

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
Facoltà di Medicina Veterinaria  
Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica



**MONITORAGGIO SIEROLOGICO DI PESTIVIRUS  
IN POPOLAZIONI DI CAMOSCIO (*Rupicapra r.  
rupicapra*) E STAMBECCO (*Capra i. ibex*)  
NELLE ALPI CENTRO-OCCIDENTALI**

**Relatore: Dott.ssa Camilla LUZZAGO**

**Co-relatore: Dott.ssa Martina BESOZZI**

**Laureando:**

**FEDERICA CERIANI**

**Matr. No. 743952**

**Anno Accademico 2014-2015**

## Sommario

|   |    |
|---|----|
| <b>INTRODUZIONE</b> .....   | 2  |
| 1.1 <i>SCENARIO ED ECOSISTEMA ALPINO</i> .....                              | 2  |
| 1.2 <i>PESTIVIRUS</i> .....   | 5  |
| <i>Inquadramento tassonomico</i> .....                                      | 5  |
| <i>Struttura del virus</i> .....  | 5  |
| <i>Resistenza ambientale</i> .....  | 6  |
| <i>BDV</i> .....  | 6  |
| <i>BVDV</i> .....   | 7  |
| <i>Spettro d'ospite e trasmissione</i> .....                                | 7  |
| <i>Diffusione dei pestivirus nei ruminanti domestici</i> .....              | 10 |
| <i>Diffusione dei pestivirus nei ruminanti selvatici</i> .....              | 11 |
| <b>MATERIALI E METODI</b> .....   | 16 |
| 1.3 <i>AREA DI STUDIO</i> .....   | 16 |
| <i>Comprensorio Alpino di Caccia Verbano-Cusio-Ossola 2</i> .....           | 16 |
| <i>Comprensorio Alpino di Caccia Alpi e Prealpi Lecchesi</i> .....          | 19 |
| <i>Valli di Lanzo</i> .....   | 21 |
| 1.4 <i>CENTRI DI CONTROLLO PER LA SELVAGGINA E GESTIONE VENATORIA</i> ..... | 23 |
| 1.5 <i>RACCOLTA DEI CAMPIONI</i> .....                                      | 25 |
| 1.6 <i>METODICHE DI LABORATORIO</i> .....                                   | 27 |
| <i>Virus-neutralizzazione (VN)</i> .....                                    | 27 |
| <i>ELISA</i> .....  | 28 |
| 1.7 <i>ANALISI STATISTICA</i> .....   | 30 |
| <b>RISULTATI</b> .....  | 31 |
| 1.8 <i>CAMPIONI RACCOLTI</i> .....  | 31 |
| 1.9 <i>ANALISI SIEROLOGICHE</i> .....                                       | 33 |
| <b>DISCUSSIONE</b> .....  | 39 |
| <b>CONCLUSIONI</b> .....  | 43 |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....   | 44 |
| <b>RINGRAZIAMENTI</b> .....   | 55 |

## INTRODUZIONE

### SCENARIO ED ECOSISTEMA ALPINO

Le Alpi rappresentano uno degli ecosistemi di maggior pregio ecologico in Europa. Nel corso dei secoli hanno subito una continua modificazione del territorio che ha permesso, ai giorni nostri, la nascita di un mosaico di microambienti diversificati tra loro (Goetz, 1996). In passato le Alpi sono state oggetto di cambiamenti per opera dell'uomo che ha incrementato l'attività agro-silvo-pastorale modificandone l'aspetto del territorio (Goetz, 1996). Le trasformazioni ambientali, quali i disboscamenti, la cura dei prati, dei pascoli e delle coltivazioni agricole, gli eccessivi carichi di bestiame domestico in quota, hanno provocato conseguenze sfavorevoli per le popolazioni di animali selvatici autoctone, soprattutto gli ungulati selvatici, che hanno subito un progressivo decremento (Perco et al., 1987). In quegli anni si è così assistito ad una progressiva estinzione di specie selvatiche, quali lo stambecco (*Capra ibex*), che scomparve per esempio sulle Alpi Orientali, ed una drastica diminuzione di specie quali il camoscio (*Rupicapra r. rupicapra*), il cervo (*Cervus elaphus*) ed il capriolo (*Capreolus capreolus*) (Perco et al., 1987). I cambiamenti economici avvenuti a partire dal dopo guerra ed il boom industriale hanno causato una crisi dell'economia zootecnica ed agricola montana, determinando lo spopolamento delle valli montane ed un incremento demografico nei grossi centri urbani di pianura (Zanzi, 2004). Il conseguente e progressivo abbandono del territorio Alpino ha permesso un ripristino di condizioni più naturali, favorendo un

incremento delle popolazioni di ungulati selvatici (Mustoni et al., 2002). I boschi hanno lentamente ri-colonizzato le aree prative precedentemente sottratte e l'innalzamento delle temperature ambientali ha modificato anche l'aspetto di parte della vegetazione montana (Briand et al., 1989; Chemini et al., 1999). Negli anni del dopo guerra, la popolazione di ungulati selvatici ha quindi subito un forte aumento, permesso anche dalla nascita di riserve naturali e atteggiamenti da parte dell'uomo di maggior cura ambientale e faunistica (Mustoni et al., 2002). Il cervo ha infatti ripopolato le Alpi, lo stambecco è stato soggetto di reintroduzioni ed il camoscio, grazie all'incremento delle aree boschive, è stato interessato da una forte crescita demografica. In questi stessi anni si è anche assistito ad un ritorno, più o meno naturale, di predatori quali orso e lupo (Mustoni et al., 2002). Altre specie quali la lepre variabile (*Lepus timidus*), il fagiano di monte (*Tetrao tetrix*) o la coturnice (*Alectoris graeca*), che negli anni di trasformazioni ambientali operate dall'uomo avevano subito un costante incremento demografico, negli ultimi 40 anni hanno subito una notevole diminuzione a causa della sparizione di molti habitat vocati (Pedrotti et al., 2001). Il progressivo e continuo mutamento del territorio alpino lo ha reso estremamente diversificato, inoltre aree prima considerate marginali, ora nuovamente impiegate, hanno permesso una vita faunistica. Questo aspetto ha controbilanciato gli effetti negativi che negli anni 1960-1970 hanno reso la montagna oggetto di una diversificata antropizzazione vedendola protagonista di nuove attività ludico-sportive che hanno causato un ulteriore impatto negativo sulla dinamica delle popolazioni locali. La frammentazione

degli habitat naturali ha costretto diverse popolazioni di ungulati a condividere ambienti incrementando il contatto inter specifico (Martin et al., 2011). Questo tipo di interazione, in particolare tra specie domestiche e specie selvatiche è sempre stato un tema molto dibattuto, incentrato in particolare su controllo e diffusione di malattie infettive (Hudson et al., 2002; Foreyt et al., 1982; Callan et al., 1991; Frolich et al., 2002). Nell'ambiente alpino il periodo di maggiore rischio e contatto tra animali domestici e animali selvatici risulta essere il periodo del pascolo estivo, nei mesi che vanno da maggio ad ottobre, durante i quali le diverse specie condividono gli stessi spazi. Indagini sierologiche hanno infatti evidenziato, sieroprevalenze variabili in ruminanti selvatici verso patogeni notoriamente presenti nel domestico quali *Toxoplasma Gondii*, *virus Respiratorio Sinciziale Bovino* (BRSV), il virus della Parainfluenza di tipo 3 (PI3), virus della *Rinotracheite Bovina Infettiva* (IBR) ed il virus della *Diarrea Virale Bovina* (BVDV) (Citterio et al., 2003; Gaffuri et al., 2006), avvalorando la necessità di approfondire il ruolo delle diverse specie nella trasmissione e nel mantenimento delle infezioni. È, in questo contesto, che nasce la necessità e l'importanza di monitorare, la fauna selvatica nei confronti di patogeni, quali ad esempio i pestivirus (Olde Riekerink, et al 2005), che sono ampiamenti diffusi nei ruminanti domestici causando ingenti perdite economiche e produttive negli allevamenti (Houe, 1999) e recentemente alta mortalità nel camoscio pirenaico (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) (Marco et al., 2009).

## PESTIVIRUS

### *Inquadramento tassonomico*

Il genere *Pestivirus* appartiene alla famiglia *Flaviviridae* (Heinz et al., 2000), insieme al genere *Flavivirus* e *Hepacivirus*. Al genere *Pestivirus* appartengono il virus della Border Disease (BDV), il virus della Diarrea Virale Bovina genotipo 1 (BVDV-1), il BVDV genotipo 2 (BVDV-2) ed il virus della Peste Suina Classica (CSFV) (Thiel et al., 2005). Questi virus hanno rispettivamente come ospiti d'elezione, l'ovino, il bovino ed infine il suino, in particolare BVDV e BDV possono superare la barriere di specie ed infettare ospiti diversi appartenenti all'ordine *Artiodactyla* (Becher et al., 1999; Becher et al., 1997; Doyle & Heuschele, 1983; Hamblin & Hedger, 1979; Nettleton, 1990; Pellerin et al., 1994). I pestivirus hanno una diffusione mondiale e causano ingenti perdite economiche (Houe, 1999). Alla Famiglia *Flaviviridae* appartengono almeno 70 virus differenti, parte dei quali è responsabile di zoonosi (West Nile, Japanese encephalitis e il Wesselsbron virus), assumendo un ruolo importante nel campo della Sanità Pubblica.

### *Struttura del virus*

I pestivirus sono caratterizzati da un virione di forma sferica con un diametro di circa 40-50 nm, dotato di envelope lipidico (Collett, 1988), con genoma composto da un singolo filamento proteico a RNA con polarità positiva (Hornberg, 2009). Una delle peculiarità del virus è la sua variabilità genomica ed antigenica che determina la necessità di un continuo aggiornamento delle metodiche diagnostiche, al fine di

ridurre il rischio di diffusione incontrollata del patogeno (Vilcek et al., 2005).

#### *Resistenza ambientale*

Grazie alla presenza dell'envelope lipidico, è un virus che risulta sensibile ai disinfettanti e alle sostanze tensioattive. 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), resiste inoltre fino a -40°C (Heinz et al., 2000).

#### *BDV*

Il BDV è un virus che colpisce i piccoli ruminanti con una diffusione mondiale (Nettleton et al., 1998). Sono stati descritti sette genotipi virali isolati in Stati quali Usa, Australia, Nuova Zelanda, Turchia, Giappone, Canada (Sullivan et al., 1997; Oguzoglu et al., 2009; Strong et al., 2010) ed in molti Stati europei quali Germania (Becker et al., 1997), Svizzera (Stadler et al., 2005), Francia (Dubois et al., 2008) e Spagna (Arnal et al., 2004). In Italia è stata descritta per la prima volta da Buonavoglia (et al., 1991) ed è maggiormente diffusa nelle regioni meridionali ed insulari per l'elevata prevalenza degli allevamenti ovini-caprini (Martella et al., 2000). Il virus causa disturbi di natura riproduttiva quali aborti, infertilità, nati-mortalità, nascita di soggetti persistentemente infetti (PI) con tremori, atassia, malformazioni cerebrali e ridotta crescita (Nettleton et al., 1998). È stata dimostrata cross-reazione tra il ceppo BVD ed il BVDV-1, riconducibile ad una più ampia cross-reattività di BVDV-1 (Becker et al., 2003).

## *BVDV*

È un virus che presenta una diffusione mondiale nel bovino se non sottoposto a piani di controllo ed eradicazione sistematici (Ståhl et al., 2012). Esistono due genotipi: BVDV-1, molto diffuso, e BVDV-2, isolato in America del Nord e più raro in Europa (Vilcek et al., 2005). BVDV-1 e 2 presentano numerose varianti genetiche ed antigeniche (Vilcek et al., 2005). In entrambi i genotipi si riconoscono due *biotipi* che si distinguono per il loro comportamento biologico nelle colture cellulari sensibili: il biotipo citopatico (CP), che porta alla morte per apoptosi le colture cellulari infettate ed il biotipo non citopatico (NCP), ossia che in coltura cellulare non porta a morte le cellule (Gamlen et al., 2010). In vivo il ceppo CP è in grado di svilupparsi dal ceppo NCP, in seguito a mutazioni o ricombinazioni del genoma virale (Brownlie et al., 1987).

### *Spettro d'ospite e trasmissione*

Sia per BVDV che per BDV la trasmissione può avvenire per via orizzontale, in modo diretto ed indiretto, e per via verticale attraverso le infezioni transplacentari. La condizione fondamentale affinché si verifichi la trasmissione orizzontale è il contatto diretto tra animali sani ed animali infetti, portatori ed eliminatori del patogeno (Meyling et al., 1990). I veicoli di trasmissione del virus sono rappresentati da saliva, secrezioni oculari o nasali, urine, placenta, liquido amniotico, latte, sperma ove persiste per periodi molto lunghi (Meyling et al., 1990) e feci, che però sembrano contenere basse quantità di virus (Brownlie et al., 1987). La contaminazione del pascolo pur rappresentando un

possibile veicolo di trasmissione, non sembra rivestire, nel domestico, un ruolo significativo per l'infezione. (Houe, 1995). Al contrario, per i ruminanti selvatici, il pascolo rappresenta un veicolo di trasmissione del virus attraverso il contatto diretto con animali domestici, quali bovini e prevalentemente pecore, che durante la stagione estiva, da maggio ad ottobre, condividono i medesimi territori (Richomme et al., 2006). Un altro possibile rischio di contatto diretto inter specifico è determinato dalla presenza delle "foraggiate" condivise sia da ruminanti domestici che da ruminanti selvatici e attraverso le quali il contatto inter specifico è maggiore. (Casaubon et al., 2012).

La trasmissione verticale è possibile quando una femmina gravida nel primo periodo della gravidanza, entra in contatto con il virus (Grooms et al., 2004), periodo in cui il sistema immunitario del feto non è ancora completamente sviluppato, riconoscendo quindi come self gli antigeni virali. Nel bovino tale periodo è compreso indicativamente tra i 30 e 120 giorni di gestazione (Grooms, 2004; Schoder e al., 2004), negli ovi-caprini tale periodo intercorre dai 40 ai 60 giorni di gravidanza (Fenner's et al, 2011). Per quanto riguarda BVDV, sebbene entrambi i biotipi siano capaci di oltrepassare la barriera placentare, solo il biotipo NCP è responsabile della nascita di soggetti PI, il biotipo citopatico causa al contrario la morte fetale (Pastoret et al., 1998). Il ruolo epidemiologicamente più importante nel trasmettere l'infezione, sia per il BVDV che per il BDV, è rappresentato dal soggetto PI, in quanto è portatore ed eliminatore del patogeno attraverso escreti e secreti corporei (Brownlie et al, 1987; Meyling e Jensen, 1988;

Bruschke et al., 1998). Invece i soggetti transitoriamente infetti (TI), sviluppano una risposta anticorpale che perdura per tutta la loro vita. È inevitabile che i piani di controllo negli allevamenti debbano considerare come primaria importanza l'identificazione del PI per ridurre la possibilità di circolazione del virus nel proprio allevamento.

Da un punto di vista della sintomatologia clinica, l'animale che si infetta dopo la nascita può presentare una viremia transitoria che dura 10-14 giorni (Howard, 1990) associata ad una immunosoppressione anch'essa transitoria (Wihelmsen et al., 1990) dovuta a linfopenia (Ridpath et al., 2007), leucopenia (Muller-Doblies et al., 2004) e trombocitopenia (Marshall et al., 1996; Blanchard et al., 2010) indotta dall'infezione virale, che può determinare episodi di diarrea (Brownlie et al., 1987) e predispone a co-infezioni (Hussin & Woldehiwet, 1994). I soggetti PI, in particolari condizioni, possono sviluppare la Malattia delle Mucose (MD) (Brownley et al., 1984), patologia sporadica ad esito letale che si sviluppa per lo più in animali di età compresa tra i sei mesi e i due anni, quando entrano in contatto con un ceppo CP omologo al ceppo NCP responsabile della infezione persistente. Le manifestazioni sono caratterizzate da diarrea profusa acquosa con muco e sangue, disidratazione, punti e petecchie emorragiche a livello del vestibolo labiale e vescicole a carico degli unghioni con una conseguente manifestazione clinica di zoppia (Baker, 1987; Moenning e Plagemann, 1992). I soggetti possono morire nell'arco di poco tempo dalla comparsa delle manifestazioni cliniche anche per il

sopraggiungere di infezioni concomitanti (Moenning e Plagemann, 1992).

#### *Diffusione dei pestivirus nei ruminanti domestici*

Il BVDV ed il BDV sono virus endemici in diverse realtà e diffusi a livello mondiale (Gorka et al., 2015). L'importanza attribuita a queste infezioni è correlata alle ingenti perdite economiche provocate dai problemi a livello riproduttivo presenti sia per i grandi che per i piccoli ruminanti (Houe et al., 2003; Giammarioli et al., 2011).

Per quanto riguarda BVDV, nel 2001 l'Organizzazione Mondiale della Sanità Animale ha inserito tale patologia fra le priorità da affrontare per le notevoli perdite economiche e produttive, incentivando piani di controllo a livello nazionale. Non per tutti gli Stati il problema è stato affrontato come di primaria importanza, diversificando il quadro epidemiologico riscontrabile a livello europeo. Attualmente BVDV è stata eradicata in Svezia, Norvegia, Finlandia e Danimarca. Piani di controllo ed eradicazione obbligatori a livello nazionale sono presenti in Austria, Belgio, Germania, Scozia, Irlanda e Svizzera. In Italia non vi sono invece piani di controllo a livello nazionale, solo le province autonome di Bolzano e Trento hanno eradicato la malattia dal loro territorio, anche le province di Roma, Como e Lecco hanno intrapreso piani di controllo volontari per controllare la malattia dal proprio territorio (Ferrari et al., 1999; Luzzago et al., 2004). Su tutto il territorio italiano il ceppo più diffuso nei bovini è rappresentato da BVDV-1 (Luzzago et al., 2014) che risulta endemico in molte aree rendendo più facile la trasmissione al selvatico durante il pascolo estivo. La

diffusione della malattia in Italia è notevole ed indagini condotte rilevano valori di sieroprevalenza alti sia in allevamenti di bovini da latte con valori intorno al 90% (Cavirani et al., 1992; Luzzago et al., 1999), che in allevamenti di bovini da carne (Castrucci et al., 1998).

Anche per quanto riguarda la Francia non esistono piani di controllo a livello nazionale, rendendo i virus ancora endemici nel territorio nazionale (Position Paper).

In Spagna sia il BDV che il BVDV sono endemici in molti allevamenti di ovini e bovini, il genotipo più diffuso è BVDV-1 mentre BVDV-2 presenta una prevalenza inferiore e di recente scoperta sul territorio (Gorka et al., 2015).

Per quanto concerne il BDV, in Italia, è molto diffuso in diverse realtà tra gli allevamenti di ovi-caprini, ma ancora troppo poco controllato (Giammarioli et al., 2011). In Sicilia il 75% degli allevamenti ovi-caprini indagati si è mostrata positiva al virus (Bottari, 2006).

Negli allevamenti di ovi-caprini, non esistono piani di controllo come per il BVDV e le perdite economiche riguardanti quest'infezione sono state troppo spesso sottostimate dagli allevatori (Giammarioli et al., 2011).

#### *Diffusione dei pestivirus nei ruminanti selvatici*

A partire dagli anni 2000-2001 si verificarono diversi episodi di mortalità anche elevata nelle popolazioni di camoscio pirenaico (*Rupicapra p. pyrenaica*) delle zone centrali dei Pirenei spagnoli (Marco et al., 2007). Fu la prima volta che venne descritto BDV in una

popolazione di animali selvatici (Marco et al., 2007). I camosci mostravano depressione, abbattimento, debolezza e difficoltà di movimento; alcuni animali mostravano variazioni comportamentali e alterazioni da un punto di vista ematologico e biochimico, in più aree alopeciche e di iperpigmentazione cutanea. Alla necropsia, cachessia ed infezioni secondarie furono descritte in tutti gli animali (Marco et al., 2007). Da indagini sierologiche retrospettive, si scoprì che il virus circolava nei camosci dal 1990, ma che si sviluppò in forma epidemica solo negli anni 2000 (Marco et al., 2011). Durante gli anni dal 2001 al 2009 l'epidemia si diffuse in buona parte del territorio dei Pirenei, raggiungendo Andorra solo nel 2010 avvalorando l'ipotesi che l'epidemia si sia diffusa nelle popolazioni limitrofe (Fernandez-Sirera et al., 2012). L'isolamento del virus dalle carcasse degli animali trovati morti sul territorio ha portato all'identificazione di un nuovo ceppo virale circolante nel camoscio identificato come BDV-4 (Arnal et al., 2004). Negli anni che seguirono l'epidemia, vennero condotte indagini sierologiche sulle popolazioni di camoscio pirenaico per verificare la circolazione del virus ed attualmente il virus è considerato endemico (Fernandez-Sirera et al., 2012).

L'epidemia si diffuse anche in Francia e le aree principalmente colpite sono state ad Est dei Pirenei, la zona di Orlu ed a Sud Est (Pioz et al., 2007). Analisi filogenetiche applicate a sequenze del genoma di BDV isolati da ovini in Francia e Spagna e da camosci pirenaici hanno evidenziato che, sebbene la variante virale del camoscio sia originata dall'ovino, si è successivamente diffusa e mantenuta nella

popolazione di camosci dei Pirenei, come dimostrato dalla forte aggregazione geografica delle sequenze di BDV di camoscio (Luzzago et al., 2014) corrispondenti ai diversi focolai verificatisi nei Pirenei. Nel camoscio pirenaico sono state osservate infezioni da BDV in individui di qualsiasi età con una maggiore prevalenza dei soggetti inferiori ai due anni, facendo sospettare la presenza di soggetti PI (Pioz et al., 2007).

Nelle Alpi francesi meridionali, è stato isolato nel camoscio alpino un ceppo di BDV appartenente ad una variante virale molto diffusa nelle popolazioni ovine locali, verosimilmente dovuto ad una trasmissione inter-specifica nel periodo di pascolo, in assenza di sintomatologia sovrapponibile a quella verificatasi nei Pirenei (Martin et al., 2015). Inoltre in un'altra specie di ruminante selvatico, il muflone (*Ovis musimon*), è stata rilevata un'elevata sieroprevalenza al pestivirus, ipotizzando un ruolo di possibile portatore del virus (Martin et al., 2011).

In Svizzera, come in Italia, la circolazione dei pestivirus nelle popolazioni di ungulati selvatici risulta essere ad oggi molto bassa, da considerarsi sporadica, proveniente da situazioni di promiscuità tra ruminanti domestici e selvatici durante la stagione dei pascoli estivi (Casaubon et al., 2012).

In particolare in Italia, risultano basse le sieroprevalenze in tutte le aree indagate (Citterio et al., 2003; Gaffuri et al., 2006), tranne in Alta Val di Susa dov'è più elevata nel camoscio (25,5%), ma avvalorando

comunque la sporadicità dell'infezione come "spill-over" dal domestico (Gaffuri et al., 2006).

Altre specie di ungulati selvatici sono state indagate per la presenza di anticorpi nei confronti dei pestivirus. Per esempio, in Norvegia la sieroprevalenza nel cervo si attesta su valori del 12,3% (Lillehaug et al., 2003). In Baviera invece la sieroprevalenza in questa specie risulta molto bassa, nonostante in allevamenti di bovini sia ancora molto alta (Krametter et al., 2004; Schmitt & Wittkowski, 1999).

## SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo della presente tesi è indagare la diffusione dei pestivirus in popolazioni di ruminanti selvatici, in particolare in popolazioni di camoscio e stambecco delle Alpi Centro-Occidentali, a fronte dell'attuale assenza di misure di controllo sistematiche e della conseguente elevata diffusione nei ruminanti domestici.

Le indagini sono state condotte nell'ambito del progetto MIUR-PRIN 2010 (n. 2010P7LFW4) "Genomica e interazione ospite-agente patogeno: un modello di studio nella prospettiva della One-Health" e del "Monitoraggio sanitario dei ruminanti selvatici del Comprensorio Alpino di Caccia C.A.VC1 Valle del Sesia" e delle relativa convenzione stipulata tra il Comprensorio ed il Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica (DIVET) dell'Università degli studi di Milano.

## MATERIALI E METODI

### AREA DI STUDIO

La raccolta dei campioni è stata condotta in cinque aree geografiche: il Comprensorio Alpino di Caccia Verbano-Cusio-Ossola 2 - Ossola Nord (VCO2), il Comprensorio Alpino di Caccia Vercelli 1 - Valle del Sesia (VC1), il Comprensorio Alpino di Caccia Alpi e Prealpi Lecchesi (LC) e le Valli di Lanzo (TO), indicate in figura 1.



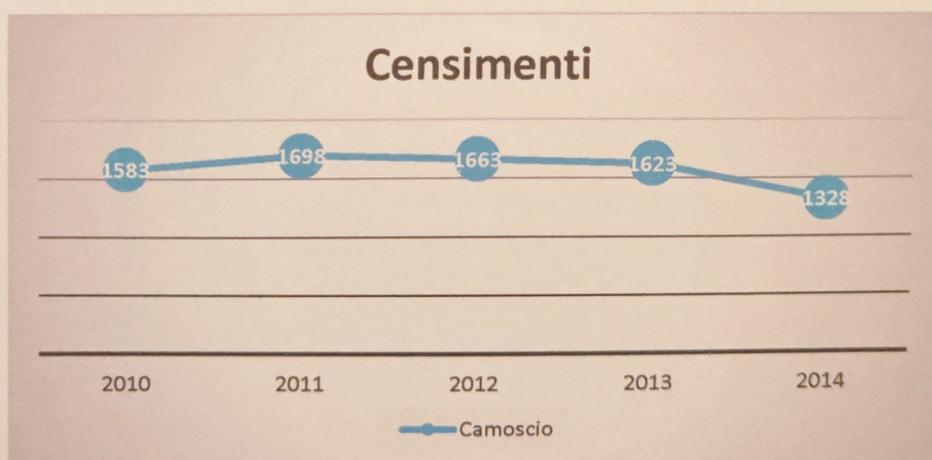
**Figura 1. Aree geografiche di provenienza delle popolazioni di camoscio e stambecco.**

### *Comprensorio Alpino di Caccia Verbano-Cusio-Ossola 2*

La prima area di studio è il C.A. VCO2 Ossola Nord situato nelle Alpi Lepontine in provincia di Verbania, Piemonte, con un'estensione di 72.740 ha dei quali 49.275 costituiscono la superficie venabile. Il territorio include tre valli principali (Val Vigezzo, Valle Antigorio, Val Formazza) e tre valli secondarie (Valle Devero, Valle Isorno, Val d'Ossola). Sono presenti popolazioni stabili di camoscio (Superficie Utile alla Specie S.U.S. 32.736 ha), oltre ad altre specie di ungulati,

quali capriolo, cervo e stambecco. Il cinghiale invece risulta diffuso solo nel settore Sud della provincia. Sono presenti inoltre popolazioni di ruminanti domestici (bovini e ovi-caprini) che durante la stagione primaverile/estiva condividono i pascoli d'alta quota con la fauna selvatica.

Il metodo di prelievo venatorio in quest'area, detto "metodo VCO", ha come obiettivo il raggiungimento del massimo abbattimento consentito nel più breve tempo possibile, massimo 10 giornate. Ogni cacciatore può prelevare un massimo di sei ruminanti selvatici per stagione venatoria. Le informazioni disponibili in merito alla consistenza numerica derivano dai censimenti primaverili con osservazione diretta a partire da itinerari e/o postazioni fisse. Di seguito è riportato il grafico 1 che mostra l'andamento della popolazione negli ultimi 5 anni.



**Grafico 1. Andamento dei censimenti primaverili per la specie camoscio degli ultimi 5 anni nel VCO2.**

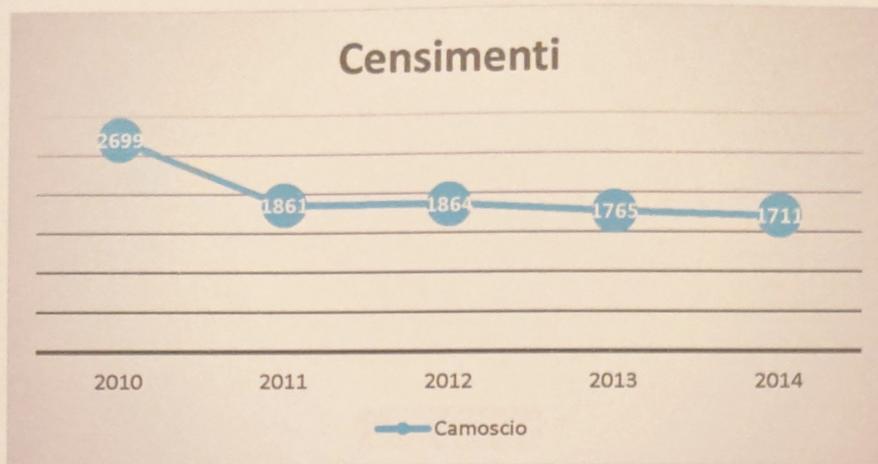
Da un punto di vista sanitario non sono stati segnalati focolai con sintomatologia clinica conclamata e/o lesione macroscopiche ad eccezione di un focolaio di cheratocongiuntivite nel 2012 e di casi di polmonite nel 2014. Inoltre è segnalato un calo progressivo di peso

corporeo nei soggetti di un anno di età (yearling) dal 1996 al 2009 (Viganò, 2009).

#### *Comprensorio Alpino di Caccia Vercelli 1*

La seconda area di studio è il C.A. VC1 Valle del Sesia situato nella provincia di Vercelli, Piemonte, con un'estensione di 77.668 ha, di cui 51.182 rappresentano la superficie venabile. Si può suddividere in tre distretti geografici, "Alta Valsesia", "Media Valsesia" e "Prealpi Biellesi e Valsesiane" (De Biaggi et al., 1990).

Sono presenti sul territorio popolazioni stabili di camoscio (S.U.S. 48.792 ha), oltre ad altre specie di ungulati selvatici come capriolo, cervo, muflone e stambecco. Il cinghiale è inoltre diffuso in tutto il C.A., ma maggiormente in ambiente prealpino. Sono presenti inoltre popolazioni di ruminanti domestici (in prevalenza ovi-caprini data la rinomata produzione di lana della provincia) che durante la stagione primaverile/estiva condividono i pascoli d'alta quota con la fauna selvatica. Il metodo di prelievo venatorio prevede l'assegnazione di un singolo capo/cacciatore specificandone specie, sesso e classe di età, il cacciatore ha poi due mesi e mezzo di tempo per poter effettuare il prelievo corretto. Per quanto riguarda l'andamento demografico, gli animali sono sottoposti a censimenti primaverili effettuati dagli stessi cacciatori prima di ogni stagione venatoria, al fine di istituire un piano di abbattimento consono alla densità demografica della popolazione. Di seguito è riportato il grafico 2 che mostra l'andamento della popolazione dei camosci degli ultimi 5 anni.



**Grafico 2. Andamento dei censimenti primaverili per la specie camoscio degli ultimi 5 anni nel VC1.**

Dal punto di vista sanitario si registrano casi di pseudotubercolosi da *Corynebacterium ovis pseudotuberculosis* e di dermatofilosi da *Dermatophylus congolensis* negli anni di indagine. Non sono disponibili dati sullo stato sanitario negli anni precedenti al 2013.

#### *Comprensorio Alpino di Caccia Alpi e Prealpi Lecchesi*

La terza area è situata in provincia di Lecco, Lombardia, con un'estensione di 62.517,7 ha (Pedrotti et al., 2001). I rilievi si estendono con un'altitudine che si aggira tra i 300 m s.l.m. a quote fino a 2400 m s.l.m. Il territorio è circondato da montagne che creano una conca naturale internamente alla quale si sviluppa il Lago e l'abitato. È delimitato a Nord dal Monte Coltignone e San Martino, ad Est il Resegone, a Sud il Magnodeno ed a Ovest il Monte Barro. Comprende due aree di caccia: "Prealpi Lecchesi" e "Alpi Lecchesi", ciascuno dei quali è suddiviso in più settori: Agrella, Barchitt, Pizzo Cavallo, Val Marcia e rispettivamente Muggiò, Grigne, Campelli-Madesimo, Resegone.

Sono presenti popolazioni stabili di camoscio in entrambi i distretti geografici oltre ad altre specie di ungulati selvatici come capriolo, cervo e stambecco. Sono inoltre presenti, altre specie quali cinghiale e avifauna alpina. Gli ungulati sono cacciati nei mesi che vanno da Ottobre a Dicembre nel rispetto del piano di caccia selettivo. Il metodo di prelievo venatorio prevede l'assegnazione di un singolo capo/cacciatore specificando classe, sesso ed età. Ogni cacciatore ha un numero massimo di capi da prelevare che gli vengono assegnati ad inizio stagione venatoria, variabile da anno ad anno in base al piano di abbattimento. Negli anni 2000-2001 è stata segnalata un'epidemia di polmonite nella popolazione di camosci presenti sul territorio con elevati tassi di mortalità ed incremento della sieroprevalenza di BRSV (Citterio et al., 2003). A partire dagli anni seguenti al crollo demografico, si è assistito ad una continua crescita di popolazione con stime che arrivarono negli anni 2013 e 2014 ad un numero di rispettivamente 2135 e 2077 capi, come riportato nel grafico 3.



**Grafico 3. Andamento dei censimenti primaverili per la specie camoscio degli ultimi 5 anni Alpi e Prealpi Lecchesi.**

### *Valli di Lanzo*

Le Valli di Lanzo, situate in provincia di Torino, Piemonte, occupano il settore meridionale delle Alpi Graie e sono tre Valli che si estendono da Nord verso Sud giacenti su di un unico bacino idrico rappresentato dal fiume Stura di Lanzo. Le tre Valli da Nord sono la Val Grande di Lanzo con i centri principali Cantoria, Chialamberto e Groscavallo; la Val d'Ala con Ala di Stura e Balme ed infine la Val di Viù con Viù, Lemie e Usseglio. Le aree specifiche oggetto di studio sono il Comune di Groscavallo (V. Grande), il Comune di Ala di Stura (V. d'Ala), il Comune di Balme (V. d'Ala) ed il Comune di Usseglio (V. di Viù).

La realtà geografica e faunistica sono quelle tipiche di un ambiente alpino. Tra gli ungulati selvatici sono presenti popolazioni di camosci, stambecchi, cervi, caprioli. Sono inoltre presenti popolazioni di cinghiali. La popolazione degli stambecchi locali non si è mai estinta completamente, come invece accaduto in altre realtà montane quali le Alpi Orobie.

La gestione della caccia è programmata ai sensi della Legge della Regione Piemonte 6 giugno 2011. Ad ogni cacciatore è assegnato nominalmente un carniere di capi fino a massimo di cinque. La specie campionata in quest'area (stambecco), in quanto specie particolarmente protetta, non risulta soggetta a prelievo venatorio. Nel 2007 un'epidemia di polmonite ha interessato le valli di Lanzo, il Gran Paradiso e il Parco della Vanoise in Savoia (Francia) provocando un calo demografico della popolazione degli stambecchi locali di oltre il 40% (dato non pubblicato). L'agente eziologico è ancora sconosciuto,

ma questo evento ha innescato la necessità di indagini più approfondite cominciando da studi retrospettivi di natura sierologica, su popolazioni di stambeccchi locali, prevalentemente maschi adulti. Di seguito è riportato il grafico 4 sull'andamento dei censimenti degli ultimi 5 anni.



**Grafico 4. Andamento dei censimenti per la specie stambecco degli ultimi 5 anni nelle Valli di Lanzo.**

## CENTRI DI CONTROLLO PER LA SELVAGGINA E GESTIONE

### VENATORIA

La gestione venatoria risulta alquanto complessa a livello nazionale in quanto presenta un'impostazione differente a seconda della regione e delle provincie interessate. L'esercizio dell'attività venatoria è consentito purché non contrasti con l'esigenza di conservazione della fauna e non arrechi danno effettivo alle produzioni agricole (art 2). Ogni Regione ha una propria autonomia gestionale purché risulti conforme alla Legge e rispetti le direttive imposte dalla comunità internazionale (art. 3). Le Regioni e le Provincie predispongono un proprio piano faunistico-venatorio concorde alle esigenze locali del territorio per il mantenimento di un corretto ecosistema (art 10.7).

### **Regione Piemonte**

La Regione Piemonte, in attuazione alla legge 157/1992, ha istituzionalizzato un programma venatorio delineando le dimensioni spaziali e faunistiche delle aree venatorie, al fine di ottenere un maggiore controllo del territorio e del bracconaggio e realizzare un stretto legame tra i cacciatori con il territorio, favorendo l'impegno ambientale e venatorio negli Ambiti Territoriali di Caccia (ATC) e nei Comprensori Alpini di Caccia (CAC). I Comitati di gestione devono individuare, per ogni Comprensorio Alpino di Caccia (CA), uno o più Centri per il controllo dei capi abbattuti. I Centri devono essere siti in locali chiusi ove non sia espletata altra attività professionale nelle ore di apertura. Essi devono essere opportunamente attrezzati per le specifiche attività di rilevamento dei dati su ogni capo prelevato (Linee

Guida per l'organizzazione e realizzazione dei piani di prelievo dei bovidi e dei cervidi selvatici nella regione Piemonte). Gli accertamenti sono affidati a tecnici faunistici qualificati, in possesso dei requisiti professionali di cui all'art. 17 comma 5 dell'ex L.R. 70/96, nonché a tecnici laureati in scienze biologiche.

### **Regione Lombardia**

La Regione Lombardia, ai sensi della L.R. 26/1993, prevede che ogni provincia rediga un proprio piano faunistico-venatorio in accordo alle diverse realtà locali che le contraddistinguono per le caratteristiche della fauna locale, della morfologia ambientale, delle esigenze gestionali territoriali nonché gli usi e le tradizioni. Per quanto concerne la provincia di Lecco, il territorio è suddiviso in settori, definiti su proposta dei comitati di gestione, che istituiscono in ogni settore un centro di raccolta, previo accordo con la Provincia, fornito di idonea cella frigorifera, accessibile per eventuali controlli sia da parte della polizia provinciale che dell'ASL.

## RACCOLTA DEI CAMPIONI

Le indagini sono state condotte a partire da camosci abbattuti e pervenuti ai centri di controllo, ove presenti, durante le stagioni venatorie 2013 e 2014 e su stambecchi catturati nel mese di maggio 2013 e 2014. Il prelievo del materiale biologico, e nello specifico di sangue, è stato affidato agli stessi cacciatori, i quali, a inizio di ogni stagione venatoria, sono stati formati da personale specializzato (medici veterinari, tecnici faunistici e guardie forestali) sulla gestione del capo abbattuto, sul riconoscimento dei singoli organi, nonché sulla corretta modalità di prelievo e trasporto dei campioni. Prima dell'apertura della stagione venatoria, sono stati distribuiti dei kit per la raccolta del materiale biologico contenenti guanti a perdere e provette sterili da 50ml. I campioni di sangue potevano essere raccolti in campo, dopo l'abbattimento del capo e durante le corrette pratiche di dissanguamento dell'animale oppure potevano essere raccolti direttamente ai centri di controllo da personale veterinario tramite il recupero di coaguli di sangue a livello cardiaco. I campioni, recapitati ai centri di controllo, ove presenti, nella stessa giornata di abbattimento dell'animale, venivano centrifugati, aliquotati e stoccati a -20°C e trasportati presso i laboratori DIVET dell'Università degli Studi di Milano al termine della stagione venatoria; in alternativa i campioni venivano trasportati il giorno dopo il prelievo ai laboratori universitari e lì centrifugati, aliquotati e stoccati.

Gli stambecchi, al contrario, sono specie particolarmente protetta, pertanto non soggetta a prelievo venatorio, quindi la raccolta dei

campioni è stata possibile grazie all'impiego della tele-anestesia effettuata da personale veterinario dell'Università degli Studi di Torino. Il protocollo prevedeva l'impiego di un anestetico con dosaggi standard a seconda del grado di sedazione richiesto. Sono state impiegate corde per la contenzione e mascherina per diminuire lo stress dell'animale. Durante la sedazione veniva effettuato un prelievo di sangue da personale veterinario (come mostrato in figura 2) e i campioni venivano centrifugati in giornata per ottenere le aliquote di siero.

Al termine delle manualità sull'animale veniva somministrato un antidoto per antagonizzare gli effetti dose-dipendente dell'anestetico. Questo effetto è molto importante, specie nel selvatico, in quanto si riescono ad evitare complicanze legate al perdurare dell'effetto sedativo-analgescico (Zanichelli et al., 1993).



**Foto 2. Prelievo di sangue dalla vena giugulare dettaglio di mascherina e corde per la contenzione (foto Professor Luca Rossi, Università di Torino).**



**Foto 3. Fase di risveglio post anestesia (Foto Professor Luca Rossi, Università di Torino).**

#### METODICHE DI LABORATORIO

I sieri raccolti sono stati processati allo scopo di determinare la presenza di anticorpi specifici verso i pestivirus, indice di una esposizione pregressa all'infezione. A tal fine sono state utilizzati due differenti metodiche di laboratorio per determinare anticorpi sia verso BDV che BVDV ed aumentare la probabilità di identificare campioni sieropositivi: un test immunoenzimatico (ELISA) commerciale per la determinazione degli anticorpi verso la proteina p80/p125, comune a tutti i pestivirus (Martin et al., 2011) ed un test di virus-neutralizzazione (VN) per la ricerca di anticorpi neutralizzanti verso BVDV.

#### *Virus-neutralizzazione (VN)*

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

E' stata utilizzata la linea cellulare Madin Darby Bovine Kidney (MDBK ATCC CCL-22), coltivata in Minimum Essential Medium (MEM) con 1% di L-glutamina 200mM, 100 U/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina, 2.5 µg/ml di fungizone 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 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 incubate in termostato umidificato a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub> per 1-2 ore. In tutti i pozzetti è stata seminata una sospensione di MDBK (1,5 x 10<sup>5</sup> /ml), in terreno addizionato di FBS 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 (1931). I sieri con titolo >8 sono stati considerati positivi.

### *ELISA*

In accordo con quanto riportato in letteratura (Martin et al., 2015), è stato scelto un kit commerciale per BDV e BVDV (IDEXX BVDV p80 Ab). La positività è rilevata dalle reazione immunoenzimatica prodotta

dal legame degli anticorpi specifici con la proteina p80/125, comune a BDV e BVDV.

Il test è stato eseguito su siero stoccato  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento della processazione in laboratorio. Il siero è stato diluito 1:5 secondo le indicazioni della casa produttrice per i sieri dei piccoli ruminanti. Dopo un'incubazione "over-night" a  $3-5^{\circ}\text{C}$  gli anticorpi specifici per la proteina p80, se presenti, formano un immuno-complesso con la proteina stessa. Quindi dopo aver effettuato un accurato lavaggio dei pozzetti per eliminare il materiale non legato, si è proceduto all'aggiunta del coniugato anticorpo/enzima. In seguito a incubazione e lavaggio, è stato aggiunto un substrato che in presenza dell'enzima determina una reazione colorimetrica blu. Lo sviluppo della colorazione è inversamente proporzionale alla positività del campione. Il risultato ottenuto tramite una lettura con spettrofotometro a 450 nm ha permesso il confronto con l'assorbanza media dei controlli negativi. I risultati sono stati considerati positivi se il valore percentuale, ottenuto dalla differenza del valore di assorbanza con la media dei controlli negativi, risultava essere  $S/N < 40\%$ , negativo con valori  $S/N > 50\%$  ed infine dubbio con valori compresi tra il 40% ed il 50%.

### ANALISI STATISTICA

I dati complessivi ottenuti nelle aree di indagini sono stati raccolti su foglio elettronico e sono stati sottoposti a un'analisi statistica descrittiva preliminare. Per il calcolo delle prevalenze, con i relativi intervalli di confidenza, nelle varie classi di frequenza è stato utilizzato il programma Winepi ( <http://www.winepi.net/>). Analisi ulteriori sono state effettuate sui dati relativi alla titolazione anticorpale ottenuta in VN, i dati sono stati trasformati in Logaritmo ( $\text{Log}_2$ ) e sono stati analizzati con un software statistico IBM® SPSS®, Versione 20, il confronto tra i gruppi è stato effettuato con il test statistico ANOVA Univariata. La significatività è stata accettata per valori di  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

### CAMPIONI RACCOLTI

Tra il 2013 ed il 2014 sono pervenuti ai centri di controllo un totale di 1298 camosci e catturati un totale di 55 stambecchi. Nella Tabella 1 è indicato il numero di camosci abbattuti durante le stagioni venatorie 2013 e 2014 nelle tre aree oggetto di studio. Per quanto concerne la popolazione degli stambecchi sono stati raccolti 24 campioni nel 2013 e 31 campioni nel 2014.

| Camosci abbattuti | 2013 | 2014 |
|-------------------|------|------|
| VCO2              | 217  | 191  |
| VC1               | 211  | 202  |
| LECCO             | 252  | 225  |

**Tabella 1. Numero di camosci abbattuti nelle tre aree geografiche durante le stagioni venatorie 2013 e 2014.**

Le tabelle seguenti riportano il numero di sieri raccolti e la quantità di sieri effettivamente utilizzabili per gli esami sierologici.

| Anno 2013 | Camosci Abbattuti | Sieri Raccolti | Sieri Esaminati |
|-----------|-------------------|----------------|-----------------|
| VCO2      | 217               | 52             | 43              |
| VC1       | 211               | 60             | 40              |
| LECCO     | 252               | 31             | 29              |

**Tabella 2. Confronto tra numero di capi abbattuti per ciascuna area di studio, numero di sieri raccolti ed analizzati durante la stagione venatoria 2013.**

| Anno 2014 | Camosci<br>Abbattuti | Sieri<br>Raccolti | Sieri<br>Esaminati |
|-----------|----------------------|-------------------|--------------------|
| VCO2      | 191                  | 17                | 15                 |
| VC1       | 202                  | 49                | 38                 |
| LECCO     | 225                  | 24                | 21                 |

**Tabella 3. Confronto tra numero di capi abbattuti per ciascuna area di studio, numero di sieri raccolti ed analizzati durante la stagione venatoria 2014.**

Relativamente ai prelievi di siero su capo abbattuto, la raccolta dei campioni e quindi la disponibilità per eventuali analisi dipende dalle difficoltà che sono emerse nelle operazioni di prelievo in campo e dal grado di collaborazione dei cacciatori. Inoltre le condizioni di prelievo del campione e la successiva gestione del campione biologico, hanno compromesso la qualità del siero stesso, determinando un'ulteriore riduzione del numero dei campioni idonei alle analisi di laboratorio. Sono stati esclusi i campioni con eccessivo grado di emolisi e possibili contaminazioni nella fase di raccolta. La qualità dei campioni raccolti ha quindi presentato un'elevata variabilità dovuta alle modalità di prelievo precedentemente descritte. A titolo esemplificativo è riportata una scala di qualità dei sieri raccolti (foto 4).



**Foto 4. Da sinistra verso destra: esempio di gradi di emolisi differenti, partendo da un siero di camoscio ottenuto da un prelievo *in vivo*, fino ad un siero ottenuto da un prelievo di sangue contaminato da altri fluidi (Viganò, 2009).**

Per quanto riguarda le Valli di Lanzo la quantità dei sieri esaminati corrisponde al totale di sieri raccolti, in quanto il prelievo di sangue *intra vitam* non comporta i problemi relativi alla qualità riscontrati nel prelievo *post mortem*, come è possibile notare nella foto 5.



**Foto 5. Esempio sieri ottenuti da sangue prelevato da stambecchi sottoposti a cattura farmacologica.**

#### ANALISI SIEROLOGICHE

Nei due anni di indagine sono stati esaminati un totale di 186 sieri di camoscio, di cui 186 in VN e 113 in ELISA. In base alla quantità del campione è stato possibile esaminare con entrambe le metodiche sierologiche un totale di 99 sieri. Per quanto concerne la popolazione degli stambecchi sono stati esaminati 24 campioni nel 2013 e 31 nel 2014. La popolazione campionata è rappresentata da soggetti in prevalenza maschile (tranne due femmine catturate nel 2014) ed esclusivamente soggetti adulti per esigenze decise in fase preliminare.

Le tabelle riportate di seguito, mostrano come varia la sieroprevalenza stimata durante gli anni di indagine, suddividendo il risultato per area di studio (Tabella 4-5).

| ANNO 2013 | SIERI ESAMINATI | SIERI POSITIVI (VN) | %SIEROPREVALENZA (I.C. 95%) |
|-----------|-----------------|---------------------|-----------------------------|
| VCO2      | 43              | 4                   | 9.30 (0.74-17.87)           |
| VC1       | 40              | 1                   | 2.50 (0.00-7.28)            |
| LC        | 29              | 1                   | 3.45 (0.00-9.62)            |

**Tabella 4. Sieroprevalenza nei camosci nel 2013 nelle tre aree di indagini.**

| ANNO 2014 | SIERI ESAMINATI | SIERI POSITIVI (VN) | %SIEROPREVALENZA (I.C. 95%) |
|-----------|-----------------|---------------------|-----------------------------|
| VCO2      | 15              | 1                   | 6.67 (0.00-19.22)           |
| VC1       | 38              | 2                   | 5.26 (0.00-12.28)           |
| LC        | 21              | 0                   | 0.00 (0.00-13.24)           |

**Tabella 5. Sieroprevalenza nei camosci nel 2014 nelle tre aree di indagini.**

Per quanto concerne la popolazione degli stambecchi, i sieri esaminati sono risultati tutti negativi.

| VALLI DI LANZO | SIERI ESAMINATI | SIERI POSITIVI (VN) | %SIEROPREVALENZA (I.C.95%) |
|----------------|-----------------|---------------------|----------------------------|
| 2013           | 24              | 0                   | 11.65(0.000-11.6535)       |
| 2014           | 31              | 0                   | 9.12(0.0000- 9.1197)       |

**Tabella 6. Sieroprevalenza negli stambecchi durante gli anni di indagine 2013 e 2014 nelle Valli di Lanzo.**

Dalle analisi sierologiche condotte sono risultati positivi al test in VN un totale di 9 campioni su 241 esaminati.

In particolare per quanto riguarda i sieri testati con entrambe le metodiche, 4 campioni risultati sieropositivi in VN non sono stati confermati dal test ELISA. In tabella sono riassunti i dati relativi ai camosci sieropositivi (Tabella 7) sui sieri analizzati. È stato riscontrato solo un soggetto adulto sieropositivo nei due anni di indagini, una

femmina abbattuta nel comune di Montecrestese (VCO2) durante la stagione venatoria 2013.

| Contrass. | Anno | Area | Sesso | Eta'   | Lesioni    | Titolo VN |
|-----------|------|------|-------|--------|------------|-----------|
| 80874     | 2013 | VCO2 | M     | 1 anno | Assente    | 1024      |
| 81967     | 2013 | VCO2 | F     | 2 anni | Assente    | 1024      |
| 82126     | 2013 | VCO2 | M     | 1 anno | Assente    | 32        |
| 83003     | 2013 | VCO2 | F     | 1 anno | Assente    | 128       |
| 106596    | 2013 | VC1  | F     | 1 anno | Assente    | 11        |
| 9389      | 2013 | LC   | F     | 1 anno | Assente    | 64        |
| 53109     | 2014 | VCO2 | F     | 6 mesi | Cachettico | 1024      |
| 91835     | 2014 | VC1  | M     | 1 anno | Assente    | 1024      |
| 117200    | 2014 | VC1  | F     | 1 anno | Assente    | 16        |

**Tabella 7. Caratteristiche degli animali sieropositivi.**

I risultati sono stati poi suddivisi sulla base dell'età degli animali. Prendendo in considerazione tutte le classi di età solamente dei camosci, poiché la popolazione degli stambecchi, oltre ad essere completamente negativa è stata campionata in modo differente, come quanto riportato precedentemente, sono stati considerati separatamente i soggetti di un anno o yearling (classe 1), i soggetti di 2-3 anni o subadulti (classe 2) ed i soggetti maggiori di 4 anni o adulti (classe 3). Dai risultati emersi, si evidenzia una differenza al limite

della significatività statistica tra yearling e soggetti di classe adulta (p=0.057).

| ETA'      | N ESAMINATI | N POSITIVI |
|-----------|-------------|------------|
| CLASSE 0  | 9           | 1          |
| YEARLING  | 67          | 7          |
| SUBADULTI | 19          | 1          |
| ADULTI    | 86          | 0          |

Tabella 8. Numero soggetti sieropositivi divisi per classe di età.

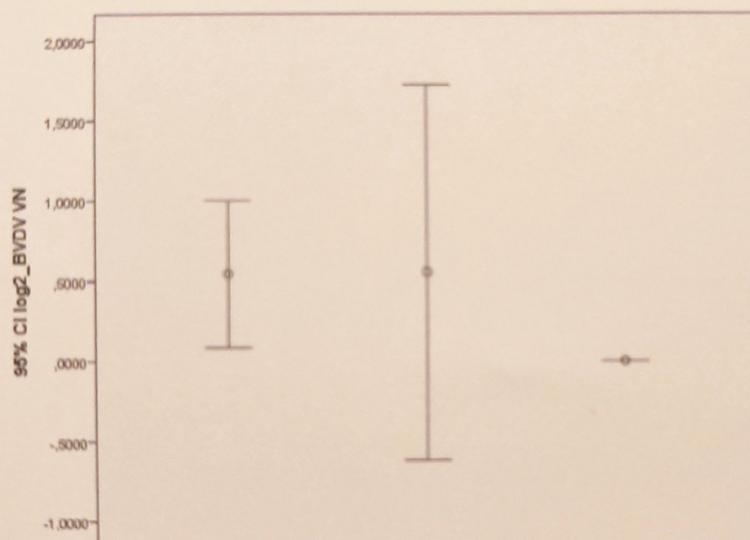
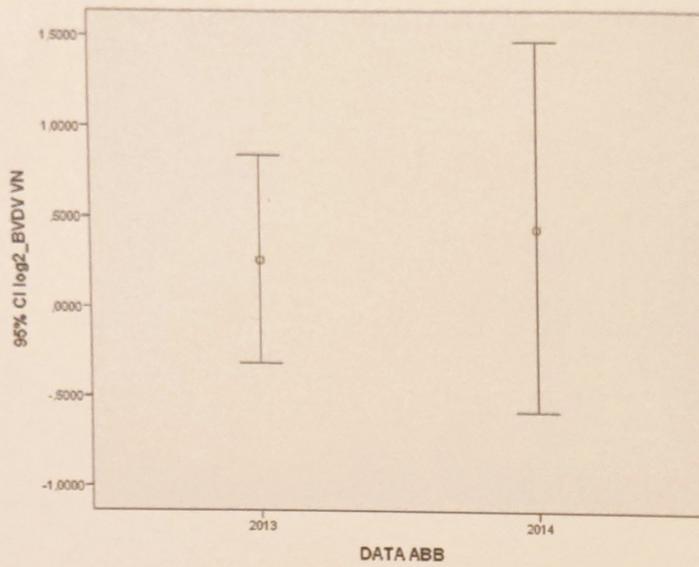
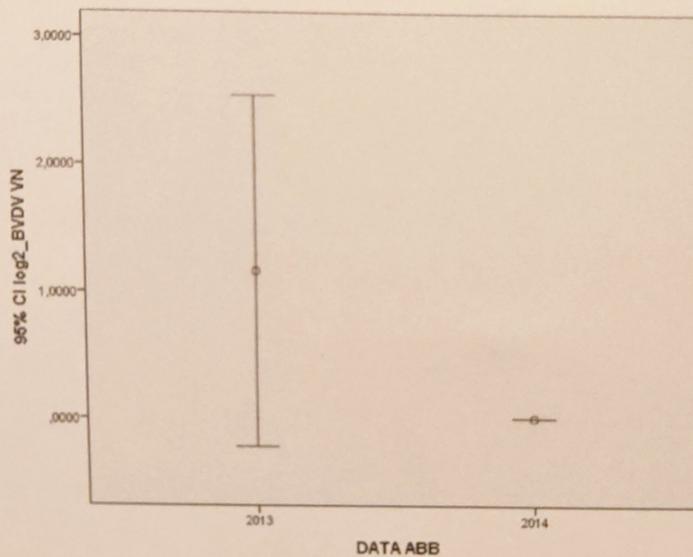


Grafico 5. Titoli anticorpali suddivisi per classi di età (yearling e classi adulte).

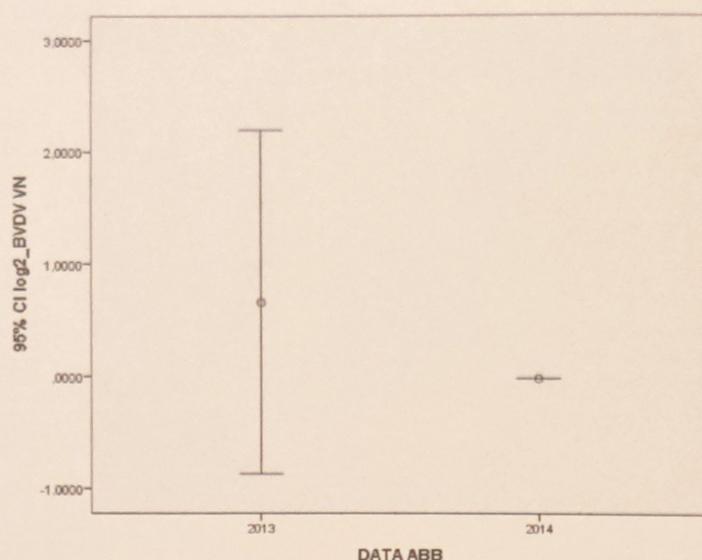
È stata in seguito presa in considerazione solo la popolazione degli yearling, mettendo in evidenza come durante la stagione venatoria 2013 ci siano sieropositività in tutte le aree di studio, mentre nel 2014 solo nel VC1 sono risultati positivi due yearling, a differenza delle altre due aree nelle quali non risultano sieropositività. I grafici riportati di seguito (6-7-8) mostrano da un punto di vista statistico come varia il titolo anticorpale degli yearling abbattuti per C.A.



**Grafico 6. Titoli anticorpali degli yearling abbattuti nel VC1 durante le due stagioni venatorie.**



**Grafico 7. Titoli anticorpali degli yearling abbattuti nel VCO2 durante le due stagioni venatorie.**



**Grafico 8. Titoli anticorpali degli yearling abbattuti nel CA LC durante le due stagioni venatorie.**

La Tabella 10 mostrata di seguito, riporta le distribuzioni geografiche delle sieropositività divise per distretti geograficamente distinguibili tra loro. Sono stati quindi considerati come distretto 1 la Valle Antigorio (Crodo, Baceno, Premia, Formazza), distretto 2 i comuni di Montecrestese e Cravariola, distretto 3 la Val Vigizzo, che appartengono al C.A. VCO2; distretto 4 l'intera Valsesia, appartenente al C.A. VC1, distretto 5 le Alpi Lecchesi, distretto 6 le Prealpi Lecchesi e distretto 7 le Valli di Lanzo.

| C.A.        | DISTRETTI | N ESAMINATI | N POSITIVI |
|-------------|-----------|-------------|------------|
| VCO2        | 1         | 22          | 3          |
| VCO2        | 2         | 7           | 1          |
| VCO2        | 3         | 28          | 1          |
| VC1         | 4         | 78          | 3          |
| Alpi LC     | 5         | 32          | 1          |
| Prealpi LC  | 6         | 14          | 0          |
| V. di Lanzo | 7         | 56          | 0          |

**Tabella 10. Numero di soggetti sieropositivi divisi per Comprensori Alpini e distretti geografici negli anni di indagine.**

## DISCUSSIONE

Dalle analisi condotte nelle popolazioni di camoscio si evidenzia una sieroprevalenza contenuta nei confronti di pestivirus variabile nei due anni di indagini e nelle tre aree di studio indagate. Complessivamente è presente una sieropositività maggiore nel 2013 rispetto al 2014 in tutte e tre le aree di studio, ed un maggiore interessamento del VCO2, in particolare la Valle Antigorio, rispetto alle altre zone di studio con valori rispettivamente di 9.30% nel 2013 ed di 6.67% nel 2014. Nel complesso, nel camoscio, solo 9 campioni dei 186 sieri esaminati sono risultati positivi alla ricerca di anticorpi verso i pestivirus, di questi, 5 confermati sia in VN che in Elisa e 4 che non si sono ri-confermati con la metodica ELISA. Da questi dati è possibile fare alcune considerazioni.

In primo luogo, dati i bassi valori di sieroprevalenza in tutte le aree si può considerare l'infezione come sporadica e quindi i pestivirus non circolanti all'interno delle popolazioni selvatiche prese in esame.

In secondo luogo, la scelta di testare i sieri con entrambe le metodiche in parallelo è stata effettuata per aumentare la sensibilità diagnostica data la difficoltà di analisi che questa tipologia di sieri presenta. L'approccio diagnostico applicato in indagini condotte nei Pirenei (Fernandez-Sirera et al., 2012) e nelle Alpi francesi (Martin et al., 2011) prevede invece l'utilizzo della metodica ELISA e la conferma dell'esito in VN. La metodica ELISA è infatti più rapida, meno costosa, ma in base ai nostri risultati risulta meno sensibile rispetto alla VN.

Inoltre la VN permette di calcolare il titolo anticorpale, quindi una valutazione non solo qualitativa (esito positivo/negativo), ma anche quantitativa. Interessante è sottolineare che i camosci risultati sieropositivi presentavano un titolo anticorpale elevato. Questo risultato e il riscontro delle sieropositività principalmente in animali di età minore o uguale ai 2 anni, supportano l'ipotesi che il contatto con animali infetti, probabilmente ruminanti domestici al pascolo, si ripeta ogni anno. È importante sottolineare che la maggiore parte dei soggetti sieropositivi è stata riscontrata nel VCO2 (n=5), rispetto agli altri Comprensori Alpini indagati VC1 (n=3), LC (n=1). Si può, inoltre, osservare che i soggetti positivi del VCO2 (n=5) provengano in prevalenza dal distretto geografico comprendente il comune di Premia (n=3), a sostegno di quanto anche riportato in lavori precedenti (Besozzi, 2011). Le località in cui sono stati abbattuti i soggetti (Salecchio, Costa di Faedo, Colmine, Topera) sono, infatti, classicamente luoghi di pascolo estivo dei ruminanti domestici, avvalorando l'ipotesi precedentemente sostenuta del contatto e dello "spill-over" dal domestico. Anche per quanto concerne il comprensorio VC1 le sieropositività riscontrate possono essere ricondotte allo stesso fenomeno di infezioni sporadiche, in particolare greggi di ovini che pascolano comunemente gli stessi territori. La trasmissione interspecifica non è in grado di determinare perciò infezioni persistenti nel selvatico, ma transitorie, la cui frequenza dipende dalla prevalenza nel domestico e dal livello di interazione spaziale fra le popolazioni, nonché dalla densità di popolazione.

Complessivamente la sieroprevalenza riscontrata nei due anni di indagini si mantiene a livelli contenuti, come riscontrato anche in altre realtà, quali per esempio la Svizzera (Casaubon et al, 2012).

L'unica eccezione è rappresentata dalle popolazioni di camoscio pirenaico, interessate da focolai di BDV, genotipo 4 con un forte impatto demografico (Arnal et al, 2004; Marco et al., 2009). Tale variante virale risulta attualmente endemica in popolazione dei camosci dei Pirenei (Fernandez-Sirera et al., 2012). Questa realtà non è stata riscontrata in nessun altro areale distributivo dei camosci, rendendo la realtà spagnola unica e singolare. In merito ai nostri risultati possiamo dedurre che il virus non sia endemico all'interno della popolazione per la bassa sieroprevalenza riscontrata nei due anni di indagine. Valutando l'età dei soggetti positivi e cioè il fatto che tutti gli animali positivi siano animali giovani e con una fascia d'età compresa da zero a due anni, ci può far ipotizzare che non ci sia trasmissione verticale del patogeno, come riscontrata nel domestico che rappresenta, come quanto già riportato, il mezzo principale di mantenimento del virus all'interno degli allevamenti per la presenza dei soggetti PI. Questo è spiegabile dal fatto che il periodo di interazione tra domestico e selvatico è legato al periodo primaverile-estivo, periodo in cui le mandrie di animali domestici vengono portati in alpeggio e condividono pascoli con animali selvatici facilitando l'interazione e quindi la possibilità dello "spill-over" dal domestico (Casaubon et al, 2012). Durante questo periodo le femmine di camoscio non sono ancora gravide in quanto la stagione degli amori

per questa specie è durante il mese di novembre, quando ormai le mandrie monticanti sono tornate in pianura e quindi non esiste la possibilità di trasmissione verticale.

Per quanto concerne la popolazione degli stambecchi, essendo una specie protetta, è stato possibile decidere a priori la numerosità campionaria e la tipologia di soggetti da catturare. Si è quindi scelto di analizzare esclusivamente soggetti adulti, che potessero quindi fornire dati "storici" sulla possibile esposizione a patogeni, e per la maggior parte maschi, in quanto le indagini sono state condotte durante i mesi primaverili, periodo in cui le femmine di stambecco sono gravide e l'impiego dell'anestetico avrebbe potuto portare a complicazioni gestazionali (Zanichelli et al., 1993). Da questo studio non si evidenzia alcuna sieropositività per pestivirus nella popolazione di stambecchi, confermata con entrambi i test sierologici impiegati. Tale risultato potrebbe dipendere dall'etologia dell'animale; infatti normalmente l'habitat ideale per questa specie è tra i 2000 m s.l.m. e i 3000 m s.l.m. dove l'interazione con il domestico è meno probabile e quindi meno facile la trasmissione inter-specifica dei patogeni. Da questi risultati è, inoltre, possibile escludere che le mortalità che interessarono la popolazione degli stambecchi a partire dal 2007 fossero imputabili a infezioni da pestivirus.

## CONCLUSIONI

Nel complesso la sieroprevalenza riscontrata nelle popolazioni indagate si mantiene a livelli contenuti sia per quanto concerne la popolazione dei camosci che per quanto riguarda la popolazione degli stambecchi, dove non è stata riscontrata alcuna sieropositività. Tale frequenza è verosimilmente dovuta a sporadiche infezioni conseguenti all'interazione con i ruminanti domestici. A tale proposito va considerato che la principale fonte di mantenimento dell'infezione, per quanto noto nelle specie domestiche, è rappresentata da soggetti persistentemente infetti in seguito a trasmissione verticale. L'interazione con il domestico si verifica nei mesi estivi, periodo in cui le femmine di camoscio non sono gravide. La trasmissione interspecifica non è in grado di determinare perciò infezioni persistenti nel selvatico, ma transitorie, la cui frequenza dipende dalla prevalenza nel domestico e dal livello di interazione spaziale fra le popolazioni. Occorre sottolineare che queste considerazioni vengono effettuate anche nei limiti che un campionamento di fauna selvatica presenta, in quanto la disponibilità campionaria è inevitabilmente legata alla collaborazione di tutti gli enti che ne fanno parte ai fini di un corretto svolgimento del lavoro. Ne scaturisce come la collaborazione tra tecnici, ricercatori, personale di campo, mondo venatorio ed enti territoriali sia elemento imprescindibile per un pieno successo dell'attività di ricerca, nonché della gestione faunistico-venatoria.

## BIBLIOGRAFIA

- ADURIZ G, ATXAERANDIO R., CORTABARRIA N. (2015). First detection of bovine viral diarrhoea virus type 2 in cattle in Spain. *Veterinary record open*.
- ARCHETTI L., HORSFALL F.L. (1950). Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J, exp, med* 92, 441-462.
- ARNAL MC, FERNANDEZ -DE-LUCO D, RIBA L, MALEY M, GILRAY J, ET AL (2004). A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica*). *J Gen Virol* 85: 3653–3657.
- BACHOFEN C., BRAUN U., HILBE M., EHERENSPERGER F., STALDER H., PETERHANS E., (2010). Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. *Veterinary Microbiology* 141, 258–267.
- BAKER JC. (1987). Bovine viral diarrhoea virus: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1987, 190: 1449-1458.
- BAKER J.C., (1995). The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice* 11, 425–446.
- BECHER P., AVALOS-RAMIREZ R., ORLICH M., CEDILLO ROSALES S., KONIG M., SCHEWEIZER M., STALDER H., SCHIRRMIERER H., THIEL H.J., (2003). Genetic and antigenetic characterization of novel pestivirus genotypes: Implication for classification. *Virology* 311, 96–104.
- BESOZZI M. (2011). INFEZIONI RESPIRATORIE VIRALI NEI CAMOSCI DEL VERBANO CUSIO OSSOLA. Tesi di Laurea. Università degli studi di Milano. Divet.

- BOTTARI T., FOTI M., RINALDO D., FISICHELLA V., DI PIETRO BUONAVOGLIA D. Ricerca di anticorpi per border disease virus (bdv) in ovini siciliani. Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria – 2Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie - Facoltà di Medicina Veterinaria, Polo Universitario dell'Annunziata 98168 Messina 3Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali - Facoltà di Medicina Veterinaria –Bari.
- BRIAND F., DUBOST M., PITT D., RAMBAND D. (1989). Le Alpi. Un sistema sotto pressione. Ed. Unione Internazionale per la Conservazione della Natura e delle Risorse Naturali (UICN) e Centro Internazionale per l'Ambiente Alpino (ICALPE), *Le Bourget-du-Lac*, Francia.
- BROWN T.T., DELAHUNTA A., BISTNER S.I., SCOTT F.W., MCENTEE K., (1974). Pathogenetic studies of infection of the bovine fetus with bovine viral diarrhoea virus. I. Cerebellar atrophy. *Veterinary Pathology* 11, 486–505.
- BROWN T.I., BISINER S.I., DELAHUNTA A., SCOTT F.W., MCENTEE, K., (1975). Pathogenetic studies of infection of the bovine fetus with bovine viral diarrhea virus. II. Ocular lesions. *Veterinary Pathology* 12, 394–404.
- BROWNLIE J., CLARKE M. C., HOWARD C.J. (1987). The pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection in cattle. *Ann. Rech. Vet.* 18,157-166.
- BROWNLIE J., HOOPER L.B., THOMPSON I., COLLINS M.E., (1998). Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) The bovine pestivirus. *Clinical and Diagnostic Virology* 10, 141–150.
- CABEZON O., ROSER V., MENTABERRE G., FERNANDEZ-SIRERA L, CASAS DIAZ E, OLVERA J.L, SERRANO E., ROSSEL R., RIQUELMA C., LAVIN S., SEGALES J. & MARCO I. (2011) Experimental infection with chamois border disease virus causes and long-lasting viraemia and disease in Pyrenean chamois (*Rupicapra Pyrenaica*). *Journal of General Virology* 92,2494-2501.

- CASAUBON J., HANS-RUDOLF VOGT., HANSPETER STALDER., CORINNE HUG AND MARIE- PIERRE RYSER-DEGIORGIS. (2012) \*Bovine viral diarrhea virus in free-ranging wild-ruminants in Switzerland: low prevalence of infection despite regular interactions with domestic livestock *Veterinary Research* 2012, 8:204.
- CITTERO C.V., 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 diarrhea virus with members of the flaviviridae. *JGen Virol.* 69 (Pt 10): 2637-43
- DONE J.T., TERLECKI S., RICHARDSON C., HARKNESS J.W., SANDS J.J., PATTERSON D.S.P., SWEASEY D., SHAW I.G., WINKLER C.E., DUFFELL S.J., (1980). Bovine virus diarrhea mucosal disease virus: Pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Veterinary Record* 106, 473–479.
- DUBOIS E., RUSSO P., PRIGENT M., THIERY R., (2008). Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. *Veterinary Microbiology* 130, 69–79.
- FERNA NDEZ-SIRERAL L. , CABEZON O., ALLEPUZ A, ROSELL R., RIQUELME C.,SERRANO E., LAVIN S., MARCO I. (2012).Two Different Epidemiological Scenarios of Border Disease in the Populations of Pyrenean chamois(*Rupicapra p. pyrenaica*) after the First Disease Outbreaks.

- FRAY M.D., SUPPLE E.A., MORRISON W.I., CHARLESTON B., (2000). Germinal centre localization of bovine viral diarrhoea virus in persistently infected animals. *Journal of General Virology* 81, 1669–1673.
- FROLICHK, JUNGS, LUDWING A., LIECKFELDT D., GIBERTP, GAUTHIER D., HARS J. (2005). Detection of a newly described pestivirus of Pyrenean chamois (*Rupicapra r Pyrenaica*) in France. *J. Wildl. Dis* 41,606-610.
- FRO" LICH K., JUNG S., LUDWING A., LIECKFELDT D., GAUTHIER P., HARS J. (2005). Detection of a Newly Described Pestivirus of Pyrenean Chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in France. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(3), 2005, pp. 606–610.
- GAFFURI A., GIACOMETTI M., TRANQUILLO VM, MAGNINO S., CORDIOLI P., LANFRANCHI P. (2006). Servouy of roe deer, chamois and domestic sheep in the central Italian Alps.
- GIAMMARIOLI M., SAVERINA A. L. R., STEINBACH F., CASCIARI C., DE MIA GM. (2011). Genetic and antigenic typing of Border Disease Virus (BDV) isolates from Italy reveal the exsistence of a novel BDV group. *Veterinary Microbiology* 2011 147 231-236
- GOETZ, (1996). La wilderness nelle Alpi. Atti del Convegno "Wilderness e turismo integrato: Opportunità o conflittualità?". Verbania Pallanza 19 ottobre 1996
- GROOMS D.L., (2004). Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice* 20, 5–19.
- HAFEZ SM., LIESS B., (1927b). Studies on bovine viral diarrhea-mucosal disease virus II. Stability and some physic-chemical properties. *Acta Virol.*, 16, 399-408.

- HEINZ FX, COLLETT MS, PURCELL RH, GOULD EA, HOWARD CR, HOUGHTON M, MOORMANN RJM, RICE CM, THIEL HJ. FAMILY FLAVIVIRIDAE. IN: VAN REGENMORTEL MHV, FAUQUET CM., BISHOP DHL, CARSTENS EB, ESTES MK, LEMON SM, MANILOFF J, MAYO MA, MCGEOCH DJ, PRINGLE CR, WICKNER RB (EDS).(2000)Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, New York, 2000, pp. 859- 878.
- HOUE H., LINDBERG A., MOENNIG V. (2006) Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in european. *J Vet Diagn Invest* 18: 427-436.
- HORNEBERG 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
- HOUE (1999) Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64, 89–107
- HOWARD C.J., (1990). Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. *Revue Scientifique et Technique* (International Office of Epizootics) 9, 95–103
- HURTADO A., ADURIZ G., GOMEZ N., OPORTO B., JUSTE RA ET AL (2004). Molecular identification of a new pestivirus associated with increased mortality in the Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in Spain. *J Wildl Dis* 40: 796-800
- LOKEN T, (2000) Border disease in goats. In: Tempesta, M (ed) Recent advances in Goats Disease, *International Veterinary information service*.
- LIEBLER-TENORIO E.M., GREISER-WILKEI, POHLENZ J.F., (1997). Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease. *Archives of virology* 142, 1613–1634.

- LIEBLER-TENORIO E.M., LANWEHR A., GREISER-WILKEI., LOEHRB.I., POHLENZ J., (2000). Comparative investigation of tissue alterations and distribution of bvd-viral antigen in cattle with early onset versus late onset mucosal disease. *Veterinary microbiology* 77, 163–174.
- LUZZAGO A., FRIGERIO M., ZECCONI AL (2004). BVD Control program in Lecco and Como provinces (Italy): Herd risk categories to modulate interventions. In: *Processing Second European Symposium on BVDV control*, Porto, Portugal pp100.
- LUZZAGO C., LAUZI S., EBRANATI E, GIAMMARIOLI M., MORENO A., CANNELLA V., MASOEROL., CANELLI E., GUERCIO A., CARUSO C., CICCOCCHI M., DE MIA GM., ACUTIS PL., ZEHENDER G., PELETTO S. (2014) Extended genetic diversity of bovine viral diarrhea virus and frequency of genotypes and subtypes in cattle in Italy between 1995 and 2013. *Biomed Res Int.* 2014:147145. doi: 10.1155/2014/147145.
- LUZZAGO C (b)., EBRANATI E., LANFRANCHI P., CABEZÓN O., LAVÍN S., ROSELL R.,ROSSI L., ZEHENDER G., MARCO I.(2014) Spatial and temporal phylogeny of Border disease virus in Pyrenean chamois Proceedings of Chamois International Congress, Parco Nazionale della Maiella, Lama dei Peligni 17-20 giugno 2014.
- MARCO I., ROSELL R., CABEZON O., MENTABERRE G., CASAS E., VELARDE R., LOPEZ-OLVERA J.R., HURTADO A., LAVIN S., (2008). Epidemiological study of border disease virus infection in Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) after an outbreak of disease in the Pyrenees (NE Spain). *Veterinay. Microbiology.* 127, 29–38.
- MARCO I., ROSSE R., CABEZON O., MENTABERRE G., CASAS E., VELAVERDE R., LAVIN S. (2009) Border Disease Virus among Chamois, Spain. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 15, No. 3, March 2009

- MARCO I., ROSSEL R., CABEZON O., MENTABERRE G., CASAS E., VELARDE R, LAVIN S. (2009). Border Disease virus among Chamois, Spain. *Emerging infectious Disease*, Vol.15, NO 3, March 2009. 15 (3): 448-51.
- MACLACHLAN NJ., DUBOVI EJ. (2011). *Fenner's Veterinary Virology*. IV Edition,
- MCGOWANM R., KIRKLANDP D., RICHARDS S.G., LITTLEJOHNS, I., (1993). Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *Veterinary Record* 133, 39–43.
- MARSHALL, D.J., MOXLEY, R.A., KELLING, C.L., (1996). Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Pathology* 33, 311–318.
- 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 Disease, Epidemiology and Risk Analysis Applied to Veterinary Sciences (UREAR), Faculty of Veterinary Medicine , University of Liege, Boulevard de Colonster, 20, B42, B-4000 Liege, Belgium. 147(3-4): 320-8*
- MARTIN C., PAUL-PIERRE P., BERNARD B., MARIE-FRANCE H. and CLAUDE S. (2011). Epidemiology of Pestivirus infection in wild ungulates of the French South Alps. *Veterinary Research* 2011, 42:70
- MARURER K., KREY T., MOENNING V., THIEL H.J., RUMENAPF T., (2004). CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Virology* 78, 1792–1799.
- MARTELLA V., PRATELLI A., BOLLO E., BUONAVOGLIA D., PERILLO A., GRECO G., GUARDA F., BUONAVOGLIA C. (2000). Rilievi virologici ed

istopatologici in agnelli e capretti con infezione da Pestivirus Large An.  
Rev.,2 , 73- 77.

- MEYLING A., HOUE H., JENSENA M., (1990). Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Revue Scientifique et Technique* (International Office of Epizootics) 9, 75–93.
- MOENNING V, PLAGEMANN GW. (1992) the pestiviruses. *Adv. Virus Res.*, 41: 53-91
- MUSTONI A., PEDROTTI L., ZANON E., TOSI G. (2002). Ungulati delle Alpi. 1° ed. 265-309 pp.
- MULLER-DOBLIES D., ARQUINT A., SCHALLER P., HEEGAARD P.M., HILBE M., ALBINI S., ABRIL C., TOBLERK., EHRENSPERGER F., PETERHANS E., et al., (2004). Innate immune responses of calves during transient infection with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11, 302–312.
- NETTLETON P.F., GILRAY J.A., RUSSO P., DLISSI E., (1998). Border disease of sheep and goats. *Veterinary research* 29, 327-340.
- 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.
- OLDE RIEKERINK RG., DOMINICI A ., BARKEMA H.W. , DE SMIT A.J. (2005). Seroprevalence of pestivirus in four species of alpine wild ungulates in the High Valley of Susa, Italy. *Veterinary Microbiology* 108 (2005)
- OGUZOGLU T.C., TAN M.T., TOPLU N., DEMIR A.B., BILGE-DAGALP S., KARAOLGU T., OZKUL A., ALKAN F., BURGU I., HAAS L., GREISER-WILKE I., 2009. Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: A new BDV subgroup *Veterinary Microbiology* 135, 374–379.
- PEDRERA M., GÓMEZ-VILLAMANDOS J.C., MOLINA V., RISALDE M.A., RODRIGUEZ-SANCHEZ B., SANCHEZ-CORDON P.J., 2011.

Quantification and determination of spread mechanisms of bovine viral diarrhoea virus in blood and tissues from colostrum-deprived calves during an experimental acute infection induced by a non-cytopathic genotype 1 strain. *Transboundary and Emerging Diseases* 59, 377–384. Pedrera, M., Gómez-

- PEDROTTI L., DUPRE' E, PREATONI D, TOSO S (2001). Banca dati Ungulati. Status, distribuzione, consistenza, gestione, prelievo venatoria, e potenzialità delle popolazioni di Ungulati in Italia. *Biologia e conservazione della Fauna*, 109: 1-132.
- PIOZ M., LOISON A., GIBERT P., DUBRAY D., MENAUNT P., Le TALLEC B., ARTOIS M., GILOT-FROMENT E. 2007. Transmission of a pestivirus infection in a population of Pyrenean chamois. *Vet. Microbiol.* 119, 19–30.
- PRES P, D HEIN (2010). BVD Eradication in Switzerland: a new approach. *Veterinary Microbiology* 142, 137-142.
- REGOLAMENTO PER LA CACCIA DI SELEZIONE AGLI UNGULATI. Provincia di Lecco
- RICHOMME C., GAUTHIER D., FROMONT E., (2006) Contact rates and exposure to inter-species disease transmission in mountain ungulates. *Epidemiol. Infect* 134 21 30.
- RIDAPTH J.F., Neill J.D., PETERHANS E., 2007. Impact of variation in acute virulence of BVDV1 strains on design of better vaccine efficacy challenge models. *Vaccine* 25, 8058–8066
- RIEKERINK R. G. M. O., DOMINICI A. BARKEMA H.W., AND DE SMIT A.J.. (2005). Seroprevalence of pestivirus in four species of alpine wild ungulate in the High Valley of Susa, Italy. *Veterinary Microbiology* 108: 297–303.

- ROMAN M, POGRANICHNI Y., ERAN R., LEON H T. STEVENSON G. W. (2008) Prevalence and characterization of bovine viral diarrhoea virus in the white-tailed deer population in Indiana. *J Vet Diagn Invest* 20:71–74 (2008)
- STÅHL K., ALENIUS S. BVDV (2012) control and eradication in Europe-an update .*Jpn J Vet Res.* 2012 Feb; 60 Suppl: S31-9. *Review.*
- SULLIVAN D.G., CHANG G.J., AKKINA R.K., (1997). Genetic characterization of ruminant pestiviruses: Sequence analysis of viral genotypes isolated from sheep. *Virus Research* 47, 19–29.
- THIELH, COLLET M.S., GOULD E.A., HEINZF. X., HOUGHTON M., MEYERS G., PURCELL R.H., RICE C.M. (2005). Family Flaviviridae. IN Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (EDS.), *Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy Viruses. Elsevier Academic Press, New York, pp. 981-998.*
- TORRIANI D, (2007). E lavorazioni GIS per l'analisi delle S.U.S Comprensorio Alpino VCO2-Ossola Nord.
- WEBER, E, (2004), El rebecco norteno y meridional, Omega Barcellona.
- WILHELMSSEN C.L., BOLIN S.R., RIDPATH J.F., CHEVILLE N.F., KLUGE J.P., 1990. Experimental primary postnatal bovine viral diarrhoea viral infections in sixmonth-old calves. *Veterinary Pathology* 27, 235–243
- VIGANO' (2009). Integrazione dei parametri parassitologici, metabolici e sierologici nella gestione degli ungulati selvatici. Tesi di dottorato di ricerca. Università degli studi di Milano Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria Divet. Vet/06.
- VILCEK S., DURKOVIC B., KOLESAROVA M., PATON D.J., (2005). Genetic diversity of BVDV: Consequences for classification and molecular epidemiology. *Preventive Veterinary Medicine* 72, 31–35.

- VILCEK S., NETTLETON P.F. (2006). Pestivirus in wild animals. *Vet Microbiol* 116(2006) 1-12.
- ZANICHELLI S., SCROLLAVEZZA P.(1993) L'impiego dei nuovi alfa2 – stimolanti nella contenzione degli ungulati selvatici presenti in Italia. Università degli studi di Parma. Istituto clinica e chirurgia veterinaria.
- ZANZI L. (2004). Le Alpi nella storia d'Europa. Edizione CDA Vivalda, Torino

## RINGRAZIAMENTI

Ringrazio:

- Il Comprensorio Alpino di Caccia Verbano-Cusio-Ossola 2 - Ossola Nord (VCO2), il Comprensorio Alpino di Caccia Vercelli 1 - Valle del Sesia (VC1), il Comprensorio Alpino di Caccia Alpi e Prealpi Lecchesi (LC) che hanno permesso e collaborato ai prelievi durante le stagioni venatorie per i progetti di ricerca sugli ungulati selvatici.
- Il Professor Luca Rossi dell'Università degli Studi di Torino per aver fornito materiale biologico e fotografico riguardante gli stambecchi delle Valli di Lanzo.
- La Dottoressa Camilla Luzzago che pazientemente mi ha assistito durante questo percorso e nella realizzazione della tesi finale.
- La Dottoressa Martina Besozzi che mi ha insegnato moltissimo con passione e pazienza affiancandomi in ogni momento durante questi anni e facendomi conoscere questo nuovo mondo.
- Un Ringraziamento speciale va ai miei Genitori che da sempre sono una guida nella mia vita, aiutandomi, affiancandomi, spronandomi ed incoraggiandomi in ogni momento, ma che soprattutto, come da buoni alpinisti, mi hanno fatto capire l'importanza del sapersi rialzare dopo ogni caduta.

- È doveroso ringraziare i miei amici universitari e non, con i quali ho condiviso fatiche, paure, sconforti ma anche momenti di gioia, felicità e soddisfazione. Vi ringrazio perché siamo sempre stati un gruppo e ogni esame, ogni momento è stato affrontato insieme rendendo la vita universitaria molto più bella e leggera da affrontare. Tutti i momenti trascorsi insieme li ricorderò con gioia.
- Un ringraziamento speciale va alla mia Amica Francesca che da compagna di studi è diventata un'amica importante che ha saputo conoscermi come pochi. Durante questi anni abbiamo trascorso insieme moltissimi momenti dallo studio, ai momenti di gioia e a quelli difficili, nonché le moltissime risate e gli altrettanti consigli. Un grazie speciale perché mi sei sempre stata vicina e pronta ad aiutarmi quando ne ho avuto bisogno e so che ci sarai anche in futuro. Questa laurea è un traguardo importante che abbiamo raggiunto insieme.
- Ed infine il Grazie finale è per Te, che sei entrato nella mia vita diventando una parte essenziale di essa. Un Grazie perché con il tuo affetto mi hai sempre sostenuto, affiancato, incoraggiato e spronato. Grazie perché ti sento accanto in ogni momento e sei diventato un punto di riferimento importante ed un compagno di viaggio con il quale ho condiviso i momenti migliori e sono certa che ne vivremo altrettanti in futuro.