

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**  
**Facoltà di Medicina Veterinaria**  
**Corso di Laurea in Medicina Veterinaria**  
**Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica**



**INFEZIONI RESPIRATORIE VIRALI**  
**NEI CAMOSCI DEL VERBANO CUSIO OSSOLA**

Relatore : **Dott.ssa Camilla LUZZAGO**

Co-relatore : **Dott. Roberto VIGANO'**

Laureando:

**Martina BESOZZI**

Matr. N. **676825**

Anno accademico **2011/2012**

## Sommario

1. INTRODUZIONE.....	3
1.1. INFEZIONI RESPIRATORIE NEI RUMINANTI SELVATICI .....	3
1.2. PESTIVIRUS NEI RUMINANTI.....	7
1.2.1. <i>Struttura del virus</i> .....	7
1.2.2. <i>Resistenza ambientale</i> .....	8
1.2.3. <i>Spettro d'ospite e trasmissione</i> .....	8
1.2.4. <i>Comportamento in vitro</i> .....	9
1.3. RSV NEI RUMINANTI .....	10
1.3.1. <i>Struttura del virus</i> .....	10
1.3.2. <i>Resistenza ambientale</i> .....	10
1.3.3. <i>Spettro d'ospite e trasmissione</i> .....	11
1.3.4. <i>Comportamento in vitro</i> .....	11
1.4. ORTHOREOVIRUS NEI MAMMIFERI .....	11
1.4.1. <i>Struttura del virus</i> .....	12
1.4.2. <i>Resistenza ambientale</i> .....	13
1.4.3. <i>Spettro d'ospite e trasmissione</i> .....	13
1.4.4. <i>Comportamento in vitro</i> .....	13
2. SCOPO DEL LAVORO.....	15
3. MATERIALI E METODI .....	16
3.1. AREA DI STUDIO .....	16
3.1.1. <i>Realtà geografica</i> .....	16
3.1.2. <i>Realtà faunistica</i> .....	17
3.2. RACCOLTA DEI CAMPIONI.....	18
3.3. SELEZIONE DELLA POPOLAZIONE CAMPIONE .....	19
3.3.1. <i>Sieri</i> .....	19
3.3.2. <i>Tamponi bronco-polmonari</i> .....	19
3.4. METODICHE DI LABORATORIO .....	20
3.4.1. <i>Test di virus neutralizzazione (VN)</i> .....	20
3.4.2. <i>Isolamento virale</i> .....	22

3.4.3. Immunofluorescenza .....	22
3.4.4. Microscopia Elettronica .....	23
3.4.5. RT-PCR, sequenziamento e analisi delle sequenze .....	23
3.5. ANALISI STATISTICA .....	23
4. RISULTATI.....	25
4.1. ANALISI SIEROLOGICHE .....	26
4.2. ISOLAMENTO VIRALE, IMMUNOFLUORESCENZA E MICROSCOPIA ELETTRONICA .....	31
4.3. ANALISI MOLECOLARE .....	33
5. DISCUSSIONE .....	35
6. CONCLUSIONE .....	38
7. BIBLIOGRAFIA .....	40
8. RINGRAZIAMENTI .....	50

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1. INFEZIONI RESPIRATORIE NEI RUMINANTI SELVATICI

Le forme respiratorie rappresentano uno dei maggiori problemi sanitari dei ruminanti selvatici, quali ad esempio il camoscio (*Rupicapra rupicapra*), lo stambecco (*Capra ibex*), il muflone (*Ovis aries musimon*) a livello europeo ed il bighorn sheep (*Ovis canadensis*) in Nord America, con importanti ripercussioni a livello demografico.

Gli agenti eziologici coinvolti sono molteplici e quasi sempre si riscontrano in associazione tra loro (Zanin *et al.*, 1993). Si ipotizza un ruolo definito di “door-opener” di alcuni virus respiratori, quale il Virus Respiratorio Sinciziale (RSV), ad infestazioni di origine parassitaria ed infezioni batteriche, tra cui *Mannheimia haemolytica*, che è considerata da molti Autori il principale agente eziologico batterico coinvolto nelle infezioni respiratorie degli ungulati selvatici sia europei che americani (Zanin *et al.*, 1993; Hars and Gauthier, 1994; Wobeser, 1994). Proprio in Europa e Nord America sono stati riscontrati negli ultimi decenni importanti focolai di forme respiratorie accompagnati da un’alta mortalità; in Europa soprattutto nel camoscio (*Rupicapra rupicapra*) e nello stambecco (*Capra ibex*) (Hars and Gauthier, 1994), in America nel bighorn sheep (Wolff *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2012).

Una delle più gravi epidemie di polmonite nei camosci in Europa si è verificata proprio in Italia nell’autunno-inverno 2000-2001, periodo durante il quale sono state ritrovate 194 carcasse nelle Alpi Lecchesi, con un tasso di mortalità che ha raggiunto in alcune aree l’80% ed ha interessato tutte le classi di età (Citterio *et al.*, 2003). Inoltre il monitoraggio sierologico della popolazione di camosci negli anni pre e post epidemia (stagioni venatorie 1998-2001) ha evidenziato un incremento della sieroprevalenza e dei titoli anticorpali verso RSV

bovino (BRSV) raggiungendo valori del 95.8%, mentre sieronegatività verso Pestivirus (BVDV), Virus della Rinotracheite Infettiva (IBR) e Parainfluenza 3 (PI3). Durante l'epidemia sono stati sottoposti ad esame macroscopico 18 camosci trovati morti: 11 avevano lesioni riferibili a polmonite fibrinosa lobare, 6 a broncopolmonite catarrale e uno presentava ascessi polmonari multifocali, 14 di questi presentavano contemporaneamente polmonite verminosa; da 6 soggetti è stato possibile collezionare campioni per eseguire un esame batteriologico, da 3 di questi sono stati isolati *Mannheimia haemolytica* e *Aerococcus viridans* (Citterio *et al.*, 2003). Negli stessi anni anche sulle Alpi Orobie, è stata svolta un'indagine sierologica su una popolazione di camosci, di cervi e su greggi monticanti con i quali potevano interagire durante la stagione estiva. Tra i camosci ne sono stati testati sierologicamente 98 per BVDV e 88 per BRSV dimostrando una sieroprevalenza rispettivamente del 18% (I.C. 95% 11.2-27.4) e del 41% (I.C. 95% 30.5-51.9) (Gaffuri *et al.*, 2006).

Una popolazione di caprioli appenninica in calo demografico, è stata indagata tra il 1995 ed il 2004 per valutare l'associazione tra circolazione di BRSV, parametri demografici e calo della densità di popolazione. Le analisi sierologiche hanno evidenziato una sieroprevalenza del 14.8% (I.C. 95% 10.5-19.8) verso BRSV ed è stata dimostrata un'associazione significativa tra la variazione di densità della popolazione e la circolazione del virus (O.R.=1.170-2.367,  $p=0.005$ ). I risultati ottenuti inoltre supportano l'ipotesi che BRSV si mantenga nella popolazione di capriolo e sia responsabile delle variazioni demografiche (Armaroli *et al.*, 2006).

In conclusione per quanto riguarda RSV, l'impatto sulla dinamica di popolazione non è ad oggi completamente chiarito, nonostante sindromi respiratorie colpiscano frequentemente bovidi selvatici quali

bighorn sheep (*Ovis canadensis*) negli USA e camoscio in Europa (Gauthier, 2001; Citterio *et al.*, 2003). La sieroprevalenza riscontrata in numerose popolazioni supporta l'ipotesi di una diffusione di BRSV a carattere endemico (Gaffuri *et al.*, 2006; Boyce *et al.*, 2011), sebbene sia stato rilevato un rialzo dei titoli anticorpali in corso di focolaio di polmonite ad elevata mortalità (Citterio *et al.*, 2003).

Durante un'altra epidemia caratterizzata da alopecia e sintomi respiratori in Spagna tra il 2001 ed il 2002 è stato segnalato un nuovo genotipo di Border Disease Virus (BDV) appartenente al genere Pestivirus in una popolazione di camosci dei Pirenei (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). Studi successivi hanno dimostrato che la malattia è diventata endemica nell'area ed ha avuto un grave impatto sulle dinamiche di popolazione (Marco *et al.*, 2007). Nel 2005, a circa 30 km dalla precedente epidemia, è stata segnalata un'improvvisa mortalità con un calo demografico dell'85.6%. Pochi mesi dopo l'epidemia si diffonde alla vicina regione di Cadì National Hunting Reserve, portando la popolazione ad un calo demografico stimato del 63% tra il 2004 ed il 2006. Sono stati effettuati 68 esami necroscopici su camosci trovati morti, di differenti classi di età comprese tra 1 e 5 anni, che dimostravano sintomi respiratori, cachessia ed alopecia. Le lesioni macroscopiche riscontrate sono state broncopolmonite in 31 camosci, enterite in 4, cheratocongiuntivite in 2, ascessi in 2, pleuropolmonite fibrinosa solo in un camoscio. È stata poi effettuata un'indagine molecolare (PCR) su omogenati di milza e reni utilizzando primers panpestivirus. Dei 68 camosci analizzati 66 sono risultati positivi e solo 2 negativi a Pestivirus (Marco *et al.*, 2009).

Dal 1995 si hanno studi sulla prevalenza dei Pestivirus nei camosci anche sul versante francese dei Pirenei, dove si registrano nell'area più a Sud valori di sieroprevalenza pari al 45.9% nei camosci e 61.1% nei mufloni, fino a valori del 70.3% nei camosci della zona di Orlu

(Martin *et al.*, 2011; Pioz *et al.*, 2007). In Italia, precisamente in Val di Susa, nel 2005 è stata riscontrata una sieroprevalenza del 25.5% nei confronti dei Pestivirus nei camosci e del 5.9% nei cervi (Olde Riekerink *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda l'esperienza del Nord America, tra il 2008 e il 2010 sono state studiate 8 popolazioni di bighorn sheep demograficamente indipendenti in 5 Stati diversi del Nord America (Montana, Nevada, Washington, Oregon, Sud Dakota) con sintomi respiratori, per un totale di 44 soggetti esaminati, lo studio evidenzia tramite l'esame batteriologico e metodiche molecolari diversi agenti eziologici batterici della famiglia delle *Pasteurellaceae* (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella trehalosi*) (Wolff *et al.*, 2012). Altri Autori sostengono che la polmonite batterica riscontrata nei bighorn sheep americani sia secondaria ad infezioni respiratorie virali primarie, date più frequentemente da BRSV e PI-3 (Miller *et al.*, 2012). A supporto di questa ipotesi l'indagine eseguita su quattro popolazioni di bighorn sheep nel Montana tra il 2002 ed il 2006 in seguito ad un forte calo demografico dovuto a malattia respiratoria: i tamponi orofaringei di 106 soggetti, sono stati sottoposti ad esame batteriologico e parallelamente i sieri degli stessi ad esame sierologico, riscontrando in tutti i campioni la presenza di *Pasteurella trehalosi* e sieropositività verso PI3 e BRSV in tutti i campioni, mentre solo due soggetti sono risultati positivi a IBR (1:8) (Miller *et al.*, 2011).

Nel complesso, i dati disponibili in letteratura suggeriscono un differente livello di adattamento alla specie ospite dei virus indagati nelle forme respiratorie dei ruminati selvatici ed in particolare del camoscio. I Pestivirus sembrano presentare un livello di adattamento inferiore, sulla base della sporadica diffusione o assenza in alcune aree e dall'anomalo profilo di virulenza osservato in alcuni focolai.

La diffusione endemica di RSV suggerisce invece un livello di adattamento maggiore alla specie ospite.

Di seguito si approfondiranno alcuni aspetti relativi a virus quali BVDV, BRSV e *Orthoreovirus* dei mammiferi (MRV) caratterizzati da tropismo per l'apparato respiratorio ed in considerazione di precedenti esperienze sia italiane sia straniere che hanno evidenziato sieroprevalenze a volte molto elevate negli ungulati selvatici.

Per quanto riguarda MRV, l'isolamento a livello polmonare nella popolazione di camosci oggetto della presente indagine, ha motivato l'approfondimento dei dati disponibili in letteratura.

## 1.2. PESTIVIRUS NEI RUMINANTI

Il genere Pestivirus, che include il Virus della Diarrea Virale Bovina (BVDV) e della Border Disease (BDV), non è strettamente ospite specifico, numerose indagini hanno infatti evidenziato una trasmissione interspecie (Vilcek e Nettleton, 2006). BVDV può contribuire allo sviluppo della sindrome respiratoria bovina a causa dei suoi effetti immunosoppressivi: è infatti spesso associato a patologie dell'apparato respiratorio che colpiscono i giovani vitelli, spesso in concomitanza con l'infezione da *Mannheimia haemolytica*, o virus quali PI-3, BRSV, BHV-1 (Richer *et al.*, 1988).

### 1.2.1. Struttura del virus

I Pestivirus sono virioni di forma sferica, di circa 40-60 nm di diametro, con nucleocapside a simmetria icosaedrica e provvisti di envelope lipidico contenente subunità superficiali a forma di anello del diametro di 10-12 nm (Collett, 1988); il genoma è rappresentato da RNA monocatenario a polarità positiva di 12.3 kb (Hornberg, 2009).



### 1.2.2. Resistenza ambientale

Grazie alla presenza dell'envelope lipidico è un virus facilmente inattivabile dai più comuni solventi organici o dal cloroformio (Hermodosson e Dinter, 1962; Dinter, 1963). Il potere infettante cala notevolmente dopo trattamento di una sospensione virale con 0,5 mg/ml di tripsina a 37°C per un'ora. Mentre a valori di pH compresi tra 5.7 e 9.3 risulta avere una discreta stabilità (Hafez e Liess, 1972b).

### 1.2.3. Spettro d'ospite e trasmissione

Inizialmente venivano classificati in base alla specificità d'ospite, ma per quanto l'ospite naturale di BVDV sia rappresentato dal bovino, può essere isolato anche da altre specie animali domestiche e selvatiche appartenenti all'ordine degli *Artiodactyla* (Ridpath 2003; Vilček e Nettleton, 2006). Per quanto riguarda gli animali selvatici, indagini sierologiche hanno dimostrato infezioni in più di 40 specie ospite (Vilček e Nettleton, 2006). I Pestivirus sono infatti sierologicamente correlati. L'ospite naturale di BDV è rappresentato dalla pecora, ma recenti studi hanno identificato BDV nei camosci (Bregoli *et al.*, 2006; Marco *et al.*, 2007).

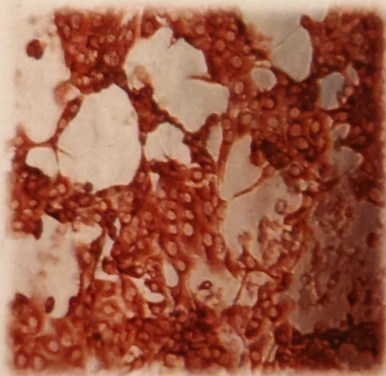
Il virus riesce anche ad adattarsi al coniglio dopo alcuni passaggi, ma non è comunque da considerare un ospite naturale dell'infezione (Baker *et al.*, 1954).

La trasmissione di BVDV può avvenire sia per via orizzontale, in modo diretto e indiretto, sia per via verticale. Il contatto diretto fra animali sani e animali infetti è la principale via di trasmissione, mentre le altre modalità di trasmissione indiretta sono strettamente dipendenti dalla quantità di virus presente e dalla modalità stessa, tenendo presente che il virus sopravvive fino a due settimane nell'ambiente esterno. Il BVDV viene eliminato attraverso la saliva, secrezioni oculari o nasali, urine, liquido amniotico, placenta, muco

vaginale e sperma, ove lo si può riscontrare per periodi molto lunghi dopo l'infezione. (Viet *et al.*, 2004; Lindberg *et al.*, 2006). La trasmissione verticale si verifica quando viene infettata una femmina gravida, poiché il BVDV è in grado di oltrepassare la barriera placentare. I ceppi citopatici causano sempre la morte del feto, mentre i ceppi non-citopatici, a seconda del periodo di insorgenza dell'infezione, possono dare origine ai soggetti immunotolleranti e persistentemente infetti (Brownlie *et al.*, 1990).

#### 1.2.4. Comportamento in vitro

A seconda della replicazione in coltura cellulare si possono distinguere un biotipo citopatico ed uno non citopatico (Brownlie *et al.*, 1986; Bolin *et al.*, 1985b,c). Per questo motivo per la diagnosi di laboratorio del biotipo citopatico il Gold Standard è la virusneutralizzazione su cellule MDBK o cellule fibroblasti che embrionali (MacLachlan *et al.*, 2011); mentre per il biotipo non citopatico bisogna avvalersi di immunofluorescenza (Fernelius, 1964) o immunoperossidasi (Holm Jensen, 1981).



**Figura 1 : ECP BVDV in coltura cellulare continua di MDBK evidenziato tramite test di immunoperossidasi.**

### 1.3. RSV NEI RUMINANTI

Il RSV è compreso nella Famiglia *Paramyxoviridae*, Subfamiglia *Pneumovirinae*, Genere *Pneumovirus* (MacLachlan *et al.*, 2011). Fu isolato per la prima volta nel 1956 da uno scimpanzée con sintomi simil-influenzali (Morris *et al.*, 1956), poco dopo anche in un bambino a Baltimora con malattia polmonare e messo in coltura cellulare il virus mostrava un caratteristico effetto citopatico di tipo sinciziale (Chanock *et al.*, 1957). Nei Ruminanti sono stati proposti due sottogruppi, uno comprende RSV bovino e caprino, l'altro quello ovino (Alansari *et al.*, 1999).

#### 1.3.1. Struttura del virus

È un virus pleomorfo con forma e dimensioni variabili, tra 150 e 300 nm di diametro (Berthiaume *et al.*, 1974). È provvisto di envelope e nucleocapside contenente un filamento di RNA monocatenario a polarità negativa (Huang *et al.*, 1982) composto da 10 geni codificanti per 10 proteine virali, di cui 4 associate all'envelope e 3 formano il nucleo capsidico (Levin *et al.*, 1987).

#### 1.3.2. Resistenza ambientale

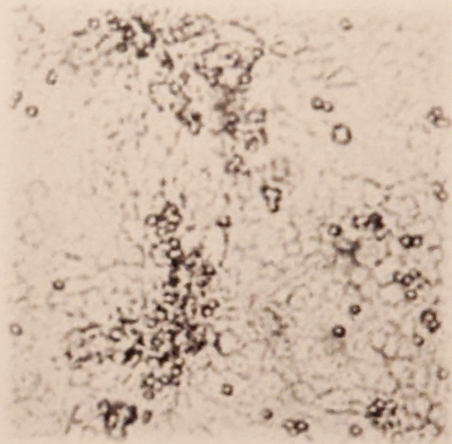
E' un virus piuttosto labile, è sensibile a valori bassi di pH, etere, cloroformio e la maggior parte dei comuni disinfettanti; viene inattivato a 56°C per 30 minuti, ma è resistente alle basse temperature, anche se dopo conservazione a -70°C l'isolamento virale risulta più difficoltoso (Inaba *et al.*, 1970; Paccaud e Jacquier, 1970; Rosenquist, 1974).

### 1.3.3. Spettro d'ospite e trasmissione

E' possibile la reinfezione: ciò è dimostrato dal fatto che in una popolazione chiusa esistono infezioni ricorrenti; probabilmente RSV persiste in alcuni soggetti durante l'estate e innesca nuovi casi clinici l'inverno successivo (Van der Poel *et al.*, 1993); in particolare il virus si moltiplica e permane silente nei linfociti B, dove sono stati trovati antigeni virali oltre 6 mesi dopo un'infezione sperimentale (Valarcher *et al.*, 2001).

### 1.3.4. Comportamento in vitro

In coltura cellulare BRSV cresce su molti tipi cellulari di bovino (rene, testicolo, tiroide, timo, duodeno, retto), suino (rene fetale), topo (polmone, rene), scimmia (Vero) e uomo (Hela, HEp-2); anche se la crescita migliore si ha su una coltura cellulare bovina (Matumoto *et al.*, 1974).



**Figura 2 : ECP BRSV in coltura cellulare continua di MDBK.**

## 1.4. ORTHOREOVIRUS NEI MAMMIFERI

Anche MRV sono responsabili d'infezione in numerose specie di mammiferi (Tyler *et al.*, 2001; Day *et al.*, 2009). Tuttavia, poiché si tratta spesso di infezioni asintomatiche o paucisintomatiche, rimangono sotto-diagnosticate. Nonostante spesso sia un reperto

occasionale MRV ha una sua importanza epidemiologica e sanitaria in quanto isolato oltre che in specie come primati, bovini, equini, suini, gatti, cani e topi, anche nell'uomo (Tyler *et al.*, 2001).

MRV fu isolato per la prima volta nei primi anni '50 in un essere umano con sintomi respiratori e venne così chiamato nel 1959 *Respiratory Enteric Orphan* perché era un agente eziologico non associato ad alcuna patologia già nota ed isolabile dall'apparato respiratorio e da quello enterico, infatti prima classificato come ECHO (*Enteric Cytopathic Human Orphan Virus*) sierotipo 10 (Kapikian, 1996).

#### 1.4.1 Struttura del virus

MRV ha forma sferica con diametro di 70 nm nel caso del virione completo e di 52 nm in carenza del solo capsido esterno, sprovvisto di envelope.

L'acido nucleico rappresentato da dsRNA è suddiviso in 10 segmenti, diversi per dimensione e composizione nucleotidica, raggruppati in 3 classi indicate come L (*Large*), M (*Medium*) e S (*Small*) (Nibert and Schiff, 2001). La segmentazione del genoma è responsabile dell'alta frequenza di ricombinazione caratteristica di questi virus indipendentemente dal sierotipo di appartenenza. Nel MRV si riconoscono 9 proteine strutturali e 2 non strutturali. Quelle strutturali vengono denominate con le lettere dell'alfabeto greco (lambda, mi e sigma) a seconda del segmento del genoma codificante L, M o S. Esistono 3 sierotipi di MRV, tutti agglutinano gli eritrociti umani, ma solo il sierotipo 3 agglutina quelli di bovino (Fields *et al.*, 1990).

#### 1.4.2. Resistenza ambientale

È un virus molto stabile a temperatura ambiente e anche ad alte temperature, infatti a 37°C perde il 50% di potere infettante e viene completamente inattivato dopo 3 ore a 56°C e 1 ora a 60°C, mentre a temperature inferiori ai 4°C viene inibita la crescita e replicazione. I tempi si riducono notevolmente se si associa l'azione di alcune sostanze chimiche come etanolo al 70% dopo lunga esposizione oppure etanolo al 95% o ipoclorito di sodio in soluzione (800 ppm) dopo anche breve esposizione. Il virus è invece molto sensibile all'inattivazione tramite raggi UV (Fields *et al.*, 1990).

#### 1.4.3. Spettro d'ospite e trasmissione

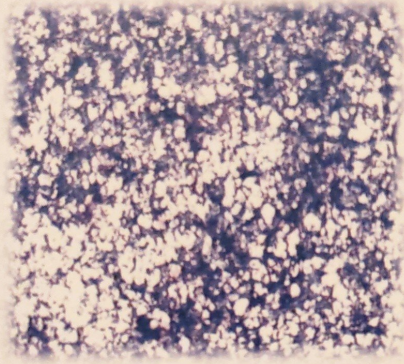
MRV può essere facilmente isolato dalle feci, ma anche dalle secrezioni nasali e faringee, dalle urine, dal sangue, dal liquido cerebrospinale di diverse specie come uomo, topo, scimpanzé, cane, gatto, bovino, ovino, equino, suino, scimmia. Mentre nel pipistrello è stato isolato con caratteristiche sia del virus tipico dei mammiferi sia di quello tipico dei volatili (Kapikian, 1996).

Le particelle virali si diffondono soprattutto per aerosol, essendo un virus stabile ad alti valori di umidità relativa (90-100%), colonizzando quindi l'epitelio respiratorio di numerosi soggetti conviventi (Fields *et al.*, 1990), ma esiste anche la possibilità di diffusione tramite ciclo oro-fecale (MacLachlan *et al.*, 2011).

#### 1.4.4. Comportamento in vitro

*In vitro* si ottiene una buona replicazione del virus su linee cellulari primarie o continue di diverso tipo; MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney), LLC-MK2 (rhesus monkey kidney), Intestinal 407 (cellule embrionarie intestinali umane), BGM (Buffalo Green Monkey kidney) (Ridinger *et al.*, 1982) e cellule Vero. Su tutte queste linee cellulari il

virus produce un caratteristico effetto citopatico; le cellule diventano di aspetto granulare e presentano inclusi intracitoplasmatici, ben visibili usando la colorazione Rosso Congo, che si portano in posizione sempre più perinucleare aumentando di volume man mano che l'infezione perdura nel tempo (Fields *et al.*, 1990).



**Figura 3: ECP MRV in coltura cellulare continua di MDBK con colorazione EE.**

## 2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo della presente tesi è di indagare la diffusione di virus respiratori, quali BRSV e BVDV, caratterizzati da un differente livello di adattamento nei ruminanti selvatici e in particolare nel camoscio, a fronte di una diffusione endemica nei ruminanti domestici. L'indagine è stata svolta nell'ambito della convenzione "Monitoraggio sanitario dei ruminanti selvatici", tra C.A. VCO2 e il Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica (DIVET), (ex Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria-DIPAV) dell'Università degli Studi di Milano. Analizzando i dati disponibili rispetto alla serie storica degli abbattimenti, si osserva un calo della condizione fisica nel camoscio, in particolare nel peso degli yearling. L'attenzione quindi è stata focalizzata su questa classe d'età, in quanto fornisce indicazioni circa il tasso di sopravvivenza dei giovani dell'anno all'inverno precedente. In particolare, la presente tesi ha valutato la presenza di virus polmonari negli yearling e ha effettuato un'indagine sieropidemiologica estesa a tutte le categorie di età, al fine di valutare la circolazione di patogeni virali in assenza di sintomatologia clinica conclamata.



### 3. MATERIALI E METODI

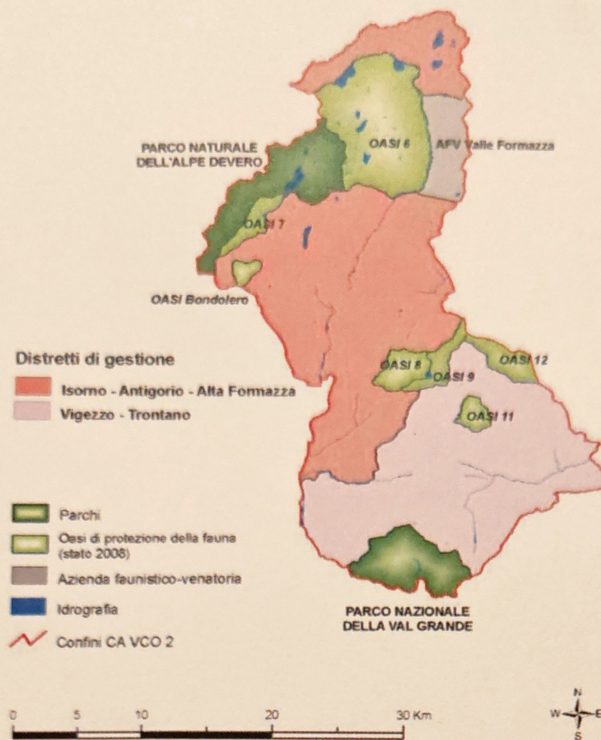
#### 3.1. AREA DI STUDIO

##### 3.1.1. Realtà geografica

La raccolta dei campioni è stata condotta durante le stagioni venatorie nel Comprensorio Alpino Verbano-Cusio-Ossola 2 (C.A. VCO2), situato nelle Alpi Lepontine Occidentali. Il comprensorio comprende quattro valli principali: Formazza, Antigorio, Vigezzo e Isorno. Una piccola porzione relativa ai comuni di Trontano e Masera appartiene geograficamente alla Val d'Ossola. Sulla base della nuova perimetrazione il C.A. si estende complessivamente su 72.740 ha (Torriani, 2007).



Figura 4: localizzazione geografica della Provincia di Verbania.



**Figura 5: carta del territorio del C.A. VCO2 e relative aree protette e AFV.**

Le caratteristiche tipicamente alpine del VCO2 sono chiaramente percepibili osservando la distribuzione altitudinale del territorio: oltre l'80% della superficie è ad una quota superiore ai 900 m s.l.m.. Infine, nonostante la quota media elevata, il 60% della superficie del C.A. ha una pendenza inferiore ai 30° (Viganò e Borretti, 2009).

### 3.1.2. Realtà faunistica

Il territorio di studio è caratterizzato dalla presenza di tutte le quattro specie di ungulati selvatici tipiche dell'ambiente alpino: camoscio (*Rupicapra rupicapra rupicapra*), capriolo (*Caproelus caproelus*), cervo (*Cervus elaphus*), stambecco (*Capra ibex*). Inoltre la presenza di francolino (*Banasa banasia*), fagiano di monte (*Tetrao tetrix*), coturnice (*Alectoris graeca*), pernice bianca (*Lagopus mutus*), nonché

della lepre bianca (*Lepus timidus*) testimoniano l'elevata qualità ambientale dell'area di studio. Peraltro negli ultimi anni si è verificato un aumento demografico e spaziale del cinghiale (*Suus scrofa*), dovuto ad immissioni non autorizzate. L'attività venatoria è esercitata su: camoscio, capriolo, cervo, cinghiale, fagiano di monte e coturnice. Per quanto riguarda in particolare il camoscio, oggetto di studi di questa tesi, è presente in tutto il territorio del Comprensorio Alpino VCO2. La superficie utile alla specie (S.U.S.) è pari a 32.736 ha. La densità media della specie nel quinquennio 2004/2008 riferita alla S.U.S., risulta essere pari a 4,9 individui per 100 ha (Viganò e Borretti, 2009). La morfologia del suolo risulta, infatti, particolarmente favorevole all'insediamento di questa specie. La presenza di versanti a diversa pendenza ed esposizione, boschi ben strutturati inframmezzati da zone ad arbusteti, praterie di alta quota ben estese dove gli animali trascorrono la stagione estiva, e buona presenza di zone rocciose, canali, vallette nivali ben distribuite e settori rocciosi di difficile accesso dove le femmine possono partorire, costituiscono un ambiente molto vocato per questo bovide. Per quanto riguarda consistenza numerica e densità, i dati a disposizione derivano dai censimenti effettuati annualmente durante la stagione primaverile, con un andamento per lo più costante nella popolazione.

### 3.2. RACCOLTA DEI CAMPIONI

Le indagini sono state condotte a partire dai camosci pervenuti al centro di controllo VCO2 durante le stagioni venatorie dal 2006 al 2009. Per ogni capo è stata valutata la classe di età e sono stati registrati il sesso, le misurazioni morfo-biometriche (peso eviscerato, lunghezza del ramo della mandibola e del tarso, lunghezza del corno destro e del sinistro) e i dati relativi all'abbattimento (ora e luogo).

Inoltre i cacciatori stessi, al momento dell'abbattimento, hanno provveduto alla raccolta dell'abomaso e di sangue intero tramite iugulazione per le successive analisi. La raccolta dei campioni è stata effettuata dal personale tecnico del centro di controllo e personalmente ho partecipato attivamente a detta raccolta a partire dalla stagione venatoria 2007.

### 3.3. SELEZIONE DELLA POPOLAZIONE CAMPIONE

Considerando le difficoltà effettive nell'ottenere campioni di sangue dai soggetti abbattuti, sono stati analizzati sierologicamente tutti i sieri raccolti e pervenuti al laboratorio.

Sulla base dei dati sierologici ottenuti nel biennio 2007-2008, nelle stagioni venatorie 2009-2010 è stato prelevato tessuto polmonare da sottoporre ad analisi virologiche da tutti i soggetti di un anno di età (yearling) e da soggetti adulti nel caso di evidenti lesioni polmonari.

#### 3.3.1. Sieri

I campioni di sangue pervenuti al centro di controllo sono stati centrifugati per la raccolta del siero e successivamente aliquotati in provette da 1,5 ml e stoccati a -20°C.

Le modalità di prelievo dei campioni di sangue, *post-mortem* e in condizioni di scarsa igiene, hanno influito sulla qualità del campione ai fini analitici; il siero di alcuni campioni è risultato infatti inquinato o eccessivamente emolitico e perciò non utilizzabile a priori ovvero sottoposto ad analisi non ha permesso di ottenere un risultato valido.

#### 3.3.2. Tamponi bronco-polmonari

Sono stati prelevati campioni utilizzando due differenti tipologie di tamponi: uno indicato per effettuare l'isolamento virale in coltura cellulare (UTM Kit, Copan) ed uno per poter effettuare analisi

molecolari (eSwab, liquid amies preservation medium, Copan); con ognuno sono stati tamponati 43 camosci nella stagione venatoria del 2009. Il brushing con tampone è stato fatto attraverso il bronco principale verso il lobo apicale del polmone poche ore dopo l'abbattimento. I tamponi sono stati stoccati a -20°C al centro di controllo per una settimana e successivamente trasferiti a -80°C in laboratorio prima della processazione.

### 3.4. METODICHE DI LABORATORIO

#### 3.4.1. Test di virus neutralizzazione (VN)

**BVDV:** I sieri di sangue sono stati testati per valutare la presenza e il titolo di anticorpi neutralizzanti verso BVDV ceppo 1a NADL (ATCC VR-534) secondo la metodica tratta da O.I.E. (1996), parzialmente modificata.

E' stata utilizzata la linea cellulare MDBK, coltivata in Minimum Essential Medium (MEM) e 10% di siero fetale bovino (FBS), negativo ad anticorpi e BVD virus.

I sieri in esame sono stati diluiti serialmente in base 2 da 1:4 a 1:512. Per ciascun campione sono state effettuate due repliche. In ogni pozzetto dei campioni di siero diluiti e dei controlli (ad eccezione del controllo cellule) è stato inoculato un volume di sospensione virale (50 µl/pozz.) contenente 100 TCID<sub>50</sub>. Quale controllo del titolo virale sono state inoculate la sospensione virale utilizzata e le diluizioni 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> in 4 repliche per diluizione. Le piastre inoculate sono state mantenute in termostato umidificato a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub> per 1 ora. In tutti i pozzetti è stata seminata una sospensione di MDBK (1,5 x 10<sup>5</sup> /ml) 50 µl per pozzetto, in terreno addizionato di siero fetale bovino alla concentrazione finale del 10%. Le piastre sono state incubate in termostato umidificato a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub> per 96 ore.

Il titolo neutralizzante è stato espresso come il reciproco della più alta diluizione di siero in grado di neutralizzare completamente l'effetto citopatico del virus ed è stato calcolato mediante il metodo di Kärber. I sieri con titolo >8 sono stati considerati positivi.

**BRSV:** Il test è stato eseguito su micropiastre a 96 pozzetti utilizzando la linea cellulare MDBK ed il ceppo virale BRSV 375. È stata utilizzata la medesima metodica descritta sopra con la differenza che le piastre sono state incubate in termostato umidificato a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub> per 7 giorni.

Il titolo neutralizzante è stato espresso come reciproco della più alta diluizione del siero in grado di neutralizzare completamente l'effetto citopatico del virus ed è stato calcolato secondo il metodo di Kärber. I sieri con titolo > 8 sono stati considerati positivi.

**MRV:** I sieri sono stati testati in VN verso i ceppi di riferimento di MRV: Reovirus sierotipo 1 ceppo Lang (ATCC VR-230), Reovirus sierotipo 2 ceppo D5 Jones (ATCC VR-231) e Reovirus sierotipo 3 ceppo Abney (ATCC VR-232), gentilmente forniti dal dott. Cordioli (IZSLER, Reparto di Virologia). E' stata utilizzata la linea cellulare stabilizzata di cellule Vero, coltivata in MEM e 5% di siero fetale bovino, negativo ad anticorpi e BVD virus. È stata utilizzata la medesima metodica descritta sopra con la differenza che le piastre sono state incubate in termostato umidificato a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub> per 3 giorni. Il titolo neutralizzante è stato espresso come il reciproco della più alta diluizione di siero in grado di neutralizzare completamente l'effetto citopatico del virus ed è stato calcolato mediante il metodo di Kärber (1931). I sieri con titolo >8 sono stati considerati positivi.

### 3.4.2. Isolamento virale

Le provette contenenti i tamponi sono state vortexate ed il terreno di trasporto è stato trasferito in provette sterili e centrifugato a 3300 x g per 10 minuti a 2-8°C. Il sedimento è stato utilizzato per l'immunofluorescenza per RSV (vedi capitolo successivo), mentre il surnatante è stato inoculato nelle piastre a 24 pozzetti in cellule MDBK con aggiunta di MEM addizionato con 1% di L-glutammina 200 mM, 100 U/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomicina, 2,5 µg/ml di fungizone e 10% di FBS, negativo agli anticorpi verso BHV-1, BRSV, PI-3 e BVDV. Le piastre inoculate sono state incubate a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub> e dopo le 1-2 ore del periodo di adsorbimento le colture cellulari sono state sottoposte ad un lavaggio e poi è stato aggiunto altro MEM. Le colture sono state osservate quotidianamente per 6 giorni per rilevare l'eventuale effetto citopatico (ECP). Se non si è osservato nessun ECP sono stati fatti due passaggi ciechi, le cellule sono state raschiate e mischiate vigorosamente con il terreno ed utilizzate per essere inoculate in monostrati cellulari freschi.

### 3.4.3. Immunofluorescenza

Il sedimento cellulare dei tamponi polmonari e i replicati in coltura cellulare con ECP sono stati fissati con acetone puro pre-raffreddato a -20°C. E' stato poi eliminato l'acetone aspirando e rimossa la camera con pozzetti, i vetrini sono stati lasciati asciugare a 37°C per circa 10 minuti e poi incubati con anticorpo monoclonale marcato BRSV (VMRD) (50 microlitri/pzz) per 1,30 h a 37°C in camera umida al 5% di CO<sub>2</sub>. Sono stati poi effettuati un lavaggio per immersione in PBS per 10 minuti ed una colorazione di contrasto con Blu di Evans per altrettanti 10 minuti. Dopo un altro lavaggio per immersione in PBS

per 10 minuti è stato aggiunto Mounting Medium immediatamente per evitare che si asciughi la preparazione. Il vetrino è stato letto con microscopio a fluorescenza 50x e 200x.

#### 3.4.4. Microscopia Elettronica

Il campione 84407, uno yearling femmina abbattuto nel 2009 nel comune di Premia, il quale aveva dato un ECP non riferibile né a BVDV né a BRSV, è stato inviato alla cortese attenzione del Dottor Antonio Lavazza (IZLER, reparto di Microscopia Elettronica).

#### 3.4.5. RT-PCR, sequenziamento e analisi delle sequenze

L' RNA virale è stato estratto da lisato di cellule Vero infette usando TRIZOL®LS (Invitrogen). È stato poi risospeso in 10 µl di acqua DPEC. L'RNA diluito è stato poi retrotrascritto in c-DNA e sottoposto a PCR per Pestivirus (Luzzago *et al.*, 2001), RSV bovino e ovino (Larsen *et al.*, 1999; Eleraky *et al.*, 2003), pan-coronavirus (Vijgen *et al.*, 2008). Sulla base dell'esito della microscopia elettronica, il c-DNA è stato successivamente sottoposto a PCR per MRV utilizzando primers per L1-rv5/L1-rv6 (Leary *et al.*, 2002), specifici per un tratto genomico di L1 conservato in MRV. I prodotti di PCR sono stati sequenziati in strutture esterne (Primm). Le sequenze ottenute sono state corrette manualmente utilizzando il software Bioedit (Hall, 1999) e allineate con sequenze disponibili in GenBank, utilizzando ClustalX software (Thompson *et al.*, 1994).

### 3.5. ANALISI STATISTICA

I dati raccolti su foglio elettronico sono stati analizzati con un software statistico (MedCalc®, Versione 12.2.1.0, MedCalc Software bvba, Belgio). A fini statistici la distribuzione delle frequenze delle diverse variabili categoriche (età, sesso, anno, provenienza) sono state



comparate fra loro attraverso il Test  $\chi^2$ . La significatività è stata accettata per valori di  $p < 0,05$ . Per quanto riguarda il calcolo delle prevalenze, con i relativi intervalli di confidenza, delle due patologie considerate nelle varie classi di frequenza è stato utilizzato il programma online Winepi (<http://www.winepi.net/>).

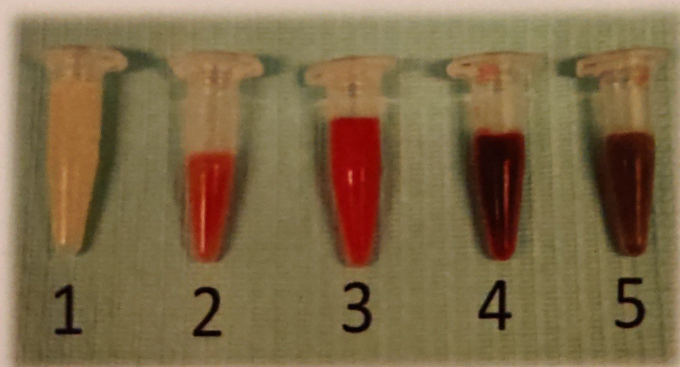
#### 4. RISULTATI

Tra il 2006 ed il 2009 sono pervenuti al centro di controllo un totale di 772 camosci. Nella tabella 1 è indicato il numero dei soggetti abbattuti suddivisi per stagione venatoria.

<i>ANNO</i>	<i>CAMOSCI ABBATTUTI</i>
2006	184
2007	211
2008	175
2009	202

**Tabella 1: Numero camosci abbattuti per stagione venatoria.**

Relativamente ai prelievi di siero, la qualità dei campioni raccolti ha presentato una elevata variabilità dovuta alle modalità di prelievo precedentemente descritte. In particolare, nella figura 6 è riportata, a titolo esemplificativo, una scala di qualità dei sieri raccolti. Il campione di siero (1) è stato prelevato da un soggetto in vita; i sieri (2-3-4-5) sono stati raccolti da soggetti abbattuti durante l'attività venatoria. I sieri (1-2-3) sono stati utilizzati per analisi sierologiche, il siero (4) di scarsa qualità è stato scartato a priori e il "siero" (5) è la conseguenza di una contaminazione da altri fluidi organici.



**Figura 6:**  
Confronto  
tra qualità  
di sieri.

La tabella 2 riporta il numero di sieri prelevati e il numero di sieri effettivamente utilizzati per gli esami sierologici, ricavando poi la percentuale di animali testati rispetto a quelli abbattuti.

<i>ANNO</i>	<i>ANIMALI ABBATTUTI</i>	<i>SIERI RACCOLTI</i>	<i>SIERI ESAMINATI</i>	<i>ESAMINATI SU ABBATTUTI</i>
2006	184	41	22	11.96%
2007	211	44	25	11.85%
2008	175	49	38	21.71%
2009	202	114	61	30.20%

**Tabella 2: Confronto tra numero di capi abbattuti per ciascuna stagione venatoria e numero di sieri raccolti per gli esami sierologici.**

#### 4.1. ANALISI SIEROLOGICHE

**BRSV:** Nei tre anni di indagini sono risultati sieropositivi 81 campioni (68,06%) su 119 sieri analizzati. Suddividendo il risultato per anno di prelievo (tabella 3) si evidenzia la sieroprevalenza più elevata nei primi due anni di indagine con valori del 76% nel 2007 e di 79.41% nel 2008 e un calo nel 2009 con valori di siero prevalenza del 57.38%. Tale differenza è risultata al limite della significatività statistica ( $p=0.053$ ).

<i>ANNO</i>	<i>SIERI ESAMINATI</i>	<i>SIERI POSITIVI</i>	<i>SIEROPREVALENZA (I.C. al 95% .)</i>
2007	25	19	76% (59.26-92.74)
2008	34	27	79.41% (65.82-93.00)
2009	61	35	57.38% (44.97-69.79)*

**Tabella 3: Sieroprevalenza per BRSV nei camosci suddivisa per anno di prelievo. \*p=0.053.**

Nella tabella 4 gli stessi risultati sono stati suddivisi in base al sesso dei soggetti, le femmine mostrano valori di sieroprevalenza superiori (74.7%) rispetto ai maschi (61.9%), tale differenza non risulta statisticamente significativa .

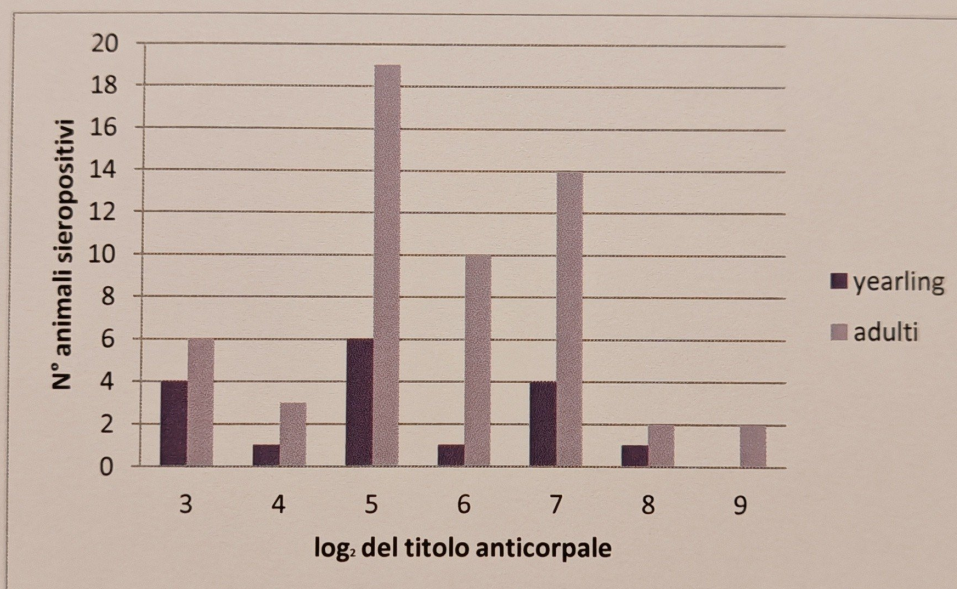
<i>SESSO</i>	<i>N°ESAMINATI</i>	<i>N°POSITIVI</i>	<i>SIEROPREVALENZA (I.C. al 95% .)</i>
FEMMINE	54	40	74.7% (62.39-85.76)
MASCHI	63	39	61.9% (49.91-73.9)

**Tabella 4: sieroprevalenze nei confronti di BRSV sul totale dei camosci analizzati suddivisi per sesso.**

La sieroprevalenza degli yearling è risultata inferiore rispetto agli adulti ( $p < 0.001$ ) (tabella 5). Inoltre, la distribuzione dei titoli anticorpali verso BRSV evidenzia un picco al valore 5 in entrambe le categorie d'età ed una maggiore frequenza di titoli superiori a 5 negli animali adulti (grafico 1).

<i>ETA'</i>	<i>N°ESAMINATI</i>	<i>N°POSITIVI</i>	<i>SIEROPREVALENZA</i> <i>(I.C. al 95% .)</i>
YEARLING	38	17	44.74% (28.93-60.55)*
ADULTI	79	62	78.48% (69.42-87.54)

**Tabella 5: sieroprevalenze ne confronti di BRSV sul totale dei camosci analizzati suddivisi per età (p<0.001).**



**Grafico 1: distribuzione dei titoli anticorpali virusneutralizzanti nei camosci positivi suddivisi per classe di età.**

La distribuzione geografica delle sieropositività evidenzia una maggiore frequenza di soggetti sieropositivi nel comune di Premia rispetto agli altri comuni (p<0.01), come illustrato in tabella 6.

<i>COMUNE</i>	<i>N°ESAMINATI</i>	<i>N°POSITIVI</i>	<i>SIEROPREVALENZA</i> <i>(I.C. al 95%.)</i>
PREMIA	42	36	85.71% (75.13-96.30)
ALTRO	74	43	58.11% (46.87-69.35)

**Tabella 6: sieroprevalenze nei confronti di BRSV sul totale dei camosci analizzati suddivisi per comune.**

**BVDV:** Nei quattro anni di indagini sierologiche sono risultati positivi 4 camosci (tabella 7) su 141 sieri analizzati.

<i>CONTRASSEGNO</i>	<i>DATA PRELIEVO</i>	<i>COMUNE</i>	<i>SESSO</i> <i>ETA'</i>	<i>LESIONI</i> <i>SINTOMI</i>
65641	14-09-08	Premia	♀ 2 anni	Assenti
83955	02-09-09	Premia	♀ 2 anni	Assenti
83831	06-09-09	Premia	♀ 2 anni	Assenti
84205	09-09-09	Premia	♂ 8 anni	Assenti

**Tabella 7: Caratteristiche degli animali sieropositivi verso BVDV.**

Nella tabella 8 sono riportate le sieroprevalenze suddivise per anno, si evidenziano animali sieropositivi limitatamente agli anni 2008 e 2009.

Il calcolo della prevalenza massima attesa, sulla base della numerosità del campione testato e dell'esito, risulta più elevata nell'anno 2006, raggiungendo il valore del 12.69%.

<i>ANNO</i>	<i>SIERI ESAMINATI</i>	<i>SIERI POSITIVI</i>	<i>SIEROPREVALENZA (I.C. al 95% .)</i>
<b>2006</b>	22	0	0 (0-12.69)
<b>2007</b>	25	0	0 (0-11.25)
<b>2008</b>	38	1	2.63% (0-7.72)
<b>2009</b>	57	3	5.26% (0-11.06)

**Tabella 8: Sieroprevalenza per BVDV nei camosci suddivisa per anno di prelievo.**

La distribuzione geografica delle sieropositività evidenzia la localizzazione di tutti i soggetti sieropositivi nel comune di Premia ( $p < 0.05$ ), come illustrato in tabella 9.

<i>COMUNE</i>	<i>N°ESAMINATI</i>	<i>N°POSITIVI</i>	<i>SIEROPREVALENZA (I.C. al 95% .)</i>
<b>PREMIA</b>	44	4	9.09% (0.60-17.59)
<b>ALTRO</b>	72	0	0 (0- 4.00)

**Tabella 9: sieroprevalenze nei confronti di BVDV sul totale dei camosci analizzati suddivisi per comune.**

4.2. ISOLAMENTO VIRALE, IMMUNOFLUORESCENZA E  
MICROSCOPIA ELETTRONICA

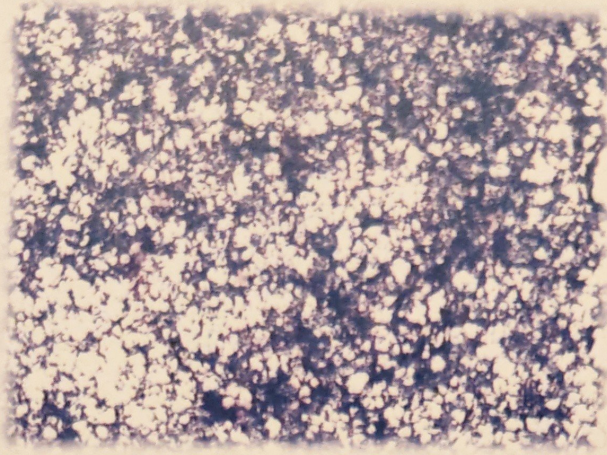
Nella stagione 2009 sono stati analizzati 43 tamponi, 2 hanno mostrato ECP al 2° (83929 e 84407) passaggio in coltura cellulare su MDBK e 1 al 3° passaggio (84406).

<i>CONTRASSEGNO</i>	<i>DATA PRELIEVO</i>	<i>COMUNE</i>	<i>SESSO ETA'</i>	<i>LESIONI*</i>
83829	02-09-09	Craveggia	♀ 1 anno	Assenti
84406	13-09-09	Craveggia	♂ 1 anno	Assenti
84407	23-09-09	Premia	♀ 1 anno	Assenti

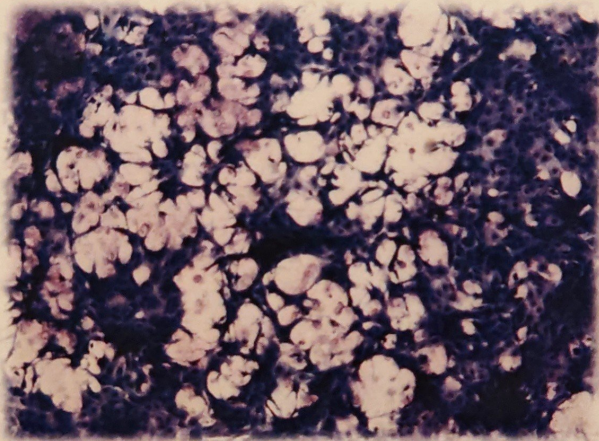
**Tabella 10: Caratteristiche dei soggetti MRV positivi**  
**\* lesioni macroscopiche a livello polmonare.**

Sulla coltura cellulare relativa all'isolamento virale è stata effettuata una colorazione Ematossilina-Eosina per evidenziare eventuali corpi inclusi (figure 7-8).





**Figura 7: ECP MRV**  
**in coltura cellulare di MDBK con colorazione EE, campione con**  
**contrassegno 84406 (foto Dott. G. Manarolla).**



**Figura 8: ECP MRV in coltura cellulare di MDBK con**  
**colorazione EE, campione con contrassegno 84406 (foto Dott. G.**  
**Manarolla).**

All'immunofluorescenza verso BRSV, sono risultati tutti negativi.

La microscopia elettronica ha evidenziato la struttura di MRV nei 3 replicati in tessuto coltura con ECP.

#### 4.3. ANALISI MOLECOLARE

L'analisi molecolare dei campioni di colture cellulari infette è risultata positiva per MRV, confermando i risultati della microscopia elettronica. Le tre sequenze di 348 nucleotidi sono risultate identiche fra loro, confrontate con le sequenze disponibili in banca dati hanno evidenziato il 97% di identità con una sequenza di origine umana, ottenuta in Olanda nel 1984 e il 93% di identità con una sequenza ottenuta dall'intestino di un pipistrello in Italia nel 2011 (figura 9).

È stata quindi effettuata una virus-neutralizzazione verso i tre ceppi di riferimento di MRV su 5 campioni di siero di soggetti del 2009, tra cui il campione 84406 (MRV positivo) ed un campione di un piccolo dell'anno rinvenuto morente in data 4 novembre 2009 (CAM 4NOV). I titoli anticorpali sono risultati più alti nei confronti del sierotipo 1, come mostrato in Tabella 11.

<i>CONTRASSEGNO</i>	<i>TITOLO ANTICORPALE VERSO REO 1</i>	<i>TITOLO ANTICORPALE VERSO REO 2</i>	<i>TITOLO ANTICORPALE VERSO REO 3</i>
84406	256	Neg	91
83823	128	Neg	32
84049	362	Neg	Neg
84382	181	Neg	Neg
CAM 4 NOV	Neg	Neg	Neg

Tabella 11: titoli anticorpali in virus neutralizzazione verso i tre ceppi di MRV.

	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
	5	15	25	35	45	55
Camoscio	GCTAGGCCGA	TATCAGGAAT	GCAGAACATG	ATTCAGCATC	TTTCAAAACT	ATATAAACGC
uomo	.....	.....	.....	.....	.....	.....T
pipistrello	.....	.....G.....	.....T.....	.....	.....	.....T
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
	65	75	85	95	105	115
Camoscio	GGATTTTCAT	ATAGAGTAAA	CGACTCTTTT	TCTCCAGGCA	ACGATTTTAC	TCACATGACT
uomo	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....
pipistrello	.....	.....	.....T.....	.....T.....	.....	.....
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
	125	135	145	155	165	175
Camoscio	ACCACTTTCC	CTTCAGGCTC	AACAGCCACT	TCCACTGAGC	ATACTGCCAA	TAATAGTACG
uomo	.....	.....	G.....	..T.....	.....	.....C...
pipistrello	..T.....	.C.....	G.....	..T.....	.....T.....	.....
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
	185	195	205	215	225	235
camoscio	ATGATGGAGA	CTTTCCTGAC	GGTGTGGGGA	CCCGAACACA	CTGACGACCC	TGATGTCTTA
uomo	.....A.....	.....	.....	.....G.....	.....	.....
pipistrello	.....A.....	.....T.....	.....G.....	..T.....	.....	.....
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
	245	255	265	275	285	295
Camoscio	CGTTTAATGA	AGTCCTTGAC	TATTCAAAGA	AATTACGTGT	GTCAGGGTGA	CGATGGATTG
uomo	.....	.....	.....G.....	.....	.....A.....	.....
pipistrello	.....	.....T..A..	.....G.....	.....T.....	.....A.....	.....C.....
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
	305	315	325	335	345	
Camoscio	ATGATTATTG	ACGGGAATAC	TGCCGGTAAG	GTGAACAGTG	AAACTATC	
uomo	.....	.....	.....	.....	.....	
pipistrello	.....C.....	.....	.....T.....	.....	.....	

**Figura 9:Allineamento della sequenza nucleotidica del gene L1 di reovirus del camoscio con sequenze disponibili in banca dati ad elevata similarità: uomo numero di accesso AY007423 (Goral et al., 1996), pipistrello, numero di accesso JQ277469. Il punto indica identità nucleotidica, la lettera una differenza.**

## 5. DISCUSSIONE

All'interno della popolazione campione si evidenzia una sieroprevalenza nei confronti di BRSV variabile negli anni, dal 2007 al 2009 si mantiene sempre sopra il 50% con un picco nel 2008 e un calo nel 2009 (57.38%). La prevalenza si distribuisce nelle diverse classi di età, risultando maggiore (78.48%) nei soggetti adulti e minore nei soggetti di un anno di età (44.74%). Il fatto che la risposta anticorpale sia così diffusa negli adulti e comunque con una buona prevalenza anche nei giovani è evidenza di una attiva circolazione virale, sia essa espressione di fenomeni di periodica reintroduzione nel periodo di interazione con i ruminanti domestici durante la stagione estiva sia essa mantenuta dalla popolazione di camosci. A favore di quest'ultima ipotesi, l'indagine (Armaroli et al., 2006) sulla prevalenza di BRSV in una popolazione di capriolo appenninico dimostra il mantenimento dell'infezione a livello endemico indipendentemente dal contatto con popolazioni di ruminanti domestici. Inoltre, in un'indagine condotta in allevamenti di bovini da latte il pascolo non è risultato fra i fattori di rischio associati alla circolazione virale (Luzzago *et al.*, 2010), pertanto l'ipotesi di un continuo spill-over da parte del bovino non risulta ulteriormente supportata.

La sieroprevalenza per BRSV nella popolazione indagata potrebbe essere la conseguenza di un ingresso del virus nella popolazione negli anni precedenti a quelli studiati; dovuto probabilmente ad un peggioramento dello stato delle difese immunitarie dei soggetti. A questo riguardo è stata effettuata un'analisi delle relazioni tra indici parassitologici, titoli anticorpali e quadro metabolico sulla stessa popolazione di camosci che ha evidenziato una correlazione positiva tra gli indici di abbondanza delle cariche elmintiche abomasali e il titolo anticorpale di BRSV (Angela C., 2010). Occorre quindi

comprendere quale fattore influenza maggiormente lo stato di salute dell'ospite. Una prima ipotesi prende in considerazione il fatto che la presenza di parassiti abomasali possa compromettere lo stato fisiometabolico del soggetto, attraverso la sottrazione di sostanze nutritive da parte dei parassiti.

Se poi si confronta la sieroprevalenza della popolazione del VCO2 con quella studiata nella provincia di Lecco (Citterio *et al.*, 2003) si può notare che le sieroprevalenze delle tre aree (VCO2, Alpi Lecchesi, Prealpi Lecchesi) hanno un trend diverso. Infatti, indipendentemente dalla presenza di mortalità, nella provincia di Lecco la sieroprevalenza dopo un iniziale calo aumenta esponenzialmente fino a valori di 95,8% nella zona delle Alpi Lecchesi; mentre nel VCO2 la sieroprevalenza diminuisce negli anni. Si può quindi pensare che l'endemia si possa mantenere con valori di sieroprevalenza più bassi oppure che la circolazione del virus stia diminuendo progressivamente. Importante sottolineare la differenza tra la presenza di mortalità nella provincia di Lecco e l'assenza di segnalazioni durante i censimenti sia di mortalità sia di stati patologici nel VCO2, se non casi sporadici nel 2008 riconducibili a cheratocongiuntivite e una progressiva diminuzione di peso dei camosci abbattuti durante l'attività venatoria, dal 1996 al 2008 si registra infatti un calo del peso medio degli yearling di 2 kg.

Per quanto riguarda le sieropositività riscontrate nei confronti di BVDV si possono fare alcune considerazioni valutando l'età dei soggetti positivi ed il luogo di provenienza. Il fatto che gli anticorpi si ritrovino in tre soggetti di 2 anni e uno di 8 anni può far ipotizzare che non ci sia trasmissione verticale del patogeno che è il mezzo principale per il suo mantenimento all'interno della popolazione. Secondariamente si può osservare che i soggetti positivi provengono tutti dalla zona del comune di Premia, in particolare le località in cui

sono stati abbattuti i soggetti (Alpe Nava, Busin, Corte Satta) sono classicamente luogo di pascolo estivo di ruminanti domestici. Quindi i camosci sieropositivi possono aver avuto un contatto con i domestici, ma in periodi in cui in caso di infezione non si può avere trasmissione verticale perché le femmine di camoscio hanno già partorito e non sono ancora gravide.

I risultati confermano quindi anche il dato bibliografico secondo il quale BVDV avrebbe scarse capacità di adattamento nel selvatico rispetto a BRSV (Olde Rienkerink, 2005).

Confrontando anche le sieropositività ottenute per Febbre Q (Viganò *et al.*, 2010) nella stessa popolazione di camosci (9 soggetti tra il 2007 ed il 2009), si evidenzia la provenienza degli animali positivi dalla stessa area di Premio. Elemento che avvalorava l'ipotesi che l'interazione con popolazioni di ruminanti domestici determini uno "spill-over" di patogeni.

Per quanto riguarda l'isolamento di MRV, non risultano precedenti segnalazioni in letteratura nel genere *Rupicapra*. I soggetti positivi, 2 femmine ed un maschio yearling abbattuti nel mese di settembre, non presentavano sintomi respiratori al momento dell'abbattimento, quali scoli nasali e oculo-congiuntivali e lesioni polmonari a livello macroscopico. Questo aspetto unitamente al fatto che i soggetti presentavano anticorpi neutralizzanti verso il virus infettante, testimonia che l'infezione fosse già in fase di remissione, come effettivamente dimostra la positività virale evidenziata al 2°/3° passaggio cieco in coltura cellulare. I tre soggetti risultavano sieronegativi nei confronti di BVDV e BRSV, non si sono quindi evidenziate ripercussioni cliniche ed anatomopatologiche evidenti in corso di infezione in assenza di co-infezione con gli altri patogeni respiratori indagati. La sua circolazione è stata confermata anche nella popolazione di camosci del VCO2 in quanto una indagine sierologica

su un campione ristretto di sieri ha mostrato alti titoli anticorpali nei confronti di Reovirus 1, considerato sierologicamente omologo al virus di campo della popolazione dopo sierotipizzazione. Ci si interroga quindi sul potenziale patogeno di questo virus. È noto il comportamento del virus nelle popolazioni di mammiferi domestici, il quale risulta essere diffuso, ma senza rilievi di patologie respiratorie se non in associazione con altri agenti patogeni (Tyler *et al.*, 2001; Day *et al.*, 2009) e ben adattato in tutte le specie di mammiferi, uomo compreso ed evolvendo a livello molecolare indipendentemente dall'ospite, dalla localizzazione geografica e dalla data di isolamento (Mehemet *et al.*, 1995).

## 6. CONCLUSIONE

La sieroprevalenza nei confronti di BRSV si mantiene a livelli elevati negli anni indagati, nei soggetti adulti come negli yearling. Tale andamento testimonia l'attiva circolazione virale, sia essa espressione di fenomeni di periodica reintroduzione nel periodo di interazione con i ruminanti domestici sia essa mantenuta dalla popolazione di camosci. Si può ipotizzare che la diminuzione della sieroprevalenza nell'ultimo anno di indagine sia evidenza di una ridotta circolazione virale, tale andamento merita essere monitorato nei successivi anni per valutare se vi siano le condizioni per la persistenza dell'infezione ovvero la sua estinzione. Inoltre, risulta necessaria l'identificazione e caratterizzazione molecolare di RSV per chiarire l'epidemiologia nelle popolazioni di ruminanti selvatici.

Per quanto riguarda BVDV si può affermare che le positività ottenute derivino da un'interazione con le popolazioni di ruminanti domestici, ma in periodi in cui non è possibile il verificarsi di una trasmissione verticale, indispensabile per il mantenimento dell'infezione in una popolazione.

Per quanto riguarda l'isolamento di MRV, non risultano precedenti segnalazioni in letteratura nel genere *Rupicapra*. Nei soggetti in cui il virus è stato isolato non sono state evidenziate ripercussioni cliniche ed anatomopatologiche evidenti in corso di infezione in assenza di co-infezione con gli altri patogeni respiratori indagati. Ci si interroga quindi sul potenziale patogeno di questo virus. A questo proposito sarebbero necessarie ulteriori indagini per valutare se tale virus sia altrettanto diffuso ed adattato nelle specie di ruminanti selvatici quanto in quelle di ruminanti domestici (Mehemet *et al.*, 1995).



## 7. BIBLIOGRAFIA

- ALANSARI H, DUNCAN RB, BAKER JC and POTGIETER LN (1999). Analysis of ruminant respiratory syncytial virus isolates by RNase protection of the G glycoprotein transcripts. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11: 215-20
- ANGELA C. Analisi delle relazioni tra indici parassitologici, titoli anticorpali e quadro metabolico nel camoscio (*Rupicapra r. rupicapra*). Tesi di Laurea, relatore Prof. Paolo Lanfranchi, correlatore Dott. Roberto Viganò, 2010.
- ARMAROLI ELISA, CARRAIN RAFFAELA, GUBERTI VITTORIO. Sero-epidemiological survey on bovine respiratory syncytial virus in a wild roe deer (*Capreolus capreolus*) population in demographic decrease in the Northern Appennines, Italy (1995-2004). VII Conference of the European Wildlife Diseases Association. 27-30 Sept 2006, Aosta Valley, Italy.
- BAKER K, CASSIRER EF, ANDERSON NJ, RAMSEY JM, MANSFIELD K, BRUNING DL, WOLFF P, SMITH JB, JENKS JA. 2012. Causes of pneumonia epizootics among bighorn sheep, Western United States, 2008-2010. *Emerg Infect Dis.* 18(3):406-14.
- BERTHIAUME L, JONCAS J, PAVILANIS V. 1974. Comparative structure, morphogenesis and biological characteristics of the respiratory syncytial (RS) virus and the pneumonia virus of mice. *Arch. Ges. Virusforsch.* 45:39-51.
- BOLIN SR, MC CLURKIN AW, CUTLIP RC, CORIA MF. 1985b. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with non-cytopathic bovine viral diarrhea virus by

superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 46:573-576.

- BOLIN SR, MC CLURKIN AW, CULTIP RC, CORIA MF. 1985c. Response of cattle persistently infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus to vaccination for bovine viral diarrhoea and to subsequent challenge exposure with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 46:2467-2470.
- BREGOLI M, TREVISIOL K, DELLAMARIA D, CITTERIO C, DI GIUSTO T, COCCHI M, FRANZIONE E, PASOLLI C, CONEDERA G, MARCO I, SCHIRMAIER H, CEGLIE L. 2012. Pestiviruses among wild ungulates populations from North-Eastern Italian Alps. VIII Congresso Italiano di Teriologia, 9-11 Maggio 2012, Piacenza.
- BROWNLIE J., 1990. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. Sci. Tech.*; 9(1): 43-59.
- BROWNLIE J, CLARKE MC, HOWARD CJ, POCOCK DH. 1986. Mucosal disease: the dilemma of experimental disease. I. In: HARTOGAN PJ, MONAGHAN ML (Editors), Proceedings of the 14<sup>th</sup> World Congress on Disease of Cattle. World Association for Buiatrics. Dublin, Ireland, pp. 199-203.
- CHANOCK RM, ROIZMAN B, MEYERS R. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent. I. Isolation, properties and characterization. *Am. J. Hyg.* 66:281-300.
- CITTERIO CV, LUZZAGO C, SALA M, SIRONI G, GATTI P, GAFFURI A, LANFRANCHI P. 2003. Serological study of a population of alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) affected by an outbreak of respiratory disease. Dipartimento di

Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria,  
Università degli Studi di Milano, via Celoria 10, 20133  
Milano, Italy. 153(19):592-6.

- COLLETT MS, ANDERSON DK, RETZEL E. 1988. Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae. *J Gen Virol.* 69 ( Pt 10):2637-43.
- DAY JM. 2009. The diversity of the orthoreoviruses: molecular taxonomy and phylogentic divides. United States Department of Agriculture, Southeast Poultry Research Laboratory, Agricultural Research Service, Athens, GA 30605, United States. *Infect Genet Evol.* 9(4):390-400.
- DINTER Z, 1963. Relationship between bovine virus diarrhoea virus and hog cholera virus. *Zentralbl. Bakteriol. Parasintekd. Infektionskr., Hyg. Abt. 1, Orig.*, 188:475-486.
- ELERAKY NZ, KANIA SA, EVERMANN JF, POTGIETER LN. 2003. Comparison of targeting F and G protein genes to detect bovine and ovine respiratory syncytial viruses. *J Vet Diagn Invest.* 15(3):277-80.
- FERNELIUS AL. 1964. Noncytopathogenic bovine viral diarrhoea viruses detected and titrated by immunofluorescence. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, 28:121-126.
- FIELDS BN, KNIPE DM. Virology. II Edition, New York 1990.
- GAFFURI A, GIACOMETTI M, TRANQUILLO VM, MAGNINO S, CORDIOLI P, LANFRANCHI P. 2006. Serosurvey of roe deer, chamois and domestic sheep in the central Italian Alps. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna Bruno Ubertini, Via Rovelli 53, I-24100 Bergamo, Italy. *J Wildl Dis.* 42(3):685-90.

- GIANGASPERO M, HARASAWA R, ZECCONI A, LUZZAGO C. Genotypic characteristics of bovine viral diarrhoea virus 2 strains isolated in northern Italy. *J Vet Med Sci.* 63(9):1045-9.
- GORAL MI, MOCHOW-GRUNDY M, DERMODY TS. Virology. Sequence diversity within the reovirus S3 gene: reoviruses evolve independently of host species, geographic locale, and date of isolation. 1996 Feb 1;216(1):265-71.
- HAFEZ SM, LIESS B, 1972b. Studies on bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. II. Stability and some physico-chemical properties. *Acta Virol.*, 16, 399-408.
- HALL, T.A, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- HARS RJ, GAUTHIER D. 1994. Pathologie du bouquetin des alpes: bilan sanitaire des populations françaises. *Travaux Scientifiques du Parc National de la Vanoise.* 18, 53-98.
- HERMODOSSON S, DINTER Z. 1962. Properties of bovine virus diarrhoea virus. *Nature*, 194:893-894.
- HOLM JENSEN MH. 1981. Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhoea virus in porcine serum. A comparative examination using CF, PLA and NPLA assays. *Acta. Vet. Scand.* 22:85-98.
- HORNBERG A, FERNANDEZ SR, VOGL C, VILCEK S, MATT M, FINK M, KOFER J, SCHOPF K. 2009. Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. *Vet Microbiol.* 2009 Mar 30;135(3-4):205-13.

- HUANG YT, WERTZ GW. 1982. The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. *J Virol.* 43:150-157.
- INABA Y, TANAKA Y, SATO K, ITO H, OMORI T, MATUMOTO M. 1970. Nomi virus, a virus isolated from an apparently new epizootic respiratory disease of cattle. *Jap. J. Microbiol.* 14:246-248.
- KAPIKIAN AZ, SHOPE RE. 1996. Rotaviruses, Reoviruses, Coltiviruses, and Orbiviruses. Baron S, editor, 4th edition. *Medical Microbiology.* Chapter 63.
- LARSEN LE, Tjørnehøj K, VIUFF B, JENSEN NE, UTTENTHAL A. 1999. Diagnosis of enzootic pneumonia in Danish cattle: reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in naturally and experimentally infected cattle. *J Vet Diagn Invest.* 11(5):416-22.
- LEARY TP, ERKER JC, CHALMERS ML, CRUZ AT, WETZEL JD, DESAI SM, MUSHAHWAR IK, DERMODY TS. 2002. Detection of mammalian reovirus RNA by using reverse transcription-PCR: sequence diversity within the lambda3-encoding L1 gene. *J Clin Microbiol.* 40(4):1368-75.
- LEVINE S, KLAIBER-FRANCO R, PARADISO P. 1987. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 68:2521-2524.
- LINDBERG A, BROWNLIE J, GUNN GJ, HOUE H, MOENNIG V, SAATKAMP HW, SANDVIK T, VALLE PS, 2006. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Rev. Sci. Tech.;* 25(3): 961-79.

- LUZZAGO C, BRONZO V, SALVETTI S, FRIGERIO M, FERRARI N. 2010. Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence and risk factors in endemic dairy cattle herds. *Vet Res Commun* 34:19–24.
- MACLACHLAN NJ, DUBOVI EJ. Fenner's Veterinary Virology. IV Edition, 2011.
- MARCO I, ROSELL R, CABEZON O, MENTABERRE G, CASAS E, VELARDE R, LAVIN S. 2009. Border Disease Virus among Chamois, Spain. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 15, No. 3, March 2009. 15(3):448-51.
- MARCO I, ROSELL R, CABEZON O, MENTABERRE G, CASAS E, VELARDE R, LOPEZ-OLVERA JR, HURTADO A, LAVIN S. 2007. Epidemiological study of border disease virus infection in Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) after an outbreak of disease in the Pyrenees (NE Spain). *Vet Microbiol*. 2007 Aug 17. 127(1-2):29-38.
- MARTIN C, LETELLIER C, CAIJ B, GAUTHIER D, JEAN N, SHAFFII A, SAEGERMAN C. 2011. Epidemiology of Pestivirus infection in wild ungulates of the French South Alps. *Vet Microbiol*. Department of Infectious and Parasitic Diseases, Epidemiology and Risk Analysis Applied to Veterinary Sciences (UREAR), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Boulevard de Colonster, 20, B42, B-4000 Liège, Belgium. 147(3-4):320-8.
- MATUMOTO M, INABA Y, KUROGI H, SATO K, OMORI T, GOTO Y, HIROSE O. 1974. Bovine respiratory syncytial virus: host range in laboratory animals and cell cultures. *Arch. Ges. Virusforsch.* 44:280-290.

- GORAL IM, MOCHOW-GRUNDY M, DERMODY TS. 1996. Sequence diversity within the Reovirus S3 gene: Reoviruses evolve independently of host species, geographic locale, and date of isolation. *Virology* 216(1):265-71.
- MILLER DS, HOBERG E, WEISER G, AUNE K, ATKINSON M, KIMBERLING C. 2012. A Review of Hypothesized Determinants Associated with Bighorn Sheep (*Ovis canadensis*) Die-Offs. *Vet Med Int.* 2012;2012:796527.
- MILLER DS, WEISER GC, AUNE K, ROEDER B, ATKINSON M, ANDERSON N, ROFFE TJ, KEATING KA, CHAPMAN PL, KIMBERLING C, RHYAN J, CLARKE PR. 2011. Shared Bacterial and Viral Respiratory Agents in Bighorn Sheep (*Ovis canadensis*), Domestic Sheep (*Ovis aries*), and Goats (*Capra hircus*) in Montana. *Vet Med Int.* 2011:162520. 2011 Nov 16.
- MORRIS JA Jr, BLOUNT RE, SAVAGE RE. 1956. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coriza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92:544-550.
- OLDE RIEKERINK RG, DOMINICI A, BARKEMA HW, DE SMIT AJ. 2005. Seroprevalence of pestivirus in four species of alpine wild ungulates in the High Valley of Susa, Italy. *Vet Microbiol.* 108(3-4):297-303.
- OLLAND AM, JANE-VALBUENA J, SCHIFF LA, NIBERT ML, HARRISON SC. 2001. Structure of the reovirus outer capsid and dsRNA-binding protein sigma3 at 1.8 Å resolution. *EMBO J.* 2001 Mar 1; 20(5):979-89.
- PACCAUD MF, JACQUIER C. 1970. A respiratory syncytial virus of bovine origin. *Arch. Ges. Virusforsch.* 30:327342.

- PIOZ M, LOISON A, GIBERT P, DUBRAY D, MENAUT P, LE TALLEC B, ARTOIS M, GILOT-FROMONT E. 2007. Transmission of a pestivirus infection in a population of Pyrenean chamois. *Vet Microbiol.* 119(1):19-30.
- PRINCE GA, HORSWOOD LR, BERNTD J, SUFFIN SC, CHANOCK RM. 1979. Respiratory syncytial virus infection inbred mice. *Infect. Immun.* 26:764-766.
- RICHER L., MAROIS P., LAMONTAGNE L., 1988. Association of bovine viral diarrhea virus with multiple viral infections in bovine respiratory disease outbreaks. *Can. Vet. J.*; 29: 713-17.
- RIDINGER DN, SPENDLOVE RS, BARNETT BB, GEORGE DB, ROTH JC. 1982. Evaluation of cell lines and immunofluorescence and plaque assay procedures for quantifying reoviruses in sewage. *Appl Environ Microbiol.* 43(4):740-6.
- RIDPATH J.F., 2003. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals*; 31: 127-31.
- ROSENQUIST BD. 1974. Isolation of respiratory syncytial virus from calves with acute respiratory disease. *J. Infect. Dis.* 130:177-182.
- TYLER KL, CLARKE P, DEBIASI RL, KOMINSKY D, POGGIOLI GJ. 2001. Reoviruses and the host cell. Dept of Neurology, University of Colorado Health Sciences Center, Campus Box B-182, 4200 E, 9th Avenue, Denver, CO 80262, USA. *Trends Microbiol.* 9(11):560-4.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive



multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids Res.* 22, 4673-4680.

- TORRIANI D. 2007. Elaborazioni GIS per l'analisi delle S.U.S. Comprensorio Alpino VCO2 - Ossola Nord.
- VALAERCHER JF, BOURTY H, LAVENU A, BOURGES-ABELLA N, ROTH M, ANFREOLETTI O, AVE P and SCHELCHER F (2001). Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus. *Virology* 291: 55-67.
- VAN DER POEL WH, KRAMPS JA, MIDDEL WG, VAN OIRSCHOT JT and BRAND A (1993). Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infections: a longitudinal epidemiological study in dairy herds. *Archives of Virology* 133: 309-321.
- VIGANÒ R., BORRETTI M. 2009. Piano di programmazione per la gestione degli ungulati selvatici ruminanti 2009/2013. Comprensorio Alpino VCO2 - Ossola Nord, 1-158.
- VIGANÒ R., LUZZAGO C., BESOZZI M., PISTONE D., BARDELLI M., LANFRANCHI P. Sieropositività per *Coxiella Burnetii* in camosci e ovini in Val D'Ossola (Prov. VB). 28èmes Rencontres du G.E.E.F.S.M., Rocchetta Nervina, Imperia, 10-13 giugno 2010: 43.
- VIET A.F., FOURICHON C., SEEGER H., JACOB C., GIUHENNEUC-JOUYAUX C., 2004. A model of the spread of the bovine viral-diarrhoea virus within a dairy herd. *Prev. Vet. Med.*; 63(3-4): 211-236

- VIJGEN L, MOES E, KEYAERTS E, LI S, VAN RANST M.. A pancoronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses. *Methods Mol Biol.* 2008;454:3-12.
- VILCECK S., NETTLETON P.F. 2006. Pestiviruses in wild animals. *Vet Microbiol.* 116: 1-12.
- WOBESER GA. 1994. Disease and epizootiology: basic principles. In *Investigation and Management of Disease in Wild Animals.* Ed GA Wobeser. New York, Plenum Press. Pp 3-12.
- XU W, COOMBS KM. 2009. Conserved structure/function of the orthoreovirus major core proteins. *Virus Res.* 2009 Apr 7. 144(1-2):44-57.
- ZANIN E, FARINA G, MUNINELLI F, RIZZOLI P, FRAQUELLI C. 1993. Bronco-polmonite del camoscio (*Rupicapra rupicapra*) nel gruppo del Brenta (Trentino). *Atti della Società Italiana di Buiatria.* 25, 697-703.

## 8. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio:

Il Comprensorio Alpino VCO2-Ossola Nord (VB) che ha permesso i prelievi durante le stagioni venatorie per il progetto di ricerca sugli ungulati selvatici.

Il Professor Paolo Lanfranchi ed il Dottor Roberto Viganò per avermi introdotta nel mondo della fauna selvatica.

Il Dottor Paolo Cordioli ed il Dottor Antonio Lavazza per l'analisi dei campioni mandati all'IZLER.

Il Professor Valerio Bronzo per aver collaborato con grande pazienza all'analisi statistica.

La Dottoressa Camilla Luzzago che mi ha seguita passo passo nello sviluppo della tesi, spronandomi, assecondando le mie passioni e proiettandomi sempre verso il futuro.

La Professoressa Pieranna Martino, la Professoressa Paola Dall'Ara e la Dottoressa Stefania Lauzi per essere state un tassello fondamentale nella mia formazione.

Un ringraziamento particolare va alla mia famiglia che ha sempre creduto nelle mie possibilità aiutandomi ad arrivare fino a questo punto.

Alla mia amica Chiara che non è stata solo una compagna di studi, collaborando anche con la raccolta dei campioni per le nostre tesi, ma

è diventata un sostegno non solo nello studio. E ad amici particolari, ognuno ha contribuito alla mia realizzazione: Chiara, Vale, Laura, Azzurra, Marco, Bobo, Manuel.