

EPIDEMIOLOGIA E GENOTIPI DI *TOXOPLASMA GONDII* NEL CINGHIALE E IN SUINI DA ALLEVAMENTI CONVENZIONALI

EPIDEMIOLOGY AND GENOTYPES OF *TOXOPLASMA GONDII* IN WILD BOARS AND IN PIGS RAISED IN INTENSIVE FARMS

VILLA L., GAZZONIS A. L., MANFREDI M. T.

Dipartimento di Medicina Veterinaria (DIMEVET), Università degli Studi di Milano

Parole chiave: *Toxoplasma gondii*, suini, cinghiali

Key words: *Toxoplasma gondii*, pigs, wild boars

Riassunto

Per la possibile presenza di cisti tissutali, le carni di suini e cinghiali rappresentano una importante fonte di infezione da *Toxoplasma gondii* per l'uomo. Lo scopo dello studio è stato quello di valutare l'epidemiologia e i genotipi di *T. gondii* in suini e cinghiali in Nord Italia. Preliminarmente è stato eseguito uno screening sierologico (ELISA) per rilevare la circolazione dell'infezione; successivamente, sono state eseguite indagini di biologia molecolare (PCR) per valutare l'effettiva infettività delle carni e per determinare i genotipi del parassita circolanti. Sono stati raccolti campioni di sangue e di muscolo di 340 suini (189 suini all'ingrasso e 151 scrofe riproduttrici) provenienti da 23 allevamenti convenzionali della Pianura Padana e di 75 cinghiali sottoposti a prelievo venatorio nella Provincia del Verbano-Cusio-Ossola. Sono risultati positivi al test sierologico 14 suini (4,1%) con una prevalenza maggiore nelle scrofe (8,6%) rispetto ai suini all'ingrasso (0,5%). Le analisi molecolari hanno consentito di individuare in 8 soggetti i genotipi I, II e III del parassita. Tra i diversi allevamenti o anche all'interno dello stesso allevamento sono risultati circolare genotipi diversi. Relativamente ai cinghiali, 25 animali sono risultati positivi al test ELISA (33,8%) e di questi 3 anche in PCR, rilevandosi la circolazione del ceppo di tipo II. I risultati del presente studio confermano la circolazione di diversi genotipi di *T. gondii* in queste specie di suidi nel Nord Italia, con prevalenze maggiori nei cinghiali cacciati rispetto ai suini da allevamenti intensivi, e avvalorano l'importanza di monitorare e sorvegliare tale parassitosi dagli importanti risvolti zoonosici.

Abstract

Due to the possible presence of tissue cysts, meat from pigs and wild boars represent an important source of *Toxoplasma gondii* infection for humans. The aim of the study was to evaluate the epidemiology and genotypes of *Toxoplasma gondii* in pigs and wild boars in Northern Italy. Preliminarily, a serological screening (ELISA) was performed to evaluate the rate of infection; then, molecular biology techniques (PCR) were used to evaluate the actual infectivity of the meat and to determinate the genotypes of circulating parasites. Blood and muscle samples from 340 pigs (189 market pigs and 151 sows) raised in 23 intensive farms in the Pianura Padana, and from 75 wild boars hunted in the Provincia of Verbano-Cusio-Ossola, were collected. 14 pigs were found positive to the serological test (4,1%), the seroprevalence was higher in sows (8,6%) than in market pigs (0,5%). Molecular biology assays permitted to identify in 8 animals genotypes I, II and III of the parasite. Between different farms or also in the same farm, genotypes varied. For what concerns wild boars, 25 animals were found positive to ELISA (33,8%) and 3 of these also to PCR, noting the circulation of genotype II. The results of this study confirmed the presence of different *T. gondii* genotypes in these

species of Suidae in Northern Italy, with higher prevalences in wild boars than in pigs, and support the importance of monitoring and surveillance of this parasitosis with important zoonotic implications.

INTRODUZIONE

Toxoplasma gondii è un protozoo parassita ubiquitario appartenente al phylum Apicomplexa, in grado di infettare un ampio range di ospiti e di cellule diverse [1]. Il gatto domestico e altri felini selvatici sono gli ospiti definitivi di *Toxoplasma gondii*, mentre gli ospiti intermedi sono quasi tutte le specie di mammiferi e uccelli, compreso l'uomo.

L'uomo può infettarsi in diversi modi: mangiando carni crude o poco cotte di ospiti intermedi contenenti cisti tissutali, alimenti di origine vegetale contaminati da oocisti sporulate o ingerendo accidentalmente questi stadi, tramite trasfusione di sangue o trapianto d'organo e per via transplacentare da madre a feto.

I suini e gli ovicapri tra le specie domestiche e, tra gli animali selvatici, i cinghiali e i cervi, rappresentano le specie in cui si rileva una maggiore frequenza di cisti tissutali, e da qui l'importanza delle loro carni come fonte di infezione per l'uomo [2].

La toxoplasmosi è una delle più comuni malattie zoonotiche di origine parassitaria a livello mondiale e la più comune nell'Unione Europea [3]. Con un approccio basato su diversi criteri, la FAO e il WHO hanno incluso *Toxoplasma gondii* nella 'top ten' dei parassiti di origine alimentare più dannosi al mondo [4]. A livello europeo, l'EFSA riporta che nonostante la toxoplasmosi presenti la più alta incidenza umana tra le zoonosi parassitarie, nell'Unione Europea questa sia considerata una malattia sotto rilevata e sotto riportata. Infatti, benché gli Stati membri abbiano l'obbligo di riportare dati riguardanti la situazione epidemiologica per *Toxoplasma* (Direttiva 2003/99/CE), non sono disponibili dati rappresentativi né per gli esseri umani, né per gli animali e né per gli alimenti [5].

In diversi studi è stata evidenziata l'importanza dei genotipi di *Toxoplasma gondii* nel determinare la gravità della malattia nell'uomo. In particolare, i ceppi di tipo II, sono stati identificati come la causa di più del 70% dei casi umani di toxoplasmosi negli Stati Uniti e in Europa; invece, i ceppi di tipo I e quelli ricombinanti o atipici sono stati associati ad una più alta incidenza di toxoplasmosi oculare e di toxoplasmosi grave anche nei pazienti immunocompetenti [6, 7, 8, 9].

SCOPO DEL LAVORO

Ad oggi mancano dati epidemiologici rappresentativi e aggiornati riguardanti la prevalenza di *Toxoplasma gondii* nei suidi del Nord Italia. Pertanto, vista l'importanza delle carni di suini e cinghiali come fonte di infezione per l'uomo, il presente studio si è proposto di valutare l'epidemiologia di *Toxoplasma gondii* in suini da allevamenti convenzionali e in cinghiali sottoposti a prelievo venatorio nel Nord Italia, attraverso uno screening sierologico per valutare la circolazione dell'infezione, e la successiva analisi molecolare per valutare l'effettiva infettività delle carni e per determinare i genotipi del parassita circolanti tra le popolazioni di animali oggetto di studio.

MATERIALI E METODI

Descrizione dell'area

La suinicoltura italiana è concentrata nel Nord Italia: in particolare, la Lombardia è la regione italiana che alleva il maggior numero di suini e gli allevamenti suinicoli intensivi sono concentrati soprattutto nelle aree di pianura, mentre nelle aree collinari e montane la produzione suinicola è solo marginale. Quasi tutti gli allevamenti campionati appartengono alla cosiddetta Bassa Padana e in particolare alle province di Pavia, Lodi, Cremona, Mantova,

Milano e Brescia, una zona caratterizzata da un clima tipicamente continentale e da una forte umidità. Sono stati campionati anche un allevamento della provincia emiliana di Piacenza sui Colli Piacentini e un allevamento della Bassa Comasca, una zona della provincia di Como nell'Alta Pianura lombarda, entrambe zone caratterizzate comunque da un clima pressoché simile a quello della Pianura Padana.

I cinghiali campionati provengono dalla provincia del Verbano-Cusio-Ossola, situata nel Nord della regione Piemonte; in particolare, i cinghiali sono stati cacciati nei comuni di Verbania e dintorni, un territorio quasi interamente collinare e montuoso, con un clima variabile, da alpino a temperato, a seconda dell'altitudine della zona considerata, caratterizzato da inverni freddi, estati calde e forte piovosità.

Campionamento

Il campionamento dei suini è stato condotto da novembre 2015 a novembre 2016. Sono stati campionati complessivamente 340 suini (189 suini all'ingrasso e 151 scrofe riproduttrici) provenienti da 23 allevamenti convenzionali siti in Lombardia (Pianura Padana); per ogni azienda sono stati campionati in media 16 animali (min-max: 10-30). Per i suini campionati sono stati raccolti dati epidemiologici circa il management dell'allevamento. Durante la macellazione sono stati raccolti campioni di coagulo e di tessuto muscolare cardiaco, da cui sono stati ottenuti il siero per centrifugazione (4000 r.p.m., 5 minuti) e l'omogenato di tessuto miocardico (circa 50 grammi), in seguito stoccati a -20°C in attesa di analisi.

Il campionamento dei cinghiali è stato condotto nella stagione di caccia, indicativamente da ottobre a dicembre, nel corso di 2 anni consecutivi (2015 e 2016). Sono stati campionati 75 cinghiali (54 nel 2015 e 21 nel 2016) sottoposti a prelievo venatorio in Piemonte (Provincia del Verbano-Cusio-Ossola). Si precisa che il campionamento per la stagione 2016 è ancora in corso. I dati epidemiologici raccolti per i cinghiali sono l'età, il sesso, il peso e il luogo di abbattimento dell'animale. In questo caso, vista l'impossibilità di raccogliere campioni di sangue, sono stati raccolti soltanto campioni di tessuto muscolare diaframmatico, da cui sono stati ottenuti il succo di carne (meat juice) secondo la tecnica descritta da Nöckler et al. [10] e l'omogenato di tessuto muscolare, stoccati congelati a -20°C in attesa di analisi.

Sierologia

I campioni di siero dei suini e quelli di succo carneo dei cinghiali sono stati analizzati con ID Screen® Toxoplasmosis Indirect Multi-species (IDvet), un kit diagnostico ELISA indiretto progettato per la ricerca di anticorpi specifici di *Toxoplasma gondii* in siero, plasma o estratto di carne di ruminanti, cani, gatti e suini. Il test è stato eseguito seguendo la procedura indicata nelle istruzioni fornite dal produttore.

Analisi statistica

La prevalenza di infezione nel suino e nelle diverse categorie produttive considerate è stata calcolata secondo Bush et al. [11]. In analogia, la prevalenza di infezione è stata calcolata nel cinghiale e nelle diverse categorie considerate (classi di età, genere, anno di campionamento). Sui dati ottenuti nel cinghiale è stata condotta l'analisi dei fattori di rischio associati all'infezione da *T. gondii*. Un modello lineare generalizzato (GLM) è stato condotto utilizzando il logaritmo naturale dei valori SP% ELISA come variabile dipendente; le seguenti variabili risposta sono state introdotte nel modello completo: età (variabile ordinale: rosso, subadulto, adulto1, adulto2, adulto3, adulto4), genere (variabile categoria), peso (variabile continua). L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software SPSS.

Biologia molecolare

I suini e i cinghiali risultati positivi alla ricerca di anticorpi anti-*Toxoplasma gondii* nel siero

o nel meat juice sono stati sottoposti ad analisi molecolare. Campioni di omogenato di tessuto muscolare cardiaco (suini) o diaframmatico (cinghiali) sono stati processati per l'estrazione del DNA genomico utilizzando il kit commerciale NucleoSpin®Tissue (Macherey-Nagel). I campioni di DNA ottenuti sono stati analizzati mediante PCR nested secondo il protocollo descritto da Hurtado et al. [12] per il rilevamento di DNA di *Toxoplasma gondii*. Successivamente, sui campioni risultati positivi, è stata effettuata la genotipizzazione mediante PCR multilocus come descritto da Su et al. [13] e sequenziamento (Metabion, Martinsried, Germany).

Le sequenze ottenute sono state manualmente corrette e successivamente confrontate con sequenze note dei diversi genotipi di *T. gondii* depositate in GenBank utilizzando il programma Mega6 [14].

RISULTATI

Nei suini è stata rilevata una sieroprevalenza di 4,1% (14/340), registrandosi una prevalenza maggiore nelle scrofe (8,6%) rispetto agli ingrassi (0,5%). Le scrofe positive al test ELISA mostravano un valore S/P% medio di 91,59 (min 50,08-max 178,97); queste scrofe provenivano da 7 allevamenti delle province di Lodi, Pavia, Brescia e Sud di Milano. Il suino all'ingrasso positivo al test anticorpale presentava un valore S/P% pari a 174,5%; questo campione proveniva da un allevamento del Lodigiano, dal quale tra l'altro provenivano anche 3 delle scrofe positive (Figura 1). Delle 12 scrofe provenienti da 7 allevamenti analizzate, 8 provenienti da 5 allevamenti sono risultate positive alla PCR; non è stato possibile analizzare una scrofa in quanto di questa non si aveva a disposizione il tessuto muscolare cardiaco. Il suino all'ingrasso positivo al test sierologico è risultato positivo anche alla PCR; questo animale proveniva dallo stesso allevamento nel quale sono state trovate 3 scrofe positive al test ELISA, delle quali 2 positive anche in PCR. Per quanto riguarda la genotipizzazione delle scrofe, in tre animali è stato identificato il genotipo I, in altrettante tre il genotipo II e nelle altre due il genotipo III. In tre allevamenti è stato riscontrato un solo genotipo circolante, mentre è stato evidenziato come in due allevamenti circolassero due genotipi diversi del parassita (genotipi I e II in un allevamento e genotipi II e III nell'altro). La genotipizzazione del suino all'ingrasso positivo in PCR è in corso.

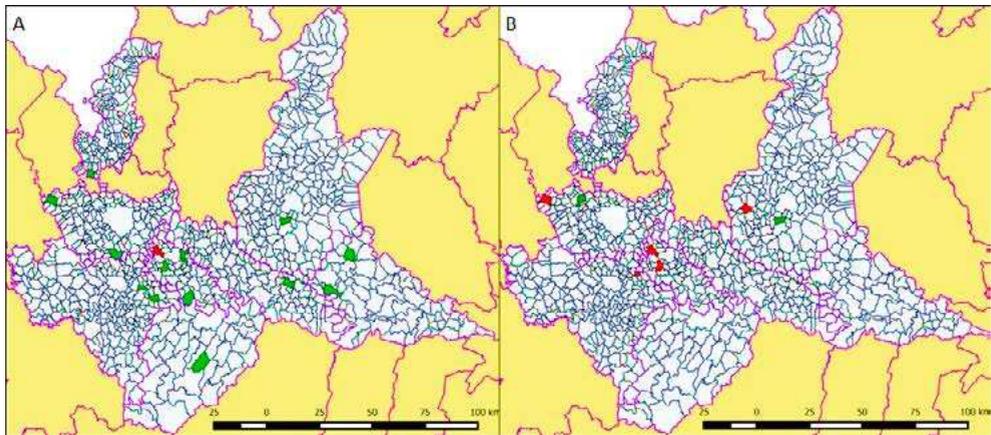


Figura 1. Distribuzione spaziale degli allevamenti di suini all'ingrasso (A) e di scrofe (B) campionati. In grigio scuro sono indicati i positivi, in grigio chiaro i negativi.

Figure 1. Map of location of sampled market pigs (A) and sows (B) farms. Positive farms are marked in dark grey, negative farms in light grey.

Nei cinghiali è stata rilevata una sieroprevalenza pari a 33,8% (25/74) e 4 campioni sono risultati dubbi in quanto aventi valore S/P% compreso tra 40 e 50%. Non è stato possibile analizzare un campione dei 54 raccolti nel 2015 in quanto il meat juice non era sufficiente. I campioni positivi in sierologia mostravano un valore S/P% medio pari a 99,24 (min 59-max 145); questi animali, così come quelli risultati dubbi, provenivano da 12 dei 14 comuni della provincia del Verbano-Cusio-Ossola dove sono stati abbattuti i cinghiali campionati (Figura 2). È stata rilevata una sieroprevalenza più alta nei cinghiali campionati nel 2015 (43,4%) rispetto a quelli del 2016 (9,5%); occorre tuttavia considerare che i dati del 2016 sono parziali essendo il campionamento ancora in corso. Per quanto riguarda i dati epidemiologici raccolti, è stata evidenziata una prevalenza maggiore negli animali giovani (40%) rispetto agli animali adulti (29,2%) e più alti valori di SP% in ELISA; considerando il sesso, la prevalenza di infezione negli esemplari femmine e in quelli maschi mostravano valori molto simili (P=33.3% e 34%, rispettivamente). L'analisi statistica mediante GLM non ha evidenziato alcuna associazione tra l'infezione e i fattori di rischio considerati, risultando tutte le variabili introdotte nel modello (età, sesso e peso) statisticamente non significative. Dei 25 cinghiali sieropositivi, 2 sono risultati positivi anche in PCR: i due esemplari provenivano dallo stesso comune, erano entrambi di sesso maschile, uno rosso e l'altro adulto 2, di 19 e 42 kg di peso, rispettivamente; in questi animali è stata dimostrata la circolazione del genotipo II. Anche uno dei cinghiali risultati dubbi al test ELISA è stato confermato positivo in PCR: si trattava di un esemplare adulto 2 maschio, di 45 kg di peso; per questo campione la determinazione del genotipo è in corso.

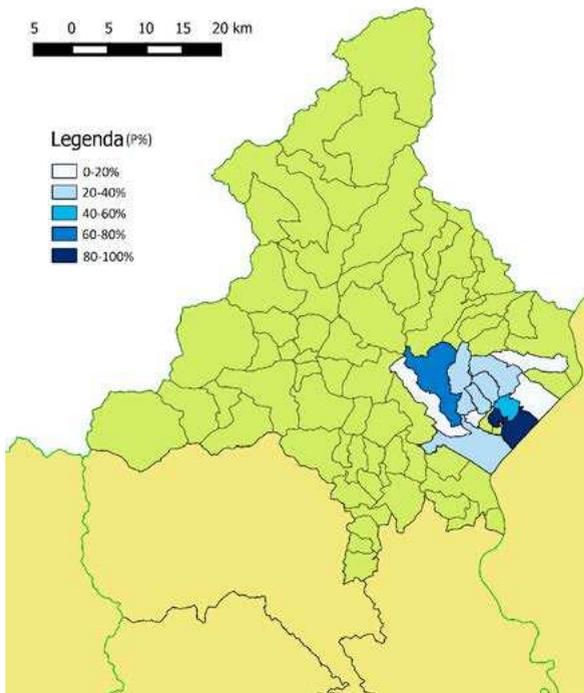


Figura 2. Distribuzione spaziale dei comuni della Provincia del Verbano-Cusio-Ossola nei quali è stato effettuato il prelievo venatorio dei cinghiali; a diversi colori corrisponde un diverso livello di sieroprevalenza.

Figure 2. Map of location of sampled districts of the Provincia of Verbano-Cusio-Ossola where wild boars were hunted; to different colours corresponds a different level of seroprevalence.

DISCUSSIONE

È stato dimostrato in diversi studi come in Europa il consumo di carne cruda o poco cotta infetta sia una delle principali vie di infezione da *Toxoplasma* nell'uomo [15, 16, 17]. L'EFSA, nell'opinione scientifica riguardante i pericoli per la salute pubblica da prendere in considerazione nell'ispezione sanitaria delle carni [18], ha incluso *Toxoplasma gondii* tra i patogeni zoonotici derivanti dal consumo di carne di suino, evidenziando inoltre l'importanza di sistemi di monitoraggio sierologici per diagnosticare le zoonosi subcliniche negli animali macellati, che non sono rilevabili con i metodi di ispezione tradizionali. Recentemente, sempre l'EFSA, ha pubblicato delle specificazioni tecniche riguardanti indicatori epidemiologici armonizzati per i pericoli biologici da considerare in sede di ispezione sanitaria delle carni di animali selvatici allevati [19], includendo anche *Toxoplasma gondii* nel cinghiale.

Per la valutazione della circolazione e la sorveglianza dell'infezione, le indagini sierologiche per *Toxoplasma gondii* negli animali domestici e selvatici rappresentano un importante mezzo diagnostico, considerando la persistenza a lungo termine di anticorpi specifici e la forte associazione tra sieropositività e infettività delle carni derivate [20]. Numerosi test sono stati messi a punti per la diagnosi sierologica dell'infezione da *T. gondii*. Per il presente lavoro è stato utilizzato un kit ELISA commerciale (ID Screen® Toxoplasmosis Indirect Multi-species, IDVET) sia per i suini che per i cinghiali, rispettivamente su siero e succo carneo. Questo ELISA ha mostrato ottime sensibilità (90%) e specificità (97,39%) ed una concordanza con IFA dell'87% nella determinazione di anticorpi anti-*Toxoplasma gondii* nei sieri di suino; inoltre, all'esame dei campioni di succo carneo, è stata osservata una concordanza sostanziale con i risultati ottenuti all'analisi del siero [21]. In particolare, il succo carneo è stato proposto come valida matrice alternativa per la ricerca di anticorpi di *Toxoplasma gondii* negli animali selvatici inclusi i cinghiali, in quanto nell'ambito dei prelievi venatori non è sempre possibile il campionamento ematico ante-mortem e vi sono ovvie difficoltà logistiche nell'ottenere campioni di siero anche dopo la morte dell'animale [22]. I tessuti muscolari più frequentemente utilizzati per ottenere il succo di carne sono i muscoli cardiaco e diaframmatico. Nel presente studio, il succo carneo usato per le indagini sierologiche dei cinghiali è stato ottenuto a partire da campioni di muscolo diaframmatico, che risulta essere uno dei muscoli più idonei per ottenere questo substrato per la ricerca di *Toxoplasma gondii* [23].

La sieroprevalenza riscontrata nei suini (4,1%) è in linea con altri studi europei [24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31], ma risulta più bassa di quella riportati in studi italiani recenti condotti in Centro Italia e nelle Isole Maggiori (Sicilia e Sardegna) (10-16%) [32, 33, 34]. La sieroprevalenza è risultata maggiore nelle scrofe (8,6%) rispetto ai suini all'ingrasso (0,5%), riscontro comune anche ad altri lavori [24, 27, 29, 32, 35, 36, 37, 38, 39, 40], nei quali è stato dimostrato come l'età rappresenti un importante fattore di rischio per l'infezione da *Toxoplasma gondii*: gli animali riproduttori, vivendo più a lungo, hanno maggiori possibilità di entrare a contatto con il parassita, oltre al fatto che l'immunità persiste per tutta la vita dell'animale.

Si è assistito ad una significativa riduzione della prevalenza di *Toxoplasma gondii* nei suini negli ultimi 20 anni: l'unico studio presente in letteratura condotto nel Nord Italia riporta una prevalenza del 64,4% [41]. Si sottolinea quindi l'importanza del management di allevamento e in particolare delle misure di biosicurezza per il controllo del parassita nei suini, soprattutto in relazione al confinamento degli animali, al controllo di gatti e roditori, così come di altri micromammiferi che possono veicolare *Toxoplasma*, e al controllo dell'acqua e degli alimenti a disposizione degli animali. Negli ultimi anni, vista la sempre maggiore sensibilità dei consumatori per tematiche di benessere animali, stanno assumendo sempre più importanza e diffusione le tipologie di allevamento cosiddette 'animal friendly'

e in particolare l'allevamento biologico e all'aperto. Diversi studi, condotti soprattutto in Olanda ma anche in altri Paesi europei, hanno evidenziato come queste tipologie di allevamento siano un importante fattore di rischio per la riemersione della parassitosi [25, 26, 42, 43].

La prevalenza dell'infezione riscontrata a livello sierologico si riflette nel grado di infettività delle carni. Infatti, dei 14 campioni risultati sieropositivi solo 10 sono stati confermati positivi all'analisi molecolare. Anche in altri studi è stato riportato un andamento simile [44, 45, 46, 47, 48]. La negatività della PCR in animali positivi al test sierologico può essere dovuta alla sensibilità della tecnica molecolare, alla limitata dimensione del campione, alla distribuzione irregolare delle cisti tissutali nella muscolatura, diversa inoltre nei vari organi e tessuti, e forse anche al basso numero di cisti tissutali nei tessuti dei suini testati [49]. Per le analisi di biologia molecolare è stato utilizzato l'omogenato di tessuto muscolare cardiaco dei suini campionati, in quanto il tessuto miocardico rappresenta uno dei siti di elezione dove riscontrare le cisti tissutali del parassita in questa specie ospite, come dimostrato in suini infettati sperimentalmente [50].

Successivamente, per la corretta valutazione del rischio rappresentato per l'uomo dal consumo di prodotti di origine animali, di fondamentale importanza è la determinazione del genotipo: infatti, a diversi genotipi descritti sono state attribuite diverse forme cliniche [20]. Ad oggi, vi sono solo pochi studi riguardanti i genotipi di *Toxoplasma gondii* attualmente circolanti in Italia negli animali domestici. In particolare, Bacci et al. [47] hanno evidenziato una predominanza dei pattern di Tipo II o di Tipo I/II in suini allevati in Nord Italia. Nel presente lavoro sono stati riscontrati tutti i 3 genotipi di *Toxoplasma gondii*, ovvero i Tipi I, II e III, variabili anche all'interno dello stesso allevamento. La forte diversità genotipica del parassita potrebbe portare a eventi di ricombinazione genetica, che potrebbero potenzialmente generare più ceppi con nuove proprietà biologiche, come una maggiore virulenza per l'uomo [54].

La sieroprevalenza riscontrata nei cinghiali (33,8%) è in linea con altri studi europei [28, 55, 56, 57, 58, 59, 60] e risulta leggermente più alta di quella riscontrata finora in Italia (14-18%) [32, 61, 62, 63]. È stata rilevata una prevalenza maggiore negli animali giovani (40%) rispetto agli adulti (29,2%). Ad oggi non è ancora chiaro se l'età sia o meno un fattore di rischio per la parassitosi nel cinghiale: vi sono infatti studi che hanno evidenziato una maggiore prevalenza nei giovani [64] e, al contrario, altri studi hanno riportato una prevalenza maggiore negli adulti, analogamente anche a quanto ormai assodato nel suino [60, 65, 66, 67, 68, 69], mentre in altri lavori non sono state rilevate differenze significative [58, 70, 71, 72, 73]; ad ogni modo per trarre conclusioni certe in merito alla persistenza dell'immunità per tutta la vita dell'animale sono necessari ulteriori studi [57]. Ancora, in questo lavoro, in accordo con altri studi [58, 71, 74], non è stata evidenziata una correlazione tra la sieroprevalenza di *Toxoplasma gondii* e il sesso dei cinghiali; vi sono altresì alcuni studi in cui il sesso femminile è risultato essere un fattore di rischio per la parassitosi [60, 72], mentre in un solo caso il sesso maschile è stato associato ad una maggiore prevalenza del parassita [66]. Inoltre, è stata evidenziata una prevalenza della parassitosi ben più alta nei campioni di cinghiali abbattuti nella stagione di caccia dell'anno 2015 rispetto all'anno 2016, rispettivamente pari a 43,4% e 9,5%. Le cause di tale discrepanza potrebbero essere legate ad una diminuzione della popolazione di cinghiali nella zona campionata a causa di un eccessivo abbattimento di animali e quindi una minore densità di popolazione, ma anche al cambiamento delle abitudini alimentari degli animali in base alle fonti di cibo disponibili, legate anche alla presenza di altre specie selvatiche; da considerare anche le condizioni climatiche, potenzialmente variabili tra un inverno e l'altro, che possono influenzare la sopravvivenza delle oocisti parassitarie in ambiente. Si tratta comunque di ipotesi aperte e ad oggi non è possibile trarre conclusioni certe a riguardo, in quanto il

campionamento per la stagione di caccia del 2016 è ancora in corso.

I cinghiali giocano un ruolo importante nel mantenere il ciclo selvatico del parassita (cinghiali – volpi – roditori – cinghiali), favorito anche dalle cattive pratiche dei cacciatori, che lasciano residui di carcasse di cinghiali nell'ambiente a disposizione di altri animali selvatici. Per questi motivi, i cinghiali sembrano essere indicatori ideali per capire le variazioni geografiche associate alla prevalenza della parassitosi in ambito selvatico [61]. Inoltre, vista la sempre maggiore probabilità di condividere lo stesso ambiente, l'infezione protozoaria negli animali selvatici potrebbe rappresentare un indicatore epidemiologico per il rischio di trasmissione agli animali domestici [2]. Pertanto, le informazioni sulla prevalenza della parassitosi nella fauna selvatica sono utili per valutare la contaminazione ambientale di *Toxoplasma* e il rischio associato per la salute pubblica [75].

La presenza di cisti tissutali di *T. gondii* è stata confermata nel presente studio in due animali, andamento simile anche ad altri lavori [44, 64, 76]. Le analisi di biologia molecolare sono state condotte sui campioni di tessuto diaframmatico dei cinghiali sottoposti a prelievo venatorio, essendo dimostrato come il diaframma rappresenti uno dei tessuti di elezione delle cisti tissutali parassitarie nei suidi [50]. Il genotipo riscontrato in questa specie è soltanto il II; tuttavia, come precedentemente evidenziato, il campionamento di questa specie è ancora in corso. La caratterizzazione del genotipo è particolarmente importante dato che, come suggerito da Grigg e Sundar [54], la ampia diversità di ceppi di *Toxoplasma gondii* infettanti varie prede nel ciclo selvatico può produrre nuovi ceppi in grado di espandersi clonalmente e quindi estendersi anche al ciclo domestico.

CONCLUSIONI

I dati ottenuti confermano l'importanza delle carni infette come fonte di infezione da *Toxoplasma gondii* per l'uomo e la necessità di piani di monitoraggio e sorveglianza per le specie domestiche e selvatiche destinate al consumo umano, in particolare suini, cinghiali, ovicaprini e cervi, che sono le specie animali in cui è stata dimostrata una maggiore frequenza di cisti tissutali nelle carni. Alcuni Autori hanno proposto la sierologia su succo carneo come mezzo di controllo per alcuni patogeni tra cui *Toxoplasma gondii*, in quanto in questo modo sarebbe possibile creare profili sierologici di allevamento ed andare ad implementare le misure di biosicurezza in allevamenti problematici [77, 78]; inoltre, *Toxoplasma gondii* potrebbe essere un valido strumento come marker di biosicurezza e di standard igienici dell'allevamento suinicolo.

Oltre al monitoraggio sierologico, si sottolinea ancora una volta l'importanza della biologia molecolare e soprattutto della genotipizzazione: in particolare, con la PCR multilocus a più geni è possibile valutare la possibile presenza di ricombinazioni genetiche del parassita e quindi lo sviluppo di ceppi ricombinanti e atipici, soprattutto in relazione agli animali selvatici, nei quali questi eventi potrebbero avvenire con più facilità, il che rappresenta a sua volta un rischio non trascurabile anche per gli animali allevati e quindi per l'uomo.

BIBLIOGRAFIA

1. Dubey JP. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2nd edn. Boca Raton, FL; 2010.
2. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*. 2000;30 12-13:1217-58.
3. ECDC/EFSA: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal*. 2014.
4. FAO/WHO: Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. vol. *Microbiological Risk Assessment Series*. Rome. 2014.

5. EFSA: Scientific Opinion on Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, foods and animals. vol. EFSA Journal. 2007.
6. Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessières MH, Thulliez P, Filisetti D, et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. J Infect Dis. 2002;186 5:684-9.
7. Carne B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, et al. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. J Clin Microbiol. 2002;40 11:4037-44.
8. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J Infect Dis. 1995;172 6:1561-6.
9. Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. J Infect Dis. 2001;184 5:633-9.
10. Nöckler K, Serrano FJ, Boireau P, Kapel CM, Pozio E. Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. Vet Parasitol. 2005;132 1-2:85-90.
11. Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. J Parasitol. 1997;83 4:575-83.
12. Hurtado A, Aduriz G, Moreno B, Barandika J, García-Pérez AL. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. Vet Parasitol. 2001;102 1-2:17-27.
13. Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. Parasitology. 2010;137 1:1-11.
14. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013;30 12:2725-9.
15. Baril L, Ancelle T, Goulet V, Thulliez P, Tirard-Fleury V, Carne B. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. Scand J Infect Dis. 1999;31 3:305-9.
16. Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, et al. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. BMJ. 2000;321 7254:142-7.
17. Kapperud G, Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Eskild A, Eng J. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Results of a prospective case-control study in Norway. Am J Epidemiol. 1996;144 4:405-12.
18. EFSA: Scientific opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat from swine. vol. EFSA Journal. 2011.
19. EFSA: Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat from farmed game. vol. EFSA Journal. 2013.
20. Dubey JP. Toxoplasmosis in pigs--the last 20 years. Vet Parasitol. 2009;164 2-4:89-103.
21. Veronesi F, Ranucci D, Papa P, Branciarri R, Miraglia D, Moretta I, et al. Comparison between a commercial ELISA and IFAT for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies on serum and meat juice of swine. Large Animal Review. 2012;18:65-70.
22. Coelho C, Lopes AP, Mesquita JR, Cardoso L, Vieira-Pinto M. *Toxoplasma gondii* Infection in Hunted Wild Boars (*Sus scrofa*): Heart Meat Juice as an Alternative Sample to Serum for the Detection of Antibodies. Ecohealth. 2015;12 4:685-8.
23. Wallander C, Frössling J, Vågsholm I, Burrells A, Lundén A. "Meat juice" is not a homogeneous serological matrix. Foodborne Pathog Dis. 2015;12 4:280-8.

24. Edelhofer R. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in pigs in Austria-an evaluation of data from 1982 and 1992. *Parasitol Res.* 1994;80 8:642-4.
25. Kijlstra A, Eissen OA, Cornelissen J, Munniksma K, Eijck I, Kortbeek T. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45 9:3165-9.
26. van der Giessen J, Fonville M, Bouwknecht M, Langelaar M, Vollema A. Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing systems in The Netherlands. *Vet Parasitol.* 2007;148 3-4:371-4.
27. Paștiu AI, Györke A, Blaga R, Mircean V, Rosenthal BM, Cozma V. In Romania, exposure to *Toxoplasma gondii* occurs twice as often in swine raised for familial consumption as in hunted wild boar, but occurs rarely, if ever, among fattening pigs raised in confinement. *Parasitol Res.* 2013;112 6:2403-7.
28. Deksne G, Kirjušina M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Latvia. *J Parasitol.* 2013;99 1:44-7.
29. Turčeková L, Antolová D, Reiterová K, Spišák F. Occurrence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in naturally infected pigs. *Acta Parasitol.* 2013;58 3:361-6.
30. Djokic V, Blaga R, Aubert D, Durand B, Perret C, Geers R, et al. *Toxoplasma gondii* infection in pork produced in France. *Parasitology.* 2016;143 5:557-67.
31. Wallander C, Frössling J, Dórea FC, Uggla A, Vågsholm I, Lundén A. Pasture is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection in fattening pigs. *Vet Parasitol.* 2016;224:27-32.
32. Scala A, Giobbe M, Mula P, Pipia AP, Sanna-Coccone GN, Firinu A, et al. Toxoplasmosis: a seroepidemiological survey in pigs and boars of Sardinia. *Parassitologia.* 2008;50 1-2:235.
33. Veronesi F, Ranucci D, Branciarri R, Miraglia D, Mammoli R, Fioretti DP. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection on finishing swine reared in the Umbria region, central Italy. *Zoonoses Public Health.* 2011;58 3:178-84.
34. Villari S, Vesco G, Petersen E, Crispo A, Buffolano W. Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. *Vet Parasitol.* 2009;161 1-2:1-8.
35. van Knapen F, Kremers AF, Franchimont JH, Narucka U. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cattle and swine in The Netherlands: towards an integrated control of livestock production. *Vet Q.* 1995;17 3:87-91.
36. Lundén A, Lind P, Engvall EO, Gustavsson K, Uggla A, Vågsholm I. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in pigs slaughtered in Sweden. *Scand J Infect Dis.* 2002;34 5:362-5.
37. García-Bocanegra I, Simon-Grifé M, Dubey JP, Casal J, Martín GE, Cabezón O, et al. Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic pigs from Spain. *Parasitol Int.* 2010;59 3:421-6.
38. Klun I, Vujančić M, Yera H, Nikolić A, Ivović V, Bobić B, et al. *Toxoplasma gondii* infection in slaughter pigs in Serbia: seroprevalence and demonstration of parasites in blood. *Vet Res.* 2011;42:17.
39. Lopes AP, Dubey JP, Neto F, Rodrigues A, Martins T, Rodrigues M, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, goats and pigs from the North of Portugal for human consumption. *Vet Parasitol.* 2013;193 1-3:266-9.
40. Djokic V, Fablet C, Blaga R, Rose N, Perret C, Djurkovic-Djakovic O, et al. Factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in confined farrow-to-finish pig herds in western France: an exploratory study in 60 herds. *Parasit Vectors.* 2016;9:466.

41. Genchi C, Polidori GA, Zaghini L, Lanfranchi P. Aspetti epidemiologici della Toxoplasmosi nell'allevamento intensivo del suino. *Archivio Veterinario Italiano*. 1991;42 3:105-11.
42. de Buhr K, Ludewig M, Fehlhaber K. *Toxoplasma gondii*-seroprevalence— current results in German swine herds. *Arch Lebensmittelhygiene*. 2008;59:5-8.
43. Slany M, Reslova N, Babak V, Lorencova A. Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in pork meat from different production systems in the Czech Republic. *Int J Food Microbiol*. 2016;238:252-5.
44. Berger-Schoch AE, Herrmann DC, Schares G, Müller N, Bernet D, Gottstein B, et al. Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in feline faeces (oocysts) and meat from sheep, cattle and pigs in Switzerland. *Vet Parasitol*. 2011;177 3-4:290-7.
45. Samico Fernandes EF, Samico Fernandes MF, Kim PC, de Albuquerque PP, de Souza Neto OL, de S Santos A, et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in slaughtered pigs in the state of Pernambuco, Brazil. *J Parasitol*. 2012;98 3:690-1.
46. Esteves F, Aguiar D, Rosado J, Costa ML, de Sousa B, Antunes F, et al. *Toxoplasma gondii* prevalence in cats from Lisbon and in pigs from centre and south of Portugal. *Vet Parasitol*. 2014;200 1-2:8-12.
47. Bacci C, Vismarra A, Mangia C, Bonardi S, Bruini I, Genchi M, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range, organic pigs in Italy using serological and molecular methods. *Int J Food Microbiol*. 2015;202:54-6.
48. Bamba S, Halos L, Tarnagda Z, Alanio A, Macé P, Moukoury S, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and direct genotyping using minisequencing in free-range pigs in Burkina Faso. *Int J Food Microbiol*. 2016;230:10-5.
49. Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP, Lunney JK, Gamble HR. Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. *Vet Parasitol*. 2006;141 1-2:9-17.
50. Juránková J, Basso W, Neumayerová H, Baláž V, Jánová E, Sidler X, et al. Brain is the predilection site of *Toxoplasma gondii* in experimentally inoculated pigs as revealed by magnetic capture and real-time PCR. *Food Microbiol*. 2014;38:167-70.
51. de Sousa S, Ajzenberg D, Canada N, Freire L, da Costa JM, Dardé ML, et al. Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. *Vet Parasitol*. 2006;135 2:133-6.
52. Sousa S, Canada N, Correia da Costa JM, Dardé ML. Serotyping of naturally *Toxoplasma gondii* infected meat-producing animals. *Vet Parasitol*. 2010;169 1-2:24-8.
53. Lopes AP, Vilares A, Neto F, Rodrigues A, Martins T, Ferreira I, et al. Genotyping Characterization of *Toxoplasma gondii* in Cattle, Sheep, Goats and Swine from the North of Portugal. *Iran J Parasitol*. 2015;10 3:465-72.
54. Grigg ME, Sundar N. Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. *Int J Parasitol*. 2009;39 8:925-33.
55. Bártová E, Sedlák K, Literák I. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in wild boars in the Czech Republic. *Vet Parasitol*. 2006;142 1-2:150-3.
56. Ruiz-Fons F, Vicente J, Vidal D, Höfle U, Villanúa D, Gauss C, et al. Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology*. 2006;65 4:731-43.
57. Opsteegh M, Swart A, Fonville M, Dekkers L, van der Giessen J. Age-related *Toxoplasma gondii* seroprevalence in Dutch wild boar inconsistent with lifelong persistence of antibodies. *PLoS One*. 2011;6 1:e16240.

58. Jokelainen P, Velström K, Lassen B. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild boars hunted for human consumption in Estonia. *Acta Vet Scand.* 2015;57:42.
59. Witkowski L, Czopowicz M, Nagy DA, Potarniche AV, Aoanei MA, Imomov N, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boars, red deer and roe deer in Poland. *Parasite.* 2015;22:17.
60. Reiterová K, Špilovská S, Blaňarová L, Derdáková M, Čobádiová A, Hisira V. Wild boar (*Sus scrofa*) - reservoir host of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Anaplasma phagocytophilum* in Slovakia. *Acta Parasitol.* 2016;61 2:255-60.
61. Ranucci D, Veronesi F, Moretti A, Branciaro R, Miraglia D, Manfredi MT, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boars (*Sus scrofa*) from Central Italy. *Parasite.* 2013;20:48.
62. Ferroglio E, Bosio F, Trisciuglio A, Zanet S. *Toxoplasma gondii* in sympatric wild herbivores and carnivores: epidemiology of infection in the Western Alps. *Parasit Vectors.* 2014;7:196.
63. Sarno E, Costanzo N, Quaranta V, Santoro AML, Stephan R. Prevalence of IgG against hepatitis E virus, *Salmonella* spp., and *Toxoplasma gondii* in meat juice samples from wild boars hunted in Southern Italy. *Journal of Food Safety and Food Quality-Archiv Fur Lebensmittelhygiene.* 2014;65 6:141-4.
64. Luptakova L, Balent P, Valencakova A, Hisira V, Petrovova E. Detection of *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon* spp. in wild boars by serological and molecular methods. *Revue De Medecine Veterinaire.* 2010;161 12:559-63.
65. Calero-Bernal R, Pérez-Martín JE, Reina D, Serrano FJ, Frontera E, Fuentes I, et al. Detection of Zoonotic Protozoa *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis suihominis* in Wild Boars from Spain. *Zoonoses Public Health.* 2016;63 5:346-50.
66. Coelho C, Vieira-Pinto M, Faria AS, Vale-Gonçalves H, Veloso O, Paiva-Cardoso M, et al. Serological evidence of *Toxoplasma gondii* in hunted wild boar from Portugal. *Vet Parasitol.* 2014;202 3-4:310-2.
67. Račka K, Bártová E, Budíková M, Vodrážka P. Survey of *Toxoplasma gondii* antibodies in meat juice of wild boar (*Sus scrofa*) in several districts of the Czech Republic. *Ann Agric Environ Med.* 2015;22 2:231-5.
68. Wallander C, Frössling J, Vågsholm I, Uggla A, Lundén A. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in wild boars (*Sus scrofa*) in Sweden and evaluation of ELISA test performance. *Epidemiol Infect.* 2015;143 9:1913-21.
69. Richomme C, Aubert D, Gilot-Fromont E, Ajzenberg D, Mercier A, Ducrot C, et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. *Vet Parasitol.* 2009;164 2-4:296-300.
70. Antolová D, Reiterová K, Dubinský P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boars (*Sus scrofa*) in the Slovak Republic. *Ann Agric Environ Med.* 2007;14 1:71-3.
71. Gauss CB, Dubey JP, Vidal D, Ruiz F, Vicente J, Marco I, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild pigs (*Sus scrofa*) from Spain. *Vet Parasitol.* 2005;131 1-2:151-6.
72. Jokelainen P, Näreaho A, Hälli O, Heinonen M, Sukura A. Farmed wild boars exposed to *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp. *Vet Parasitol.* 2012;187 1-2:323-7.
73. Richomme C, Afonso E, Tolon V, Ducrot C, Halos L, Alliot A, et al. Seroprevalence and factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in wild boar (*Sus scrofa*) in a Mediterranean island. *Epidemiol Infect.* 2010;138 9:1257-66.
74. Closa-Sebastia F, Casas-Diaz E, Cuenca R, Lavin S, Mentaberre G, Marco I. Antibodies to selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) from Catalonia (NE Spain). *European Journal of Wildlife Research.* 2011;57 4:977-81.

75. Dubey JP, Jones JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol.* 2008;38 11:1257-78.
76. Magnino S, Frasnelli M, Fabbi M, Bianchi A, Zanoni MG, Merialdi G, et al. The monitoring of selected zoonotic diseases of wildlife in Lombardy and Emilia-Romagna, northern Italy. *Game Meat Hygiene in Focus: Microbiology, Epidemiology, Risk Analysis and Quality Assurance*; 2011. p. 223-44.
77. Felin E, Jukola E, Raulo S, Fredriksson-Ahomaa M. Meat Juice Serology and Improved Food Chain Information as Control Tools for Pork-Related Public Health Hazards. *Zoonoses Public Health.* 2015;62 6:456-64.
78. Meemken D, Tangemann AH, Meermeier D, Gundlach S, Mischok D, Greiner M, et al. Establishment of serological herd profiles for zoonoses and production diseases in pigs by “meat juice multi-serology”. *Prev Vet Med.* 2014;113 4:589-98.