



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Corso di laurea specialistica in Medicina Veterinaria

DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA, PATOLOGIA COMPARATA E
IGIENE VETERINARIA

TESI DI LAUREA

INDAGINE SULL'INFEZIONE DA VIRUS DEL CIMURRO E DA *TOXOPLASMA GONDII* IN VOLPI CACCiate IN VALLE D'AOSTA

Relatore: Dott. Marco Martini

Correlatrici: Dott.ssa Federica Marcer

Dott.ssa Serena Robetto

Laureanda: Anna Paterlini

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

INDICE

INTRODUZIONE	3
1. BIOLOGIA DELLA VOLPE	5
1.1 Classificazione	5
1.2 Morfologia	7
1.3 Identificazione	7
1.4 Habitat	8
1.5 Attività e alimentazione	9
1.6 Organizzazione sociale	10
1.7 Riproduzione	10
1.8 Vita media e cause di mortalità	12
2. IL CIMURRO	13
2.1 I <i>Morbillivirus</i>	13
2.2 Eziologia	15
2.3 Epidemiologia	18
2.4 Patogenesi	19
2.5 Quadri clinici	20
2.6 Lesioni anatomo-patologiche	24
2.7 Diagnosi	26
2.8 Diagnosi differenziale	29
2.9 Terapia	30
2.10 Profilassi	31
2.11 Salute pubblica	34
2.12 <i>Canine Distemper Virus</i> nella Volpe (<i>Vulpes vulpes</i>)	35
3. LA TOXOPLASMOSI	41
3.1 I Protozoi	42
3.2 Eziologia	43
3.3 Ciclo biologico	44
3.4 Ruolo del gatto	48
3.5 Trasmissione all'uomo	49
3.6 Quadri clinici	51
3.7 Lesioni anatomo-patologiche negli animali domestici (cane e gatto)	52
3.8 Diagnosi	53
3.9 Terapia	55
3.10 Profilassi	56
3.11 Legislazione	57
3.12 <i>Toxoplasma gondii</i> nella Volpe (<i>Vulpes vulpes</i>)	58
4. MATERIALI E METODI	65
4.1 Campionamento	65
4.2 Analisi molecolare per la ricerca di CDV	66
4.3 Analisi molecolare per la ricerca di <i>Toxoplasma gondii</i>	68

5. RISULTATI	71
5.1 Luogo di prelievo delle volpi	71
5.2 Autopsie	81
5.3 Ricerca di CDV	86
5.4 Ricerca di <i>T. gondii</i>	95
6. DISCUSSIONE E CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	97

INTRODUZIONE

La volpe (*Vulpes vulpes*) è uno dei carnivori selvatici più diffusi nella nostra penisola e nel resto dell'Europa.

Avendo a disposizione volpi cacciate in un'area ristretta come quella della Valle d'Aosta, si è deciso di ricercare due patogeni, mai ricercati finora in quest'area, che possono colpire la volpe e che sono entrambi importanti, seppur per aspetti diversi.

Il cimurro è una malattia virale che colpisce tutti i canidi ed altri mammiferi. Normalmente i cani domestici vengono vaccinati, la crescente urbanizzazione degli ambienti rurali e la capacità della volpe di avvicinarsi ai paesi alla ricerca di cibo aumentano il rischio della trasmissione del virus ai cani randagi o non vaccinati.

La toxoplasmosi è tra le malattie parassitarie più diffuse nel mondo e rappresenta un problema di sanità pubblica, in quanto può colpire tutti gli animali a sangue caldo, compreso l'uomo. La volpe, come altri mammiferi selvatici, può svolgere il ruolo di serbatoio di questa infezione in ambiente silvestre.

1. BIOLOGIA DELLA VOLPE

1.1 Classificazione

Classe: *Mammalia*

Ordine: *Carnivora*

Famiglia: *Canidae*

Genere: *Vulpes*

Specie: "volpi rosse"

Vulpes vulpes (Linneo 1758)

Vulpes canus

Vulpes bengalensis

Vulpes ferilatus

"volpi africane"

Vulpes chama

Vulpes ruppel

Vulpes pallidus

"volpi pigmee nordamericane"

Vulpes velox

Vulpes macrotis

Il genere *Vulpes* viene definito un genere complesso dal punto di vista tassonomico sia perché è difficile distinguerlo da altri generi appartenenti alla famiglia dei Canidi, sia perché composto da un numero variabile di specie, a seconda dell'autore consultato: 13 specie secondo Prigioni *et al.* (2001), 9 specie e 48 sottospecie secondo Boitani (1981), circa 80 specie e sottospecie difficilmente identificabili con sicurezza secondo Scortecci (1966). La distribuzione geografica di questo genere è vastissima: Europa, Nord America, gran parte dell'Asia e Africa settentrionale fino al Sudan orientale.

Si riescono a riconoscere delle caratteristiche generali tra tutte le volpi appartenenti al genere *Vulpes*: hanno la testa piccola con il muso allungato e appuntito; la dentatura è forte e tagliente; il tronco è lungo, sottile e molto snello con una coda slanciata. Tutto il corpo è ricoperto da una folta pelliccia. Il tronco e il capo misurano circa 1 mt, la coda 50 cm, e l'altezza al garrese è 35 cm (Scortecci, 1966).

Poiché le volpi prese in considerazione per questa tesi appartengono tutte alla specie *Vulpes vulpes* d'ora in avanti parlerò solo di tale specie utilizzando il termine generico "volpe".

In Italia si possono riconoscere 2 sottospecie di volpe: volpe comune crucigera, distribuita in tutto il continente (Scortecci, 1966), e volpe comune *ichnusae* detta volpe sarda, presente in Sardegna (Scortecci, 1966; Prigioni *et al.*, 2001), di taglia più piccola e con orecchie più corte rispetto alla sottospecie peninsulare. Secondo Boitani (1981) e Prigioni *et al.* (2001), invece, la volpe crucigera sarebbe solo una varietà di volpe distinta solo per il colore del mantello (presenta una striatura dorsale nera dalla testa alla coda che all'altezza delle spalle si incrocia perpendicolarmente con un'altra stria nera) e non una vera sottospecie. Un'altra varietà distinta da questi autori è la volpe argentata, selezionata in cattività e difficilmente visibile in natura.



Figura 1.1. Volpe rossa (*Vulpes vulpes*)

1.1 Morfologia

La volpe ha la testa larga, il muso lungo e affusolato, gli occhi obliqui, le orecchie larghe alla base e appuntite alla sommità. Il corpo è snello e flessuoso, esile ma robustissimo. Gli arti sono brevi, la coda è lunga (fino ad oltre un terzo del corpo) e folta (Boitani *et al.*, 2003).

La pelliccia è folta, morbida e soffice, e fa apparire l'animale più grosso di quanto non sia in realtà. Il mantello nelle parti superiori del corpo è rosso fulvo con qualche spolverata di bianco, nelle parti laterali grigiastro ed in quelle inferiori tendono al bianco; labbra e guance sono biancastre; la parte distale degli arti è nerastra; le orecchie sono fulve nella parte interna e alla base, più scure e nerastre nelle parti esterne e all'apice; la coda è uguale al dorso, tranne nella parte terminale dove assume una colorazione bianca (Scortecci, 1966; Prigioni *et al.*, 2001).

Il peso medio delle volpi è 7-8 kg.

La dentatura è tipica dei canidi: i canini sono fini e molto appuntiti, i ferini molto taglienti. Il numero totale di denti è 42: nell'adulto la formula dentaria dell'arcata superiore è 3142, dell'arcata inferiore è 3143.

1.2 Identificazione (Prigioni *et al.*, 2001)

Per identificare una volpe si può fare un'osservazione diretta, oppure riconoscere le tracce o le feci.

Distinguere una volpe tramite osservazione diretta non è difficile (se si esclude il tentativo di distinguere le varie specie tra loro).

Risulta più difficile invece riconoscere le tracce su fango e neve (possono essere confuse con un cane di piccola taglia): hanno una forma più allungata (> 6 cm di lunghezza negli esemplari più grandi), i segni delle unghie sono meno marcati, le due dita mediane sono avanzate e non divaricate. Quando la volpe va al passo le tracce non presentano un andamento rettilineo e quando va al trotto sono poste obliquamente rispetto alla direzione di marcia.

Le feci sono variabili per forma e dimensione (circa 5-10 cm); contenendo svariati tipologie d'alimenti emanano un odore sgradevole.

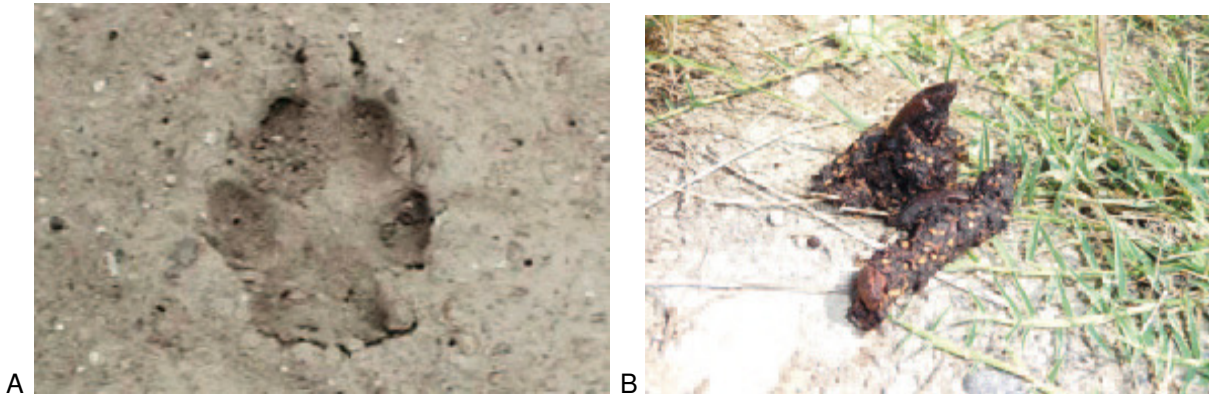


Figura 1.2
 A = Impronta di volpe B = Escrementi di volpe
 (Colombi *et al.*, 2009)

1.4 Habitat

La volpe nell'immaginario comune viene considerata un animale scaltro, astuto e persino maligno, in realtà non è più scaltra di altri carnivori della stessa taglia e nemmeno nociva. Rimane però un animale opportunisto sia nei confronti della ricerca di tane che di cibo. La sua capacità di adattamento alle diverse condizioni e a seconda delle stagioni è paragonabile solo a quella dell'uomo e del ratto.

L'ambiente tipico è quello del bosco, con gli alberi non fitti alternati a cespugli, ricco di prede di piccola taglia (roditori e uccelli). Grazie alla sua grande adattabilità riesce a vivere in ambiente montano, dove la vegetazione arborea è molto scarsa, in pianura, con vegetazione erbacea ed arborea abbondante, nelle zone molto popolate o al contrario scarsamente popolate.

La tana generalmente è molto lunga e profonda. Durante l'anno si trova alla base degli alberi tra le radici, sotto una macchia molto fitta o in altri posti dove difficilmente possono arrivare cani e uomini: raramente si riesce a trovare la tana, perché è molto abile nel trovare un luogo appartato (Scortecci, 1966). La volpe, inoltre, può utilizzare tane scavate da istrice e tassi, adattandole alle proprie esigenze.

Viene spesso segnalata nelle discariche a cielo aperto e nelle periferie urbane: le periferie urbane rappresentano delle zone protette per la volpe perché da un lato non vi può essere nessuna attività venatoria, e dall'altro offrono numerosi punti di ricovero (edifici abbandonati, tombini, etc) e di alimentazione (discariche e immondizia in generale) (Scortecci, 1966).

Non bisogna dimenticare che la volpe rappresenta un serbatoio naturale della rabbia silvestre e un possibile anello di congiunzione con la rabbia urbana, vista la sua capacità di avvicinarsi alle case e, quindi, ai gatti e cani domestici (Pilli e De Battisti, 1998). La volpe è inoltre un serbatoio epidemiologico di malattie comuni anche al cane come il cimurro.

1.5 Attività ed alimentazione

La volpe rimane nella tana durante il giorno ed esce al crepuscolo per cacciare. La caccia è l'attività principale della volpe, che percorre gran parte del suo territorio alla ricerca di cibo: durante questi spostamenti marca il territorio, controlla i punti di stoccaggio del cibo, si confronta con altri individui presenti nel territorio e in quelli confinanti. Cacciando più di quello che in realtà le serve, è in grado di nascondere piccoli bocconi nel terreno in punti diversi del territorio e di recuperarli poi a distanza di parecchi giorni individuandoli con sicurezza, senza confonderli con quelli di altri. Questa modalità di stoccaggio del cibo è detta *catching behaviour*.

Pur essendo un carnivoro, ha abitudini alimentari molto diverse e si ciba di tutto quanto sia commestibile; solo quando c'è cibo in abbondanza dimostra chiare preferenze (Prigioni e Tacchi, 1991). Viene considerata al vertice della piramide ecologica in ambienti dove raramente sono presenti predatori di grossa taglia, come il lupo (*Canis lupus*, Linneo 1758) o la lince (*Lynx lynx*, Linneo 1758).

Le prede principali sono roditori di media grandezza come lepri e conigli selvatici; se vengono a mancare caccia piccoli roditori (topi campagnoli). E' in grado di cacciare uccelli che nidificano o permangono a lungo a terra come pernici e otarde, e non avendo paura dell'acqua riesce a catturare anche anatre, oche e cigni. E' in grado di catturare alcuni pesci, ponendosi in agguato sulla riva del corso d'acqua e facendo uscire il pesce con un colpo di zampa. Grazie alla sua agilità, alla forza muscolare e alla potente dentatura, può cacciare giovani ruminanti dei boschi come piccoli daini, cerbiatti e caprioli (Scortecci, 1966).

Se viene a mancare il cibo riesce ad accontentarsi di insetti (cavallette, maggiolini, cervi volanti, scarabei rinoceronti), chioccioline, lumache, lombrichi, api e favi colmi di miele (Scortecci, 1966).

Alla carne alterna cibo vegetale: in particolare gradisce la frutta ben matura e dolce.

Se mancano animali vivi non ha problemi a cibarsi di carogne e avanzi di ogni genere (Boitani *et al.*, 2003).

Se ci sono abitazioni nelle vicinanze la volpe caccia nei pollai, nelle conigliere e nelle piccionaie. La ragione per cui viene odiata dai contadini è proprio perché uccide più di quello che in realtà le serve, prendendo pezzi di carne da un animale all' altro. Più si abitua alle prede domestiche più ci torna, riuscendo il più delle volte a sfuggire alle trappole poste dagli uomini (Scortecci, 1966).

Un ulteriore problema da non sottovalutare, come già accennato in precedenza, è la sempre più frequente urbanizzazione della volpe: più della metà del contenuto dello stomaco può provenire da resti di cibo gettati dall'uomo (Contesse *et al.*, 2004).

1.6 Organizzazione sociale

La volpe è essenzialmente un animale solitario ma in grado di creare dei legami temporanei con la formazione della coppia e l'allevamento della prole. Le volpi sono in genere monogame, ma alla coppia possono essere associati uno o più individui di sesso femminile. Le femmine di questo gruppo sono solitamente imparentate ma solo la femmina dominante si riproduce: le altre aiutano a nutrire e sorvegliare i cuccioli e, nel caso di morte della femmina dominante, la seconda in gerarchia le subentra (Prigioni *et al.*, 2001).

1.7 Riproduzione

La volpe è in grado di riprodursi sin dai 10 mesi d'età (Prigioni *et al.*, 2001). Il periodo di fecondità è influenzato dal fotoperiodo.

La stagione degli amori comincia verso la fine dell'inverno: il maschio (che emana un odore molto forte) corteggia la femmina anche per 6 settimane e lotta contro altri maschi con furia, mordendosi e ferendosi a volte anche gravemente. Durante l'accoppiamento sia il maschio che la femmina stridono e urlano (Prigioni *et al.*, 2001).

La femmina quando rimane gravida sceglie una tana diversa dal normale, più sicura: è formata generalmente da vari tunnel che sboccano in superficie con più aperture.

La riveste con peli della propria pelliccia (che sta mutando avvicinandosi la primavera). La tana è riconoscibile per la presenza di un odore persistente di volpe, di resti alimentari e di feci nelle immediate vicinanze (Scortecci, 1966).

La gestazione dura 52-53 giorni e la femmina partorisce da 3 a 8 cuccioli (Prigioni *et al.*, 2001).

La nascita avviene tra aprile e maggio. I cuccioli nascono inetti e goffi, con un manto corto e brunastro. Nei primi giorni dopo il parto è il maschio che caccia mentre la femmina rimane nella tana (Scortecci, 1966).

I cuccioli aprono gli occhi dopo circa 14 giorni. Dopo un mese e mezzo cominciano ad uscire dalla tana sotto la supervisione dei genitori e assaggiano le prime prede che i genitori pongono loro (piccoli uccelli, pesci e altre prede). Lo svezzamento è completo dopo 8-10 settimane e quando arriva l'estate cominciano a cacciare da soli. Solo in autunno si allontanano definitivamente dalla tana e dai genitori: i maschi si muovono prima delle femmine, ma non prima di ottobre. In genere gli spostamenti hanno termine entro gennaio (Scortecci, 1966).

Circa i 2/3 delle volpi in dispersione non si sposta di oltre 10 km, mentre un terzo raggiunge i 50 km (solo un numero esiguo raggiunge i 100-150 km). Le volpi che si disperdono cercano un nuovo *home range* in aree non ancora colonizzate o a discapito di un altro soggetto vecchio che non riesce più ad imporre la propria territorialità. I soggetti costretti a vagare sono detti "itineranti" e sono importanti ai fini dell'epidemiologia delle malattie infettive e di quelle parassitarie (Boitani *et al.*, 2003).

1.8 Vita media e cause di mortalità

In natura circa il 90-97% della popolazione ha al massimo 3 anni di vita, solo poche volpi raggiungono i 4 anni e ancor meno i 5 anni.

I nemici delle volpi sono i grossi uccelli da preda e il lupo ma la causa di mortalità nel 90% dei casi rimane l'uomo, che le caccia perché le ritiene dannose o per il gusto di cacciare (Pilli e De Battisti, 1998; Scortecci, 1966). Molte volpi muoiono anche a causa di incidenti stradali.

Le malattie che possono determinarne la morte sono varie, tra le quali la rogna sarcotica e la rabbia (dove presente).

Rapportando il tasso di natalità con quello di mortalità risulta un ricambio della popolazione ogni anno di circa il 65-70%: la crescita della popolazione delle volpi viene limitata dalle risorse ambientali, dalle malattie e dai fattori sociali (Boitani *et al.*, 2003).

Quando l'uomo tenta di ridurre il numero di volpi nel territorio quasi sempre i fattori naturali appena descritti permettono alla volpe di avere capacità di recupero eccezionali: variano in pochissimo tempo i tassi di natalità, mortalità, fecondità, sopravvivenza, le strutture sociali dei gruppi e le dimensioni del territorio, in modo da annullare l'effetto dell'uomo nel giro di 2-3 anni. Per questo motivo è necessario che ogni intervento venga correttamente pianificato e preceduto da un'adeguata ricerca di base.

In cattività, invece, una volpe vive in media 10 anni, arrivando anche a 15 anni (Boitani *et al.*, 2003).

2. IL CIMURRO

Il cimurro è una malattia contagiosa sostenuta da un virus ad RNA, *Canine Distemper Virus* (CDV), che può colpire molte specie di carnivori domestici e selvatici e che è capace di determinare infezione a carico di tutti i tessuti dell'organismo (Farina e Scatozza, 1998).

Viene definito anche malattia di Carré dal nome dello scienziato che nel 1905 scoprì che si trattava di una malattia sostenuta da un virus (Williams, 2001).

Nonostante sia conosciuto da più di 200 anni risulta essere ancora una delle malattie più significative circolanti assieme alla rabbia, diffusa in quasi tutto il mondo.

Due degli ospiti principali sono il cane (*Canis familiaris*) e il visone (*Mustela vison*) perciò le ricerche sulla biologia, sulla patogenesi e sulla profilassi di questo virus sono state molto approfondite, sia per motivi affettivi sia per motivi economici (Williams, 2001).

2.1 I Morbillivirus

I *morbillivirus* sono dei virus che causano patologie altamente infettive in molte specie animali.

Farina e Scatozza nel 1998 classificavano all'interno di questo genere 4 specie: cimurro, peste bovina, peste dei piccoli ruminanti e morbillo umano. Tuttavia alcune indagini sierologiche eseguite su pinnipedi e cetacei già dimostravano che i *morbillivirus* circolavano attivamente tra i mammiferi acquatici.

Nell'ultimo decennio è stata confermata la loro presenza tra i mammiferi acquatici con l'individuazione di nuove specie (cimurro delle foche e *morbillivirus* dei cetacei) e la scoperta che anche il cimurro del cane può colpire le foche. La classificazione dei *morbillivirus*, quindi, non può essere ancora considerata del tutto conclusa in quanto le indagini sui mammiferi acquatici sono tutt'ora in svolgimento.

Esistono poi 3 virus che inizialmente erano stati inseriti nel genere *morbillivirus*, ma che in realtà appartengono a generi diversi:

- Genere *Henipavirus*: comprende l' Hendra virus (EMV, detto anche *morbillivirus* degli equini) e il Nipah virus (NiV) (<http://en.wikipedia.org/wiki/Henipavirus>)

- Genere *Rubulavirus*: comprende il Menangle virus (MenV detto anche *morbillivirus* dei suini)

(http://www.scahls.org.au/data/assets/pdf_file/0006/1280841/menangle_virus.pdf)

(<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/menangle.pdf>)

Famiglia: *Paramyxoviridae*

Subfamiglia: *Paramyxovirinae*

Genere: *Morbillivirus*

Specie: cimurro canino: *Canine Distemper Virus* (CDV)

cimurro delle foche: *Phocine Distemper Virus* (PDV)

morbillivirus dei cetacei: *Cetacean Morbivirus* (CeMV)

- *morbillivirus* dei delfini: *Dolphin Morbillivirus* (DMV)

- *morbillivirus* delle focene: *Porpoise Morbillivirus* (PMV)

- *morbillivirus* dei globicefali: *Pilot Whale Morbillivirus* (PWMV)

peste dei piccoli ruminanti: *Peste-des-Petits-Ruminants Virus* (PPRV)

peste bovina: *Rinderpest Virus* (RPV)

morbillo: *Measles Virus* (MeV)

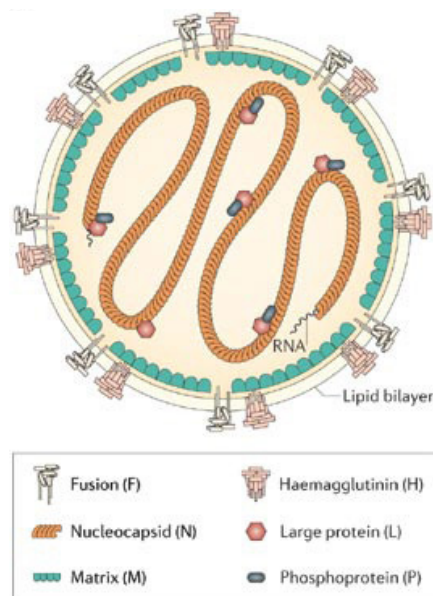


Figura 2.1. Schema del virus del morbillo (MeV)

http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n12/box/nrmicro1550_BX1.html

2.2 Eziologia

MORFOLOGIA

Il virus del cimurro è un virus ad RNA a singolo filamento negativo relativamente grande (100-700 nm) e con morfologia sferica o filamentosa. E' racchiuso da un nucleocapside a simmetria elicoidale di 5-8 nm di spessore e con un diametro tra i 150 e 250 nm, che contiene le proteine strutturali del virus N, P ed L (Greene e Appel, 2006). Esternamente viene circondato da envelope lipoproteico che deriva dalla membrana plasmatica delle cellule dell'ospite; internamente ci sono proteine di membrana (M) mentre all'esterno si trovano due glicoproteine di superficie, l'emoagglutinina (H) e la proteina di fusione (F) (Williams, 2001) che sono lunghe circa 8-13 nm (Farina e Scatozza, 1998).

Le analisi genetiche del frammento del gene P (388 pb) e della regione che codifica per la proteina H hanno permesso di differenziare il genotipo degli animali selvatici da quello vaccinale (Greene e Appel, 2006).

Il virus del cimurro fino ad ora analizzato è sierologicamente omogeneo, anche se esistono alcuni ceppi che differiscono per la loro patogenicità (Greene e Appel, 2006).

RESISTENZA

È un virus labile nell'ambiente, sensibile al calore, all'essiccazione e alla luce ultravioletta, mentre vive molto bene a basse temperature:

- distrutto tra i 50° e i 60° C per 30 minuti
- in porzioni di tessuti e secrezioni sopravvive almeno 1 ora a 37° C e 3 ore a 20° C
- sopravvive nell'ambiente per settimane tra 0° e 4° C
- stabile al di sotto dei 0° C
- resiste per almeno 7 anni a -65° C

Rimane attivo tra pH 4.5 e 9.0. E' sensibile all'etere, al cloroformio, alla formalina (<0.5%), al fenolo (0.75%) e ai sali quaternari di ammonio (0.3%). Nei canili, quindi, il virus non sopravvive a lungo se si trova in luoghi caldi, se si usano i comuni disinfettanti e se si isolano i cani infetti (Greene e Appel, 2006).

OSPITI

Lo spettro degli ospiti naturali è molto ampio: tutte le specie dell'ordine dei carnivori sono suscettibili.

FAMIGLIA	SPECIE
<i>Canidae</i>	cane, volpe, coyote, lupo, sciacallo, dingo
<i>Mustelidae</i>	furetto, visone, martora, puzzola, tasso, donnola, lontra, moffetta
<i>Procyonidae</i>	procione, coati, kinkajou
<i>Felidae</i>	ghepardo, gatto, leone, leopardo, tigre, giaguaro, ocelot, margay (gatto di Wied)
<i>Suidae</i>	pecari
<i>Hyenidae</i>	iena
<i>Viverridae</i>	binturong (gatto orsino), fossa, linsango, zibetto
<i>Herpestidae</i>	mangusta, suricate
<i>Ailuridae</i>	panda minore (panda rosso)
<i>Ursidae</i>	orso, panda gigante
<i>Phocidae</i>	foca

Tabella 2.1. Famiglie di ospiti suscettibili al CDV appartenenti all'ordine dei carnivori

Il principale ospite in ambiente domestico è il cane, il quale probabilmente funge da reservoir per gli animali selvatici così come gli animali selvatici possono essere una via di trasmissione del virus al cane (Greene e Appel, 2006). Vengono maggiormente colpiti i soggetti giovani, mentre gli adulti acquisiscono un'immunità naturale che li protegge dalla malattia (Farina e Scatozza, 1998).

Gli ursidi, nonostante siano suscettibili, sembra che raramente sviluppino la malattia (Williams, 2001). Marsilio *et al.* (1997) in Italia hanno riscontrato, tra il 1991 e il 1995, delle positività sierologiche in 15 orsi bruni Marsicani (*Ursus arctos*) (9 in libertà e in 6 in cattività) nel Parco Nazionale d'Abruzzo.

IL CIMURRO NEI MAMMIFERI MARINI

Esistono 4 specie di *morbillivirus*, correlati tra loro, che possono infettare mammiferi acquatici: il *Canine Distemper Virus* (CDV) può infettare le foche, il *Phocine Distemper Virus* (PDV) infetta le foche (foca di Harbour e foca grigia), il *Porpoise Morbillivirus* (PMV) infetta le balene e il *Dolphin Morbillivirus* (DMV) infetta i delfini.

Il PDV e alcuni ceppi selvatici di CDV hanno causato un'elevata mortalità nelle foche del lago Baikal (*Phoca sibirica*) nelle foche del mar Caspio (*Phoca caspica*), e la diffusione del virus probabilmente è partita dal cane o da altri carnivori terrestri suscettibili.

Il PMV e il DMV sono maggiormente correlati con i *morbillivirus* dei ruminanti (Greene e Appel, 2006).

2.3 Epidemiologia

La trasmissione del virus avviene generalmente mediante l'aerosol oppure tramite tutti i secreti e gli essudati (orali, respiratori e oculari). È fondamentale che ci sia un contatto stretto tra animale infetto e animale recettivo per far sì che avvenga l'infezione, proprio perché il virus nell'ambiente è molto labile. Il virus può essere escreto anche mediante la pelle, le feci e le urine ma questi sembrano essere dei veicoli non fondamentali per la diffusione dell'infezione (Williams, 2001). Nel cane è stata documentata anche la trasmissione transplacentare; negli animali selvatici può avvenire ma non sembra essere epidemiologicamente importante (Krakowka *et al.*, 1977).

L'escrezione del virus nell'ambiente avviene a partire da 7 giorni post-infezione e può durare fino a 70-90 giorni (anche se solitamente tale periodo è più breve, ed è importante sottolineare che l'escrezione del virus avviene anche se l'infezione è subclinica (Williams, 2001).

La diffusione del cimurro dipende dalla suscettibilità della specie ospite ma viene influenzata anche dalla densità di popolazione, dallo stress, dallo stato vaccinale, dagli stati immunosoppressivi e dall'esposizione ad elevate dosi virali. Una grande densità di popolazione, soprattutto di cuccioli, è necessaria per mantenere l'epidemia che viene agevolata anche dal comportamento che l'ospite infetto tiene nei confronti degli altri animali (Williams, 2001), mentre la vaccinazione, per poter essere protettiva, deve essere ripetuta periodicamente, altrimenti i cani tornano suscettibili al virus (Greene e Appel, 2006).

Nelle popolazioni canine con densità elevate la malattia diventa endemica e la sintomatologia si manifesta per lo più nei cuccioli dal momento in cui perdono l'immunità materna e avviene lo svezzamento (intorno ai 3-6 mesi). Nelle popolazioni isolate di cani, invece, la malattia determina un'epidemia con sintomi gravi a tutte le età (Greene e Appel, 2006). Osservare l'andamento della malattia nel cane può essere un aiuto per comprendere come si evolve il cimurro negli animali selvatici (Williams, 2001).

2.4 Patogenesi

Il virus penetra mediante l'aerosol attraverso le vie respiratorie, entro 24 ore moltiplica nei macrofagi e li utilizza come veicolo per diffondere alle tonsille e ai linfonodi bronchiali. A 2-4 giorni post infezione replica in questi siti e anche nei linfonodi retrofaringei.

Dopo circa una settimana, con l'instaurarsi della viremia, il virus può essere localizzato a livello sistemico nei tessuti linfatici, nella lamina propria dell'apparato digerente e nelle cellule di Kupffer nel fegato. La diffusione del virus coincide con il picco febbrile e il rilevamento di linfopenia B e T: il virus è in grado infatti di danneggiare le cellule linfoidee e dare quindi immunosoppressione (Williams, 2001). L'immunosoppressione cellulo-mediata nei cuccioli in convalescenza può persistere per più di 10 settimane; in quelli che riescono a sopravvivere all'infezione prenatale o neonatale permane un'immunodeficienza che può aggravare altre infezioni (ad esempio una gastroenterite da *Parvovirus*, tipica dei cuccioli con meno di 6 mesi) (Greene e Appel, 2006).

Dopo 8-9 giorni dall'infezione il virus riesce ad arrivare al tessuto epiteliale e cerebrale: questo evento corrisponde all'inizio dell'eliminazione attraverso tutti gli escreti corporei, anche se l'infezione è sub-clinica (Greene e Appel, 2006). Probabilmente questo momento negli animali selvatici non è evidenziabile clinicamente (Williams, 2001).

La capacità del virus di invadere il SNC è strettamente legata allo stato del sistema immunitario del cane. Penetra per via ematogena (in forma libera o legato alle piastrine e alle cellule mononucleate) nello spazio perivascolare delle meningi, nell'epitelio dei plessi corioidei del quarto ventricolo e nelle cellule ependimali che rivestono il sistema ventricolare. La diffusione nel liquido cefalorachidiano spiega perché si sviluppano precocemente lesioni, ad esempio, alla corteccia cerebrale, al tratto ottico ed al midollo spinale (Greene e Appel, 2006).

Dopo 7-14 giorni dall'infezione il sistema immunitario dell'animale reagisce e determina il manifestarsi dell'infezione (Williams, 2001):

- Se la risposta anticorpale è elevata e precoce non si sviluppano i sintomi e il virus viene completamente eliminato (si formano delle IgG specifiche contro CDV che riescono a neutralizzarlo); inoltre permette di prevenire un'ulteriore infezione (Greene e Appel, 2006; Williams, 2001).

- Se la risposta è intermedia la sintomatologia può essere blanda: dopo 3 settimane dall'infezione il virus viene comunque eliminato da quasi tutti i tessuti, ad eccezione forse del polmone, della pelle (anche nei cuscinetti plantari), del tessuto uveale e del SNC (Williams, 2001). Con la guarigione si instaura un'immunità a lungo termine e il virus non viene più escreto. La protezione però può essere compromessa se il cane viene esposto nuovamente ad un virus molto virulento o ad un'alta quantità di virus in un momento di immunodepressione o di stress (Greene e Appel, 2006).
- Se la risposta anticorpale è minima o nulla si sviluppa una sintomatologia molto grave a livello sistemico (pelle, ghiandole esocrine ed endocrine, epitelio gastro-intestinale, respiratorio e genito-urinario) con possibile morte dell'animale nel giro di 1-2 settimane. Il sopraggiungere di infezioni secondarie peggiora la gravità dei sintomi (Williams, 2001).

2.5 Quadri Clinici

La sintomatologia clinica può variare in base alla specie, all'età e all'immunità dell'ospite, al ceppo virale e alle condizioni ambientali (Greene e Appel, 2006).

Le variazioni dei parametri ematologici sono aspecifiche: è comune tuttavia una linfopenia assoluta (Williams, 2001).

CANIDI

Nei canidi i giovani sono i più suscettibili. Greene e Appel (2006) hanno stimato che tra il 25% e il 75% dei cani suscettibili sviluppano un'infezione subclinica ed eliminano il virus senza manifestarne i sintomi.

Dopo un breve periodo di incubazione (7-14 giorni) comincia la fase sintomatologica: picco febbrile, diminuzione dell'appetito, scolo oculo-nasale sieroso (che diventa muco purulento) e depressione del sensorio. In seguito si manifestano i sintomi a carico dell'apparato respiratorio e di quello digerente: tosse, dispnea (a causa di laringo-tracheite catarrale, polmonite e broncopolmonite), vomito e diarrea. La conseguenza principale è la disidratazione e l'emaciazione perché il cane perde molti liquidi e ne assume pochi. Questi sintomi generali possono svilupparsi in cani di tutte le età, ma sono più frequenti nei soggetti non vaccinati, nei cuccioli tra le 12 e le 16

settimane di vita che hanno perso l'immunità materna, o nei cuccioli più giovani che non hanno ricevuto un'adeguata quantità di anticorpi materni (Greene e Appel, 2006).

Infine si possono riscontrare anche lesioni a carico dell'apparato tegumentario: ipercheratosi dei cuscinetti plantari e del tartufo e dermatite vescicolo-pustolosa all'inguine e al piatto delle cosce (Farina e Scatozza, 1998). L'ipercheratosi è spesso associata a sintomi neurologici, mentre la dermatite raramente lo è, perciò viene considerata un fattore prognostico favorevole (Greene e Appel, 2006).

La durata dei sintomi può variare da 1 a 6 settimane e concludersi con la guarigione o con la morte dell'animale: la mortalità varia dal 30 all'80% (Williams, 2001). I cani che guariscono dopo un'infezione clinica o un'infezione che perdura a lungo hanno l'organismo molto debilitato (Williams, 2001). Nonostante molti cani riescano a guarire completamente, in alcuni di essi può persistere il virus nel SNC e dare quindi delle sequele neurologiche (Greene e Appel, 2006).

Quando il virus colpisce il SNC i sintomi possono variare a seconda della zona interessata e si manifestano solitamente entro 1-3 settimane dopo la guarigione, ma non c'è modo di sapere quale cane infetto svilupperà la sintomatologia. Le complicazioni neurologiche rappresentano quindi il principale fattore che fa variare la prognosi e la possibilità di guarigione. I sintomi sono generalmente progressivi, sia che insorgano in modo acuto o cronico e possono svilupparsi recidive con guarigioni intermittenti. I principali sintomi neurologici sono iperestesia, rigidità cervicale o paraspinale, convulsioni, segni cerebellari e vestibolari, paraparesi o tetraparesi con atassia e mioclonia, spasmi, movimenti in circolo, iperattività, alterazioni del comportamento, nistagmo. La mioclonia si può osservare mentre il cane è sveglio, ma è più comune quando dorme e può essere presente senza nessun altro segno neurologico. Se il midollo spinale è gravemente lesionato si può manifestare paresi da motoneurone superiore associata a mioclonia (Greene e Appel, 2006).

In caso di encefalomielite spesso si sviluppa un'uveite asintomatica. Il virus può lesionare anche il nervo ottico (dando cecità) e la retina (causandone degenerazione, necrosi e distacco): in seguito all'atrofia della retina nel fondo si formano delle lesioni circoscritte, iperreflettenti chiamate *gold medallion lesions* e che sono considerata caratteristiche di una precedente infezione da CDV (Greene e Appel, 2006).

Esiste una rara malattia infiammatoria cronica e progressiva che colpisce la sostanza grigia dell'emisfero cerebrale e del tronco encefalico chiamata ODE (*Old Dog Encephalitis*): sembra essere una conseguenza dell'infezione acuta di CDV nel SNC di animali immunocompetenti. Una forma simile è stata osservata nell'uomo affetto da panencefalite sclerosante subacuta (PESS), complicazione tardiva dell'infezione da virus del morbillo (Greene e Appel, 2006).

Esiste anche una forma simile di ODE chiamata polioencefalite da corpi inclusi, che si sviluppa dopo una vaccinazione o nei cani che manifestano improvvisamente solo i sintomi neurologici del cimurro. E' caratterizzata da necrosi multifocale della sostanza grigia, infiammazione perivascolare dei linfociti e inclusioni citoplasmatiche e intranucleari (Greene e Appel, 2006).

Una cagna che si infetta durante la gravidanza può manifestare un'infezione blanda o subclinica e può trasmettere il virus ai feti. L'infezione transplacentare, a seconda del momento della gravidanza in cui avviene, può determinare aborto, nascita di feti morti o cuccioli deboli che sviluppano sintomi neurologici nelle prime 4-6 settimane di vita. Nei cuccioli che riescono a superare l'infezione permane tuttavia uno stato di immunodepressione in quanto il virus ha leso lo sviluppo degli organi linfoidei (Greene e Appel, 2006).

Se i cuccioli si infettano prima dell'eruzione dei denti permanenti possono avere ipoplasia e irregolarità nello sviluppo dello smalto, della dentina o della radice. Se si riscontrano questi danni in un cane adulto può essere segno di una precedente infezione da cimurro (Greene e Appel, 2006).

Se i cuccioli si infettano durante la crescita si può sviluppare sclerosi metafisaria delle ossa lunghe (Greene e Appel, 2006).

Il decorso della malattia può variare in base all'instaurarsi di infezioni secondarie favorite dall'immunosoppressione creata dal virus (Farina e Scatozza, 1998). *Salmonella* spp. si riscontra comunemente e causa diarrea emorragica o sepsi; *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* causano miosite e radicoloneurite; *Pneumocystis carinii* causa polmonite (Greene e Appel, 2006).

ALTRE SPECIE

Nelle specie selvatiche i segni clinici, soprattutto all'inizio, possono non essere manifesti (Williams, 2001).

Nei procionidi i sintomi possono essere molto simili a quelli descritti nel cane, e spesso viene riportato un comportamento anormale. Se la malattia si prolunga molto si può vedere ipercheratosi dei cuscinetti plantari con marcati ispessimenti e profonde screpolature. Nel procione con infezione sperimentale la mortalità è tra il 50% e il 100% (Williams, 2001).

Nei mustelidi i primi segni clinici sono l'essudato oculo-nasale sieroso, la fotofobia, l'iperemia e l'ispessimento delle palpebre, delle labbra e dell'ano. In seguito si possono instaurare delle infezioni secondarie alla pelle che sfociano in un forte prurito, localizzato specialmente a livello della faccia. Altri possibili segni sono febbre, depressione, tosse, diarrea, disidratazione, anoressia, cambiamenti del comportamento e convulsioni. Nel visone adulto (*Mustela lutreola*) la mortalità è molto variabile (tra il 20 e il 90%), mentre nei cuccioli si aggira intorno al 90%. Nel furetto domestico (*Mustela putorius furo*) CDV è mortale nel 100% dei casi (Williams, 2001).

Ci sono alcune specie, come il furetto dai piedi neri (*Mustela nigripes*) e la volpe grigia (*Urocyon cinereoargenteus*), che sono così suscettibili che pochi o nessun individuo riesce a recuperare dopo la malattia (Williams, 2001).

Nel maiale l'infezione è subclinica ma nei pecari (*Tayassu tajacu*), mammiferi simili al cinghiale diffusi in America centro-meridionale, si sviluppa encefalite (Greene e Apple, 2006).

2.6 Lesioni anatomo-patologiche

LESIONI MACROSCOPICHE

Le lesioni possono non essere visibili o non rispecchiare i segni clinici, e purtroppo non ce ne sono di specifiche (Williams, 2001).

Quando l'infezione viene trasmessa durante la gravidanza, o subito dopo la nascita, il cucciolo manifesta per lo più atrofia del timo (Greene e Appel, 2006).

Se l'infezione diventa generalizzata si riscontrano infiammazione dell'apparato respiratorio (soprattutto polmonite) con scolo oculo-nasale, e diarrea dovuta ad enterite catarrale. L'organismo è generalmente debilitato (Williams, 2001). Un altro reperto che può essere significativo, ma che è meno frequente, è lo sviluppo irregolare dei denti.

Nel cane con infezione del SNC si può osservare ipercheratosi del tartufo e dei cuscinetti plantari, mentre è difficile riscontrare delle lesioni evidenti direttamente nella materia cerebrale. Reperti occasionali possono essere congestione delle meningi, dilatazione dei ventricoli e aumento della pressione del liquido cefalorachidiano a causa dell'edema (Greene e Appel, 2006).

LESIONI ISTOLOGICHE

Lesioni comuni sono deplezione linfoide e atrofia del timo, polmonite interstiziale e, nel caso di infezioni secondarie, broncopolmonite purulenta (Williams, 2001). Se si instaura una polmonite interstiziale diffusa i setti alveolari sono ispessiti e si trovano cellule epiteliali desquamate e macrofagi all'interno degli alveoli (Greene e Appel, 2006).

Corpi inclusi si possono riscontrare in numerosi tessuti dell'organismo ma bisogna evitare di fare diagnosi di cimurro basandosi solo sulla loro presenza. Infatti, non solo sono aspecifici, ma appaiono tardi per essere d'aiuto nella clinica. Nelle cellule epiteliali delle membrane mucose, nei leucociti, nelle cellule della glia e nei neuroni si possono trovare corpi inclusi citoplasmatici di diametro 1-5 μm . I corpi inclusi intranucleari sono invece più comuni nell'epitelio di rivestimento o ghiandolare e nelle cellule gangliari. Inclusi citoplasmatici possono essere anche trovati nell'epitelio di transizione dell'apparato urinario circa 5-6 settimane dopo l'infezione e nel sistema linfoide (Greene e Appel, 2006). Altri siti di formazione dei corpi inclusi sono la mucosa gastrica, gli enterociti, l'epitelio pancreatico e dei dotti biliari (Williams, 2001).

Nei cuccioli si riscontra spesso degenerazione cistica dell'epitelio ameloblastico che porta ai difetti di sviluppo dello smalto dentale. Se si instaura un'encefalite neonatale fatale si possono osservare degenerazione neuronale e mielinica o demielinizzazione primaria, senza infiammazione perivascolare. Negli animali che sopravvivono le aree di necrosi sono sostituite da astrociti ipertrofici. Le aree della sostanza bianca che subiscono maggiori danni si trovano nei peduncoli cerebellari laterali, nel midollo dorso-laterale adiacente al quarto ventricolo e nel cervelletto. Si possono riscontrare lesioni anche a carico della corteccia cerebrale, del mesencefalo e dei nuclei della base. In alcuni cani si sviluppa una polioencefalomielite non infiammatoria che colpisce principalmente il cervello (con demielinizzazione, vacuolizzazione e gliosi della sostanza bianca) e il talamo. Corpi inclusi intracitoplasmatici o intranucleari si trovano principalmente negli astrociti e nei neuroni (Greene e Appel, 2006).

Nei cani adulti o con un sistema immunitario più forte si può sviluppare una leucoencefalomielite con lesioni localizzate principalmente nel tronco encefalico e nel midollo spinale (cl clinicamente manifeste con atassia e problemi vestibolari), che possono essere più diffuse e gravi rispetto alle lesioni causate da una encefalite acuta (Greene e Appel, 2006).

Un altro tipo di lesione che si può osservare è una lieve orchite ed epididimite: ecco perché si può riscontrare riduzione temporanea della spermatogenesi, del fluido prostatico e del testosterone. Questo tipo di lesione è stato riportato anche nei procioni (Greene e Appel, 2006).

Quando si riscontrano cellule giganti nella sostanza bianca del SNC e nella parte anteriore dell'uvea (secondariamente anche nei linfonodi, nei polmoni e nelle leptomeningi) bisogna metterle in diagnosi differenziale con i *Paramyxovirus* (Greene e Appel, 2006).

Lesioni alla retina di tipo degenerative, necrotizzanti, cicatriziali e atrofiche possono essere riscontrate anche negli animali selvatici (Williams, 2001).

2.7 Diagnosi

La diagnosi può essere inizialmente sospettata valutando i sintomi clinici, l'età (3-6 mesi) e la mancanza di vaccinazione. Quando il cane è adulto, invece, può non essere così semplice sospettare cimurro, anche perché i sintomi respiratori sono spesso confusi con tracheobronchiti di altra natura. (Greene e Appel, 2006). Quando si notano comportamenti alterati, come ad esempio attività diurna in animali notturni e aggressività si può sospettare il cimurro con localizzazione neurologica (Williams, 2001).

Alcuni animali, affetti da CDV, manifestano solo pochi e blandi sintomi e dalle analisi del sangue si riscontra solo una linfopenia assoluta (causata da deplezione linfoide): così per confermare la diagnosi è necessario osservare le lesioni ed eseguire degli esami collaterali (Williams, 2001).

I tessuti che contengono elevate quantità di virus (in caso di infezione generalizzata) e che dovrebbero essere prelevati quindi dopo la morte sono: milza, tonsille, linfonodi, stomaco, polmone, duodeno, vescica, fegato, pancreas e cervello (Greene e Appel, 2006). Nei cuccioli si osserva atrofia del timo (Williams, 2001).

Diretta: permette di evidenziare il virus o suoi componenti.

- ISTOLOGIA E CITOLOGIA

La diagnosi viene fatta attraverso l'esame istologico che permette di trovare i corpi inclusi nell'epitelio, nel tessuto linfoide e nel cervello. Mediante microscopio elettronico si possono evidenziare i virioni.

Strisci utili per la ricerca di corpi inclusi possono essere eseguiti dalla congiuntiva o da tamponi vaginali, congiuntivali, tonsillari, cellule del liquido cefalorachidiano, linfonodi, epitelio vescicale, cervelletto (Williams, 2001).

- IMMUNOFLUORESCENZA

Le tecniche di immunoistochimica sono ampiamente usate. L'immunofluorescenza può essere eseguita su sezioni congelate di campioni biotici e autotici, ma anche su sezioni di tessuti in paraffina se fissati in modo specifico. La ricerca degli antigeni è facilitata nelle infezioni acute, perché dopo l'instaurarsi della risposta immunitaria il virus può essere mascherato dagli anticorpi; inoltre gli antigeni sono difficili da trovare nei campioni di fluidi corporei provenienti da cani con sintomi neurologici che non hanno avuto o che hanno superato i sintomi sistemici.

L'immunofluorescenza può essere eseguita anche su campioni citologici e facilitare la diagnosi, ma, richiedendo degli strumenti specifici, non viene eseguita in tutti i laboratori. Gli strisci citologici possono essere eseguiti su epitelio congiuntivale, tonsillare, genitale, respiratorio. L'esame può essere eseguito anche su liquido cefalo-rachidiano, sangue, sedimento urinario e midollo osseo. Il virus può essere riscontrato per un periodo più lungo nelle cellule epiteliali e nei macrofagi alveolari (Greene e Appel, 2006).

Mediante microscopio elettronico può essere osservato il nucleocapside virale da campioni di feci, polmoni o milza (Williams, 2001).

- ELISA

Il test può essere usato per trovare gli antigeni virali nel siero e nel liquido cefalo-rachidiano ma, come accade per l'IF, la ricerca è resa difficoltosa se i campioni provengono da cani con sintomi neurologici che non hanno avuto o che hanno superato i sintomi sistemici (Greene e Appel, 2006).

- ISOLAMENTO IN VITRO

La crescita del virus avviene solo coltivandolo direttamente su cellule epiteliali o fibroblasti di cane infetto stimulate con mitogeni: l'isolamento nelle culture cellulari di routine invece è difficoltoso. A volte è stato isolato in cellule Vero o in colture primarie di cellule renali e di cellule epiteliali vescicali di cane, ma il successo è stato basso. La crescita in macrofagi alveolari rileva il virus in 24-48 ore e, assieme alla crescita in linfociti era considerato, un tempo, dato essenziale per l'isolamento del virus (i ceppi virali crescono meglio nei macrofagi e nei linfociti), ma è stato sostituito poi da culture di linfociti di cane. In generale il titolo del virus vaccinale è elevato in macrofagi, linfociti, cellule renali e linee cellulari epiteliali (Greene e Appel, 2006).

- PCR

L'RNA del virus può essere individuato mediante una RT PCR eseguita su un tampone (nel cane con infezione acuta), oppure su siero, sangue intero e liquido cefalorachidiano (nel cane con malattia sistemica o neurologica). Questo test è molto utile per la diagnosi ante-mortem perché una positività è abbastanza specifica, ma non è abbastanza diffuso. Sono state messe a punto delle tecniche di PCR per individuare il virus in colture cellulari e sezioni istologiche. Quando si ha a disposizione tessuto nervoso fissato in formalina si può eseguire una semi-nested PCR. In generale quando si ottiene una positività mediante PCR è indicativa di infezione, così come quando si ottiene un risultato negativo i motivi possono essere

molti, compreso una manipolazione non corretta del campione (Greene e Appel, 2006).

- IMMUNOISTOCHEMICA

È una tecnica utilizzata per fare diagnosi ante-mortem che rileva gli antigeni nella mucosa nasale, nell'epitelio dei cuscinetti plantari e nella cute con peli del collo (Greene e Appel, 2006).

Indiretta: permette di evidenziare la risposta immunitaria che l'organismo mette in atto quando entra in contatto con il virus. Il titolo anticorpale nel cane è proporzionale al livello di protezione: dalle analisi effettuate spesso gli animali che muoiono a causa del cimurro non presentano anticorpi contro il virus (Williams, 2001). La sierologia rappresenta un buon metodo per effettuare studi sulla presenza e sull'epidemiologia del cimurro nelle popolazioni selvatiche ma il sangue può essere prelevato solo se non eccessivamente emolizzato (Williams, 2001).

- SIERONEUTRALIZZAZIONE

È considerato il test *gold standard* e permette di identificare gli anticorpi contro il virus: evidenzia gli anticorpi diretti contro le proteine H ed F della membrana del virus che compaiono 10-20 giorni dopo l'infezione e possono permanere per tutta la vita dell'animale (Greene e Appel, 2006).

- ELISA

Il test viene usato per differenziare le IgG e le IgM sieriche, anche se è un po' meno specifico. Elevati livelli di IgM indicano più facilmente casi acuti di malattia (81%) piuttosto che encefaliti croniche (60%), e, fino a 3 settimane dopo la prima vaccinazione, si può riscontrare un aumento di IgM transitorie. Un aumento di IgG, invece, è considerato ambiguo e può indicare sia un'infezione pregressa sia in corso oppure una precedente vaccinazione.

Se la barriera emato-encefalica è integra e si trovano IgG nel liquido cefalorachidiano è patognomonico di infezione. Se aumenta la pressione endocranica e la concentrazione proteica e cellulare nel LCR è indice di infezione (Greene e Appel, 2006).

2.8 Diagnosi differenziale

L'infezione da cimurro può essere primaria o secondaria ad altre infezioni che causano immunosoppressione, così come può favorire essa stessa l'instaurarsi di altre patologie. In questo modo, quando si effettua la diagnosi per il cimurro non bisogna tralasciare la ricerca di altre infezioni batteriche, protozoarie o virali tipiche dei carnivori (Williams, 2001).

Di seguito vengono elencate alcune patologie che sono state riscontrate simultaneamente al cimurro in varie specie animali:

- Toxoplasmosi, comunemente riscontrata nei carnivori (Moller e Nielsen, 1964; Dubey *et al.*, 1992)
- *Sarcocystis* nei procioni (Dubey *et al.*, 1990)
- Encefalitozoonosi nei licaoni (Van Heerden *et al.*, 1989)
- *Pneumocystis carinii* nei cani (Williams, 2001)
- Coccidiosi nei furetti dai piedi neri (Williams, 2001)
- Malattia di Tyzzer nel procione (Wojcinski *et al.*, 1986)
- Varie infezioni batteriche secondarie nella volpe grigia (Black *et al.*, 1996)
- Enterite da *parvovirus* nei coyote (Holzman *et al.*, 1992)
- Rabbia in un procione, il quale tra l'altro non presentava sintomi di encefalite (Williams, 2001)
- Epatite nel cane e encefalite nella volpe causate da canine adenovirus 1 (Williams, 2001)

Non bisogna dimenticare che alcune di queste patologie, come ad esempio la rabbia, devono essere prese subito in considerazione quando un cane o un altro carnivoro presenta sintomi neurologici, perché il possibile passaggio all'uomo creerebbe un grave problema di salute pubblica. Inoltre non bisogna tralasciare eventuali intossicazioni come l'avvelenamento da piombo (Williams, 2001).

2.9 Terapia

Non esiste una terapia specifica: l'unico trattamento possibile è tenere sotto controllo i sintomi e agire contro le infezioni batteriche secondarie. Anche se un cane non può guarire dalla malattia si può migliorare la qualità della vita e ridurre la mortalità. L'unica ragione per cui un veterinario si può opporre alla terapia è la comparsa di sintomi neurologici incompatibili con la vita.

In caso di infezione alle vie respiratorie si devono prendere tutti gli accorgimenti per permettere al cane di respirare meglio (come ad esempio rimuovere lo scolo oculonasale, mantenere l'animale al caldo e all'asciutto) ma soprattutto si deve iniziare una terapia antibiotica contro eventuali infezioni secondarie. L'agente maggiormente responsabile di complicazioni in caso di polmonite è *Bordetella bronchiseptica*, che richiede una terapia ad ampio spettro: ampicillina (20 mg/Kg) e tetraciclina (5-10 mg/kg, vietata nei cuccioli perché colora i denti).

Quando sono presenti sintomi gastroenterici che comportano vomito e diarrea è indispensabile una terapia di supporto per via parenterale.

Nel momento in cui compaiono sintomi neurologici bisogna capire se il proprietario è in grado di accettare la situazione: infatti l'encefalite può portare alla paralisi, al semicoma e quindi ad una situazione di inabilità tale che l'unica soluzione raccomandata è l'eutanasia. Quando invece la situazione è meno grave si può tentare di tenerla sotto controllo, per periodi anche prolungati, mediante la somministrazione di desametasone e successivamente di antiinfiammatori. Ci sono alcune manifestazioni maggiormente tollerate dai proprietari: convulsioni, mioclonia e neurite ottica. Per le convulsioni la terapia consigliata è diazepam (5-10 mg) per l'attacco epilettico e fenobarbitale per il mantenimento; la mioclonia è irreversibile e non trattabile; la neurite ottica può essere controllata mediante glucocorticoidi (Greene e Appel, 2006).

Anche negli animali selvatici tenuti in cattività il trattamento del cimurro è solamente sintomatico (antibiotici, fluidi, anticonvulsivanti) e la prognosi rimane riservata, mentre non è possibile trattare eventuali esemplari malati che vivono in libertà (Williams, 2001).

2.10 Profilassi

DIRETTA

Una corretta disinfezione dei locali e l'isolamento degli animali infetti (i quali eliminano il virus per 1-2 settimane) può rappresentare un buon modo per evitare la circolazione del virus andando a sfruttare la sua scarsa resistenza nell'ambiente (Greene e Appel, 2006).

Il virus del cimurro è sensibile ai normali disinfettanti quali formalina, fenolo, sali quaternari di ammonio, ipoclorito di sodio (Farina e Scatozza, 1998).

INDIRETTA

Gli anticorpi materni vengono trasmessi in utero (3%) e tramite il colostro (97%). La protezione dura in media 12-14 settimane nei cuccioli che assumono colostro, mentre solo 1-4 settimane nei cuccioli che non lo ricevono. La vaccinazione rappresenta dunque il metodo migliore per evitare l'infezione dei cuccioli dal momento in cui l'immunità materna decresce.

Nei cuccioli che hanno ricevuto il colostro la vaccinazione viene eseguita tra la 6° e la 16° settimana di vita con un richiamo dopo 3-4 settimane. Nei cuccioli che non hanno ricevuto colostro, invece, viene fatta a 2-3 settimane di vita e il richiamo dopo 2-4 settimane. Se un cane con più di 16 settimane non è mai stato vaccinato si somministrano 2 dosi a distanza di 2-4 settimane.

L'immunità data dai richiami vaccinali (o dalla guarigione dopo un'infezione naturale) dura più di 1 anno, ma può essere inadeguata se il cane diventa immunocompromesso o entra in contatto con un ceppo altamente virulento. Poiché il cane si può infettare anche da adulto è consigliato effettuare comunque un richiamo vaccinale annuale (Greene e Appel, 2006).

La vaccinazione di soggetti malati o con il sistema immunitario compromesso deve essere evitata (Williams, 2001).

Normalmente l'iniezione del vaccino è sottocutanea, mentre nei cani esposti al virus e non vaccinati, viene fatta endovena o intramuscolo perché crea un'immunità più rapida (Greene e Appel, 2006).

Tipologie di vaccini:

- VIVO ATTENUATO MODIFICATO (MLV-Modified Live Virus Vaccine)

Anche se in generale la protezione che offre è maggiore, questa non è uguale per tutti i vaccini MLV prodotti: infatti maggiore è la potenza protettiva che si vuole ottenere, maggiore è la virulenza del ceppo vaccinale. In questi casi la vaccinazione può comportare lo sviluppo della malattia, soprattutto in alcune specie selvatiche e nei soggetti immunocompromessi (Greene e Appel, 2006).

- con passaggi seriali su cellule renali di cane (ceppi Rockborn e Snyder Hill): danno un'immunità solida e duratura con titoli anticorpali elevati ma possono determinare lo sviluppo di encefaliti nei cuccioli di cane e in altri carnivori selvatici (Greene e Appel, 2006).

- con passaggi seriali su embrioni e cellule di pollo (ceppo Onderstepoort): produce una immunità umorale più bassa ma è apatogeno e replica solo nei tessuti linfatici; non viene eliminato e scompare in 3 settimane. La protezione dura 1 anno ed è ideale per cuccioli e cani a rischio come prima vaccinazione. Rappresentano la tipologia vaccinale più usata (Greene e Appel, 2006).

- con vettore vivo ricombinante: è un *Poxvirus* in cui sono stati inseriti dei geni per la codifica delle proteine antigeniche H ed F del virus del cimurro. È la tipologia di vaccino più sicura (Greene e Appel, 2006).

I vaccini MLV si trovano in forma liofilizzata e devono essere mantenuti refrigerati e al buio fino al loro utilizzo (in questo modo durano 16 mesi). Se mantenuti a 20° C sono stabili per 7 settimane mentre se mantenuti a 47° C ed esposti alla luce durano appena 7 giorni. Una volta ricostituiti, quindi, devono essere utilizzati il prima possibile (massimo 3 giorni a 4° C e 1 giorno a 20° C) (Greene e Appel, 2006).

Gli animali selvatici maggiormente suscettibili alla malattia indotta dal vaccino MLV sono il panda minore (*Ailurus fulgens*), il furetto dai piedi neri (*Mustela nigripes*), il visone europeo (*Mustela lutreola*), la volpe grigia (*Urocyon cinereoargenteus*) e il licaone (*Lyacon pictus*). I furetti domestici e i leoni, invece, sono meno suscettibili alla malattia indotta dal vaccino e vengono vaccinati con successo mediante il ceppo Onderstepoort (Greene e Appel, 2006).

Poiché il cimurro determinato da un'infezione post-vaccinale è meno grave rispetto alla malattia naturale viene suggerito da Greene e Appel (2006) di vaccinare sia i

carnivori tenuti in cattività sia quelli selvatici. Anche Williams (2001) sottolinea come negli animali selvatici nei quali si riesce ad eseguire con successo l'iter vaccinale (con vaccini MLV) si sviluppa un'immunità di lunga durata. Tuttavia l'utilizzo di vaccini modificati deve essere fatto con cautela in quanto le conoscenze riguardo al reale funzionamento e alle possibili reazioni (comprese quelle con gli anticorpi materni) nelle varie specie non sono ancora del tutto chiarite. L'unico vaccino che potrebbe in futuro essere utilizzato per la vaccinazione in campo è quello ricombinante (Williams, 2001).

- **VACCINI ETEROLOGHI (virus del morbillo attenuato)**

Sono vietati in UE. Nonostante CDV e MeV siano antigenicamente correlati, il titolo anticorpale che si sviluppa dopo questo tipo di vaccino è minimo ma prolungato. La possibilità che si sviluppi malattia è remota (Greene e Appel, 2006).

- **VACCINI INATTIVATI**

Sono stati abbandonati perché non producono un'immunità sufficiente nel momento in cui il cane viene esposto ad un differente ceppo virale (anche se la malattia che ne consegue è meno grave rispetto ad un cane non vaccinato). Rimangono applicabili alle specie selvatiche che sono sensibili ai virus vaccinali (ad esempio il furetto e il panda minore), ma i risultati sono comunque scarsi (Greene e Appel, 2006; Williams, 2001).

Prima della messa a punto di vaccini vivi attenuati efficaci venivano ampiamente usati i sieri iperimmuni: proteggono il cane per circa 10 giorni e al giorno d'oggi possono essere usati solo nel caso di cani suscettibili che non siano mai stati vaccinati o che siano stati esposti al virus senza possedere l'immunità colostrale.

2.11 Salute pubblica

La sclerosi multipla e il morbo di Paget sono due patologie umane per le quali sono state fatte delle ipotesi di connessione con il virus del cimurro.

La sclerosi multipla è una malattia neurologica degenerativa dell'uomo che si sospetta essere correlata sia con la panencefalite sclerosante subacuta umana (PESS) sia con l'encefalite cronica progressiva del cane (ODE). La PESS e l'ODE sono due malattie con delle similitudini: entrambe sono infiammazioni non suppurative e croniche che portano a demielinizzazione e proliferazione gliale, ma finora non ci sono stati riscontri che il virus del morbillo e quello del cimurro possano essere implicati nello sviluppo della sclerosi multipla (Greene e Appel, 2006; Williams, 2001).

Il morbo di Paget è una malattia cronica che colpisce l'uomo e determina infiammazione degli osteoclasti: come risultato l'osso viene distrutto, rimodellato e deformato. Il virus responsabile dell'infiammazione sembra essere un *paramyxovirus*, perciò è stata fatta l'ipotesi che l'uomo possa contrarre questa malattia entrando in contatto con il CDV canino o varianti del virus del morbillo. Effettivamente il CDV è stato trovato analizzando le ossa di pazienti affetti dal morbo mediante analisi molecolare, ma il ruolo effettivo del cane o di altri carnivori selvatici non è ancora stato provato (Greene e Appel, 2006; Williams, 2001).

Quando si riscontra un cane con sintomi neurologici bisogna sempre mettere in diagnosi differenziale la rabbia a causa dell'impatto che può avere sulla salute pubblica. Spesso il virus del cimurro è stato riscontrato in animali rabidi, da questo deriva il fatto che bisogna tenerne conto soprattutto nelle aree dove la rabbia è endemica.

2.12 *Canine Distemper Virus* nella Volpe (*Vulpes vulpes*)

Diffusione

A partire dal 2006 in Europa si è assistito ad una epidemia di cimurro nella volpe che ha riguardato alcune Nazioni come Italia, Germania e Svizzera. Di seguito vengono elencate le ricerche effettuate in Europa nella volpe prima e dopo questa recente epidemia.

- van Moll *et al.* (1995) in Germania hanno ricercato CDV mediante analisi immunoistochimica su campioni di cervello di 90 volpi e non hanno riscontrato positività (Tab. 2.2).
- Truyen *et al.* (1998), sempre in Germania, hanno analizzato invece il siero di 383 volpi che era stato prelevato per eseguire un'indagine sul *Canine Parvovirus* (CPV). Mediante il test della sieroneutralizzazione (SNT) hanno riscontrato una sieropositività per CDV del 4.4% (17), senza particolari differenze tra le volpi provenienti da aree sub-urbane e rurali (Tab. 2.2). Per la sieroprevalenza di CPV e degli altri virus riscontrati si rimanda alla Tab. 2.2.
- Sempre in Germania Frölich *et al.* (2000) hanno fatto un'indagine sulla prevalenza di CDV nei carnivori selvatici; gli anticorpi nei confronti di CDV sono stati riscontrati mediante SNT nel 5% delle volpi testate (30 su 591) provenienti da aree urbane (22) e sub-urbane (8). La RT PCR ha rilevato inoltre la presenza di RNA da campioni di milza e polmone di 13 volpi, 5 delle quali erano state testate anche per gli anticorpi, dando però risultato negativo. Gli Autori sono riusciti a sequenziare parzialmente il gene F rilevando una vicinanza molto stretta con il ceppo vaccinale usato nei cani (Tab. 2.2).
- Damien *et al.* (2002) hanno evidenziato come la popolazione volpina del Lussemburgo abbia una positività sierologica variabile dal 9% (SNT su 44 campioni), al 18% (ELISA su 61 campioni). Solamente 4 volpi su 44 sono inoltre risultate positive ad entrambi i test (Tab. 2.2).
- Sobrino *et al.* (2008) hanno analizzato mediante ELISA il siero prelevato da 137 volpi provenienti dalla Spagna ottenendo il 17.1% di positività. Contemporaneamente è stata ricercata anche la sieroprevalenza nei confronti di CPV (Tab. 2.2).
- Santos *et al.* (2009) hanno prelevato campioni sierologici da sangue e da omogenato di milza da 22 volpi in Portogallo e hanno riscontrato una

prevalenza del 9% (2 volpi mediante SNT). Contemporaneamente è stata ricercata anche la sieroprevalenza nei confronti di CPV (Tab. 2.2).

- Akerstedt *et al.* (2010) sono andati a ricercare in 275 volpi provenienti dalla Norvegia la sieroprevalenza per varie patologie. La positività per CDV si attesta tra il 9.6% e il 12.3%. Si rimanda alla Tab. 2.2 per le sieroprevalenze nei confronti di *Toxoplasma gondii*, *Canine Adenovirus* e *Leptospira interrogans*.

PREV. DI CDV	ANALISI MOLECOLARE	N° CAMPIONI POSITIVI	N° CAMPIONI TESTATI	METODO DIAGNOSTICO	AUTORI
0%	-	0	90	Immunoistochimica su cervello	van Moll <i>et al.</i> 1995
4.4	-	17	383	SNT su siero (torace+cuore)	Truyen <i>et al.</i> 1998 ¹
5%	-	30	591	NPLA su siero	Frölich <i>et al.</i> 2000
5.1%	Sequenza gene F = 99.58% di omologia con ceppo vaccinale	13	253	RT PCR su milza e polmone	
14%	-		44	SNT su siero (cuore)	Damien <i>et al.</i> 2002
18%	-	8	61	ELISA su siero (cuore)	
17.1%	-	23	134	ELISA su siero (cuore)	Sobrino <i>et al.</i> 2008 ²
9%	-	2	22	SNT su siero e milza	Santos <i>et al.</i> 2009
9.6 -12.3%	-	n.d.	275	SNT su siero	Akerstedt <i>et al.</i> 2010 ³

Tabella 2.2. Prevalenze di CDV nella volpe (*Vulpes vulpes*) riscontrate in Europa. I numeri in apice si riferiscono alle altre patologie ricercate dagli autori nel medesimo studio, sempre nelle volpi, che vengono riportate nell'appendice sottostante.

	Autori	Patogeno	n°Camp.Test.	Prevalenza
1	Truyen <i>et al.</i> 1998	<i>Canine Parvovirus</i>	500	13%
		<i>Canine Adenovirus</i>	485	3.5%
		<i>Canine Herpesvirus</i>	485	0.4%
2	Sobrino <i>et al.</i> 2008	<i>Canine Parvovirus</i>	137	5.1%
3	Akerstedt <i>et al.</i> 2010	<i>Toxoplasma gondii</i>	275	18.6%
		<i>Canine Adenovirus</i>	275	59.6%
		<i>Leptospira interrogans</i>	275	9.9%

Appendice della Tabella 2.2.

Caso clinico

López-Peña *et al.* (1994) hanno eseguito per la prima volta un'indagine immunoistochimica per ricercare gli antigeni di cimurro nei tessuti della volpe. Il loro report rappresenta, inoltre, la prima indagine spagnola su CDV nella volpe. Gli Autori hanno eseguito le indagini su 7 volpi (6 vivevano in cattività e 1 in natura) che presentavano in vita problemi respiratori. Al momento dell'autopsia i polmoni si presentavano collassati e i linfonodi polmonari erano aumentati di volume. Era presente dello scolo mucopurulento a livello degli occhi e ipercheratosi dei cuscinetti plantari. Sono stati quindi prelevati campioni da cervello, trachea, polmoni, milza, terza palpebra, rene, vescica, linfonodi, intestino e stomaco per eseguire le analisi istopatologiche e immunoistochimiche.

Mediante l'analisi istologica è stata riscontrata una polmonite fibrinosa essudativa in 5 volpi, tra le quali anche quella selvatica. A livello respiratorio erano presenti inoltre polmonite interstiziale con infiltrazione di cellule monocucleate (a livello di setti alveolari e macrofagi), alveoli ripieni di linfociti e cellule alveolari desquamate, e iperplasia dell'epitelio alveolare.

Corpi inclusi intracitoplasmatici eosinofili di varie dimensioni e numero sono stati trovati a livelli di molteplici campioni. Nell'apparato respiratorio si trovavano a livello di cellule epiteliali di trachea, bronchi e bronchioli, e nei macrofagi dell'essudato. Gli altri siti dove sono stati individuati sono i macrofagi circolanti, l'epitelio vescicale, l'epitelio della pelvi e dei tubuli renali, e l'epitelio dei dotti biliari.

Nel cervello è stata riscontrata nella maggior parte dei casi una encefalite demielinizzante, specialmente attorno al quarto ventricolo, mentre a livello di milza e linfonodi era presente deplezione linfocitaria.

L'esame immunohistochimico ha permesso di identificare gli antigeni virali in numerosi tessuti, ottenendo in questo modo diagnosi certa di CDV in tutte e 7 le volpi. Le sedi dove sono stati riscontrati maggiormente sono le cellule epiteliali dell'apparato respiratorio, ma positività si sono ottenute anche a livello di cellule delle ghiandole bronchiali, cellule endoteliali, pelvi renale, cellule epiteliali di stomaco e intestino, cellule mesangiali dei glomeruli, cellule epiteliali della terza palpebra, epatociti e macrofagi circolanti.

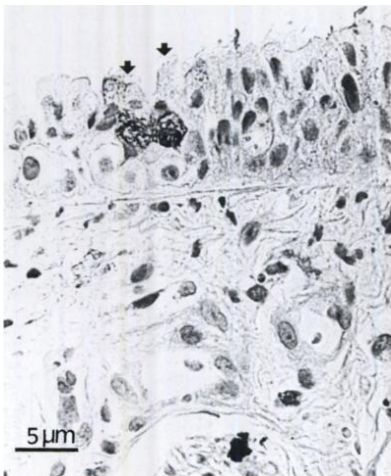


Figura 2.2. Antigeni virali di CDV nelle cellule epiteliali dei bronchioli (freccie) di volpe. López-Peña *et al.* (1994)

3. LA TOXOPLASMOSI

La toxoplasmosi è una malattia parassitaria sostenuta da un protozoo a DNA, *Toxoplasma gondii*, che è in grado di parassitare ogni tipo di cellula nucleata degli animali omeotermi: mammiferi (circa 200 specie, compreso l'uomo) e uccelli (circa 62 specie) (Rinaldi, 2010). Secondo Jakubek *et al.* (2007) questa patologia sembra essere molto comune negli animali selvatici, soprattutto nei canidi.

E' una delle zoonosi più importanti ubiquitaria nel mondo. La prevalenza nell'uomo è elevata, soprattutto nei Paesi tropicali (fino al 70% a causa spesso delle scarse condizioni igieniche) e in Francia (50-60% a causa dell'elevato consumo di carne cruda). In Italia, invece, la sieroprevalenza si è ridotta al 18-30% (Brandonisio, 2006). La toxoplasmosi rappresenta ancora oggi un problema di sanità pubblica, in particolare nella donna in gravidanza e nei soggetti immunodepressi affetti da AIDS. (Brandonisio, 2006). La percentuale di donne in Italia che risultano sieronegative in gravidanza è del 40%, quindi circa 600 donne su 1000 può contrarre l'infezione durante la gravidanza: l'infezione primaria attesa è di 1-10 casi ogni 1000 gravidanze, perciò risulta fondamentale divulgare il più possibile le norme basilari per evitare l'infezione (SNLG, 2010).

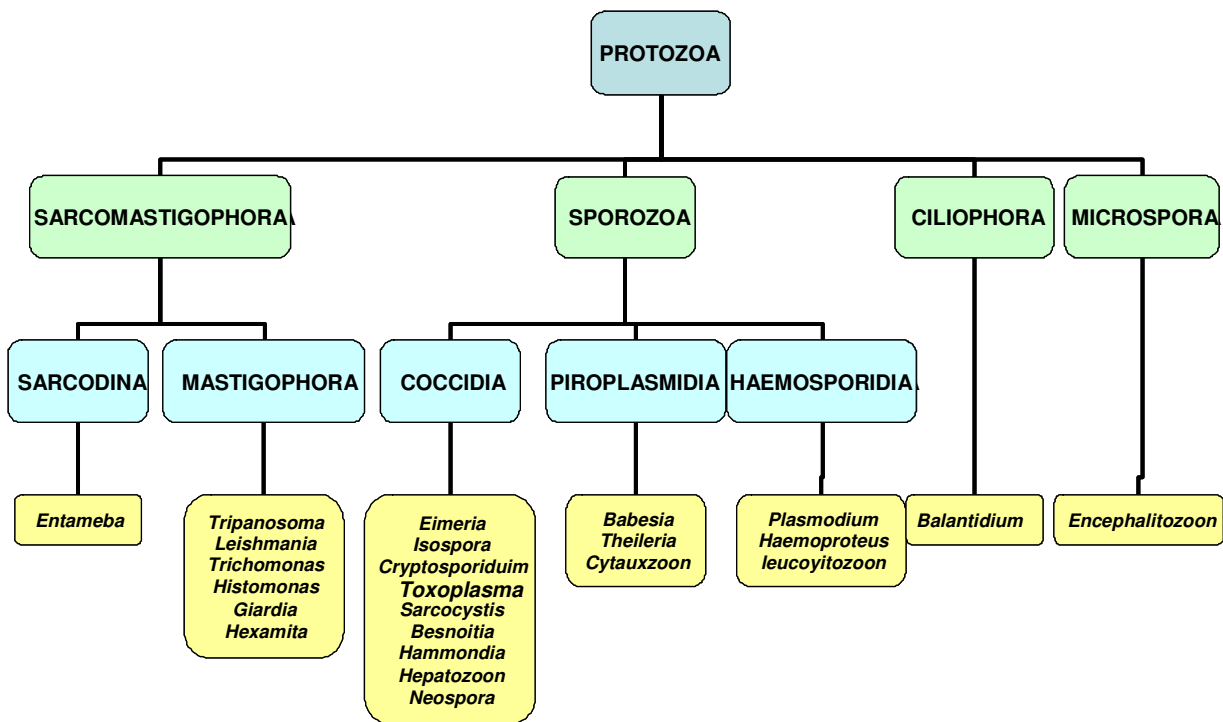
Nei pazienti con AIDS la toxoplasmosi ha sempre rappresentato una possibile infezione secondaria con lo sviluppo di sintomi cerebrali nel 10-15% dei casi. Con l'avvento di nuove terapie per contrastare l'HIV c'è stata una drastica riduzione dell'incidenza sia di encefalite sia della mortalità (Brandonisio, 2006).

3.1 I Protozoi

I protozoi sono organismi unicellulari con una struttura cellulare tipica degli Eucarioti: citoplasma, apparato di Golgi, lisosomi, mitocondri e nucleo (che può essere singolo, doppio o multiplo). Se ne riconoscono più di 35.000 specie.

Toxoplasma è un protozoo con nucleo singolo e dotato di locomozione grazie a fibrille citoplasmatiche.

Qui di seguito viene riportata la classificazione dei principali protozoi di interesse parassitologico (tratto da Urquhart *et al*, 1988):



3.2 Eziologia

Il nome *Toxoplasma gondii* trae origine da *toxòn*, termine greco che indica la forma ad arco del protozoo, mentre *gondii* è parte del nome del piccolo roditore (*Ctenodactylus gundi*) dal quale fu isolato per la prima volta il parassita nel 1908 (Pietrobelli, 2003).

Nel corso degli anni sono stati riconosciuti 3 genotipi principali che presentano differente patogenicità:

Tipo I: è stato raramente isolato (circa 10% di riscontri in Europa e negli USA, per lo più in infezioni umane). Questo genotipo ha un'elevata virulenza nel topo (causa la morte con meno di 10 tachizoiti). *In vitro* possiede un alto grado di moltiplicazione perché la conversione da tachizoite a bradizoite è ridotta.

Tipo II: è il genotipo più comunemente isolato nell'uomo, nella pecora e nel maiale (80% dei riscontri in Europa e negli USA). Nel topo non ha virulenza: determina infezione cronica con presenza di cisti tissutali. *In vitro* possiede un basso grado di moltiplicazione perché è facilitata la conversione da tachizoite a bradizoite, con formazione di cisti.

Tipo III, Genotipi Ricombinanti, Genotipi Atipici: sono genotipi isolati raramente in Europa e negli USA. Vengono riscontrati più frequentemente negli animali selvatici, in aree remote e in patologie umane rare. Il tipo III è di solito più virulento nel topo rispetto al tipo II (Dardé, 2004).

.

3.3 Ciclo Biologico

Il ciclo biologico è piuttosto complesso e comprende una fase intestinale ed una extra-intestinale; è stato compreso nel 1970 quando si è dimostrato che i felidi sono gli ospiti definitivi, mentre un gran numero di animali domestici e selvatici possono essere ospiti intermedi (Dubey e Beattie, 1988).

Il gatto quindi è un ospite completo perché è l'unico animale in cui avvengono entrambe le fasi, mentre in tutti gli altri animali avviene solamente la fase extra-intestinale.

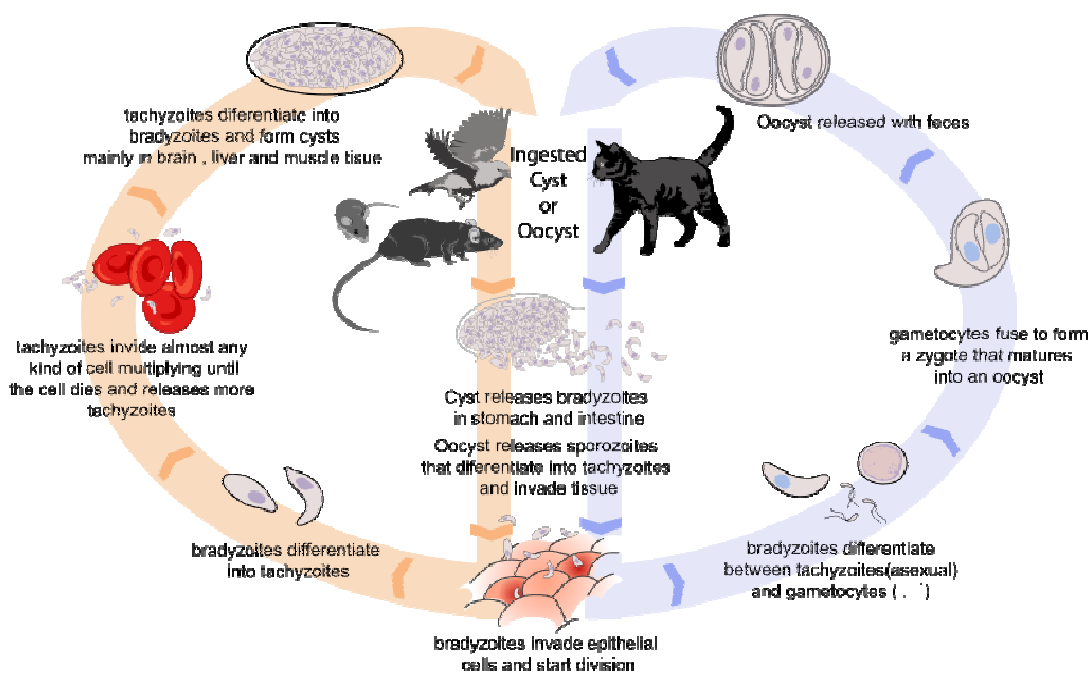


Figura 3.1. Ciclo di *Toxoplasma gondii*
it.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma_gondii

STADI MORFOLOGICI DI *T. GONDII*:

Oocisti: sono la forma di resistenza del parassita nell'ambiente. Hanno una forma rotondeggiante, con un diametro di circa 10x12 μm . Le oocisti si formano nell'intestino del gatto (felidi) e vengono emesse con le feci nell'ambiente esterno, dove maturano e diventano infettanti. L'ocisto sporulata (cioè contenente gli sporozoiti, di forma simile ai tachizoiti) rappresenta la forma infettante del parassita.

Tachizoiti (da *tachùs* = veloce): sono la forma invasiva e proliferativa del parassita che caratterizza la fase acuta e subacuta della malattia. Hanno forma lanceolata con nucleo centrale (4-8 μm di lunghezza e 2-3 μm di larghezza).

Bradizoiti (da *bradùs* = lento): sono la forma di resistenza del parassita nell'ospite. Hanno forma lanceolata, ma sono più sottili rispetto ai tachizoiti e il nucleo è posto all'estremità posteriore (7 μm di lunghezza e 1.5 μm di larghezza) (Rinaldi, 2010).

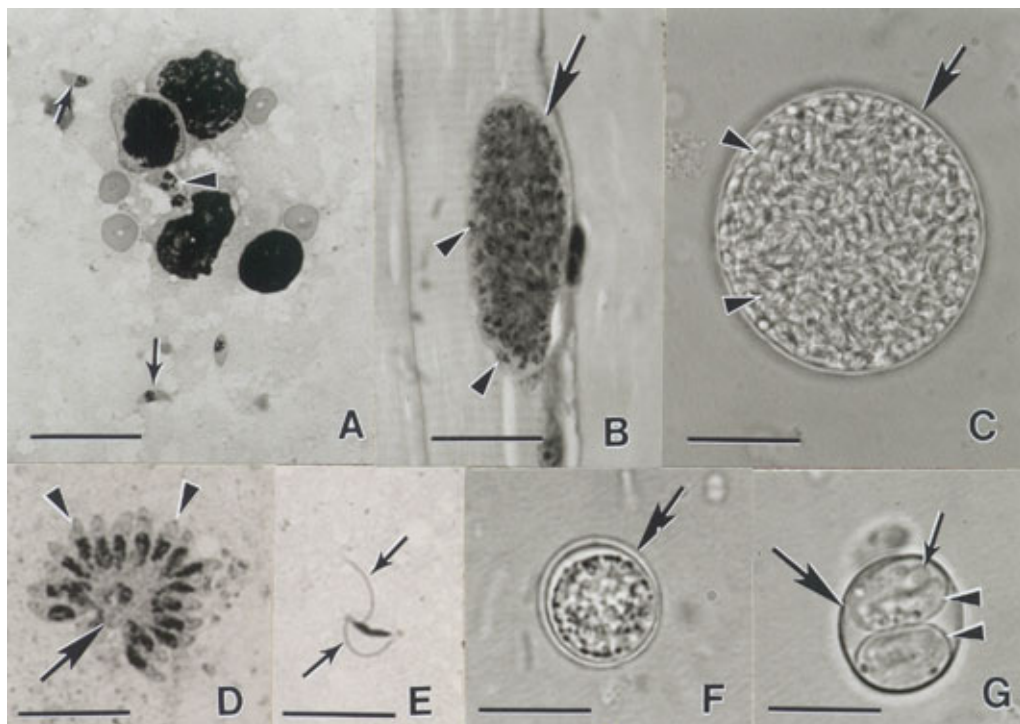


Figura 3.2. Stadi morfologici di *T. gondii*

A = TACHIZOITI in uno striscio di milza

B = CISTI tissutale in una sezione di muscolo

C = CISTI tissutale in omogenato di cervello

D = SCHIZONTE con molti MEROZOITI in uno striscio di intestino di gatto infetto

E = MICROGAMETE con 2 flagelli in uno striscio di intestino di gatto infetto

F = OOCISTI NON SPORULATA in feci di gatto

G = OOCISTI SPORULATA

<http://www.ars.usda.gov/main/docs.htm?docid=11013>

FASE INTESTINALE

Il gatto si infetta ingerendo le oocisti mature, i tachizoiti o i bradizoiti.

Dopo l'ingestione di oocisti sporulate, nell'intestino avviene la liberazione degli sporozoiti, che sono gli elementi infettanti. Gli sporozoiti invadono le cellule della mucosa dell'intestino tenue: all'interno della cellula lo sporozoita comincia la fase schizogonica (asessuata) del ciclo biologico. Si forma così uno schizonte a livello di digiuno e ileo (con dimensioni di circa 4-17 μm) all'interno del quale si sviluppano 32 merozoiti (Rinaldi, 2010). Lo schizonte cresce fino a quando la cellula intestinale che lo contiene esplose e vengono liberati i merozoiti, i quali vanno a colonizzare altre cellule. Si succedono più fasi asessuate fino a quando si instaura la fase gametogonica (sessuata) nella quale alcuni merozoiti si differenziano in microgameti (forma "maschile") e macrogameti (forma "femminile"). Il microgamete è piccolo e mobile, il macrogamete grande e statico: dalla loro fusione all'interno della cellula intestinale si forma un'oocisti. Le oocisti quindi escono dalle cellule intestinali e vengono eliminate con le feci, ma essendo ancora immature non sono infettanti (Pietrobelli, 2003).

Nell'ambiente esterno l'oocisti riesce a maturare in 1-5 giorni solo se ci sono le condizioni idonee (temperatura, umidità e ossigenazione). Il tempo di maturazione è molto variabile in base alla temperatura: a 24 °C avviene in 2-3 giorni, a 11 °C avviene in 14-21 giorni, non avviene sotto i 4° e sopra i 37°C. Con la maturazione si formano all'interno di ciascuna oocisti 2 sporocisti, che contengono a loro volta 4 sporozoiti (quindi 8 sporozoiti per oocisti).

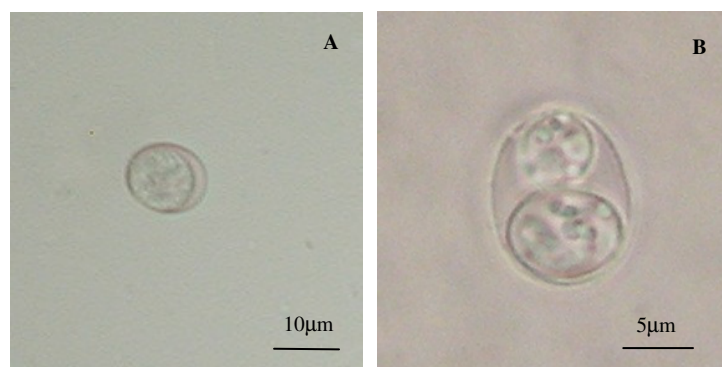


Figura 3.3

A = Oocisti non sporulate

B = Oocisti sporulata

FASE EXTRA-INTESTINALE

L'ospite recettivo si infetta ingerendo gli sporozoiti (contenuti nelle oocisti emesse dal gatto), i bradizoiti (contenuti nelle cisti terminali nei tessuti infetti), o i tachizoiti (contenuti nel sangue infetto e nel latte crudo non pastorizzato).

Gli sporozoiti a livello di mucosa intestinale superano la barriera e tramite il circolo ematico raggiungono i tessuti bersaglio. Si instaura così la fase acuta della malattia con la formazione dei tachizoiti, che dura circa 1-2 settimane se l'animale ha un sistema immunitario competente. I tachizoiti si moltiplicano velocemente fino a riempire le cellule parassitate (8-16 per cellula, soprattutto macrofagi, cellule gliali e muscolari; Rinaldi, 2010). La fase cronica si instaura con l'inizio della reazione immunitaria e la formazione di immunoglobuline che hanno il compito di contrastare l'azione dei tachizoiti. Questi, per sfuggire all'azione anticorpale, rallentano lo sviluppo fino a diventare bradizoiti che si localizzano all'interno di cisti terminali (30-60 μm , ma possono attivare fino a 100 μm). Le cisti si riscontrano nel tessuto muscolare, ma anche in altre sedi (occhio, cervello, ecc.) (Pietrobelli, 2003); di rado nei polmoni, nel fegato e nei reni (Rinaldi, 2010). Le cisti si formano in pochi giorni e possono permanere per anni, anche per tutta la vita dell'ospite. Possiedono una membrana che consente un contatto diretto con le difese immunitarie dell'ospite: se avviene una caduta delle difese immunitarie la cisti si può riattivare, il bradizoita torna tachizoita ed aumenta la moltiplicazione, originando così una nuova fase acuta della malattia (Pietrobelli, 2003).

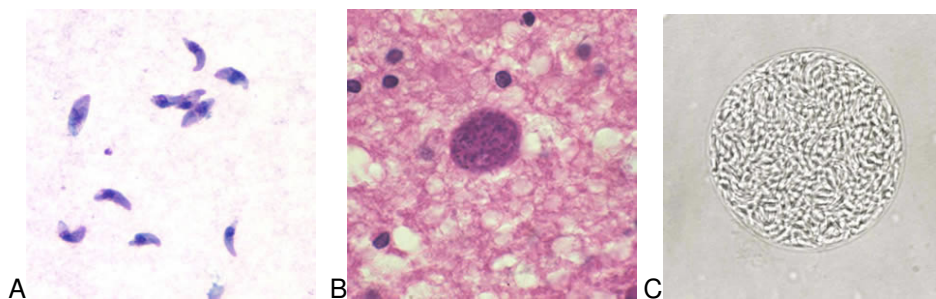


Figura 3.4

A = Tachizoiti in uno striscio di versamento peritoneale in un topo di laboratorio

B = Cisti in sezione istologica di cervello

C = Cisti

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/imagelibrary/S-Z/Toxoplasmosis/body_Toxoplasmosis_il3.htm

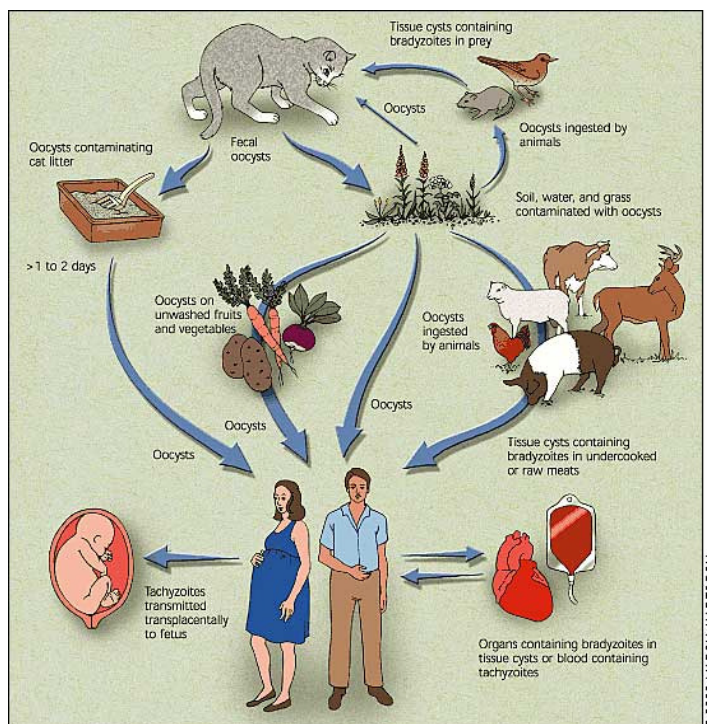


Figura 3.5. Modalità di infezione dell'uomo

http://www.antropozoonosi.it/Malattie/Toxoplasmosi/2132_f1.jpg

3.4 Ruolo del gatto

Il gatto possiede un ruolo epidemiologico importante poiché è l'unico ospite definitivo del parassita e può diffondere l'infezione agli altri animali e all'uomo.

Per questo è importante, soprattutto per un veterinario, riconoscere il momento in cui il gatto è veicolo di infezione, così da poter informare i suoi clienti sui possibili rischi di contagio. Quando il gatto entra in contatto con il parassita possono passare da 3 a 48 giorni prima che sia in grado di eliminare le oocisti attraverso le feci. La quantità di oocisti eliminate in questo breve periodo (al massimo 15 giorni) è elevatissima, fino a 100 milioni, ed è in grado di produrre una quantità maggiore di oocisti se l'infezione è avvenuta mediante l'ingestione di bradizoiti provenienti da organi infetti.

Uno dei fattori principali che permette al parassita un'elevata diffusione è l'elevatissima resistenza delle oocisti eliminate con le feci, nell'ambiente, che riescono a rimanere vitali anche se le condizioni non sono favorevoli. Inoltre le oocisti sono resistenti ai più comuni disinfettanti. Fortunatamente se il gatto, già infetto, entra di nuovo in contatto con il parassita molto difficilmente elimina ancora oocisti (Pietrobelli, 2003).

3.5 Trasmissione all'uomo

L'uomo può contrarre la malattia attraverso 4 modalità:

- 1- ingestione di oocisti mature
- 2- ingestione di bradizoiti
- 3- ingestione di tachizoiti
- 4- trasmissione verticale per via transplacentare

Ingestione di bradizoiti: è la modalità principale di infezione dell'uomo. Può avvenire per ingestione di carne cruda infetta o poco cotta. Le cisti terminali sono state riscontrate nelle carni di animali domestici (bovino, equino, ovino, caprino, volatili da cortile) ma anche di selvatici (cervo, alce, renna, orso, antilope, lepre, coniglio selvatico, roditori, piccione) (Pietrobelli, 2003). I bradizoiti vengono inattivati cuocendo, congelando o affumicando la carne, ma sono molto resistenti alle principali tecniche di conservazione (vedi Tab. 3.1 sottostante).

Trattamento	Caratteristiche	Durata
COTTURA	60° C	10 minuti
CONGELAMENTO	-10° C	3 giorni
	-20° C	2 giorni
SALAGIONE	NaCl 2-3.3% a 15° C	14 giorni
	NaCl 2% a 4° C	49 giorni
	NaCl 0.85% a 4° C	56 giorni
	NaCl 0,85% a 10-15° C	21 giorni

Tabella 3.1. Resistenza di bradizoiti a varie tecniche di conservazione della carne di maiale.
(Gianfaldoni e Mancianti, 2010)

Ingestione di oocisti mature: può avvenire quando si manipolano feci di gatto infetto senza prestare attenzione alle più banali norme igieniche, si ingeriscono verdure mal lavate e contaminate da feci di gatto infetto e si entra in contatto con terra dove sono presenti oocisti mature, soprattutto in corso di giardinaggio (Pietrobelli, 2003). Le oocisti mature resistono all'acidità gastrica, ma sono distrutte dal congelamento, dalla cottura e dal disseccamento (Rinaldi, 2010).

Trasmissione transplacentare: è stata confermata nell'uomo, negli ovicaprini, e nei mammiferi marini.

Nella pecora se l'infezione avviene entro i 90 giorni di gestazione si sviluppano aborto o natimortalità a causa degli effetti teratogenici, mentre se avviene dopo i 110 giorni gli agnelli nascono sani ma congenitamente infetti (Piergili Fioretti, 2010).

Nell'uomo questa trasmissione si ha solo se l'infezione si verifica in corso di gravidanza: il rischio di trasmissione al feto aumenta con l'avanzare della gravidanza, mentre più precoce è l'infezione più grave è il danno (SNLG, 2010). Il primo trimestre di gravidanza è il periodo più delicato perché avviene l'embriogenesi del feto e un'infezione in questo periodo causa lesioni incompatibili con la vita. Nel secondo trimestre possono avvenire lesioni al SNC, ai polmoni, al fegato, ai reni e alle ossa e può sopraggiungere aborto. Nel terzo trimestre di gravidanza, invece, il feto è più maturo e gli anticorpi materni riescono a proteggerlo, riducendo così la gravità dei sintomi; si possono però sviluppare comunque, durante l'adolescenza, corioretinite, epilessia, strabismo, sordità o ritardo intellettivo (Rinaldi, 2010).

Ingestione di tachizoiti: è la modalità di infezione meno frequente. Avviene tramite ingestione di secreti (latte) ed escreti ma i tachizoiti vengono rapidamente distrutti a 50° C, non resistono alla pastorizzazione (72° C per 15") e nel caso di ingestione difficilmente superano la mucosa gastrica. Fattori favorevoli all'infezione da tachizoiti sono l'ipocloridria e la presenza di grasso negli alimenti (Pietrobelli, 2003).

Inoltre l'uomo si può infettare attraverso il trapianto di organi, di cellule staminali o emotrasfusioni da donatori sieropositivi per toxoplasma (Bruschi, 2010).

3.6 Quadri Clinici

Negli animali

Nel gatto adulto la toxoplasmosi è per lo più asintomatica. Nei soggetti giovani o immunodepressi (affetti da FIV o FeLV) può causare sintomi enterici (diarrea, disidratazione, dimagrimento, debilitazione) simile a quelli causati dalla coccidiosi. Meno frequentemente può causare infiammazione ai polmoni, al fegato, al pancreas e ai linfonodi; può colpire la retina dando cecità, o il sistema nervoso centrale dando incoordinazione, alterazioni del carattere, difficoltà a deglutire, perdita di controllo della defecazione e della minzione (Pagini, 2003).

Molti degli animali domestici possono contrarre polmoniti, epatiti ed encefaliti. Nel cane l'inizio della forma clinica è contraddistinta dalla presenza di febbre, debolezza, anoressia e diarrea. Spesso si riscontrano polmonite e sintomi neurologici. E' possibile che l'infezione avvenga in concomitanza con il cimurro (CDV, *Canine Distemper Virus*) e talvolta è stato presupposto il suo coinvolgimento in casi di immunosoppressione in seguito alla vaccinazione da cimurro (Taylor *et al.*, 2010).

Nei piccoli ruminanti *T. gondii* è tra le cause più importanti di aborto; esiste inoltre una elevata correlazione tra la percentuale di infezioni e la presenza di gatti negli allevamenti: girando indisturbati per i pascoli rilasciano milioni di oocisti nei prati e la pioggia dilava il terreno andando a contaminare anche le acque di abbeverata (Vesco *et al.*, 2007).

Nell'uomo

Nell'uomo immunocompetente la toxoplasmosi è per lo più asintomatica. Solo nel 10-20% dei casi le persone manifestano linfadenopatia che può regredire anche senza terapia.

Nei soggetti immunodepressi invece causa forme gravi di encefaliti che possono portare a morte: la toxoplasmosi rappresenta infatti una delle prime cause di morte nei pazienti affetti da AIDS.

Qui di seguito, nella Tab. 3.2, vengono elencate le principali infezioni secondarie che possono svilupparsi nei pazienti affetti da AIDS.

	<1995	1995-96	1997-98	1999-2000	2001-02	2003-04	2005-06
Candidosi	24,5	20,5	19,2	19,7	19,7	19,4	17,2
Polmonite da <i>Pneumocystis carinii</i>	22,3	18,2	18,2	19,9	19,7	19,3	20,8
Toxoplasmosi	8,6	7,8	7,2	6,3	6,6	6,3	6,3
Micobatteriosi	6,0	7,1	7,2	6,7	6,1	6,9	6,8
Altre infezioni	14,7	16,0	13,3	13,6	14,0	14,5	14,6

Tabella 3.2. Prevalenza (%) negli anni 1995-2006 delle patologie indicative di AIDS nell'uomo adulto (dati ISS: Suligoi *et al.*, 2007).

Le principali conseguenze di un'infezione transplacentare sono rappresentate da aborto spontaneo, calcificazioni intracraniche, corioretinite (che si può manifestare anche dopo 20-30 anni dall'infezione), cecità, idrocefalo, danni neurologici e ritardo mentale (SNLG, 2010). In alcuni casi non ci sono conseguenze e il neonato nasce sano. La sintomatologia dipende dalla virulenza di *T. gondii*, dall'epoca gestazionale in cui avviene l'infezione, dalle difese immunitarie della madre e dagli eventuali farmaci somministrati. Nel momento in cui la madre entra in contatto con il patogeno sviluppa anticorpi anti-*Toxoplasma*, perciò le successive gravidanze sono esenti da rischio di infezione (Nardini e Fiorini, 1986).

3.7 Lesioni anatomo-patologiche negli animali domestici (cane e gatto)

LESIONI MACROSCOPICHE

L'unica lesione predominante e aspecifica è la necrosi che si riscontra in molti organi, soprattutto nel cervello, nei polmoni, nel fegato e nei linfonodi mesenterici.

A livello del parenchima polmonare e della pleura si evidenziano noduli bianco-grigiastri grandi fino a 5 mm. I linfonodi bronchiali sono spesso necrotici e aumentati di volume.

Foci necrotici possono essere rinvenuti anche a livello di pancreas, rene e milza, mentre nello stomaco e nell'intestino tenue sono state riscontrate lesioni ulcerative. A livello di SNC si possono osservare aree pallide e atrofiche nel cervelletto. In alcuni cani affetti da toxoplasmosi i muscoli degli arti erano atrofici, pallidi e il tessuto connettivo stava sostituendo il tessuto muscolare (Dubey e Lappin, 2006).

LESIONI ISTOLOGICHE

Nei polmoni si possono riscontrare essudazione fibrinosa e necrosi delle pareti alveolari, dei vasi e dei bronchioli. Il lume degli alveoli è ripieno di fibrina e occasionalmente vi si può riscontrare anche linfociti, neutrofili ed eosinofili.

La necrosi a livello muscolare causa involuzione delle fibre muscolari (sostituite da tessuto fibroso), dei piccoli vasi sanguigni e del connettivo circostante.

Nel SNC si riscontra meningoencefalite multifocale non suppurativa con necrosi, gliosi e vasculite. Può essere presente necrosi neuronale, malacia e astrocitosi ed è stato trovato anche infiltrato multifocale a livello delle meningi consistente in macrofagi, cellule plasmatiche, linfociti e neutrofili (Dubey e Lappin, 2006).

3.8 Diagnosi

La diagnosi di *T. gondii* si deve basare su una ricerca diretta o indiretta del parassita, visto che i sintomi clinici e le analisi ematobiochimiche non sono patognomoniche.

La Comunità Europea, al fine di controllare la malattia nell'uomo e negli animali, e di individuare le sorgenti di infezione più importanti, ha incaricato la European Food Safety Authority (EFSA) di fornire indicazioni su quali metodi diagnostici permettano di evidenziare il parassita in modo ottimale (Piergili Fioretti, 2010).

Diretta: permette di evidenziare il parassita, nelle sue diverse forme, mediante ricerca microscopica, isolamento *in vivo* o *in vitro* e amplificazione del DNA con tecniche molecolari.

- ESAME COPROLOGICO

L' esame coprologico permette di vedere le oocisti eliminate con le feci dall'ospite completo (gatto ed altri felidi). L'importanza diagnostica di questa tecnica non è elevata perché il periodo di patenza è breve, le oocisti sono di dimensioni assai

ridotte (10-12 µm), e sono morfologicamente simili alle oocisti di altri coccidi come *Isospora felis* e *I. rivolta*, *Sarcocystis bovifelis* e *S. ovifelis*, e *Hammondia hammondi*. Si utilizza la tecnica di flottazione con soluzione satura di NaCl e ZnSo₄ al 33% o la tecnica di Telemann che prevede la sedimentazione con acido acetico ed etere. (Piergili Fioretti, 2010).

- ISOLAMENTO *IN VIVO* O *IN VITRO*

Il parassita può essere coltivato *in vitro* in colture di fibroblasti umani (metodo rapido, ca. 7 giorni, ma meno sensibile), oppure *in vivo* inoculandolo nel peritoneo di topi da laboratorio (metodo lento, 4-6 settimane, specifico e sensibile). L'isolamento sui topi permette di far amplificare il parassita e di valutarne la vitalità (Piergili Fioretti, 2010).

- ISTOLOGIA, IMMUNOFLUORESCENZA E IMMUNOISTOCHEMICA

L'esame istologico è un metodo utile per osservare la presenza di cisti e lesioni nei tessuti target (linfonodi, milza, fegato, polmone, SNC). Sulle sezioni istologiche è possibile effettuare un'immunofluorescenza diretta per evidenziare le pseudocisti e i tachizoiti. Queste forme vengono evidenziate anche mediante l'esame immunohistochemico, che viene eseguito utilizzando degli anticorpi policlonali che si vanno a legare agli antigeni del parassita (Piergili Fioretti, 2010).

- PCR

La possibilità di amplificare il DNA del parassita è fondamentale per la diagnosi di infezione fetale nell'uomo (si esegue la PCR dal materiale prelevato mediante amniocentesi).

Questa tecnica viene usata anche per la ricerca del DNA nei tessuti degli animali, nel sangue, siero, liquor e umor acqueo. È una buona tecnica rispetto alla sierologia perché un risultato sierologico positivo sul liquor non permette di discriminare se l'infezione sia locale o ci sia stato un passaggio di IgG attraverso la barriera emato-encefalica. Se questa metodica viene utilizzata per fare diagnosi ante-mortem, deve essere associata al rilievo anticorpale mediante IFAT o ELISA (Piergili Fioretti, 2010).

- SIEROLOGIA DIRETTA

Nei soggetti immunodepressi possono essere usati i test ELISA e Western Blot per la ricerca degli antigeni circolanti (Piergili Fioretti, 2010).

Indiretta: permette di evidenziare la risposta immunitaria che l'organismo mette in atto quando entra in contatto con il parassita. I test sono numerosi ma quelli che si utilizzano maggiormente sono l'ELISA, l'IFAT, l'Avidity Test e il MAT. L'ELISA è il test più accreditato perché altamente standardizzato, e assieme all'IFAT, è considerato il test di riferimento per la diagnosi perché riesce a saggiare tutte le classi anticorpali. L'Avidity Test misura l'affinità funzionale delle IgG specifiche per *T. gondii*, perciò permette di distinguere tra infezione recente (bassa affinità) e cronica (elevata affinità). Il MAT è un test di agglutinazione che viene indicato per gli studi epidemiologici negli animali domestici e selvatici perché è semplice e non è richiesto l'utilizzo di reagenti specie-specifici (Piergili Fioretti, 2010).

Gli anticorpi che l'organismo produce sono: IgM, compaiono nel siero già 5 giorni post infezione, sono massime dopo 2-3 settimane e scompaiono dopo 3-6 mesi; IgG, compaiono dalla seconda settimana, raggiungono il picco dopo 2-3 mesi, diminuiscono in 1-2 anni e possono permanere per tutta la vita dell'individuo; IgA prodotte in modo incostante in un momento intermedio tra IgM e IgG e scompaiono dopo circa un anno (Pietrobelli, 2003).

3.9 Terapia

I farmaci anti-*Toxoplasma* più utilizzati in umana sono associazioni di antifolici (pirimetamina + sulfadiazina), macrolidi (soprattutto spiramicina) e clindamicina (Brandonisio, 2006). La spiramicina è un buon farmaco per prevenire l'infezione fetale perché è ben tollerata dalla madre, non ha effetti teratogeni sul feto e possiede un'eccellente attività antiparassitaria (Pietrobelli, 2003).

Nel gatto si usa la clindamicina (10-12,5 mg/Kg) che riduce gli effetti collaterali, oppure la pirimetamina associata a sulfamidici e acido folico. Secondo Pagini (2003) l'uso della pirimetamina può non essere idoneo in tutti i gatti, perché può essere tossico anche se somministrata in piccole dosi.

3.10 Profilassi

Una corretta profilassi rappresenta il modo migliore per evitare l'infezione e le conseguenze sia negli animali che nell'uomo.

Gatto

Se vive solo in appartamento è sufficiente non alimentarlo con carni o visceri crudi o poco cotti (come fegato e polmone) e proteggere dalle mosche gli alimenti (potrebbero fungere da vettori di oocisti mature).

Se vive anche all'esterno l'unico modo per proteggerlo veramente è effettuare almeno una volta l'anno un esame sierologico, in quanto può entrare a contatto con altri gatti o cibarsi di ospiti recettivi (Pietrobelli, 2003).

Uomo

Il Sistema Nazionale delle Linee Guida dell'Istituto Superiore di Sanità (SNLG, 2010) ha fornito delle indicazioni sulle precauzioni che bisogna adottare per prevenire l'infezione, soprattutto in caso in cui ci si riferisca ad una donna gravida:

- lavare frutta e verdura (incluse le insalate già preparate) prima della manipolazione e del consumo, soprattutto se proviene da orti dove i gatti hanno libero accesso
- lavare le mani prima, durante e dopo la preparazione degli alimenti
- cuocere bene la carne e le pietanze surgelate già pronte ed evitare le carni crude conservate, come prosciutto e insaccati
- evitare il contatto con le mucose dopo aver manipolato la carne cruda
- non bere latte non pastorizzato
- evitare il contatto con terriccio potenzialmente contaminato da feci di gatto (eventualmente indossare i guanti e successivamente lavare bene le mani)
- eliminare quotidianamente le feci del gatto ma evitarne il contatto diretto con le mani (eventualmente indossare i guanti nel cambiare la lettiera e successivamente lavare bene le mani).
- ridurre il contatto con gatti randagi

Rimane fondamentale la collaborazione tra medici veterinari e umani per informare le persone sulle corrette procedure di prevenzione. Come si può dedurre dalle linee guida, anche una donna in gravidanza può vivere tranquillamente a contatto con il suo gatto di casa: sembrano avere, infatti, maggior peso le indicazioni relative alla manipolazione degli alimenti.

3.11 Legislazione

Il D.M. 15/12/90 obbliga la notifica delle malattie infettive da parte dei medici: nella classe V tra le zoonosi previste dal Regolamento di Polizia Veterinaria non viene però menzionata la toxoplasmosi.

Questa zoonosi viene finalmente nominata nell'allegato I (articolo 4, comma 3) del D.L. nr° 191 del 04.04.2006 (attuazione della direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici): "Elenco delle zoonosi e degli agenti zoonotici da sottoporre a sorveglianza in funzione della situazione epidemiologica". Nonostante questo non esistono dati epidemiologici indicativi della diffusione nazionale dell'infezione negli animali e nell'uomo; inoltre non ci sono dati sulla presenza del parassita negli alimenti (Piergili Fioretti, 2010).

La Comunità Europea, al fine di controllare la malattia nell'uomo e negli animali, e di individuare le sorgenti di infezione più importanti, ha incaricato la European Food Safety Authority (EFSA) di fornire indicazioni su quali metodi diagnostici permettano di evidenziare il parassita, sia negli animali che negli alimenti. Poiché non esiste un metodo diagnostico veloce da poter effettuare al macello, e macroscopicamente le cisti terminali non possono essere individuate dal Veterinario Ispettore, l'EFSA raccomanda di effettuare le indagini a livello di produzione primaria, cioè negli allevamenti di ovini, caprini, suini e nella selvaggina (programma di biosicurezza 2007-2013 CE) (Piergili Fioretti, 2010).

3.12 *Toxoplasma gondii* nella Volpe (*Vulpes vulpes*)

La toxoplasmosi, come già detto, è ampiamente diffusa nel mondo. Dubey e Odening (2001) affermano che un numero significativo di animali selvatici, tra cui anche canidi selvatici, risulta sieropositivo.

Per poter avere una visuale più ampia della prevalenza di *T. gondii* nella volpe riporto di seguito alcuni lavori svolti nell'ultimo decennio in Europa.

- Jakubek *et al.* (2001) hanno analizzato il siero di 221 volpi provenienti da varie parti della Svezia e lo hanno analizzato mediante iscom ELISA: il 38% (84 volpi) presentava anticorpi nei confronti di *T. gondii*. Questo indica che nel periodo in esame l'infezione di *T. gondii* era abbastanza comune in gran parte della Svezia e secondo gli Autori la volpe potrebbe essere un indicatore della presenza di toxoplasmosi negli animali predati. Contemporaneamente in queste volpi si è ricercato *N. caninum* (Tab. 3.3).
- Wanha *et al.* (2005) hanno prelevato il siero per la ricerca di anticorpi, mediante IFAT, contro *T. gondii* da 94 volpi cacciate e 242 cani (*Canis familiaris*) in Austria: il 35% delle volpi e il 26% dei cani è risultato positivo. Contemporaneamente hanno ricercato anticorpi contro *N. caninum* (Tab. 3.3).
- In Gran Bretagna Hamilton *et al.* (2005) hanno analizzato l'essudato polmonare proveniente da 549 volpi mediante IFAT, rinvenendo anticorpi nei confronti di *T. gondii* nel 20% delle volpi. È stata ricercata anche la prevalenza di *N. caninum* (Tab. 3.3).
- Da questo stesso gruppo di volpi Smith *et al.* (2003) hanno prelevato a random 61 campioni di lingua e ricercato *T. gondii* mediante PCR. Il DNA del parassita non è stato però riscontrato, ma questa discrepanza tra sierologia e tecniche molecolari non è stata correlata a problemi di tecnica diagnostica o al tipo di tessuto utilizzato. Hanno eseguito inoltre altri campionamenti per ricercare altri due importanti parassiti zoonosici, *Echinococcus* e *Trichinella*, e alcuni parassiti intestinali (Tab. 3.3).
- Siragusa *et al.* (2004) hanno raccolto 5 campioni di siero di volpi che vivevano in Campania (delle quali 2 in un'area protetta del WWF) e hanno riscontrato una sola positività nei confronti di *T. gondii*. La volpe non proveniva dall'area protetta. Ulteriori indagini sono state fatte nei confronti di *N. caninum*, *Leishmania infantum*, *Rickettsia conorii*, *Leptospira spp.* (Tab. 3.3).

- Hurková e Modrý (2006) in Repubblica Ceca hanno eseguito analisi molecolari su carnivori selvatici alla ricerca di *T. gondii*. Dalle volpi sono stati isolati 152 campioni di cervello e analizzati mediante PCR, dando positività in 2 (1.3%) volpi. Si rimanda alla Tab. 3.3 per la prevalenza di *N. caninum*.
- Jakubek *et al.* (2007) hanno prelevato il siero di 337 volpi originariamente catturate per il programma nazionale contro la rabbia in Ungheria e lo hanno analizzato mediante iscom ELISA: il 68% di queste (228) presentava anticorpi contro *T. gondii*. L'elevata sieroprevalenza sembra essere dovuta alla forte presenza del parassita nelle prede della volpe, ad esempio la lepre europea (*Lepus europaeus*) e la lepre bianca (*Lepus timidus*). Contemporaneamente hanno ricercato anticorpi contro *N. caninum* (Tab. 3.3).
- Murphy *et al.* (2007) hanno eseguito le loro ricerche per *T. gondii* su volpi provenienti dalle zone rurali dell'Irlanda prelevando il versamento toracico da 206 volpi e il cervello da 148. Gli anticorpi sono stati rilevati nel versamento toracico del 56% delle volpi (115); l'analisi istologica dei cervelli ha evidenziato lesioni tipiche da encefaliti parassitarie nel 22% dei preparati. La PCR è stata quindi utilizzata in questi campioni di cervello con evidenti alterazioni per amplificare il DNA di *T. gondii*, che è stato riscontrato solo in una volpe (3%), la quale era risultata anche sieropositiva. L'elevata sieroprevalenza è un segno di quanto il parassita sia presente nell'ambiente e di come debba essere tenuto sotto controllo a causa dell'infezione che può causare all'uomo e alle pecore. Si rimanda alla Tab. 3.3 per la prevalenza degli altri parassiti ricercati (*N. caninum* e *Encephalitozoon spp.*)
- Sobrino *et al.* (2007) hanno analizzato il siero di 102 volpi provenienti da diverse regioni della Spagna mediante il MAT e hanno riscontrato anticorpi nel 64.7% (66) dei casi (Tab. 3.3). Le analisi sono state condotte anche in altri animali selvatici della Spagna e l'elevato riscontro sierologico dimostra come la fauna selvatica sia ampiamente a contatto con il parassita e come alcuni animali (come la lince e il gatto selvatico europeo) possano avere un significato epidemiologico nella sua diffusione.
- Aubert *et al.* (2010) hanno voluto individuare il genotipo di *T. gondii* in alcuni animali selvatici presenti in Francia, vista la carenza di informazioni riguardo al genotipo del parassita circolante in Europa. 14 volpi su 19 sono risultate positive sierologicamente mediante il MAT, perciò l'omogenato del cuore

proveniente da 13 di queste volpi positive è stato inoculato singolarmente in topi da laboratorio. L'isolamento di *T. gondii* ha avuto successo in 9 campioni (69%) ed è stato in seguito analizzato mediante PCR-RFLP. I risultati indicano che tutti e 9 i genotipi appartengono al tipo II (non virulenti per il topo).

- Mancianti *et al.* (2010) hanno potuto eseguire delle analisi su due gruppi di volpi cacciate in provincia di Pisa in annate differenti. Dal primo gruppo di 79 volpi hanno prelevato il versamento emorragico addominale o toracico e lo hanno analizzato solamente mediante IFAT, ottenendo il 52% di sieropositività. Del secondo gruppo di 50 volpi, solo 31 sono state esaminate in parallelo sia mediante IFAT che PCR (muscolo cardiaco) e delle 15 risultate sieropositive (48.8%), solo 5 (16,1%) sono risultate positive anche alla PCR. La percentuale di positività si abbassa al 10%, se si considerano solo i risultati relativi alla PCR, che è stata effettuata in realtà su tutti 50 campioni del secondo gruppo (Tab. 3.3).
- De Craeye *et al.* (2011) sono andati a ricercare *T. gondii* in volpi e in cervidi in Belgio, per capirne la diffusione in ambiente selvatico, vista l'elevata sieroconversione delle donne in gravidanza nel Paese. Hanno analizzato 304 cervelli di volpi mediante real-time PCR e la positività è stata ottenuta su 57 (18.8%) campioni. Di 26 campioni positivi alla PCR hanno eseguito la genotipizzazione riscontrando il genotipo II in 25 volpi e il genotipo III in una sola. Hanno indagato, inoltre, la prevalenza di *N. caninum* (Tab. 3.3).
- Lopes *et al.* (2011) hanno eseguito la ricerca di *T. gondii* in numerosi animali selvatici del Portogallo, comprese 6 volpi che sono risultate tutte positive al MAT test (Tab. 3.3).

PREVALENZA DI <i>T. gondii</i>	N° CAMPIONI POSITIVI	N° CAMPIONI TESTATI	METODO DIAGNOSTICO	AUTORI
38%	84	221	DAT su siero	Jakubek <i>et al.</i> 2001 ¹
0%	0	61	PCR su lingua	Smith <i>et al.</i> 2003 ²
20%	1	5	IFAT su siero	Siragusa <i>et al.</i> 2004 ³
35%	34	94	IFAT su siero	Wanha <i>et al.</i> 2005 ⁴
20%	111	549	IFAT su estratto polmonare	Hamilton <i>et al.</i> 2005 ⁵
1.3%	2	152	PCR su cervello	Hurková e Modrý 2006 ⁶
68%	228	337	DAT su siero	Jakubek <i>et al.</i> 2007 ⁷
56%	6	206	IFAT su versamento toracico	Murphy <i>et al.</i> 2007 ⁸
0.7%	1	33	PCR su cervello	
64.7%	66	102	MAT su siero (cuore+versamento toracico+vasi)	Sobrinho <i>e al.</i> 2007
73.7%	14	19	MAT su siero (cavità toracica)	Aubert <i>et al.</i> 2010
69%	9	13	Isolamento su topo da cuore	
52%	41	79	IFAT su versamento toracico e addominale	Mancianti <i>et al.</i> 2010
10%	5	50	PCR su muscolo cardiaco	
48.4%	15	31	IFAT su versamento toracico e addominale	
66.9%	184	275	DAT su siero	Akerstedt <i>et al.</i> 2010 ⁹
18.8%	57	304	real-time PCR su cervello	De Craeye <i>et al.</i> 2011 ¹⁰
100%	6	6	MAT su siero	Lopes <i>et al.</i> 2011

Tabella 3.3. Prevalenze di *T. gondii* nella volpe (*Vulpes vulpes*) riscontrate in Europa dal 2001 al 2011. I numeri in apice si riferiscono alle altre patologie ricercate dagli autori nel medesimo studio, sempre nelle volpi, che vengono riportate nell'appendice sottostante.

	Autori	Patogeno	n °Camp.Test.	Prevalenza
1	Jakubek <i>et al.</i> 2001	<i>Neospora caninum</i>	221	0%
2	Smith <i>et al.</i> 2003	<i>Dipylidium caninum</i>	588	0.7%
		<i>Echinococcus</i> spp.	588	0%
		<i>Trichinella</i> spp.	587	0%
		<i>Trichuris vulpis</i>	588	0.3%
		<i>Toxocara canis</i>	588	62%
		<i>Toxoscaris leonina</i>	588	0.3%
		<i>Uncinaria stenocephala</i>	588	41%
3	Siragusa <i>et al.</i> 2004	<i>Leishmania infantum</i>	5	0%
		<i>Leptospira interrogans</i>	5	40%
		<i>Neospora caninum</i>	5	0%
		<i>Rickettsia conorii</i>	5	40%
4	Wanha <i>et al.</i> 2005	<i>Neospora caninum</i>	94	0%
5	Hamilton <i>et al.</i> 2005	<i>Neospora caninum</i>	549	0.9%
6	Hurková e Modrý 2006	<i>Neospora caninum</i>	152	4.6%
7	Jakubek <i>et al.</i> 2007	<i>Neospora caninum</i>	337	1.5%
8	Murphy <i>et al.</i> 2007	<i>Encephalitozoon</i> spp.	2	100%
		<i>Neospora caninum</i>	206	3%
		<i>Neospora caninum</i>	33	0%
9	Akerstedt <i>et al.</i> 2010	<i>Canine Distemper virus</i>	275	9.6 – 12.3%
		<i>Canine Adenovirus</i>	275	59.6%
		<i>Leptospira interrogans</i>	275	9.9%
10	De Craeye <i>et al.</i> 2011	<i>Neospora caninum</i>	304	6.6%

Appendice della Tabella 3.3.

Caso clinico

La toxoplasmosi nella volpe ha un andamento generalmente subclinico.

Occasionalmente sono stati riportati casi di infezione acuta di toxoplasmosi associata a infezione da cimurro in Danimarca (Møller, 1952) e negli USA (Helmboldt e Jungherr, 1955; Møller e Nielsen, 1964; Reed e Turek, 1985).

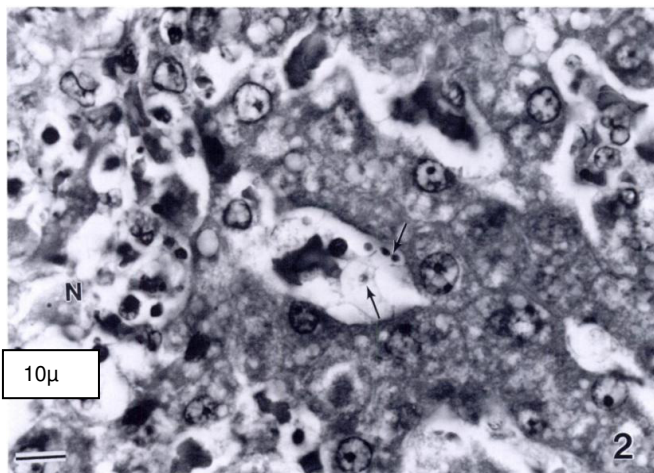
Dubey *et al.* (1990) descrivono un caso di toxoplasmosi acuta primaria in una volpe non associato all'infezione del cimurro. La volpe (femmina), catturata dai guardia parco nel West Fairmount Park a Philadelphia in Pennsylvania (USA), presentava movimenti incoordinati e sembrava non rendersi conto di ciò che la circondava; in decubito laterale compiva movimenti di pedalamento e tentava di mordere gli operatori. Dopo il decesso, naturale, la carcassa è stata sottoposta ad autopsia.

All'esame anatomico-patologico le condizioni di salute generale erano buone. Nel fegato, aumentato di volume, sono stati riscontrati numerosi noduli biancastri disseminati e approfonditi nel parenchima. Noduli simili, anche se isolati, erano presenti nei polmoni.

Il tessuto cerebrale è stato sottoposto al FAT (Fluorescent Antibody Testing) per ricercare gli antigeni della rabbia, ma il test ha dato esito negativo.

È stato prelevato il sangue dal cuore per eseguire un esame sierologico e sono stati riscontrati gli anticorpi contro *T. gondii* sia nel siero diluito 1:8 che 1:4. Il titolo anticorpale basso può essere legato allo stadio acuto dell'infezione.

Campioni di tessuto proveniente da vari organi (cuore, pelle, polmoni, reni, surreni, pancreas, milza, stomaco, intestino, linfonodi, vescica, lingua, massetere e cervello) sono stati prelevati e fissati in formalina per eseguire l'esame immunostochimico. La maggior parte delle lesioni sono state riscontrate a livello di fegato: foci necrotici, emorragia, detriti e istiociti; tachizoiti sono stati trovati negli epatociti, nei macrofagi e liberi nei sinusoidi.



Necrosi (N) degli epatociti e tachizoiti (freccie) di *T. gondii* nel fegato di volpe. (Dubey *et al.*, 1990)

A livello di cuore, lingua, polmoni, pancreas e surrenali sono stati trovati foci isolati di necrosi e sono stati osservati un numero variabile di tachizoiti. Nella muscolatura striata, inoltre, vi era una forte risposta infiammatoria per la presenza di istiociti. Nel sottocute sono state osservate due aree di necrosi con alcuni tachizoiti alla periferia delle lesioni. Nel cervello, cervelletto e tronco encefalico sono stati rilevati noduli gliali sparsi ma in nessuna sezione è stato riscontrato il protozoo.

I tachizoiti presenti nel fegato, nei polmoni, nella lingua e nelle ghiandole surrenali sono stati marcati positivamente utilizzando un siero anti *T. gondii*, mentre hanno dato esito negativo nei confronti del siero anti *Neospora caninum*.

Batteri o inclusioni virali non erano presenti in alcun tessuto.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Campionamento

Durante la stagione venatoria 2009-2010 la Regione Autonoma Valle d'Aosta (RAVA) ha predisposto un apposito calendario venatorio che consentiva ai cacciatori l'abbattimento di un numero illimitato di volpe rossa (*Vulpes vulpes*), in "caccia vagante" dal 20-09-2009 al 18-11-2009 e in "caccia in battuta" dal 21-11-2009 al 21-01-2010. Le carcasse delle volpi abbattute venivano consegnate al Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Animali Selvatici (Ce.R.M.A.S.) presso la sezione di Aosta dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta per essere sottoposte ad esame necroscopico e alla ricerca della rabbia silvestre e di altre zoonosi come ad esempio la trichinellosi e le infezioni da *Salmonella* spp.

Il periodo che poteva intercorrere tra l'abbattimento e il conferimento delle carcasse di volpe era variabile, da qualche ora fino ad un paio di giorni. Presso il Ce.R.M.A.S. ogni carcassa pervenuta veniva consegnata insieme ad uno specifico foglio di accompagnamento che riportava i dati richiesti al cacciatore (sesso, età stimata, luogo di abbattimento, data del prelievo, eventuale sintomatologia clinica o alterazioni del comportamento ecc.). Stabilita l'idoneità del campionamento da parte dell'operatore di accettazione del Ce.R.M.A.S. le carcasse venivano codificate con un apposito numero di accettazione informatizzato. Una volta giunte al laboratorio di diagnostica veniva prelevata la testa di ogni singola carcassa di volpe per essere inviata al Laboratorio di Patologia Animale presso la sede centrale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta per la ricerca del virus della rabbia mediante Immunofluorescenza Diretta (IFD) su materiale cerebrale. Effettuata questa operazione le carcasse venivano stoccate, prive della testa, in congelatore a -20°C. Soltanto le carcasse degli animali risultati negativi alla ricerca del virus della rabbia venivano sottoposti ad esame necroscopico. Nell'ambito di questa tesi, durante il periodo ottobre-dicembre 2009, sono state effettuate in totale 137 autopsie, durante le quali si è proceduto, quando possibile, a campionare diversi organi, tra cui porzioni di midollo allungato per la ricerca di CDV e di cuore per la ricerca di *Toxoplasma gondii*. Tutti i campioni effettuati sono stati posti in provette

Eppendorf (capacità 1,5 ml) appositamente etichettate e sono stati congelati a -80° C fino al momento della spedizione presso la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Padova, dove sono state svolte le analisi sotto descritte.

4.2 Analisi molecolare per la ricerca di CDV

Per la ricerca di *Canine Distemper Virus* sono stati esaminati 70 campioni di midollo allungato e le analisi sono state effettuate presso il Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, laboratorio di Malattie Infettive.

ESTRAZIONE DELL'RNA

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata mediante l'uso del kit "High Pure Paraffin kit" (Roche). La quantità di tessuto richiesta per questo kit è di 20-30 mg. Ad ogni campione vengono aggiunti 400 µl di *Tissue Lysis Buffer* e 200 mg di silica beads che servono per l'omogenazione effettuata mediante Ribolyzer (Hybaid) ripetendo 2 volte il ciclo con velocità 5 per 15 sec. L'omogenato così ottenuto viene centrifugato al massimo dei giri per 2 min e al surnatante vengono aggiunti 1 ml di Binding Buffer e 600 µl di etanolo assoluto. La soluzione viene poi caricata su colonnine con filtro di natura silicica e sottoposta agli opportuni lavaggi con le soluzioni fornite dal kit. Gli acidi nucleici presenti sulla membrana vengono poi eluiti con Elution Buffer e digeriti con DNasi a 37° C per 45 min. Al termine della digestione vengono aggiunti 20 µl di *Tissue Lysis Buffer*, 18 µl di SDS al 10% e 40 µl di *Proteinase K Working Solution*. Dopo un'incubazione a 55° C per 1 ora si aggiungono 325 µl di Binding Buffer e 325 µl di etanolo assoluto. La soluzione viene caricata su una seconda colonnina e sottoposta agli opportuni lavaggi con le soluzioni fornite dal kit. L'eluizione finale dell'RNA viene effettuata con 70 µl di Elution Buffer.

La sospensione di RNA ottenuta è stata divisa in 2 aliquote e conservata a -70° C.

REAL-TIME PCR

L'identificazione di RNA di CDV nei campioni estratti è avvenuta mediante una One Step SybrGreene RT real-time PCR utilizzando la coppia di primer universali descritta da Saliki *et al.* (2002) per l'amplificazione di una porzione di 83 pb del gene codificante per la proteina P di CDV, CeMV e PDV.

La reazione di amplificazione è stata eseguita utilizzando lo strumento Light Cycler 480 (Roche) utilizzando il kit 1-Step QRT PCR Kit Kapa SybrFast Universal (Kapa BioSystems).

Per ogni esperimento sono sempre stati inclusi un controllo positivo ed un bianco. Come controlli positivi sono stati utilizzati: RNA di CDV (Bussel strain, batch 1/10-1) fornito gentilmente dal laboratorio di virologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, sede di Legnaro; RNA estratto da un campione di rene proveniente da balenottera comune (*Balaenoptera physalus*) infetta da DMV; RNA estratto da un campione di cuore proveniente da stenella striata (*Stenella coeruleoalba*) infetta da DMV.

Ciascuna reazione è stata eseguita in un volume finale di 10 µl con la seguente composizione:

- 1x Kapa 1step qprobe mm
- 0,8 µM Primer F (5'-ATT AAA AAG GG(G/C) ACA GGA GAG AGA TCA GCC-3')
- 0,4 µM Primer R (5'-ATT GGG TTG CAC CAC TTG TC-3')
- 1x Kapa RT mix
- 2 µl di RNA target

Il profilo termico di retro-trascrizione e di amplificazione prevede:

- 42° C per 5 min (RT)
- 95° C per 5 min (attivazione Taq polimerasi)

40 ripetizioni del seguente ciclo (la lettura della fluorescenza è effettuata al termine di ciascuna fase di annealing - estensione):

- 95° per 3 sec (denaturazione)
- 55° C per 20 sec (annealing)
- 72° C per 1 sec (estensione)

La curva di denaturazione viene ottenuta applicando il seguente profilo termico:

- 95° C per 1 min
- 65° C per 1 min con successivo passaggio a 95° C con lettura in continuo della fluorescenza

L'analisi dei risultati è stata eseguita utilizzando il LightCycler 480 Software 1.5.0 SP3 in dotazione allo strumento.

I campioni vengono considerati positivi quando almeno una delle temperature di *melting* dei prodotti di amplificazione è sovrapponibile a quella dei controlli positivi.

4.3 Analisi molecolare per la ricerca di *Toxoplasma gondii*

Per la ricerca di *T. gondii* sono stati esaminati 70 campioni di cuore e le analisi sono state effettuate presso il Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie, laboratorio di Parassitologia e Malattie Parassitarie.

ESTRAZIONE DEL DNA

L'estrazione del DNA è stata effettuata mediante l'uso del kit: "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche). La quantità di tessuto richiesta per questo kit è tra i 20 e 50 mg; ad ogni campione viene aggiunto il Lysis Buffer, proteinasi K e incubato a 55° C per un'ora circa o comunque fino ad una completa disgregazione del tessuto. Successivamente viene aggiunto il Binding Buffer e incubato a 70° C per 10 minuti per permettere il legame con il DNA. A questo punto si aggiunge isopropanolo e si fissa il DNA mediante filtrazione del lisato su delle colonnine che possiedono un filtro di natura silicica; per ottenere un DNA privo di impurità si effettuano vari lavaggi con un buffer apposito.

PCR (Polimerase Chain Reaction)

Il protocollo di amplificazione del DNA prevede la formazione di una miscela (30 µl totale) con la seguente composizione:

- 1x PCR Buffer
- 2 mM MgCl₂
- 0,2 mM dNTPs
- 0,3 µM Primer COC1 (5'-AAG TAT AAG CTT TTA TAC GGC T-3')
- 0,3 µM Primer COC2 (5'-CAC TGC CAC GGT TAG CCA ATA C-3')
- 2 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen)
- 1-3 µl DNA

La miscela viene sottoposta al seguente profilo termico di amplificazione utilizzando lo strumento TPersonal (Biometra) per ottenere un amplificato di dimensioni pari a circa 300pb:

- 95° C per 5 min (attivazione Taq polimerasi)

12 ripetizioni del seguente ciclo (con decremento di 0,5° C per ciclo):

- 94° C per 30 sec (denaturazione)

- 58° C per 30 sec (annealing)

23 ripetizioni del seguente ciclo:

- 94° C per 30 sec (denaturazione)
- 52° C per 30 sec (annealing)
- 72° C per 30 sec (estensione)

L'estensione finale viene ottenuta a 72° C per 7 min.

I prodotti di amplificazione ottenuti vengono conservati a 4° C fino alla loro analisi mediante elettroforesi eseguita in gel di agarosio al 2% e lasciata correre a 100 V per 35 min. La visualizzazione dei risultati viene effettuata mediante colorazione del gel con Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen) e successiva lettura con lo strumento Geldoc XR (Biorad). Come marcatori di peso molecolare per valutare la lunghezza delle bande sono stati usati i markers MK5 e MK8 della ditta Fermentas. Per l'acquisizione dell'immagine è stato utilizzato il programma Quantity One.

Poiché gli oligonucleotidi utilizzati amplificano una regione comune (nss-rRNA) per *T. gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis* (Ho *et al.*, 1996), se si ottiene una positività dal tracciato elettroforetico, è necessario sequenziare gli amplificati. Il sequenziamento viene eseguito dalla ditta BMR Genomics, Padova (<http://www.bmr-genomics.it/>), che utilizza un sequenziatore ABI 3730XL 96 capillari. I risultati ottenuti vengono analizzati tramite appaiamento con le sequenze depositate in GenBank™ mediante il software nucleotide-nucleotide ChromasPro versione 1.42 (Technelysium Pty Ltd., Australia).

5. RISULTATI















E' stato possibile effettuare le analisi molecolari sia per la ricerca di *Canine Distemper Virus* (CDV) sia per *T. gondii* su 70 delle 137 volpi sottoposte ad esame autoptico nel periodo in esame, analizzando rispettivamente midollo allungato e muscolo cardiaco.

In questo modo si è cercato di avere un dato quanto più omogeneo e completo sulla ricerca dei due patogeni e sulle possibili co-infezioni presenti nelle singole carcasse.

5.1 Luogo di prelievo delle volpi

Tutte le volpi utilizzate per le indagini sono state cacciate nella regione Valle d'Aosta, dove i Comuni sono raggruppati in stazioni forestali di competenza territoriale. Le stazioni forestali rappresentano i luoghi dove sono ubicati i centri di controllo della selvaggina e dove i cacciatori devono consegnare gli animali cacciati per poter essere controllati dagli Ufficiali Forestali e sottoposti a monitoraggio sanitario da parte del personale tecnico-veterinario del Ce.R.M.A.S. secondo apposita convenzione con l'Assessorato alla Sanità della Regione.

Nella cartina della Valle d'Aosta (Fig. 5.1) vengono indicati con il simbolo (📍) i Comuni in cui i cacciatori hanno prelevato le 70 volpi, suddivisi per stazione forestale. Le volpi analizzate sono pervenute presso 14 stazioni forestali, così suddivise: Prè St. Didier (n=4 da 3 Comuni), Morgex (n=2 da 2 Comuni), Villeneuve (n=2 da 1 Comune), Arvier (n=6 da 4 Comuni), Valpelline (n=6 da 2 Comuni), Aosta (n=10 da 5 Comuni), Etroules (n=5 da 2 Comuni), Aymailles (n=3 da 1 Comune), Nus (n=15 da 5 Comuni), Chatillon (n=4 da 2 Comuni), Antey St. André (n=10 da 4 Comuni), Antey Brusson (n=1 da 1 Comune), Verres (n=1 da 1 Comune), Pon St. Martin (n=1 da 1 Comune).

STAZIONI FORESTALI	
	PRE' ST. DIDIER
	MORGEX
	VILLENEUVE
	ARVIER
	VALPELLINE
	AOSTA
	ETROULES
	AYMAVILLES
	NUS
	CHATILLON
	ANTEY ST. ANDRE'
	ANTEY BRUSSON
	VERRES
	PON ST. MARTIN

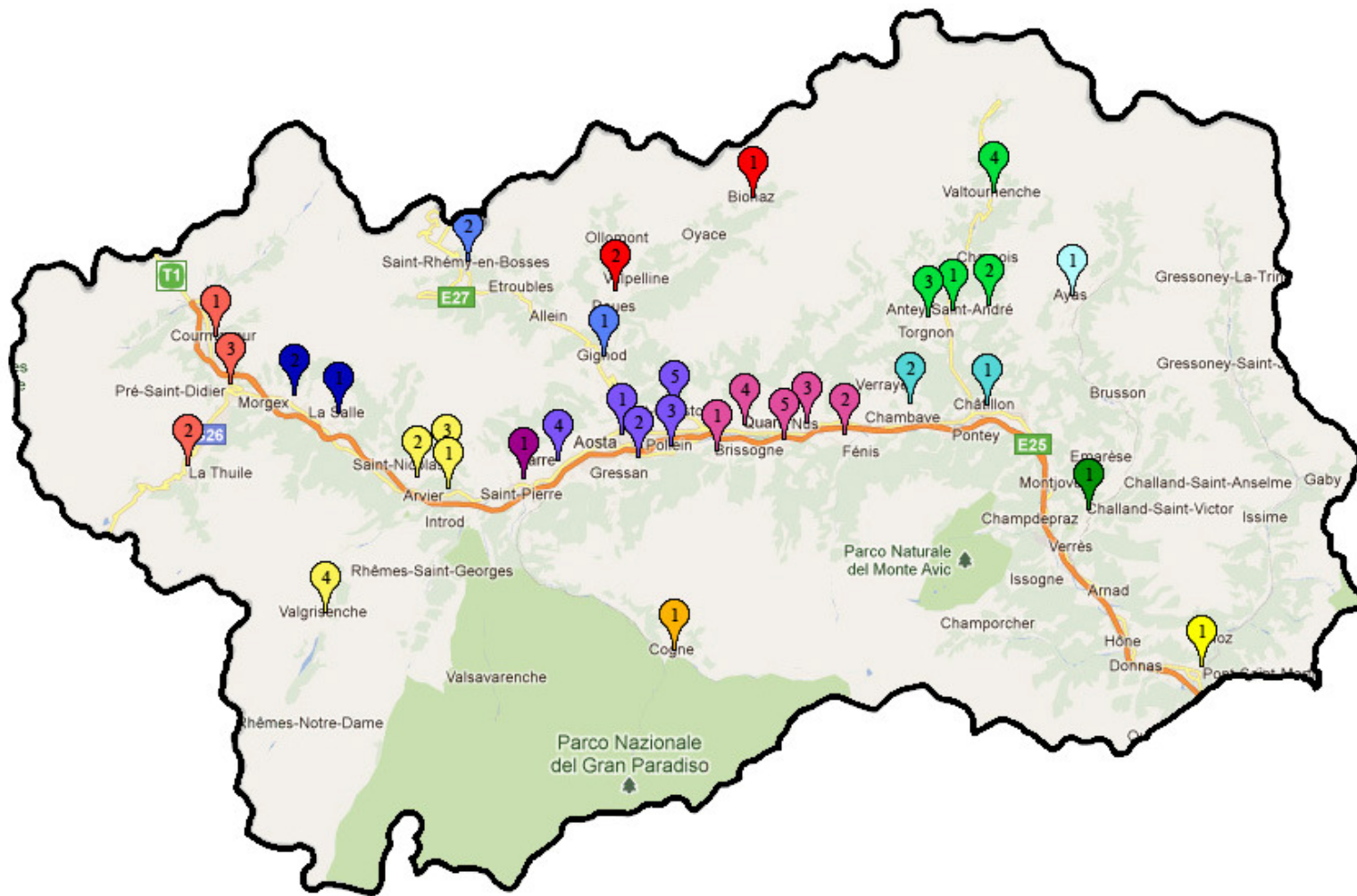



Figura 5.1. Comuni della Regione Valle d'Aosta dove sono state prelevate le 70 volpi. Ogni segnalino () con il numero corrisponde ad un Comune ed il colore indica la stazione forestale di appartenenza.

Nella Tab. 5.1 sono riportati i dati relativi agli animali esaminati (numero di identificazione presso la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Padova, codice di identificazione delle volpi accettate presso l'IZS di Aosta, anno di cattura delle volpi, Comune dove sono state cacciate, altitudine del Comune e stazione forestale di competenza).

Di seguito alla Tab. 5.1 è stata fatta una ricerca sui Comuni valdostani dove sono state prelevate le volpi e sono stati elencati suddivisi per stazione forestale: per ogni Comune sono indicati l'altitudine, la popolazione umana, l'estensione del territorio e il numero delle volpi cacciate in quel determinato territorio (con relativo codice di identificazione). Inoltre è stato possibile, quasi sempre, suddividere i territori di prelievo in base alle caratteristiche ambientali: urbano, extraurbano, rurale, silvestre, prateria alpina. Quando ciò non era possibile è stato indicato con "dato non disponibile".

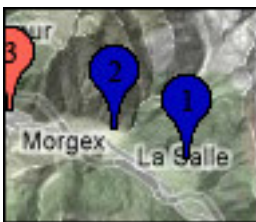
Cod.UNIV	Cod.IZS	ANNO	COMUNE	ALTITUDINE m.s.l.m	STAZIONE FORESTALE
1	110622	2009	BRISSOGNE	839	NUS
2	113427	2009	CHARVENSOD	749	AOSTA
3	114543	2009	QUART	535	NUS
4	113795	2009	NUS	529	NUS
5	110631	2009	ST. NICOLAS	1200	ARVIER
6	115613	2009	ST. NICOLAS	1200	ARVIER
7	113856	2009	TORGNON	1489	ANTEY ST. ANDRE'
8	110217	2009	DOUES	1176	VALPELLINE
9	113820	2009	COGNE	1534	AYMAVILLES
10	114531	2009	COURMAYEUR	1224	PRE' ST. DIDIER
11	112210	2009	CHATILLON	549	CHATILLON
12	113805	2009	SARRE	631	AOSTA
13	110186	2009	AVISE	775	ARVIER
14	113802	2009	ST. CHRISTOPHE	619	AOSTA
15	112628	2009	QUART	535	NUS
16	111208	2009	SARRE	631	AOSTA
17	110200	2009	TORGNON	1489	ANTEY ST. ANDRE'
18	103296	2009	SARRE	631	AOSTA
19	119422	2009	GIGNOD	988	ETROULES
20	110165	2009	GIGNOD	988	ETROULES
21	100932	2009	ST. RHEMY EN BOSSES	1619	ETROULES
22	117145	2009	MORGEX	923	MORGEX
23	101205	2009	PON ST. MARTIN	345	PONT ST. MARTIN
24	113827	2009	BIONAZ	1606	VALPELLINE
25	110181	2009	ARVIER	776	ARVIER
26	113797	2009	QUART	535	NUS
27	107996	2009	NUS	529	NUS
28	122836	2009	TORGNON	1489	ANTEY ST. ANDRE'
29	115619	2009	LA SALLE	1001	MORGEX
30	113823	2009	BIONAZ	1606	VALPELLINE
31	115942	2009	QUART	535	NUS
32	119532	2009	ANTEY ST. ANDRE'	1074	ANTEY ST. ANDRE'
33	114529	2009	COURMAYEUR	1224	PRE' ST. DIDIER
34	100506	2009	DOUES	1176	VALPELLINE
35	119950	2009	DOUES	1176	VALPELLINE
36	117152	2009	AOSTA	583	AOSTA
37	101389	2009	TORGNON	1489	ANTEY ST. ANDRE'
38	110211	2009	VALTOURNENCHE	1524	ANTEY ST. ANDRE'
39	119934	2009	CHARVENSOD	749	AOSTA
40	119418	2009	FENIS	541	NUS
41	115616	2009	ST. DENIS	820	CHATILLON
42	103055	2009	CHALLAND ST. VICTOR	744	VERRES
43	114548	2009	VALGRISENCE	1664	ARVIER
44	118876	2009	COGNE	1534	AYMAVILLES
45	100938	2009	ST. RHEMY EN BOSSES	1619	ETROULES
46	113799	2009	QUART	535	NUS
47	102208	2009	AYAS	1698	BRUSSON
48	117151	2009	ST. PIERRE	731	VILLENEUVE
49	117138	2009	QUART	535	NUS
50	119810	2009	AVISE	775	ARVIER
51	114540	2009	ST. PIERRE	731	VILLENEUVE
52	117148	2009	PRE' ST. DIDIER	1004	PRE' ST. DIDIER
53	118011	2009	DOUES	1176	VALPELLINE
54	101387	2009	TORGNON	1489	ANTEY ST. ANDRE'
55	110194	2009	TORGNON	1489	ANTEY ST. ANDRE'
56	117449	2009	CHATILLON	549	CHATILLON
57	119415	2009	CHATILLON	549	CHATILLON
58	110036	2009	NUS	529	NUS
59	117159	2009	LA MAGDELEINE	1644	ANTEY ST. ANDRE'
60	113800	2009	BRISSOGNE	839	NUS
61	100414	2009	LA THUILE	1450	PRE' ST. DIDIER
62	120446	2009	COGNE	1534	AYMAVILLES
63	113845	2009	ST. RHEMY EN BOSSES	1619	ETROULES
64	114539	2009	POLLEIN	551	AOSTA
65	117134	2009	BRISSOGNE	839	NUS
66	103305	2009	SARRE	631	AOSTA
67	110162	2009	NUS	529	NUS
68	113860	2009	VALTOURNENCHE	1524	ANTEY ST. ANDRE'
69	110028	2009	AOSTA	583	AOSTA
70	119946	2009	ST. MARCEL	625	NUS

Tabella 5.1: Codici identificativi delle 70 volpi sottoposte ad analisi e informazioni riguardo all'anno e al territorio di prelievo (Comune, altitudine, stazione forestale).



COMUNI CHE FANNO RIFERIMENTO ALLA STAZIONE FORESTALE DI PRE' ST. DIDIER

1. COURMAYEUR: comune che si trova a 1224 m di altitudine. Ha una popolazione di 2870 abitanti e un'estensione di 209,65 kmq. In questo territorio sono state cacciate 2 volpi (n. 010- 114531; n. 033- 114529), la prima in un ambiente extra-urbano/rurale, la seconda in un ambiente silvestre.
2. LA THUILE: comune che si trova a 1450 m di altitudine. Ha una popolazione di 767 abitanti e un'estensione 126,13 kmq. In questo territorio è stata cacciata una volpe (n. 061- 100414) in ambiente silvestre.
3. PRE' SAINT DIDIER: comune che si trova a 1004 m di altitudine. Ha una popolazione di 959 abitanti e un'estensione di 34 kmq. In questo territorio è stata cacciata una volpe (n. 052- 117148) in ambiente extra-urbano/rurale.



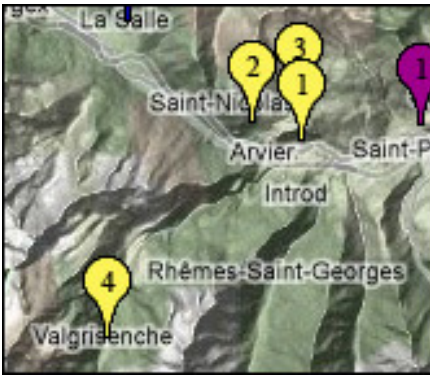
COMUNI CHE FANNO RIFERIMENTO ALLA STAZIONE FORESTALE DI MORGEX

1. LA SALLE: comune che si trova a 1001 m di altitudine. Ha una popolazione di 2071 abitanti e un'estensione di 83 kmq. In questo territorio è stata cacciata una volpe (n. 029- 115619) in ambiente silvestre.
2. MORGEX: comune che si trova a 923 m di altitudine. Ha una popolazione di 2091 abitanti e un'estensione di 43,3 kmq. In questo territorio è stata cacciata una volpe (n. 022- 117145) in ambiente silvestre.



COMUNI CHE FANNO RIFERIMENTO ALLA STAZIONE FORESTALE DI VILLENEUVE

1. SAINT PIERRE: comune che si trova a 731 m di altitudine. Ha una popolazione di 3134 abitanti e un'estensione di 26 kmq. In questo territorio sono state cacciate 2 volpi (n. 048- 117151; n. 051- 114540), la prima in ambiente silvestre, la seconda in ambiente extra-urbano/rurale.



COMUNI CHE FANNO RIFERIMENTO ALLA STAZIONE FORESTALE DI ARVIER

1. ARVIER: comune che si trova a 776 m di altitudine. Ha una popolazione di 900 abitanti e un'estensione di 33,35 kmq. In questo territorio è stata cacciata una volpe (n. 025- 110181) in ambiente extra-urbano/rurale.
2. AVISE: comune che si trova a 775 m di altitudine. Ha una popolazione di 896 abitanti e un'estensione di 33,4 kmq. In questo territorio sono state cacciate 2 volpi (n. 050- 119810; n. 013- 110186), la prima in ambiente silvestre, mentre per la seconda il dato non è disponibile.
3. SAINT NICOLAS: comune che si trova a 1200 m di altitudine. Ha una popolazione di 338 abitanti e un'estensione di 15 kmq. In questo territorio sono state cacciate 2 volpi (n. 005- 110631; n. 006- 115613), entrambe in ambiente extra-urbano/rurale.
4. VALGRISENCHE: comune che si trova a 1664 m di altitudine. Ha una popolazione di 195 abitanti e un'estensione di 113,26 kmq. In questo territorio è stata cacciata una volpe (n. 043- 114548) in ambiente extra-urbano/rurale.



COMUNI CHE FANNO RIFERIMENTO ALLA STAZIONE FORESTALE DI VALPELLINE

1. BIONAZ: comune che si trova a 1606 m di altitudine. Ha una popolazione di 241 abitanti e un'estensione di 142,8 kmq. In questo territorio sono state cacciate 2 volpi (n. 024- 113827; n. 030- 113823) entrambe in ambiente extra-urbano/rurale.
2. DOUES: comune che si trova a 1176 m di altitudine. Ha una popolazione di 480 abitanti e un'estensione di 16 kmq. In questo territorio sono state cacciate 4 volpi (n. 008- 110217; n. 034- 100506; n. 035- 119950; n. 053- 118011), la prima in ambiente silvestre, mentre le altre in ambiente extra-urbano/rurale.



COMUNI CHE FANNO RIFERIMENTO ALLA STAZIONE FORESTALE DI AOSTA

1. AOSTA: comune che si trova a 583 m di altitudine. Ha una popolazione di 35106 abitanti e un'estensione di 21,37 kmq. In questo territorio sono state cacciate 2 volpi (n. 069- 110028; n. 036- 117152), la prima in ambiente extra-urbano, la seconda in ambiente silvestre.
2. CHARVENSOD: comune che si trova a 749 m di altitudine. Ha una popolazione di 2518 abitanti e un'estensione di 25 kmq. In questo territorio sono state cacciate 2 volpi (n. 002- 113427; n. 039- 119934), la prima in ambiente silvestre, la seconda in ambiente extra-urbano/rurale.
3. POLLEIN: comune che si trova a 551 m di altitudine. Ha una popolazione di 1508 abitanti e un'estensione di 15 kmq. In questo territorio è stata cacciata una volpe (n. 064- 114539) in ambiente silvestre.
4. SARRE: comune che si trova a 631 m di altitudine. Ha una popolazione di 4836 abitanti e un'estensione di 28,10 kmq. In questo territorio sono state cacciate 4 volpi (n. 012- 113805; n. 016- 111208; n. 018- 103296; n. 066- 103305) tutte in ambienti extra-urbani/rurali.
5. SAINT CHRISTOPHE: comune che si trova a 619 m di altitudine. Ha una popolazione di 3280 abitanti e un'estensione di 14 kmq. In questo territorio è stata cacciata una volpe (n. 014- 113802) in ambiente silvestre.



COMUNI CHE FANNO RIFERIMENTO ALLA STAZIONE FORESTALE DI ETROULES

1. GIGNOD: comune che si trova a 988 m di altitudine. Ha una popolazione di 1589 abitanti e un'estensione di 25,96 kmq. In questo territorio sono state cacciate 2 volpi (n. 019- 119422; n. 020- 110165) entrambe in ambiente silvestre.
2. SAINT RHEMY EN BOSSES: comune che si trova a 1619 m di altitudine. Ha una popolazione di 376 abitanti e un'estensione di 65 kmq. In questo territorio sono state cacciate 3 volpi (n. 021- 100932; n. 063- 113845; n. 045- 100938), le prime 2 in ambiente silvestre, mentre la terza in ambiente extra-urbano/rurale.



COMUNI CHE FANNO RIFERIMENTO ALLA STAZIONE FORESTALE DI AYMAVILLES

1. COGNÉ: comune che si trova a 1534 m di altitudine. Ha una popolazione di 1490 abitanti e un'estensione di 212,85 kmq. In questo territorio sono state cacciate 3 volpi (n. 009- 113820; n. 044- 118876; n. 062- 120446), la prima in ambiente silvestre, le altre due in ambiente extra-urbano/rurale.



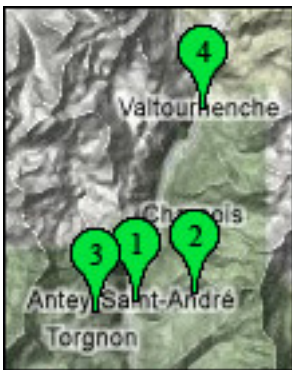
COMUNI CHE FANNO RIFERIMENTO ALLA STAZIONE FORESTALE DI NUS

1. BRISSOGNE: comune che si trova a 839 m di altitudine. Ha una popolazione di 957 abitanti e un'estensione di 25,5 kmq. In questo territorio sono state cacciate 3 volpi (n. 001- 110622; n. 060- 113800; n. 065- 117134) tutte in ambiente silvestre.
2. FÉNIS: comune che si trova a 541 m di altitudine. Ha una popolazione di 1756 abitanti e un'estensione di 68 kmq. In questo territorio è stata cacciata una volpe (n. 040- 119418) in ambiente silvestre.
3. NUS: comune che si trova a 529 m di altitudine. Ha una popolazione di 2907 abitanti e un'estensione di 57,38 kmq. In questo territorio sono state cacciate 4 volpi (n. 058- 110036; n. 067- 110162; n. 004- 113795; n. 027- 107996), le prime due in ambiente silvestre, la terza in una prateria alpina, mentre per la quarta il dato non è disponibile.
4. QUART: comune che si trova a 535 m di altitudine. Ha una popolazione di 3799 abitanti e un'estensione di 62 kmq. In questo territorio sono state cacciate 6 volpi (n. 003- 114543; n. 026- 113797; n. 046- 113799; n. 015- 112628; n. 031- 115942; n. 049- 117138), la prima in una prateria alpina, per la seconda e la terza il dato non è disponibile, mentre le rimanenti tre in ambiente extra-urbano/rurale.
5. SAINT MARCEL: comune che si trova a 625 m di altitudine. Ha una popolazione di 1266 abitanti e un'estensione di 42 kmq. In questo territorio è stata cacciata una volpe (n. 070- 119946) ma il dato dell'ambiente non è disponibile.



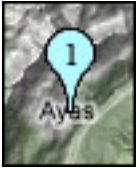
COMUNI CHE FANNO RIFERIMENTO ALLA STAZIONE FORESTALE DI CHATILLON

1. CHATILLON: comune che si trova a 549 m di altitudine. Ha una popolazione di 4948 abitanti e un'estensione di 39,77 kmq. In questo territorio sono state cacciate 3 volpi (n. 011- 112210; n. 057- 119415; n. 056- 117449), le prime due in ambiente silvestre mentre la terza in ambiente extra-urbano/rurale.
2. SAINT DENIS: comune che si trova a 820 m di altitudine. Ha una popolazione di 373 abitanti e un'estensione di 11 kmq. In questo territorio è stata cacciata una volpe (n. 041- 115616) in ambiente silvestre.



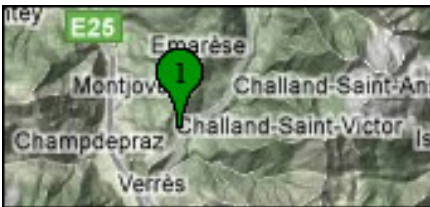
COMUNI CHE FANNO RIFERIMENTO ALLA STAZIONE FORESTALE DI ANTEY ST. ANDRE'

1. ANTEY SAINT ANDRE': comune che si trova a 1074 m di altitudine. Ha una popolazione di 622 abitanti e un'estensione di 11,8 kmq. In questo territorio è stata cacciata una volpe (n. 032- 119532) in ambiente silvestre.
2. LA MAGDELEINE: comune che si trova a 1644 m di altitudine. Ha una popolazione di 116 abitanti e un'estensione di 8 kmq. In questo territorio è stata cacciata una volpe (n. 059- 117159) in ambiente silvestre.
3. TORGNON: comune che si trova a 1489 m di altitudine. Ha una popolazione di 520 abitanti e un'estensione di 42 kmq. In questo territorio sono state cacciate 6 volpi (n. 055- 110194; n. 017- 110200; n. 007- 113856; n. 028- 122836; n. 037- 101389; n. 054- 101387), la prima in ambiente silvestre, della seconda il dato non è disponibile, mentre le altre quattro in ambiente extra-urbano/rurale.
4. VALTOURNENCHE: comune che si trova a 1524 m di altitudine. Ha una popolazione di 2211 abitanti e un'estensione di 115 kmq. In questo territorio sono state cacciate 2 volpi (n. 038- 110211; n. 068- 113860), la prima in ambiente silvestre, mentre della seconda il dato non è disponibile.



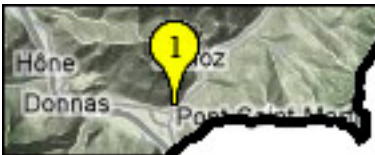
COMUNI CHE FANNO RIFERIMENTO ALLA STAZIONE FORESTALE DI ANTEY BRUSSON

1. AYAS: comune che si trova a 1698 m di altitudine. Ha una popolazione di 1345 abitanti e un'estensione di 129,9 kmq. In questo territorio è stata cacciata una volpe (n. 047- 102208) in ambiente extra-urbano/rurale.



COMUNI CHE FANNO RIFERIMENTO ALLA STAZIONE FORESTALE DI VERRÈS

1. CHALLAND SAINT VICTOR: comune che si trova a 744 m di altitudine. Ha una popolazione di 609 abitanti e un'estensione di 25 kmq. In questo territorio è stata cacciata una volpe (n. 042- 103055) in ambiente extra-urbano/rurale.



COMUNI CHE FANNO RIFERIMENTO ALLA STAZIONE FORESTALE DI PON ST. MARTIN

1. PONT SAINT MARTIN: comune che si trova a 345 m di altitudine. Ha una popolazione di 4009 abitanti e un'estensione di 6,88 kmq. In questo territorio è stata cacciata una volpe (n. 023- 101205) in ambiente extra-urbano/rurale.

5.2 Autopsie

Nella Tab. 5.2 sono riportati schematicamente gli esiti principali dei rilievi autoptici.

Cod.UNIV	Cod.IZS	SESSO	LOCALITA'	ESAME NECROSCOPICO
1	110622	F AD	BRISOGNE	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
2	113427	F AD	CHARVENSOD	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
3	114543	M AD	QUART	ANIMALE ABBATTUTO + presenza di rogna sarcoptica (vedi Fig. 5.2)
4	113795	-	NUS	ANIMALE ABBATTUTO + politraumatismo, carcassa priva del treno posteriore
5	110631	F AD	ST. NICOLAS	ANIMALE ABBATTUTO + carcassa parzialmente eviscerata ed in iniziale stato di putrefazione
6	115613	M AD	ST. NICOLAS	ANIMALE ABBATTUTO + carcassa in iniziale stato di putrefazione
7	113856	M AD	TORGNON	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
8	110217	M AD	DOUES	ANIMALE ABBATTUTO + carcassa in iniziale stato di putrefazione
9	113820	M AD	COGNE	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
10	114531	F GIOV	COURMAYEUR	ANIMALE ABBATTUTO + ernia diaframmatica (vedi Fig. 5.4)
11	112210	M AD	CHATILLON	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
12	113805	F AD	SARRE	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
13	110186	M AD	AVISE	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
14	113802	F AD	ST. CHRISTOPHE	ANIMALE ABBATTUTO + presenza di rogna sarcoptica e ascaridi (vedi Fig. 5.3)
15	112628	F AD	QUART	ANIMALE ABBATTUTO + carcassa parzialmente eviscerata ed in iniziale stato di putrefazione
16	111208	M AD	SARRE	ANIMALE ABBATTUTO + carcassa parzialmente eviscerata ed in iniziale stato di putrefazione
17	110200	-	TORGNON	ANIMALE ABBATTUTO + grave politraumatismo
18	103296	F AD	SARRE	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
19	119422	M AD	GIGNOD	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
20	110165	F AD	GIGNOD	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
21	100932	M AD	ST. RHEMY EN BOSSES	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
22	117145	M AD	MORGEX	ANIMALE ABBATTUTO + carcassa in stato di putrefazione

23	101205	M AD	PON ST. MARTIN	ANIMALE ABBATTUTO + presenza di rogna sarcoptica
24	113827	F AD	BIONAZ	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
25	110181	F AD	ARVIER	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
26	113797	M AD	QUART	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
27	107996	M AD	NUS	ANIMALE ABBATTUTO + carcassa parzialmente eviscerata ed in iniziale stato di putrefazione
28	122836	F SUBAD	TORGNON	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
29	115619	F GIOV	LA SALLE	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
30	113823	F AD	BIONAZ	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
31	115942	F AD	QUART	ANIMALE ABBATTUTO + presenza di rogna sarcoptica
32	119532	M AD	ANTEY ST. ANDRE'	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
33	114529	F AD	COURMAYEUR	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
34	100506	M AD	DOUES	ANIMALE ABBATTUTO + carcassa parzialmente eviscerata ed in iniziale stato di putrefazione
35	119950	M AD	DOUES	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
36	117152	M AD	AOSTA	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
37	101389	F AD	TORGNON	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
38	110211	M AD	VALTOURNENCHE	ANIMALE ABBATTUTO + carcassa in stato di putrefazione
39	119934	M AD	CHARVENSOD	ANIMALE ABBATTUTO + in buono stato di conservazione, obeso
40	119418	F GIOV	FENIS	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
41	115616	F AD	ST. DENIS	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
42	103055	M AD	CHALLAND ST. VICTOR	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
43	114548	M AD	VALGRISENCHE	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
44	118876	M AD	COGNE	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
45	100938	M AD	ST. RHEMY EN BOSSES	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
46	113799	F GIOV	QUART	ANIMALE ABBATTUTO + carcassa in stato di putrefazione
47	102208	M AD	AYAS	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
48	117151	F AD	ST. PIERRE	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
49	117138	F AD	QUART	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
50	119810	F AD	AVISE	ANIMALE ABBATTUTO + carcassa in stato di putrefazione

51	114540	M AD	ST. PIERRE	ANIMALE ABBATTUTO + politraumatismo grave, fratture multiple arti, iniziale stato di putrefazione
52	117148	M AD	PRE' ST. DIDIER	ANIMALE ABBATTUTO + presenza di rogna sarcoptica
53	118011	F AD	DOUES	ANIMALE ABBATTUTO + in buono stato di conservazione, obeso
54	101387	M SUBAD	TORGNON	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
55	110194	F AD	TORGNON	ANIMALE ABBATTUTO + in buono stato di conservazione, obeso
56	117449	M AD	CHATILLON	ANIMALE ABBATTUTO + carcassa in stato di putrefazione
57	119415	M AD	CHATILLON	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
58	110036	M AD	NUS	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
59	117159	M AD	LA MAGDELEINE	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
60	113800	M AD	BRISSOGNE	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
61	100414	M AD	LA THUILE	ANIMALE ABBATTUTO + carcassa parzialmente eviscerata ed in iniziale stato di putrefazione
62	120446	M AD	COGNE	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
63	113845	F AD	ST. RHEMY EN BOSSES	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
64	114539	M AD	POLLEIN	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
65	117134	M AD	BRISSOGNE	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
66	103305	M AD	SARRE	ANIMALE ABBATTUTO + carcassa in stato di putrefazione
67	110162	M AD	NUS	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
68	113860	F AD	VALTOURNENCHE	ANIMALE ABBATTUTO + carcassa in stato di putrefazione + ectoparassitosi (zecche <i>Ixodes</i>)
69	110028	F AD	AOSTA	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS
70	119946	F AD	ST. MARCEL	ANIMALE ABBATTUTO + in BCS

Tabella 5.2. Elenco degli esiti dei rilievi autoptici delle volpi cacciate. Per ogni volpe sono indicati i codici di identificazione, il sesso, la stima dell'età e il Comune dove è stata prelevata.

M=maschio / F=femmina

AD=adulto / SUBAD=sbuadulto / GIOV=giovane

BCS=buone condizioni di salute

Come si può vedere dalla Tab. 5.2 al momento dell'esame autoptico su 70 volpi (6 giovani/sub-adulti, 62 adulti e 2 non determinati) 46 (pari al 65,7%) erano in buone condizioni di salute: tre di queste avevano la carcassa ben conservata e presentavano un grosso strato di grasso sottocutaneo, tale da far pensare che in vita avessero a disposizione un'elevata quantità di cibo.

Le condizioni di salute di 18 volpi (pari al 25,7%) non si sono potute constatare con certezza in quanto di queste 14 erano in putrefazione più o meno marcata, probabilmente perché era intercorso troppo tempo tra il momento dell'abbattimento e quello del conferimento al Ce.R.M.A.S.; 2 presentavano politraumatismi e altre 2 presentavano sia putrefazione che politraumatismi. Su una delle carcasse in decomposizione (n. 68- 113860) sono state isolate zecche del genere *Ixodes*.

Infine su 6 volpi (pari al 8,5%) sono state riscontrate delle patologie macroscopicamente visibili: in particolare su 4 volpi lesioni cutanee tipiche della rogna sarcoptica (Fig. 5.2), in una volpe sia lesioni cutanee tipiche della rogna sarcoptica sia ascaridi intestinali (Fig. 5.3) e in una volpe un'ernia diaframmatica (Fig. 5.4).

Per la ricerca del virus del cimurro e di *T. gondii* non si è potuto effettuare il prelievo di materiale cerebrale (materiale considerato più idoneo) perché data l'emergenza rabbia silvestre in Italia si è data la precedenza alla ricerca del virus della rabbia. Per ridurre il rischio di un eventuale contagio gli operatori che hanno manipolato le carcasse di volpe possedevano regolare vaccinazione antirabbica. Tutte le volpi analizzate per questa tesi di laurea sono risultate negative per la ricerca del virus della rabbia.

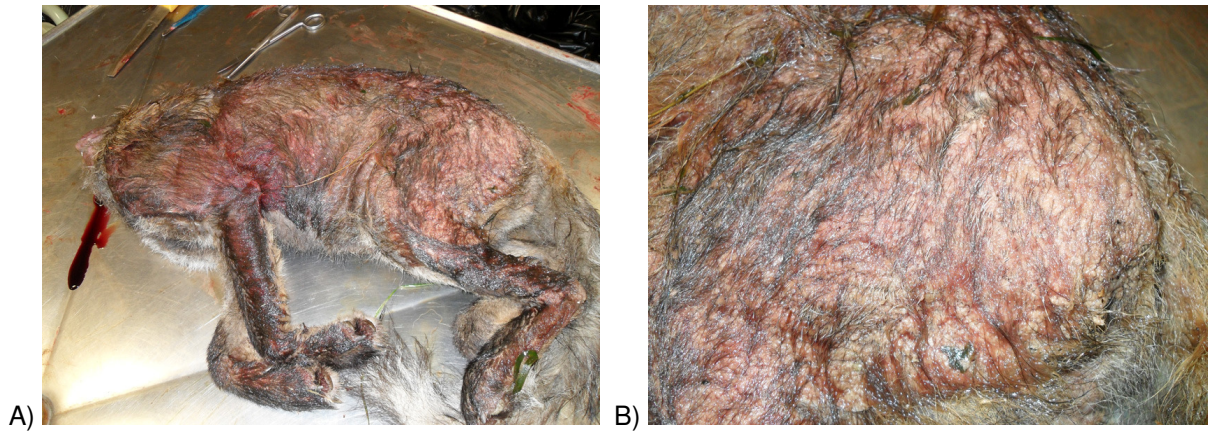


Figura 5.2. Rogna sarcoptica. Lesioni cutanee nella volpe n. 003-114543. A) visione della carcassa intera privata della testa. B) particolare delle lesioni a livello del posteriore sinistro

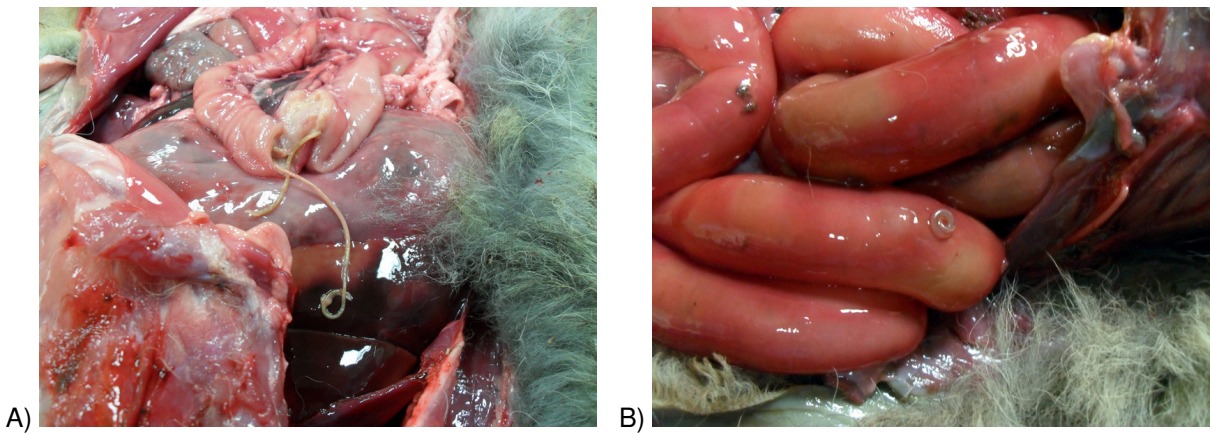


Figura 5.3. Ascaridi. Intestino della volpe n. 014-113802



Figura 5.4. Ernia diaframmatica. Particolare della lesione nella volpe n. 010- 114531

5.3 Ricerca di CDV

La coppia di primer utilizzata nel saggio RT real-time PCR è quella descritta da Saliki *et al.* (2002) per l'individuazione di varie specie di *morbillivirus* fra cui CDV, CeMV e PDV mediante retro trascrizione e successiva amplificazione di una porzione di 80 pb del gene codificante per la proteina P. Date le piccole dimensioni dell'amplificato si è pensato di verificare la possibilità di utilizzare questa coppia di primer in un saggio di RT real-time PCR.

Tale verifica è stata effettuata con il software Beacon Designer 7.0 (Premier Biosoft International, California) utilizzando come *target* le sequenze codificanti per la proteina P di CDV (AB606409), DMV (NC_005283), CeMV (AF333347) e PWMV (AF200817). La valutazione della coppia di primer per un saggio con SybrGreen ha avuto buon esito e, dalle analisi del software, si attendono temperature di *melting* (T_m) dei prodotti tutte molto simili fra loro, con quella di CDV che si distacca dai virus dei cetacei, seppur in maniera molto leggera. Successivamente si è verificata, con esito negativo, la possibilità di disegnare una sonda di tipo TaqMan, abbinabile agli stessi primer, per cui si è optato di procedere con la messa a punto di una RT real-time PCR con SybrGreen di tipo "one-step". Con questa metodica, che prevede l'esecuzione della reazione di retro trascrizione e di amplificazione con un'unica miscela di reazione, si evitano manipolazioni intermedie che possono accrescere i rischi di false positività dovute a cross contaminazioni.

Eseguendo una RT real-time PCR si assume che i campioni positivi debbano avere una T_m uguale a quella del controllo, e per poterlo provare si utilizza il colorante fluorescente SybrGreen. Il SybrGreen è un intercalante economico ma aspecifico, vuol dire che si lega a tutto il DNA a doppio filamento che trova, indipendentemente che la sequenza sia specifica o meno. Il legame tra il colorante e il dsDNA determina una forte emissione di fluorescenza proporzionale alla quantità di amplificato presente: maggiore è la quantità di DNA nel campione prima avverrà il ciclo soglia (CT = *threshold cycle*, detto anche CP = *crossing point*) durante il quale sale la curva di amplificazione.

La curva di amplificazione che si ottiene dalla lettura della fluorescenza discrimina solo tra campioni che contengono amplificati e campioni che non li contengono e non può differenziare se la fluorescenza derivi da un amplificato specifico, da uno non

specifico o dalla sommatoria di più amplificati. Infatti la fluorescenza potrebbe essere dovuta alla presenza di un solo tipo di DNA o più d'uno.

Per poterli distinguere è necessario allora eseguire l'analisi della derivata 1° della curva di dissociazione, che permette di capire da quanti picchi di *melting* è formata ciascuna curva e calcolarne le temperature. Ogni DNA possiede una propria T_m (definita come la temperatura alla quale il DNA è per il 50% a doppio filamento e per il 50% a singolo filamento) ecco perché si considerano positivi solo i campioni che presentano almeno un prodotto di amplificazione che presenta una T_m uguale a quella del controllo positivo (Mackay *et al.*, 2007).

Data l'aspecificità del colorante, dunque, dall'analisi di un campione è possibile riscontrare la presenza di amplificati aspecifici dovuti al legame aspecifico dei primer ad un target diverso o alla creazione di dimeri aspecifici. Questo può avvenire quando la reazione entra nella fase di *plateau* o quando la quantità di DNA è scarsa. Un altro fattore da non dimenticare è che possono esistere amplificati diversi con T_m molto simili, perciò per differenziarli è necessario valutarne il peso molecolare mediante una PCR classica (Ririe *et al.*, 1997).

Come primo passo per la messa a punto della RT real-time PCR con SybrGreen sono stati saggiati RNA estratti da campioni di organo di animali sicuramente positivi per DMV (da cuore di un delfino *Stenella coeruleoalba* e da rene di una balenottera *Balaenoptera physalus*) e un RNA di CDV (Bussel strain, batch 1/10-1), fornito gentilmente dal laboratorio di virologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, sede di Legnaro.

Tutti i campioni sono risultati altamente positivi (Fig. 5.5, A e B) e dall'analisi delle curve di dissociazione si è verificato, come atteso, che le Tm sono molto simili tra loro, con quella di CDV che si discosta leggermente (Fig. 5.5, A). Come si evince dalle curve riportate in Fig. 5.5 (A e B) si ottengono curve di amplificazione anche nei bianchi (reazioni in cui si è aggiunta acqua al posto dell'acido nucleico) ma l'analisi delle curve di dissociazione dimostra che l'aumento della fluorescenza è dovuto a prodotti aspecifici (picchi a Tm diverse da quelle dei controlli positivi).

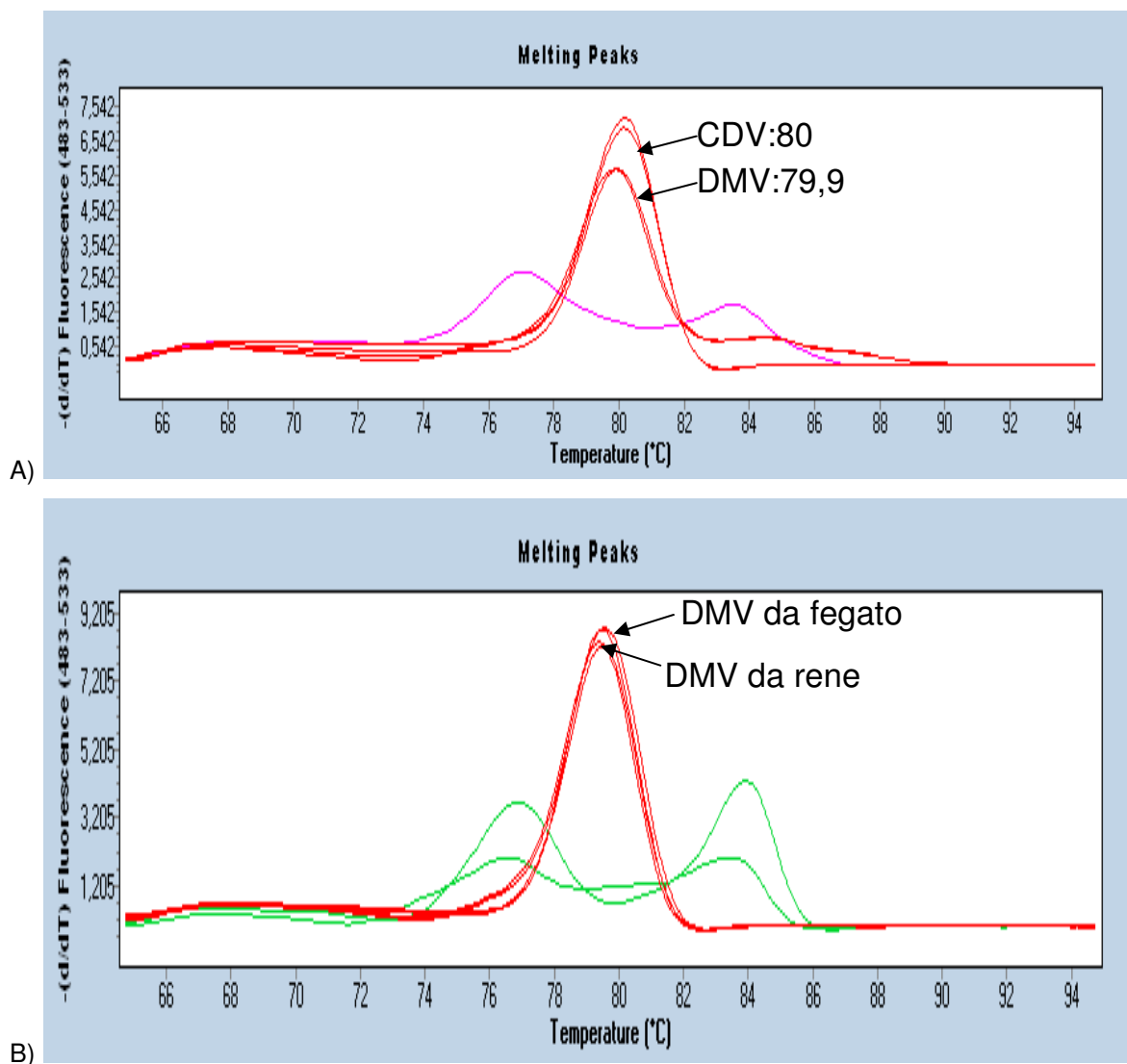


Figura 5.5. Temperature di melting. A) Tm di CDV e DMV. B) Tm di DMV da campioni di fegato e rene. Le curve viola (A) e verdi (B) rappresentano il bianco.

Successivamente si è proceduto con la valutazione dell'efficienza della reazione mediante la formula $\{\eta=10^{-1/S}-1\}$ dove S è la pendenza della retta ottenuta con diluizioni scalari di uno standard. Questa reazione è stata eseguita con diluizioni a scalare su base 10 dell'RNA di CDV (da 10^{-1} a 10^{-5}), permettendo di verificare come la reazione abbia un'efficienza pari a 97,8% e con un errore pari a 0,003 (Fig. 5.6)

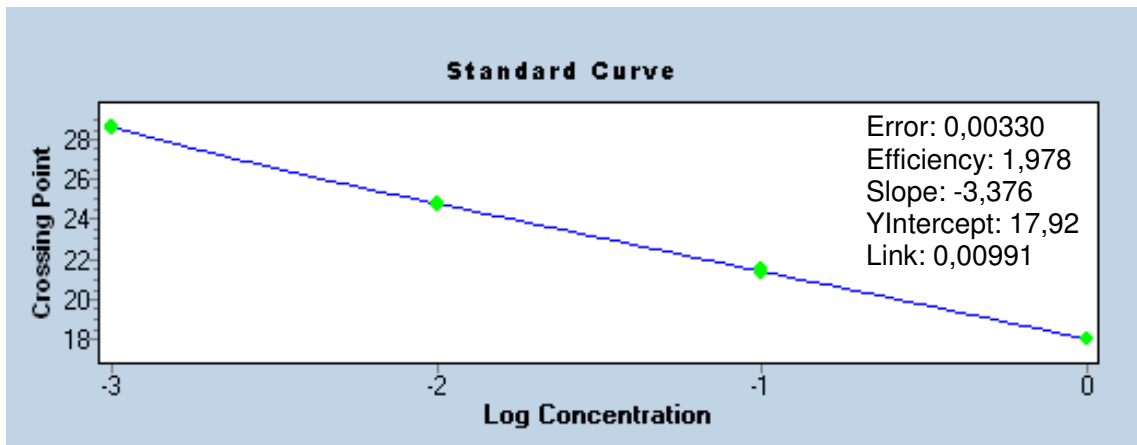


Figura 5.6. Curva standard ottenuta con diluizioni a scalare su base 10 dell'RNA di CDV.

Alle diluizioni più elevate, oltre agli amplificati specifici, salgono anche gli aspecifici come si può vedere dalle curve di denaturazione della Fig. 5.7: inizialmente tutte le curve salgono ben distanziate e ad intervalli precisi, poi con l'aumentare della diluizione si avvicinano e si confondono.

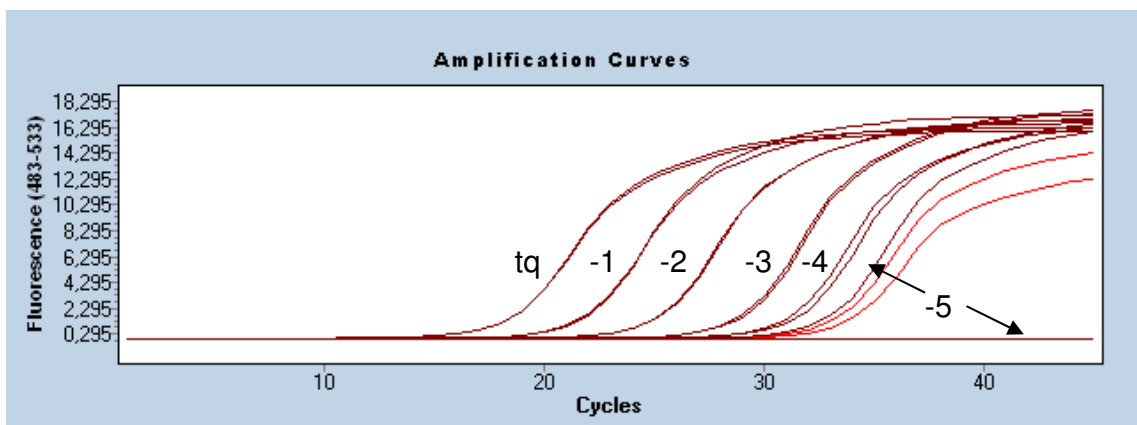


Figura 5.7. Curve di amplificazione ottenute con diluizioni a scalare su base 10 dell'RNA di CDV. Le curve rosse corrispondono al bianco.

Tq = RNA non diluito / -1,-2,-3,-4,-5 = diluizioni a scalare dell'RNA

L'analisi della curva di dissociazione (Fig. 5.8) ha permesso di verificare che tale andamento è giustificato dalla presenza, alle diluizioni più basse e nel bianco, di amplificati aspecifici.

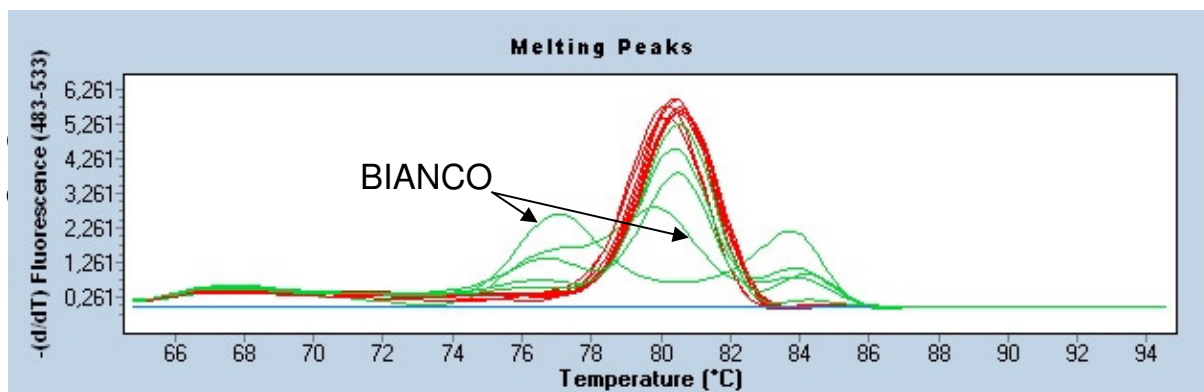


Figura 5.8. Picchi di melting ottenuti facendo la derivata 1° delle curve di amplificazione descritte in Fig. CDV.

Rosso = amplificati corrispondenti a CDV tal quale e diluito da 10^{-1} a 10^{-3} .

Verde = amplificati corrispondenti a CDV diluito 10^{-4} e 10^{-5} . Il bianco viene indicato dalle frecce.

Sulla base delle T_m ottenute nei diversi esperimenti e partendo da diverse quantità di RNA target è stata calcolata la temperatura di melting media dei vari controlli positivi con il seguente esito:

RNA - CDV = $80,57 \pm 0,50$

RNA - DMV (rene) = $79,75 \pm 0,59$

RNA - DMV (cuore) = $79,90 \pm 0,53$

Come atteso le T_m dei prodotti ottenuti dai *morbillivirus* considerati sono molto simili fra loro con quella ottenuta da CDV leggermente più alta rispetto alle altre.

Successivamente sono stati analizzati gli RNA estratti dai 70 campioni di midollo allungato di volpe per 68 dei quali (pari al 97,14%) è stata ottenuta una curva di amplificazione con CP variabili fra 23,35 e 39,22.

La successiva analisi delle curve di dissociazione ha permesso di calcolare le T_m di ciascun campione, riportate in Tab. 5.3.

Come criterio per l'attribuzione di positività al saggio si è scelto di selezionare i campioni che presentavano fra le T_m una che cadesse nel range calcolato per CDV ($80,57 \pm 0,50$). Questo ha permesso di identificare 43 campioni positivi (pari al 61,42%) dei quali 21 (pari al 48,83%) presentano più prodotti di amplificazione come testimoniato dalla presenza di più picchi di melting. Ciò potrebbe indicare che in

questi campioni ci sia una inferiore quantità di RNA target e quindi un minor titolo viremico. Dall'analisi delle aree sottese alle curve ottenute da questi 21 campioni si evidenzia come in 7 le aree dell'amplificato aspecifico risultino predominanti su quelle dell'amplificato specifico, che risulta quindi in concentrazioni minori.

I campioni considerati negativi sono 22 (pari al 31,42%) e comprendono i campioni per i quali non si sono ottenute curve di amplificazione o che presentano prodotti di amplificazione con Tm differenti da quella del controllo positivo.

Ci sono poi 5 campioni (013- 110186, 019- 119422, 034- 100506, 050- 119810, 062- 120446), pari al 7.14%, che presentano una Tm appena al di sotto del range atteso. Questi campioni sono stati indicati come dubbi.

		PICCO 1			PICCO 2			PICCO 3		
		TM	AREA	%	TM	AREA	%	TM	AREA	%
001- 110622	+	80,32	11,00							
002- 113427	+	80,30	10,23							
003- 114543	+	80,16	8,54	87,95	76,30	1,17	12,04			
004- 113795	+	80,39	10,15							
005- 110631	+	80,18	7,71							
006- 115613	+	80,27	9,80	82,98	76,27	2,01	17,02			
007- 113856	+	80,20	9,16	79,86	82,67	2,31	20,14			
008- 110217	+	80,33	8,24	73,57	76,63	2,96	26,43			
009- 113820	+	76,95	6,91	65,68	80,45	3,61	34,31			
010- 114531	+	80,13	10,68							
011- 112210	+	80,15	6,46	91,11	69,90	0,63	8,88			
012- 113805	+	80,38	7,46	56,99	76,81	4,76	36,36	70,12	0,87	6,65
013- 110186	?	80,03	15,00							
014- 113802	-	79,91	9,55							
015- 112628	+	80,40	10,55	91,66	76,42	0,96	8,34			
016- 111208	+	80,59	6,22	63,66	76,84	3,00	30,70	69,90	0,55	5,63
017- 110200	+	84,06	5,71	64,52	80,32	3,14	35,48			
018- 103296	-	79,73	7,18	45,35	83,82	6,17	38,97	76,04	2,48	15,66
019- 119422	?	80,04	11,29							
020- 110165	+	81,00	7,33	59,74	84,12	4,94	40,26			
021- 100932	Nessun amplificato									
022- 117145	+	80,34	12,00							
023- 101205	-	83,39	6,27	85,53	76,93	1,06	14,46			
024- 113827	+	80,20	11,34							
025- 110181	Nessun amplificato									
026- 113797	+	76,97	4,74	62,45	80,53	2,85	37,54			
027- 107996	-	83,76	3,85							
028- 122836	+	80,07	9,35							
029- 115619	+	80,35	9,38							
030- 113823	+	80,35	11,09							
031- 115942	+	80,15	8,43							
032- 119532	+	80,24	10,54							
033- 114529	+	80,40	11,49							
034- 100506	?	76,79	6,22	51,19	80,00	5,93	48,80			
035- 119950	+	80,32	8,41	61,70	82,74	5,22	38,29			

		PICCO 1			PICCO 2			PICCO 3		
		TM	AREA	%	TM	AREA	%	TM	AREA	%
036- 117152	+	80,32	12,01							
037- 101389	-	84,25	8,46							
038- 110211	+	80,28	10,50							
039- 119934	+	80,19	7,95							
040- 119418	+	80,84	5,02	58,85	77,27	2,57	30,12	70,11	0,94	11,02
041- 115616	-	79,79	12,09							
042- 103055	-	84,24	10,78							
043- 114548	+	80,29	14,55							
044- 118876	-	79,95	8,40							
045- 100938	+	80,70	7,37	58,81	83,85	5,16	41,18			
046- 113799	-	76,51	11,56	73,16	82,77	4,24	26,83			
047- 102208	-	83,65	6,76							
048- 117151	+	76,60	3,22	76,66	71,77	0,75	17,85	80,30	0,23	5,47
049- 117138	+	80,34	11,26							
050- 119810	?	80,05	7,11							
051- 114540	-	79,97	12,44							
052- 117148	-	79,71	7,21	66,14	82,25	3,69	33,85			
053- 118011	+	80,14	12,36							
054- 101387	-	83,98	13,07							
055- 110194	+	80,34	11,78							
056- 117449	-	79,87	9,57							
057- 119415	+	80,14	10,15							
058- 110036	-	83,35	10,44							
059- 117159	-	79,66	7,12	59,08	82,17	4,93	40,91			
060- 113800	+	80,42	11,06							
061- 100414	+	84,71	9,88	75,24	80,37	3,25	24,75			
062- 120446	?	80,01	6,44	69,77	82,90	2,79	30,22			
063- 113845	-	79,81	8,29	77,04	85,27	2,47	22,95			
064- 114539	-	81,18	0,06	40,00	72,41	0,05	33,33	85,92	0,04	26,66
065- 117134	-	79,93	6,59	86,59	85,31	1,02	13,40			
066- 103305	+	83,47	8,72	61,23	80,44	5,52	38,76			
067- 110162	+	81,00	9,18	84,76	70,29	1,65	15,23			
068- 113860	+	80,18	10,88	94,60	85,26	0,62	5,39			
069- 110028	-	79,85	8,11							
070- 119946	+	76,70	2,17	50,23	80,21	2,15	49,76			

Tabella 5.3. Risultati dei 70 campioni. Sono indicate la temperatura di Melting e l'area sottesa per ogni curva di amplificazione ottenuta.

I campioni positivi sono indicati con (+), quelli negativi con (-), quelli dubbi con (?).

A titolo esemplificativo di seguito viene mostrato il risultato grafico (Fig. 5.10) della RT real-time PCR eseguita su alcuni campioni (compresi nella Tab. 5.3), con successiva analisi delle curve di dissociazione per il calcolo delle Tm.

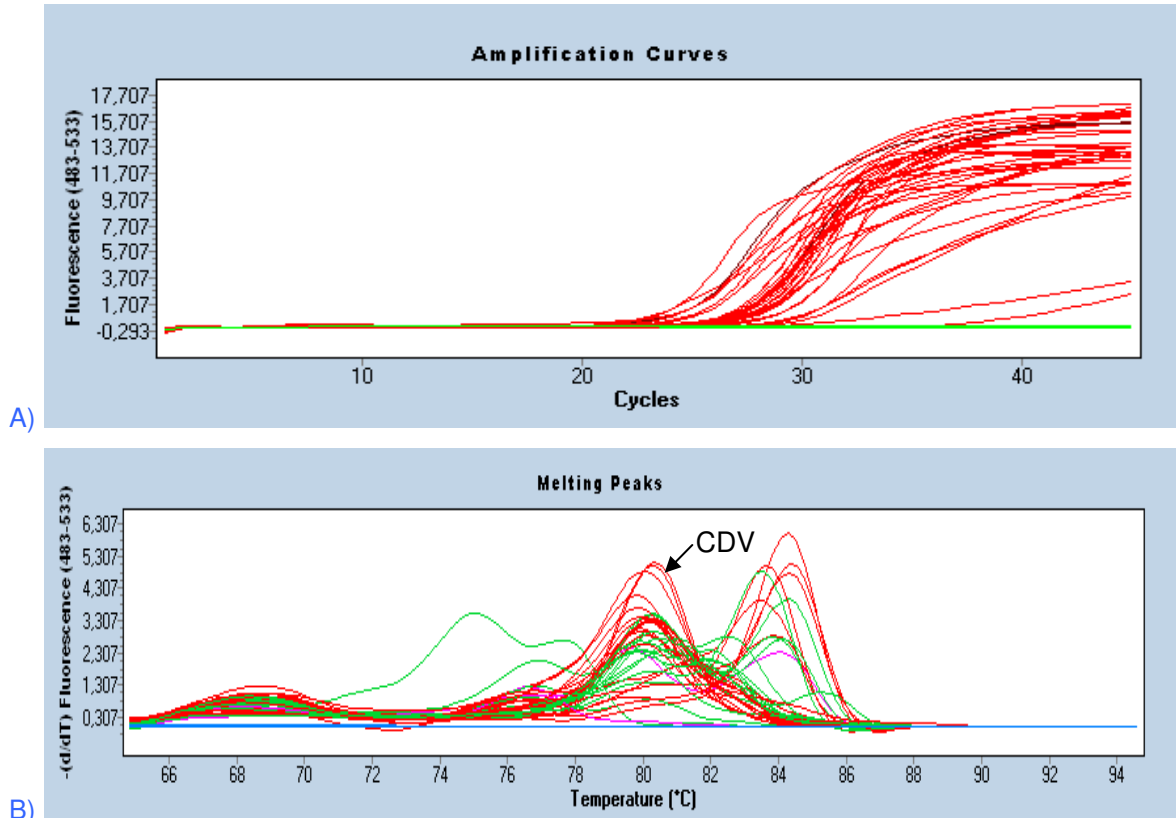


Figura 5.10. Risultato della RT real-time PCR eseguita su alcuni campioni di midollo allungato e su due controlli positivi (CDV-2 e CDV-3).

- A) Curve di amplificazione. Rosso = campioni dai quali si sono ottenuti amplificati. Verde = campioni dai quali non si sono ottenuti amplificati. Marrone = controlli positivi (CDV).
- B) Picchi di melting ottenuti facendo la derivata 1° delle curve di dissociazione. Rosso = amplificati con un unico picco. Si evidenziano numerosi altri colori che corrispondono agli amplificati che possiedono più picchi. Azzurro = campioni dai quali non sono stati ottenuti amplificati.

5.4 Ricerca di *T. gondii*

Dei 70 campioni di muscolo cardiaco analizzati mediante PCR classica nessuno è risultato positivo nei confronti di *T. gondii*. Quindi non si è reso necessario effettuare il sequenziamento del DNA.

6. DISCUSSIONE E CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

La recente ricomparsa della rabbia silvestre in Italia (ottobre 2008 in provincia di Udine e novembre 2009 in provincia di Belluno) rappresenta un importante problema di sanità pubblica, ma offre la possibilità di avere a disposizione un gran numero di carcasse di volpe (*Vulpes vulpes*) e dà l'opportunità di effettuare numerose indagini su questo mammifero assai diffuso nel nostro Paese, ma del cui stato sanitario non si sa in realtà moltissimo.

Non bisogna sottovalutare l'aiuto che può essere offerto dai cacciatori: spesso possono essere uno strumento importante per ottenere un campionamento di animali su tutto il territorio e in poco tempo. La presente tesi utilizza proprio materiale proveniente dall'attività venatoria e fornisce dati preliminari e un punto di partenza per ulteriori indagini e approfondimenti relativi ad un'area, la Valle d'Aosta, dove, in base alla bibliografia consultata, non sono state effettuate indagini per la ricerca di CDV e *T. gondii* nella volpe.

Cimurro

Fino al 2002 in Europa la sieroprevalenza nelle volpi per il cimurro si è attestata tra il 4.4 e il 18% (Tab. 2.2).

Nel 2006 è scoppiata un'epidemia molto importante nei carnivori selvatici che ha coinvolto non solo l'Italia ma anche la Germania e la Svizzera. Il primo riscontro è stato l'aumento di mortalità dei carnivori selvatici e l'osservazione di comportamenti anomali che potevano essere dovuti a turbe neurologiche. Le volpi colpite, ad esempio, potevano avere minor timore ad entrare in contatto con l'uomo, presentare apatia o incoordinazione motoria (Citterio *et al.*, 2008) e mioclonia (Monne *et al.*, 2011). Rari sono stati i casi di aggressività nei confronti dell'uomo (Citterio *et al.*, 2008).

I primi casi sospetti sono stati rinvenuti nel 2006, a maggio in Carnia (Fiuli Venezia Giulia) e ad agosto in Val Pusteria (Alto Adige); l'anno successivo ad aprile ci sono stati dei casi a Predazzo (Trentino) e nel Comelico Superiore (Belluno) (Citterio *et al.*, 2008). Dal 2006 al 2008 la diagnosi di cimurro è stata eseguita mediante PCR e/o immunofluorescenza, in particolare utilizzando come target il SNC. I campioni degli animali selvatici analizzati sono stati oltre 250 e i riscontri positivi provenivano da 95

volpi e 30 tassi; le volpi erano state trovate nella provincia di Trento (60), Bolzano (22), Belluno (10) e Udine (3). Non ci sono state significative differenze in base alla classe d'età (Citterio *et al.*, 2008).

Il fronte dell'infezione si è spostato poi velocemente verso sud-ovest arrivando fino alle pre-Alpi venete, mettendo a rischio d'infezione altri carnivori selvatici e domestici (Monne *et al.*, 2011).

Nella primavera-estate del 2008 sono state trovate numerose volpi con sintomi neurologici riferibili al cimurro in un'area compresa tra le alpi e il lago Chiemsee, nella Baviera meridionale, e 11, sottoposte ad esame istopatologico e successiva diagnosi immunoistochimica, sono risultate positive (Sekulin *et al.*, 2011).

Nel 2009 l'epidemia ha raggiunto le zone limitrofe al Parco Nazionale dello Stelvio: Engadina (est della Svizzera) in primavera e Valtellina (Sondrio) tra agosto e ottobre, dove sono state trovate 5 giovani volpi positive alla PCR. Nei mesi successivi sono state avvistate nell'area più di 30 volpi con alterazioni del comportamento, ma solo 10 sono state catturate. Due volpi sintomatiche sono state rinvenute a febbraio a Grosotto (Sondrio) e nel frattempo l'epidemia in Svizzera si è diffusa verso ovest (Martella *et al.*, 2010; Ryser-DeGiorgi e Origgi, 2010). Non sono state effettuate ricerche tali da conoscere il numero totale di volpi svizzere coinvolte nell'epidemia; la diagnosi è stata effettuata solamente in poco più di 30 animali (tra volpi e tassi) ma in molti altri sono state riscontrate lesioni a livello di polmoni e cervello (Ryser-DeGiorgis e Origgi, 2010).

Le volpi utilizzate per la presente tesi sono state prelevate nel Nord-Ovest dell'Italia (Valle d'Aosta) tra settembre e dicembre 2009, durante l'epidemia che si stava verificando nelle regioni del Nord-Est. Il risultato della RT real-time PCR eseguita sui 70 campioni di midollo allungato delle volpi ha dato un riscontro positivo nel 61.4% dei campioni (43 volpi). Questo dato, anche se ottenuto da un numero limitato di animali, è assai elevato e fa sospettare che ci sia stata un' ampia diffusione dell'infezione nella popolazione volpina in quel periodo.

Citterio *et al.* (2008) evidenziano come il rinvenimento nel 2006 di numerosi casi di cimurro nel Triveneto sia un evento nuovo, che contrasta con i dati di negatività ottenuti in precedenti ricerche. In Svizzera l'esposizione dei carnivori selvatici al *morbillivirus* prima dell'epidemia non sembrava elevata, e alcuni casi sospetti non sono mai stati indagati ulteriormente (Ryser-DeGiorgi e Origgi, 2010).

I risultati di questa tesi confermano come la diffusione dell'infezione da CDV riguardi in maniera massiccia territori precedentemente non esaminati, adiacenti a quelli sinora meglio indagati. Un ulteriore utile approfondimento è rappresentato dalla valutazione della similitudine dei virus da noi evidenziati tramite RT real-time PCR con quelli descritti in altre aree europee, dell'arco alpino soprattutto, sequenziando gli amplificati ottenuti.

La possibilità di effettuare delle indagini molecolari con relativa genotipizzazione permette di conoscere dove e quando un determinato ceppo virale è presente, così da poterlo confrontare con i ceppi individuati in altri luoghi o in altri periodi. La metodica migliore è analizzare il gene *Haemagglutinin* (H) perché, come evidenziato da McCarthy *et al.* (2007), la regione che lega la molecola SLAM (molecola di attivazione del segnale linfocitario che si trova tra i residui 530 e 549 del gene H) è responsabile dell'infezione della cellula ospite. Basandosi sui dati ottenuti dalle analisi è possibile creare un albero filogenetico per il gene suddiviso in varie linee genetiche. Questi Autori hanno individuato 6 differenti possibili residui nella posizione 530, e uno solo nella posizione 549 (Y549H); inoltre hanno dimostrato che la maggior parte dei CDV isolati da animali selvatici possiedono la mutazione a livello 549 ma non alla posizione 530. Sekulin *et al.* (2011) confermano il sospetto che le mutazioni che avvengono nel residuo 549 del gene H del virus del cimurro siano responsabili dell'instaurarsi dell'infezione in nuove specie ospiti. Questi Autori hanno sequenziato il gene H da 5 delle 11 volpi rinvenute in Germania nella primavera-estate 2008, rilevando che questo gene possiede una sostituzione nella posizione 549 (Y-> H). La medesima sostituzione si trova anche nel virus del cimurro isolato da un tasso nello stesso periodo e negli stessi luoghi delle volpi, ma non nel virus isolato da due furetti domestici nel 2006 (Sekulin *et al.*, 2011). Le analisi filogenetiche confermano che il ceppo tedesco è strettamente legato al ceppo H04Bp1F isolato in Ungheria nel 2004 in un cane, il quale però non possiede la mutazione Y549H (Demeter *et al.*, 2007). È stata quindi avanzata l'ipotesi che la diffusione del cimurro del 2008 in Germania sia originata dal ceppo in Ungheria che ha subito la modifica alla posizione 549.

Monne *et al.* (2011) hanno analizzato il genotipo di 66 volpi positive per CDV rinvenute in Italia tra ottobre 2006 e marzo 2009. I risultati indicano che tutti i ceppi sono correlati sia tra loro sia con i ceppi isolati in Germania nel 2008 e sono stati inseriti nella linea genetica "Europe", dove sono raggruppati i CDV isolati nei cani

provenienti da vari paesi europei. Ma, visto che i ceppi isolati in Italia, Germania e Ungheria appena descritti formano un gruppo monofiletico isolato rispetto al resto della linea genetica, hanno creato un nuovo gruppo chiamato “Wildlife Europe 2006-2009”. Successivamente hanno analizzato geneticamente 29 CDV isolati da tassi, il CDV isolato da una faina e 23 CDV isolati da cani, tutti provenienti dalle stesse regioni del Nord-Est dell’Italia. Il virus dei tassi e della faina è stato classificato come “Wildlife Europe 2006-2009”; due CDV canini sono stati inseriti all’interno della linea “Europe” anche se possiedono una similarità elevata con il gene H dei ceppi selvatici, mentre gli altri 21 appartengono alla linea “Arctic”. Martella *et al.* (2006) avevano già confermato la presenza in Italia, oltre che della linea “Europe”, della linea “Arctic” in ceppi isolati in cani nel 2004, nel 2005 e nel 2006; inoltre avevano isolato il CDV di una volpe che non era legato alla linea europea.

La linea “Wildlife Europe 2006-2009” è stata identificata anche in Austria (Benetka *et al.*, 2011) in una faina e in un tasso analizzati nel 2006 e 2007, mentre in due cani il ceppo è risultato intermedio tra “Wildlife Europe 2006-2009” e “Asia-1”.

In Polonia nel 2009 Adaszek *et al.* hanno riscontrato invece la presenza di tre variazioni a livello del gene N del CDV isolato da 9 animali positivi (9 volpi, 3 visoni, e 3 cani) e questo suggerisce la probabile presenza di nuove varianti di CDV in questa parte dell’Europa.

In definitiva gli animali coinvolti nell’epidemia scoppiata nel Nord-Est dell’Italia erano affetti da un virus del cimurro classificato in una nuova linea genetica. La presenza di questo nuovo ceppo anche in altre zone dell’Europa fa sospettare che una possibile fonte di contagio sia la movimentazione di animali selvatici e domestici tra i vari Paesi europei in maniera legale o illegale (Monne *et al.*, 2011). La diffusione del virus, inoltre, può essere stata facilitata dall’aumento, negli ultimi decenni, di ungulati selvatici in ambiente alpino, che ha favorito la ricolonizzazione dei grossi carnivori selvatici seguita da un aumento della popolazione volpina. CDV, infatti, è un virus che si trasmette in modo più efficace quando la concentrazione della popolazione ospite è elevata (Mörner *et al.*, 2002).

I risultati di questo lavoro portano interessanti conoscenze relative alla circolazione di CDV nella popolazione volpina di un’area delle Alpi occidentali, la Valle d’Aosta, per la quale erano carenti le informazioni. Innanzitutto va ricordato che queste informazioni derivano da un campione di animali ottenuto passivamente, utilizzando una parte dei capi abbattuti da cacciatori nella stagione 2009-2010. Ciò influenza la

rappresentatività del campione, che comunque è un obiettivo difficile da raggiungere nei confronti di popolazioni selvatiche, soprattutto quando non vi siano dati certi sulla dimensione e sulla struttura di popolazione. Pur tenendo conto di questo limite, si possono fare alcune considerazioni:

1. l'infezione è largamente presente (61% con un errore standard, per un campione randomizzato di ± 0.12) nella popolazione, a livelli molto elevati considerando quanto conosciuto a proposito di altre popolazioni volpine;
2. l'infezione colpisce sia i giovani (4 positivi sui 6 esaminati), che gli adulti (37 positivi su 62 esaminati);
3. l'infezione appare diffusa in tutto il territorio considerato;
4. ciò fa pensare ad una attiva circolazione virale al momento dell'indagine;
5. la capacità del virus di diffondere in modo così efficiente è probabilmente dovuta ad una elevata densità della popolazione volpina, che assicura un'elevata frequenza di contatti diretti, unica modalità di trasmissione efficace;
6. la volpe appare quindi in grado di svolgere il ruolo di serbatoio anche di questa infezione, come per la rabbia.

Come ulteriore approfondimento sarebbe interessante analizzare i campioni mediante RT PCR e ottenere successivamente il sequenziamento del gene H dei CDV isolati, in modo da capire se il virus presente in Valle d'Aosta sia il medesimo di quello responsabile dell'epidemia 2006-2009 nelle Alpi orientali. Questo proverebbe ulteriormente l'ampia diffusione che il ceppo ha avuto attraverso le Alpi e stimolerebbe la ricerca del virus in altri carnivori selvatici anche nelle aree occidentali dell'Italia.

Infine con questa tesi si vuole evidenziare la necessità di mantenere una sorveglianza demografica ed epidemiologica continua sullo stato sanitario delle popolazioni non solo volpine ma anche di altre specie selvatiche, come l'esperienza della lotta alla rabbia ha ampiamente dimostrato.

Toxoplasma gondii

Negli ultimi dieci anni in diversi Paesi europei come Svezia, Gran Bretagna, Austria, Ungheria, Irlanda, Spagna, Francia, Belgio, Repubblica Ceca, Portogallo, Norvegia (vedi Tab. 3.3) si riscontrano nella volpe sieroprevalenze per *T. gondii* estremamente

variabili dal 20% al 100%, che sottolineano come questo animale possa svolgere un ruolo di reservoir per il parassita in ambiente silvestre. I dati sulla diffusione di *T. gondii* nella volpe in Italia non sono molto numerosi e risultano limitati alle Regioni Toscana e Campania. De Lalla *et al.* (1967) e Berengo *et al.* (1969) hanno ottenuto prevalenze sierologiche nell'area di Siena rispettivamente del 43,3% e del 42%. Siragusa *et al.* (2004) invece hanno potuto analizzare solamente il siero di 5 volpi provenienti dalla Campania, delle quali solo una è risultata positiva. I dati preliminari ottenuti da Mancianti *et al.* (2010) in volpi nella provincia di Pisa negli anni 2009-2010 hanno evidenziato sieroprevalenze del 48,4% - 52%. In Valle d'Aosta, non sono state condotte, fino ad ora, indagini epidemiologiche per la ricerca di questo parassita nelle volpi.

Per quanto riguarda la ricerca di *T. gondii* mediante tecniche molecolari, gli organi normalmente utilizzati per la ricerca di questo parassita sono rappresentati dal cervello (Hurková e Modrý, 2006) o muscoli fortemente irrorati (cuore, lingua, diaframma) (Smith *et al.*, 2003; Manfredi *et al.*, 2010), dove più frequentemente si trovano cisti terminali e zoiti. Per la ricerca di *T. gondii* nell'ambito di questa tesi sono stati analizzati, mediante PCR, campioni di muscolo cardiaco. Sebbene l'affiancamento di altre tecniche diagnostiche, quali l'esame istologico ed immunoistochimico, sia auspicabile per ottenere un quadro diagnostico più completo, l'approccio molecolare è stata una scelta obbligata in quanto non era possibile avere campioni freschi da fissare in formalina. Le carcasse sono state tutte congelate al momento del loro conferimento presso il Ce.R.M.A.S., e 18 di queste (25.7%) presentavano anche uno stato più o meno marcato di putrefazione al momento dei prelievi autoptici. All'esame anatomo-patologico non sono state riscontrate, negli organi interni, lesioni macroscopicamente evidenti.

Le analisi eseguite sui 70 campioni di cuore hanno dato tutte esito negativo.

Le percentuali di positività riscontrate nelle indagini effettuate da altri Autori in Europa, mediante PCR eseguita direttamente su tessuti di volpe (lingua e cervello), sono piuttosto basse. Esse sono comprese tra lo 0% in Gran Bretagna (Smith *et al.*, 2003), dove i dati di sieroprevalenza (20%) indicano però che il parassita circola (Hamilton *et al.*, 2005), e l'1,3% in Repubblica Ceca (Hurková e Modrý, 2006). Per quanto riguarda la realtà italiana, Mancianti *et al.* (2010) hanno eseguito un'indagine in volpi (cuore) della provincia di Pisa, ottenendo positività del 16,1%, contro una sieroprevalenza del 48,4%. Questi studi indicano quindi che la PCR, pur essendo

una tecnica sensibile e specifica, può presentare dei limiti legati al sito di campionamento, al basso numero di cisti e zoiti presenti o all'esigua quantità di materiale che viene utilizzata in questo tipo di analisi (Murphy *et al.*, 2007; Mancianti *et al.*, 2010).

La possibilità di effettuare le prove biologiche *in vivo* su topo, permetterebbe invece di verificare vitalità e patogenicità del ceppo e di "amplificare" naturalmente il DNA del parassita. L'utilità di questa metodica è confermata dal lavoro di Aubert *et al.* (2010) che sono riusciti ad isolare *T. gondii* dal 69% dei campioni di cuore delle volpi sieropositive.

Una metodica sensibile e specifica, che in future indagini potrebbe essere applicata ai campioni in esame, è la real-time multiplex PCR che De Craeye *et al.* (2010) hanno utilizzato direttamente (senza passaggio in animali da laboratorio) su tessuto cerebrale di volpe in Belgio, evidenziando la presenza di *T. gondii* nel 18.8% degli animali esaminati; con questa metodica inoltre è possibile evidenziare contemporaneamente la presenza di più parassiti nello stesso campione, nonché ottenere il DNA da utilizzare per la genotipizzazione degli isolati.

Per quanto riguarda le diverse linee clonali di *T. gondii*, Dardé (2004) sottolinea che, sebbene i dati disponibili per gli animali selvatici siano scarsi, i genotipi più frequentemente isolati nelle popolazioni di animali selvatici in Europa e USA sono rappresentati dal tipo III e da ceppi atipici, mentre nell'uomo e negli animali domestici (pecora e maiale) prevale il genotipo II. Mentre quest'ultimo non è virulento per il topo da laboratorio, il ruolo patogeno sostenuto dai ceppi atipici non è ancora completamente conosciuto ed altri studi dovrebbero essere condotti a riguardo. Al contrario Aubert *et al.* (2010), in uno studio eseguito su volpi in Francia, hanno isolato unicamente il genotipo II nel 69,2% degli animali esaminati, in linea con i riscontri ottenuti nell'uomo e negli animali domestici in questo Paese. Anche De Craeye *et al.* (2011) nella quasi totalità dei casi (96%) hanno evidenziato la presenza del genotipo II, mentre in una sola volpe positiva il genotipo III.

I risultati di queste indagini sui genotipi sottolineano come le specie selvatiche possano fungere da importanti reservoir per la trasmissione di *T. gondii*. Anche la volpe, come gli altri carnivori selvatici, può svolgere questo ruolo e, per capire meglio la diffusione del parassita nell'ambiente e la prevalenza dell'infezione nei carnivori stessi, è utile eseguire delle indagini sierologiche (Dubey e Beattie, 1988; Murphy *et al.*, 2007).

Jakubek *et al.* (2001; 2007) hanno sottolineato come l'elevata sieroprevalenza di *T. gondii* nelle volpi in Svezia e in Ungheria potrebbe essere dovuta al tipo di alimentazione. La volpe, essendo un carnivoro con pochi predatori (se si eccettua l'uomo), si trova al vertice della catena alimentare: essendo le sue prede più numerose, andando ad analizzare il tipo di alimentazione si può capire il grado di diffusione di un patogeno nelle specie predate e di conseguenza nell'ambiente. *T. gondii* viene veicolato da numerosi ospiti, tra i quali uccelli, roditori, lepre europea (*Lepus europaeus*) e lepre bianca (*Lepus timidus*) che rappresentano buona parte dell'alimentazione della volpe (Hamilton *et al.*, 2005; Frölich *et al.*, 2003). Frölich *et al.* (2003) hanno evidenziato nella lepre europea in Germania positività elevate sia per la presenza del parassita stesso (57%) sia per anticorpi anti-*T. gondii* (46%), sostenendo così l'ipotesi che le lepri possano rappresentare un veicolo di infezione per la volpe. Inoltre il fatto che le lepri rientrino tra le sue principali prede è sottolineato dal fatto che la variazione numerica della popolazione delle lepri in un'area è strettamente legata alla variazione della popolazione delle volpi. Aubert *et al.* (2010) hanno invece riscontrato in Francia una sieroprevalenza nelle lepri europee molto bassa (9%), senza riuscire ad isolare, mediante PCR, il parassita dai campioni sierologicamente positivi.

Le volpi che sono state utilizzate per questa tesi erano in generale in buono stato di salute (65,7%). Solo 3 di queste, inoltre, presentavano un'elevata quantità di grasso sottocutaneo: questo suggerisce che nelle aree dove sono state cacciate le volpi la quantità di cibo a disposizione sia adeguato rispetto alla popolazione volpina.

Un'indagine sulla dieta della volpe in Nord Italia, valutata mediante analisi del contenuto stomacale, ha evidenziato che i mammiferi (in particolare lagomorfi), gli uccelli (soprattutto galliformi) e, in secondo ordine, gli insetti sono le categorie alimentari consumate da questa specie (Prigioni, 1991).

Dato che la lepre europea è una specie ad elevato interesse venatorio anche in Valle d'Aosta, sono state eseguite delle indagini per stimarne la popolazione: nel 2006 la densità media delle volpi avvistate è risultata di 6.3 lepri/100 ha contro un valore medio di riferimento di 7,5 capi/100 ha. Dal 1973 al 2004, inoltre, c'è stata una progressiva diminuzione dei prelievi venatori della lepre; la ragione di tale riduzione non viene imputata ad un aumento della popolazione di volpi, ma probabilmente all'interruzione dei ripopolamenti dal 1996, alla riduzione del numero di cacciatori specializzati o ad una diminuzione naturale della popolazione (Piano Regionale

Faunistico-Venatorio 2008-2012). La lepre bianca, invece, è una specie a basso rischio di estinzione e in Italia, dove rimane comunque cacciabile, è presente a basse densità su tutto l'arco alpino, compresa la Valle d'Aosta, anche se non se ne conoscono i dati effettivi sulla distribuzione e sulla consistenza delle popolazioni (Piano Regionale Faunistico-Venatorio 2008-2012). Questa specie è inserita nell'allegato V della Direttiva 92/43/CEE "Habitat" (che regola lo sfruttamento delle specie di interesse comunitario) e nell'allegato III della Convenzione di Berna (specie protette) (http://www.bighunter.it/Portals/0/Allegati/lepre_bianca_o_variabile.pdf). *T. gondii* è stato riscontrato nella lepre europea in provincia di Brescia (Chiari *et al.*, 2009) e in tre province dell'Emilia Romagna (Spaggiari *et al.*, 2009). Monitorare le specie più predate dalla volpe in una determinata area geografica può aiutare quindi a chiarire l'epidemiologia di eventuali patogeni circolanti.

Alla luce di quanto detto finora, la negatività dei campioni in esame, eseguita su un numero piuttosto limitato di campioni, associata poi alla mancanza di dati sulla sieroprevalenza nelle volpi, nelle sue prede e nell'ospite completo in Valle d'Aosta, non può garantire sull'assenza del patogeno nell'area di studio. Potrebbe quindi in futuro essere utile eseguire test sierologici su campioni di polmone. Hamilton *et al.* (2005) sottolineano l'utilità di questo organo testato mediante immunofluorescenza indiretta (IFAT); infatti, quando non è possibile effettuare un prelievo di sangue come spesso succede negli animali selvatici, l'estratto polmonare rappresenta un substrato adatto, perché molto vascolarizzato, ricco di anticorpi e può essere utilizzato anche dopo il congelamento.

Come sottolineato da Jakubek *et al.* (2007) più si eseguono ricerche diagnostiche atte a ricercare il parassita, più si può comprendere il vero ruolo delle volpi nell'epidemiologia della toxoplasmosi.

BIBLIOGRAFIA

- Aubert D., Ajzenberg D., Richomme C., Gilot-Fromont E., Terrier M.E., de Gevigney C., Game Y., Maillard D., Gibert P., Dardé M.L., Villena I. (2010) – Molecular and biological characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in France. *Veterinary Parasitology* 171: 346-349
- Berengo A., De Lalla F., Cavallini-Sempieri L., Bechelli G., Cavallini F. (1969) – Prevalence of Toxoplasmosis among domestic and wild animals in the area of Siena, Italy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18(3) 391-394
- Boitani L., CNR, Roma (1981) – Progetto finalizzato “Promozione della qualità dell’ambiente: Distribuzione e biologia di 22 specie di mammiferi in Italia”.
- Boitani L., Lovari S., Vigna Taglianti A. (2003) – Fauna d’Italia. Mammalia III: Carnivora-Artiodactyla. Ed. Calderini 58-84
- Black S.S., Austin F.W., McKinley E. (1996) – Isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Listeria monocytogenes* serotype 4 from a gray fox (*Urocyon cinereoargenteus*) with canine distemper. *Journal of Wildlife Diseases* 32: 362-366
- Brandonisio O. (2006) – Toxoplasmosi. In *Parassiti e parassitosi umane: dalla clinica al laboratorio*. Scaglia M., Gatti S., Rondanelli E.G., 69-88. Ed. Selecta Medica
- Colombi D., Roppa F., Mutinelli F., Zanetti M. (2009) – La Volpe. Aspetti ecologici, biologici e gestionali in Friuli Venezia Giulia. Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia, Udine: 1-36
- Contesse P., Hegglin D., Gloor S., Bontadina F., Deplazes P. (2004) – The diet of urban foxes (*Vulpes vulpes*) and the availability of anthropogenic food in the city of Zurich, Switzerland. *Mammalian Biology* 69 (2): 81-95.

- Dardé M.L. (2004) – Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. Ann. Ist. Super. Sanità 40(1): 57-63
- De Craeye S., Speybroeck N., Ajzenberg D., Dardé M.L., Collinet F., Tavernier P., Van Gucht S., Dorny P., Dierick K. (2011) – *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wildlife: Common parasites in Belgian foxes and Cervidae? Veterinary Parasitology 178: 64-69
- D.L. 4 aprile 2006, n.191: Attuazione della direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici.
- Dubey J.P., Beattie C.P. (1988) – Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press, Boca Raton. 220 pp.
- Dubey J.P., Hamir A.N., Hanlon C.A., Rupprecht C.E. (1992) – Prevalence of *Toxoplasma gondii* in raccoons. Journal of the American Veterinary Medical Association 200: 534-536
- Dubey J.P., Hamir A.N., Hanlon C.A., Topper M.J., Rupprecht C.E. (1990) – Fatal necrotizing encephalitis in a raccoon associated with a *Sarcocystis*-like protozoon. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2: 345-347
- Dubey, J.P., Hamir A.N., Rupprecht C.E. (1990) – Acute Disseminated Toxoplasmosis in a Red Fox (*Vulpes vulpes*). Journal of Wildlife Diseases 26(2): 286-290
- Dubey, J.P., Odening K. (2001) – Toxoplasmosis and related infections. In Parasitic diseases of wild mammals, 2nd ed., Samuel W. M., Pybus M. J., Kocau A. A., 478–519. Ed. Iowa State University Press
- Farina R., Scatozza F. (1998) – Trattato di malattie infettive degli animali. Ed. Utet 628-631

- Frölich K., Wisser J., Schmüser., Fehlberg U., Neubauer H., Grunow R., Nikolaou K., Priemer J., Thiede S., Streich W.J., Speck S. (2003) – Epizootiologic and ecologic investigations of european brown hares (*Lepus europaeus*) in selected populations from Schleswig-Holstein, Germany. *Journal of Wildlife Diseases* 39(4) 751-761

- Gianfaldoni D., Mancianti F. (2010) – *Toxoplasma gondii*. Un problema ispettivo attuale? Indagine epidemiologica in suini macellati a domicilio in Toscana. Dati preliminari. LXIV Convegno Nazionale SISVet, Asti

- Greene C.E., Appel M.J. (2006) – Canine Distemper. In *Infectious diseases of the dog and cat*, 3rd ed., Greene C.E., 25-41. Ed. Elsevier

- Hamilton C.M., Gray R., Wright S.E., Gangadharan B., Laurenson K., Innes E.A. (2005) – Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from around the UK. *Veterinary Parasitology* 130: 169-173

- Helmboldt C.F., Jungherr E.L. (1955) – Distemper complex in wild carnivores simulating rabies. *American Journal of Veterinary Research* 16: 463-469 (citato da Dubey, J.P., Hamir A.N., Rupprecht C.E. (1990) – Acute Disseminated Toxoplasmosis in a Red Fox (*Vulpes vulpes*). *Journal of Wildlife Diseases* 26(2): 286-290

- Ho M.S.Y., Barr B.C., Marsh A.E., Anderson M.L., Rowe J.D., Tarantal A.F., Hendrickx A.G., Sverlow K., Dubey J. P., Conrad P.A. (1996) – Identification of Bovine *Neospora* Parasites by PCR Amplification and Specific Small-Subunit rRNA Sequence Probe Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 4(5): 1203-1208

- Holzman S., Conroy M.J., Davidson W.R. (1992) – Diseases, parasites and survival of coyotes in south-central Georgia. *Journal of Wildlife Diseases* 28: 572-580

- Hurková L., Modrý D. (2006) – PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. *Veterinary Parasitology* 137: 150-154

- Jakubek E.-B., Bröjer C., Regnersen C., Ugglå A., Schares G., Björkman C. (2001) – Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Swedish red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Parasitology* 102: 167-172

- Jakubek E.-B., Farkas R., Pálfi V., Mattsson J. G. (2007) – Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Hungarian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Parasitology* 144: 39-44

- Krakowka S., Hoover E.A., Koestner A., Ketring K. (1977) – Experimental and natural occurring transplacental transmission of canine distemper virus. *American Journal of Veterinary Research* 38: 919-922

- Lopes A.P., Sargo R., Rodrigues M., Cardoso L. (2011) – High seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild animals from Portugal. *Parasitol. Res.* 108: 1163-1169

- Lovari S., Cavallini P., Crema G., Lazzaretti L., Lucherini M., Ricci-Lucchi M., Valier P. (1991) – Parametri ambientali e uso dell'habitat della volpe *Vulpes vulpes* (L, 1758) in alcune aree del Parco Naturale della Maremma. *Atti I Simp. Ital. Carnivori. Hystrix*, (n.s.) 3: 21-29

- Mancianti F., Verin R., Ariti G., Nardoni S., Mugnaini L., Papini R. (2010) – Preliminary result on prevalence of *Toxoplasma gondii* in free ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) in the province of Pisa (Italy): a serological and molecular approach. *Parassitologia* Vol. 52 (No. 1-2)

- Mandara M.T., Pavone S., Vitellozzi G. (2007) - Internal Hydrocephalus and Associated Periventricular Encephalitis in a Young Fox. *Vet. Pathol.* 44: 713-716

- Marsilio F., Tiscar P.G., Gentile L., Roth H.U., Boscagli G., Tempesta M., Gatti A. (1997) – Serologic survey for selected viral pathogens in brown bears from Italy. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 304-307

- Møller T. (1952) – Toxoplasmosis *Vulpes vulpes* (fox toxoplasmosis). *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavia Supplement* 93: 308-320 (citato da Dubey, J.P., Hamir A.N., Rupprecht C.E. (1990) – Acute Disseminated Toxoplasmosis in a Red Fox (*Vulpes vulpes*). *Journal of Wildlife Diseases* 26(2): 286-290

- Møller T., Nielsen S.W. (1964) – Toxoplasmosis in distemper-susceptible carnivora. *Pathologica Veterinaria* 1: 189-203 (citato da Dubey, J.P., Hamir A.N., Rupprecht C.E. (1990) – Acute Disseminated Toxoplasmosis in a Red Fox (*Vulpes vulpes*). *Journal of Wildlife Diseases* 26(2): 286-290

- Mörner T., Obendorf D.L., Artois M., Woodford M.H. (2002) – Surveillance and monitoring of wildlife diseases. *Rev Sci Tech.* 21(1) 67-76

- Murphy T.M., Walochnik J., Hassl A., Moriarty J., Mooney J., Toolan D., Sanchez-Miguel C., O'Loughlin A., McAuliffe A. (2007) – Study on the prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* and molecular evidence of *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infections in red foxes (*Vulpes vulpes*) in rural Ireland. *Veterinary Parasitology* 146: 227-234

- Nardini A., Fiorini I. (1986) – Toxoplasmosi. *Immunologia e clinica. Caleidoscopio* 20: 1-34

- Pagini S. (2003) – Zoonosi parassitarie emergenti: ruolo degli animali da compagnia. Tesi di laurea in Medicina Veterinaria. Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli Studi di Padova

- Pilli R., De Battisti R. (1998) – Animali e uomo: l'esempio della volpe. Rivista della Federazione Italiana Parchi e delle Riserve Naturali, numero 24 – giugno 1998

- Piano Regionale Faunistico-Venatorio 2008-2012. Regione Autonoma Valle d'Aosta. Assessorato Agricoltura e Risorse Naturali; Dipartimento Risorse Naturali e Corpo Forestale; Direzione Flora, Fauna, Caccia e Pesca

- Pietrobelli M. (2003) - Toxoplasmosi. In Parassitologia urbana: città, animali e salute pubblica. Puccini V., Tarsitano E., 49-57. Ed. Edagricole

- Prigioni C. (1991) – Aspetti della biologia della volpe (*Vulpes vulpes*) in Italia settentrionale. In Prigioni C. (ed.): Atti I Simp. Ital. Carnivori. Hystrix, (n.s.) 3: 41-50

- Prigioni C., Cantini M., Zilio A. (2001) – Atlante dei Mammiferi della Lombardia 218-222. Regione della Lombardia e Università degli Studi di Pavia

- Prigioni C., Tacchi E. (1991) – Nicchia trofica della volpe *Vulpes vulpes* nella Valle del Ticino. In Prigioni C. (ed.): Atti I Simp. Ital. Carnivori. Hystrix, (n.s.) 3: 65-75

- Reed W.M., Turek J.J. (1985) – Concurrent distemper and disseminated toxoplasmosis in a red fox. Journal of the American Veterinary Medical Association 187: 1264-1265 (citato da Dubey, J.P., Hamir A.N., Rupprecht C.E. (1990) – Acute Disseminated Toxoplasmosis in a Red Fox (*Vulpes vulpes*). Journal of Wildlife Diseases 26(2): 286-290

- Rinaldi L. (2010) – Protozoi: Toxoplasma. In Antropozoonosi parassitarie. Corso eLearning. Progetto "Campus Virtuale" dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. Disponibile all'indirizzo <http://www.federica.unina.it/medicina-veterinaria/antropozoonosi-parassitarie/protozoi-toxoplasma/>

- Saliki J.T., Cooper E.J., Gustavson J.P. (2002) – Emerging Morbillivirus Infections of Marine Mammals. Development of Two Diagnostic Approaches. New York Academy of Science 969: 51-59
- Scortecci G. (1966): Animali: mammiferi (II vol. pag 634-642). Edizioni Labor
- Siragusa C., Casapulla R., Baldi L., Guarino A., Mizzoni V., Romano R. (2004) – Osservazioni sullo stato sanitario di alcuni selvatici in Campania: indagine sierologica. J. Mt. Ecol. 7: 265-267
- Smith G.C., Gangaharan B., Taylor Z., Laurenson M.K., Bradshaw H., Hide G., Hughes J.M., Dinkel A., Romig T., Craig P.S. (2003) – Prevalence of zoonotic important parasites in the red fox (*Vulpes vulpes*) in Great Britain. Veterinary Parasitology 118: 133-142
- SNLG (Sistema Nazionale Linee Guida - 2010) – Linea guida: Gravidanza fisiologica. Istituto Superiore di Sanità. Pavona (Roma). Edizione Iacobelli. Disponibile all'indirizzo: <http://www.snlg-iss.it>
- Sobrino R., Cabezón O., Millán J., Pabón M., Arnal M.C., Luco D.F., Gortázar C., Dubey J.P., Almeria S. (2007) – Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild carnivores from Spain. Veterinary Parasitology 148: 187-192
- Spagnesi M., De Marinis A.M. (a cura di) (2002) – Mammiferi d'Italia. Quaderni di Conservazione della Natura, 14, Ministero dell'Ambiente - Istituto Nazionale della Fauna Selvatica
- Suligo B., Boros S., Camoni L., Lepore D., Santoro A., Ferri M., Roazzi P. (2007) – Aggiornamento dei casi di AIDS notificati in Italia e delle nuove diagnosi di infezione da HIV al 31 dicembre 2006. supplemento del notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità, 20 (6) suppl. 1
- Taylor M.A., Coop R.L., Wall R.L. (2007). Veterinary Parasitology, third Edition. Blackwell Publishing: 431-432.

- Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M., Jennings F.W. (1998) – *Parassitologia veterinaria*. II edizione. Ed. UTET
- Van Heerden J., Bainbridge N., Burroughs R.E.J., Kriek N.P.J. (1989) – Distemper-like disease and encephalitozoonosis in wild dogs (*Lycaon pictus*). *Journal of Wildlife Diseases* 25: 70-75
- Vesco G., Buffolano W., La Chiusa S., Mancuso G., Caracappa S., Chianca A., Villari S., Currò V., Liga F., Petersen E. (2007) – *Toxoplasma gondii* infections in sheep in Sicily, southern Italy. *Veterinary Parasitology* 146: 3-8
- Wanha K., Edelhofer R., Gabler-Eduardo C., Prosl H. (2005) – Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. *Veterinary Parasitology* 128: 189-193
- Williams E.S. (2001) – Canine Distemper. In *Infectious Diseases of Wild Mammals*, 3rd ed., Williams E.S., Barker I.K., 50-59. Iowa State University Press
- Wojcinski Z.W., Barker I.K. (1986) – Tyzzer's disease as a complication of canine distemper in a racoon. *Journal of Wildlife Diseases* 22: 55-59

Siti web:

- <http://en.wikipedia.org/wiki/Henipavirus>
- (http://www.scahls.org.au/data/assets/pdf_file/0006/1280841/menangle_virus.pdf)
- <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/menangle.pdf>