



**CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE PER LO STUDIO DELLE
MALATTIE DA PESTIVIRUS E DA ASFIVIRUS**

Via Salvemini, 1 06126 Perugia (Italy), Tel. 075 343 238/239 Fax 075 343238

**PROGETTO DI RICERCA EUROPEO FP7 (KBBE-2008-1-3-03) "Improve
tool and strategies for the prevention and control of Classical swine fever"**

RELAZIONE TECNICA AI SENSI ART. 13 D. LGS. 224/2003

**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE**

INTRODUZIONE

La Peste Suina Classica (PSC) colpisce suini domestici e selvatici ed è sostenuta da un pestivirus. Le caratteristiche di morbilità e mortalità ne fanno una delle infezioni transfrontaliere da tenere sotto costante controllo.

L'Italia ha sospeso la vaccinazione nel 1991 ed in base alla normativa europea ha applicato una strategia fondata sulla sorveglianza primaria e lo *stamping out* degli eventuali focolai di infezione. L'ultimo focolaio denunciato in Italia è occorso nel 2003 in Sardegna, ma negli anni novanta diverse sono state le emergenze causate dal virus della PSC. Ricordiamo in particolare l'epidemia del 1997 che partì dall'Olanda e coinvolse diversi stati europei toccando anche il nostro paese con due focolai tra loro collegati. Inoltre è opportuno ricordare che l'infezione ha colpito anche alcune popolazioni di cinghiali (figura 1).



Figura 1 - epidemie di PSC registrate in Italia nel cinghiale

L'esperienza insegna che il riscontro dell'infezione nei suini domestici causa enormi perdite economiche dovute appunto alla politica dello *stamping out* che, in ambito europeo, è stata talvolta applicata non solo ai suini riconosciuti infetti, ma anche a quelli sospetti di infezione (Pluimers et al 1999). Questi interventi, pur se criticati per gli alti costi ed ancor più per motivi etici, si sono rivelati efficaci ed adeguati ad estinguere i focolai di infezione in un tempo limitato e comunque utile per evitare l'endemizzazione dell'infezione.

Capitolò a parte meritano le diverse strategie che sono state sperimentate nelle popolazioni di suini selvatici. Il sistema del depopolamento è stato applicato in alcune occasioni non solo in Italia, ma anche nel resto d'Europa (Moennig 2000, Laddomada 2000). Si è però dovuto constatare che questa misura non è stata pienamente efficace e addirittura diversi studi dimostrano che la caccia in zone infette può favorire l'endemizzazione dell'infezione. In alcuni particolari contesti è stata applicata la strategia che, in termini anglosassoni, viene definita del "*sit and wait*". In effetti l'esperienza dimostra che in popolazioni di cinghiali residenti in ambienti naturalmente delimitati da barriere naturali che impediscano il contatto con altri gruppi recettivi, l'infezione da virus PSC tende ad auto estinguersi. Diverse sono comunque le variabili legate all'ospite, al virus e all'ambiente che possono condizionare e prolungare il tempo di estinzione dell'infezione la quale rappresenta un rischio non accettabile per le popolazioni di suini domestici vicini.

La legislazione europea prevede la possibilità di ricorrere alla vaccinazione in caso di emergenza, ma in realtà questa opzione non è mai stata applicata. Storicamente nei confronti della PSC è stato usato un vaccino vivo modificato capace di indurre una solida immunità protettiva. I soggetti vaccinati, da un punto di vista sierologico, sono però indistinguibili da animali venuti a contatto con il virus selvaggio e questo aspetto rappresenta il limite più rilevante del vaccino tradizionale.

Questo presidio immunizzante, distribuito in forma orale, è stato utilizzato per controllare l'infezione in alcune popolazioni di suini selvatici della Germania (Kaden 2000). Recentemente, sono stati sviluppati vaccini derivanti dall'ingegneria genetica che consentono di differenziare soggetti vaccinati da quelli infetti. Dopo diversi studi effettuati su suini domestici, si è pensato di trasferire questa tecnologia alle popolazioni di suini selvatici. Il presente lavoro descrive la sperimentazione di un vaccino basato sulla tecnologia DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) su due distinte popolazioni di cinghiali.

MATERIALI E METODI

Caratteristiche del vaccino sperimentale

Nell'ambito di un progetto di ricerca finanziato dal settimo programma quadro dell'Unione Europea, è stato allestito un vaccino presso il Friedrich-Loeffler-Institute, Greifswald-Insel Riems (Germany) (Leifer 2009). Si tratta di un vaccino marker costituito da un virus chimera (CP7_E2alf), in cui la proteina immunodominante E2 di uno stivite modificato del virus della Diarrea Virale del Bovino (BVDV CP7), è stata sostituita con la corrispondente proteina E2 del virus PSC Alfort 187 (Reimann et al., 2004; Koenig et al., 2007).

Somministrato vivo, il vaccino è in grado di conferire una solida immunità nei confronti del virus PSC e, nello stesso tempo, di evocare una risposta anticorpale differenziabile rispetto a quella indotta dal virus selvaggio. Quest'ultima può essere dimostrata attraverso una *ELISA marker* in grado di evidenziare anticorpi indotti dalla proteina Erns del virus PSC, che il virus BVD chimero non possiede ed è quindi esclusiva del virus PSC *wild type*. Il soggetto vaccinato si presenta quindi positivo ai tradizionali test sierologici per la diagnosi di PSC, mentre risulta negativo all' *ELISA marker*; al contrario un suino infettato dal virus della PSC sarà positivo ad entrambi i test. Da tempo sono presenti sul mercato kit *ELISA* commerciali rispondenti a tale caratteristica (sensibilità 93- 98%, specificità 99%; Schroeder et al 2009).

Come già sperimentato in Germania (Kaden et al. 2000), il vaccino è stato somministrato vivo, sottoforma di apposite esche costituite all'esterno da uno spesso strato lipidico miscelato con farina di mais, mentre all'interno un blister in plastica ed alluminio contiene il mestruo vaccinale allo stato liquido (figura 2).

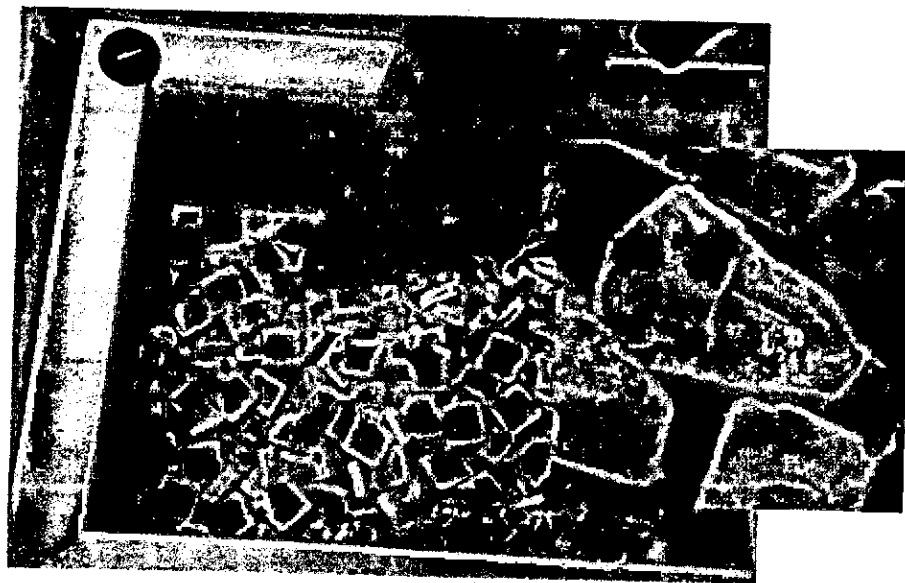


Figura 2 - esche vaccinali pronte per essere distribuite

Caratteristiche dei siti di sperimentazione

Il trial è stato effettuato in Umbria dove sono state scelte due aziende faunistiche venatorie (AFV), situate la prima, nel comune di Città di Castello (AFV "Roschetti") e l'altra nel comune di Spoleto (AFV "Paradiso di Pianciano"). Per la scelta dei siti di sperimentazione sono stati presi in considerazione diversi elementi al fine di soddisfare ogni esigenza in termini di efficacia, sicurezza e tracciabilità della vaccinazione. Sulla base delle informazioni raccolte, le due aree sono apparse ottimali per le caratteristiche ambientali e per presenza e consistenza di popolazione di cinghiali. In entrambe le AFV la popolazione selvatica viene sorvegliata con particolare cura anche attraverso punti di foraggiamento che sono utilizzati per fidelizzare i branchi di cinghiali specialmente durante l'estate quando il cibo scarseggia. I due siti di sperimentazione sono inoltre ben delimitati da confini netti e controllabili. Le popolazioni di cinghiali risiedono quindi all'interno di un'area circoscritta dove, durante la stagione venatoria, avvengono gli abbattimenti. I punti di foraggiamento sono stati utilizzati per la posa delle esche, anche per evitare che queste fossero assunte da specie diverse dai cinghiali. Infine, pur trattandosi di aree private, la caccia è comunque sottoposta a stretta regolamentazione da parte del servizio Faunistico della Provincia, il quale in deroga alla normativa regionale/nazionale, può concedere il permesso di effettuare un maggior numero di battute di caccia rispetto alle zone pubbliche.

Caratteristiche della campagna vaccinale

La sperimentazione di campo ha previsto diverse fasi. In collaborazione con il servizio faunistico della Provincia di Perugia, nella tarda estate 2011 è stato effettuato un video monitoraggio dei punti di foraggiamento. Posizionando alcune fotocamere ad infrarossi (figura 3), è stato possibile censire le specie animali che abitualmente si recano presso i punti di foraggiamento e stimare la consistenza dei singoli branchi di cinghiali. Le foto trappole hanno mostrato una netta prevalenza di cinghiali e una piccola percentuale di altri potenziali competitori, quali tassi, istrici, lepri, caprioli, ghiandaie e altri passeriformi.



Figura 3 - fotocamera a raggi infrarossi utilizzata per filmare le aree selezionate

In seguito è stata effettuata la campagna vaccinale *sensu strictu*. Le esche vaccinali, scongelate qualche ora prima della posa, sono state distribuite manualmente nei punti di foraggiamento; in relazione alla densità stimata della popolazione di cinghiali, sono stati scelti 11 punti di foraggiamento presso i quali sono state distribuite 35/40 esche/punto, per un totale di 425 esche rilasciate sul territorio. Una quantità di mais pari a circa la metà della razione abituale, è stata comunque distribuita. Per evitare che il vaccino fosse inattivato dal caldo o diminuisse di titolo, le

esche sono state distribuite poco prima del tramonto, ora in cui normalmente i cinghiali tendono ad alimentarsi.

Per verificare l'efficacia del trattamento vaccinale, sono stati campionati i soggetti abbattuti durante la successiva stagione venatoria, iniziata a distanza di un mese dal rilascio delle esche. Tale periodo è stato considerato sufficiente a consentire nei soggetti vaccinati l'instaurarsi di un'efficace risposta immunitaria.

Esami di laboratorio

Dai soggetti abbattuti sono stati raccolti campioni di siero e organi per gli esami di laboratorio; inoltre per ogni animale sono state registrate informazioni circa il sesso, la stima dell'età e il peso.

I test sierologici sono stati eseguiti attraverso la metodica ELISA, mediante l'uso di un kit commerciale (HerdCheck CSFV Antibody" IDEXX Laboratories) in accordo con le indicazioni del produttore; in un secondo momento, gli stessi campioni sono stati sottoposti a prove di Sieroneutralizzazione (SN) per PSC, secondo le indicazioni contenute nella decisione della Commissione Europea 2002/106/CE del 1 febbraio 2002 recante approvazione di un manuale di diagnostica che stabilisce procedure diagnostiche, metodi per il prelievo di campioni e criteri per la valutazione degli esami di laboratorio ai fini della conferma della peste suina classica.

Per quanto riguarda gli organi, in particolare, le tonsille sono state omogeneizzate e sottoposte ad estrazione di RNA, mediante il kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN) secondo le indicazioni del produttore. Sui campioni di RNA sono state eseguite due analisi di PCR, una che amplifica un tratto del genoma comune a tutti i Pestivirus (5'NTR) e l'altra che amplifica esclusivamente il gene codificante la proteina E2 del virus PSC (Vilček et al 1994; Lowings et al 1996).

RISULTATI

Le immagini registrate dalle fototrappole hanno rilevato che i cinghiali, pur se inizialmente diffidenti, hanno assunto le esche dopo aver consumato il mais disponibile; inoltre solo una parte trascurabile delle esche è stata assunta da competitori non target (istrici). In ogni sito di foraggiamento, le esche non consumate sono state recuperate il giorno successivo al rilascio e quindi contate (tabella1).

		esche			
AFV		rilasciate	recuperate	consumate	% consumate
Rossetti	Escatura 1	40	5	35	87,5
	Escatura 2	40	3	37	92,5
	Escatura 3	40	3	37	92,5
	Escatura 4	40	4	36	90
	Escatura 5	40	4	36	90
	Escatura 6	40	2	38	95
Paradiso	Escatura 1	35	16	19	54,3
	Escatura 2	35	27	8	22,8
	Escatura 3	40	7	33	82,5
	Escatura 4	40	16	24	60
	Escatura 5	35	15	20	57,13
Totale		425	102	323	76

Tabella 1 - esche distribuite e consumate nel corso dell'esperimento

La stagione venatoria è iniziata, in entrambe le aziende, ad ottobre 2011 ed è terminata a dicembre 2011. In tutto sono state effettuate 9 battute di caccia, 7 nell'AFV "Roschetti" e 2 nell'AFV "Paradiso di Pianciano", per un totale di 168 animali abbattuti. Da 157 di questi soggetti è stato possibile prelevare campioni di siero per verificare l'efficacia della vaccinazione. Il test ELISA ha rilevato la presenza di 14 cinghiali positivi e di 144 cinghiali negativi. Il test SN ha rilevato la presenza di 99 cinghiali negativi e di 58 cinghiali positivi con titoli anticorpali piuttosto variabili (tabelle 2 e 3).

Cinghiali esaminati	157	%
Positivi SN	58	37
Positivi ELISA	14	9

Tabella 2 - campioni sierologicamente esaminati e risultati delle prove di laboratorio

Titolo SN	numero campioni	ELISA		
		positivo	negativo	dubbio
1/5	16	1	14	1
1/10	16	0	16	0
1/15	3	0	2	1
1/20	2	0	2	0
1/40	11	5	6	0
1/80	2	1	1	0
1/160	2	2	0	0
1/320	2	2	0	0
1/640	3	3	0	0

Tabella 3 - dettaglio dei risultati espressi dalle prove sierologiche sui campioni risultati positivi al test SN

Successivamente, sui campioni sierologicamente positivi sono state condotte indagini di biologia molecolare per la ricerca del virus a partire dalle tonsille. Tutti i campioni testati sono risultati negativi, confermando così i dati ottenuti dalle indagini sperimentali riguardo la mancata capacità del virus vaccinale di replicare a lungo nel tempo negli animali vaccinati (Leifer et al., 2009). Infine, sulle esche recuperate dai siti di foraggiamento è stato effettuato il test di isolamento virale; i risultati confermano che, dal momento della produzione a quello dell'ingestione, non è avvenuta alcuna perdita di titolo virale a carico del vaccino.

CONCLUSIONI

Diversi sono gli spunti di riflessione che si possono trarre dall'esperienza sopra condotta. È importante sottolineare in prima battuta che la percentuale di animali risultati positivi e quindi immunizzati nei confronti del virus PSC è soddisfacente. Recenti studi condotti con modelli matematici basati sulle esperienze tedesche (Stefan von Rueden et al. 2008), stimano che la copertura vaccinale in una popolazione selvatica può oscillare tra il 20 e il 65%: la prevalenza di cinghiali sieropositivi (37%) osservata nel nostro studio è quindi in linea con altre osservazioni. Acquisito questo importante dato, è opportuno considerare alcuni altri aspetti legati alle peculiarità del protocollo sperimentale. I branchi di cinghiali a cui è stato somministrato il vaccino sono costituiti da animali in qualche modo antropizzati perché abituati alla somministrazione di cibo da parte degli addetti operanti nelle aziende faunistiche. Questa regolare e frequente abitudine ha senz'altro facilitato la somministrazione delle esche vaccinali, perché i cinghiali le hanno trovate

nelle loro usuali poste di alimentazione. Probabilmente la dispersione delle esche condotta in forma casuale nell'ambiente e al di fuori di siti di alimentazione consolidati, condizionerebbe in senso negativo il livello di immunità inducibile.

Prima di effettuare la sperimentazione si nutrivano timori circa l'appetibilità delle esche. In pratica si temeva che gli animali selvatici potessero diffidare di questo "nuovo" alimento così diverso per forma e dimensione dai chicchi di mais che normalmente costituiscono la razione distribuita nelle aziende faunistiche. La scelta di miscelare una quantità ridotta di mais insieme alle esche si è rivelata efficace come testimoniato dalle immagini registrate dalle foto trappole in cui si può osservare che i cinghiali tendono prima a consumare il mais schivando addirittura le esche che vengono però assunte in seguito. Ciò è anche dimostrato dal fatto che le esche non consumate rinvenute il giorno successivo la distribuzione, sono state una percentuale piuttosto bassa rispetto a quelle rilasciate.

Il virus vaccinale si è mantenuto attivo nell'ambiente per tutto il periodo di esposizione nonostante temperature stagionali abbastanza elevate (20-25°C). Questo dato è confermato dagli esami di laboratorio: è stato infatti possibile evidenziare il potere infettante del virus su colture cellulari ad un titolo non diverso da quello registrato prima della dispersione delle esche nell'ambiente. Ciò significa che gli animali hanno potuto assumere il vaccino vivo e vitale e quindi efficace.

I dati di laboratorio condotti sui cinghiali esaminati dimostrano che il test di SN virale è decisamente più sensibile del test ELISA nel verificare la presenza di anticorpi indotti dal vaccino. Questo dato era in parte atteso perché non a caso la SN è considerato il test *gold standard*, ma sorprende che anche soggetti con titoli piuttosto significativi in SN siano risultati negativi al test ELISA.

Dall'esperienza condotta non siamo in grado di determinare se tutti i soggetti che hanno ingerito l'esca vaccinale abbiano poi effettivamente sviluppato una protezione immunitaria. Infatti non è stato possibile inserire nel protocollo vaccinale un marcatore biologico che potesse fornire indicazioni in questo senso. È comunque possibile ipotizzare che una seconda somministrazione, il giorno successivo o anche a maggiore distanza di tempo, possa favorevolmente condizionare il numero di soggetti immunizzati.

In conclusione, il vaccino sperimentale si è dimostrato adatto ad indurre una solida immunità nelle popolazioni di cinghiali oggetto dello studio e il protocollo vaccinale si è rivelato efficace. In prospettiva si può quindi ragionevolmente pensare che questo strumento possa costituire un presidio strategicamente applicabile nel controllo della PSC nei selvatici.

VERIFICA SPERIMENTALE SUI POSSIBILI RISCHI ED IMPATTI PER LA SALUTE UMANA E PER L'AMBIENTE

Nel dossier presentato per la notifica relativa all'emissione di organismi geneticamente modificati ai sensi del decreto legislativo 8/07/2003 n 224 (notifica n.B/IT/10/01) era stata condotta un'analisi del rischio e di conseguenza era stata effettuata una valutazione di impatto ambientale. Da questa analisi non erano emersi rischi di per la salute umana ed animale a altro tipo di impatto ambientale negativo.

L'esperienza condotta ha confermato questa valutazione ed in particolare si specifica che:

1. Non sono emersi motivi per ritenere che il virus vaccinale possa replicare nella specie umana. Si continua quindi a ritenere che il vaccino CP7_E2alf non rappresenti alcun rischio per la salute umana.
2. Grazie alle immagini registrate dalle foto trappole è stato possibile documentare che solo una specie non target (Istrice) è venuta a contatto con le esche vaccinali. Si tratta di due soggetti che, per un breve periodo non superiore a 6 minuti, si è alimentata soprattutto del mais sparso nel sito di escatura. Non è possibile stabilire con certezza quante esche abbiano in qualche modo assunto le istrice, ma ragionevolmente molto poche perché in quel sito

- (Escatura 2 az. Paradiso) le esche risultate consumate sono state solo 8: con ogni probabilità la maggior parte di queste esche è stata consumata dai cinghiali che sono sopravvenuti subito dopo l'arrivo delle istrice. Si ricorda che non si hanno motivi di ritenere che l'istrice sia recettivo al virus vaccinale chimerico e quindi eventuali assunzioni di materiale vaccinale sarebbe da considerare a fondo cieco.
3. Gli esami di laboratorio condotti sui cinghiali oggetto della sperimentazione hanno evidenziato che da nessun soggetto è stato possibile reisolare il virus chimerico che pure aveva indotto una reazione anticorpale. Ciò significa che il virus conferma l'incapacità di indurre viremia attiva e quindi non si ha motivo di ritenere possibile una sua eliminazione nell'ambiente da parte di soggetti vaccinati.
 4. Il tempo di esposizione delle esche è stato quello minimo indispensabile e tutte le esche non consumate come anche i blister residui, sono stati ritirati dai siti di escatura il mattino successivo la deposizione delle esche. I siti sono stati mantenuti sotto il costante controllo delle foto trappole e pertanto si esclude qualsiasi ulteriore contaminazione ambientale durante questa sperimentazione dovuta ad azione accidentale o dolosa.

In relazione a quanto sopra esposto si ritiene di poter escludere rischi per la salute umana e/o animale derivanti dalla sperimentazione condotta e più in generale dall'emissione nell'ambiente di esche vaccinali contenenti il vaccino chimerico CP7_E2alf.

Bibliografia

1. Vilček, Š., A.J. Herring, J.A. Herring, P.F. Nettleton, J.P. Lowings, D.J. Paton "Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis" Arch. Virol. 136, 309-323 1994
2. Lowings P., Iyata G., Needham J., Paton D. "Classical swine fever diversity and evolution" J. Gen. Virol. 77, 1311-1321 1996
3. Pluimersa F.H, de Leeuw P.W, Smaka J.A, Elberse A.R.W, Stegeman J.A "Classical swine fever in The Netherlands 1997-1998: a description of organisation and measures to eradicate the disease" Preventive Veterinary Medicine Volume 42, Issues 3-4, 1 December 1999, Pages 139-155
4. Volker Moennig "Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy" Veterinary Microbiology Volume 73, Issues 2-3, 13 April 2000, Pages 93-102
5. Kaden V, Lange E, Fischer U, Strebelow G "Oral immunisation of wildboar against classical swine fever: evaluation of the first field study in Germany" Veterinary Microbiology Volume 73, Issues 2-3, 13 April 2000, Pages 239-252
6. Laddomada A "Incidence and control of CSF in wildboar in Europe" Veterinary Microbiology Volume 73, Issues 2-3, 13 April 2000, Pages 121-130
7. Artois M., Depner K.R., Guberti V., Hars J., Rossi S., Rutili D. "Classical swine fever (hog cholera) in wild boar in Europe" Revue Scientifique et Technique de l'OIE 2002, Vol. 21, n° 2, p. 287-303
8. Reimann I., Depner K., Trapp S., Beer M. "An avirulent chimeric Pestivirus with altered tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus" Virology, 322, 143-157 2004
9. Beer M., Reimann I., Hoffmann B., Depner K. "Novel marker vaccines against classical swine fever" Vaccine, 25, 5665-5670 2007
10. Stefan von Rueden, Christoph Staubach, Volker Kaden, R.G. Hess, Julia Blicke, Sabine Kuehne, Jana Sonnenburg, Andreas Froehlich, Juergen Teuffert, Volker Moennig

"Retrospective Analysis of the Oral Immunisation of Wild Boar Populations against Classical Swine Fever Virus (CSFV) in region Eifel of Rhineland-Palatinate" *Veterinary Microbiology* 2008 Nov 25;132(1-2):29-38

11. Leifer I., Lange E., Reimann I., Blome S., Juanola S., Plana Duran J., Beer M., "Modified live vaccine candidate CP7_E2alf provides early onset of protection against lethal challenge infection with classical swine fever virus after both intramuscular and oral immunization" *Vaccine*, 27, 6522-6529 2009
12. Schroeder S., Blome S., Koenen F., Loeffen W., Haegemann A., Uttenthal Å. Evaluation of CSFV Antibody ELISAs for the differentiation of infected from vaccinated animals. Abstract from 3rd Annual Meeting EPIZONE, Antalya, Turkey 2009