

SINTESI

Obiettivi

Il progetto vuole far luce sulla presenza del parassita protozoo *Blastocystis* nei suidi domestici, allevati allo stato brado e semibrado, escludendo allevamenti intensivi, e nei suidi selvatici, o cinghiali. *Blastocystis* sp. è riconosciuto come il più comune microeucariota del tratto intestinale umano (Stensvold, 2013). La sua prevalenza è di molto superiore a quella di altri comuni parassiti intestinali unicellulari come *Giardia*, *Entamoeba*, *Balantidium* e *Cryptosporidium*. Si riscontra frequentemente negli animali domestici, allevati per scopi zootecnici, ma anche negli animali selvatici.

Lo scopo generale di questo progetto è quello di migliorare la comprensione dell'epidemiologia dell'infezione da *Blastocystis* sp., attraverso l'utilizzo di metodiche di biologia molecolare. La sensibilità delle tecniche di amplificazione e sequenziamento del DNA e la capacità di risolvere finemente le differenze/affinità tra gli isolati umani ed animali permetteranno di definire meglio il rischio zoonotico. In questo modo sarà inoltre possibile studiare i principali serbatoi del parassita e le vie di infezione che includono: produzione, macellazione, manipolazione, imballaggio e distribuzione di carni, fino al consumatore finale.

Metodologia

I campioni presi in esame sono stati raccolti in nella vasta area interna dell'Appennino Centrale, corrispondente alla Provincia di Rieti. In quest'area è largamente diffusa la presenza di suidi (*Sus scrofa*) sia domestici allevati al brado o semibrado per la produzione di alimenti per autoconsumo con metodi tradizionali sia allo stato selvatico interessati dalla caccia

Per verificare la presenza del protozoo *Blastocystis*, sono stati raccolti dei campioni di feci di suino, selvatico o domestico, per un totale di 158 campioni. I prelievi sono stati eseguiti nei punti di ritrovo delle squadre di caccia per i cinghiali, mentre le feci dei suini domestici sono state prelevate al momento della macellazione

Il DNA è stato estratto dal materiale fecale, e sottoposto a reazione a catena della polimerasi (PCR). Sono stati utilizzati primer specifici per la caratterizzazione dei sottotipi di *Blastocystis* spp.: BL18SPPF1 e BL18SR2PP). I prodotti PCR positivi alla presenza di *Blastocystis* sono stati purificati e sequenziati in-house o inviati presso la BMR Genomics (Padova, Italia) per la purificazione e il sequenziamento in-service. Le sequenze ottenute sono state analizzate ed elaborate mediante il software specifici. I prodotti PCR risultati positivi che presentavano doppie bande o doppi picchi nel cromatogramma prodotto dal sequenziamento Sanger, sono stati riprocessati secondo un nuovo protocollo sviluppato per questo studio e sequenziati tramite Next Generation Sequencing (NGS) presso la BMR Genomics (Padova, Italia) con tecnologia NGS su piattaforma Illumina Miseq. I dati ottenuti sono stati analizzati seguendo una pipeline ottimizzata per questo studio.

Per comprendere le relazioni evolutive e lo status tassonomico degli isolati, è stata condotta un'analisi filogenetica utilizzando metodi di inferenza Bayesiana.

Risultati

Sono stati estratti un totale di 83 campioni di materiale fecale, di cui 40 proveniente da maiali domestici e 43 da cinghiali. Di questi sono risultati utilizzabili 79 campioni (42 cinghiali e 37 maiali). 52 campioni (26 cinghiali - 26 maiali domestici) sono risultati positivi alla presenza di *Blastocystis*, ossia il 67,5% positivi del totale nei campioni analizzati (il 72.5% nei maiali domestici e il 62.8% nei cinghiali).

Il sequenziamento Sanger del materiale amplificato da cinghiali e da suini domestici ha confermato la presenza di *Blastocystis* assegnati a 2 (ST5 e ST15) e 3 (ST1, ST3 e ST5) sottotipi, rispettivamente.

Diciotto campioni sono stati sottoposti alla procedura NGS. Tra questi sono state trovate sequenze rappresentative di un singolo ST (3, 5 o 15) ma anche casi di colonizzazione multipla. In particolare, dei 6 casi osservati nei cinghiali, 5 riguardano ST15 e ST5. Il caso rimanente mostra la

presenza di ST5 e ST3. I 4 casi di colonizzazione mista nei suini domestici hanno sempre riguardato ST 5, con ST15 (3 casi) o ST3 (1 caso).

Tabella 3 Sottotipi ritrovati

	n. samples	PCR-positive (%)	Mixed infections (% ^a)	By subtype			
				ST1 (% ^a)	ST3 (% ^a)	ST5 (% ^a)	ST15 (% ^a)
Wild boar	42	26 (61.9)	6 (23.1)	0	1 (3.8)	9 (34.6)	21 (80.8)
Domestic pig	37	26 (70.2)	4 (15.4)	1 (3.8)	3 (11.5)	23 (88.5)	3 (11.5)

Discussione

La presenza del parassita protozoo *Blastocystis* è stata confermata in questo studio per i maiali domestici, come già stato riscontrato in altri lavori (Wang et al., 2018; Wylezich et al., 2019), e in quelli selvatici (prima segnalazione).

La frequenza di positivi nei maiali domestici è del 70.2% nel nostro dataset, una percentuale notevolmente alta visto il confronto con altri lavori pubblicati (Wang et al., 2018). Nei maiali domestici sono stati rilevati esclusivamente sottotipi zoonotici. Il sottotipo più frequente è ST5, che si presenta in due forme alleliche distinte. Possiamo quindi presupporre una diversa origine del parassita e diverse fonti di infezione, ma che non sembra sia legata alla provenienza geografica. Il ST5 è considerato zoonotico anche se scarsamente segnalato nell'uomo e mai identificato in Italia. Nei suini domestici sono stati inoltre individuati il ST1 e ST3, con un esemplare ciascuno, frequentemente isolati anche nell'uomo e quindi con marcato rischio zoonotico.

Ricordiamo che in particolare il ST3 è il sottotipo maggiormente presente nell'uomo (Cian et al., 2017). Tutti i maiali compresi in questo studio sono stati allevati in ambiente peridomestico o domestico, mai industriale, o in stato semibrado.

Conclusioni

Questo studio rappresenta quindi la prima descrizione dei sottotipi di *Blastocystis* presenti nei cinghiali. Il sottotipo maggiormente presente è il ST15, non zoonotico e raro. In misura minore è stato rinvenuto anche il ST5, con le stesse forme alleliche presenti nei suini domestici, zoonotico. Questa segnalazione sembra indicare una sovrapposizione di infezione tra suini domestici e selvatici, suggerendo una comune fonte di infezione. In base ai risultati dello studio, il cinghiale non rappresenterebbe un alto rischio per la salute umana. Nei cinghiali sono stati evidenziati inoltre numerosi casi che possiamo attribuire ad infezioni multiple, risolte utilizzando una nuova metodologia perfezionata per questo studio.

Bibliografia

- Cian, A., Safadi, D. El, Osman, M., Moriniere, R., Gantois, N., Benamrouz-vanneste, S., Delgado-viscogliosi, P., et al., 2017. Molecular Epidemiology of *Blastocystis* sp. in Various Animal Groups from Two French Zoos and Evaluation of Potential Zoonotic Risk, 1–29.
- Stensvold, C., 2013. *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Tropical Parasitology*, **3**(1), 26.
- Wang, J., Gong, B., Yang, F., Zhang, W., Zheng, Y., and Liu, A., 2018. Subtype distribution and genetic characterizations of *Blastocystis* in pigs, cattle, sheep and goats in northeastern China's Heilongjiang Province. *Infection, Genetics and Evolution*, **57**, 171–176.
- Wylezich, C., Belka, A., Hanke, D., Beer, M., Blome, S., and Höper, D., 2019. Metagenomics for broad and improved parasite detection : a proof-of- concept study using swine faecal samples q. *International Journal for Parasitology*, **49**(10), 769–777.

Parole chiave: *Blastocystis*, barcode, SSU rDNA, sottotipi, zoonosis, NGS, suini

Elenco collaboratori:

Valeria Russini (biologo, gestione prove biomolecolari), Margherita Montalbano Di Filippo (biologo, gestione prove biomolecolari), Alessandra Tolomei (veterinario, gestione analisi); Rita Fanelli, Miriam Polidori, (tecnico di laboratorio, prove parassitologiche, sierologiche e biomolecolari); Cristiano Cocumelli, (veterinario, istopatologia); Andrea Novelletto, Responsabile U.O (biologo, gestione prove biomolecolari).

pietro.calderini@izslt.it

“Genotipizzazione degli isolati di *Blastocystis* sp. nei suidi domestici e selvatici e definizione del ruolo zoonotico” LT0217