

PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2013”

RELAZIONE FINALE

N. identificativo progetto: IZS LT 02/13 RC

SINTESI DEL PROGETTO

Titolo: Indagine multidisciplinare su agenti patogeni zoonosici in popolazioni di cinghiali delle Regioni Lazio e Toscana.

Identificativo progetto: IZS LT 02/13 RC

Recapito Responsabile progetto: antonio.battisti@izslt.it

Parole chiave: zoonosi, cinghiale, Sanità Pubblica, diagnosi.

Obiettivi

L'obiettivo generale del progetto è stato quello di realizzare uno studio su alcuni importanti agenti zoonosici in popolazioni di cinghiali del Lazio e della Toscana abbattuti/catturati durante le stagioni di caccia 2013-2016. I campioni sono stati effettuati presso centri di raccolta e/o macelli.

In particolare gli scopi del progetto erano:

- Valutare la presenza e stimare la prevalenza di alcuni agenti zoonosici in popolazioni di cinghiali del Lazio e della Toscana abbattuti/catturati durante il periodo di studio, andando a prelevare diversi campioni (campioni biologici di vario tipo dagli animali abbattuti, carni).
- Acquisire informazioni per permettere di valutare il significato epidemiologico di questa specie, per i vari agenti patogeni oggetto di studio, sia in termini di rischio per la salute pubblica che di rischio per le popolazioni di animali domestici.
- Fornire informazioni necessarie alle Autorità Competenti per l'elaborazione di proposte operative utili ad una corretta gestione delle popolazioni di cinghiali nelle aree oggetto di studio.

Metodologia e Risultati

In primo luogo sono state aggiornate le conoscenze bibliografiche inerenti gli aspetti epidemiologici, diagnostici e patogenetici degli agenti da ricercare nella specie cinghiale. Sono stati poi raccolti dati sulle popolazioni di cinghiali nelle aree oggetto di studio e definite le tempistiche dei prelievi e la numerosità campionaria. Sono state quindi messe a punto schede di prelievo per la raccolta dei campioni inerenti il progetto di ricerca e stabilite le modalità operative di prelievo e di conferimento dei campioni.

Dalla principale area di studio (provincia di Viterbo) sono stati campionati 188 cinghiali di cui 89 maschi (47,3%), 90 femmine (47,9%) e 9 animali in cui il sesso non era specificato (4,8%). Altri 43 animali, di cui 26 maschi (60,5%), 14 femmine (32,6%) e 3 animali in cui il sesso non era specificato (7%) sono stati campionati da tre province della regione Toscana (FI, PT, PO). Complessivamente, dei 231 animali campionati in prevalenza (53,7%) si trattava di animali adulti con una età stimata >24 mesi ed un peso >50 kg.

I campioni da prelevare per ogni soggetto erano i seguenti: tamponi nasali (n=2), siero da coagulo intracardiaco, e/o in alternativa una porzione di polmone (10 gr.), linfonodi della testa (mandibolari e retrofaringei), milza, contenuto del grosso intestino, linfonodi ileocecali, muscolo scheletrico profondo, muscolo diaframmatico, cistifellea, eventuali altri organi con lesioni evidenti.

Gli agenti zoonosici oggetto di ricerca e le prove eseguite erano i seguenti:

- Test diretti per *Staphylococcus aureus* dai tamponi nasali.
- Test indiretti per *Brucella spp.* dal siero ottenuto dal coagulo intracardiaco, e/o in alternativa da estratto d'organo da una porzione di polmone (10 gr.).
- Test diretti per *Brucella spp.* dai linfonodi della testa e dalla milza.
- Test anatomo-istopatologici e colturali per *Mycobacterium spp.* dai linfonodi/organi con lesioni riferibili a tubercolosi.
- Test diretti per *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia enterocolitica* ed *Escherichia coli* dal contenuto intestinale (grosso intestino) e dal muscolo scheletrico.
- Test diretti per *Salmonella spp.* dai linfonodi ileo-cecali.
- Test diretti per *Trichinella spp.* dal muscolo diaframmatico.

I campioni di tutte le tipologie sono stati esaminati individualmente. Per gli esami colturali e parassitologici sono state utilizzate tecniche standard accreditate, seguendo i metodi ISO qualora previsti, o seguendo metodiche standard internazionali (es: Manuale OIE). Per *Mycobacterium spp.* è stato applicato uno schema di test "in serie" valutando prima la presenza di lesioni anatomiche macroscopiche riferibili a tubercolosi e qualora presenti, eseguendo analisi anatomo-istopatologiche e colturali.

Gli agenti isolati/identificati sono stati caratterizzati dal punto di vista fenotipico e genotipico, mediante l'impiego di tecniche microbiologiche quali-quantitative e biomolecolari (es.: PCR, sequenziamento ed analisi delle sequenze ottenute).

Nelle tabelle 1, 2 e 3 sono riportati i risultati delle analisi eseguite e gli agenti zoonosici riscontrati nelle diverse aree di studio.

Tabella 1. Agenti zoonosici riscontrati nei campioni biologici prelevati da animali abbattuti nella provincia di Viterbo.

Tipo di agente	N. animali positivi/188 esaminati	% di positività
<i>Mycobacterium spp.*</i>	0	0,0
<i>Brucella spp.</i> esame sierologico (RBPT)	9	4,8
<i>Brucella spp.</i> esame sierologico (FdC)	21	11,2
<i>Brucella spp.</i> esame colturale/PCR	1	0,5
<i>Trichinella spp.</i>	0	0,0
<i>Salmonella spp.</i>	8	4,3
<i>Campylobacter spp.</i>	57	30,3
<i>Campylobacter jejuni</i>	2	1,1
<i>Campylobacter coli</i>	7	3,7
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	2	1,1
<i>Campylobacter lanienae</i>	20	10,6
<i>Campylobacter</i> non identificati a livello di specie	26	13,8
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2	1,1
<i>E. coli</i> enteropatogeno (<i>eae+</i>)	12	6,4
<i>E. coli</i> STEC/VTEC (<i>stx-1/ stx-2+</i>)	0	0,0
<i>E. coli</i> enteroaggregativi	0	0,0

MSSA [^]	24	12,8
MRSA	0	0,0
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> ^{^^}	7	3,7
MRSP	2	1,1
Gene <i>mecA/mecC</i> ^{**}	2	1,1

*Inviati presso la U.O. 4 linfonodi per esami istologici da 23 animali.

**Ricerca effettuata a partire da tutti gli Staphylococchi coagulasi positivi isolati.

[^]Quattro isolati positivi per il gene *blaZ*.

^{^^}Tre isolati positivi per il gene *blaZ*.

Tabella 2. Agenti zoonosici riscontrati nei campioni di muscolo scheletrico prelevati da animali abbattuti nella provincia di Viterbo.

Tipo di agente	N. animali positivi/188 esaminati	% di positività
<i>Salmonella spp.</i>	0	0,0
<i>Campylobacter spp.</i>	0	0,0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	6	3,2
<i>E. coli</i> enteropatogeno (<i>ae+</i> *)	7	3,7
<i>E. coli</i> STEC/VTEC (<i>stx-1/ stx-2+*</i>)	15	8,0

* Geni identificati soltanto nel brodo colturale e non dalle singole colonie.

Tabella 3. Agenti zoonosici riscontrati nei campioni biologici prelevati da animali abbattuti in Toscana.

Tipo di agente	N. animali positivi/43 esaminati	% di positività
<i>Mycobacterium spp.</i>	0	0,0
<i>Brucella spp.</i> esame sierologico (RBPT)	0	0,0
<i>Brucella spp.</i> esame sierologico (FdC)	2	4,7
<i>Brucella spp.</i> esame colturale	0	0,0
<i>Trichinella spp.</i>	0	0,0
<i>Salmonella spp.</i>	1	2,3
<i>Campylobacter spp.</i>	0	0,0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	6	14,0
<i>E. coli</i> enteropatogeno (<i>ae+</i>)	2	4,7
<i>E. coli</i> STEC/VTEC (<i>stx-1/ stx-2+*</i>)	0	0,0
<i>E. coli</i> enteroaggregativi	0	0,0
MSSA [^]	12	27,9
MRSA	0	0,0
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> ^{^^}	1	2,3
MRSP	0	0,0
Gene <i>mecA/mecC</i> [*]	0	0,0

*Ricerca effettuata a partire da tutti gli Staphylococchi coagulasi positivi isolati.

[^]Nessun isolato positivo per il gene *blaZ*.

^{^^}Un isolato positivo per il gene *blaZ*.

Discussione e Conclusioni

La numerosità campionaria raggiunta è stata conforme a quanto prefissato negli obiettivi del progetto (numerosità in grado di rilevare almeno un “positivo”, qualora la prevalenza minima tra i vari agenti nella popolazione sia di almeno il 2,0%, con CI 95%).

Nella maggior parte dei casi sono stati prelevati tutti i campioni previsti dal progetto ed il materiale è risultato conforme per l’esecuzione delle analisi. Trattandosi di animali selvatici e di campionamenti eseguiti in condizioni di campo ciò sta a testimoniare l’ottimo lavoro svolto dai

Servizi Veterinari (U.O. 8) che si sono avvalsi della collaborazione delle squadre di caccia coinvolte. A partire dai campioni di organo dei 231 animali esaminati non sono state rilevate evidenze microbiologiche di infezione da *Mycobacterium spp.*. In un caso è stata rilevata evidenza microbiologica (diagnosi diretta) di infezione da *Brucella spp.*, a fronte di un riscontro di diverse positività sierologiche (23 soggetti positivi alla fissazione del complemento (F.d.C.), seppur in genere a titolo non elevato (≤ 160). L'isolato identificato è risultato appartenere alla specie *Brucella suis* biovariante 2. Tutti gli animali sono risultati negativi per *Trichinella spp.*

Gli agenti zoonosici maggiormente riscontrati sono stati:

-*Campylobacter spp.* Il contenuto intestinale del 30,3% degli animali provenienti dalla provincia di Viterbo è risultato positivo. Solo in rari casi sono stati isolati *Campylobacter jejuni* (1,1%) o *Campylobacter coli* (3,7%). In alcuni casi, dopo aver escluso la presenza *Campylobacter jejuni/coli*, specie considerate rilevanti per la Sanità Pubblica e/o Veterinaria, è stato deciso riportare la sola identificazione a livello di genere. Nessun *Campylobacter spp.* è stato isolato né da campioni di muscolo, né da campioni prelevati in Toscana.

-*Staphylococcus aureus* meticillino sensibili (MSSA). I tamponi nasali del 12,8% degli animali campionati in provincia di Viterbo e del 27,9% degli animali campionati in Toscana sono risultati positivi. La presenza di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti (MRSA) non è stata rilevata, mentre è stata rilevata la presenza del gene *mecA*, responsabile della resistenza nei confronti dei beta-lattamici, in due degli 8 isolati di *Staphylococcus pseudintermedius* identificati.

-*Escherichia coli* patogeni. Dal contenuto intestinale del 6,4% degli animali provenienti dalla provincia di Viterbo e del 4,7% degli animali provenienti dalla Toscana sono stati isolati *Escherichia coli* provvisti del fattore di adesione definito intimina (gene *eae*). È importante inoltre sottolineare che in nessuno di essi è stata rilevata la presenza di geni codificanti per Shiga-tossine (*stx-1/stx-2*) tipiche degli *Escherichia coli* produttori di verocitotossine (VTEC o STEC), la cui contemporanea presenza a fattori di adesione in uno stesso isolato costituisce un corredo genetico tipico di *E. coli* di particolare significato zoonosico per l'uomo, come ad esempio *E. coli* enteroemorragici (EHEC) ed *E. coli* associati a sequele particolarmente severe ed invalidanti (es. sindrome e molitico uremica) in età neonatale/infantile.. La ricerca di *Escherichia coli* produttori di verocitotossine nel muscolo scheletrico degli animali ha permesso di rilevare alcuni campioni positivi per i geni *eae* (3,7%) e *stx-1/stx-2* (8,0%). Questi geni sono stati tuttavia identificati soltanto nel brodo colturale e non dalle singole colonie, il che sta ad indicare una presunta presenza.

-*Salmonella spp.* La presenza di *Salmonella spp.* è stata rilevata nel 4,3% degli animali (contenuto intestinale e/o linfonodi ilieocecali) provenienti dalla provincia di Viterbo. I ceppi riscontrati appartenevano a diversi sottospecie/sierovaranti: *Salmonella enterica subsp. houtenae IV*, *Salmonella* Kottbus, *Salmonella enterica subsp. diarizonae IIIb*, *Salmonella enterica subsp. arizonae IIIa*, *Salmonella* Stanleyville ed un isolato in fase R non tipizzabile sierologicamente. Al contrario l'unico isolato dalla Toscana apparteneva alla sierotipo *Salmonella* Typhimurium, variante monofasica. Nessun isolato veniva rilevato in campioni di muscolo scheletrico.

-*Yersinia enterocolitica*. La presenza di *Yersinia enterocolitica* è stata rilevata nel contenuto intestinale di soli due animali (1,1%) provenienti dalla provincia di Viterbo e nel 14,0% degli animali provenienti dalla Toscana. La percentuale di positività per *Yersinia enterocolitica* sui campioni di muscolo scheletrico è stata del 3,2%. In quest'ultimo caso la sierotipizzazione ha permesso di escludere la presenza di *Yersinia enterocolitica* appartenente ai gruppi O1, O2, O3, O5, O8 e O9.

In generale, i risultati ottenuti hanno evidenziato tassi di positività per gli agenti zoonosici ricercati non elevati. Il mancato riscontro di positività nei confronti di rilevanti agenti zoonosici quali *Mycobacterium spp.* rappresenta un risultato rassicurante anche in senso indiretto: nelle nostre Regioni il cinghiale non può essere considerato un serbatoio di *Mycobacterium Tuberculosis-complex* (es. *M. bovis* e *M. tuberculosis*), e le occasionali positività per *M. bovis* riscontrate nel corso degli anni possono essere considerate un epifenomeno di recrudescenza di tubercolosi in bovini al pascolo (ospiti-serbatoio associati a *M. bovis*). La costante assenza di *Trichinella spp.* nei campioni del nostro studio è altresì in linea con le prevalenze attese per il cinghiale, solitamente

estremamente basse sul territorio italiano, nonostante alcuni casi riportati con conseguenze da esposizione e malattia nell'Uomo.

Importante il riscontro in un soggetto di un ceppo di *Brucella suis* biovariante 2, notoriamente circolante nelle popolazioni di cinghiale nel territorio della Regione Lazio eD in altre Regioni dell'Italia centrale. La percentuale di positività per Salmonella, con isolamento in un soggetto di un ceppo di *Salmonella* Typhimurium variante monofasica, conferma il ruolo di ospite-serbatoio della specie *Sus scrofa* (sia le popolazioni selvatiche che i suini allevati) anche di *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, incluse le serovars maggiormente rilevanti per l'impatto zoonosico nell'Uomo.

D'altro canto, l'assenza di *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* e di colonie riferibili ad *E. coli* VTEC nel muscolo degli animali oggetto di studio, nonché l'assenza di *Yersinia enterocolitica* appartenente ai gruppi O1, O2, O3, O5, O8 e O9, suggerisce un livello igienico adeguato della carne dei cinghiali abbattuti durante lo studio, e che la successiva macellazione dei cinghiali cacciati era stata eseguita nel rispetto pratiche comuni di igiene.

Indagini volte ad individuare la presenza e la circolazione di patogeni zoonosici sono, tuttavia, fondamentali ai fini stimare le prevalenze in funzione di valutare i rischi per la Salute Pubblica, anche considerando che la commercializzazione ed il consumo di carni provenienti da popolazioni di animali selvatici, allorché non controllate, può costituire una fonte di esposizione ad un rischio difficilmente valutabile per il consumatore.

Ulteriori studi mirati potranno servire in futuro per meglio comprendere il significato epidemiologico del cinghiale in relazione ai diversi agenti zoonosici e per fornire alle Autorità Competenti ulteriori informazioni necessarie per l'elaborazione di proposte operative utili ad una corretta gestione dello status sanitario della specie, anche in funzione dell'esposizione dell'Uomo in rapporto all'attività venatoria, al consumo, ed alla produzione e distribuzione delle sue carni.

Bibliografia

-Barlozzari G. et al., 2013. "First report of *B.suis* biovar 2 in a semi free-range pig farm, Italy", *Veterinaria Italiana*, 2015 Vol. 51 No. 2 pp. 151-154.

-Deni D. et al., 2012. Monitoraggio della tubercolosi nel cinghiale cacciato in ambiti territoriali definiti dalla Provincia di Arezzo. Numero 3 (dicembre 2012).

-Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals – OIE

-Meng X. J. et al., 2009. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009 September 27; 364(1530): 2697–2707.

-Wacheck S. et al., 2010. Wild boars as an important reservoir for foodborne pathogens. *Foodborne Pathog Dis.* 2010 Mar;7(3):307-12.

-Zottola T. et al., 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility of salmonella in European wild boar (*Sus scrofa*); Latium Region - Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2013 Mar;36(2):161-8.