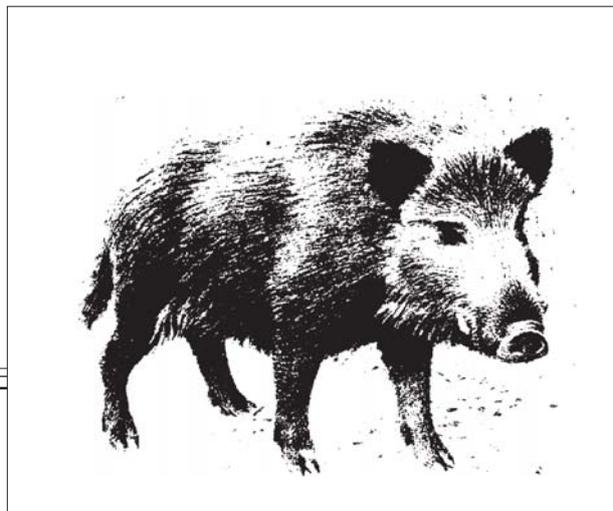


## IGIENE AMBIENTALE



# MONITORAGGIO DI *Francisella tularensis* NELLA PROVINCIA DELLA SPEZIA: IL CIN- GHIALE QUALE ANIMALE SENTINELLA

Carlo Ercolini<sup>1</sup>, Stefano Fisichella<sup>2</sup>, Laura Serracca<sup>3</sup>, Elena Teneggi<sup>4</sup>, Alessandra Terarollo<sup>3</sup>

### Introduzione

La tularemia nell'uomo è una malattia essenzialmente sporadica, che colpisce per lo più le popolazioni rurali e coloro che esercitano attività venatoria.

Tuttavia a volte si manifesta con focolai epidemici, il che accade quando l'infezione insorge in seguito all'ingestione di acqua contaminata da carcasse animali o da roditori selvatici eliminatori di *Francisella tularensis* (FARINA e SCATOZZA, 1995).

In USA il 90% dei casi d'infezione umana sono dovuti a trasmissione da parte di lagomorfi; in Europa e in Asia è più spesso in relazione ad ingestione di acqua contaminata (MORSETTI e MOLÈ, 1992).

In Italia le prime segnalazioni dell'infezione in animali risalgono al 1931 (BARDELLI e RAVAGLIA, 1931)

mentre solo nel 1966 sono segnalati i primi casi umani diagnosticati sierologicamente (BIANCHI, 1966).

In natura l'infezione da *Francisella tularensis* si verifica in un gran numero di animali selvatici: precisamente in 100 specie di animali selvatici, 9 di domestici, 25 di uccelli, 70 di artropodi ed in alcune specie di pesci e anfibi (DEDEK *et al.*, 1991; OLSEN 1974; MÖRNER 1992; MORSETTI e MOLÈ, 1992).

L'elevatissimo numero di ospiti vertebrati ed invertebrati riconosciuti serbatoi e diffusori dell'agente casuale costituisce un costante pericolo potenziale per l'uomo.

L'importanza dei mammiferi domestici, dei grossi mammiferi selvatici e dei volatili è da considerare modesta nella trasmissione del contagio, nonostante sia stata riconosciuta la responsabilità di alcuni di questi animali in casi di tularemia nell'uomo.

Per i vertebrati dell'Europa è stata proposta una suddivisione in tre gruppi (Tab. 1) in relazione alla recettività e sensibilità all'infezione da *Francisella*

1 Dirigente della sezione

2 Medico veterinario collaboratore

3 Tecnici di laboratorio

4 Medico Veterinario Volontario

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (Dir. Prof. G. Cantini Cortellezzi) - Sezione della Spezia.

**Tab. 1** - Suddivisione dei vertebrati secondo la recettività e sensibilità all'infezione da *Francisella tularensis holarctica*

<b>GRUPPO I</b> animali molto recettivi e molto sensibili	<b>GRUPPO II</b> animali recettivi ma poco sensibili	<b>GRUPPO III</b> animali poco recettivi e praticamente insensibili
Lepre, Arvicola, Topo, Coniglio selvatico*	Coniglio domestico, Coniglio selvatico*, Castoro, Riccio, Toporagno, Pecora	Bovino, Cavallo, Gatto, Cane, Volpe, Tasso, Donnola, Puzzola, Rana verde maggiore

\* Il coniglio selvatico viene classificato tra le specie del gruppo I se infettato con la sottospecie *neoartica* e tra le specie del gruppo II se infettato con la sottospecie *holarctica*.

*tularensis holarctica* (OLSUFJEV e DUNAYEVA, 1960).

Le specie incluse nei gruppi II e III sviluppando una positività sierologica assumono un ruolo di animali "indicatori" che permettono di conoscere l'evolversi dell'infezione in natura.

*Francisella tularensis* è un corto bacillo con dimensioni di 0,2 x 0,2-0,7 millimicron, immobile, aerobio, non sporigeno e capsulato, gram negativo, che si colora tenuamente con rilievo bipolare (FARINA e SCATOZZA, 1995; KONEMAN, 1995).

La capsula costituita da proteine, lipidi e carboidrati, è la responsabile della virulenza del germe (DAVIS *et al.*, 1993).

*Francisella tularensis* in natura resta vitale per mesi in condizioni di basse temperature (optimum di crescita in acqua a 4°- 6°C) e nel contesto di substrati adatti, come fango e carcasse animali in decomposizione (TASSELLI *et al.*, 1988).

Le capacità infettanti vengono mantenute dal germe per 7 giorni nelle carcasse e per 40 giorni sulla pelle e sul pelo di animali (BIFFI GENTILI *et al.*, 1985, TASSELLI *et al.*, 1982).

Nel 1988 un focolaio di tularemia umana di origine idrica interessò alcune frazioni del comune di Beverino in Val di Vara (La Spezia).

Allo scopo di verificare la diffusione dell'infezione in tutta la Val di Vara, nel periodo 1988-1990 furono controllati 1068 sieri umani e 1451 sieri animali, con percentuali di positività rispettivamente del 6,0% e del 7,7%. Dai dati della ricerca emerse una larga diffusione dell'infezione tularemica nella zona considerata e una notevole correlazione nella distribuzione territoriale delle positività sierologiche umane ed animali (ERCOLINI *et al.*, 1991).

Apparve chiara la necessità di effettuare un moni-

toraggio siero-epidemiologico nella zona.

I sieri degli animali domestici (ovini, caprini, bovini, equini), facilmente reperibili in seguito al piano di profilassi nazionale, mostravano elevata positività sierologica; tuttavia si trattava di animali non autoctoni, soggetti a frequenti spostamenti per pascolo o per commercio, quindi non idonei a svolgere la funzione di animali indicatori.

Per i cinghiali, animali stanziali, non si presentavano le problematiche sopracitate, ma risultava difficile reperire i campioni di siero da esaminare.

L'occasione per svolgere una approfondita analisi siero-epidemiologica è stata colta con il verificarsi di un focolaio di peste suina classica, riscontrato nella vicina provincia di Massa Carrara.

A seguito di tale episodio, l'Amministrazione Provinciale della Spezia, in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale, organizzò un controllo sierologico su cinghiali abbattuti durante la stagione venatoria 1992-1993.

I campioni di siero prelevati furono saggiati anche nei confronti di *Francisella tularensis* permettendo pertanto di valutare se, almeno nella realtà territoriale della Spezia, il cinghiale potesse essere considerato un animale "sentinella" per monitorare l'edemicità della tularemia

### Materiali, metodi e risultati

Sono stati esaminati complessivamente 353 emosieri di cinghiale prelevati nel periodo compreso tra novembre 1992 e gennaio 1993.

I sieri sono stati saggiati per la presenza di anticorpi anti *Francisella tularensis* utilizzando la metodica di agglutinazione lenta in micrometodo (MASSEY e MANGIAFICO, 1974) modificata secondo MAGNINO *et al.*, 1990.

I test di microagglutinazione sono più sensibili di quelli di agglutinazione in provetta in quanto evidenziano anticorpi della IgM nove giorni prima (SATO *et al.*, 1990). Vengono utilizzati come antigeni batteri trattati con fenolo e colorati con cristalvioletto.

Per questo esame sono stati impiegati prodotti in commercio e precisamente: Bacto-*Francisella tularensis* Antigen Slide e, come controllo positivo, Bacto-*Francisella* Antiserum.

Al fine di escludere eventuali reazioni crociate con anticorpi anti *Brucella* e *Rickettsia* i sieri positivi sono stati saggiati tramite test di agglutinazione lenta in micrometodo utilizzando antigeni di *Brucella abortus* e *Proteus* OX19.

Il test prevede diluizioni seriali in base 2 del siero con soluzione fisiologica (1/20-1/160).

Sono stati considerati positivi per *Francisella tularensis* tutti i campioni con titolo superiore a 1:20 e privi di cross-reattività (MAGNINO *et al.*, 1990).

42 dei 353 campioni esaminati, pari al 12%, sono risultati positivi al test sierologico: 19 con positività modesta (titolo 1:40), 21 con positività netta (titolo 1:80) e 2 con positività elevata (titolo 1:160).

### Discussione

I criteri da noi valutati per definire un corretto indicatore sono i seguenti:

#### Rappresentatività:

- correlabilità con il fenomeno studiato
- presenza diffusa sul territorio da esaminare
- scarsa mobilità nell'ambito dell'area d'indagine
- ciclo vitale lungo

#### Accessibilità:

- deve essere facilmente campionabile.

Il cinghiale è correlabile al fenomeno studiato poichè è sensibile all'infezione: ciò è dimostrato dalle positività riscontrate nei sieri animali.

Non sviluppa malattia con la sottospecie di *Francisella tularensis* presente in Europa (*holarctica*) (MICOZZI 1989) e non rientra dunque tra gli animali recettivi che di solito muoiono prima che si formino anticorpi specifici (FARINA e SCATOZZA, 1995); può quindi essere incluso nel gruppo II di Olsufjev.

È un animale a ciclo vitale lungo, necessita nel suo habitat di un'ampia disponibilità di acqua ed è quindi presente per lunghi periodi nelle aree più a rischio.

È l'unica specie autoctona non soggetta a vere

migrazioni: potenzialmente il cinghiale può percorrere tragitti di 40 - 50 km, ma di norma una femmina permane nell'ambito massimo di 1500 - 2000 ettari e un maschio non supera i 12000 - 15000 ettari (MARSAN *et al.*, 1990); inoltre è vietato immettere nel territorio ligure cinghiali di qualsiasi razza e provenienza sia ai fini del ripopolamento che per ogni altro fine (L.R. 25/08/1989 n. 38, art. 2, par. 1).

Il reperimento annuale dei campioni potrebbe essere attuabile facilmente grazie alla disciplina imposta dalla Regione Liguria (L.R. 25/08/1989 n. 38) sulla caccia del cinghiale. In base a questa legge i cacciatori sono tenuti, avvenuto l'abbattimento, a consegnare campioni di muscolo per l'esame trichinoscopico. Risulterebbe facile la raccolta dei campioni di sangue da esaminare affidandosi alla disponibilità dei cacciatori stessi.

A tutto ciò consegue che, nella nostra realtà, il cinghiale è l'animale che meglio risponde alle caratteristiche di indicatore della tularemia: senza spese aggiuntive, sempre nello stesso periodo dell'anno, in numero costante, di provenienza conosciuta sarebbero disponibili sieri il cui esame ci permetterebbe di valutare la prevalenza e di monitorare questa zoonosi che rappresenta un serio problema igienico-sanitario.

A nostro giudizio questo sistema di monitoraggio della tularemia può essere esteso ai territori con configurazione orografica analoga a quella della provincia della Spezia ed in particolare alla Regione Liguria, in cui la legislazione presente permette un facile reperimento dei materiali, valutando la possibilità di estensione del sistema su un'ampia parte del territorio nazionale in tempi successivi (fascia appenninica).

### BIBLIOGRAFIA

- BARDELLI P., RAVAGLIA F. - 1931. Infezione nelle lepri di una riserva di caccia riferibili a tularemia. *Annali Ig.*, **41**: 776.
- BIANCHI L. - 1966. Su alcuni casi di Tularemia in Lombardia. *G. Mal Infet. Parassit.*, **18**: 443-448.

- BIFFI GENTILI S., LEONCINI F., LANCILOTTI E., COMODO M. - 1985. L'azione del cloro e della temperatura sulla sopravvivenza di *Francisella tularensis*. *Igiene moderna*, **83**: 729-736.
- DAVIS B.D., DULBECCO R., EISEN H.N., GINSBERG H.S. - 1993. Trattato di microbiologia. IV Edizione, *Zanichelli*: 623-625.
- DEDEK J., LOEPELMAN H., KOKLES R. - 1991. Result of serological survey for selected infection among field hare (*Lepus europaeus*) in the German Democratic Republic. *Veterinary Bulletin*, **61**: 65.
- ERCOLINI C., PASINI G., FISICHELLA S., MIGNANI E. - 1991. Rilievi siero-epidemiologici sulla diffusione dell'infezione tularémica in provincia di La Spezia. *Il progresso veterinario*, **10**: 358-161.
- FARINA R. e SCATOZZA F. - 1995. Trattato di malattie infettive degli animali. *UTET*: 191-194.
- KONEMAN E.W. - 1995. Testo Atlante di Microbiologia Diagnostica. II Edizione, *Antonio Delfino Editore*: 276-177.
- MAGNINO S., FABBI N., LUINI N., CERVIO G., GUALLINI L., RADAELLI G.L. - 1990. Indagine epidemiologica sulla diffusione della Tularemia nel comprensorio dell'Oltrepò Pavese. *Arch. Vet. Ital.*, **41**: 1-22.
- MARSAN A., SCHENONE L., SPANÒ S. - 1990. Il cinghiale in Liguria. *Regione Liguria servizio produzioni agricole e valorizzazione dell'agricoltura*.
- MASSEY E.D., MANGIAFICO J.A. - 1974. Microagglutination test for detecting and measuring serum agglutinins of *Francisella tularensis*. *Appl. Microbiol.*, **27**: 25-27.
- MICOZZI G. - 1989. *Microbiologia medica*, **4**: 91-92.
- MÖRNER T. - 1992. The ecology of Tularaemia. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **11**: 1123-1130.
- MORSETTI G. and MOLÈ S. - 1992. Note sul ruolo degli animali selvatici nell'epidemiologia delle zoonosi. Rapporti di sanità pubblica veterinaria. *WHO/FAO Collaborating Centre for reseach and training in veterinary public health ISS Roma*.
- OLSEN - 1974. Diseases of Wild animals trasmitted to man. 6th ed. *Thomas*, Springfield Illinois.
- OLSUFJEV N.G. and DUNAYEVA - 1960. [citato da Hopla C.E., *Advance. Vet. Sci.* (1974) **18**: 25-53].
- SATO T., FUJITA H., OHARA Y. *et al.* - 1990. Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of Tularemia. *J. Clin. Microbiol.*, **28**: 2372-2374.
- TASSELLI E., MICOZZI G., PALARCHI M., ORLANDI F., LEONCINI F., BIFFI GENTILI S., DI PIETRO M., MONTAINI C. - 1988. La tularémica in Toscana dal 1982 al 1987. *Obiet. Doc. Vet.*, **9**: 23-28.
- TASSELLI E., MICOZZI G., PALARCHI M. - 1982. *Il nuovo progresso veterinario*, **17**: 870-876.