

PRESENZA DI CISTI DI *Toxoplasma gondii* NEL MUSCOLO DI CINGHIALE: UN RISCHIO PER I DERIVATI READY TO EAT?

DETECTION OF Toxoplasma gondii CYSTS FROM WILD BOAR MUSCLES: DOES IT REPRESENT A RISK FOR READY TO EAT FOOD?

Pinto P., Bozzo G., Novello L., Terio V.

Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia - Sezione di Controllo e Sicurezza degli Alimenti Università degli Studi di Bari

SUMMARY

Toxoplasma gondii infection is a parasitological antropozoonoses widely distributed in the world. Toxoplasmosis is mainly followed by serious disease in fetuses and immunocompromised people. Wild boars represent an important source for this parasite and evisceration, handling and consumption of raw or undercooked meat are important risk factors.

The study confirms the presence of potentially infectious cysts in wild boars muscles, detected by histological and biomolecular methods.

Key words

Wild boars, *Toxoplasma gondii*, Muscle, Histopathology, PCR

INTRODUZIONE

Toxoplasma gondii, responsabile di una delle antropozoonosi parassitarie più largamente diffuse (1), è un parassita intracellulare obbligato che riconosce quali ospiti definitivi i felini domestici e selvatici, nei quali conduce una riproduzione sia sessuata che asessuata. La prima determina la dispersione nell'ambiente esterno, attraverso le feci dei felini, di oocisti non sporulate, che dopo 2-3 giorni diventano infettanti, la seconda, comune sia al gatto che agli altri animali a sangue caldo, ospiti intermedi del coccide, porta alla formazione di tachizoiti che raggiungono diverse localizzazioni nell'organismo ospite e danno origine a cisti di bradizoiti.

I cinghiali (*Sus scrofa*), come confermano diversi studi epidemiologici, finalizzati alla valutazione della prevalenza di anticorpi *anti-toxoplasma* in questa specie, possono frequentemente rappresen-

tare l'ospite intermedio del *Toxoplasma* (2); infatti sono animali grufolatori che si nutrono di tuberi e vegetali, ma sono contestualmente carnivori, che consumano animali vivi e morti, e coprofagi. Sono queste abitudini che aumentano la probabilità per i cinghiali di contrarre l'infezione da *Toxoplasma* (3).

I cinghiali, largamente diffusi in alcune regioni italiane, sono principalmente allevati per l'attività venatoria; si tratta per lo più di allevamento estensivo in particolari ambienti riservati, boschivi e collinari.

La presenza di cisti di *Toxoplasma gondii* nelle carni degli animali selvatici abbattuti, rappresenta una potenziale fonte di zoonosi parassitaria. In particolare, le famiglie dei cacciatori risultano particolarmente esposte all'infezione a causa delle operazioni di eviscerazione e del contatto con la carne e il sangue dell'animale (4).

È noto che la principale modalità di trasmissione

del *Toxoplasma* all'uomo è rappresentata dal consumo di carne cruda o poco cotta (5).

I soggetti adulti immunocompetenti che contraggono l'infezione, sviluppando una risposta anticorpale adeguata, presentano segni clinici di lieve entità, non eliminano completamente il parassita, che persiste nell'organismo in uno stato di latenza sotto forma di cisti tissutali; è stata dimostrata, tuttavia, anche la correlazione tra l'insorgenza di disordini mentali nell'uomo e la presenza di *Toxoplasma gondii* (6), che insieme alla cecità e alle elevate percentuali di mortalità fanno della toxoplasmosi una zoonosi molto pericolosa e sottovalutata, come riferisce l'EFSA (7, 8).

In considerazione dell'elevato consumo di carne di cinghiale, che si è registrato negli ultimi anni, in particolari periodi dell'anno e in particolari regioni, ci è sembrato interessante effettuare un'indagine istopatologica, per controllare la presenza di *Toxoplasma gondii* nelle carni di cinghiali abbattuti in Basilicata, Calabria e Toscana.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 31 campioni di carne di cinghiale prelevati dalla regione del collo di cui 11 provenienti dalla Calabria, 8 dalla Basilicata e 12 dalla Toscana. Ciascun campione è stato suddiviso in 2 aliquote, la prima è stata fissata in formalina tamponata al 10% per le analisi istologiche, l'altra è stata congelata per essere sottoposta ad un'eventuale analisi biomolecolare di conferma per la presenza di *Toxoplasma gondii*.

Esame istologico

Dai campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina, sono state ottenute sezioni di 4 µm con microtomo rotativo, che, successivamente, sono state sottoposte a colorazione con Ematossilina-eosina.

L'osservazione dei preparati istologici e le rilevazioni micrometriche sono state effettuate con microscopio ottico Nikon Eclipse 50i, fotocamera Nikon Digital Sight DS 5M e acquisitore di immagini Nikon Digital Sight DS L1.

Analisi biomolecolare

1. Estrazione del DNA da campioni sospetti

Sono stati prelevati 20 g di muscolo, ai quali sono stati aggiunti 50 ml di PBS con tripsina (0,25%) e EDTA (0,025%). Il campione è stato omogenizzato e incubato per 1 h a 37°C.

L'estrazione e la purificazione del DNA sono state ottenute utilizzando il DNeasy Tissue Kit (Qiagen,

Hilden, Germany). È stato prelevato 1 ml di campione al quale sono stati aggiunti 3 ml di Lysis Buffer ATL e 300 µl di Proteinasi K. Dopo un'incubazione overnight a 56°C, sono stati aggiunti 3 ml di Buffer AL e il campione è stato nuovamente incubato a 70°C per 1h e centrifugato a 6000g per 15 min. Successivamente sono stati aggiunti 3 ml di etanolo assoluto e la miscela è stata fatta passare attraverso le QIAamp spin column, ripetendo il passaggio di centrifugazione a 8000g per 1 min fino ad esaurimento del campione. La QIAamp silica-gel membrana è stata sottoposta a due lavaggi consecutivi utilizzando i Buffer AW1 e AW2. L'eluizione del DNA è stata ottenuta in 50 µl di Buffer AE e il campione è stato conservato a -20°C.

2. Reazione di polimerizzazione a catena per la ricerca di *T. gondii*

Per la PCR sono stati utilizzati i primer 5'-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3' e 5'-TCTT-TAAAGCGTTCGTGGTC-3' che permettono di amplificare un frammento di DNA del gene B1 di *Toxoplasma gondii* che si ripete 35 volte (9)

Le reazioni sono state allestite in un volume finale di 25 µl utilizzando 12,5 µl di Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), 1µM di ciascun primer e 3 µl di campione estratto.

Il programma di amplificazione ha previsto una denaturazione iniziale a 94°C per 5 min seguita da 40 cicli di denaturazione a 94°C per 1 min, di annealing a 58°C per 1 min e di estensione a 72°C per 2 min, seguiti da un'estensione finale a 72°C per 5 min. I prodotti della PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 1,5% e colorati con etidio bromuro.

Come controllo positivo è stato utilizzato il DNA di tachizoiti del ceppo RH di *Toxoplasma gondii*. La specificità degli amplificati è stata accertata mediante sequenziamento utilizzando ABI PRISM 3100 (Applied, Biosystem, Rome, Italy)

RISULTATI

Per 30 campioni analizzati la tecnica istopatologica ha dato esito negativo, mentre in un campione di cinghiale, proveniente dalla Calabria, è stato possibile osservare la presenza di cisti parassitarie di forma subsferica e dimensioni di circa 36,11 µm e 93,67 µm, localizzate all'interno delle fibre muscolari, che ci hanno fatto presupporre si trattasse di cisti di *Toxoplasma gondii* (Figura 1) .

La capsula della cisti ovoidale mostrava uno spessore di circa 1,5 e 2,5 µm, e appariva più spessa in

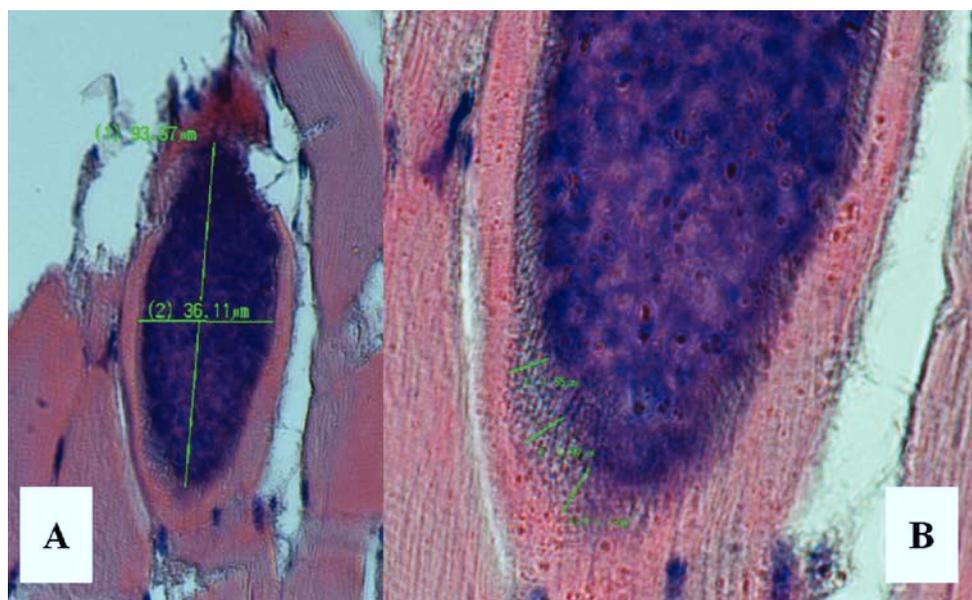
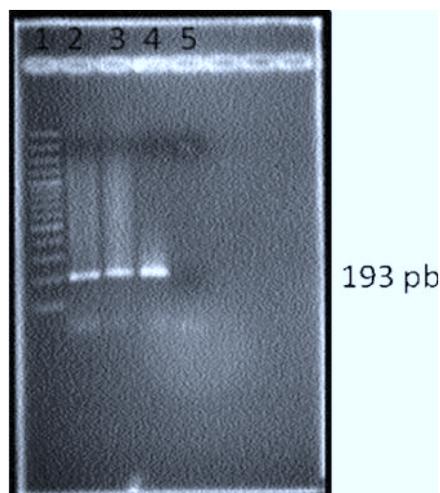


Figura 1.
Presenza di cisti
di *Toxoplasma gondii*
nel muscolo di cinghiale
(Ematossilina eosina;
A x 40; B x 100).

prossimità dei due poli. Internamente la cisti si presentava uniformemente occupata da materiale basofilo e granuloso. Le fibre muscolari parassitate apparivano deformate e quasi completamente occupate dalla cisti, ma non è stato rilevato alcun infiltrato infiammatorio a livello interstiziale.

Per avere la conferma che si trattasse di tessuto parassitato da *Toxoplasma gondii* abbiamo sottoposto il campione ad analisi biomolecolare. L'osservazione della banda attesa di 193 pb, riferita all'amplificazione del gene B1 di *Toxoplasma gondii*, ha confermato la positività dei campioni a tale parassita (Figura 2).

Figura 2. PCR specifica per il gene B1 di *Toxoplasma gondii*. Lane 1: DNA ladder 100 pb; lane 2-3: campione positivo; lane 4: controllo positivo; lane 5: controllo negativo.



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La caratterizzazione istologica delle cisti, di forma e dimensioni compatibili con i dati presenti in letteratura, e la specifica conferma biomolecolare, hanno permesso di identificare la presenza di cisti di *Toxoplasma gondii* nelle carni di un cinghiale abbattuto in Calabria (10).

È noto che i piani di monitoraggio, necessari per valutare la presenza di *Toxoplasma gondii* nei cinghiali, sono basati principalmente su sistemi analitici indiretti che valutano la presenza di anticorpi nel sangue (11), tuttavia il riscontro di positività sierologica, può essere solo indicativo di un avvenuto contatto del parassita con l'ospite e non conferma la presenza di stadi potenzialmente infettanti del parassita all'interno dei tessuti.

Nei suini selvatici, sia per le peculiari abitudini alimentari, sia per la variabile dell'età di cattura o di abbattimento, la probabilità che le carni siano infestate dal *Toxoplasma gondii* è molto elevata.

La lunga sopravvivenza delle cisti nel muscolo dei suidi che talora supera i 2 anni, consente di poter affermare che il cinghiale è una delle più importanti fonti di rischio per la trasmissione di *Toxoplasma gondii* all'uomo (12, 13, 14).

Solitamente, la carne di cinghiale è utilizzata per la preparazione di stufati e altre pietanze che richiedono tempi di cottura lunghi e che ne garantiscono, di conseguenza, la salubrità, ma spesso le carni sono anche destinate alla produzione di prodotti di salumeria; la salagione e la stagionatura non sempre consentono la completa eliminazione del rischio parassitologico (15).

L'EFSA raccomanda per il *Toxoplasma gondii* una maggiore raccolta di dati epidemiologici al fine di chiarire le numerose fonti di infezione per l'uomo, evidenziando che la diffusione del parassita non è stata ancora del tutto descritta e nuove forme dirette e indirette di infezione sono state evidenziate da alcuni recenti studi (8).

La nostra indagine rivela come le carni di cinghiale possono essere fonte di contaminazione diretta per l'uomo e pongono in discussione la verifica delle tecniche di conservazione delle carni di cinghiale per l'eliminazione del rischio di ingestione del parassita con la preparazione di *ready to eat*. Per i prodotti di salumeria derivati dalle carni di cinghiale è, dunque, necessario controllare accuratamente i tempi di stagionatura per un'adeguata riduzione dell' A_w e la concentrazione di NaCl, al fine di ridurre il rischio per il consumatore.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Hill, D.E; Chirukandoth, S., Dubey, J.P. , Lunney, J.K., Ray Gamble, H. (2006). Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. *Veterinary Parasitology*, 141, 9–17.
- 2) Gauss, C.B.L; Dubey, J.P., Vidal, D., Ruiz, F., Vicente, J., Marco, I., Lavin, S., Gortazar, C., Almeri'a, S. (2006). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild pigs (*Sus scrofa*) from Spain. *Veterinary Parasitology*, 131, 151–156.
- 3) Schley, L; Roper, T.J. (2003). Diet of wild boar *Sus scrofa* in Western Europe, with particular reference to consumption of agricultural crops. *Mammal Review*, 33, 43–56.
- 4) Tenter, A.M; Heckeroth, A.R., Weiss, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30, 1217-1258.
- 5) Garcia, J.L; Gennari, S.M., Navarro, I.T., Machado, R.Z., Sinhorini, L.I., Freire, R.L., Marana, E.R.M., Tsutsui, V., Contente, A.P.A., Begale, L.P. (2005). Partial protection against tissue cysts formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, 129, 209–217.
- 6) McAllister, M.M. (2005). A decade of discoveries in veterinary protozoology changes our concept of “subclinical” toxoplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 132, 241-247.
- 7) Montoya J.G; Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet*, 363, 1965–1976.
- 8) EFSA (2007). Surveillance and monitoring of toxoplasma in humans, food and animals. *The Efsa Journal*, 583, 1-64.
- 9) Fuentes, I; Rodríguez, M., Domingo, C.J., Del Castillo, F., Juncosa, T., Alvar, J. (1996). Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 2368–2371.
- 10) Euzéby, J. (1986). Myxozoa – Microspora – Ascetospora – Apicomplexa, 1: Coccidiosis (*Sensu Lato*). In *Protozoologie Medicale Comparee*. Merieux, Paris.
- 11) Antolová, D; Reiterová, K., Dubinský, P. (2007). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boars (*Sus scrofa*) in the slovak Republic. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 14, 71-73.
- 12) Dubey, J.P. (1988). Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *American Journal of Veterinary Research*, 49, 910–913.
- 13) Dubey, J.P. (2000). Sources of *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Until rates of congenital toxoplasmosis fall, control measures are essential. *British Medical Journal*, 321, 127–128.
- 14) Dubey, J.P; Urban, J.F., Davis, S.W. (1991). Protective immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with non-persistent strain of *Toxoplasma gondii*. *American Journal of Veterinary Research*, 52, 1316–1319.
- 15) Mie, T; Pointon, A.M., Hamilton, D.R., Kiermeier, A. (2008). A qualitative assessment of *Toxoplasma gondii* risk in ready-to-eat smallgoods processing. *Journal of Food Protection*, 71(7), 1442-1452.