

Francesco Origgi*

Indagine sull'esposizione delle *Testudo hermanni* del Bosco della Mesola all'herpesvirus delle testuggini (THV)

Molte sono le malattie ad eziologia infettiva descritte nei rettili ed in particolar modo nei cheloni (Origgi and Jacobson, 2000). Queste spaziano dalle malattie ad eziologia batterica a quelle ad eziologia virale e parassitaria. La maggior parte di queste indagini ha però riguardato essenzialmente animali mantenuti in cattività e non è noto se queste patologie riflettano fedelmente lo scenario infettivistico cui questi animali possano essere esposti anche in natura. Lo sviluppo e l'affinamento di test diagnostici sempre più sensibili ha consentito di avere degli strumenti molto importanti per lo studio di queste patologie ed in particolare per comprenderne la patogenesi (Brown et al., 2001; Lock et al. 2003; Origgi et al., 2001/2003/2004; Schumacher et al., 1993).

Tra le diverse patologie investigate nei cheloni l'herpesvirus delle testuggini (Tortoise herpesvirus-THV-) è senza dubbio una delle patologie di maggior interesse sia in termini patogenetici che epidemiologici (Marschang e Origgi, 2003). È noto infatti, che tutte le testuggini sono da considerarsi bersagli potenziali di questo virus (McArtur et al., 2002) anche se sembra del tutto evidente che le testuggini del genere *Testudo* rappresentino un bersaglio d'elezione per questo virus (Origgi et al., 2001; Marschang e Origgi, 2003). In particolare, mentre le *Testudo graeca* appaiono sensibili all'infezione, ma resistenti alla malattia, come la bassa mortalità rilevata in

questa specie sembrerebbe indicare, le *Testudo hermanni*, appaiono invece essere caratterizzate da una alta sensibilità, ma da una mortalità che può arrivare anche al 100% dei soggetti esposti al primo incontro con la malattia. Gli altri membri di questo genere e cioè la *Testudo marginata* e la *T. horsfieldii*, sembrano essere caratterizzate da una resistenza intermedia alla malattia rispetto a quella delle *Testudo graeca* ed *hermanni* (Origgi et al., 2001; Marschang e Origgi, 2003). Le ragioni di questo quadro patogenetico ed epidemiologico sono ben lungi dall'essere definite, e diversi aspetti chiave del problema sono ancora a livello aneddotico. Recentemente però alcune indagini sierologiche condotte su degli esemplari di *Testudo graeca* di origine selvatica e mantenute in cattività in Turchia hanno mostrato come più del 50% degli animali fosse sierologicamente positivo per THV (Marschang and Schneider, 2002), lasciando supporre che il virus sia presente nella popolazione selvatica di questa specie. Se ciò riflettesse effettivamente il quadro epidemiologico della *Testudo graeca* nelle sue diverse popolazioni selvatiche in Europa questo potrebbe essere un dato scientificamente rilevante per poter speculare il ruolo della *Testudo graeca* come vettore del THV. Questo risultato sarebbe assolutamente plausibile con il quadro di alta morbilità e bassa mortalità descritto precedentemente per la *Testudo graeca* tipico di una ospite che è co-evoluto con il suo

* Francesco C. Origgi DVM, PhD Anatomic Pathology Resident Department of Infectious diseases and pathology - PO BOX 110880- College of Veterinary Medicine, University of Florida, 2015 SW - 16th ave Gainesville, FL 32610-0880.

parassita. In altre parole, la *Testudo graeca* potrebbe avere "convissuto" con il THV da moltissimi anni, nell'ordine di decine o centinaia di migliaia. Questo avrebbe consentito al sistema immunitario della *Testudo graeca* di sviluppare difese adeguate nei confronti del THV che a questo punto sarebbe diventato un patogeno sempre pericoloso ma non più mortale per questa specie.

In quest'ottica il quadro epidemiologico e patogenetico associato all'infezione da THV nella *Testudo hermanni* (alta morbilità e alta mortalità) lascerebbe supporre invece che l'incontro tra THV e questa specie di *Testudo* sia avvenuto in tempi relativamente molto più recenti, forse anche in virtù della movimentazione che le diverse specie di testuggini hanno subito in sempre maggior misura in questi ultimi anni, sia nell'ambito del mercato degli animali d'affezione, sia nell'ambito di reintroduzioni di animali in nuovi areali naturali.

Per poter cominciare a verificare la solidità scientifica di una teoria simile, sarebbe necessario disporre di una popolazione di *Testudo hermanni* naive da testare sierologicamente per l'esposizione a THV al fine di ottenere un dato epidemiologico di base.

Da queste premesse, da queste teorie e da questi dubbi ha preso il via nel 2003, un progetto per la valutazione sierologica dell'esposizione a THV della popolazione di *T. hermanni* presente nella riserva integrale del *Gran Boscone della Mesola* (Fe). Questa ricerca si inseriva nell'alveo di un progetto di genetica di popolazione coordinato dal Dr Mazzotti del Museo di Storia naturale di Ferrara.

A partire dalla tarda estate del 2003 e per tutta la stagione primavera-estate del 2004 abbiamo prelevato un campione rappresentativo di sangue da cinquanta *Testudo hermanni* che venivano temporaneamente catturate per la raccolta di una serie di dati morfometrici importanti per il progetto di ricerca descritto sopra. Dal sangue prelevato dalle testuggini, veniva separato il plasma per poi essere conservato a -80°C fino al momento delle analisi.

La determinazione dell'esposizione (infezione) delle Testuggini a THV si basava sul rilevamento della presenza di anticorpi diretti nei confronti di THV nel plasma del soggetto testato. Il rilevamento di anticorpi anti-THV veniva eseguito utilizzando un sistema denominato *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) che consente la determinazione di quantità anche ridottissime di anticorpi nel plasma grazie all'innesco di una reazione a catena che esita nella produzio-

ne un viraggio di colore dei reagenti che può essere rilevato e misurato da una speciale apparecchiatura (Origgi et al., 2001/2004). Grazie ad uno studio sperimentale effettuato in precedenza (Origgi et al., 2001/2004) sappiamo che è possibile determinare la presenza di anticorpi specifici anti-THV a partire da 4-8 settimane dall'avvenuta infezione. Con questo sistema di analisi siamo stati in grado di determinare che nessuna delle *Testudo hermanni* testate risultava positiva per l'esposizione a THV. Per rigore scientifico è doveroso sottolineare che esistono almeno due sierotipi differenti di THV. Nell'ambito di questo studio però le testuggini sono state testate nei confronti del THV di sierotipo 1 che risulta essere a tutt'oggi il sierotipo più diffuso e patologicamente più significativo.

Questo risultato rappresenta il primo dato scientifico che indica la sieronegatività di un campione seppur limitato, ma certamente rappresentativo di una popolazione selvatica di *Testudo hermanni*, e nella fattispecie quelle del Bosco della Mesola, per THV. Sebbene non sia possibile trarre delle conclusioni immediate e di ordine generale a partire da questi dati, risulta comunque evidente che i nostri dati paiono confermare le ipotesi di cui sopra e cioè che la *Testudo hermanni* potrebbe rappresentare a tutti gli effetti un ospite accidentale di THV, e quindi molto più a rischio nei confronti degli effetti potenzialmente letali di questa infezione che non la *Testudo graeca*, un ospite "classico", e dunque meno a rischio. È fuor di dubbio che è necessario testare un numero maggiore di animali per dare ai nostri dati una base epidemiologica più solida, ma già questo dato iniziale assume un valore scientifico molto importante che deve essere considerato con attenzione in un'ottica di conservazione di questa specie. È chiaro infatti, che in una popolazione come quella delle Testuggini della Mesola, dove in base al numero delle testuggini testate la prevalenza di THV è pari allo 0% (in base al nostro campione) l'introduzione, anche accidentale o anche mossa da "buone intenzioni" di una o più testuggini di altre specie come la *T. graeca*, un potenziale serbatoio dell'infezione, potrebbe tradursi in un disastro di proporzioni enormi. In realtà situazioni di questo genere potrebbero verificarsi in tutti i casi di reintroduzione quando non viene accertato lo stato sierologico degli animali re-introdotti (e di quelli autoctoni) e le loro condizioni di salute. Com'è possibile infatti, sapere se una testuggine appena re-introdotta alberga uno o più patogeni letali per i soggetti conspecifici o non conspecifici che risiedono in quel territorio da un perio-

do di tempo più o meno lungo? La sola valutazione clinica non è sufficiente da sola ad eliminare questo rischio. Solo esami di laboratorio approfonditi possono aiutare a limitare o ridurre il rischio di introdurre nuove patologie in nuovi ambienti. Questo è vero per ogni patogeno e non soltanto per THV. Ogni testuggine che dovesse venire spostata da un areale ad un altro o comunque re-introdotta dovrebbe essere sottoposta a delle analisi per la determinazione dell'esposizione a tutti i patogeni conosciuti. In questo senso e con questa logica è iniziato questo progetto presso il *Gran boscone della Mesola*. In questo modo abbiamo potuto cominciare a costruire una banca-dati sierologica delle testuggini della Mesola. Una banca-dati che potrà essere una fonte d'informazioni chiave anche per il futuro, quando la ricerca ci metterà a disposizione nuovi strumenti per valutare e determinare con sempre maggior precisione lo stato di salute generale, ma anche lo stato "microbiologico" di ciascuna testuggine.

Noi siamo convinti, che questa è la direzione da seguire e che questo sia lo spirito da adottare per comprendere sempre meglio quelli che sono i rischi a cui questi straordinari animali possono essere esposti e in ultima analisi per poterli prevenire.

A tutti noi che ci occupiamo di queste tematiche è lasciata la responsabilità di sensibilizzare l'opinione pubblica nei confronti di questi problemi che spesso non vengono presi in considerazione nemmeno dagli operatori soprattutto per la scarsa familiarità che molti hanno con queste problematiche. Frequentemente poi, ne veniamo tutti investiti quando un disastro ecologico si manifesta in tutto il suo fragore mediatico e nella sua cruda realtà. L'epidemiologia, lo studio delle malattie infettive e del loro divenire all'interno delle popolazioni di animali selvatici è una parte integrante della "Conservazione" che non è una parola oscura, ma è un insieme di discipline che si sforzano di mantenere il patrimonio naturale nelle condizioni in cui l'abbiamo ricevuto da chi ci ha preceduto e per poterlo consegnare (magari migliorandolo) alle genera-

zioni future. I naturalisti, i biologi ed i veterinari sono in prima linea in questo lavoro che però ha bisogno del contributo essenziale di ogni cittadino, senza il cui aiuto ogni sforzo verrebbe assolutamente vanificato.

Bibliografia

- Brown DR, Schumacher IM, Nogueira MF, Richey LJ, Zacher LA, Schoeb TR, Vliet KA, Bennett RA, Jacobson ER, Brown MB. 2001. Detection of antibodies to a pathogenic *Mycoplasma* in American alligators (*Alligator mississippiensis*), broad-nosed Caimans (*Caiman latirostris*), and Siamese crocodiles (*Crocodylus siamensis*). J Clin Microbiol. 39: 285-92.
- Lock BA, Green LG, Jacobson ER, Klein PA. 2003. Use of an ELISA for detection of antibody responses in Argentine boa constrictors (*Boa constrictor occidentalis*). Am J Vet Res 64: 388-95.
- Marschang RE, and Origgi FC. 2003. Diagnosis of Herpes Virus Infections in Tortoises – A Review, Verh Ber Erkr Zootiere 41: 47-52.
- Marschang RE, and Schneider RM. 2002. Detection of antibodies against chelonid viruses in wild-caught spur-thighed tortoises, *Testudo graeca*, in Turkey, p. 95-97, Proceedings of the 8th Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians, Reno NV.
- McArthur S, Blahak S, Koelle P, Jacobson ER, Marschang RE, Origgi F. 2002. Chelonian Herpesvirus. J Herp Med Surg 12: 14-31.
- Origgi F, Jacobson ER. 2000. Diseases of The Respiratory Tract of the Chelonians. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice. 3: 537-549.
- Origgi FC, Klein PA, Mathes K, Blahak S, Marschang RE, Tucker SJ, Jacobson ER. 2001. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting herpesvirus exposure in Mediterranean tortoises (spur-thighed tortoise [*Testudo graeca*] and Hermann's tortoise [*Testudo hermanni*]). J Clin Microbiol. 39: 3156-63.
- Origgi FC, Romero CH, Bloom DC, Klein PA, Gaskin JM, Tucker SJ, Jacobson ER. 2004. Experimental transmission of a herpesvirus in Greek tortoises (*Testudo graeca*). Vet Pathol. 41:50-61.
- Schumacher IM, Brown MB, Jacobson ER, Collins BR, Klein PA. 1993. Detection of antibodies to a pathogenic mycoplasma in desert tortoises (*Gopherus agassizii*) with upper respiratory tract disease. J Clin Microbiol 31: 1454-1460.