

# AGGIORNAMENTO DEL QUADRO EPIDEMIOLOGICO DI ASCARIS SPP. IN ITALIA

GAMBETTA B.<sup>[1]</sup>, PERRONE V.<sup>[2]</sup>, GABRIELLI S.<sup>[1]</sup>, CAVALLERO S.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>*Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma ~ Roma ~ Italy,* <sup>[2]</sup>*Dipartimento di Prevenzione, Az.USL Roma B ~ Roma ~ Italy*

Keywords: *Ascaris*, ITS *cox2* genotyping, molecular epidemiology

## Riassunto

L'Italia è un Paese tradizionalmente votato alla suinocoltura dove le attività di monitoraggio sanitario degli allevamenti intensivi devono ancora tener conto dell'insorgenza di patologie che seppur definite "minimali" sono ancora in grado di produrre ingenti danni economici. Tra le patologie minimali, l'ascaridiosi nei suini è una infestazione che determina un ritardo nella crescita e la formazione sulla superficie del fegato di macchie biancastre (milk spot) limitando la commerciabilità della carne destinata al consumo umano. *Ascaris suum* e *Ascaris lumbricoides* infestano rispettivamente il suino e l'uomo e l'alta similarità morfologica e biologica tra i due taxa li pone ancora al centro di un dibattito circa l'appartenenza o meno alla stessa specie, secondo il concetto biologico. Infatti, tra *Ascaris* spp. Dell'uomo e del suino è stata dimostrata sia la presenza di flusso genico sia una differenza del genoma mitocondriale di un valore molto più basso di quello che solitamente distingue due specie. Studi di epidemiologia molecolare hanno dimostrato che la fonte di infestazione in Italia, dove l'ascariasi umana mostra ormai una bassa prevalenza, è principalmente il suino. Analisi filogenetiche eseguite su sequenze mitocondriali di esemplari di *Ascaris* spp. Umano e suino da regioni geografiche endemiche e non endemiche hanno mostrato relazioni evolutive molto vicine. Lo scopo del presente studio è stato quello di caratterizzare esemplari di *Ascaris* spp. Ottenuti da suini e da uomini campionati in Italia, per identificare l'agente eziologico dell'ascariasi umana nel nostro territorio e per osservare i genotipi circolanti nei suini, per un ulteriore aggiornamento dell'epidemiologia molecolare.

## Abstract

Italy is a traditionally pig farming voted country and the veterinary monitoring activities for intensive farms still must take into account the outbreak of "minimal" pathologies that may cause significant economic damages. Ascariidiosis is one of the minimal pathologies that affect pigs, eliciting a growth deficit and "milk spots" lesions on the liver surface, limiting the meat marketability. *Ascaris suum* and *Ascaris lumbricoides* infect pigs and humans, respectively. Their taxonomic uncertainty is based on the high morphological and biological similarities and scientific community suggests that they belong to the same species. In particular, recent findings demonstrated the presence of gene flow between human and pig *Ascaris* spp. and a low genetic variability in mtDNA. Molecular epidemiological studies showed that the source of infection in Italy, a non endemic country for human ascariasis, is mostly the pig. Phylogenetic studies based on mtDNA sequences from human and pig *Ascaris* spp. originated from endemic and non endemic countries, showed very close evolutionary relationships. The aim of this study was to characterize at molecular level specimens of human and swine *Ascaris* spp. from Italy to distinguish the three genotypes (*sum*, *lumbricoides* and heterozygote) and to identify the aetiological agent of human ascariasis for an update of molecular epidemiology.

## INTRODUZIONE

L'ascaridiosi è considerata ancora ad oggi una malattia negletta tropicale nonostante infesti più di un miliardo di persone nel mondo prevalentemente nei paesi in via di sviluppo, mentre nei

paesi industrializzati compresa l'Italia è quasi scomparso. Anche *A. suum* è cosmopolita negli allevamenti suini e la sua prevalenza dipende dalle buone pratiche di gestione, ma solo pochi allevamenti ne sono completamente privi. L'infestazione suina può comportare una riduzione nella commercializzazione delle carni con un forte impatto sulla redditività delle attività dell'allevamento (10, 11). Lo status tassonomico dei due nematodi è attualmente oggetto di studio in quanto presentano similarità morfologiche, genetiche e biochimiche. Inoltre, diversi studi hanno mostrato la presenza di ibridi, flusso genico e trasmissione crociata e una differenza del genoma mitocondriale molto più bassa di quella che solitamente distingue due specie (3,5, 6). L'incertezza tassonomica causa notevoli difficoltà nella definizione dei contesti epidemiologici, che può comportare conseguenze negative sulla pianificazione delle strategie di controllo sia in ambito sanitario umano sia in quello veterinario. Nelle regioni non endemiche, come l'Europa e il Nord America, la trasmissione all'uomo è principalmente zoonosica, al contrario delle regioni altamente endemiche come ad esempio Cina, Guatemala e Africa dove il ciclo di trasmissione di *A. lumbricoides* e *A. suum* sembra essere distinto, ma studi più recenti hanno mostrato la presenza di infestazioni crociate e ibridi anche in Cina e in Uganda dove uomini e suini vivono in simpatia (1, 12). Inoltre, un recente caso-studio ha dimostrato la presenza di un ascaride con genotipo ibrido tra le due specie in un allevatore di suini della provincia di Cuneo (4). Studi di filogenesi eseguiti con lo scopo di indagare le relazioni evolutive tra esemplari provenienti da entrambi gli ospiti e da regioni endemiche e non endemiche, hanno permesso l'identificazione di tre cladi (A, B, C) dove gli aplogruppi non sembrano suddivisi seguendo criteri di endemicità o di affiliazione all'ospite, sebbene il clade C mostrava una stretta specificità per l'ospite suino (2, 3).

## **MATERIALI E METODI**

In questo studio sono stati analizzati 10 esemplari da uomo e 190 da suini provenienti da numerosi allevamenti italiani utilizzando l'analisi dei profili di restrizione della regione ribonucleare ITS (13), metodo che è in grado di differenziare il genotipo *A. suum*, *A. lumbricoides* e ibrido. Sono state inoltre analizzate le sequenze del gene mitocondriale *cox1* di un sottocampione rappresentativo usando il network della Parsimonia e la filogenesi Bayesiana per definire l'appartenenza al clade A, B o C.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **Risultati**

I risultati totali sui profili di restrizione dell'ITS nei nematodi da uomo e suino mostrano un'origine suina in circa l'80% delle infestazioni. In entrambi gli ospiti è stata riscontrata la presenza di tutti e tre genotipi. La maggior parte delle infestazioni umane è dovuta al genotipo suino, confermando il potenziale zoonosico di *A. suum* in Italia (Figura 1), mentre le infestazioni suine mostrano una bassa percentuale della presenza del genotipo umano (6%). Le analisi filogenetiche (Figura 2) mostrano una distribuzione degli aplotipi mitocondriali in tre cladi (A, B e C) dove si riscontra la presenza di aplotipi condivisi da esemplari che provengono da entrambi gli ospiti in ogni clade. Anche il clade C mostra la presenza di due esemplari di origini umana, confermando i dati recentemente pubblicati da Betson et al., (2).

### **Discussione**

Gli allevamenti intensivi rappresentano un ambiente artificiale per i suini e l'ascaridiosi, come altre elmintiasi, è tuttora presente come malattia sub-clinica scarsamente sintomatica. Il persistere di questa parassitosi nell'allevamento intensivo del suino in Italia nonostante la disponibilità e l'uso di farmaci è di certo legato alla mancanza e/o costante attuazione di adeguate misure igieniche e di biosicurezza (7). Il rilievo di tale infestazione all'ispezione post-mortem al macello può essere considerato sia un valido indicatore del livello igienico-sanitario degli

allevamenti ma anche della loro redditività (8) sia come un osservatorio epidemiologico fondamentale per le attività di Sanità Pubblica Veterinaria per la prevenzione delle malattie diffuse (9). Studi precedenti sull'incidenza dell'ascaridiosi sui ricavi, sui costi variabili annuali e sulle performances alla macellazione in aziende suinicole piemontesi hanno evidenziato un impatto economico dell'infestazione più ingente negli allevamenti a ciclo aperto caratterizzati da alta prevalenza di *A. suum* (8). I risultati totali della presente indagine molecolare sui nematodi rinvenuti in suini provenienti da allevamenti intensivi non hanno mostrato alcuna differenza genetica fissata tra gli esemplari di *Ascaris* spp. di origine suina e umana e le analisi dei pattern di restrizione dell'ITS hanno confermato l'alto potenziale zoonotico in Italia. Le analisi filogenetiche basate sulle sequenze della regione mitocondriale della *cox1* hanno mostrato che la segregazione degli aplotipi non segue alcun criterio di origine geografica o di affiliazione all'ospite, ma la maggior parte della variabilità genetica viene osservata a livello individuale e di popolazione, sostenendo l'ipotesi che i due taxa rappresentano due varianti della stessa specie.

## BIBLIOGRAFIA

- 1- Betson, M., Nejsumb, P., Llewellyn-Hughes, J., Griffin, C., Atuhaire, A., Arinaitwe, M., Adriko, M., Ruggiana, A., Turyakira, G., Kabatereine, N.B., and Stothard J.R. (2012). Genetic diversity of *Ascaris* in southwestern Uganda. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* 106, 75–83.
- 2- Betson, M., Nejsumb, P., Bendall, R.P., Deb, R.M., Stothard, J.R. (2014). Molecular epidemiology of ascariasis: a global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs. *J. Infect. Dis.* 210, 932-41. doi: 10.1093/infdis/jiu193.
- 3- Cavallero, S., Snabel, V., Pacella, F., Perrone, V., D'Amelio, S. (2013). Phylogeographical studies of *Ascaris* spp. based on ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2170. doi: 10.1371/journal.pntd.0002170
- 4- Dutto, M., Petrosillo, N. (2013) Hybrid *Ascaris suum/lumbricoides* (Ascarididae) infestation in a pig farmer: a rare case of zoonotic ascariasis. *Cent Eur J Public Health* 4, 224-226.
- 5- Leles, D., Gardner, S.L., Reinhard, K., Iñiguez, A., and Araujo, A. (2012). Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species?. *Parasit. Vectors.* 5,42.
- 6- Liu, G.H., Wu, C.Y., Song, H.Q., Wei, S.J., Xu, M.J., Lin, R.Q., Zhao, G.H., Huang, S.Y., and Zhu, Y.Q. (2012). Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. *Gene* 492, 110–116.
- 7- Martelli, P. et al., (2013) *Le patologie del maiale*. Editore: Le Point Veterinaire Edizione: 9/2013.
- 8- Merlino, V., Massaglia, S., Verduna, T., Borra, D., Rambozzi, L. Incidenza dell'ascaridiosi suina sui costi di alimentazione e sulla PLV (Produzione lorda vendibile) aziendale: dati preliminari. *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini*, p. 121, XLI Meeting annuale 19-20 marzo 2015.
- 9- Perrone, V., Cito, G., Pacella, F., Cavallero, S., (2013) Elmintiasi in suini da allevamento intensivo: rilievi ispettivi al macello. *Summa. Animali da reddito.* 20, 19-27.
- 10- Razzini, P., Bignami, S., (2008) Ruolo del macello come osservatorio delle infestazioni da endoparassiti: aspetti sanitari ed economici. *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini*, p. 29, XXXIV Meeting annuale 13-14 maggio 2008.
- 11- Skallerup, P., Nejsumb, P., Jørgensen C.B., Göring H.H.H., Karlskov-Mortensen P., Archibald A.L., Fredholm M., Thamsborg S.M. (2012) Detection of a quantitative trait locus associated with resistance to *Ascaris suum* infection in pigs. *Int. J. Parasitol.* 42, 383-391.
- 12- Zhou, C., Li, M., Yuan, K., Deng, S., Peng, W. (2012). Pig *Ascaris*: an important source of human ascariasis in China. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1172-1177.
- 13- Zhu, X.Q., Chilton, N.B., Jacobs, D.E., Boes, J., and Gasser, R.B. (1999). Characterisation of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 29, 469-478.