

# EFFETTI DELL'ABBATTIMENTO CONTROLLATO SULLA EVOLUZIONE DELLA VIRULENZA: IL CASO DELLA PESTE SUINA CLASSICA

De Leo G.A.\*, Guberti V.\*\*

\*Dipartimento di Scienze Ambientali, Università degli Studi di Parma, Parco Area delle Scienze, 43100 Parma, deleo@elet.polimi.it

\*\* Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica. Ozzano Emilia (Bologna), infsvete@iperbole.bologna.it

**Riassunto** - L'eradicazione della Peste Suina Classica nel Cinghiale è stata sempre tentata con il depopolamento. La densità soglia di estinzione per l'infezione nel cinghiale è estremamente bassa, tanto che è molto difficile, se possibile, raggiungerla attraverso la caccia o gli abbattimenti selettivi. Quando lo sforzo di depopolamento non raggiunge la densità soglia di estinzione del virus è probabile osservare una ripercussione a livello di virulenza dell'agente eziologico. Empiricamente la riduzione della densità, per un diminuito contatto tra infetti e recettivi, dovrebbe favorire la presenza di stipti virali a virulenza ridotta. Nel presente lavoro si è utilizzato un semplice modello SIR con due stipti virali a differente virulenza per simulare gli effetti causati da modificazioni della dinamica di popolazione dell'ospite. Quando il depopolamento raggiunge la densità soglia di estinzione per lo stipte a bassa virulenza entrambi i virus vengono eradicati. Ovviamente lo stipte a bassa virulenza permane nella popolazione con densità più basse rispetto a quello più virulento. In assenza di interventi lo stipte a maggior virulenza è l'unico in grado di persistere nella popolazione seppur a bassa prevalenza. A livelli medi di depopolamento entrambi gli stipti resistono nella popolazione, tuttavia, al lieve aumentare dello sforzo di depopolamento corrisponde un incremento della prevalenza complessiva. Tale situazione è determinata dal fatto che la riduzione dello stipte con maggior virulenza viene ampiamente compensata dal maggior incremento dello stipte a bassa virulenza, il tutto guidato da meccanismi densità ospite dipendenti. I risultati del modello suggeriscono che l'infezione nel cinghiale non deve essere contrastata con livelli insufficienti di depopolamento, che al contrario, complicano la lotta alla malattia.

**Abstract** - **Effect of host depopulation on parasite virulence evolution: the case of classical swine fever in wild boar.**

Eradication of classical swine fever in wild boar populations is usually attempted by host depopulation. The wild boar threshold density for the extinction of the infection is very low, and very rarely (if ever) can be reached by increasing hunting or culling. When the depopulation effort fails in reaching the threshold of extinction, a possible perturbation on virus virulence evolution can be observed. Empirically, the decreasing of the contact rates between infectious and susceptible animals will favour the less virulent strain. A SIR model coupled with two virus strains with different virulence has been used in order to evaluate the dynamic of virulence evolution according to the host population management. When depopulation reaches the host threshold density for extinction of the low virulent strain, both the strains fade out. Obviously the less virulent strain will survive at a lower host density than the high virulent one. In the absence of any intervention, only the most virulent strain will survive with a very low prevalence. At a medium level of depopulation both the strains survive. Surprisingly when a slight intensity of depopulation is applied the whole prevalence increases. The decreasing of the most virulent strain is overcompensated by the increase of the less virulent one. The latter spreads due to the relatively low host density resulting in an higher prevalence. If so, in the wild, depopulation should be accurately planned and performed exclusively when the host threshold density can reasonably reached.

J. Mt. Ecol., 7 (Suppl.): 107- 118

## 1. Introduzione

L'interazione fra agente infettivo e i suoi ospiti è una delle più intime e complesse fra le varie relazioni interspecifiche. L'agente infettivo infatti dipende interamente dal suo ospite sia per l'accesso a risorse nutritive che per la trasmissione ad un altro ospite suscettibile nel suo ciclo di vita. D'altro canto, la presenza di un agente infettivo porta solitamente ad una riduzione della fitness dell'ospite attraverso una riduzione della sua sopravvivenza, fertilità, diminuzione del successo riproduttivo, alterazione del comportamento antipredatorio. Le conseguenze a livello evolutivo possono essere

molto importanti. Se infatti sono presenti diversi genotipi di un ospite e di un suo agente infettivo, e se i vari genotipi del parassita (ceppi geneticamente distinti) sono specializzati ciascuno su un particolare genotipo dell'ospite, allora in generale è il genotipo ospite più comune - quello più abbondante in un determinato momento - che soffre di più per l'attacco del parassita, in quanto la malattia si trasmette tanto più facilmente quanto più è abbondante l'ospite. Quando la densità del genotipo ospite più rappresentato diminuisce a causa dell'attacco dei parassiti che ne riducono la *fitness*, un altro genotipo ospite diventerà

dominante, ma - al contempo - anche più vulnerabile all'attacco della malattia. E così via, in quella che è stata definita una guerra evolutiva fra ospite e parassita, una guerra che vede succedersi nel tempo ceppi infettivi distinti e diversi genotipi ospite che da questi tentano di fuggire. Questi andamenti ciclici hanno una solida interpretazione teorica (Anderson & May, 1992), mentre le osservazioni di campo, se si esclude per il settore agricolo, sono invece decisamente rare. Ciò è dovuto essenzialmente alla forte asimmetria nei tempi generazionali fra ospite e parassita: la lunghezza di una generazione per gli ospiti, infatti, supera spesso di diversi ordini di grandezza quella dei parassiti. Pertanto, mentre su orizzonti temporali molto lunghi è possibile individuare addirittura un legame coevolutivo fra diverse specie di ospite e diverse specie di parassiti, su tempi brevi si può al più sperare di osservare cambiamenti nel genotipo del parassita volti favorire al massimo la diffusione della malattia. L'evoluzione della virulenza della myxomatosi del coniglio in Australia rappresenta sicuramente uno dei casi meglio documentati (Fenner, 1994). Nel 1950, in seguito all'introduzione di un ceppo molto virulento (fino al 99.8% di mortalità) del virus *Mymoma*, si selezionarono nel giro di un solo anno ceppi a diversa virulenza (Fenner & Ratcliffe, 1965). Questi ceppi vennero classificati in sei categorie di virulenza decrescente. Si poté così osservare che il ceppo a virulenza intermedia (Grado III, 90% di mortalità) era diventato in pochissimo tempo il più diffuso e rimase dominante per oltre 30 anni (Fenner, 1994). L'interpretazione di questo fenomeno è relativamente semplice (van Baalen & Sabelis, 1995): ceppi troppo virulenti uccidono l'ospite troppo velocemente prima di riuscire ad infettare altri ospiti suscettibili. Quelli poco virulenti sono tali proprio perché si riproducono lentamente all'interno dell'ospite; ne consegue che la loro diffusione nella popolazione è troppo lenta e i ceppi poco virulenti sono soppiantati dai più efficienti ceppi a virulenza intermedia, caratterizzati dal compromesso migliore fra velocità di riproduzione all'interno dell'ospite (virulenza) e velocità di trasmissione nella popolazione. Il problema dell'evoluzione della virulenza è di notevole rilevanza non solo un punto di vista strettamente teorico (Read, 1995), ma anche sanitario per le enormi implicazioni sulla salute umana (Wilson *et al.*, 1994). Molte malattie infettive e parassitarie che oggi vengono percepite come nuove o "emergenti" (Lyme disease, Hantavirus, Ebola,

ecc.) erano probabilmente presenti nell'ambiente già da molto tempo, se pur confinate in popolazioni animali in zone geografiche ristrette (Gibson, 1993). In seguito a pressioni evolutive legate tipicamente a cambiamenti climatici, ecologici e di uso del suolo, hanno trovato l'opportunità per saltare dal loro ospite originario all'uomo (Schrag & Wiener, 1995). Dati pubblicati sui siti WEB dell'Organizzazione Mondiale della Sanità ([www.who.org](http://www.who.org)) e del Centro di Controllo delle Malattie di Atlanta ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)) mostrano che le malattie infettive e parassitarie rappresentano ancora una delle principali cause di mortalità nei paesi in via di sviluppo, e continuano a diffondersi in maniera allarmante in seguito a una serie concomitante di fattori culturali, sociali e ambientali, quali l'impressionante crescita demografica, l'aumento della povertà, la malnutrizione, l'incremento della mobilità (Wilson *et al.*, 1994). Quello dell'evoluzione della virulenza è un problema che riguarda, se pur in modi diversi, anche i paesi industrializzati, Italia compresa. Si pensi ad esempio al problema del controllo della virulenza negli ospedali, oppure negli allevamenti intensivi di pesce, carne suina e pollame. Modelli teorici ed osservazioni sperimentali hanno mostrato chiaramente che un uso smodato di antibiotici o vaccini può portare in particolari condizioni alla selezione di ceppi infettivi resistenti alle più diffuse terapie di controllo (Björkman & Phillips-Howard, 1990; Anderson & May, 1992). Da qualche tempo, anche il problema della diffusione di patologie fra domestico e selvatico è al centro di aspre discussioni per le rilevanti conseguenze a livello economico e veterinario. L'Italia, come altri Stati Membri della Comunità Europea, deve fronteggiare un'epidemia di Peste Suina Classica (PSC) nel cinghiale di difficile eradicazione (Kaden 1998, Teuffert *et al.*, 1998). La PSC è una malattia a denuncia obbligatoria. Negli allevamenti intensivi l'individuazione di un solo caso infetto richiede lo *stamping out* di tutti gli animali dell'allevamento con danni economici enormi (Horst *et al.*, 1997). Non c'è da stupirsi quindi che, là dove si concentrano importanti attività industriali del settore alimentare legate alla produzione di carne suine, prosciutti e insaccati, la diffusione della PSC nel selvatico viene vista dagli allevatori con timore per il potenziale rischio di infezione del domestico (Bengis, 1997; Corso, 1997). Esistono pertanto fortissime pressioni per intervenire e bloccare la diffusione della malattia. Per il controllo e l'eradica-

zione della PSC nel selvatico sono stati proposti interventi ispirati essenzialmente a quelli usati negli allevamenti intensivi, cioè il *depopolamento* o *abbattimento controllato*. Semplici modelli teorici mostrano che è possibile eliminare un agente infettivo riducendo la densità della popolazione ospite al di sotto di una soglia critica detta di *eradicazione* (Anderson e May, 1992): al di sotto di questa soglia, infatti, la popolazione è così sparsa, rarefatta, che l'agente infettivo non è più in grado di persistere stabilmente e pertanto si estingue. L'applicazione di questa strategia al selvatico, tuttavia non è esente da critiche (Szent-Iványi, 1984). In particolare viene sostenuto (Guberti, 1991) che le battute di caccia aumentano la mobilità dei cinghiali, favorendo così la diffusione della malattia. Inoltre l'abbattimento preferenziale di individui adulti (che costituiscono i migliori trofei di caccia) può alterare la struttura d'età della popolazione a favore delle classi d'età giovani, le più suscettibili alla malattia. Inoltre le densità di soglia calcolabili in base ai parametri epidemiologici caratteristici sono così basse da essere difficilmente raggiungibili se non ha patto di uno sforzo di caccia irrealistico o realizzabile solo costi elevati (Guberti *et al.*, 1998). In pratica, non si riuscirebbe mai ad eradicare la malattia nel selvatico, ma solo a ridurre la densità dei cinghiali, favorendo però l'endemizzazione della malattia. Inoltre il crollo della densità dovuto al depopolamento potrebbe favorire la selezione di ceppi poco virulenti per il selvatico, ma ugualmente pericolosi per il domestico. Questi ceppi sarebbero in grado di persistere nella popolazione anche a densità particolarmente basse e costituirebbero una minaccia per il domestico, rendendo di fatto inefficace la politica di controllo basata sul depopolamento.

Questo lavoro si propone di analizzare se il depopolamento sia in grado effettivamente di selezionare ceppi a bassa virulenza capaci di persistere anche in una popolazione molto sparsa. L'approccio utilizzato è quello classico della dinamica delle popolazioni: viene considerata una popolazione di ospiti suscettibili attaccata da due ceppi dello stesso virus, uno a bassa e uno ad alta virulenza, in competizione fra loro per lo stesso ospite. Attraverso questo modello viene verificato se e come diversi livelli di abbattimento possono influire sull'equilibrio competitivo fra i due ceppi. E' stata scelta la PSC per tarare i parametri demografici ed epidemiologici su un caso reale di rilevanza sanitaria. L'agente eziologico della PSC è un RNA virus (appartenente alla famiglia Togaviridae) e pertanto è caratterizzato da un tasso

di mutazione sufficientemente alto da generare una consistente variabilità genetica, come dimostrano diversi studi in questo campo (Stadejek *et al.*, 1997; Greiser Wilke *et al.* 1998, Hofmann & Bossy, 1998; Vilcek & Belak, 1998). E' pertanto lecito supporre che gli ospiti possono reagire in maniera differente a ceppi geneticamente distinti capaci di esprimere diversa virulenza, come mostrato da Kosmidou *et al.* (1998) e da Vilcek & Paton (1998).

La Peste Suina Classica costituisce solo lo spunto iniziale di questo lavoro che per il momento ha obiettivi più generali. Infatti, in questa fase non si cerca di rappresentare con precisione questa o quella particolare patologia della fauna selvatica, quanto piuttosto di definire un modello teorico formale di carattere generale su cui verificare le conseguenze evolutive del depopolamento. Mentre l'effetto dell'uso di antibiotici sull'evoluzione della virulenza è largamente riconosciuto, è probabile che anche altre forme di manipolazione del sistema ospite-parassita possano alterare i delicati equilibri competitivi fra i diversi ceppi di un agente infettivo. Per questo motivo si è mantenuto intenzionalmente la struttura del modello al livello più semplice possibile, con lo scopo di analizzare un problema ben preciso, cioè se, e in che circostanze, l'abbattimento può influire sulla selezione di ceppi a diversa virulenza. Si è evitato di introdurre fattori, orpelli o abbellimenti che, a fronte di un maggiore realismo per questa o quella specifica patologia, avrebbero rischiato di far perdere di generalità al presente lavoro confondendo i risultati della nostra analisi.

## 2. Il modello epidemiologico

In questa sezione è presentato il modello epidemiologico per una popolazione di ospiti suscettibili all'attacco di un agente infettivo che si presenta in due forme o ceppi, un primo ceppo poco virulento e un secondo ceppo molto virulento. Si assume, come avviene tipicamente in questo ambito, che la virulenza sia misurata in termini di mortalità indotta dall'agente infettivo: di conseguenza, tanto più velocemente un agente patogeno uccide il proprio ospite, tanto più questo viene ritenuto virulento. Il modello epidemiologico generale è costruito di seguito per livelli successivi di complessità (Scott & Smith, 1994) a partire dalla descrizione della semplice dinamica di popolazione di un'ospite.

### 2.1. Dinamica dell'ospite in assenza di malattia

Si indichi con  $S$  la densità di ospiti suscettibili

nella popolazione. La dinamica della popolazione ospite in assenza dell'agente infettivo viene descritta dalla seguente equazione:

$$\frac{dS}{dt} = G(S) \quad (1)$$

dove con  $dS/dt$  si indica la variazione nell'unità di tempo del numero di ospiti, e con  $G(S)$  il reclutamento istantaneo, una funzione unimodale convessa, prima crescente con  $S$ , poi decrescente, e tale per cui  $G(0)=0$  e  $G(K)=0$ , dove  $K$  è la capacità portante della popolazione. I risultati della nostra analisi valgono per un'ampia classe di funzioni per  $G(S)$ ; tuttavia, senza perdere di generalità, assumeremo, per semplicità nella trattazione, che la popolazione di ospiti segua una dinamica di tipo logistico, ovvero:

$$G(S) = rS(1-S/K) \quad (2)$$

dove con  $r$  [tempo<sup>-1</sup>] si indica il tasso istantaneo di crescita a basse densità.

## 2.2. Il caso di una specie ospite attaccata da un solo agente infettivo

Quando è presente un solo agente infettivo (ad esempio il primo ceppo), la dinamica del sistema ospite-parassita può essere descritta dalle due seguenti equazioni:

$$\frac{dS}{dt} = G(S) - \beta_1 I_1 S \quad (3a)$$

$$\frac{dI_1}{dt} = \beta_1 I_1 S - (\alpha_1 + \mu) I_1 \quad (3b)$$

dove  $I_1$  rappresenta il numero di ospiti infettati dal primo ceppo,  $\beta_1$  [tempo<sup>-1</sup> num. ospiti infetti<sup>-1</sup>] è il coefficiente di trasmissione da infetto a suscettibile,  $\mu$  [tempo<sup>-1</sup>] il tasso di mortalità naturale di un ospite sano ( $1/\mu$  rappresenta la vita media attesa di un ospite sano), mentre  $\alpha_1$  [tempo<sup>-1</sup>] misura l'aumento di mortalità dovuta all'infezione. Pertanto  $1/(\mu + \alpha_1)$  rappresenta la vita media attesa di un ospite infetto di tipo 1. Si può dimostrare che l'agente infettivo è in grado di diffondersi stabilmente nella popolazione se e solo se:

$$R_o = \frac{\beta_1 K}{\alpha_1 + \mu} > 1 \quad (4)$$

$R_o$  viene detto capacità riproduttiva di base (basic reproductive number) e rappresenta il numero medio di infezioni secondarie generate dall'introduzione di un individuo infetto in una popolazione di  $K$  ospiti suscettibili. In alternativa, la relazione che garantisce la coesistenza di ospite e parassita si può esprimere nel modo seguente:

$$K > K_{T1} = \frac{\alpha_1 + \mu}{\beta_1} \quad (5)$$

ovvero, l'agente infettivo può diffondersi nella popolazione se e solo se la densità  $K$  di ospiti è superiore ad un valore minimo di soglia  $K_{T1}$ . Al di sotto di tale soglia, non ci sono abbastanza ospiti per sostenere l'agente infettivo nella popolazione. Si noti che, a parità del coefficiente di trasmissibilità ( $\beta_1$ ), è tanto più difficile eradicare la malattia quanto più è basso il tasso di mortalità indotta dal parassita  $\alpha_1$ . Ne consegue che è più difficile eradicare un ceppo poco virulento che uno molto virulento. Un agente patogeno poco virulento è infatti in grado di persistere anche in popolazioni molto sparse, uno molto virulento solo in popolazioni molto abbondanti. Se  $R_o > 1$ , si può dimostrare che dopo un certo tempo ospiti suscettibili ed ospiti infetti raggiungono un equilibrio stabile pari rispettivamente a:

$$S^*_1 = \frac{\alpha_1 + \mu}{\beta_1} = K_{T1} \quad (6a)$$

$$I^*_1 = \frac{G(S^*_1)}{\beta_1} \quad (6b)$$

## 2.3. L'abbattimento controllato per l'eliminazione di un solo agente infettivo

Il concetto di soglia critica definito nel paragrafo precedente ci permette di introdurre la politica di eradicazione basata sul depopolamento. L'idea alla base della strategia di depopolamento è quella di ridurre la densità della popolazione al di sotto della soglia di eradicazione attraverso la rimozione di un numero sufficiente di capi. Se indichiamo con  $c$  il tasso di abbattimento o di mortalità da caccia (*culling*), il modello risulta modificato nel modo seguente:

$$\frac{dS}{dt} = G(S) - (\beta_1 I_1 S - cS) \quad (7a)$$

$$\frac{dI_1}{dt} = \beta_1 I_1 S - (\alpha_1 + \mu + c)_1 \quad (7b)$$

Si assume in questo ambito che l'abbattimento colpisca indifferentemente ospiti infetti e ospiti suscettibili. Se fosse possibile valutare sul campo lo stato clinico dell'animale prima di abbatterlo, si potrebbe pensare a forme di rimozione più selettive. In pratica, molte volte questo non è possibile e l'abbattimento viene esercitato indifferentemente su tutta la popolazione. E' possibile dimostrare che se il tasso di abbattimento  $c$  è sufficientemente alto, allora è possibile eradicare la malattia dalla popolazione. Una politica cautelativa è quella che impedisce radicalmente la diffusione della malattia nella popolazione. Si può dimostrare che questo è possibile quando:

$$c > c^* = (\alpha_1 + \mu) (R_0 - 1) \quad (8)$$

Se la popolazione è caratterizzata da dinamica logistica, per eradicare la malattia è tuttavia sufficiente che il tasso di abbattimento soddisfi la seguente relazione:

$$c > c_e = \frac{r}{r + \beta_1 K} = (\alpha_1 + \mu) (R_0 - 1) = \frac{r}{r + \beta_1 K} c^* \quad (9)$$

Si noti infatti che  $c_e$  è più piccolo di  $c^*$ . Questo significa che se si sceglie un tasso di abbattimento intermedio fra  $c_e$  e  $c^*$  ( $c^* > c > c_e$ ), la malattia può inizialmente diffondersi nella popolazione (generando ad esempio un picco epidemico), ma poi non riesce a persistere ed è quindi destinata ad estinguersi.

**2.4. Un ospite e due agenti infettivi a diversa virulenza**

Consideriamo infine il sistema completo, costituito da ospiti sani (suscettibili), ospiti infetti col primo ceppo (quello poco virulento) e ospiti infetti col secondo ceppo (quello molto virulento). Il modello epidemiologico che descrive la dinamica di questa popolazione è il seguente:

$$\frac{dS}{dt} = G(S) - [(\beta_1 I_1 S - \beta_2 I_2 S) - cS] \quad (10a)$$

$$\frac{dI_1}{dt} = \beta_1 I_1 S - [(\alpha_1 + \mu + c) I_1 - \beta_{1,2} I_1 I_2] \quad (10b)$$

$$\frac{dI_2}{dt} = \beta_2 I_2 S - [(\alpha_2 + \mu + c) I_2 - \beta_{1,2} I_1 I_2] \quad (10c)$$

dove:

- S: num. di individui suscettibili nella popolazione;
- I<sub>1</sub>: num. di ospiti infetti col primo ceppo (poco virulento);
- I<sub>2</sub>: num. di ospiti infetti col secondo ceppo (molto virulento)
- G(S): tasso istantaneo di crescita;
- c: tasso di abbattimento (*culling*);
- m: mortalità naturale;
- α<sub>1</sub>: mortalità indotta dal primo agente infettivo;
- α<sub>2</sub>: mortalità indotta dal secondo agente infettivo (α<sub>2</sub> >> α<sub>1</sub>);
- β<sub>1</sub>: coeff. di trasmissione da infetto di tipo 1 a suscettibile;
- β<sub>2</sub>: coeff. di trasmissione da infetto di tipo 2 a suscettibile;
- β<sub>12</sub>: coeff. di trasmissione da infetto di tipo 2 a infetto di tipo 1.

Si osserva in primo luogo che un ospite può abbandonare il comparto dei suscettibili (S) essenzialmente per tre ragioni: perché muore di mortalità indipendente dal parassita; perché entra in contatto con un ospite infetto col ceppo 1 e passa quindi nella classe I<sub>1</sub> (con un tasso pari a β<sub>1</sub>I<sub>1</sub>) o perché entra in contatto con un ospite infetto col ceppo 2 e passa quindi nella classe I<sub>2</sub> (con un tasso pari a β<sub>2</sub>I<sub>2</sub>).

Un'attenzione particolare merita il termine di cross-infezione β<sub>12</sub>I<sub>1</sub>I<sub>2</sub> nelle equazioni (10b) e (10c): questo termine sta ad indicare che se un ospite infetto di tipo 1, cioè colpito già dal ceppo poco virulento, entra in contatto con un ospite infetto di tipo 2 (quello molto virulento), allora passa nella classe dei molto virulenti (I<sub>2</sub>) con probabilità proporzionale a β<sub>1,2</sub>. Questo fenomeno è noto in letteratura col nome di *super-infezione*. La giustificazione di questo fenomeno sta nel fatto che l'agente infettivo più virulento è tale proprio perché ha un tasso di riproduzione all'interno dell'ospite maggiore di quello del ceppo poco virulento: pertanto, se entrambi i ceppi sono presenti nello stesso ospite in un certo momento, è quello più virulento che prende il sopravvento sull'ospite perché si riproduce più velocemente. Questo meccanismo, che rappresenta ovviamente un caso limite ma significativo, si distingue da quello di co-infezione, in cui entrambi i ceppi possono coesistere almeno per un certo

tempo in un ospite infetto. E' ovviamente possibile rappresentare matematicamente anche questo meccanismo, ma il modello risulterebbe ancora più complesso per l'aggiunta di un'ulteriore equazione. Analisi preliminari mostrano che i risultati non sarebbero qualitativamente differenti da quelli riportati nel seguito, pertanto proseguiremo lo studio in base al modello (10).

### 2.5. Ipotesi ulteriori

E' opportuno specificare una serie di ipotesi ulteriori sui parametri del modello. In primo luogo, il fatto che il secondo ceppo sia più virulento del primo si traduce in termini formali nella relazione:

$$\alpha_2 \gg \alpha_1 \quad (11)$$

Quindi, la mortalità indotta dall'agente patogeno appartenente al secondo ceppo è più alta di quella indotta dal primo ceppo, ovvero la vita attesa di un ospite infetto di tipo 2 è più bassa di quella di un ospite infetto di tipo 1.

Sui coefficienti di trasmissibilità non è necessario imporre vincoli particolari: si può assumere che  $\beta_2$  sia uguale o anche superiore a  $\beta_1$ , in quanto la maggiore virulenza del secondo ceppo può tradursi in una maggiore facilità di trasmissione della malattia da un ospite infetto altamente viremico ad uno suscettibile. Comunque sia, nel seguito, per semplicità della trattazione, abbiamo assunto che la capacità riproduttiva del primo ceppo ( $R_{01}$ ) sia superiore a quella del secondo ( $R_{02}$ ), cioè che:

$$R_{01} = \frac{\beta_1 K}{\alpha_1 + \mu} > \frac{\beta_2 K}{\alpha_2 + \mu} = R_{02} > 1 \quad (12)$$

Questo significa che, se consideriamo i due ceppi isolatamente, la soglia di eradicazione per il primo ceppo ( $K_{T1}$ ) è più bassa di quella del secondo ceppo ( $K_{T2}$ ). In altri termini, è più difficile eradicare il ceppo 1 piuttosto che il ceppo 2 (quando isolati). Il modello (10) viene analizzato nella sezione successiva in funzione di diversi valori del tasso di superinfezione ( $\beta_{12}$ ) e di quello di abbattimento (c). L'analisi del modello viene presentata in due tempi. In primo luogo si verifica se, in assenza di abbattimento, è possibile la coesistenza dei due ceppi, e sotto che condizioni. Quindi, una volta verificata la possibilità di coesistenza, si utilizza il caso della peste suina classica per analizzare come l'abbattimento controllato possa alterare

questi equilibri competitivi fra i due ceppi e con che conseguenze.

### 3. Coesistenza o esclusione competitiva?

In questa sezione viene individuata la relazione fra i parametri del modello che garantisce la coesistenza dei due ceppi virulenti in assenza di abbattimento controllato. E' possibile distinguere due casi. Quando non c'è possibilità di super-infezione ( $\beta_{12}=0$ ), allora si può dimostrare che il ceppo con la maggiore capacità riproduttiva (cioè con maggiore  $R_0$ ) si diffonde nella popolazione ed elimina quello con la capacità riproduttiva inferiore. Nel nostro caso, dal momento che  $R_{01} > R_{02}$ , è il ceppo meno virulento (tipo 1) che vince sempre la competizione contro il ceppo più virulento (tipo 2) che viene così eliminato dalla popolazione. Il primo ceppo ha un vantaggio competitivo rispetto al secondo, in quanto è in grado di persistere in una popolazione molto sparsa ( $K_{T1} < K_{T2}$ ): infatti, proprio perché uccide il proprio ospite più lentamente del ceppo 2 ( $\alpha_1 \ll \alpha_2$ ), lo lascia in circolazione per un tempo sufficientemente lungo da infettare complessivamente un numero di ospiti suscettibili ( $R_{01}$ ) maggiore che il ceppo 2 ( $R_{02}$ ). In assenza di super-infezione, la selezione favorisce quindi i ceppi a bassa virulenza: i ceppi molto virulenti uccidono i loro ospiti troppo velocemente per essere competitivi.

Se invece esiste la possibilità di super-infezione ( $\beta_{12} > 0$ ), allora il risultato della competizione dipende dal valore effettivamente assunto dal coefficiente  $\beta_{12}$ . Per semplicità di notazione, si definisce:

$$\Delta K_T = K_{T2} - K_{T1}$$

e si ricorda che, in base alla (6),  $I^*_1$  e  $I^*_2$  sono le densità di ospiti infetti all'equilibrio rispettivamente di tipo 1 e di tipo 2, cioè:

$$I^*_1 = \frac{G(K_{T1})}{\beta_1} \quad \text{e} \quad I^*_2 = \frac{G(K_{T2})}{\beta_2}$$

E' possibile distinguere tre casi in base a valori crescenti del tasso di super-infezione  $\beta_{12}$ :

$$\text{- se } 0 < \beta_{12} < \frac{\beta_1 \Delta K_T}{I^*_1} \quad (13a)$$

vince ancora il ceppo 1 e il ceppo 2 si estingue

$$- \text{ se } \frac{\beta_1 \Delta K_T}{I_1^*} < \beta_{12} < \frac{\beta_2 \Delta K_T}{I_2^*} \quad (13b)$$

i due ceppi coesistono stabilmente nella popolazione

$$- \text{ se } \beta_{12} > \frac{\beta_2 \Delta K_T}{I_2^*} \quad (13c)$$

è il ceppo 2 che vince mentre il ceppo 1 si estingue.

Pertanto, la coesistenza di due ceppi a diversa virulenza è possibile solo se: *i.* c'è super-infezione; *ii.* e se il coefficiente  $\beta_{12}$  è sufficientemente grande (13 b). Inoltre è possibile dimostrare che la probabilità di coesistenza cresce anche al crescere della capacità  $K$  portante degli ospiti in assenza della malattia. Pertanto, alte densità di ospite (alti valori della capacità portante) favoriscono la diffusione di ceppi virulenti che altrimenti, a basse densità, non sarebbe capaci di persistere nella popolazione.

### 3. 1 Il caso della peste suina Classica

A questo punto possiamo finalmente analizzare come l'abbattimento controllato influisce sui processi competitivi fra due ceppi a diversa virulenza. L'analisi viene condotta con riferimento ad un caso realistico, quello della Peste Suina Classica in una popolazione di cinghiali della Sardegna Nord-Orientale (Guberti *et al.*, 1996; Guberti *et al.*, 1998). Il valore dei parametri demografici utilizzati è riportato in Tabella 1. Si assume che in assenza di malattia la popolazione raggiunge all'equilibrio una densità pari a 600 individui su un'area di 220 km<sup>2</sup>, corrispondente a 2.73 individui/km<sup>2</sup>. Il tasso istantaneo di crescita a basse densità pari a 0.5 [anni<sup>-1</sup>] a cui corrisponde un tempo di raddoppio della popolazione a basse densità pari a 2 anni. Il tasso di mortalità per un ospite sano è stato posto pari a 0.2 a cui corrisponde una speranza di vita media di 5 anni. Per quanto riguarda i parametri epidemiologici, si è assunto che la vita attesa di un ospite infetto dal primo ceppo sia pari a poco più di 70 giorni, e quindi  $\alpha_1 \approx 1/70$  [giorni<sup>-1</sup>]  $\approx 5$  [anni<sup>-1</sup>] e quella di un ospite infetto dal secondo ceppo pari a circa 24 giorni, per cui  $\alpha_2 \approx 1/24$  [giorni<sup>-1</sup>]  $\approx 15$  [anni<sup>-1</sup>]. I coefficienti di trasmissione riportati in Tabella 1 sono stati scelti in modo tale da produrre valori della capacità riproduttiva di base realistici e compatibili con le analisi di Guberti *et al.*, 1998, cioè  $R_{01}=4.6$  e  $R_{02}=2.37$ .

Purtroppo non sono disponibili stime dirette o indirette per il termine di super-infezione ( $\beta_{12}$ ).

Per comprendere appieno l'effetto potenziale dell'abbattimento controllato, ci mettiamo nel caso che noi riteniamo più significativo, cioè il (13c). Il coefficiente  $\beta_{12}$  viene quindi assunto pari a 0.84 in modo tale che in assenza di abbattimento sia il ceppo più virulento (il ceppo 2) a prevalere nella popolazione.

L'analisi epidemiologica viene quindi eseguita calcolando le densità di ospiti suscettibili e infetti di tipo 1 e 2 all'equilibrio al crescere del tasso di abbattimento  $c$ . Per semplicità, nel seguito lo sforzo di abbattimento verrà riportato in termini di percentuale annua di rimozione della popolazione. Per l'analisi numerica è stato utilizzato LocBif, un package per l'analisi delle biforcazioni.

Per comprendere al meglio l'effetto dell'abbattimento sulla competizione dei due ceppi, riportiamo prima le prevalenze degli infetti quando uno solo dei due ceppi è presente nella popolazione. In Fig. 1a) si vede che se solo il secondo ceppo è presente nella popolazione e non c'è abbattimento, la prevalenza all'equilibrio (frazione di individui infetti sulla popolazione) si assesta intorno al 2%. Al crescere dello sforzo di abbattimento la prevalenza diminuisce, prima molto lentamente e in seguito più velocemente fino a giungere all'eradicazione completa della malattia per sforzi di abbattimento superiori al 30% annuo, a cui corrisponde una soglia di estinzione pari a 1.13 individui/km<sup>2</sup>. In Fig. 1b) viene riportata la prevalenza all'equilibrio quando solo il ceppo di tipo 1 è presente nella popolazione. Come si vede la prevalenza risulta maggiore che nel caso precedente (4%). L'eradicazione completa della malattia richiede un maggior sforzo di abbattimento (38%) e la soglia critica di estinzione è pari a 0.67 individui/km<sup>2</sup>, cioè circa il 40% in meno che nel caso precedente.

Cosa succede quando entrambi i ceppi sono contemporaneamente presenti? Se lo sforzo di abbattimento è nullo, è il ceppo più virulento ad avere il sopravvento (Fig. 2a). La prevalenza complessiva è bassa (pari al 2%) in quanto solo infetti di tipo 2 sono in circolazione nella popolazione. Se si comincia ad abbattere animali, per bassi sforzi di rimozione è sempre il ceppo di tipo 2 a prevalere nella popolazione, ma quando lo sforzo di abbattimento supera il 5% annuo lo scenario cambia: la riduzione della densità di ospiti suscettibili infatti comincia a favorire il ceppo di tipo 1 che può pertanto coesistere col ceppo 2, se pur inizialmente a prevalenza molto bassa. In seguito, per sforzi di abbattimento superiori al 12% annuo, la frazio-

**Tab. 1** - I parametri demografici utilizzati nella simulazione. Questi valori si riferiscono ad una popolazione del Nuorese caratterizzata da una capacità portante di 600 cinghiali su un'area di circa 220 km<sup>2</sup> (Guberti *et al.*, 1996, Guberti *et al.*, 1998)

Parametro	Simbolo	Valore	Unità di misura
Capacità portante	K	600	# Individui su 220 km <sup>2</sup>
Tasso istantaneo di crescita	r	0.5	anni <sup>-1</sup>
Tasso di mortalità naturale	$\mu$	0.2	anni <sup>-1</sup>
Tasso di mortalità di un individuo infetto dal ceppo 1	$\alpha_1$	5	anni <sup>-1</sup>
Tasso di mortalità di un individuo infetto dal ceppo 2	$\alpha_2$	15	anni <sup>-1</sup>
Coeff. di trasmissione della malattia da infetto di tipo 1 a suscettibile	$\beta_1$	0.04	[# infetti tipo 1] <sup>-1</sup> anni <sup>-1</sup>
Coeff. di trasmissione della malattia da infetto di tipo 2 a suscettibile	$\beta_2$	0.06	[# infetti tipo 2] <sup>-1</sup> anni <sup>-1</sup>
Coeff. di trasmissione della malattia da infetto di tipo 2 a infetti di tipo 1.	$\beta_{12}$	0.84	[# infetti tipo 1] <sup>-1</sup> anni <sup>-1</sup>

ne di individui infetti di tipo 1 supera quella di tipo 2. Per sforzi di abbattimento maggiori del 24% annuo il ceppo di tipo di 1 diventa dominante e quello di tipo 2 viene eradicato dalla popolazione. Al crescere ulteriore dello sforzo di rimozione la prevalenza diminuisce fino ad arrivare all'eradicazione anche del ceppo di tipo 1, ma solo per rimozioni superiori al 38% annuo. E' interessante notare però che per valori intermedi dello sforzo di rimozione, la prevalenza complessiva cresce al cresce dell'abbattimento (Fig. 2b), invece di diminuire, come ci si aspetterebbe se invece un solo ceppo fosse presente nella popolazione (Fig.1a e 1b). Questo accade perché, con il progressivo depopolamento, prende man mano sopravvento il ceppo meno virulento, più efficace nel diffondersi e persistere in popolazioni sparse.

Le conseguenze da un punto di vista pratico gestionale sono importanti. Infatti, in presenza di super-infezione, il calcolo della soglia di eradicazione della malattia sulla base del ceppo dominante può riservare brutte sorprese. Infatti, in assenza di abbattimento, il ceppo prevalente è quello di tipo 2; questo è caratterizzato da una soglia di eradicazione relativamente alta (1.13 ind/km<sup>2</sup>) a cui corrisponde uno sforzo di abbattimento pari al 30% annuo. Pertanto, quando si esercita questo sforzo di abbattimento, si riesce effettivamente ad eradicare completamente il ceppo di tipo 2 (quello molto virulento), ma nel contempo si creano le condizioni favorevoli per la diffusione del ceppo di tipo 1 (quello meno virulento). Quel che è peggio è che, al nuovo equilibrio corrispondente al 30% di rimozione annua, la prevalenza sale al 4%, cioè a circa il doppio della prevalenza che si avrebbe senza intervenire (2%)! Questo tipo di politica risulta quindi non solo inefficace (non riesce ad eradicare la

malattia), ma addirittura controproducente, in quanto aumenta sia la prevalenza che l'abbondanza di infetti nella popolazione. Per arrivare alla completa eliminazione bisognerebbe spingere ulteriormente lo sforzo di abbattimento fino al 38% annuo con un conseguente aggravio dei costi. Analisi ulteriori ci hanno permesso di verificare che risultati qualitativamente identici si ottengono anche considerando modelli più realistici che includono esplicitamente una classe di individui (temporaneamente o permanentemente) immuni. I risultati ottenuti col generico modello (10) sono pertanto validi anche per una classe più ampia di modelli capaci di descrivere con maggiore dettaglio e realismo specifiche patologie.

#### 4. Conclusioni

Il presente lavoro suggerisce come il depopolamento può, almeno teoricamente, favorire la selezione di ceppi via via meno virulenti. Questo fenomeno ha come effetto quello di ridurre la soglia di estinzione dell'agente infettivo, o, il che è lo stesso, di aumentare lo sforzo di abbattimento necessario per eradicare completamente l'infezione. Se lo sforzo di abbattimento non è sufficientemente alto, è pertanto possibile che l'effetto di questa politica sia addirittura quello di aumentare la prevalenza (%) e il numero assoluto di individui infetti, ottenendo così il risultato opposto a quello desiderato. Lo sforzo di rimozione necessario per eradicare anche i ceppi meno virulenti può essere in pratica irrealistico, oppure realizzabile solo a costi molto alti. Questi risultati sembrano abbastanza robusti e insensibili a variazioni strutturali del modello.

Il messaggio finale di questo lavoro non è che il depopolamento influisce sempre ed inevitabilmente sulla selezione di ceppi a bassa virulenza

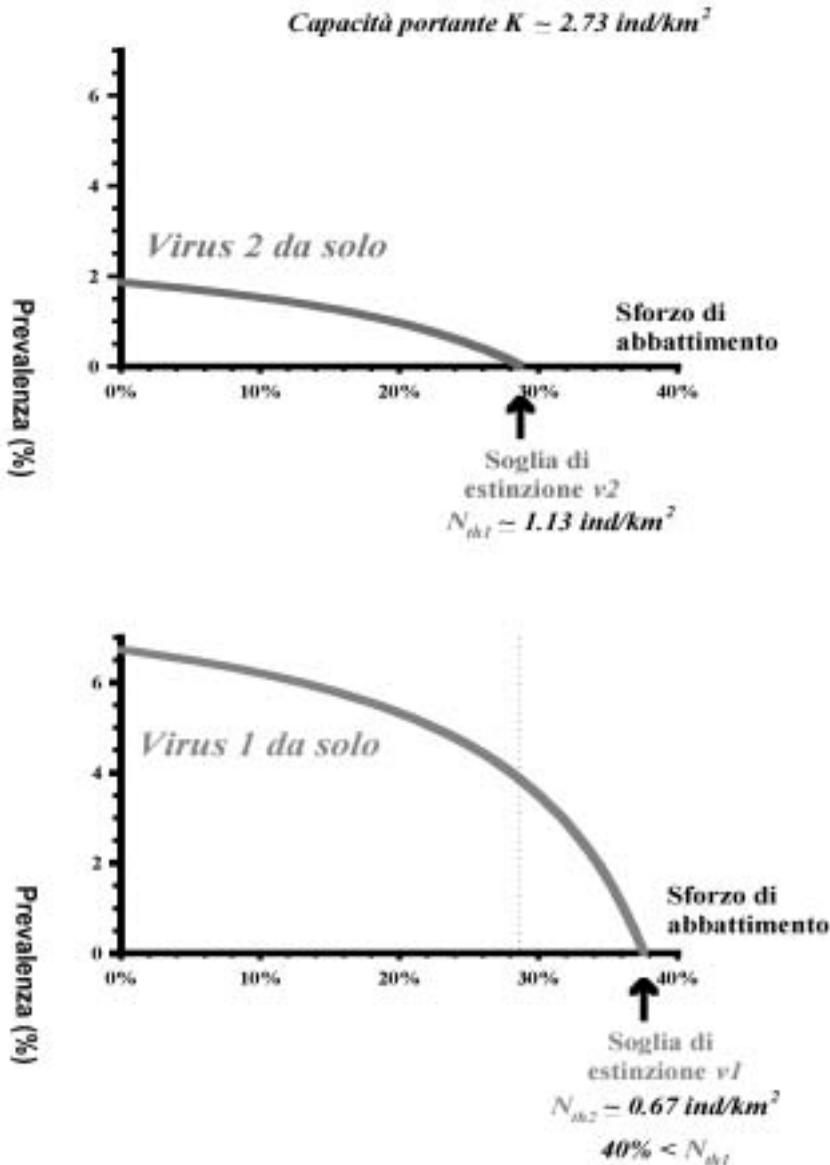


Fig. 1 – a) prevalenza di infetti di tipo 2 all’equilibrio in funzione dello sforzo di abbattimento  $c$  quando il solo ceppo 2 è presente nella popolazione. La malattia viene eradicata per sforzi superiori al 30%. La soglia di eradicazione corrispondente è pari a 1.13 cinghiali per  $\text{km}^2$ ; b) prevalenza di infetti di tipo 1 all’equilibrio in funzione dello sforzo di abbattimento  $c$  quando il solo ceppo 1 è presente nella popolazione. La malattia viene eradicata per sforzi superiori al 38%. la soglia di eradicazione corrispondente è pari a 0.67 cinghiali per  $\text{km}^2$ . La prevalenza del ceppo poco virulento è sempre superiore a quella del ceppo molto virulento per qualsiasi valore della sforzo di abbattimento

aumentando di conseguenza la prevalenza. Questo scenario si basa interamente sulla possibilità di cross-infezione: se per una particolare malattia si può escludere con certezza questa

possibilità, allora l’abbattimento controllato non può influire in alcun modo sulla selezione di ceppi a diversa virulenza (a meno che, naturalmente, non intervengano altri fattori che

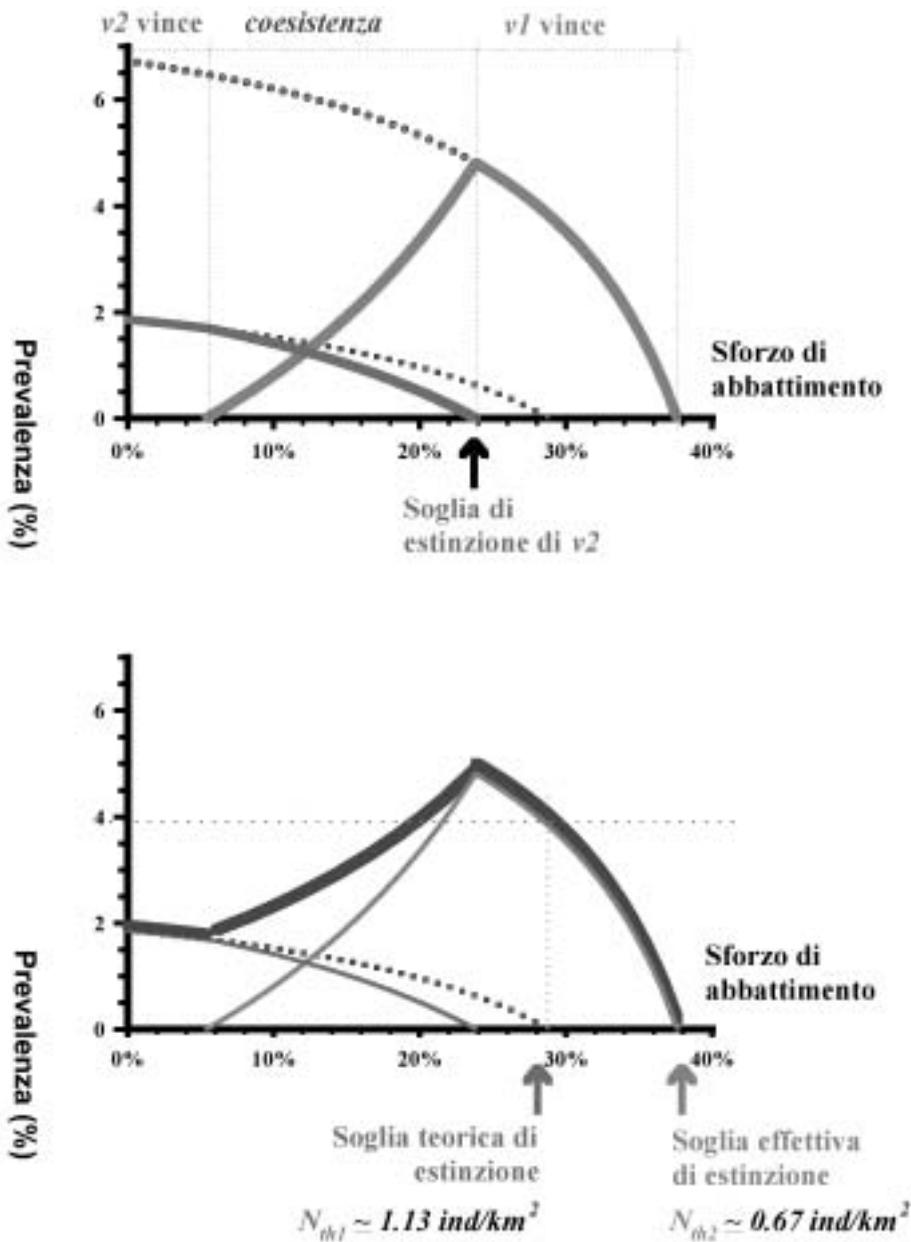


Fig. 2 – a) prevalenza di infetti di tipo 1 e di tipo 2 all’equilibrio in funzione dello sforzo di abbattimento c quando entrambi i ceppi sono inizialmente presenti nella popolazione; b) prevalenza complessiva di individui infetti nella popolazione in funzione dello sforzo di abbattimento c. Si vede che se si implementa lo sforzo di rimozione necessario per eradicare il ceppo virulento (c=30%), all’equilibrio la prevalenza risulta circa il doppio della prevalenza che si aveva originariamente senza intervento (c=0).

qui ignorati). Pertanto, nel caso specifico della peste suina classica sarebbe quantomeno necessario valutare - attraverso opportuni test epide-

miologici in campo e in laboratorio (Greiser Wilke, 1998), ed eventualmente attraverso l’uso delle moderne tecnologie molecolari

(Vilcek & Belak, 1998; Vilcek & Paton, 1998) – se, nel corso di un'epidemia: 1) coesistono davvero ceppi del virus geneticamente distinti, come del resto mostrato da Stadejek *et al.* (1997) e Hofmann & Bossy (1998); 2) gli ospiti rispondono diversamente ai vari ceppi che esprimono quindi una diversa virulenza, fatto anche questo mostrato da Kosmidou *et al.* (1998). Se entrambe queste condizioni sono verificate, allora è possibile che, sotto opportune condizioni, la manipolazione della densità della popolazione ospite attraverso l'abbattimento controllato provochi la selezione di ceppi meno virulenti con le conseguenze a livello gestionale sopra evidenziate.

Se esiste il rischio di co-infezione o super-infezione, cosa si suggerisce per il controllo e l'eradicazione della malattia? Purtroppo, non esistono ricette sicure. Quello che appare chiaro è che, se non si riesce ad assicurare alti livelli di rimozione, intervenire può essere addirittura peggio che non far niente. Una possibilità attualmente in esame è quella di lasciare che l'infezione segua il suo decorso naturale. Infatti un'analisi preliminare dei transitori generati dal modello (10) mostra l'esistenza di oscillazioni molto ampie del numero di infetti, per cui a fase epidemiche molto pronunciate seguono fasi endemiche con prevalenze bassissime, matematicamente non nulle, ma biologicamente irrealistiche. E' pertanto possibile che queste oscillazioni, col concomitante sviluppo di immunità, portino ad una "naturale" estinzione dell'infezione in conseguenza di fluttuazioni casuali, un fenomeno ben noto nella letteratura anglosassone col termine di *endemic fade-out* (Anderson & May, 1992). D'altra parte, un intervento di depopolamento insufficiente non consentirebbe di eradicare l'agente infettivo, ma riuscirebbe solo a smorzare sensibilmente le oscillazioni, favorendo così l'endemizzazione della malattia.

## 5. Ringraziamenti

Giulio De Leo desidera ringraziare di cuore Enrico Zaffaroni, Annapaola Rizzoli e Paolo Lanfranchi per averlo coinvolto in queste tematiche. Vittorio Guberti ringrazia Domenico Rutili e Alberto Laddomada per le "interminate" discussioni riguardanti le sottili differenze tra pratica e teoria quando applicate alla gestione delle infezioni nella fauna selvatica.

## Bibliografia

ANDERSON, R.M. & R.M. (May 1992) - *Infectious Diseases of Humans: Dynamics and Control*. Oxford

- University Press, Oxford.
- BENGIS R.G. (1997) - Animal health risks associated with the transportation and utilisation of wildlife products. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 16(1):104-110
- BJÖRKMAN A. & PHILLIPS-HOWARD P.A. (1990) - The epidemiology of drug resistance malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84:177-180
- CORSO B. (1997) - Likelihood of introducing selected exotic diseases to domestic swine in the continental United States of America through uncooked swill. *Revue Scientifique et Technique de l'office International des Epizooties*, 16(1):199-206.
- FENNER F. & RATCLIFFE F.N. (1965) - *Myxomatosis*. Cambridge University Press, Cambridge.
- FENNER F. (1994) - Myxomatosis. In Scott, M.E. e G. Smith, *Parasitic and Infectious Diseases: Epidemiology and Ecology*. Academic Press, London. Pag. 337-346
- GIBBONS A. (1993) - Where are "new" diseases born? *Science*, 261: 6.
- GREISER WILKE I., DEPNER K., FRITZEMEIER J., HAAS L. & MOENNIG V. (1998) - Application of a computer program for genetic typing of classical swine fever virus isolates from Germany. *Journal of Virological Methods*, 75(2):141-150.
- GUBERTI V. (1991) - Fauna e patologie a denuncia obbligatoria: il caso della peste Suina Classica nel cinghiale in Toscana. *Supplemento alle Ricerche di Biologia e della Selvaggina*, XIX: 393-403.
- GUBERTI V., COSSU P., BOZZI F., CABRAS P., RUIU A., PIRINO A., MEREU G., BASSU M. & FIRINU A. (1996) - Aspetti demografici della popolazione di cinghiale nella provincia di Nuoro: effetti del modello di gestione. *I Convegno programmi di ricerca finalizzati degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali*. Istisan Congressi (46): 87.
- GUBERTI V., RUTILI D., FERRARI G., PATA C. & OGGIANO A. (1998) - Estimate the threshold abundance for the persistence of the Classical Swine Fever in the wild boar population of the Eastern Sardinia, Italy. In: *Measure to control Classical Swine Fever in European Wild Boar*. European Union, Perugia, Italy 6-7 April 1998, Pp 54-61.
- HOFMANN, M. & BOSSY S. (1998) - Molecular epidemiological analysis of classical swine fever virus isolates from the 1993 disease outbreaks in Switzerland. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 140 (9): 365-370
- HORST HS., HUIRNE R.B.M. & DIJKHUIZEN A.A. (1997) - Risks and economic consequences of introducing classical swine fever into the Netherlands by feeding swill to swine. *Revue Scientifique et Technique de l'office International des Epizooties*, 16 (1) : 207-214
- KADEN V. (1998) - Classical swine fever in wild boars - situation in the European Community and selected aspects of transmission of the disease. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 111(6):201-207
- KHIBNIK A.I., KUZNETSOV YU. A, LEVITIN V. V. & NIKOLAEV E.V. (1993) - Continuation techniques

- and interactive software for bifurcation analysis of ODEs and iterated maps. *Physica D*, 62, 360-371.
- KOSMIDOU A., BUTTNER R. & MEYERS G. (1998) - Isolation and characterization of cytopathogenic classical swine fever virus (CSFV). *Archives of Virology*, 143(7):1295-1309.
- READ A.P. (a cura di) (1995) - Genetics and Evolution of infectious diseases in natural populations - Group report. Pag. 450-477 in Grenfell B.T. e A.P.Dobson (Eds.), *Ecology of Infectious Diseases in Natural Populations*, Cambridge University Press, Cambridge.
- SAATKAMP H.W., DIJKHUIZEN A.A., GEERS R., HUIRNE R.B.M., NOORDHUIZEN J.P.T.M. & GOEDSEELS-V (1997) - Economic evaluation of national identification and recording systems for pigs in Belgium. *Preventive Veterinary Medicine*, 30(2):121-135.
- SCOTT M.E. & SMITH G. (1994) - *Parasitic and Infectious Diseases: Epidemiology and Ecology*. Academic Press, New York.
- SCHRAG, S. J. & WIENER P. (1995) - Emerging infectious disease: what are the relative roles of ecology and evolution? *Trends in Ecology and Evolution*, 10:319-324.
- STADEJEK T., VILCEK S., LOWINGS JP., BALLAGIPORDANY A., PATON DJ. & BELAK S. (1997) - Genetic heterogeneity of classical swine fever virus in Central Europe. *Virus Research*, 52 (2) : 195-204
- SZENT-IVÁNKY T. (1984) - La peste porcine classique: nouvelles méthodes de prophylaxie et d'éradication. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 3:487:505.
- TEUFFERT J., KRAMER M. & SCHLUTER H. (1998) - The epidemiology of classical swine fever (CSF) in Germany under special consideration of the tasks of the veterinary practitioners. *Praktische Tierarzt*. 79(SI):45-49
- VAN BAALEN M. & SABELIS M.W. (1995) - The scope for virulence management: a comment of Ewald's view on the evolution of virulence. *Trends in Microbiology*, 3: 414.
- VILCEK S. & BELAK S. (1998) - Classical swine fever virus: Discrimination between vaccine strains and European field viruses by restriction endonuclease cleavage of PCR amplicons. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 39(3):395-400
- VILCEK S. & PATON D.J. (1998) - Application of genetic methods to study the relationship between classical swine fever outbreaks. *Research in Veterinary Science*, 65(1):89-90
- WILSON M.E, LEVINS R. & SPIELMAN A. (Eds.) (1994) - *Diseases in Evolution: Global Changes and Emergence of Infectious Diseases*. New York Academy of Science, New York