

# MONITORAGGIO SIEROLOGICO NEL CAPRIOLO NELLA ZONA DELL'ALTOPIANO DI ASIAGO (VI)

Stancampiano L.\*, Nardelli S.\*, Carnieletto P.\*, Turilli C.\*, Maragno M.\*\*\*, Cantele Carlo M.\*\*

\* Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Via Romea 14/A - 35020 Legnaro (PD);

\*\* AULSS 3 Bassano del Grappa (VI)

**Riassunto** - Sono stati esaminati 139 campioni di siero ematico di Capriolo, raccolti durante la stagione venatoria 1995-'96 nelle 15 riserve o aziende faunistiche venatorie presenti nel territorio dell'AULSS 3 della provincia di Vicenza. In particolare è stata eseguita la ricerca di anticorpi per afta, IBR e BVD, utilizzando una metodica ELISA di tipo competitivo, tale quindi da non necessitare di anticorpi specifici anti-cervidi; per febbre Q, utilizzando la fissazione del complemento; per leptospirosi, utilizzando la microagglutinazione; per borreliosi, utilizzando l'immunofluorescenza. Vista la mancanza di dati bibliografici riguardanti il Capriolo, come soglia di positività sono state considerate le soglie normalmente utilizzate per i ruminanti domestici. Nessuno dei campioni esaminati è risultato positivo per afta, leptospirosi e febbre Q. La prevalenza sierologica è risultata pari allo 0.7% sia per IBR sia per BVD (un solo campione positivo su 139), mentre la prevalenza più elevata (4.5%) è stata riscontrata per borreliosi, con 5 campioni positivi, su 110 idonei all'immunofluorescenza. Alcuni sieri hanno mostrato titoli anticorpali rilevabili, seppure sotto la soglia di positività, per tutti gli esami effettuati eccetto che per afta. Le positività sierologiche per borreliosi appaiono positivamente correlate al peso e all'età degli animali (correlazione per ranghi di Spearman,  $p < 0.05$ ) e distribuite in maniera disomogenea nelle diverse riserve ( $\chi^2$ :  $p < 0.05$ ). Gli animali con titoli anticorpali rilevabili, seppure sotto soglia, per leptospirosi, mostrano una tendenza statisticamente significativa ad avere anticorpi per borrelia ( $\chi^2$ :  $p < 0.01$ ).

**Abstract** - Roe deer *Capreolus capreolus* serological monitoring in the "Altopiano di Asiago" (Northern Italy) area. A total of 139 sera collected in 1995-1996 from Roe deer hunted in 15 hunting reserves of the AULSS 3 area of Vicenza province have been examined. Serological tests were performed for foot and mouth disease, IBR and BVD using competitive ELISA (which do not require anti-deer specific antibodies). Serological tests were also performed for Q-fever, using complement fixation test, for leptospirosis, using microagglutination test and for Lyme disease, using immunofluorescent test. As cut-off values were not available in literature for Roe deer, the ones applied to domestic ruminants have been used. No sera resulted positive for foot and mouth disease, leptospirosis and Q-fever. Antibody prevalence was 0.7% both for IBR and for BVD (1 sample out of 139), while Lyme disease showed the highest prevalence (4.5%) with 5 positive samples out of 110. Some sera have shown detectable antibodies, even though these were under cut-off values for all diseases except for foot and mouth disease. Lyme disease serological titres appear to be positively correlated with animal age and body weight (Spearman rank correlation,  $p < 0.05$ ) and unequally distributed in the 15 hunting reserves ( $\chi^2$ :  $p < 0.05$ ). Roe deer with detectable, although under cut-off, anti-leptospira titres have, more frequently than expected, antibodies against Lyme disease ( $\chi^2$ :  $p < 0.01$ ). In contrast to the high occurrence of this infectious disease in domestic dogs from the same area.

J. Mt. Ecol., 7 (Suppl.): 269- 273

## 1. Introduzione

Che gli ungulati selvatici possano svolgere un ruolo rilevante nell'epidemiologia di alcune infezioni comuni ai domestici ed all'uomo è oramai ampiamente riconosciuto, così come che i ruminanti domestici, al pascolo, possano rappresentare un fattore di rischio sanitario per le popolazioni di fauna selvatica. Malgrado questa consapevolezza, i dati relativi alla reale circolazione di microparassiti nelle popolazioni di animali selvatici sono piuttosto scarsi e frammentari, anche per la difficoltà e la mancanza di criteri chiaramente e tradizionalmente definiti in ambito di ecopatologia. E' stata quindi

organizzata una indagine sierologica nel Capriolo per la ricerca di anticorpi contro alcuni agenti eziologici responsabili di patologie tipiche dei domestici, tra cui alcune zoonosi. In particolare la ricerca di anticorpi contro febbre Q è stata effettuata in quanto nel 1993, proprio in provincia di Vicenza, si è avuto un focolaio umano di febbre Q causato dal passaggio di greggi transumanti positive (Manfredi Selvaggi *et al.*, 1996).

## 2. Metodi

I sieri sono stati raccolti durante la stagione venatoria 1995-'96 nell'ambito di un piano di



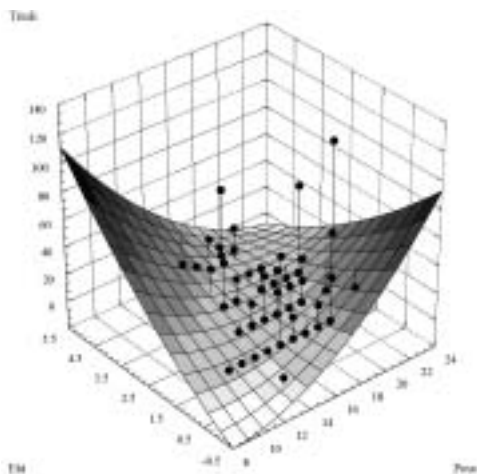


Fig. 2 - Distribuzione dei titoli anticorpali per borreliosi in relazione al peso ed all'età dei caprioli. La superficie interpola i dati con una funzione polinomiale di secondo ordine.

titoli anticorpali rilevabili, seppure sotto soglia, per *Leptospira*, e le sieropositività per *Borrelia*, sia considerando i sieri sotto soglia come negativi (tabella 2x2) sia considerandoli separatamente (tabella 3x2) (Tab. 2). La distribuzione dei caprioli esaminati per classi di età è rappresentata in Fig. 3.

### 3. Discussione

#### 3.1. Tecniche utilizzate

La ricerca di anticorpi in specie non convenzionali, quali in particolare i cervidi, presenta alcuni problemi di ordine tecnico e interpreta-

tivo dovuti, in parte, alla mancanza di sieri di controllo positivi e negativi con cui confermare la validità dei test. L'applicazione di metodiche ELISA di tipo competitivo se da un lato offre il grosso vantaggio di non dovere ricorrere ad anticorpi marcati anti-specie, dall'altro pone il problema se gli anticorpi prodotti dal Capriolo competano effettivamente con quelli utilizzati nella prova ELISA. In linea teorica essendo questi ultimi di origine cunicola (afta) o murina (IBR-BVD), è possibile che vadano a legarsi su epitopi non riconosciuti come tali dal sistema immunitario del Capriolo. In tale caso la sensibilità della prova ELISA sarebbe talmente bassa da pregiudicarne l'utilizzo. Tale rischio va particolarmente considerato per prove ELISA nelle quali l'anticorpo competitivo è monoclonale (IBR-BVD), e quindi si lega su uno specifico epitopo, mentre è meno probabile per reazioni ELISA (afta) basate su anticorpi policlonali.

Comunque, pur in assenza di dati ottenuti su cervidi sperimentalmente immunizzati, è ragionevole ritenere che, per almeno due delle tre prove ELISA utilizzate (afta e BVD), l'evenienza di una non competizione sia poco verosimile. Infatti l'ELISA utilizzata per l'afta evidenzia agevolmente anticorpi di un ampio spettro di specie recettive, quali Bovino, Bufalo, Suino, piccoli ruminanti. L'ELISA BVD è indirizzata verso una proteina, la p80-120, espressa da tutti i pestivirus e la cui struttura antigenica è altamente conservata tra essi. I dati disponibili per l'ELISA IBR gE sono meno indicativi, tuttavia tale reazione risulta nettamente positiva in capre infettate da *Herpesvirus* della capra, anti-

Tab. 1 - Risultati degli esami sierologici.

	positivi	prevalenza	dubbi/sotto soglia	negativi	non adatti	totale esaminati
Afta	0	0%	0	139	0	139
IBR	1	0.7%	1	137	0	139
BVD	1	0.7%	3	135	0	139
Febbre Q	0	0%	2	136	1	138
Leptospirosi	0	0%	10	129	0	139
Borreliosi	5	4.5%	28	77	29	110

Tab. 2 - Tabella di contingenza: risultati dei test per leptospirosi e borreliosi.

	<i>Leptospira</i> negativi	<i>Leptospira</i> sotto soglia	totale
<i>Borrelia</i> negativi	74	3	77
<i>Borrelia</i> sotto soglia	24	4	28
<i>Borrelia</i> positivi	2	3	5
totale	100	10	110

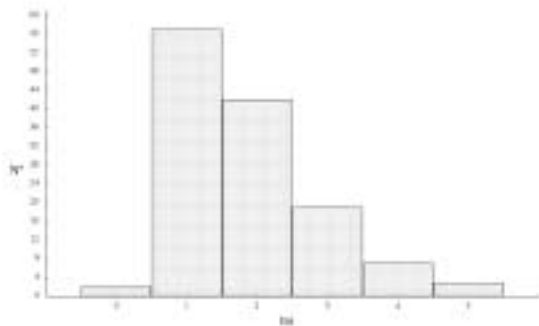


Fig. 3 - Distribuzione dei caprioli esaminati per classi di età.

genicamente imparentato con IBR. Piuttosto, è da considerare come vi siano numerosi *Herpesvirus* correlati antigenicamente al BHV-1, responsabile dell'IBR (Lyaku et al., 1992) tra cui uno tipico dei cervidi. Analogamente vi sono numerosi pestivirus correlati antigenicamente col BVDV, tra cui un pestivirus del cervo, (Paton, 1995) e uno isolato nel Capriolo (Frölich & Hofmann 1995). Ciò infatti fa sorgere il problema se gli anticorpi eventualmente rilevati nel Capriolo siano prodotti in seguito a infezioni con virus tipici di specie selvatiche o con virus tipici dei domestici, ed in quest'ultimo caso, quali.

Per quanto riguarda le metodiche sierologiche non-ELISA utilizzate, si può affermare con sufficiente tranquillità che non vi siano problemi di specificità di risposta verso particolari siti antigenici. Infatti per tutte e tre le prove viene utilizzato come antigene un derivato batterico bruto (febbre Q) o addirittura l'intero batterio, vivo (*Leptospira*) o fissato (*Borrelia*). Persistono comunque numerosi interrogativi. Ad esempio, persiste il dubbio che i caprioli producano anticorpi fissanti il complemento in risposta all'eventuale infezione da *Coxiella burnetii* e che l'uso di anticorpi coniugati anti-capra per la ricerca di anticorpi contro *Borrelia burgdorferi*, per quanto precedentemente testato (la presenza di sieri positivi, tra l'altro, conferma la sua utilizzabilità nel Capriolo) possa avere determinato comunque un abbassamento della sensibilità del test.

### 3.2. Epidemiologia

Per quanto riguarda l'afta, la negatività di tutti i sieri era prevedibile sulla base della assenza di questa infezione nei domestici e della sua elevatissima infettività. Il dato comunque conferma l'assenza di circolazione di questo virus in popolazioni di ungulati selvatici. La loro pre-

senza sul territorio, essendo animali recettivi, dovrà essere considerata in caso di focolaio nei domestici, ma non rappresenta, in quanto tale, un fattore di rischio per i domestici stessi.

Interessante è la presenza di un solo animale positivo per BVD e di uno solo per IBR. Sembrerebbe che né questi virus né virus ad essi correlati circolino tra gli ungulati presenti nell'ambito selvatico considerato. Ciò è particolarmente vero per l'IBR, virus respiratorio altamente diffusibile, per il quale non sono quindi ipotizzabili prevalenze così scarse. Lo stesso virus, tra l'altro, è poco presente negli allevamenti bovini di piccole dimensioni del Veneto (CREV, dati non pubblicati), gli unici che possono avere contatti, tramite il pascolo, con ungulati selvatici. E' quindi molto probabile che il campione positivo sia in realtà un falso positivo. La diffusione più lenta dell'infezione da BVD nei ruminanti domestici e la sua presenza anche in bovini all'alpeggio (mancano però dati relativi alla AULSS considerata) rende più problematica l'interpretazione dei risultati riguardanti questa infezione. Tra l'altro, in alcune fasi o tipi di infezione, gli animali possono essere sieronegativi (immunotolleranti; fase iniziale dell'infezione acuta). Ciò è stato osservato anche nel Capriolo, nel quale due pestivirus correlati al BVD sono stati isolati da animali sieronegativi (Frölich & Hofmann, 1995). Anche se abbastanza improbabile, non sembra dunque possibile escludere totalmente la circolazione di pestivirus nella popolazione di Capriolo. Un'attiva trasmissione tra bovino e Capriolo sembra comunque altamente improbabile, se non in maniera sporadica. Quanto osservato sarebbe in accordo con Frölich (1995) che non ha rilevato differenze di sieroprevalenze per BVD in cervidi che provenivano da zone con diverse densità di Bovini.

I risultati del monitoraggio suggeriscono che *Leptospira interrogans* non circoli all'interno della popolazione di Capriolo esaminata. In Italia anche altri autori hanno rilevato l'assenza di sieropositivi in diversi ungulati selvatici (Gennero et al., 1993). Non è chiaro se ciò accada per l'assenza di leptospirosi nell'area in esame o per la mancanza di legami eco-epidemiologici tra roditori e Capriolo. In Veneto la sieroprevalenza sembra estremamente bassa anche nei ruminanti domestici (IZS delle Venezie, Relazione tecnica 1996). I titoli sotto soglia per leptospirosi sono statisticamente correlati alla presenza di titoli rilevabili per borreliosi, probabilmente in relazione al fatto che entrambi questi agenti eziologici sono spiroche-

te, malgrado le scarse affinità genetiche tra le due (Hyde & Johnson, 1984). Poiché nessuno dei sieri esaminati è risultato positivo per leptospirosi, la specificità della microagglutinazione per la diagnosi di infezione da *Leptospira* appare comunque confermata anche nel Capriolo.

Vista la negatività per febbre Q di tutti i sieri esaminati non sembra essersi verificato il possibile rischio di trasmissione dell'infezione da *Coxiella burnetii* dalle greggi in transito nella provincia di Vicenza alle popolazioni di Capriolo presenti sul territorio. Dopo il focolaio umano del 1993, un monitoraggio sierologico triennale sulle greggi ha evidenziato che neanche la popolazione di pecore presenti sul territorio è stata in grado di mantenere l'infezione (Manca et al., 1998). E' possibile pertanto che nella zona non vi siano le condizioni ecologiche necessarie al mantenimento del ciclo di questa infezione. Solo la borreliosi, infezione tipicamente silvestre, sembra circolare in questa popolazione. Le differenze di prevalenza tra le diverse riserve di provenienza confermano la tendenza di questa infezione alla diffusione a macchia di leopardo, probabilmente in relazione a particolari situazioni ecologiche che permettano l'estrinsecarsi del ciclo, relativamente complesso, tra zecche e roditori. La correlazione rilevata con l'età (e il peso) dei caprioli dimostrerebbe la stabile presenza della *Borrelia* nell'habitat del Capriolo, anche se la popolazione esaminata è piuttosto giovane, come si può vedere anche dall'età dei caprioli abbattuti ed esaminati (Fig. 3).

#### 4. Conclusioni

Malgrado la popolazione di Capriolo dell'AULSS 3 sia piuttosto consistente, la circolazione dei microparassiti presi in esame appare estremamente scarsa, ad esclusione della borreliosi, infezione tipicamente silvestre. Tale osservazione potrebbe essere dovuta a:

*i.* assenza di tali infezioni nei domestici (questo è sicuramente il caso dell'afta e probabilmente di IBR); *ii.* scarsa recettività del Capriolo alle infezioni del Bovino prese in considerazione in questo lavoro; *iii.* mancanza di un'interfaccia eco-epidemiologica sufficiente alla trasmissione delle infezioni tra animali domestici e Capriolo.

#### 5. Ringraziamenti

Un grazie particolare ad Antonia Ricci per la revisione del testo e la consulenza linguistica, a Marta Pasotto per la collaborazione impagabile nella fase organizzativa e a Licia Ravarotto per l'aiuto lucido e disinteressato offerto durante la rifinitura del lavoro.

#### Bibliografia

- A. A. V. V. (1982) - *Guidelines for the control of Leptospirosis*. WHO.
- A. A. V. V. (1992) - *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. O.I.E., Parigi.
- FRÖLICH K. & HOFMANN M. (1995) - Isolation of Bovine Viral Diarrhea Virus-like Pestiviruses from Roe deer (*Capreolus capreolus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 31: 243-246.
- GENNERO M. S., MENEGUZZI P. G., MANDOLA M. L., MASOERO L., DE MENEGHI D. & ROSSI L. (1993) - Indagini sierologiche su ruminanti selvatici in Piemonte. *Atti S.I.S.Vet.*, 47: 979-983.
- HAMBLIN C., BARNETT J. T. R. & HEDGER R. S. (1986) - A new enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of ELISA. *Journal of Immunological Methods*, 93: 115-121.
- HYDE F. W. & JOHNSON R. C. (1984) - Genetic relationship of Lyme disease spirochetes to *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 20: 151-154.
- LYAKU J. R. S., NETTLETON P. F. & MARDSEN H. (1992) - A comparison of serological relationships among five ruminant alphaherpesviruses by ELISA. *Archives of Virology*, 124: 333-341.
- MANCA G., MARTINI M., DALLA POZZA M., TURILLI C. & MARANGON S. (In stampa) - Q fever in the sheep population of northern Italy: a serological survey. *Proceeding of the Annual Conference of Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine. Ennis (Ireland) 25-27 March 1998*.
- MANFREDI SELVAGGI T., REZZA G., SCAGNELLI M., RIGOLI R., RASSU M., DE LALLA F., PELLIZZER G. P., TRAMARIN A., BETTINI C., ZAMPIERI L., BELLONI M., DALLA POZZA E., MARANGON S., MARCHIORETTO N., TOGNI G., GIACOBBO M., TODESCATO A. & BINKIN N. (1996) - Investigation of a Q-fever outbreak in Northern Italy. *European Journal of Epidemiology*, 12: 403-408.
- PATON D. J. (1995) - Pestivirus diversity. *J. COMP. PATH.*, 112: 215-236.
- SIEGEL S. (1980) - *Statistica non parametrica*. Organizzazioni speciali, Firenze.