



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

**L' ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA:
principali risultati e loro trasferibilità operativa
Roma, 24 giugno**

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

Valeria Russini
Ricerca Corrente LT 0217

Responsabile del progetto: Pietro Calderini



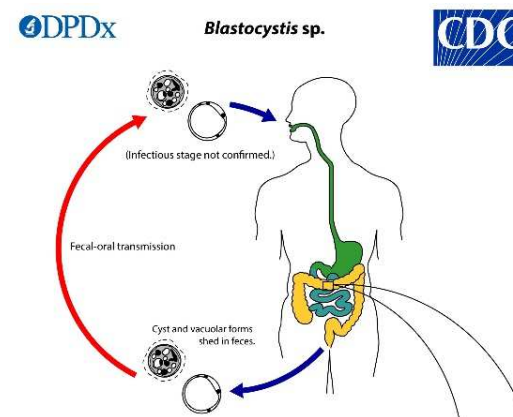
Introduzione

Blastocystis spp. (Stramenopila, Protista) è un potenziale patogeno cosmopolita, riconosciuto come il più comune microeucariota dell'intestino umano.

L'infezione avviene consumando alimenti o acqua contaminati da feci di soggetto infetto.

Presenta un ampio *range* di sintomatologia (da assente a severa), fattore di rischio per lo sviluppo della sindrome dell'intestino irritabile e orticaria.

Blastocystis ha una grande varietà di ospiti di origine animale tra cui uccelli, mammiferi (scimmie, suini domestici, cinghiali, cavalli, roditori), rettili, anfibi e insetti, di cui non è chiara la rilevanza come serbatoio.





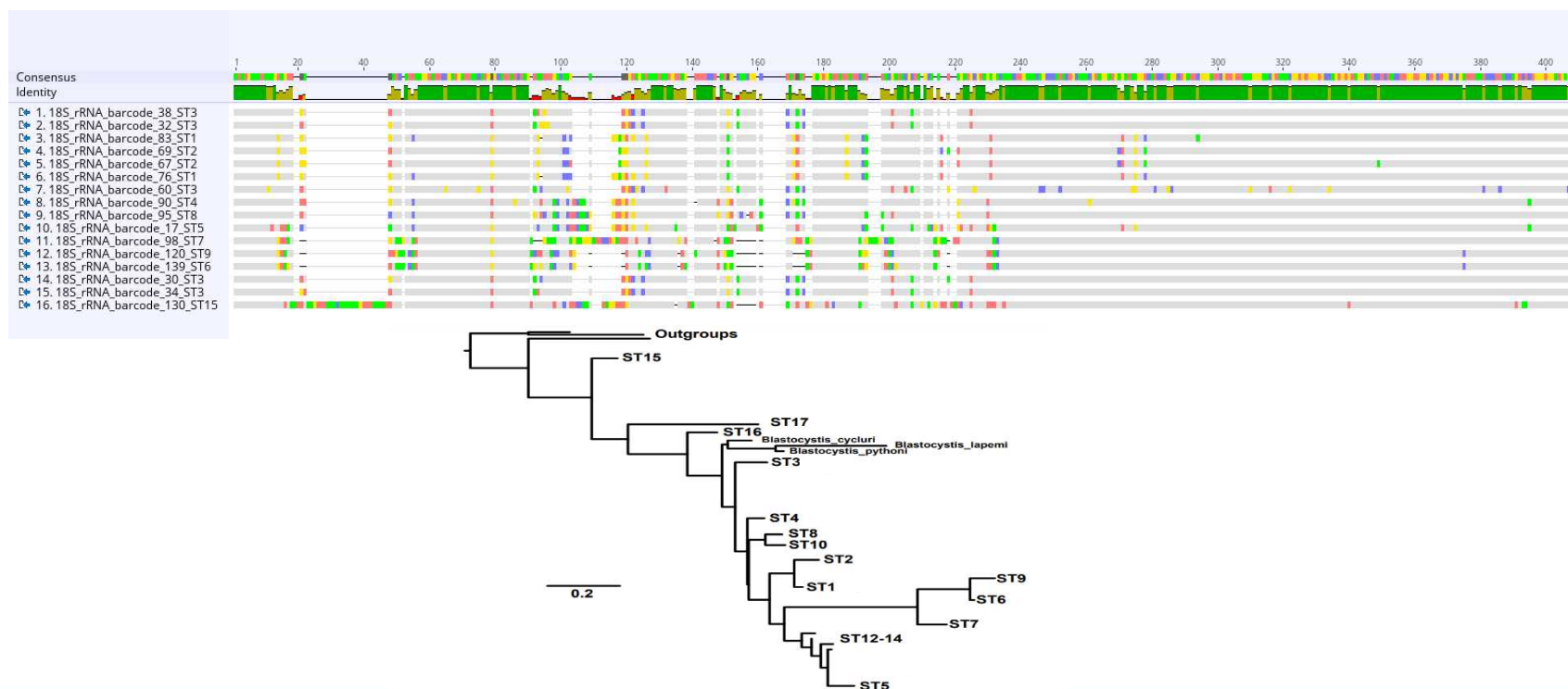
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Blastocystis spp.

Oltre a 5 specie sono riconosciuti 22 sottotipi (ST) unicamente sulla base di differenze molecolari (DNA barcoding).

9 ST riscontrati anche nell'uomo (ST1-9):

Blastocystis homini: generalmente riferito a ST zoonotici ma non monofiletico.



Introduzione

Le malattie zoonotiche, comprese quelle protozoarie, hanno i loro serbatoi in animali domestici e selvatici ed impongono un notevole costo in termini sanitari, in particolare alle popolazioni che vivono e lavorano in zone rurali o poco urbanizzate.

Recenti studi molecolari hanno dimostrato l'origine zoonotica di alcuni ST di *Blastocystis* e l'abituale presenza nei suini (*Sus scrofa*). Nei maiali è diffuso nelle aree dove viene praticato l'allevamento al brado o semibrado con metodi tradizionali.



Obiettivi

Il progetto voleva far luce sulla presenza del parassita protozoo *Blastocystis* nei **suidi domestici** allevati per autoconsumo, escludendo gli allevamenti intensivi, e nei **suidi selvatici** (cinghiali).

Lo scopo di questo studio è stato quello di migliorare la comprensione dell'epidemiologia dell'infezione da *Blastocystis*, attraverso l'utilizzo di metodiche di biologia molecolare e approccio NGS.



Obiettivi

Il progetto concerne sia la salute animale che la salute pubblica, in un'ampia visione *"One health"*

Gli obiettivi puntuali perseguiti sono stati:

- valutazione della prevalenza di *Blastocystis* spp. nei suidi domestici e selvatici in Italia centrale;
- identificazione dei ST di *Blastocystis* spp. circolanti nell'area studiata;
- confronto fra ST identificati con quelli segnalati nell'uomo per contribuire alla definizione del rischio zoonotico di *Blastocystis* spp.

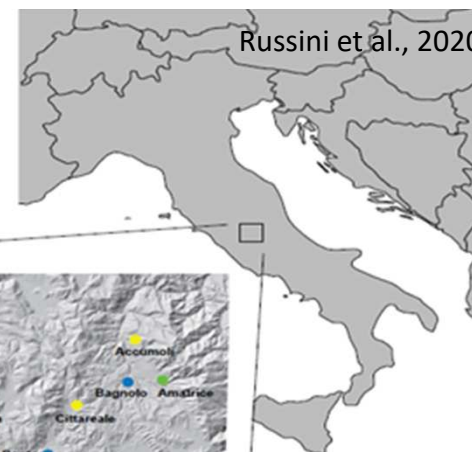
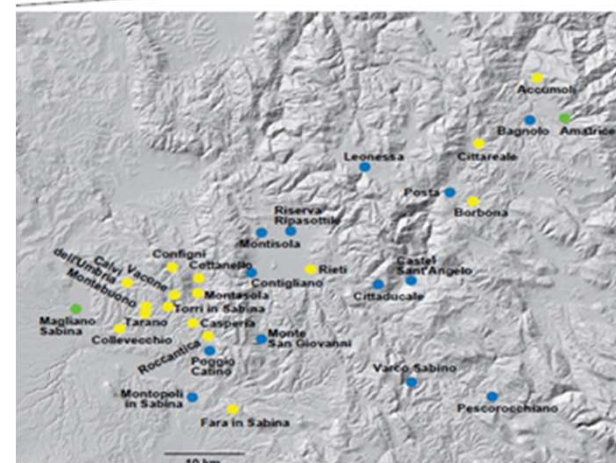




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Materiali e metodi

I campioni di feci di maiali e cinghiali sono stati raccolti nell'area interna dell'Appennino Centrale, corrispondente alla Provincia di Rieti.



Russini et al., 2020

In queste aree sono diffusi sia gli allevamenti del maiale domestico per la produzione di alimenti destinati all'autoconsumo che gli abbattimenti dei cinghiali durante la stagione venatoria.

I prelievi sono stati effettuati al momento della macellazione per i maiali e nei punti di ritrovo delle squadre di caccia per i cinghiali.

Complessivamente sono stati raccolti 158 campioni di feci.

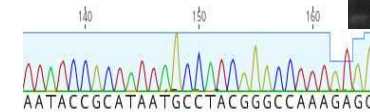
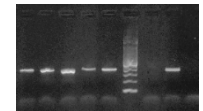




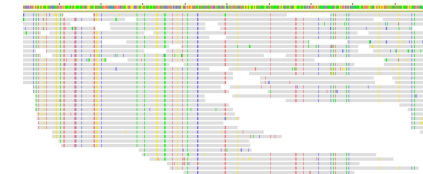
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Materiali e metodi

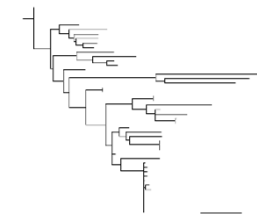
- Selezionati **79 campioni** per massimizzare la variabilità e copertura geografica del dataset.
- Estratto il **DNA** e amplificato il frammento rDNA **18S** (barcode per l'identificazione del ST).
- Sequenziati con metodica **Sanger**, indentificati ST e varianti alleliche.
- Quando Sanger non risolutivo → **NGS** amplicon sequencing (sviluppato protocollo ad hoc).



- ★ Amplicon sequencing determinante per l'identificazione di 10 **infezioni multiple** da ST diversi.



- Analisi filogenetica con metodi di inferenza Bayesiana, con ampio dataset per inquadratura tassonomica.



Risultati

Analisi molecolare

65.8% positivi per *Blastocystis* spp. (70.2% maiali, 61.9% cinghiali).

	n. campioni	PCR- positivi (%)	Infezioni multiple (%)	ST			
				ST1 (%)	ST3 (%)	ST5 (%)	ST15 (%)
Maiali	37	26 (70.2)	4 (15.4)	1 (3.8)	3 (11.5)	23 (88.5)	3 (11.5)
Cinghiali	42	26 (61.9)	6 (23.1)	0	1 (3.8)	9 (34.6)	21 (80.8)

10 infezioni multiple rilevate con NGS

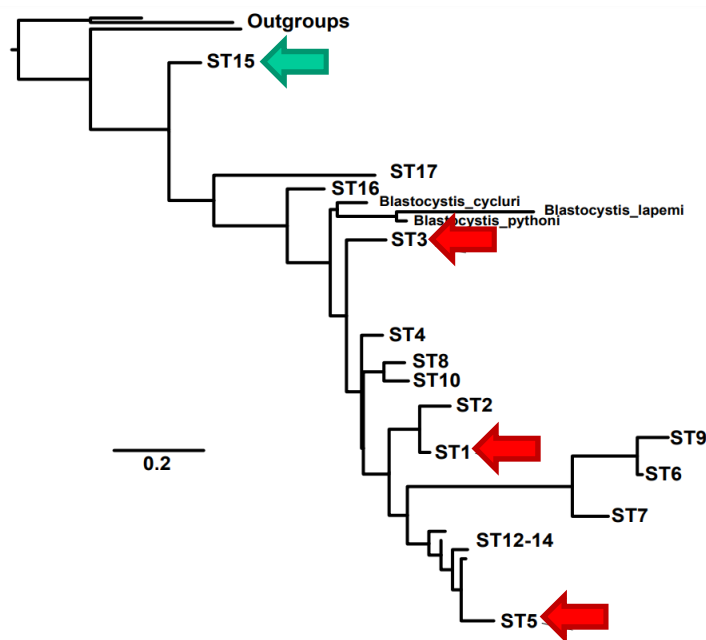
Maiali : 3 casi - ST5 e ST15
1 caso - ST5 e ST3

Cinghiali: 5 casi - ST5 e ST15
1 caso - ST5 e ST3



Risultati

Analisi filogenetica



Marcatore molecolare 18s

Isolati identificati correttamente e coerenti in una cornice filogenetica più ampia.

Tutti gli ST identificati formano cladi monofiletici.

ST15 molto divergente dagli altri ST.

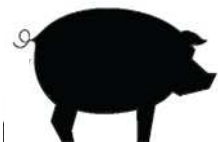
Blastocystis homini (ST 1-9) non può essere considerato un'entità tassonomica.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Risultati



70.2% positivi, più alta di altri lavori

rilevati quasi **esclusivamente sottotipi zoonotici**

più frequente è ST5: diversità allelica indicano diverse fonti di infezione non legata ad area geografica.

ST5 mai segnalato in Italia

ST1 e ST3, molto comuni nell'uomo, **marcato rischio zoonotico.**

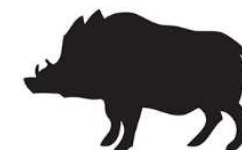
Ugualmente esposti all'infezione (61.9%)

Più frequente è il **ST15, non zoonotico e raro**

Presente anche ST5 zoonotico (stesse varianti alleliche dei maiali)

Sovrapposizione di infezione tra suini domestici e selvatici

Prima descrizione dei ST nei cinghiali.

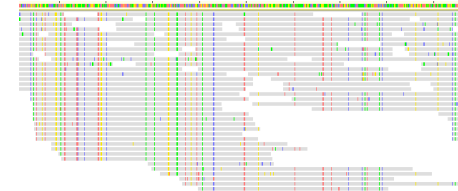




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

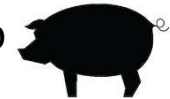
Impatto e trasferibilità operativa

Sviluppata **metodica ad hoc** di amplicon sequencing del 18s (barcode) per l'identificazione delle **infezioni multiple**, grazie alla collaborazione con UO1 EMS (Prof. Novelletto dell'Università di Torvergata).



Identificato il **potenziale zoonotico**:

Maiali presentano quasi esclusivamente ST zoonotici, evidenziando un alto rischio per la salute umana nelle zone rurali interessate da allevamento di tipo tradizionale.



Nei cinghiali, la presenza di ST non zoonotico rappresenterebbe un basso rischio per la salute umana, ma lo studio dimostra che anche se meno frequentemente sono comunque portatori di ST zoonotici (**sovrapposizione di infezione tra suini domestici e selvatici**).



Impatto e trasferibilità operativa

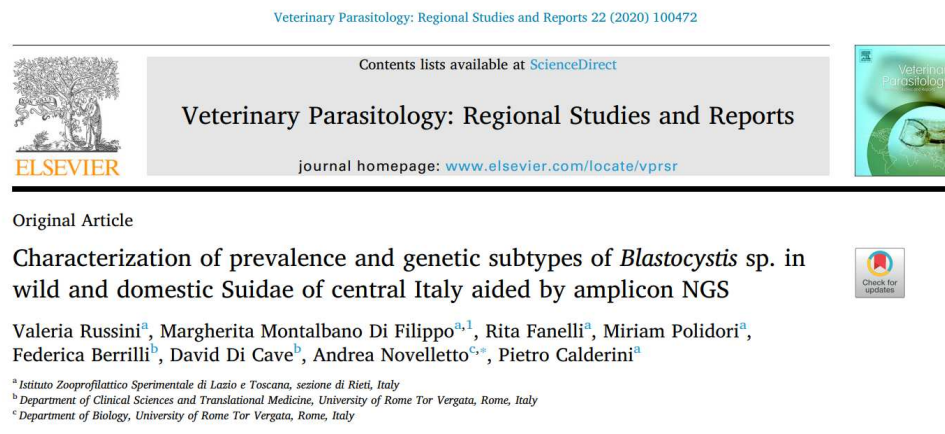
Il presente lavoro costituisce una novità nel panorama scientifico italiano e internazionale.

- Unico studio Italiano sulla presenza di *Blastocystis* in animali domestici e selvatici destinati al consumo sul territorio italiano.
- Prima segnalazione del **ST5** zoonotico in Italia.
- Una delle **prime segnalazioni con tipizzazione molecolare nei cinghiali**.
- Conferma alta frequenza nei i maiali domestici (come già stato riscontrato in altri lavori, Wang et al., 2018; Wylezich et al., 2019).



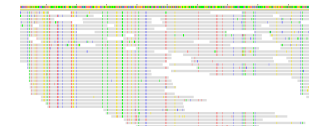
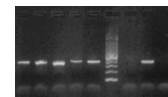
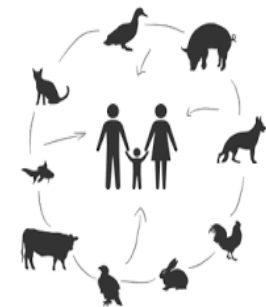
Impatto e trasferibilità operativa

I risultati del progetto hanno prodotto un articolo scientifico pubblicato su una rivista internazionale specializzata



Conclusioni

- Nelle aree come quella considerata il **rischio zoonotico** è al momento contenuto, ma c'è la possibilità che esso aumenti in futuro a causa della progressiva richiesta di prodotti alimentari tradizionali con un uso limitato di farmaci.
- Decisiva l'educazione degli allevatori i quali devono mettere in atto strategie adeguate di controllo delle parassitosi per limitare le perdite economiche, e **per ridurre al minimo i rischi di zoonosi** di origine alimentare. È necessario individuare misure di controllo efficaci a mantenere bassi i rischi connessi alla salute dell'uomo.
- Il cinghiale potrebbe rappresentare un rischio zoonotico di origine alimentare (presenti ST zoonotici); la gestione del rischio passa anche attraverso l'educazione dei cacciatori coinvolti nella trasformazione degli animali cacciati in alimento.
- Lo studio è stato rilevante nel panorama italiano e internazionale. E' stata prodotta una procedura ad hoc per l'identificazione delle infezioni multiple con metodica NGS.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Conclusioni

Prospettive future:

- Studio degli effetti sul microbiota intestinale di animali e umani in presenza di *Blastocystis*.
- Studio DIRETTO del potenziale zoonotico in soggetti particolarmente esposti (es. lavoratori a contatto con gli animali).
- Analisi dell'interazione fra ST nelle infezioni multiple (facilitazione?).





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Ringraziamenti: Sezione di Rieti

Miriam Polidori, Rita Fanelli, Francesco Tancredi,
Luisa Garofalo, Rita Vergarolo, Alessandra Tolomei,
Stefano Aragno, Ottavio Giovannelli, Rita Lorenzini,
Pietro Calderini, Margherita Montalbano Di Filippo

Prof. Andrea Novelletto (Università Tor Vergata)

