

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.6787277>

MARIA LUISA MARENZONI, FRANCESCO ORIGGI, ERIKA BALDONI,
MARTA BIAGGINI, MANUELA DIAFERIA, DANIELE MARINI, ORIANA RAFFAELE,
LAURA VIECELI, CLAUDIA CORTI, MASSIMO TRABALZA-MARINUCCI
& OLIVIERO OLIVERI

RISULTATI PRELIMINARI DEL MONITORAGGIO SANITARIO
SULLE INFEZIONI DA *MYCOPLASMA* SPP.,
MYCOPLASMA AGASSIZII e TESTUDINID HERPESVIRUS
PER IL RICOLLOCAMENTO DI *TESTUDO HERMANNI* CONFISCATE

RIASSUNTO

L'alto numero di individui confiscati a seguito di detenzione illegale ha posto l'esigenza di valutare la possibilità di un loro ricollocamento in ambienti naturali. A tale scopo nel 2019 sono state effettuate analisi sanitarie sulle *Testudo* tenute nei centri di recupero per identificare eventuali individui idonei al ricollocamento in natura, eseguendo, tra gli altri controlli, screening sierologici e molecolari per le infezioni da *Mycoplasma* spp., *Mycoplasma agassizii* e Testudinid herpesvirus. Circa il 40% dei soggetti detenuti in cattività è stato escluso dalla possibilità di ricollocamento in natura a seguito dei risultati delle analisi effettuate. Lo stato infettivo di questi soggetti dovrebbe essere gestito anche in cattività e dovrebbero essere creati gruppi distinti di animali positivi e negativi proprio per permettere la selezione e il mantenimento dello stato di negatività per specifiche infezioni nei soggetti considerati idonei al ricollocamento.

Parole chiave. *Testudo hermanni*, screening sanitario, *Mycoplasma* spp., Testudinid herpesvirus

SUMMARY

Preliminary results of health monitoring on Mycoplasma spp., Mycoplasma agassizii, and Testudinid herpesvirus infections for the relocation of confiscated Testudo hermanni. The high number of confiscated individuals following illegal detention has created the need to evaluate the possibility of their relocation into wildlife. To this aim, the health status of *Testudo* kept in recovery centers was checked in 2019 to identify any individuals suitable for relocation into wildlife, performing serological and molecular screenings for infections by *Mycoplasma* spp., *Mycoplasma agassizii*, and Testudinid herpesvirus. Approximately 40% of the individuals held in captivity were excluded from the possibility of relocation into the wildlife following the results of the analyses. The infectious state of these animals should be managed in captivity and

different groups of positive and negative animals should be created to allow the selection and maintenance of the negative state for some specific infections in individuals considered suitable for relocation.

Key words. *Testudo hermanni*, health screening, *Mycoplasma* spp., Testudinid herpesvirus

INTRODUZIONE

L'elevato numero di individui confiscati a seguito di detenzione illegale ha causato un'alta concentrazione di *Testudo* nei centri di recupero per animali selvatici (CRAS) gestiti dai Carabinieri Forestali e creato l'esigenza di valutare la possibilità di un loro ricollocamento in ambienti naturali. Oltre agli aspetti genetici (origine geografica degli animali), comportamentali (come, ad esempio, la perdita della capacità di procurarsi il cibo causata dalla detenzione e la diminuzione delle reazioni anti-predatorie), e ambientali, indicati in linee guida precedentemente pubblicate (MINISTERO DELL'AMBIENTE E DELLA TUTELA DEL TERRITORIO MATTM, 2019) vanno valutati gli aspetti sanitari, per verificare sia che la testuggine abbia uno stato di salute idoneo ad affrontare la vita in natura, sia che risulti esente da malattie infettive che potrebbero causare una minaccia per individui selvatici della stessa o di altre specie suscettibili (RAPHAEL *et al.*, 2019; BALLOUARD *et al.*, 2021).

Scopo del lavoro è stato quello di valutare lo stato di salute di individui che potrebbero essere destinati al ricollocamento, con particolare riferimento alle infezioni da *Mycoplasma* spp., *Mycoplasma agassizii* e infezioni da herpesvirus.

MATERIALI E METODI

Nell'anno 2019 sono stati sottoposti a visita clinica individui di *Testudo hermanni*, mantenuti in due diversi CRAS (A e B). Durante la visita sono stati raccolti tamponi orali (TO) e sangue (Autorizzazione del MATTM Prot. n. 0011888 del 24/05/2019; Autorizzazione della Regione Sardegna Prot. n. 3115 Rep. N. 42 dell'11/02/2019) per eseguire le successive analisi (MATTM, 2019).

I TO, eseguiti con tamponi di cotone sterili, sono stati immersi in 0.5 ml di soluzione fosfata tamponata (PBS), quindi processati in laboratorio per effettuare l'estrazione del DNA, impiegando un kit commerciale secondo le indicazioni del produttore (DNeasy Tissue kit, Qiagen), da utilizzare per la

ricerca, tramite metodi biomolecolari, di Testudinid herpesvirus (TeHV-1, 2, 3 e 4), *Mycoplasma* spp. e *Mycoplasma agassizii*. Dal DNA è stata poi effettuata la ricerca del gene della DNA polimerasi dell'herpesvirus tramite reazione a catena della polimerasi (PCR), comune a tutti gli herpesvirus dei cheloni (VANDEVANTER *et al.*, 1996; ORIGGI, 2012; MARENZONI *et al.*, 2018). Sono stati inoltre allestiti protocolli di PCR specie-specifici nei confronti dei singoli TeHV (1, 2, 3, 4) da applicare in caso di positività, al fine di identificare univocamente l'agente eziologico coinvolto (ORIGGI, 2012). Per il rilevamento di *Mycoplasma* spp. è stato utilizzato un protocollo di PCR con target il gene 16S rRNA (LIERZ *et al.*, 2007), che identifica molte diverse specie di micoplasmi. Per il rilevamento di *Mycoplasma agassizii* invece è stato utilizzato un altro protocollo specifico che identifica la regione variabile V3 del gene 16S rRNA (BROWN *et al.*, 1999).

Il prelievo di sangue è stato eseguito utilizzando provette contenenti litio eparina come anticoagulante. Il sangue è stato poi separato, tramite centrifugazione, in plasma, utilizzato per il test ELISA per la ricerca di anticorpi nei confronti di TeHVs, e parte corpuscolata da destinare alla successiva caratterizzazione genetica (qui non presentata). Per la ricerca sierologica è stato utilizzato un protocollo precedentemente validato sulle testuggini (ORIGGI *et al.*, 2001).

RISULTATI

Sono state sottoposti ad analisi 328 individui, di cui 194 provenienti dal CRAS A e 134 dal CRAS B. I due CRAS avevano caratteristiche gestionali differenti, ma le condizioni sanitarie degli individui di *Testudo hermanni* di entrambi i centri erano in generale definibili buone. I risultati delle analisi microbiologiche sono riportati nella Tab. 1.

Tab. 1
Risultati di positività ottenuti per la ricerca di Testudinid herpesvirus (TeHVs e Panherpesvirus), *Mycoplasma agassizii* e *Mycoplasma* spp.

Analisi	Risultati positivi (%)	Risultati dubbi (%)
Sierologia per TeHVs	16/328 (4.9)	8/328 (2.4)
PCR Panherpesvirus	4/328 (1.2)	0
PCR <i>Mycoplasma agassizii</i>	113/328 (34.5)	0
PCR <i>Mycoplasma</i> spp.	104/328 (31.7)	0

DISCUSSIONE

Tra i criteri che devono essere valutati prima di poter ricollocare in natura animali precedentemente detenuti in condizioni di cattività, al fine di tutelare l'ambiente naturale in cui tali soggetti dovrebbero essere immessi, devono essere presi in considerazione anche quelli sanitari (MATTM, 2019). Con tale scopo sono stati utilizzati diversi test di laboratorio per identificare soggetti infetti da microrganismi che erano stati precedentemente indicati come rilevanti negli individui da destinare al ricollocamento in natura, ossia herpesvirus e micoplasmi, in particolare *M. agassizii* (BROWN *et al.*, 1999; MARENZONI *et al.*, 2018; RAPHAEL *et al.*, 2019; BALLOUARD *et al.*, 2021). Sono stati applicati quattro protocolli di diagnosi di infezione e i risultati dei vari esami molecolari (per herpesvirus e micoplasmi) e/o del test sierologico (solo per gli herpesvirus) sono stati combinati per una lettura finale, al fine di determinare l'idoneità dei soggetti da ricollocare (BROWN *et al.*, 1999; ORIGGI *et al.*, 2001; LIERZ *et al.*, 2007; MARENZONI *et al.*, 2018). Circa il 40% dei soggetti presenti nei centri di recupero è stato escluso dal ricollocamento per cause infettive, ovvero per positività agli agenti sopra citati. Questo ha comportato pertanto una stringente selezione dei soggetti da ricollocare e, unito agli altri criteri di selezione, ad esempio genetici (MATTM, 2019), ha limitato notevolmente le possibilità di ricollocamento a circa una decina di individui. Una ulteriore conseguenza di tale selezione è il problema della gestione in cattività di questi animali in quanto è necessario attuare una separazione degli animali infetti da quelli non infetti, potenzialmente idonei ad essere ricollocati in natura.

BIBLIOGRAFIA

- BALLOUARD, J. M., BONNET, X., JOURDAN, J., MARTINEZ-SILVESTRE, A., GAGNO, S., FERTARD, B. & CARON, S., 2021. First detection of herpesvirus and mycoplasma in free-ranging Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*), and in potential pet vectors. *bioRxiv*.
- BROWN M.B., MCLAUGHLIN G.S., KLEIN P.A., CRENSHAW B.C., SCHUMACHER I.M., BROWN D.R. & JACOBSON E.R., 1999. Upper respiratory tract disease in the gopher tortoise is caused by *Mycoplasma agassizii*. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 2262-9.
- LIERZ M., HAGEN N., HARCOURT-BROWN N., HERNANDEZ-DIVERS S.J., LÜSCHOW D. & HAFEZ H.M., 2007. Prevalence of mycoplasmas in eggs from birds of prey using culture and a genus-specific mycoplasma polymerase chain reaction. *Avian Pathol.*, 36: 145-50.
- MARENZONI M.L., SANTONI L., FELICI A., MARESCA C., STEFANETTI V., SFORNA M., FRANCIOSINI M.P., CASAGRANDE PROIETTI P. & ORIGGI C., 2018. Clinical, virological and epidemiological characterization of an outbreak of Testudinid Herpesvirus 3 in a chelonian captive breeding facility: Lessons learned and first evidence of TeHV3 vertical transmission. *PLoS One*, 13: e0197169.
- MINISTERO DELL'AMBIENTE E DELLA TUTELA DEL TERRITORIO E DEL MARE (MATTM), 2019. Linee guida per il ricollocamento in natura di individui del genere *Testudo* spp. confiscati.

https://www.minambiente.it/sites/default/files/archivio/allegati/cites/linee_guida_t_estudo_aggiornate_2019.pdf accessed 27 August 2020.

- ORIGGI F.C., 2012. Testudinid Herpesviruses: A Review. *J. Herpetol. Med. Surg.*, 22(1-2): 42-54.
- ORIGGI F.C., KLEIN P.A., MATHES K., BLAHAK S., MARSCHANG R.E., TUCKER S.J. & JACOBSON E.R., 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.
- RAPHAEL, B. L., MACEY, S. K., PLATT, S. G., SEIMON, T. A., OSSIBOFF, R. J., HORNE, B. D., GAMARRA A.L., BARRERA M.G., LWIN T., SOE M. M., AUNG S. H., NEW S. S., KHAING L.L. & PLATT, K., 2019. Health Screening of Burmese Star Tortoises (*Geochelone platynota*) Prior to Introduction to the Wild. *Chelonian Conserv. Bi.: Celebrating 25 Years as the World's Turtle and Tortoise Journal*, 18: 153-162.
- VANDEVANTER, D.R., WARRENER, P., BENNETT, L., SCHULTZ, E.R., COULTER, S., GARBER, R.L. & ROSE, T.M., 1996. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 34: 1666-1671.

Indirizzo degli autori - M.L. MARENZONI, E. BALDONI, M. DIAFERIA, D. MARINI, O. RAFFAELE, L. VIECELI, M. TRABALZA-MARINUCCI, O. OLIVERI, Department of Veterinary Medicine, University of Perugia, via S. Costanzo, 4 - 06126 Perugia (I); F. ORIGGI, Centre for Fish and Wildlife Health, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland, Hochschulstrasse, 6 - 3012 Bern (Switzerland); M. BIAGGINI, C. CORTI, Museo di Storia Naturale dell'Università degli Studi di Firenze, Sezione di Zoologia "La Specola", via Romana, 17 - 50125 Firenze (I).

