuola di Agraria e Medicina Veterinaria, Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia.
- Artois M., Delahay R., Guberti V. & Cheeseman C. (2001). Control of infectious diseases of wildlife in Europe. *The Veterinary Journal*, 162 (2), 141-152.
- Balayan M.S., Usmanov R.K., Zamyatina N.A., Djumaliev D.I. & Karas F.R. (1990). Brief report: Experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J. Med. Virol.* 32:58-59.
- Boadella M., Gortázar C., Vicente J. & Ruiz-Fons F. (2012a). Wild boar: An increasing concern for Aujeszky's disease control in pigs? *BMC Veterinary Research*, 8:7.
- Boadella M., Ruiz-Fons J.F., Vicente J., Martin M., Segales, J. & Gortazar C. (2012b). Seroprevalence evolution of selected pathogens in Iberian wild boar. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(5), 395-404.

- Boadella M., Vicente J., Ruiz-Fons F., de la Fuente J. & Gortázar C. (2012c). Effects of culling Eurasian wild boar on the prevalence of *Mycobacterium bovis* and Aujeszky's disease virus. *Preventive Veterinary Medicine*, 107(3-4), 214-221.
- Boqvist S., Bergstrom K. & Magnusson U. (2012). Prevalence of antibody to six *Leptospira* serovars in Swedish wild boars. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(2), 492-496.
- Capua I., Casaccia C., Calzetta G. & Caporale V. ELSEVIER, SCIENCE. (1997a). Characterisation of Aujeszky's disease viruses isolated from domestic animals and from a wild boar (*Sus scrofa*) in Italy between 1972 and 1995. *Veterinary Microbiology*, 57(2-3), 143-149.
- Capua I., Fico R., Banks M., Tamba M. & Calzetta G. ELSEVIER, SCIENCE. (1997b). Isolation and characterisation of an Aujeszky's disease virus naturally infecting a wild boar (*Sus scrofa*). *Veterinary Microbiology*, 55(1-4), 141-146.
- Carnevali L., Pedrotti L., Riga F. & Toso S. (2009). Banca Dati Ungulati: *Status*, distribuzione, consistenza, gestione e prelievo venatorio delle popolazioni di Ungulati in Italia. Rapporto 2001-2005. *Biol. Cons. Fauna*, 117:1-168
- Choi E.J., Lee C.H., Hyun B.H., Kim J.J., Lim S.I., Song J.Y. & Shin Y.K. (2012). A survey of porcine reproductive and respiratory syndrome among wild boar populations in Korea. *Journal of Veterinary Science*, 13(4), 377-383.
- Clayson E.T., Innis B.L., Myint K.S., Narupiti S., Vaughn D.W., Giri S., Ranabhat P. & Shrestha M.P. (1995). Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53:228-232.
- Cordioli P. (2013). Relazione sull'attività dell'anno 2013, Piano di attività per l'anno 2014. Istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.
- Deutz von A., Fuchs K., Schuller W., Muller M., Kerbl M.U. & Klement C (2002). Studies on the seroprevalence of antibodies against *Leptospira interrogans* in hunters and wild boar from south-eastern Austria. *Zeitschrift Für Jagdwissenschaft*, 48(1), 60-65.

- Dobreniuc J., Favorov M.O., Shapiro C.N., Bell B.P., Mast E.E., Dadu A., Culver D., Iarovoi P., Robertson B.H. & Margolis H.S. (2001). Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J. Infect. Dis.* 184:1594-1597.
- Ebani V., Cerri D., Poli A. & Andreani E. (2003). Prevalence of Leptospira and Brucella Antibodies in Wild Boars (*Sus scrofa*) in Tuscany, Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 39:3, 718-722.
- Ercolini C., Ferrari A., Fisichella S., Guerci Lena P., Mandola M.L., Mignone W., Perruchon M. & Poggi M. (1995). Serological survey of wild boar (*Sus scrofa*) in Liguria, Italy. *Ibex J.M.E.* 3: 83-84.
- Espi A., Miguel Prieto J. & Alzaga V. (2010). Leptospiral antibodies in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*), fallow deer (*Dama dama*) and European wild boar (*Sus scrofa*) in Asturias, Northern Spain. *The Veterinary Journal*, 183(2), 226-227.
- Ferroglio E., Acutis P.L., Masoero L., Gennero S. & Rossi L. (2003). Indagine sierologica su una popolazione di cinghiali nelle Alpi Occidentali. *J. Mt. Ecol.*, 7 (Suppl.): 225-228.
- Fornazari F., Camosci L.G., Silva R.C., Guazzelli A., Ribeiro M.G., Chiacchio S.B. & Langoni H. (2011). Leptospiral antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) bred in Brazil. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 17(1), 94-97.
- Gortazar C., Vicente J., Fierro Y., Leon L., Cubero M.J. & Gonzalez M. (2002). Natural aujeszky's disease in a Spanish wild boar population. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 969: 210-212.
- Hahn E.C., Page G.R., Hahn P.S., Gillis K.D., Romero C., Anelli J.A. & Gibbs E.P.J. 1997. Mechanisms of transmission of Aujeszky's disease virus originating from feral swine in the USA. *Veterinary Microbiology* 55, 123-130.
- Hälli O., Ala-Kurikka E., Nokireki T., Skrzypczak T., Raunio-Saarnisto M., Peltoniemi O.A.T. & Heinonen M. (2012). Prevalence of and risk factors associated with viral and bacterial pathogens in farmed European wild boar. *The Veterinary Journal*, 194(1), 98-101.

- Hammer R., Ritzmann M., Palzer A., Lang C., Hammer B., Pesch S. & Ladinig, A. (2012). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections in wild boar (*Sus scrofa*) in southwestern Germany. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(1), 87-94.
- Hsieh S.Y., Meng X.J., Wu Y.H., Liu S.T., Tam A.W., Lin D.Y. & Liaw Y.F. (1999). Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J. Clin. Microbiol.* 37:3828-3834.
- Kaba M., Davoust B., Marie J.L. & Colson P. (2010). Detection of hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) livers. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 186(2), 259-261.
- Kaden V., Lange E., Hanel A., Hlinak A., Mewes L., Hergarten G., Irsch B., Dedek J. & Bruer W. SPRINGER. (2009). Retrospective serological survey on selected viral pathogens in wild boar populations in Germany. *European Journal of Wildlife Research*, 55(2), 153-159.
- Koizumi N., Muto M., Yamada A. & Watanabe H. (2009). Prevalence of *Leptospira* spp. in the kidneys of wild boars and deer in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(6), 797-799.
- Krawczyk M. (2000). Serological studies on leptospirosis in wild boar. *Medycyna Weterynaryjna*, 56(7), 440-443.
- Kukushkin S., Kanshina A., Timina A., Baybikov T. & Mikhalishin V. Springer. (2008). Investigation of wild boar (*Sus scrofa*) for porcine reproductive and respiratory syndrome in some territories of Russia. *European Journal of Wildlife Research*, 54(3), 515-518.
- Jansen A., Luge E., Guerra B., Wittschen P., Gruber A., Loddenkemper C., Schneider T., Lierz M., Ehlert D., Appel B., Stark K. & Nockler K. (2007). Leptospirosis in urban wild boars, Berlin, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 13(5), 739-742.

- Lari, A., Lorenzi, D., Nigrelli, D., Brocchi, E., Faccini, S., & Poli, A. (2006). Pseudorabies virus in european wild boar from central italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(2), 319-324.
- Le Potier, M. F., Blanquefort, P., Morvan, E., & Albina, E. (1997). Results of a control programme for the porcine reproductive and respiratory syndrome in the french 'pays de la loire' region. *Veterinary Microbiology*, 55(1-4), 355-360.
- Li T.C., Chijiwa K., Sera N., Ishibashi T., Etoh Y., Shinohara Y., Kurata Y., Ishida M., Sakamoto S., Takeda N. & Miyamura T. (2005). Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1958-1960.
- Lipowski A. & Pejsak Z. 2002. Antibody prevalence of pseudorabies virus in feral pigs in Poland. *Proc. Congr. Int. Pig. Vet. Soc.* 2:223.
- Lucchese L. 2008. Indagine sullo stato sanitario della popolazione di cinghiali del Parco Regionale dei Colli Euganei. Relatore Martini M. Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Legnaro.
- Lutz von W. (1997). Serological evidence of antibodies against *Toxoplasma* and *Leptospira* in wild boar. *Zeitschrift Für Jagdwissenschaft*, 43(4), 283-287.
- Martelli F., Caprioli A., Zengarini M., Marata A., Fiegna C., Di Bartolo I., Ruggeri F.M., Delogu M. & Ostanello F. (2008). Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Veterinary Microbiology*, 126(1-3), 74-81.
- Martinelli N., Pavoni E., Filogari D., Ferrari N., Chiari M., Canelli E. & Lombardi G. (2013). Hepatitis E virus in wild boar in the central northern part of Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*.
- Martino P.A. 2014. Leptosirosi: l'agente eziologico. In: La leptosirosi canina e umana: cosa c'è di nuovo? Supplemento a *La Settimana Veterinaria* n°877, 4 giugno 2014.

- Mason R.J., Fleming P.J.S., Smythe L.D., Dohnt M.F., Norris M.A. & Symonds M.L. (1998). *Leptospira interrogans* antibodies in feral pigs from New South Wales. *Journal of Wildlife Diseases*, 34(4), 738.
- Massei G. & Toso S., 1993. *Biologia e Gestione del Cinghiale*, Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica, Documenti Tecnici, 5.
- Massei G. & Genov P. *Il Cinghiale*. Edagricole, Bologna, 2000.
- Massei G. & Genov P., 2004. The environmental impact of wild boar. *Galemys*, 16 pag 135-145.
- Matsuda H., Okada K., Takahashi K., & Mishiro S. (2003). Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(6), 944.
- Matteazzi C., Modica N., Gallo M., Ziron G. & Pizzocaro M.L. (2010). Gestione del cinghiale, *Sus scrofa*, nelle aree protette: il caso del Parco Regionale dei Colli Euganei (PD) (*Artiodactyla, Suidae*). *Boll. Mus. St. Nat. Venezia*, suppl. al vol. 61: 319-324.
- Melnichouk O., Dewey C.E., Friendship R.M. & Haydon D.T. (2005). Seroepidemiological study of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection patterns by age in nursery pigs on seven commercial farms Ontario, Canada. *Prev. Vet. Med.* (in press).
- Meng X.J., Purcell R.H., Halbur P.G., Lehman J.R., Webb D.M., Tsareva T.S., Haynes J.S., Thscker B.J. & Emerson S.U. (1997). A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:9860-9865.
- Meng X.J., Wiseman B., Elvinger F., Guenette D.K., Toth T.E., Engle R.E., Emerson S.U. & Purcell R.H. (2002). Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J. Clin. Microbiol.* 40:117-224.

- Meng X.J., Lindsay D.S. & Sriranganathan N. ROYAL SOC. (2009). Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philosophical Transactions - Royal Society. Biological Sciences*, 364(1530), 2697-2707.
- Milas Z., Majetic Z., Habus J., Perko V., Staresina V., Barbic L., Stevanovic V., Perharic M., Ljubic B. & Turk N. (2013). The occurrence and maintenance of *Leptospira* serovars Australis and Bratislava in domestic and wild animals in Croatia. *Veterinarski Arhiv*, 83(4), 357.
- Monaco A., Carnevali L. e S. Toso, 2010 – Linee guida per la gestione del Cinghiale (*Sus scrofa*) nelle aree protette. 2° edizione. Quad. Cons. Natura, 34, Min.Ambiente–ISPRA.
- Montagnaro S., Sasso S., De Martino L., Longo M., Iovane V., Ghiurmino G., Pisanelli G., Nava D., Baldi U. & Baldi L. (2010). Prevalence of antibodies to selected viral and bacterial pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Campania Region, Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(1), 316-319.
- Müller T., Teuffert J., Zellmer K., Staubach C., Klupp B., Otte, J. & Conraths F.J. (1997). Pseudorabies virus infections in the European wild boar – A potential danger for domestic pigs?. *Epidemiologie Santé Animale*, 01, p. 31–32.
- Müller T., Teuffert J., Ziedler K., Possardt C., Kramer M., Staubach C. & Conraths F.J. (1998). Pseudorabies in the European wild boar from eastern Germany. *Journal of Wildlife Diseases*, 34(2), 251-258.
- Müller T., Hahn E.C., Tottewitz F., Kramer M., Klupp B.G., Mettenleiter T.C. & Freuling C. (2011). Pseudorabies virus in wild swine: A global perspective. *Archives of Virology*, 156(10), 1691-1705.
- Nakano T., Takahashi K., Arai M., Okano H., Kato H., Ayada M., Okamoto H. & Mishiro S. (2013). Identification of European-type hepatitis E virus subtype 3e isolates in Japanese wild boars: Molecular tracing of HEV from swine to wild boars. *Infection, Genetics and Evolution*, 18, 287-298.
- Piano monitoraggio selvatici regione Lombardia. Periodo di riferimento 05/12/2012-

31/12/2013 elaborazione del 05/03/2014.

- Plagemann, P. G. (2003). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Origin hypothesis. *Emerging Infectious Diseases*, 9(8), 903-908.
- Reiner G., Fresen C., Bronnert S. & Willems H. Elsevier, Science. (2009). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in wild boars. *Veterinary Microbiology*, 136(3-4), 250-258.
- Rodríguez Prieto V., Kukielka D., Martínez López B., de las Heras A.I., Barasona J.Á., Gortázar C, Sánchez Vizcaíno J.M. & Vicente J. (2013). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in wild boar and iberian pigs in south-central Spain. *European Journal of Wildlife Research*, 59(6), 859.
- Roic B., Jemersic L., Terzic S., Keros T., Balatinec J. & Florijancic T. (2012). Prevalence of antibodies to selected viral pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia in 2005-06 and 2009-10. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(1), 131-137.
- Ruiz-Fons F., Vicente J., Vidal D., Hofle U., Villanua D., Gauss C., Segales J., Almeria S., Montoro V. & Gortazar C. (2006). Seroprevalence of six reproductive pathogens in european wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: The effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology*, 65(4), 731-743.
- Ruiz-Fons F., Vidal D., Hofle U., Vicente J. & Gortazar C. ELSEVIER, SCIENCE. (2007). Aujeszky's disease virus infection patterns in European wild boar. *Veterinary Microbiology*, 120(3-4), 241-250.
- Ruiz-Fons F., Segales J. & Gortazar, C. (2008a). A review of viral diseases of the european wild boar: Effects of population dynamics and reservoir role. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 176(2), 158-169.
- Ruiz-Fons F., Vidal D., Vicente J., Acevedo P., Fernandez-de-Mera I.G., Montoro V. & Gortazar C. SPRINGER. (2008b). Epidemiological risk factors of Aujeszky's disease in wild boars (*Sus scrofa*) and domestic pigs in Spain. *European Journal of Wildlife Research*, 54(4), 549-555.

- Rutjes S.A., Lodder-Verschoor F., Lodder W.J., van der Giessen J., Reesink H., Bouwknecht M. & de Roda Husman A.M. (2010). Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in wild boar and red deer in the Netherlands. *Journal of Virological Methods*, 168(1-2), 197-206.
- Sato Y., Sato H., Naka K., Furuya S., Tsukiji H., Kitagawa K., Sonoda Y., Usui T., Sakamoto H., Yoshino S., Shimizu Y., Takahashi M., Nagashima S., Jirintai, Nishizawa T. & Okamoto H. (2011). A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: Identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized genotypes. *Archives of Virology*, 156(8), 1345-1358.
- Scacco M., Carnevali L. & Riga F. (2011). Indagine conoscitiva del cinghiale nel Parco Regionale dei Colli Euganei, pag. 233-241. In Riga F., Genghini M., Cascone C. & Di Luzio P. (A cura di), *Impatto degli Ungulati sulle colture agricole e forestali: proposta per linee guida nazionali. Manuali e linee guida ISPRA 68/2011.*
- Schielke A., Sachs K., Lierz M., Appel B., Jansen A. & Johne R. (2009). Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and urban regions in Germany and whole genome characterization of an endemic strain. *Virology Journal*, 6, 58-422X-6-58.
- Schönberg von A., Lutz W. & Kampe, U. (1999). Investigation of serum samples of wild boar (*Sus scrofa* L.1758) for leptospirosis. *Zeitschrift Für Jagdwissenschaft*, 45(4), 262-265.
- Schulze C., Hlinak A., Wohlsein P., Kutzer P. & Muller, T. (2010). Spontaneous Aujeszky's disease (Pseudorabies) in European wild boars (*Sus scrofa*) in the federal state of Brandenburg, Germany. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 123(9-10), 359-364.
- Slavica A., Cvetnic Z., Milas Z., Janicki Z., Turk N., Konjevic D., Severin K., Tonic J. & Lipej Z. (2008). Incidence of leptospiral antibodies in different game species over a 10-year period (1996-2005) in Croatia. *European Journal of Wildlife Research*, 54(2), 305-311.

- Slavica A., Cvetnic Z., Konjevic D., Janicki Z., Severin K., Dezdek D., Staresina V., Sindjic M. & Antic J. (2010). Detection of *Leptospira* spp. serovars in wild boars (*Sus scrofa*) from continental Croatia. *Veterinarski Arhiv*, 80(2), 247.
- Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S. & Taylor D.J. 2006. Diseases of Swine. Iowa. Blackwell Publishing Company. 9th edition.
- Tagliabue S. 2014. Diagnosi di laboratorio di leptospirosi nel cane: campionamento, metodi, dati. In: La leptospirosi canina e umana: cosa c'è di nuovo? Supplemento a *La Settimana Veterinaria* n°877, 4 giugno 2014.
- Takahashi M., Nishizawa T., Nagashima S., Jirintai S., Kawakami M., Sonoda Y., Suzuki T., Yamamoto S., Shigemoto K., Ashida K., Sato Y. & Okamoto H.. (2014). Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus Research*, 180, 59-69.
- Tamada Y., Yano K., Yatsunami H., Inoue O., Mawatari F. & Ishibashi H. (2004). Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *Journal of Hepatology*, 40(5), 869-870.
- Trembl F. & Nesnalova E. (1993). The occurrence of antibodies to *Leptospira* in the blood-serum of game. *Veterinární Medicína*, 38(2), 123.
- Trembl F., Pikula J. & Holesovska Z. (2003). Prevalence of antibodies against leptospires in the wild boar (*Sus scrofa* L., 1758). *Veterinární Medicína*, 48(3), 66.
- Vengust G., Valencak Z. & Bidovec A. WILDLIFE DISEASE ASSOC, INC. (2005). Presence of antibodies against Aujeszky's disease virus in wild boar (*Sus scrofa*) in Slovenia. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(4), 800-802.
- Vengust G., Lindtner-Knific R., Zele D. & Bidovec A. (2008). Leptospira antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) in Slovenia. *European Journal of Wildlife Research*, 54(4), 749-752.

- Vicente J., Leon-Vizcaino L., Gortazar C., Cubero M., Gonzalez M. & Martin-Atance P. (2002). Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from Southcentral Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(3), 649-652.
- Williams E.S. & Barker I.K. 2001. Infectious diseases of wild mammals. Manson Publishing, Iowa. Third Edition.
- Withers M.R., Correa M.T.; Morrow M., Stebbins M.E., Seriwana J., Webster W.D., Boak M.B. & Vaughn D.W. (2002). Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66:384-388.
- Wu N., Abril C., Hinic V., Brodard I., Thur B., Fattebert J., Hüsey D. & Ryser-Degiorgis M.P. (2011). Free-ranging wild boar: A disease threat to domestic pigs in Switzerland? *Journal of Wildlife Diseases*, 47(4), 868-879.
- Yazaki Y., Mizuo H., Takahashi M., Nishizawa T., Sasaki N., Gotanda Y. & Okamoto H. (2003). Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J. Gen. Virol.* 84:2351-2357.

SITOGRAFIA:

- Bollettino cinghiali, Parco Regionale Colli Euganei.
<http://www.parcocollieuganei.com/index.php/controllo-popolazione-cinghiali>.
24/06/2014.
- <http://www.parcocollieuganei.com/index.php/home-page/ente-parco>. 22/06/2014.
- Progetto Flora e Fauna, Parco Regionale dei Colli Euganei.
<http://www.parcocollieuganei.com/index.php/progetti-e-attivita/14-descrizioni/ente-parco-colli-euganei/126>. 22/06/2014.

RINGRAZIAMENTI

È doveroso ringraziare, in primis, tutto il personale del Parco Regionale dei Colli Euganei, che ha permesso la realizzazione di questa tesi, e di altre future, aprendo una proficua collaborazione con l'Università. Un ringraziamento particolare al personale che ha avuto quotidianamente a che fare con me nelle uscite più che mattutine ai chiusini, e alla dott.ssa Luisa Pizzocaro per la disponibilità e per l'aiuto nella gestione della raccolta dei campioni.

Ringrazio il dottor Stefano Nardelli e il personale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie per la disponibilità ad effettuare le analisi sierologiche e per la pazienza nei miei confronti, nel mese dell'anno solitamente più dedicato alle vacanze che al lavoro.

Anche se rientra nel lavoro accademico la gestione dei tesisti e pertanto da più parti si consiglia di non ringraziare i professori, ringrazio il professor Marco Martini per la disponibilità e la reperibilità (caratteristiche che non sempre caratterizzano il rapporto tesista-relatore in ambito accademico) ed un sincero grazie alla professoressa Maria Luisa Menandro per la disponibilità, e per l'aiuto nell'organizzazione del lavoro e nella non sempre facile gestione del materiale per il campionamento.

Un bel po' di grazie ai miei genitori, che mi hanno sostenuto (economicamente, cosa non irrilevante, e non solo) in tutto il mio percorso di studi universitari, ma il cui sostegno parte da lontano, col trasmettermi fin da piccolo la voglia e l'impegno che va messo nello studio e la piacevolezza della conoscenza.

Grazie a mio fratello, al quale peraltro ho scippato il computer per scrivere questa tesi. Grazie ad Alice per la sopportazione e la gentilezza nonostante il mio nervosismo nei periodi più stressanti, tesi compresa.

Grazie a Matilde, compagna di studi e di ansie.

Grazie a Honey, primo e indimenticabile cane, senza di te non sarei qui probabilmente, e a Lilo, che volentieri mi è stata in braccio nella stesura della tesi.

Federico Franchini