

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA, PATOLOGIA E IGIENE AMBIENTALE IN
MEDICINA VETERINARIA**

- XXVIII CICLO -

***TOXOPLASMA GONDII* IN ANIMALI DA REDDITO
E RISCHIO PER L'UOMO TRAMITE IL CONSUMO DI
CARNE**

Dottorando

Dott. Roberto Condoleo

Tutor

Ch.ma Prof.ssa Laura Rinaldi

Coordinatore del Dottorato

Ch.mo Prof. Giuseppe CRINGOLI

Anni Accademici 2012-13 / 2015-16

TOXOPLASMA GONDII IN ANIMALI DA REDDITO
E RISCHIO PER L'UOMO TRAMITE IL CONSUMO DI
CARNE

Indice

RIASSUNTO	pag. 5
CAPITOLO I - <i>TOXOPLASMA GONDII</i> NEGLI ANIMALI DA REDDITO E FATTORI DI RISCHIO	
1. Overview su <i>T. gondii</i>	pag. 8
2. Ciclo biologico	pag. 12
3. Infettività e persistenza nell'ambiente	pag. 15
4. Epidemiologia	pag. 19
5. Sintomatologia negli animali domestici	pag. 22
6. Diagnosi di laboratorio	pag. 24
7. Persistenza nell'ospite e relazione tra sieropositività e presenza del parassita vitale nei tessuti muscolari	pag. 28
8. Sieroprevalenza di <i>T. gondii</i> in allevamento	pag. 36
9. Fattori di rischio per gli animali domestici da reddito	pag. 40
10. Terapia e profilassi vaccinale	pag. 43
11. Riferimenti normativi	pag. 44
CAPITOLO II – TOXOPLASMOSI UMANA E RISCHI ASSOCIATI AL CONSUMO DI CARNE	
1. La trasmissione di <i>T. gondii</i> all'uomo	pag. 51
2. Periodo di incubazione e dose infettiva	pag. 52
3. Segni clinici nella popolazione e nelle fasce sensibili	pag. 52
4. Impatto e fonti d'infezione	pag. 54
5. Sorveglianza e dati di prevalenza nell'uomo	pag. 56
6. Resistenza in matrici alimentari carnee	pag. 57
7. Isolamento di <i>T. gondii</i> da alimenti carnei	pag. 60
8. Tossinfezione da <i>T. gondii</i> associata al consumo di carne	pag. 62
CAPITOLO III – MAPPATURA, RILEVAZIONE DI CLUSTER E FATTORI DI RISCHIO PER LA TOXOPLASMOSI OVINA NEL SUD ITALIA	
1. Background	pag. 64
2. Materiali e Metodi	pag. 65
3. Risultati	pag. 71
4. Discussione	pag. 73

**CAPITOLO IV – RISCHIO DI TOXOPLASMOSI ASSOCIATO AL CONSUMO DI CARNE
DI MAIALE IN ITALIA**

1. Background	pag. 79
2. Materiali e Metodi	pag. 83
3. Risultati	pag. 112
4. Discussione	pag. 115
RINGRAZIAMENTI	pag. 123
APPENDICE	pag. 124
BIBLIOGRAFIA	pag. 125

Riassunto

Toxoplasma gondii è un protozoo del phylum Apicomplexa, parassita di numerose specie animali e dell'uomo. Gli ospiti definitivi di *T. gondii* sono felidi domestici e selvatici, incluso il gatto domestico, i quali sono gli unici in grado di diffondere oocisti con le feci. Gli ospiti intermedi del protozoo comprendono numerose specie di mammiferi ed uccelli, incluso ovini, caprini, bovini, bufali, equini ed uomo. La toxoplasmosi è riconosciuta come una importante causa di infertilità negli ovini e caprini e, di conseguenza, è responsabile di significative perdite economiche nel settore ovino e caprini a livello mondiale. Inoltre, la carne ovina contaminata da *T. gondii* è considerata una rilevante fonte di infezione per l'uomo. La presente ricerca riassume le attuali conoscenze inerenti i fattori di rischio per toxoplasmosi negli animali da reddito e nell'uomo. Strumenti di indagine spaziale e un modello univariato di regressione sono stati utilizzati per creare mappe di rischio relative alla positività a *T. gondii* di ovini allevati in Campania e determinare fattori di rischio associati alla sieroprevalenza intra-allevamento del parassita. Il modello ha rivelato che "la tipologia di produzione" (latte o solo carne) era l'unica variabile indipendente associata alla maggiore sieroprevalenza nei confronti del parassita ($P\text{-value} < 0.02$). Nessuna altra variabile ambientale o di management è risultata significativa. Infine, una valutazione del rischio di toxoplasmosi associata al consumo di carne di maiale in Italia è stata proposta al fine di: 1) determinare i prodotti maggiormente a rischio in Italia; 2) individuare i principali fattori di rischio connessi all'esposizione al parassita; 3) evidenziare gli attuali "gaps" nella conoscenza di *T. gondii* quale agente di zoonosi.

Summary

Toxoplasma gondii is a widespread protozoan parasite in the phylum Apicomplexa which is able to cause disease in animals and humans. The definitive hosts of *T. gondii* are animals belonging to family Felidae, including domestic cats which spread oocysts with feces; a wide range of intermediate hosts include sheep, goats, cattle, water buffaloes and horses. Toxoplasmosis is recognized as an important cause of reproductive failure in sheep and, consequently, it is responsible for significant economic losses to ovine industry worldwide. Moreover, ovine meat contaminated by *T. gondii* is considered a

relevant source of infection for humans. The present research summarized the main findings regarding risk factors of toxoplasmosis in animals and humans. Furthermore, geospatial tools and univariate Poisson regression were used to point risk profiling maps of *T. gondii* positivity in sheep bred in the Campania region (southern Italy) and analyze risk factors associated with the within-flock seroprevalence of the parasite. The model revealed that “type of production” (milk or only meat) was the only independent variable associated with *T. gondii* seropositivity (P-value <0.02). Neither environmental nor other management variables resulted significant. Finally, a risk assessment of toxoplasmosis associated with the consumption of pork meat in Italy was proposed in order to: 1) pinpoint the main food products associated with toxoplasmosis in Italy; 2) identify the major risk factors linked to the exposure of the parasite; 3) underline the present gaps in scientific knowledge of *T. gondii*.

LISTA DEGLI ACRONIMI

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

IFAT: Indirect Fluorescent Antibodies Test

MAT: Modified Agglutination Test

IHAT: Indirect Hemoagglutination Antibodies Test

LAT: Latex Agglutination Test

GIS: Geographical Information System

QRA: *Quantitative Risk Assessment*, Valutazione quantitativa del Rischio

Uniforme($n_1; n_2$): Distribuzione di probabilità uniforme

Triangolare($n_1; n_2; n_3$): Distribuzione di probabilità triangolare

Discreta ($n_1; n_2; n_{\dots}$): Distribuzione di probabilità discreta

Cumulativa ($0, 1; 0, 2; \dots / n_1; n_2; n_{\dots}$): Distribuzione di probabilità cumulativa

CAPITOLO I - *TOXOPLASMA GONDII* NEGLI ANIMALI DA REDDITO E FATTORI DI RISCHIO

1. Overview su *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii è un protozoo inquadrato nel Phylum Apicomplexa, classe Coccidia, famiglia Sarcocystidae. *T. gondii* è l'unica specie della famiglia *Toxoplasma*. La maggioranza dei ceppi isolati in Nord America e in Europa rientra in una delle tre linee clonali, denominate tipo I, II e III (Howe & Sibley, 1995). Recenti studi suggeriscono l'esistenza di una quarta linea clonale riscontrata in animali selvatici del continente Nord Americano (Khan et al., 2011). Tuttavia, la divergenza tra le tre linee genetiche di *T. gondii* è piuttosto bassa (solo 1-2% della sequenza di DNA) (Xiao et al., 2015).

Il ciclo biologico di questo parassita a distribuzione ubiquitaria è complesso: gatto domestico e altri felidi costituiscono i suoi ospiti definitivi e completi (con ciclo intestinale ed extraintestinale), mentre tutti gli animali a sangue caldo, mammiferi (uomo compreso) ed uccelli, ne costituiscono quelli intermedi (con ciclo extraintestinale). Le modalità di trasmissione del protozoo tra gli ospiti sono diverse e la sua ampia diffusione in diverse aree del mondo fa sì che *T. gondii* assuma un ruolo di primaria importanza sia in campo umano, in quanto il 25% della popolazione mondiale risulta essere esposta al parassita (Montoya e Liesenfeld, 2004), sia in campo veterinario.

Le prime segnalazioni di parassiti riferibili a *T. gondii* risalgono al 1900, quando furono descritti parassiti *toxoplasma*-like in mammiferi ed uccelli. Pochi anni dopo, nel 1908, in una comunicazione alla Società Scientifica di San Paolo in Brasile, il ricercatore calabrese Alfonso Splendore descriveva “Un nuovo protozoo (corpuscolo reniforme) parassita dei conigli incontrato nelle lesioni anatomiche di una malattia che ricorda in molti punti il Kalaazar dell'uomo”.

Sempre nello stesso anno, i ricercatori francesi Nicolle e Manceaux (1908), segnalavano la presenza di un protozoo a forma di arco nella milza ed in altri organi di un piccolo roditore selvatico africano, *Ctenodactylus gondi*, presso l'istituto Pasteur di Tunisi. Da qui la proposta di assegnare il protozoo al genere *Toxoplasma* (dal greco: *toxon* = arco e *plasma* = forma), comprendente un'unica specie, *Toxoplasma gondii*.

Per quanto riguarda il ciclo biologico del parassita, le prime notizie risalgono agli anni '60, quando alcuni studi misero in evidenza similarità ultrastrutturali tra i merozoiti extraintestinali di *T. gondii* ed i merozoiti intestinali dei coccidi del genere *Eimeria*, con la conseguente ipotesi che il ciclo vitale del parassita fosse simile a quello degli altri coccidi. Alla fine degli anni '60, si segnalò la presenza di stadi infettivi del protozoo (oocisti isospora-like) nelle feci del gatto. Solo nel 1970 Frenkel e Dubey descrissero completamente il ciclo biologico di *T. gondii* in seguito alla scoperta degli stadi sessuali del parassita nell'intestino tenue dei gatti.

Attualmente *T. gondii* è uno degli organismi maggiormente studiati dalla comunità scientifica internazionale, sia per la sua ubiquitarietà, sia per la sua importanza come link tra la medicina umana e la medicina veterinaria.

T. gondii comprende stadi asessuati (intracellulari) presenti nei tessuti extraintestinali di ospiti definitivi ed intermedi e stadi sessuati presenti esclusivamente nell'intestino degli ospiti definitivi.

Gli stadi extraintestinali in ospiti intermedi ed ospiti definitivi sono i tachizoiti ed i bradizoiti. I tachizoiti (*tachùs* = veloce), sono detti anche endozoiti. Si tratta di stadi intracellulari (2-4 µm di larghezza per 4-8 µm di lunghezza) di forma arcuata e con nucleo centrale. All'estremità anteriore presentano il complesso apicale, che permette la penetrazione attiva e rapida dei parassiti nei macrofagi, nelle cellule gliali o muscolari. Questo apparato di penetrazione è la struttura che più caratterizza il protozoo. È caratterizzato da un insieme di elementi, quali conoide, anello polare, fibrille costali-muscolari-secretorie. Il conoide

rappresenta il sistema di aggancio alla parete della cellula dell'ospite da cui si originano i toxonemi, strutture contrattili, responsabili di un movimento rotatorio-ondulatorio che assicura a *T. gondii* la mobilità e la penetrazione nella cellula ospite. Quest'ultima fase avviene dopo che strutture sacciformi (*rhoptrie*), con sede nel conoide, hanno secreto un enzima proteolitico, il quale in condizioni ideali, 37°C di temperatura e 7,6 di ph, esercita, non solo un'azione litica, ma promuove anche la perforazione del punto di attacco sulla superficie della cellula ospite. Nelle cellule in cui sono penetrati, i tachizoiti si riproducono molto rapidamente per endoduogenia asessuata (fino a 8-16 per cellula) all'interno di un vacuolo parassitoforo. Sono infettanti per passaggio sanguigno transplacentare, ma vengono distrutti dall'acidità gastrica (Genchi e Pozio, 2004).

I Bradizoiti (*bradùs* = lento) sono anche detti cistozoiti. Essi sono stadi latenti intracellulari (1-2 μm di larghezza per 7-8 μm di lunghezza), di forma lanceolata, simili ai tachizoiti, ma più sottili e con nucleo verso l'estremità posteriore. I bradizoiti, da qualche decina a qualche migliaio, sono contenuti all'interno di cisti di 15-200 μm presenti in alcuni tessuti, in particolar modo nei tessuti muscolare e nervoso (cervello, occhio, muscolatura cardiaca ed epischeletrica). Più rare le localizzazioni a livello di polmoni, fegato, reni. La parete cistica, spessa e rifrangente, deriva da una modificazione della membrana del vacuolo parassitoforo. In queste cisti, che rappresentano lo stadio terminale del ciclo biologico di *T. gondii* negli ospiti intermedi, i bradizoiti si riproducono lentamente per endoduogenia asessuata, fino a diverse centinaia per cisti. La loro persistenza per tutta la vita dell'ospite assicura immunità di premunizione forte, durevole e protettiva contro qualsiasi ulteriore infezione (Genchi e Pozio, 2004).

Gli stadi intestinali del parassita negli ospiti definitivi sono rappresentati da: schizonti, gameti, oocisti. Gli Schizonti sono situati principalmente nel digiuno e nell'ileo. Misurano 4-

17 μm di diametro e contengono 32 merozoiti. I Gameti sono situati nell'ileo e misurano circa 10 μm di diametro.

Le Oocisti si trovano nelle feci dei gatti infetti, non sono sporulate e misurano 12 x 10 μm .

Dopo la sporulazione, che avviene nell'ambiente esterno entro 1-5 giorni, l'oocisti di *T. gondii* contiene due sporocisti, ognuna contenente 4 sporozoiti. Questi hanno struttura simile a quella dei tachizoiti, sono infettanti e resistenti all'acidità gastrica, ma vengono distrutti da congelamento, cottura ed essiccamento a determinate condizioni (vedi paragrafi successivi).

2. Ciclo biologico

T. gondii è un parassita eteroxeno, a ciclo biologico indiretto. Gli ospiti definitivi del protozoo, ovvero quelli in cui il parassita si riproduce sessualmente (ciclo intestinale) sono il gatto domestico ed in generale tutti i felini. Essi sono definiti anche ospiti completi poiché, oltre agli stadi sessuali, albergano anche gli stadi asessuali (ciclo extraintestinale) del protozoo.

Ospiti intermedi di *T. gondii* sono, invece, tutti gli altri vertebrati omeotermi, ben 200 specie di mammiferi (compreso l'uomo) e 62 specie di uccelli di tutte le aree zoogeografiche del mondo, in cui il protozoo si riproduce solo asessualmente (ciclo extraintestinale). Il complesso ciclo riproduttivo di *T. gondii* consta quindi di due fasi; una divisione asessuata che ha luogo in diversi tessuti degli ospiti, sia definitivi che intermedi, ed una riproduzione sessuata che si svolge esclusivamente nell'intestino degli ospiti definitivi.

Il ciclo biologico di *T. gondii* potrebbe continuare all'infinito attraverso il passaggio di cisti tissutali tra ospiti intermedi, anche in assenza di ospiti definitivi, o tra ospiti definitivi senza ospiti intermedi (Tenter et al., 2000).

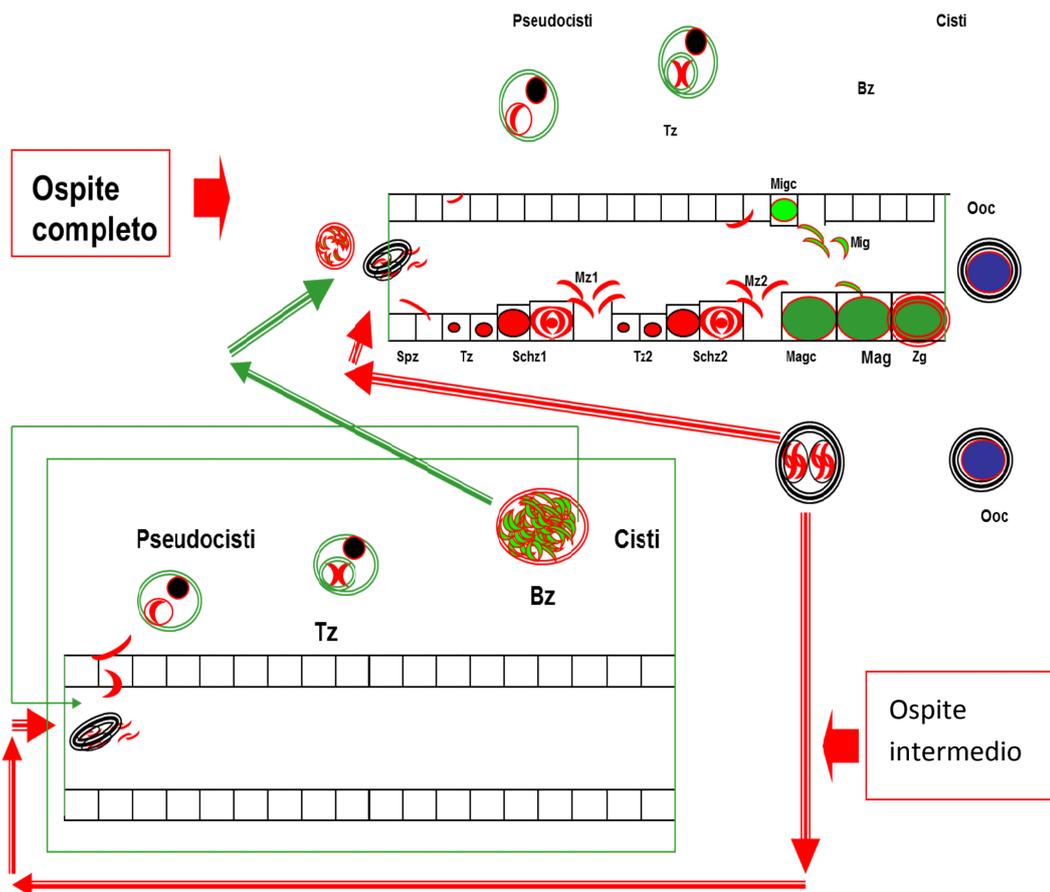


Figura 1. Ciclo biologico di *Toxoplasma gondii* (da Cringoli, 2010).

Come precedentemente menzionato, l'ospite definitivo di *T. gondii* è rappresentato da diverse specie di animali appartenenti alla famiglia *Felidae* (il parassita è stato rilevato in almeno 17 specie, Tenter et al., 2000), incluso il gatto domestico il quale ha un ruolo chiave per la epidemiologia della toxoplasmosi animale e umana. I gatti sono in grado di eliminare oocisti mediante le feci durante l'infezione acuta. Inizialmente, le oocisti non sono infettive ma queste sporulano entro un periodo che varia tra pochi giorni sino a diverse settimane. In questo stato, le oocisti sono in grado di infettare una grande varietà di ospiti intermedi, inclusi ovini, caprini, bovini, bufali e cavalli. Le oocisti sporulate possono sopravvivere nell'ambiente (e rimanere infettive) anche per un anno. Tuttavia, le condizioni ambientali possono significativamente influenzare la probabilità di

sopravvivenza e la durata della vita delle oocisti, infatti queste sono notevolmente sensibili a temperature estreme (fredde e calde) e alla bassa umidità (Tenter et al., 2000).

Quando le oocisti sono ingerite da un ospite intermedio, esse evolvono nella forma chiamata “tachizoita” (vedi paragrafo precedente), elemento infettivo tipico della fase acuta di infezione nell’animale.

Dopo un’intensa moltiplicazione, la quale può durare alcuni giorni, i tachizoiti iniziano ad invadere i tessuti dell’ospite, in particolare i tessuti muscolari e nervosi, e generano delle cisti. Tali cisti tissutali contengono i “bradizoiti”, l’altro stadio di *T. gondii*, i quali possono moltiplicare lentamente nella cisti per anni. Le cisti tissutali contenenti bradizoiti sono resistenti e possono persistere per l’intera vita dell’ospite e negli alimenti di origine animale (Tenter et al., 2000). Ospiti definitivi ed intermedi si infettano tramite l’ingestione di una delle forme infettanti di *T. gondii*, ovvero oocisti sporulate, tachizoiti e bradizoiti. La fonte di contaminazione più frequente per gli animali è rappresentata dall’ingestione di oocisti sporulate disperse dal gatto nell’ambiente (nel quale possono persistere per lunghi periodi). Per quanto riguarda l’infezione umana, il parassita è generalmente trasmesso attraverso tre vie principali 1) ingestione di bradizoiti contenuti in carne cruda/poco cotta 2) ingestione di oocisti sporulate presenti su alimenti o acqua contaminati; 3) trasmissione verticale di trachizoiti dalla madre al feto attraverso la via transplacentare (Jones et al., 2001).

Il ciclo si chiude quando l’infezione si propaga ad un altro ospite definitivo. Se quest’ultima è dovuta all’ingestione di bradizoiti, il gatto domestico inizia ad eliminare oocisti solo dopo un periodo prepatente di 3-10 giorni mentre questo periodo è più lungo (18-49 giorni) se l’infezione è causata dall’ingestione di oocisti sporulate. Anche la durata della escrezione di oocisti cambia: nel primo caso, le oocisti sono eliminate per un periodo che arriva ai 20 giorni, mentre fino a circa 10 nel secondo caso (Tenter et al., 2000).

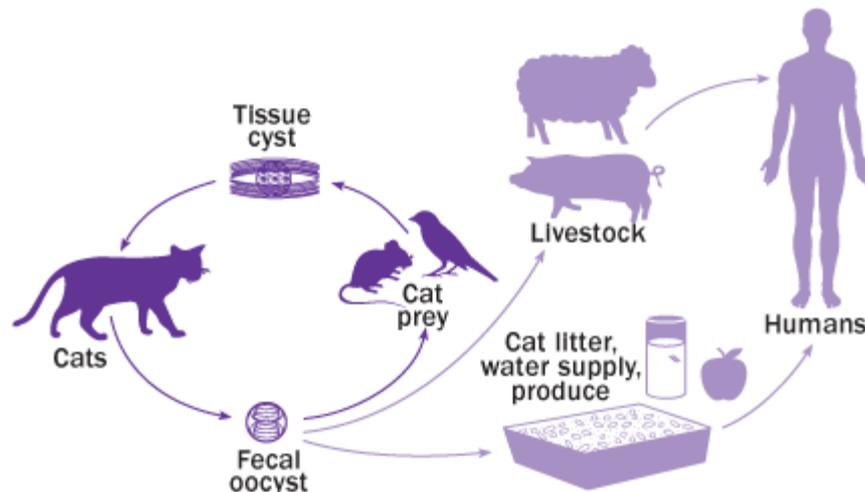


Figura 2 - Ciclo biologico di *Toxoplasma gondii* (da Tenter et al, 2000).

3. Infettività e persistenza nell'ambiente

Le forme infettive di *Toxoplasma gondii* sono sostanzialmente tre:

- Oocisti sporulate
- Tachizoiti
- Cisti tissutali/bradizoiti

Queste hanno differenti capacità infettive le quali sono legate alla loro resistenza nell'ambiente ed all'abilità di passare la barriera gastrica e intestinale. Le oocisti sporulate sono la forma più resistente, seguite dalle cisti tissutali. Al contrario, i tachizoiti non sopravvivono solitamente al processo di digestione e quindi vengono più facilmente distrutti dalle difese dell'ospite.

Le tre forme infettanti di *T. gondii* hanno infatti una differente resistenza ai diversi insulti ambientali:

Tachizoiti: Come riportato da Tenter et al. (2000), *“Essi sono estremamente sensibili alle condizioni ambientali e perdono rapidamente vitalità al di fuori dell’ospite. Cioè, è generalmente accettato che la trasmissione orizzontale di T. gondii attraverso i tachizoiti non è epidemiologicamente importante.”* Se ingeriti dall’ospite, i tachizoiti sono distrutti dai succhi gastrici. Tuttavia, alcuni studi hanno riportato che essi possono resistere per un breve periodo in soluzioni acide quali soluzioni a base di pepsina e ad alte dosi possono essere in grado di infettare il topo ed il gatto (Dubey, 1998). I tachizoiti possono essere escreti attraverso il latte. La pastorizzazione, e i trattamenti termici in generale, uccidono i tachizoiti. Sebbene raramente, i tachizoiti possono essere in grado di infettare esseri umani esposti ad alte dosi perchè soggetti al ripetuto consumo di latte contaminato non sottoposto a trattamenti di risanamento.

Cisti tissutali/bradizoiti: I bradizoiti contenuti nelle cisti tissutali sono molto più resistenti alla digestione gastrica dei tachizoiti. Essi possono sopravvivere nell’ambiente anche se sono meno resistenti alle diverse condizioni avverse rispetto alle oocisti. Le cisti tissutali sono inoltre in grado di sopravvivere a basse temperature (3 settimane a 1-4 °C o 1 settimana a -1/-8 °C); tuttavia, le temperature di congelamento inferiori a -12 °C potrebbero essere in grado di inattivarle. Il calore è anche in grado di uccidere i bradizoiti, infatti è stato dimostrato che temperature superiori a 67 °C sono in grado di inattivare le cisti. Tuttavia, il tempo di esposizione al calore potrebbe essere un fattore importante considerato che, in condizioni di laboratorio, cisti riscaldate a 60°C e 50 °C per 4 e 10 minuti rispettivamente rimangono vitali (Dubey et al., 1990). Diversi trattamenti applicati dall’industria delle carni sono in grado di uccidere i bradizoiti contenuti nelle cisti tissutali o, quantomeno, ridurre la loro concentrazione. Processi quali la salatura, l’affumicatura e l’essiccamento sono

frequentemente usati per la produzione di diversi prodotti a base di carne e possono incidere sulla probabilità che il parassita possa sopravvivere (vedi paragrafi successivi). La formazione di cisti tissutali avviene circa dopo soli 6-7 giorni dall'infezione e possono persistere per l'intera vita dell'ospite (Tenter et al., 2000). Tuttavia, poche informazioni sono disponibili riguardo il periodo di persistenza delle cisti nelle differenti specie animali e la sensibilità specie-specifica, ad esempio il bovino sembra essere maggiormente resistente rispetto ad altre specie d'allevamento (Guo et al., 2015c).

Oocisti/sporozoit: Se le condizioni ambientali sono favorevoli (areazione, umidità e temperatura), le oocisti sporulano e diventano quindi infettanti entro 1-5 giorni (Tenter et al., 2000). In tale forma, *T. gondii* è estremamente resistente nell'ambiente. Le oocisti sopravvivono per periodi brevi in caso di basse temperature o disidratazione ma sono teoricamente in grado di rimanere infettanti in condizioni accettabili fino a 18 mesi. Le oocisti sporulate sono state in grado di sopravvivere, in condizioni di laboratorio, per 54 mesi quando conservate a 48 °C e fino a 106 giorni quando tenute a -10 °C. In ogni caso, sebbene la loro notevole resistenza, rimangono piuttosto sensibili al calore (sono inattivate in 1-2 minuti se sottoposte a temperature di 55-60°C). Da rimarcare che, essendo altamente impermeabili, sono molto resistenti ai disinfettanti (Tenter et al., 2000).

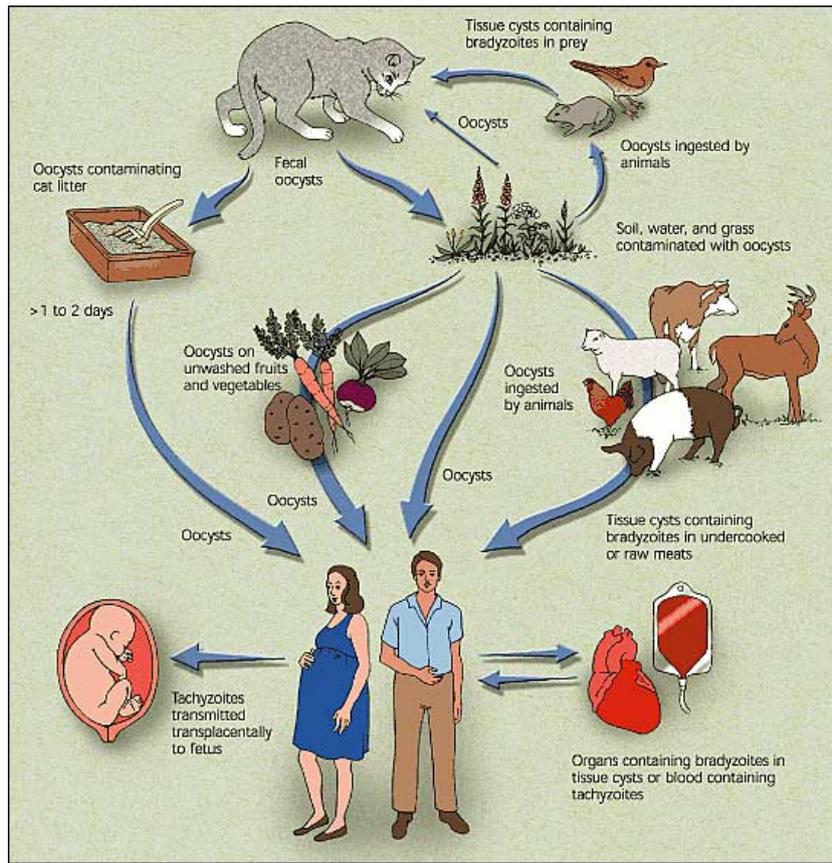


Figura 3 - *Toxoplasma gondii*: vie di infezione (da Jones et al., 2003)

4. Epidemiologia

T. gondii, in tutti gli ospiti, subisce fasi di divisione che portano alla formazione dei seguenti stadi infettivi: tachizoiti, bradizoiti (contenuti nelle cisti tissutali) e sporozoiti (contenuti nelle oocisti sporulate) che rappresentano le vere forme di disseminazione.

Tutte e tre le fasi sono infettive sia per gli ospiti intermedi che per quelli definitivi. L'infezione causata da *T. gondii* può essere contratta, quindi, dagli ospiti, principalmente attraverso una di queste vie:

- **Trasmissione orizzontale** per ingestione di oocisti sporulate dall'ambiente;
- **Trasmissione orizzontale** per ingestione di cisti in carne cruda o poco cotta o in visceri;
- **Trasmissione orizzontale** di tachizoiti (sangue, latte);
- **Trasmissione verticale** di tachizoiti via placenta (soprattutto uomo e ovino) o colostro.

Al momento, tuttavia, non è stato ancora accertato quale tra queste vie di trasmissione sia la più importante dal punto di vista epidemiologico (Tenter et al., 2000).

Le fonti principali di contagio per l'uomo e per gli animali non sono ancora state accertate con sicurezza. L'uomo, infatti, può contrarre la toxoplasmosi per via alimentare, principalmente attraverso carni crude, o poco cotte, di animali infestati o attraverso vegetali contaminati da feci di gatto. Per questo motivo, la malattia colpisce sia i vegetariani che gli onnivori.

Le oocisti, espulse dal gatto, sono molto resistenti, si mantengono a lungo infettanti e possono venire inattivate solo con una adeguata cottura. Nelle carni degli animali si possono ritrovare forme libere, pseudocisti o cisti. Queste, a differenza delle oocisti che presentano caratteristiche di resistenza e di infettività, tali da farle considerare serbatoio naturale del parassita, assumono un ruolo importantissimo nella propagazione dell'infezione, anche se sono sensibili al congelamento, alla cottura, dai processi di maturazione e alle radiazioni ionizzanti. Numerosi studi, evidenziando frequentemente la presenza di *T. gondii* in forma cistica nel maiale, hanno fatto sì che le carni di questa specie animale, nonché i suoi derivati, rappresentino gli alimenti maggiormente a rischio ai fini del contagio all'uomo.

Oltre che nel maiale, *T. gondii* è stato frequentemente osservato negli ovini, nelle capre e, anche se con minore frequenza, in pollame, conigli e cavalli. Le pecore e le capre mostrano alti valori di sieroprevalenza, in molte aree del mondo, in quanto si tratta di animali tenuti al pascolo e quindi maggiormente esposti alle infezioni a causa della contaminazione dell'ambiente da parte delle oocisti. Negli ovini, ed in misura minore nei caprini, l'insorgenza di un'infezione da *T. gondii* provoca un improvviso aumento del numero degli aborti in allevamento.

Recenti studi hanno inoltre evidenziato che alcuni casi di toxoplasmosi acuta riscontrati negli esseri umani sono stati associati al consumo di latte di capra non pastorizzato (Riemann et al., 1995). E' interessante notare il caso di una famiglia, proprietaria di capre, in cui *T. gondii* è stato trasmesso a due bambini che frequentemente consumavano latte di capra non pastorizzato, mentre, i loro genitori, che ne avevano consumato nel the o nel caffè, sono risultati sieronegativi. Ciò potrebbe essere spiegato in quanto i bambini, possedendo una bassa concentrazione di enzimi proteolitici nell'apparato digerente, che distruggono i tachizoiti

durante la digestione gastrica, sono più suscettibili alla toxoplasmosi rispetto agli adulti (Tenter et al., 2000).

Infine, è necessario riferire che i tachizoiti potrebbero entrare nei loro ospiti, penetrando anche attraverso le mucose delle prime vie digerenti guadagnando l'accesso al sistema circolatorio o al sistema linfatico, senza dover attraversare lo stomaco.

Altri veicoli di trasmissione di tachizoiti protozoari possono essere, occasionalmente, alcuni secreti del corpo, come la saliva, l'urina, le lacrime ed il liquido seminale, anche se non sono emersi casi evidenti di trasmissione agli esseri umani attraverso tali vie.

Recenti studi effettuati sull'uomo, hanno dimostrato che le fonti d'infezione possono variare tra popolazioni con culture ed abitudini alimentari differenti (Dubey e Beattie, 1988). In Canada è stata registrata un'epidemia congenita di toxoplasmosi associata al consumo di carne di caribù, mentre uno studio sierologico condotto in donne in gravidanza, che vivevano nello stesso posto, ha evidenziato positività in donne che avevano consumato carne secca e fegato di foca e carne cruda di caribù (Pekeles et al, 1991; McDonald et al., 1989). In Australia, un'epidemia di toxoplasmosi congenita ed acuta fu causata dal consumo di carne di canguro e di agnello cotta al sangue (Robson et al. 1995). Il consumo di carne cruda di montone, servita ad una festa in Brasile, è stata invece considerata la causa di un'altra epidemia acuta di toxoplasmosi (Bonametti et al, 1997; Tenter et al., 2000).

E' importante ritenere che, in aggiunta alla carne, le cisti di *T. gondii* potrebbero formarsi anche in altri organi di animali infetti (Tenter et al., 2000). Infatti, diversi casi di toxoplasmosi umana sono stati evidenziati, in Corea, dopo il consumo di milza e fegato crudi di cinghiale, e fegato crudo di maiale, alimenti considerati di elevato valore nutrizionale nei Paesi asiatici

(Choi et al., 1997). Gli episodi riportati evidenziano che il rischio di contagio da *T. gondii* è strettamente collegato alle abitudini culturali ed alimentari nelle diverse popolazioni.

I dati ottenuti dalle epidemie di toxoplasmosi acuta, sono di solito legati ad un occasionale contagio e non forniscono notizie sulla reale situazione epidemiologica nell'intera popolazione. Difatti, poiché la toxoplasmosi è una malattia asintomatica nei pazienti immunocompetenti, questi ultimi casi non vengono registrati dai programmi di rilevazione di questa patologia. Ciò, naturalmente, concorre a sottostimare questa importante parassitosi. Infine, di interesse epidemiologico, sono da ricordare i casi di toxoplasmosi, contratta in fase di trapianto di fegato, reni o cuore e durante trasfusioni di sangue (Tenter et al., 2000).

5. Sintomatologia negli animali domestici

La sintomatologia clinica e il decorso della toxoplasmosi variano considerevolmente in base alla specie animale e all'età del soggetto. I piccoli ruminanti sono la specie domestica maggiormente sensibile al parassita il quale causa principalmente aborto e mortalità neonatale. La circolazione del parassita in un gregge può determinare l'insorgenza di focolai di malattia in grado di incidere in maniera rilevante sul *management* aziendale tanto che la toxoplasmosi è considerata una delle principali problematiche di importanza economica (seconda solo all'aborto da *Chlamidia*) in diversi paesi o zone a maggiore vocazione agricola e pastorale (Dubey, 2009). Nel Regno Unito, ad esempio, la toxoplasmosi è la prima causa di perdita di agnelli nel 10 – 20% delle greggi con problemi di aborto e presenta un'incidenza annuale del 2% nella popolazione di pecore da riproduzione (Buxton, 1990; Buxton et al., 2007). L'aborto, mummificazione fetale e mortalità neonatale a causa della toxoplasmosi si verificano con una certa frequenza anche nelle capre.

Le caratteristiche cliniche della malattia variano anche a seconda degli organi colpiti come anche dalle modalità di infezione (congenita o acquisita). Le principali manifestazioni sono di natura neurologica (encefaliti) nel caso di un'infezione congenita e di natura febbrile con polmonite e enterocolite in casi di infezione postnatale. Tuttavia la stragrande maggioranza delle infestazioni si verificano senza nessuna sintomatologia in quanto le cisti tissutali possono essere rinvenute in diversi animali apparentemente senza causare alcun danno (Casarosa, 1985).

Ovino e caprini: La manifestazione clinica di una infezione sistemica nei piccoli ruminanti è molto rara. Normalmente, i sintomi sono poco specifici e comprendono febbre, dispnea, e tremori. La sintomatologia più importante riguarda le pecore (e capre) in riproduzione. Infatti, aborto e morte fetale si verificano nelle pecore in caso di infezione primaria durante la gravidanza. Nella madre, l'infezione è limitata dallo sviluppo di una risposta immunitaria, tuttavia non è in grado di impedire il passaggio del parassita al feto. Il risultato di tale infezione dipenderà dal periodo della gestazione:

- L'infezione prima del secondo mese di gravidanza determina la morte embrionale e riassorbimento o mummificazione
- Tra il secondo e il terzo mese si può avere morte fetale e aborto
- L'infezione dopo il terzo mese di gravidanza determina la nascita di agnelli morti, disvitali o congenitamente infetti.

L'infezione nella madre determina lo sviluppo di una risposta immunitaria protettiva per le successive gravidanze (Radostits et al., 2006; Urquhart et al., 2006).

Bovino: Si considera che la toxoplasmosi non abbia un ruolo significativo nei casi di aborto nella specie bovina. Nei soggetti adulti la malattia decorre solitamente in forma acuta con febbre, dispnea, atassia e ipereccitabilità seguita da forte letargia in fase avanzata. La nascita di vitelli morti o disvitali che muoiono poco dopo è rara ma possibile. I vitelli infettati

congenitamente mostrano febbre, dispnea, tosse, scolo nasale, convulsioni e tremori alla testa ed il collo. La morte sopraggiunge solitamente 2 – 6 giorni dopo (Radostits et al., 2006; Urquhart et al., 2006).

Suino: La specie suina è considerata altamente suscettibile e in caso di *outbreak* i suini di tutte le età possono essere infettati. I soggetti adulti possono manifestare debolezza, tosse, tremori, diarrea ma senza febbre mentre i suini più giovani presentano una sintomatologia più acuta con febbre elevata (40 – 42 °C), diarrea e la morte sopraggiunge solitamente dopo un decorso di diverse settimane (Dubey, 2009b). I lattonzoli (2 – 4 settimane di età) possono presentare ulteriori sintomi quali dispnea, tosse e soprattutto atassia e incoordinamento riferibili a un interessamento del sistema nervoso centrale. Le scrofe gravide solitamente abortiscono, i suinetti nascono disvitali o sopravvivono e sviluppano la stessa sintomatologia descritta per i lattonzoli a 1 – 3 settimane di età (Radostits et al., 2006).

Cavallo: La malattia clinica è molto rara nei cavalli che sono infatti considerati una specie resistente.

Gatto: Sebbene il gatto sia il portatore definitivo del parassita e possa frequentemente andare incontro ad infezione, la malattia si manifesta in forma clinica in casi molto rari. Nella forma acuta è possibile osservare sintomi respiratori quali polipnea e dispnea (83% dei casi), anoressia e febbre (66%), letargia e depressione (57%), anemia (26%), diarrea (21%), vomito (17%). Nelle rare forme croniche, si manifestano disordini neurologici associati ad atrofia muscolare e disturbi oculari.

6. Diagnosi di laboratorio

La diagnosi di toxoplasmosi può essere attuata con diversi ausili diagnostici:

- Esame coprologico
- Esame istologico
- Prove biologiche
- Esami sierologici
 - DT (Dye test)
 - IFAT - Indirect Fluorescent Antibodies Test
 - IHAT - Indirect Hemoagglutination Antibodies Test
 - LAT - Latex Agglutination Test
 - ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
 - MAT: Modified Agglutination Test
- PCR

L'esame coprologico viene condotto esclusivamente su materiale fecale proveniente dagli ospiti definitivi (gatto domestico e i felidi selvatici) e consiste nel ricercare la presenza di oocisti non sporulate mediante tecnica di flottazione con soluzione satura di solfato di zinco (metodo di Telmann). Questo tipo di esame ha il vantaggio di svelare la presenza diretta del parassita e avere costi contenuti tuttavia presenta anche diversi svantaggi. Innanzitutto, è necessaria una diagnosi differenziale nei confronti di altri coccidi, quali *Isospora* (*I. felis*, *I. rivolta*), *Sarcocystys* (*S. bovifelis*, *S. ovifelis*) e *Hammondia hammondi*. Inoltre, il test risulta utile solamente durante il periodo di patenza che è notoriamente molto breve (circa 20 giorni).

L'esame istologico viene eseguito per determinare la presenza di *T. gondii* durante la fase cronica nei tessuti target del parassita ovvero linfonodi, milza, fegato, polmone, SNC e, più raramente, tessuto muscolare. I campioni vengono trattati con le classiche procedure di fissazione, disidratazione, inclusione ed infine colorazione (mediante Giemsa e ematossilina-eosina). L'esame istologico può essere applicato per la diagnosi di toxoplasmosi di animali appartenenti a qualsiasi specie sensibile al parassita tuttavia per essere affidabile deve essere

eseguito da operatori esperti ed adeguatamente addestrati, richiede una significativa quantità di tempo e presenta una scarsa sensibilità in caso di infestioni pauciparassitarie.

Per quanto riguarda le prove biologiche, queste consistono nell'inoculare (o talvolta far ingerire) estratti di tessuti da un animale potenzialmente infetto in specie sensibili, principalmente il topo o il gatto. Al fine di rilevare il contagio dell'animale (e quindi dimostrare la presenza del parassita vitale nel soggetto inizialmente testato) vengono eseguiti uno o più test come ad esempio la ricerca di anticorpi contro *T. gondii*, esami istologici o di biologia molecolare su campioni di tessuti *target*, esame coprologico per rilevare la presenza delle oocisti (nel gatto). Il gatto risulta essere più sensibile rispetto al topo. In alcuni casi, i soggetti impiegati vengono sottoposti a un trattamento immunosoppressivo (mediante cortisonici) al fine di renderli maggiormente vulnerabili all'infezione e quindi aumentare la sensibilità del test. Le prove biologiche sono riconosciute come “*gold standard*” per la ricerca di *T. gondii*: hanno un alto grado di sensibilità diagnostica e quindi permettono di rilevare anche infezioni pauciparassitarie. Il loro utilizzo è strettamente limitato dal fatto che richiedono lunghi tempi di esecuzione (generalmente 6 settimane), sono particolarmente costose e presentano evidenti implicazioni etiche (Liu et al., 2015).

Le tecniche sierologiche disponibili per la diagnosi di toxoplasmosi negli animali sono numerose tuttavia soltanto alcune di queste sono utilizzate frequentemente. Inizialmente, la prima risposta anticorpale (sia IgM che IgG) è nei confronti degli antigeni parassitari cuticolari. Gli anticorpi IgM sono presenti già una settimana dopo l'infezione e sono rilevabili per mesi (Liu et al., 2015). Sebbene dopo gli anticorpi IgM, gli anticorpi IgG insorgono comunque precocemente, quindi la loro presenza rappresenta un segno inequivocabile dell'avvenuta infezione ma non permette di stimare il “*timing*” di quest'ultima. Al contrario, la presenza di anticorpi IgA è considerata tipica di infezione in fase acuta (Liu et al., 2015). In

seguito, la produzione anticorpale (costituita stavolta solo da anticorpi IgG) è rivolta nei confronti degli antigeni citoplasmatici.

Il DT e l'IFAT, poiché utilizzano come antigene il parassita intero, sono i test più precoci e specifici e, per questa ragione, sono considerati dall'OMS le metodiche sierologiche di riferimento per *T. gondii*. Il DT necessita del parassita vivo, quindi è potenzialmente pericoloso e richiede l'impiego di personale con alto grado di addestramento. L'IFAT utilizza invece tachizoiti non vitali ed è relativamente poco costoso. Tuttavia, poiché si basa rilevazione della fluorescenza indiretta scaturita dal complesso antigene-anticorpo, è una prova operatore-dipendente e quindi può prestarsi ad interpretazioni durante la lettura dei risultati.

Il MAT ha sensibilità e specificità paragonabili al DT (Liu et al, 2015). In questo caso vengono utilizzati tachizoiti in fissati con formalina alle pareti di pozzetti di piastre per microtitolazione; dopo l'aggiunta del siero da testare, la valutazione dello strato di precipitazione che si viene a formare permette di stabilire l'eventuale presenza di anticorpi contro *T. gondii* nel siero. Il MAT rileva con accuratezza principalmente gli anticorpi IgG, è una tecnica facile da eseguire e, poiché non è particolarmente costosa, viene adottata nella diagnosi di laboratorio di routine o durante studi epidemiologici (Liu et al, 2015).

IHAT, LAT, ELISA si avvalgono generalmente di antigeni endocitoplasmatici e per questa ragione hanno performance diagnostiche solitamente inferiori ai test precedentemente menzionati. I test LA o IHA hanno normalmente come target gli anticorpi IgG; possiedono il vantaggio di essere rapidi e facilmente eseguibili. I kit diagnostici ELISA presentano caratteristiche paragonabili all'IFAT, MAT e DT, sono in grado di rilevare tutte le più importanti classi anticorpali (IgM, IgG e IgA) e consentono di processare contemporaneamente un elevato numero di campioni. Hanno però lo svantaggio di essere

difficilmente standardizzabili e i risultati, espressi tramite una reazione colorimetrica, sono talvolta difficili da interpretare.

Le prove che si avvalgono della biologia molecolare (PCR) stanno divenendo sempre più diffuse ma, ai fini della diagnosi *ante-mortem*, sono ancora utilizzate in associazione alle tecniche sierologiche. La regione target amplificata è generalmente il gene B1 (il primo ad essere stato studiato a fini diagnostici) tuttavia sono stati sviluppati altri protocolli che amplificano parti differenti del genoma del parassita quali l'”elemento ripetuto 529 bp” e le sequenze ITS-1. La ricerca del materiale genetico viene condotta principalmente su fluido cerebrospinale, umore acqueo, fluido amniotico, feto e invogli fetali e sangue. Mentre l'analisi ematica presenta limiti diagnostici legati alla bassa concentrazione del parassita eventualmente presente nel sangue, l'esame tramite PCR di feti abortiti o invogli fetali rappresenta un importante ausilio in Medicina Veterinaria per la diagnosi di toxoplasmosi (in particolare nei piccoli ruminanti).

Infine, negli ultimi anni sono stati inoltre messi appunto metodi PCR Real-time che permettono di rilevare basse concentrazioni di DNA e stimare la concentrazione del parassita presente. Particolarmente interessante è il protocollo descritto da Opsteegh et al. (2011) che, avvalendosi di un metodo di cattura magnetica per isolare il DNA di *T. gondii*, è in grado di quantificare in maniera accurata il numero di bradizoiti presenti in campioni di carne nonostante l'eterogenea distribuzione del parassita e la piccola quantità di campione sottoposto a prova.

7. Persistenza nell'ospite e relazione tra sieropositività e presenza del parassita vitale nei tessuti muscolari

Solitamente, la reazione sierologica dell'animale è considerata un buon indicatore per la presenza di cisti di *T. gondii* nei tessuti muscolari dell'animale. Tuttavia, pochi esperimenti sono stati condotti per studiare la relazione tra lo “*status*” di animale sieropositivo e la presenza di cisti vitali nei muscoli del soggetto. Una ricerca bibliografica approfondita dei diversi studi che hanno indagato tale relazione nelle diverse specie animali da reddito è stata eseguita.

Al fine di una corretta lettura dei dati, è importante ricordare che le *performance* analitiche dei vari metodi sierologici per la ricerca di *T. gondii* possono essere differenti e che, in ogni caso, non sono paragonabili alla sensibilità e alla specificità delle prove biologiche, le quali sono riconosciute come “*gold standard*” per la ricerca del parassita (vedi paragrafo precedente). Di seguito vengono riportati in dettaglio i risultati di una ricerca bibliografica eseguita allo scopo di evidenziare il legame tra sieropositività/presenza del parassita vitale in tessuti muscolari delle principali specie allevate per la produzione di carni destinate al consumo umano.

- **Suino:** Dubey et al. (1997) hanno isolato *T. gondii* da 14 di 16 suini sieropositivi precedentemente inoculati con 1.000 o 10.000 oocisti sporulate. I suini sono stati sacrificati dopo un periodo compreso tra 103 e 875 giorni post-infezione al fine di essere testati con prova biologica. Tuttavia, lo studio non specificava quali tessuti animali sono stati utilizzati per le prove analitiche. In un altro studio Dubey et al. (1996) hanno somministrato a 42 suini mediante via orale oocisti di *T. gondii* a basso dosaggio (10 e 1 oocisti rispettivamente). Le prove biologiche eseguite su campioni di cervello, lingua e cuore hanno mostrato che 13 su 14 suini che avevano ingerito 10 oocisti e 17 di 28 suini di quelli alimentati con 1 oocisti erano positivi cioè ospitavano cisti vitali di *T. gondii* nei tessuti. I campioni erano stati prelevati 75-99 giorni dopo l'infezione sperimentale. In maniera simile, Garcia et al. (2006) hanno

sperimentalmente infettato 10 suini con 4×10^4 oocisti di *T. gondii*, li hanno macellati 60 giorni dopo, e hanno testato un pool di tessuti muscolari (lingua, cuore e diaframma) per ogni animale mediante prove biologiche al fine di rilevare la presenza del parassita vitale. Tutti i suini possedevano anticorpi contro *T. gondii* mentre la prova biologica ha rilevato che 31 (di 48, il 64%) campioni di muscolo proveniente da 8 dei 10 suini conteneva cisti vitali del parassita.

Riguardo gli studi che si sono occupati dell'infezione naturale, Omata et al. (1994) hanno investigato riguardo l'incidenza di *T. gondii* in 109 suini macellati in Argentina. Approssimativamente il 40% era sieropositivo mentre i risultati della prova biologica eseguita utilizzando campioni di diaframma ha dimostrato a sua volta che 14 (15.7%) avevano una latente e/o persistente infezione. 12 dei 14 suini positivi alla prova biologica erano sieropositivi (2 soggetti erano stati testati nonostante fossero risultati negativi alle prove sierologiche); quindi, considerando solo gli animali sieropositivi, il 27% di questi sono stati abili di infettare i topi utilizzati per l'esperimento. Al contrario, Dubey et al. (1995) hanno isolato il parassita dal topo e dal gatto da 141 di 222 cuori provenienti da scrofe sieropositive (63.5%).

Il frequente isolamento del parassita da tessuti muscolari di suini con anticorpi contro *T. gondii* conferma che la sieropositività possa essere un buon indicatore della presenza di parassiti vitali nei tessuti. Tuttavia poche informazioni si hanno riguardo la distribuzione delle cisti all'interno dell'apparato muscolo-scheletrico degli animali infetti e quindi sull'esistenza di eventuali distretti muscolari maggiormente predisposti alla contaminazione. Inoltre, non esistendo informazioni riguardo la concentrazione di parassiti presenti nel muscolo, è possibile una grande variabilità in termini di carica parassitaria.

- **Bovino:** pochi studi riportano l'isolamento di *T. gondii* da tessuti di bovini naturalmente o sperimentalmente infettati. Dubey and Thulliez (1993) hanno inoculato 10,000 oocisti in 4 maschi castrati e macellati dopo 350, 539, 1191 e 1201 giorni. Gli Autori dello studio hanno quindi saggiato mediante prova biologica campioni di lingua, cuore, muscolo semimembranoso e semitendineo, muscolo intercostale, muscolo con *longissimus dorsi*, cervello, reni, fegato e di piccolo intestino. *T. gondii* è stato isolato da animali uccisi 350, 539, 1191 giorni dopo l'infezione. Tutti gli animali hanno mostrato sierconversione ma l'ultimo soggetto ad essere macellato è diventato sieronegativo dopo 15 mesi. Il parassita è stato rilevato principalmente nel cuore (n=3) e nel fegato (n=2) e solo in 2 campioni di muscolo (semitendineo e intercostale), i quali appartenevano allo stesso animale. I campioni sono stati saggiati sia con prove biologiche sul topo che sul gatto: *T. gondii* non è stato isolato da nessuno dei 135 topi ma solo dal gatto che è ritenuto essere più sensibile. Lo studio suggerisce quindi un basso tropismo di *T. gondii* nei confronti dei tessuti di questa specie ed in particolare nei confronti dei tessuti muscolari. In un precedente studio, Dubey (1983) aveva infettato 22 bovini (16 vitelli e 6 vacche) con una dose di 10.000 oocisti. Il parassita è stato rilevato dopo solo 11 giorni ma nessun tessuto è risultato colonizzato da cisti dopo il 287^{esimo} giorno post-infezione. Sulla base dei dati riportati, l'Autore afferma che il parassita è probabilmente inattivato dopo poche settimane nei bovini, e che quindi tale specie sembra essere più resistente di altre quali il suino e l'ovino. Tale dichiarazione sembra essere supportata dai risultati di una *survey* nazionale riguardante la presenza di *T. gondii* in carne venduta al dettaglio in USA. Infatti, il parassita non è stato rilevato in 2049 campioni di carne bovina: cioè sembra essere probabile che la carne bovina abbia un ruolo trascurabile

dal punto di vista epidemiologico nella toxoplasmosi umana come supposto anche in altri lavori (Guo, 2015c; Dubey & Jones, 2008).

- **Ovino:** *T. gondii* vitale è stato isolato dalla carne di ovino: 17.7% di 433 campioni di diaframma e cuore da agnelli sono risultati positivi in Francia (Halos et al., 2010). Tuttavia, la proporzione di animali sieropositivi che avevano effettivamente cisti di *T. gondii* nei loro tessuti non era chiaramente definita in tale studio. Uno studio egiziano ha riportato che 134 di 280 ovini (47.8%) erano sierologicamente positivi per la presenza di anticorpi contro *T. gondii* e solo 28 di loro (20.9%) presentava la presenza di cisti vitali in campioni di muscolo sottoposti a prova biologica con l'impegno di topi da laboratorio (Hassanain et al., 2011). In uno studio simile, Ragoza et al. (2008) hanno esaminato campioni di cervello, cuore e diaframma di 82 pecore sieropositive avvalendosi sempre di prove biologiche e la presenza del parassita vitale è stata rilevata in tessuti provenienti da 16 soggetti (19.5%). Riguardo la specie ovina, Hassanain et al. (2011) hanno ipotizzato che non tutte le pecore siero-reattive siano portatrici di cisti vitali di *T. gondii* nei loro tessuti. Inoltre, gli stessi autori ipotizzano che la disseminazione dei bradizoiti nella carcassa potrebbe non essere uniforme. Di conseguenza, testare pochi campioni per ogni animale potrebbe non essere sufficiente per valutare l'intera carcassa.
- **Capra:** pochi studi sono presenti per la capra, tuttavia sembra esserci in questa specie una rilevante relazione tra sieropositività/isolamento del parassita, al pari dell'ovino. Gebremedhin et al. (2014) hanno testato campioni di cuore proveniente da 48 capre (44 sieropositive e 4 sieronegative) in Etiopia con prove biologiche al fine di rilevare la presenza di *T. gondii* vitale. Il parassita è stato isolato da 20 soggetti (45.4%) di cui 2 sieronegativi. Dubey et al (2011) hanno esaminato 234 cuori di capra mediante la ricerca di anticorpi per *T. gondii* e quindi presumibilmente provenienti da animali

sieropositivi. Dei 125 risultati positivi, 112 sono stati saggiati mediante prova biologica sul topo e da 29 è stato isolato *T. gondii* (25.9%).

- **Pollo:** anche per gli avicoli, e quindi il pollo, sono carenti gli studi in grado di correlare la sieropositività dell'animale con l'effettiva presenza di cisti di *T. gondii* vitali (Guo et al., 2015c). In uno studio austriaco è stato descritto l'isolamento di *T. gondii* da 56 campioni di cuore di pollo provenienti da volatili dotati di anticorpi contro *T. gondii* (206 individui testati, 26.8%) (Dubey et al., 2005). Uno studio simile effettuato in Israele ha riportato una percentuale di isolamento più alta se si considerano solo gli animali sieropositivi (19/45, 42.2%) (Dubey et al., 2004).

La successiva tabella riassume i dati precedentemente riportati.

Tabella 1 – Isolamento di *Toxoplasma gondii* da animali sieropositivi

Specie	Autori	Numero di animali sieropositivi	Tecnica sierologica	Numero di animali con <i>T. gondii</i> vitale*	Percentuale di animali positivi	Giorni trascorsi dall'infezione sperimentale	Tessuti analizzati
Suino	Dubey et al. (1997)	16	Diverse tecniche (MAT (test A) LAT IHA ELISA DT)	14	87,5	103 - 875	Non specificato
Suino	Dubey et al. (1996)	42	Diverse tecniche (MAT (test A) LAT IHA ELISA DT)	30	71,4	75-99	Cervello, lingua e cuore
Suino	Garcia et al. (2006)	10	IFA	8	80,0	60	Solo campioni di muscolo
Suino	Omata et al. (1994)	-	IFAT	12	27,0	-**	Diaframma
Suino	Dubey et al. (1995)	222	MAT	141	63,5	-**	Cuore
Bovino	Dubey and Thulliez (1993)	4	ND	3	75,0	dopo 350, 539, 1191 e 1201	Lingua, cuore, muscolo semimembranoso e semitendineo (roast), muscoli intercostali (ribs), <i>longissimus dorsi</i> (tenderloin), cervello, reni, fegato e piccolo intestino
Ovino	Ragozo et al. (2008)	82		16	19,5	-**	
Ovino	Hassanain et al. (2011)	134	LAT and ELISA	28	20,9	-**	
Capra	Gebre-medhin et al. (2014)	44	DAT	18	40,9	-**	Cuore
Capra	Dubey et al. (2011)	112	MAT	29	25,9	-**	Cuore
Pollo	Dubey et al. (2004)	45	MAT	19	42,2	-**	Cervello e Cuore

Pollo	Dubey et al. (2005)	206	MAT	56	27,2	-**	Cuore
*Prova biologica ** infezione naturale							

8. Sieroprevalenza di *T. gondii* in allevamento

Numerosi studi, eseguiti in tutto il mondo, hanno indagato riguardo la prevalenza di *T. gondii* negli allevamenti di specie animali da reddito. Generalmente, l'infezione da *T. gondii* dei capi viene valutata mediante test sierologici (ELISA, IFAT, MAT sono i test più usati). La sieropositività, infatti, viene generalmente considerata un buon indicatore della presenza del parassita vitale (Dubey & Jones, 2008) e quindi della sua prevalenza in allevamento.

Tuttavia è estremamente difficile paragonare i dati dei diversi studi poiché diversi fattori possono influire sui risultati. In particolare:

- La specie esaminata
- La nazione/area in cui è stato condotto lo studio
- Il sistema di gestione dell'azienda (es. intensivo, estensivo con o senza pascolo, biologico)
- La categoria di animali testata (es. scrofe, maiali da ingrasso, etc)
- *Performance* diagnostiche del metodo analitico adottato

La seguente tabella, tratta da una recente review di Guo et al. (2015c), elenca i risultati degli studi pubblicati dal 2004 al 2014 che hanno indagato riguardo la sieroprevalenza di *T. gondii* in suini allevati.

Tabella 2 – Sieroprevalenza di *T. gondii* nel suino dal 2004 al 2014 (tratta da Guo et al., 2015c)

TABLE 1. Seroprevalence of *T. gondii* infection in swine, 2004 to 2014

Country: area	Year	Source or type ^a	No. of sampled animals	Seroprevalence (%)	Method, titer ^b	Risk studies ^c	Reference
Brazil: southern Piauí	2014	Farm	143	25.5	IgG ELISA	Yes	59
Brazil: Rio Grande do Sul	2014	Slaughter	100	36.0	IFAT, 1:64	No	32
Brazil: Paraíba	2014	Slaughter	190	19.5	IFAT, 1:64	Yes	93
Mexico: Veracruz	2014	Backyard	402	45.3	MAT, 1:25	Yes	10
Romania: central, western, northwestern	2013	Backyard	2,564	30.5	IFAT, 1:32	No	176
		Sows	371	12.4			
		Finisher	660	0			
China: Heilongjiang	2013	Finisher	1,014	4.6	IHAT, 1:64 ^d	Limited	39
Ireland: all regions	2013	Finisher	317	4.7	LAT, 1:64	Limited	118
Latvia: Kurzeme, Latgale, Vidzeme, Zemgale	2013	Intensively reared finisher	269	0.4	In-house ELISA	No	55
		Free-range finisher	543	6.2			
Portugal: northern	2013	Farm	254	9.8	MAT, 1:20	Limited	152
Slovakia: Košice, Prešov, Banská, Bystrica, Nitra, Trnava, Bratislava	2013	Slaughter	923	2.16	ELISA kit ^e	No	217
		Sow	47	4.26			
Brazil: Pernambuco	2012	Slaughter	305	12.5	IFAT, 1:64	No	195
Chile: Araucanía, Los Ríos	2012	Slaughter	340	8.8	ELISA kit ^f	No	164
China: Hubei	2012	Farm	2,277	29.6	AG-ELISA	Limited	63
China: Liaoning	2012	Slaughter	1,164	12.0	IHAT, 1:64 ^g	No	150
China: Chongqing	2012	Slaughter	908	30.6	IHAT, 1:64 ^d	No	241
Mexico: Oaxaca	2012	Backyard	337	17.2	MAT, 1:25	Yes	5
		Farm	188	0.5			
Brazil: Rio de Janeiro	2011	Slaughter	406	7.64	IFAT, 1:64	No	154
Brazil: Rio de Janeiro	2011	Indoor raised	27	11.5	In-house ELISA	No	96
		Free range	34	20.6			
Brazil: São Paulo	2011	Farm	200	48.0	IFAT, 1:64	No	233
China: Hubei	2011	Large-scale farm finishers	3,558	24.5	A/G ELISA	Yes	212
China: Zhejiang	2011	Hoggeries	813	53.4	ELISA kit ^h	Limited	247
Czech Republic: eight districts	2011	Slaughter	551	36.0	ELISA kit ⁱ	No	15
France: New Caledonia	2011	Slaughter	49	2.0	p-30 ELISA	No	189
Italy: Umbria	2011	Indoor-raised finisher	960	16.1	IFAT, 1:16	Yes	231
Mexico: Durango	2011	Slaughter	1,074	12.7	MAT, 1:25	Limited	7
Serbia: Belgrade	2011	Slaughter	488	9.2	MAT, 1:25	No	145
Switzerland: all regions	2011	Finisher	50	14.0	p-30 ELISA	No	23
		3–4 yr	120	36.0			
		Free range	100	13.0			
Switzerland: all regions	2011	Finisher	50	14.0	p-30 ELISA	No	24
		Sow	120	36.0			
		Free range	100	13.0			
West Indies: Grenada, Carriacou	2011	Not stated	247	23.1	MAT, 1:25	No	40
Brazil: Mato Grosso	2010	Sow	708	12.8	IFAT, 1:64	No	165
Brazil: Patos	2010	Slaughter	130	36.2	IFAT, 1:64	No	53
Brazil: Toledo	2010	Farm	606	13.4	MAT, 1:25	Yes	179
China: western Fujian	2010	Sow	605	14.4	IHAT ^g	No	129
China: Guangdong	2010	Slaughter	1,022	27.0	ELISA kit ^j	No	250
Poland: various regions	2010	Not stated	1,754	19.2	In-house ELISA	No	126
Spain: all regions	2010	Finisher	1,570	9.7	MAT, 1:25	Yes	107
		Sow	1,400	24.2			
Spain: Catalonia	2010	Finisher	880	20.2	MAT, 1:25	Yes	106
		Sow	322	15.5			
United States: all regions (NAHMS) ^k	2010	Indoor-raised finisher	6,238	2.6	ELISA kit ^f	Yes	122
Brazil: Bahia	2009	Farm	465	18.3	ELISA, 1:16	No	26
Brazil: Belém	2009	Slaughter	110	50.0	IHAT, 1:16	No	99
China: Yunnan	2009	Slaughter	831	17.0	IHAT, 1:64 ^d	No	254
Italy: Sicily	2009	Slaughter	2,160	16.3	ELISA kit ^e	Yes	234
Brazil: Paraná	2008	Piggeries	408	25.5	IFAT, 1:64	No	161

TABLE 1. *Continued*

Country: area	Year	Source or type ^a	No. of sampled animals	Seroprevalence (%)	Method, titer ^b	Risk studies ^c	Reference
Brazil: west Paraná	2008	Slaughter	304	7.2	MAT, 1:64	No	49
Canada: Ontario	2008	Finisher	6,048	0.74	ELISA kit ^f	No	181
Germany: eight federal states	2008	Finisher	4,999	4.1	ELISA	No	54
Malaysia: Perak, Penang, Johor, Selangor	2008	Sow	100	0	IFAT, 1:200	No	38
Panama: Coclé, Chiriquí, Herrera, Los Santos, Panamá, Veraguas	2008	Confinement-raised slaughter	290	32.1	IFAT, 1:20	No	44
Poland	2008	Slaughter	106	26.4	MAT, 1:40	No	210
The Netherlands	2008	Organic	406	10.9	ELISA	Yes	143
United States: Wisconsin, North Carolina, Ohio	2008	Outdoor-raised finishers	324	6.8	ELISA	No	109
		Indoor-raised finishers	292	1.1			
United States: Maryland	2008	Free range	48	25.0	ELISA kit ^f	No	77
Brazil: Minas Gerais, São Paulo	2007	Slaughter	262	0	MAT	No	178
Brazil: Paraná	2007	Slaughter	117	8.5	IFAT, 1:64	No	56
Brazil: Registro, São Paulo	2007	Small farm	550	20.2	MAT, 1:64	No	58
Taiwan: northern	2007	Slaughter	395	10.1	LAT, 1:32	No	215
The Netherlands	2007	Intensively raised	265	0.4	Standard ELISA	No	227
		Organic	402	2.7			
		Free range	178	5.6			
Vietnam: Ho Chi Min	2007	Finisher	325	23.0	MAT, 1:25	No	130
		Sow	207	32.3			
Brazil: Rondônia Amazon	2006	Farm	80	37.5	MAT, 1:25	No	35
Brazil: Rio de Janeiro	2006	Slaughter	38	65.8	IFAT, 1:64	Yes	29
Portugal: Vinhais	2006	Semi-intensively raised	333	15.6	MAT, 1:20	No	60
Serbia: various regions	2006	Slaughter	605	28.9	MAT, 1:25	Yes	144
The Netherlands	2006	Organic	2,796	3.0	ELISA	Yes	158
Brazil: São Paulo	2005	Free range	286	17.0	MAT, 1:25	No	62
Brazil: São Paulo, Pernambuco	2005	Farm	759	1.3	MAT, 1:64	Yes	33
Brazil: Paraná	2005	Finisher	395	2.6	IFAT, 1:64	No	34
		Sow	29	20.7			
Germany	2005	Finisher	300	5.6	ELISA	No	199
Germany: Munsterland	2005	Sow	1,500	9.3	ELISA	No	46
Zimbabwe	2005	Finisher in good-hygiene-practice farms	238	19.8	IFAT, 1:100	No	127
		Backyard scavenging	70	35.7			
Argentina: Buenos, Cordoba, La Pampa, Santa Fe, San Luis	2004	Sow	230	37.8	MAT, 1:25	No	230
Germany: Hesse	2004	Sow	2,041	16.5	IFAT, 1:16	Yes	47
Peru: Lima	2004	Slaughter	137	27.7	Western blot	Limited	193
The Netherlands: Didam, Zevenaar, Apeldoorn, Helmond	2004	Conventional	621	0	LAT, 1:64	No	142
		Free range	635	4.7			
		Organic	660	1.2			
Taiwan: Taoyuan County	2004	Slaughter	111	28.8	LAT, 1:32	No	92
United States: Georgia	2004	Slaughter	152	16.4	Western blot	Limited	193

^a Finisher, phase between the pig's birth and sending to market; slaughter pig, pigs of various ages.

^b ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IFAT, indirect fluorescent antibody test; MAT, modified direct agglutination test; IHAT, indirect hemagglutination antibody test; LAT, latex agglutination test.

^c Risk assessment studies are further described in Table 5.

^d Veterinary Research Institute, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, People's Republic of China.

^e For *Toxoplasma gondii* serum screening; Institut Pourquier, Montpellier, France.

^f SafePath Laboratories, Carlsbad, CA.

^g Lanzhou Veterinary Research Institute, Lanzhou, People's Republic of China.

^h Zhuhai S.E.Z. Haitai Biological Pharmaceuticals Co., Ltd., Zhuhai, People's Republic of China.

ⁱ ID Screen Toxoplasmosis Indirect, ID-Vet, Grabels, France.

^j Shenzhen Combined Biotech Co., Shenzhen, People's Republic of China.

^k NAHMS, National Animal Health Monitoring System.

TABLE 2. *Detection of T. gondii in pig tissues*

Country	Year	Sample type	Methods	No. of positive samples/ total samples	Reference
Brazil	2014	Brain, heart	Bioassay in mice	17/36	32
Brazil	2014	Brain, heart, tongue	Bioassay in mice	13/37	93
Ireland	2013	Diaphragm	Nested PCR, 8S-5.8S rRNA ITS region ^a	3/23	118
Slovakia	2013	Brain, muscle	PCR, TGR1E and B1 genes	21/21	217
Brazil	2012	Heart	PCR, B1 gene	21/38	195
Serbia	2012	Blood clot	Bioassay in mice	16/22	145
Spain	2012	Fresh pork, ham	Bioassay in mice	2/50	19
Brazil	2011	Brain, heart	Bioassay in mice	5/35	98
Mexico	2010	Pork loin, leg	Seminested PCR, B1 gene	1/48	102
Spain	2010	Ham from naturally infected pigs	Bioassay in mice	6/6	18
United States	2009	Heart	PCR-RFLP ^b	29/300	229
United States	2008	Heart	Bioassay in mice and cats	14/38	77
Brazil	2007	Diaphragm, tongue	PCR, 533-bp fragment	diaphragm:17/50 tongue: 33/50	21
Brazil	2006	Brain	Bioassay in mice	6/12	97
Portugal	2006	Brain and/or heart	Bioassay in mice	15/37	60
Brazil	2005	Pork sausage	Bioassay in cats	13/149	61
Brazil	2005	Heart, brain, tongue	Bioassay in mice	7/28	62
Brazil	2005	Fresh pork sausage	Nested PCR	19/70	50
Japan	2005	Lymph node	PCR, SAG2 locus	57/101	248
United States	2005	Pork loin	Bioassay in cats and mice	7/2,094	75

^a ITS, internal transcribed spacer.

^b RFLP, restriction fragment length polymorphisms.

Come è possibile osservare, i valori di prevalenza variano notevolmente tra i diversi studi a causa dei fattori sopracitati. Simili variazioni sono anche evidenti se si osservano le tabelle riguardanti le altre specie riportate nella medesima *review* (Guo et al., 2015c).

In ogni caso, qualora si voglia valutare l'esposizione della popolazione umana a *T. gondii* mediante il consumo di carne, è comunque necessario considerare attentamente la specie di provenienza delle carni: come sottolineato dagli Autori (Guo et al., 2015a,c), la prevalenza del parassita tende ad essere più bassa per alcune specie (bovina e pollame) mentre è significativamente più alta per altre (suino e ovino).

E' da sottolineare inoltre che ricercatori hanno confrontato i dati raccolti durante gli anni e la loro analisi ha evidenziato una generale tendenza alla diminuzione dei tassi di prevalenza; questo è probabilmente legato al miglioramento dei sistemi di gestione degli allevamenti nonché ai più alti standard d'igiene e di biosicurezza adottati negli allevamenti moderni (Edelhofer, 1994; Guo et al., 2015c).

Per quanto riguarda la sieroprevalenza di *T. gondii* in Italia, una recente review di Rinaldi & Scala (2008) riporta i tassi di positività riscontrati negli ultimi 30 anni da studi scientifici riguardanti diverse specie animali da reddito (vedi Tabella).

Tabella 3 – Sieroprevalenza di T. gondii riportata da studi scientifici condotti in differenti regioni italiane dal 1978 al 2008 (tratta da Rinaldi & Scala, 2008)

Table 1. Seroprevalence data on *T. gondii* recorded in livestock from different Italian regions over the last 3 decades

Livestock species	Region	No. examined animals	Seroprevalence (%)	Diagnostic method	References	
Cattle	North	255	92.0	DAT	Avezza <i>et al.</i> , 1993	
	Sicilia	317	11.3	IFAT	Vesco <i>et al.</i> , 2005	
Buffaloes	Campania	187	94.0	MAT	Persechino <i>et al.</i> , 1980	
	Lombardia	352	78.0	LAT	Gaffuri <i>et al.</i> , 2006	
	Emilia Romagna	374	69.0	IFAT	Baldelli and Pietrobelli, 1985	
	Campania	1,170	28.5	IFAT	Fusco <i>et al.</i> , 2007	
	Puglia and Basilicata	306	88.6	IFAT	Puccini <i>et al.</i> , 1981	
	Sicilia	321	56.1	IFAT	Puccini <i>et al.</i> , 1983	
Sheep	Sicilia	1,390	0.1	IFAT	Balbo <i>et al.</i> , 1980	
	Sardegna	1,876	49.9	ELISA	Vesco <i>et al.</i> , 2007	
		7,149	28.4	IFAT IgG	Masala <i>et al.</i> , 2003	
				9.9	IFAT IgM	
			29,886	19.2	IFAT IgG	Tola <i>et al.</i> , 2006
		1,043	5.4	IFAT IgM		
			51.3	ELISA	Natale <i>et al.</i> , 2006	
Goats	Lazio	198	95.0	MAT	De Capraris and Gravino, 1981	
	Puglia and Basilicata	244	68.9	IFAT	Puccini <i>et al.</i> , 1983	
	Sardinia		2,445	12.3	IFAT IgG	Masala <i>et al.</i> , 2003
				5.6	IFAT IgM	
		4,562	11.7	IFAT IgG	Tola <i>et al.</i> , 2006	
			4.0	IFAT IgM		
Pigs	North	90	64	IFAT	Genchi <i>et al.</i> , 1991	
	Emilia Romagna	1,521	9.0	LAT	Soldati <i>et al.</i> , 1986	
	Umbria	576	16.7	IFAT	Piergili Fioretti <i>et al.</i> , 2008	
	Sicilia	1,035	21.3/20.0	ELISA/IFAT	Vesco <i>et al.</i> , 2006	
	Sardegna	408	15.2	ELISA	Scala <i>et al.</i> , 2008	
Horses (human consumption)	Various	163	30.7	MAT	Tassi, 2006	
Chickens	Various	80	12.5	MAT	Dubey <i>et al.</i> , 2008	

Legend: DAT = direct agglutination test; IFAT = indirect fluorescent antibody tests; MAT = microscopic agglutination test; LAT = latex agglutination test; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay.

9. Fattori di rischio per gli animali

Diversi studi hanno indagato riguardo i fattori che possono determinare un aumento della prevalenza di *T. gondii* a livello aziendale.

Sistema di allevamento: A parità di condizioni, animali allevati in allevamenti estensivi o biologici, quindi con possibilità di poter pascolare o comunque di accedere all'esterno, presentano un maggiore probabilità di essere siero-reattivi nei confronti di *T. gondii*. Tali animali sono verosimilmente maggiormente esposti a potenziali fonti di infestione rispetto a soggetti confinati in strutture che limitano l'accesso all'ambiente esterno (Guo et al., 2015c). Le oocisti di *T. gondii* sono estremamente resistenti e quindi in grado di contaminare gli ambienti per lunghi periodi. Per alcune specie allevate a scopo alimentare, tale fattore è determinante ai fini della valutazione dell'esposizione all'uomo del parassita: la maggior parte del pollame consumato proviene nelle nazioni occidentali da allevamenti a terra "indoor" le cui percentuali di sieroprevalenza sono molto basse, soprattutto se confrontate con i valori riscontrati in piccoli allevamenti rurali.

Una correlazione tra allevamento estensivo ed aumento della prevalenza è stata ritrovata anche per la specie suina (Bacci et al., 2015, Feitosa et al., 2014; Pastiu et al., 2013), ovina (Cenci-Goga, 2013; Tzanidakis et al., 2012; Klun et al., 2006), bovina (Klun et al., 2006) e avicola (Maksimov et al, 2011).

Età degli animali: La probabilità di infezione aumenta proporzionalmente all'età dell'animale: all'interno della stessa specie, animali con maggiore età produttiva (es. scrofe vs maiale da ingrasso) hanno maggiori probabilità di entrare in contatto con forme infettanti del parassita. Romanelli et al. (2007) e Pinheiro et al. (2009) hanno osservato una differenza significativa tra il tasso di positività degli agnelli rispetto agli ovini adulti. Lo scenario è simile per il suino: la sieroprevalenza delle scrofe è più alta rispetto ai suini da carne (García-Bocanegra et al., 2013; Van knapen et al., 1995)

Fattori geografici: La differenza, talvolta notevole, tra i valori di prevalenza del parassita di differenti paesi o aree, è legata probabilmente ai fattori precedentemente menzionati. Le nazioni o l'area più progredite dal punto di vista zootecnico adottano sistemi di allevamento

intensivo, grazie ai quali le probabilità di entrare in contatto con il parassita sono inferiori ed è possibile attuare più agevolmente ed efficacemente procedure di biosicurezza. Al contrario, in zone dove è presente una zootecnia di tipo rurale è praticato maggiormente un allevamento estensivo che favorisce invece il maggior rischio di infestione.

Fattori climatici: Alcuni studi hanno provato a correlare fattori di tipo climatico con la probabilità di infezione degli animali di un allevamento. Non è da escludere infatti che alcune variabili climatiche di un territorio, come ad esempio l'ampiezza dei *range* di temperatura e l'umidità osservati durante l'anno, possano favorire la vitalità delle oocisti disperse nell'ambiente ovvero aumentare la loro resistenza, renderle infettanti per un periodo di tempo più duraturo e quindi aumentare il rischio per gli animali presenti. In pratica, alcuni microclimi potrebbero favorire la persistenza di *T. gondii* in un'area rispetto ad altri. Kantzoura et al. (2013) hanno rilevato che zone con più alte temperature e basse precipitazioni erano associate ad un ritrovamento più frequente di *T. gondii* negli ovini. Tuttavia ulteriori indagini con l'utilizzo di Sistemi Informativi Spaziali dovrebbero essere eseguiti in quest'ambito per comprendere l'importanza effettiva di tali fattori.

Fonti di approvvigionamento dell'acqua: le oocisti sono in grado di sopravvivere in ambienti acquatici. Fonti d'acqua come fiumi, torrenti, laghi, sorgenti, sono anzi possibili mezzi di diffusione del parassita. In particolare, bacini d'acqua stagnante, come i laghi o bacini artificiali, possono favorire l'accumulo di oocisti e rendersi mezzo di contaminazione degli animali che si vanno ad abbeverare. L'associazione tra tipologia della fonte di approvvigionamento dell'acqua di abbeverata e prevalenza di *T. gondii* è stata riportata in particolare per i piccoli ruminanti (Tzanidakis et al., 2012; Romanelli et al., 2007).

Presenza di felini in allevamento: la presenza di felini, ed in particolare del gatto domestico, rappresenta uno dei fattori di rischio più immediati per gli animali d'allevamento. Sebbene l'escrezione delle oocisti avvenga per un periodo limitato, e spesso solo al momento del

contagio, l'elevato numero di elementi infettanti dispersi e la loro notevole resistenza nell'ambiente aumenta in maniera significativa le possibilità di ingestione da parte degli animali presenti e quindi la probabilità d'infezione. Tale fattore di rischio è stato riportato sia per gli ovini (Vázquez-Boland et al., 1996; Skjerve et al., 1998; Vesco et al., 2007; Romanelli et al., 2007; Andrade et al., 2013) che per i suini (García-Bocanegra et al., 2013; Assadi-Rad et al., 1995). Alcuni ricercatori, tuttavia, non hanno osservato alcun legame tra presenza di gatti e maggiore prevalenza del parassita (per la specie ovina: Cosendey-KezenLeite et al., 2014; García-Bocanegra et al., 2013; Tzanidakis et al., 2012) oppure soltanto se i felini avevano accesso all'acqua (Cenci-Coga et al., 2013) o alla zona di stoccaggio dei mangimi (Romanelli et al., 2007).

Presenza di roditori e di altri animali selvatici: i roditori e altri animali selvatici, compresi gli uccelli, possono favorire la persistenza del ciclo di *T. gondii* e/o la sua introduzione negli ambienti di allevamento. In particolare i primi, essendo preda naturale dell'ospite definitivo, possono veicolare il parassita nei loro tessuti fungendo da vettori o favorire l'ingestione delle cisti da parte di animali onnivori come il maiale. La mancanza di sistemi di controllo dei roditori è stata messa in relazione con una maggiore prevalenza del parassita soprattutto per la specie suina (Hill et al., 2010; Kijlstra et al., 2008; Villari et al., 2009; García-Bocanegra et al., 2013) ma anche in quella ovina (Romanelli et al., 2007).

10. Terapia e profilassi vaccinale

Il trattamento della toxoplasmosi negli animali da reddito consiste principalmente nella somministrazione associata di pirimetamina-sulfamidici. Tra i sulfamidici, quello maggiormente utilizzato è la sulfadiazina la cui azione terapeutica è nota già dagli anni '40 (Innes et al., 2008). Il suo impiego è stato presto combinato con la pirimetamina (1953).

Infine, una terza molecola, la spiramicina, ha mostrato essere efficace nei confronti di *T. gondii* ed è talvolta utilizzata nei protocolli terapeutici. E' importante sottolineare che le tre sostanze farmacologiche citate hanno effetto durante la fase di rapida moltiplicazione dei tachizoiti ovvero durante l'infezione acuta (Innes et al., 2008). Al contrario, non sono in grado di danneggiare il parassita quando è ormai nella cisti tissutale sotto forma di bradizoita.

Nel gatto, al contrario, l'associazione pirimetamina-sulfamidici risulta controindicata a causa dei frequenti e rilevanti effetti collaterali in questa specie (in alcuni casi può risultare addirittura tossica). Il farmaco utilizzato quasi esclusivamente nella pratica veterinaria è invece la clindamicina.

Attualmente è disponibile in commercio un solo prodotto vaccinale per la prevenzione della toxoplasmosi congenita ed è autorizzato solamente per i piccoli ruminanti (*Toxovax*). Si tratta di un vaccino contenente tachizoiti vivi (ceppo S48 attenuato in Nuova Zelanda) che può essere somministrato ad animali con età superiore ai 5 mesi e almeno 3 settimane prima dell'accoppiamento (Garcia et al., 2014). Il vaccino garantisce una protezione per due stagioni riproduttive tuttavia, essendo costituito da parassiti vivi, deve essere adeguatamente conservato, ha una breve *shelf-life* ed è potenzialmente in grado di infettare l'uomo durante la somministrazione. Inoltre, non può essere inoltre utilizzato negli animali il cui latte è destinato al consumo umano.

11. Riferimenti normativi

La toxoplasmosi ha un importante rilievo in ambito di sanità pubblica e per questo motivo è oggetto di normative nazionali e comunitarie.

Il Decreto Ministeriale del 15 dicembre 1990 “Sistema informativo delle malattie infettive e diffuse” include tale parassitosi nella classe quinta delle malattie infettive notificabili: qualunque medico sul territorio nazionale che sospetti o abbia accertato la toxoplasmosi in un paziente è tenuto a comunicarlo all’autorità sanitaria di competenza indicando gli elementi identificativi del paziente stesso, gli accertamenti diagnostici eventualmente effettuati e la data di comparsa della malattia. La norma, oltre alla toxoplasmosi, elenca una serie di malattie infettive umane e le ripartisce in cinque diverse “classi di notifica” sulla base della loro pericolosità e impatto in sanità pubblica. La notifica all’autorità sanitaria è obbligatoria, a prescindere dalla classe di appartenenza, ma sono differenti i tempi e le modalità di tale notifica: per le malattie appartenenti alla prima classe, ad esempio, si richiede la segnalazione immediata perché considerate particolarmente gravi o perché è vi è la necessità di intervenire rapidamente al fine di approntare misure di profilassi efficaci nei confronti della popolazione (vedi Figura; Ministero della Salute, 2015).

CLASSE DI NOTIFICA	MALATTIA	MODALITA' DI NOTIFICA
CLASSE I	Botulismo Rabbia Trichinellosi (nel DM15.12.1990: TRICHINOSI)	Segnalazione da parte del Medico alla Zona Territoriale per telefono, telex o fax ENTRO 12 ORE dall'osservazione di un caso di malattia anche sospetta.
CLASSE II	Brucellosi Leptosirosi Listeriosi Salmonellosi (non tifoidee) Virus dell'epatite A (nel DM15.12.1990: EPATITE A)	Segnalazione scritta su scheda di notifica da parte del Medico della Zona Territoriale ENTRO 48 ORE dall'osservazione del caso di malattia anche sospetta.
CLASSE III	Tubercolosi causata da <i>Mycobacterium bovis</i> Tubercolosi diverse da <i>Mycobacterium bovis</i>	Segnalazione scritta su scheda di notifica da parte del Medico della Zona Territoriale ENTRO 48 ORE dall'osservazione del caso di malattia anche sospetta.
CLASSE IV	Infezioni, tossinfezioni ed infestazioni di origine alimentare (malattie per le quali, alla segnalazione del singolo caso da parte del medico, deve seguire la segnalazione dell'unità sanitaria locale solo quando si verificano focolai epidemici).	Segnalazione scritta su scheda di notifica da parte del Medico della Zona Territoriale ENTRO 24 ORE dall'osservazione del caso di malattia anche sospetta
CLASSE V	Borrelliosi (nel DM15.12.1990: MALATTIA DI LYME) Echinococcosi (idatidosi) Psittacosi (ornitosi) Toxoplasmosi	Segnalazione scritta su scheda di notifica da parte del Medico della Zona Territoriale ENTRO 48 ORE. In tutti i casi di focolaio epidemico la segnalazione deve avvenire ENTRO 24 ORE.

Figura 4 – Classi, malattie e modalità di notifica del “Sistema informativo delle malattie infettive e diffusive” attivo in Italia (tratta da Ministero della Salute, 2015)

Il flusso informativo prevede che le segnalazioni siano indirizzate alle Aziende Sanitarie Locali di competenza, per poi essere raccolte dalle singole Regioni (tramite le Agenzie di Sanità Pubblica) ed infine trasmesse agli Organismi Centrali (Ministero della Salute, ISTAT, Istituto Superiore di Sanità) ed eventualmente internazionali (UE, OMS). I dati confluiscono con cadenza annuale nel **SIMID** (Sistema Informativo Malattie Infettive e Diffusive), uno

strumento informatico che ha la funzione di raccogliere, gestire e rendere disponibili tutte le informazioni raccolte a livello periferico.

Per quanto riguarda l'assetto normativo europeo, il Decreto Legislativo 191 del 2006 rappresenta l'“Attuazione della direttiva 2003/99/CE” ovvero il recepimento del provvedimento normativo comunitario che disciplina la raccolta di dati sulla presenza di zoonosi e di agenti zoonotici negli animali, alimenti, mangimi e nell'uomo. Tali informazioni vengono richieste dalla Comunità Europea al fine di pianificare ed attuare misure di controllo efficaci attraverso l'analisi del rischio, favorire l'armonizzazione dei sistemi di sorveglianza e lo scambio di informazione tra i paesi membri, nonché migliorare i sistemi di prevenzione e controllo delle zoonosi. Le informazioni che devono essere fornite sono elencate nell'allegato III della succitata normativa:

“A. Per ciascuna zoonosi e ciascun agente zoonotico devono essere forniti inizialmente i seguenti dati (successivamente occorre riferire soltanto i cambiamenti):

a) sistemi di sorveglianza (metodi di campionatura, frequenza della campionatura, tipo di campioni, definizione del caso, metodi diagnostici utilizzati);

b) strategia di vaccinazione e altre iniziative di prevenzione;

c) meccanismo e, se del caso, programmi di controllo;

d) misure da adottare in caso di risultanze positive o per casi isolati;

e) sistemi di notifica attuati;

f) descrizione dell'evoluzione della zoonosi e/o dell'infezione nel Paese.

B. Dati che devono essere forniti annualmente:

a) popolazione animale interessata (oltre alla datazione i dati si riferiscono a):

- numero di allevamenti o branchi,

- numero totale dei capi, e,

- se pertinenti, i metodi di produzione applicati;

b) numero e descrizione generale dei laboratori e istituti che sono tenuti a effettuare la sorveglianza.

C. Ogni anno devono essere fornite le seguenti informazioni dettagliate per ciascun agente zoonotico e per ciascuna categoria di dati interessata, indicandone le conseguenze:

a) modifiche dei sistemi già illustrati;

b) modifiche nei metodi precedentemente descritti;

c) esiti delle indagini e di ulteriori individuazioni od altri metodi di individuazione nei laboratori (separatamente per ogni categoria);

d) valutazione a livello nazionale della situazione recente, delle tendenze e dell'origine delle infezioni;

e) rilevanza in quanto infezione zoonotica;

f) rilevanza per l'uomo, in quanto all'origine di focolai di infezione umana, dei risultati rilevati negli animali e nei prodotti alimentari;

g) strategie di controllo riconosciute che potrebbero essere poste in atto per impedire o minimizzare la trasmissione degli agenti zoonotici all'uomo;

h) se del caso, eventuali interventi specifici decisi nello Stato membro o proposti per l'intera Comunità alla luce della situazione recente.

D. Notifica dei risultati degli esami.

I risultati devono riferire il numero delle unità epidemiologiche sottoposte ad indagine (branchi, allevamenti, campioni, partite) nonché' il numero dei campioni risultati positivi a seconda della classificazione dei casi. Ove necessario, la descrizione dei risultati deve evidenziare la distribuzione geografica delle zoonosi o degli agenti zoonotici.

E. Dati relativi ai focolai di tossinfezione alimentare:

a) numero complessivo dei focolai in un anno;

b) numero di persone morte o colpite da infezione a causa dei focolai;

- c) agenti responsabili dei focolai, e, ove possibile, sierotipo o altra descrizione definitiva di tali agenti. Qualora non sia possibile individuare l'agente responsabile dell'infezione, e' necessario spiegarne le ragioni;*
- d) prodotti alimentari implicati nel focolaio d'infezione ed altri veicoli di infezione potenziali;*
- e) identificazione della tipologia del luogo di produzione/acquisto/acquisizione/consumo del prodotto alimentare incriminato;*
- f) fattori collaterali, per esempio carenze igieniche nella trasformazione dei prodotti alimentari.”*

Per quanto riguarda la raccolta dei dati di laboratorio prodotti dal sistema di sanità pubblica veterinaria, il Ministero della Salute, con il Centro di Referenza per l'Epidemiologia Veterinaria (COVEPI), ha realizzato un sistema informativo nazionale (SINZOO), strutturato conformemente allo scadenario definito dall'EFSA per le relazioni sulle zoonosi, nel quale, periodicamente, devono essere inseriti e validati, da parte delle figure autorizzate (AA.SS.LL., Istituti Zooprofilattici, Regioni e Province autonome), i dati richiesti per le aree di pertinenza (alimenti, mangimi, animali).

Come nella direttiva europea di riferimento, il D.Lgs. 191 del 2006 include la toxoplasmosi tra gli agenti patogeni d'interesse tuttavia tale zoonosi è riportata nell'allegato I parte B - "Elenco delle zoonosi e degli agenti zoonotici da sottoporre a sorveglianza in funzione della situazione epidemiologica". Sostanzialmente, al contrario di altri otto agenti zoonotici citati nella parte A, la raccolta dei dati riguardanti la toxoplasmosi non è obbligatoria ma viene data libertà alle singole regioni e province autonome di valutare se porre in atto degli specifici sistemi di sorveglianza di tale parassitosi.

CAPITOLO II – TOXOPLASMOSI UMANA E RISCHI ASSOCIATI AL CONSUMO DI CARNE

1. La trasmissione di *T. gondii* all'uomo

Animali selvatici e domestici a sangue caldo (inclusi gli uccelli) e l'uomo sono ospiti intermedi di *T. gondii* e possono ospitare cisti tissutali nel loro corpo; l'infezione nell'uomo può avvenire mediante diverse vie:

- Ingestione di carne contaminata poco cotta (specialmente suino e agnello) contenente cisti tissutali (contenenti bradizoiti) o ingestione accidentale dopo la manipolazione di carne contaminata senza lavarsi successivamente le mani
- Ingestione di alimenti che sono stati cross-contaminati con coltelli o utensili precedentemente utilizzati sulla carne cruda
- Bevendo acqua contaminata (con oocisti)
- Ingestione accidentale attraverso il contatto con feci infette di gatto (poca igiene durante la pulizia della lettiera) o mangiando frutta o verdura che è stata contaminata con feci di gatto infette
- Bevendo latte contenente tachizoiti (rischio minimo)
- Trasmissione congenita/verticale attraverso la via transplacentare tra madre e feto
- Ricevendo sangue o organi contaminati durante una trasfusione o un trapianto

Non è noto con certezza quale di queste vie sia epidemiologicamente più importante in termini di sanità pubblica; tuttavia molti studi indicano che il consumo di carne cruda o poco cotta è considerato la maggiore via di trasmissione per l'uomo (Roghmann et al., 1999; Cook et al., 2000; Jones & Dubey, 2012; Djurkovic -Djakovic et al., 2013).

Molto probabilmente la modalità di trasmissione può variare in base a numerosi fattori quali l'appartenenza geografica, l'età, lo stile di vita e le abitudini alimentari.

2. Periodo di incubazione e dose infettiva

Il periodo di incubazione nell'uomo varia tra 5 e 23 giorni; questo può essere messo in relazione con lo stadio del parassita al momento dell'infezione (oociste, bradizoita o tachizoita), dalla virulenza del ceppo e dalla differente reazione all'infezione. La dose infettante è variabile e dipende dal ceppo e dal tipo di ospite, ma per alcune specie animali sembra essere particolarmente bassa. In uno studio di Dubey et al. (1996) viene riportato che *T. gondii* è stato isolato (attraverso prova biologica utilizzando topi e gatti) da 13 maiali a cui era stata somministrata 1 sola oocista di *T. gondii*.

3. Segni clinici nell'uomo e nelle fasce sensibili

Benché l'incidenza della toxoplasmosi nell'uomo non sia significativamente cambiata nel corso degli anni, l'attenzione e la preoccupazione sono aumentate negli ambienti medici e veterinari. Si stima che complessivamente circa il 25% della popolazione umana sia esposta a *T. gondii* ed ospiti la forma cistica, clinicamente silente (Hill e Dubey, 2002).

Nell'uomo, è possibile riconoscere 3 forme di toxoplasmosi:

1. Toxoplasmosi acquisita
2. Toxoplasmosi congenita
3. Toxoplasmosi da riattivazione

La forma più comune d'infezione nell'uomo causata da *T. gondii* è la "toxoplasmosi acquisita" ed ha solitamente un decorso asintomatico nei soggetti immunocompetenti e nelle donne non

gravide. Tuttavia, circa il 10-20% dei pazienti sviluppa linfadenite o una sindrome simil-influenzale caratterizzata da febbre, malessere, mialgia, emicrania e mal di gola, linfadenite e *rash* cutanei. I sintomi generalmente si risolvono senza trattamenti entro poche settimane.

I pazienti con sistema immunitario compromesso (persone con infezione da HIV, pazienti affetti da cancro, individui che hanno subito un trapianto, ecc) sono molto più suscettibili all'infezione da *T. gondii* e possono sviluppare sintomi più severi; i sintomi neurologici sono i segni più comuni, in particolare in caso di "toxoplasmosi da riattivazione" (riattivazione di cisti tissutali per caduta delle difese immunitarie). Possono manifestarsi encefaliti, con una sintomatologia caratterizzata da emicrania, disorientamento, spossatezza, emiparesi, cambiamenti nei riflessi e convulsioni, che possono condurre al coma e morte nei casi più gravi. Corioretinite, miocardite e pneumonite possono anche verificarsi (Spickler, 2016).

Le donne che diventano infette per la prima volta immediatamente prima o durante la gravidanza possono trasferire l'infezione al feto (trasmissione congenita); tale trasmissione è più probabile nella seconda parte della gravidanza, durante il secondo e terzo trimestre, rispetto alle prime fasi. Il motivo per cui l'incidenza dell'infezione risulta maggiore nel terzo trimestre di gravidanza, rispetto ai precedenti, è dovuto al fatto che vi è un progressivo aumento della permeabilità placentare a *T. gondii*. Al contrario, l'infezione tende ad essere più seria quando viene acquisita durante i mesi iniziali della gestazione rispetto ad un contagio durante i mesi successivi. I sintomi più gravi si hanno durante il primo trimestre della gravidanza quando possono verificarsi casi di aborto, riassorbimento fetale, nascita prematura e i bambini che sopravvivono saranno probabilmente soggetti a malattie quali corioretiniti, idrocefalo, stati convulsivi ricorrenti e calcificazioni intracerebrali.

Un contagio della madre durante il secondo trimestre di gestazione può creare lesioni in tutti gli organi del feto, ma le lesioni si manifestano più frequentemente a carico del sistema

nervoso (focolai di calcificazione encefalica, idrocefalo, microcefalo, lesioni midollari, macroftalmia). Anche se meno probabili, sono anche possibili lesioni ai polmoni, fegato e renali come anche morte fetale e aborto.

Infine, gli infanti infetti durante l'ultima fase della gestazione possono inoltre essere soggetti a febbre, epatomegalia, splenomegalia, pneumonia o infezione. Molti dei bambini infettati non mostrano segni di toxoplasmosi quando nascono, ma possono sviluppare disabilità cognitive, visive, dell'udito nel corso della loro vita (Jones et al., 2001; Kravetz & Federman, 2005; Spickler, 2016).

4. Impatto e fonti d'infezione

Uno studio olandese (Havelaar et al., 2012) ha stimato che l'impatto complessivo della toxoplasmosi umana sulla popolazione è più alto se comparato ai 14 più comuni patogeni alimentari. In Europa, la toxoplasmosi animale è una malattia notificabile solo in poche nazioni (Lituania, Polonia, Svizzera e Finlandia) mentre programmi di monitoraggio attivi per la popolazione umana sono presenti solo in alcuni paesi (12 nazioni su 28, compresa l'Italia, non hanno un sistema efficace per la sorveglianza epidemiologica di forme congenite di toxoplasmosi, Benard et al., 2008). Per tale ragione, le informazioni riguardanti l'epidemiologia di *T. gondii* negli animali e nella popolazione umana non sono abbondanti e difficili da reperire.

In aggiunta, i focolai di tossinfezione acuta dovuti al consumo di carne cruda/poco cotta sono raramente descritti (Choi et al., 1997). Tuttavia, il consumo di carne infetta di maiale (o ovina) è ancora considerato essere una delle maggiori vie di esposizione al parassita in molte nazioni (Burrells et al., 2015; Vitale et al., 2014; Boughattas et al., 2014; Djurkovic-Djakovic

et al., 2013; Dubey, 2009). A conferma di ciò, un recente studio di categorizzazione del rischio alimentare stima che la combinazione *Toxoplasma*/carne di suino è la seconda per grado di rischio tra 10 combinazioni patogeno-alimento maggiormente temute perché potenzialmente in grado di provocare casi di tossinfezione alimentare (Guo et al., 2015c). Il *Center for Disease Control and Prevention* ha individuato la toxoplasmosi quale la seconda causa di morte tra le malattie alimentari negli USA. Inoltre, include la malattia nel gruppo delle cosiddette “Malattie parassitarie trascurate” (“*Neglected parasitic infection*”) ovvero malattie a cui è rivolta poca attenzione ma che invece dovrebbero essere considerate una priorità per la salute pubblica sulla base del numero delle persone infettate, la gravità dei sintomi e la capacità di prevenirle e trattarle (CDC, 2016).

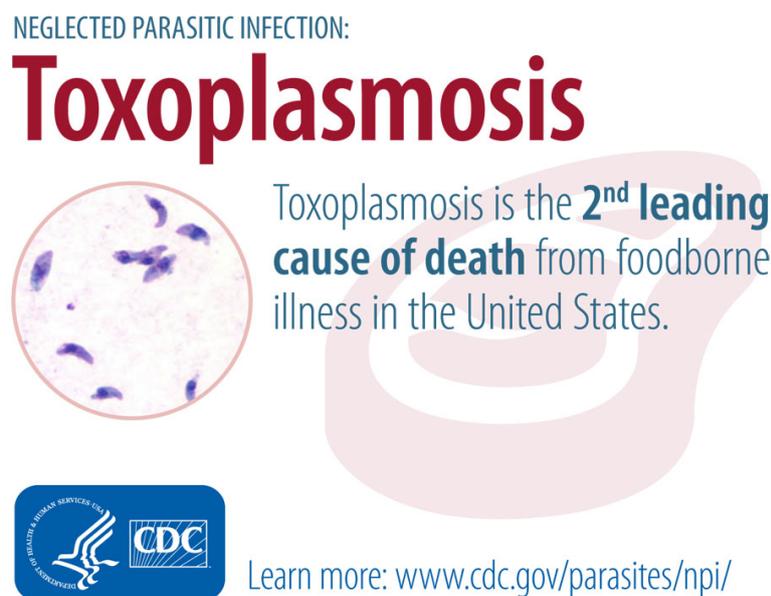


Figura 5 – Poster del Center for Disease Control and Prevention riguardante la toxoplasmosi umana

Riguardo le fonti d’infezione della fascia della popolazione più a rischio, un studio multicentrico europeo (caso-controllo) ha confrontato un gruppo di donne gravide con casi

acuti di infezione con donne sieronegative (controlli) ed ha riportato che tra il 30% e il 63% delle infezioni era attribuibile al consumo di carne non propriamente cotta o prodotti stagionati a base di carne mentre una percentuale tra il 6 e il 17% era attribuibile a contaminazioni di origine ambientale (Cook et al., 2000 riportato da Euro surveillance Volume 4, Issue 29, 20 July 2000).

5. Sorveglianza e dati di prevalenza nell'uomo

La sorveglianza della toxoplasmosi varia significativamente tra i vari paesi Europei e ogni confronto tra i tassi di malattia deve essere fatto con cautela, considerata la diversa impostazione e sensibilità dei sistemi. Tuttavia, in maniera da armonizzare la notifica dei vari stati membri, l'Unione Europea ha definito come "caso clinico" di toxoplasmosi soli i casi congeniti. Infatti l'ultimo *ECDC annual epidemiological document* (2014) ha riportato dati, tra il 2008 e il 2012, riguardanti solo casi al di sotto dell'anno di età. Il tasso di malattia complessivo dell'EU è di 0.3 casi per 100,000 abitanti. Il valore più alto si è osservato nel 2009 (10.5) quando 306 casi sono stati confermati mentre nel 2012, poichè sono stati notificati solo 40 casi, si è osservata una sostanziale decrescita rispetto agli anni passati. E' importante sottolineare che le stime indicano che solamente il 27% dei neonati infetti manifesta sintomi specifici per *T. gondii* (Dunn et al., 1999) quindi l'infezione (o la sierconversione) durante la gravidanza non è necessariamente correlata ad un caso di malattia.

Una rilevante *review* di Pappas et al. (2009), che riporta dati pubblicati tra il 1999 e il 2009 da studi condotti in tutto il mondo, ha dipinto un quadro globale riguardo la sieroprevalenza di *T. gondii* in donne gravide e donne in età fertile; la sieroprevalenza variava tra il 10 e il 60%.

Riguardo l'Italia, uno studio siciliano (Puccio et al., 2014) ha fornito dati riguardo lo status immunologico di 846 donne gravide dove la presenza di anticorpi contro *Toxoplasma* era stata verificata almeno una volta durante la gestazione. La prevalenza osservata era del 18% ed era comparabile a quella riscontrata in altre regioni italiane nello stesso studio (Verona, 17.5%; Lombardia, 22.7%; Roma (2003) 19.8% - (2008), 34.4%).

La prevalenza di anticorpi contro *T. gondii* era significativamente più alta tra le madri immigrate (30%) rispetto alle non immigrate (16.4%); le madri immigrate erano circa il 10% della popolazione dello studio.

Per quanto riguarda il tasso di sieroconversione in individui con disordini immunologici, la prevalenza in pazienti con HIV è stata investigata in molte parti del mondo e i tassi variano notevolmente, tra il 3% e il 97 % (Nissapatorn, 2009); nei paesi europei tali valori risultano compresi tra il 25% e il 50% (Nissapatorn, 2009).

Per quanto riguarda le indagini sierologiche eseguite sulla popolazione immunocompetente in generale, la prevalenza dell'infezione sembra essere più alta nei paesi sud- Europei rispetto a quella dell'Europa del Nord (Petersen et al., 2012). Mosti et al. (2013) hanno stimato la prevalenza di *T. gondii* nella popolazione del centro Italia valutando lo stato sierologico di 13177 individui in un periodo di 4 anni (2007-2010); la prevalenza complessiva è stata di 27.5% e una differenza significativa è stata osservata tra maschi e femmine (35.3% e 26.5% rispettivamente). Lo studio ha evidenziato anche una tendenza alla diminuzione del tasso di sieropositività ma nessuna diminuzione dell'incidenza della malattia in donne gravide la quale rimane relativamente alta. Infine, la toxoplasmosi è considerata la più prevalente infezione nell'uomo ed è stato stimato che colpisca il 30-50% della popolazione mondiale (Flegr et al, 2014 citato da WHO).

6. Resistenza in matrici alimentari carnee

Le cisti tissutali di *T. gondii* possono sopravvivere e rimanere infettive in carni refrigerate per diverse giorni. Hill et al. (2004) hanno riportato la presenza di parassiti vivi in carne di maiale contaminata sperimentalmente e tenuta a 4 °C per 45 giorni (sebbene fosse stata eseguita un'aggiunta di una soluzione all'1% di Cloruro di Sodio). Diversi trattamenti comunemente applicati alla carne per la conservazione o la sua lavorazione sono comunque in grado di inattivare i bradizoiti presenti nelle cisti:

- Congelamento
- Salatura
- Stagionatura
- Cottura

Tuttavia, l'efficacia di tali trattamenti è correlata ai valori utilizzati per i parametri che regolano tali processi (es. la combinazione tempo/temperatura per il congelamento).

Talvolta due o più trattamenti sono applicati contemporaneamente o consecutivamente (es. congelamento seguito da cottura), e di conseguenza, l'“effetto di inattivazione” è il risultato della combinazione di più fattori.

Riguardo il congelamento, cisti di *Toxoplasma* non si sono rivelate più infettanti quando la carne di maiale è stata conservata ad una temperatura di -12 °C per 4 giorni (Kotula et al., 1991, Dubey et al., 1988). Tuttavia, gli stessi Kotula et al. (1991) hanno riportato che *T. gondii* può sopravvivere in matrici carnee per 22 giorni a -1 °C e 11 giorni a -6.7 °C.

I bradizoiti nella carne sono molto sensibili al calore ma solo a certe combinazioni di tempo/temperatura. Dubey et al. (1990) ha ritrovato che cisti di *T. gondii* non sono infettanti quando la carne è cotta a 61 °C ma potrebbero essere vive dopo 55 °C per 3 minuti. Come riportato da EcoSure (2008), quasi il 10% dei consumatori americani cucina alimenti a base di carne di maiale a temperature inferiori a 48 °C a cuore del prodotto.

La salatura è in grado di inattivare *T. gondii*: una soluzione di cloruro di sodio (NaCl) al 2% iniettata in carne di maiale contaminata è stata in grado di rendere non più infettanti delle cisti dopo 4 giorni (Hill et al., 2004). Tuttavia, una soluzione di NaCl all'1% non ha avuto effetto dopo 45 giorni (Hill et al., 2004). La salatura è frequentemente associata alla fase di stagionatura nei processi di produzione di molti prodotti alimentari, come il prosciutto crudo, quindi anche gli effetti di questo trattamento (es. ulteriore riduzione dell'attività dell'acqua dovuta alla disidratazione) dovrebbero essere presi in considerazione per valutare la potenziale presenza di parassiti vitali. Nonostante ciò, i dati riguardanti l'effetto della stagionatura delle carni sul microrganismo sono carenti e solitamente studiati in associazione con altri trattamenti. Bayarri et al. (2010) hanno indagato riguardo la sopravvivenza del parassita durante il processo di stagionatura di 6 prosciutti ottenuti da altrettanti suini parassitati. Dopo 7 mesi, campioni omogeneizzati di ogni prosciutto erano in grado di causare una reazione sierologica nei topi inoculati. Al contrario, nessun topo è risultato infetto dopo l'inoculazione di un omogeneizzato proveniente da un prosciutto stagionato 14 mesi. In pratica, prodotti carnei con aggiunta di sale e additivi (3.9% NaCl, 25 mg/kg di nitrati, e <3 mg/kg nitriti, 47.8% contenuto d'acqua) erano in grado di inattivare *T. gondii* solo se il periodo di stagionatura previsto per il prodotto (14 mesi) era portato al termine. Tali risultati sembrano entrare in contrasto con i dati di Hill et al. (2004) precedentemente menzionati: è possibile che altri fattori possano determinare l'eventuale presenza del parassita vitale nell'alimento sottoposto a trattamenti, come ad esempio l'entità della carica parassitaria, o il fatto che non tutte le parti del prodotto siano effettivamente state interessate all'azione del trattamento (es. omogenea perfusione del sale nel prodotto).

7. Isolamento di *T. gondii* da alimenti a base di carne

L'isolamento di *T. gondii* da carni destinate al consumo umano è stato riportato da pochi lavori ed in particolare da alimenti a base di carne suina. Studi di prevalenza sierologica in allevamento o al mattatoio non provano l'effettivo rischio per il consumatore poiché non tengono conto dei successivi trattamenti a cui è sottoposto il tessuto muscolare dell'animale (stoccaggio, salatura, ecc) o le modificazioni chimico-fisiche a cui va in contro il muscolo prima di divenire carne (es. calo del pH). Allo stesso modo, analisi di tipo biomolecolare possono indicare la presenza di materiale genetico appartenente al parassita, e quindi la sua potenziale presenza, ma non sono in grado di fornirci informazioni sulla sua vitalità. Più in generale, solo ultimamente si stanno sviluppando metodiche in grado di stimare la concentrazione parassitaria presente nella matrice analizzata (Opsteegh et al. 2010; Jurankova et al., 2014).

Dubey et al. (2005) hanno condotto una *survey* sulla presenza del parassita in carni fresche di maiale, bovino e pollo commercializzate al dettaglio negli Stati Uniti; la presenza del parassita è stata verificata prelevando 2094 campioni per ognuna di tali specie e analizzati mediante prova biologica in gatti toxoplasma-free. Tutti i campioni di carne di bovino e pollo sono risultati negativi mentre da 8 campioni di carne di maiale (0.38%) è stato possibile rilevare la presenza di *T. gondii*.

Uno studio brasiliano riporta i dati riguardanti l'analisi su 149 campioni di salsicce fresche: *T. gondii* è stato isolato da un campione mentre altri 12 hanno provocato lo sviluppo di anticorpi anti- *T. gondii* nei topi precedentemente inoculati (Dias et al., 2005).

Abdulmawjood et al. (2014) hanno indagato riguardo la sopravvivenza del protozoo in salsicce fermentate di maiale a breve stagionatura (da 2 a 10 giorni) e prodotte utilizzando carni di suini infettati sperimentalmente. Sebbene il parassita vitale sia stato isolato solo da 4

campioni su 288 (1.4%) mediante prova biologica, lo studio ha dimostrato la sua capacità di sopravvivere al processo produttivo.

Non è ancora chiaro se le carni salate quali il prosciutto possano rappresentare un potenziale rischio effettivo di infezione. Come riportato precedentemente, Bayarri et al. (2010) non hanno rilevato la presenza di bradizoiti vitali in prosciutti stagionati 14 mesi e provenienti da carni suine sierologicamente positivi ma la presenza del parassita era stata rilevata sugli stessi prosciutti dopo 7 mesi di stagionatura implicando che i tempi e temperature di stagionatura nonché la concentrazione di sale siano importanti per l'inattivazione del parassita. In Inghilterra, Warnekulasuriya et al. (1998) hanno analizzato 67 campioni di prodotti a base di carne, in particolare salsicce stagionate e/o fermentate e prosciutto. Proprio un campione di prosciutto crudo è risultato contenere *T. gondii* vitale. Infine, un recente studio che combinava moderni metodi di biologia molecolare e prove biologiche è stato eseguito in Spagna per verificare la sopravvivenza del parassita in prosciutto crudo spagnolo tradizionale "Serrano" prelevato presso esercizi di vendita al dettaglio (Gomez-Samblas et al., 2015). Il campionamento riguardava 475 unità (261 prosciutti "interi" e 214 prosciutto tagliato a fette) e le analisi tramite PCR real-time hanno evidenziato la presenza di DNA del parassita in 42 campioni (8.8%). Le successive prove di isolamento da topi hanno dimostrato che il parassita era vitale in 23 di tali campioni (54.7% dei positivi) e la quantità di elementi infettanti è stata stimata essere intorno alle 10^5 unità per 100 grammi di prodotto. Poiché il parassita vitale è stato ritrovato soprattutto in prosciutti di alcuni specifici produttori, gli autori hanno ipotizzato che verosimilmente il periodo di stagionatura stabilito per questo prodotto tradizionale (almeno 9 mesi) potrebbe non essere sempre rispettato da tutti gli operatori del mercato e quindi potrebbero crearsi le condizioni per la sopravvivenza di *T. gondii*, se presente nelle carni.

8. Tossinfezione da *Toxoplasma gondii* associata al consumo di carne

Riguardo il rischio di toxoplasmosi umana, il consumo di carne contaminata sembra essere il più importante fattore di rischio. L'infezione può avvenire quando la carne è ingerita cruda/poco cotta o nel caso i trattamenti in grado di uccidere i bradizoiti (salatura, essiccazione, ecc.) non siano stati applicati al prodotto (o almeno non in maniera sufficientemente efficace). I risultati forniti da un precedente studio epidemiologico hanno dimostrato che la prevalenza sierologica nell'uomo è approssimativamente il doppio nella popolazione rappresentata da persone che mangiano carne rispetto alla popolazione di non-carnivori (24% vs. 50%, rispettivamente; $P\text{-value} < 0.01$) (Roghmann et al., 1999). Sostanzialmente, tale dato è in accordo con stime provenienti da altri ricercatori i quali indicano il consumo di carne contaminata quale responsabile di metà dei casi di infezione umana.

La fonte d'infezione è raramente rintracciata quando si manifestano casi di toxoplasmosi, se non quando insorgono focolai riguardanti un gran numero di individui. Vitale et al. (2014) hanno descritto un caso di toxoplasmosi acuta associata al consumo di salsiccia cruda contaminata verificatosi in Italia. Tale studio conferma che preparazioni di carne fresca possono rappresentare un rischio non trascurabile quando non propriamente cotte.

In un esteso studio epidemiologico, Cook et al. (2000) hanno stimato che il consumo di carne non adeguatamente cotta era causa di malattia nel 30-60% dei casi di toxoplasmosi acuta in donne gravide (Kijlstra, 2008; Cook et al., 2000).

In generale, molti studi epidemiologici su adulti sani hanno dimostrato che il frequente consumo di carne è associato con una sieropositività nei confronti di *T. gondii*. Alcune specie sono considerate avere un più importante ruolo per l'infezione come il suino, l'ovino e la capra. Al contrario altre, come i bovini, sembrano essere più resistenti a *T. gondii*, e quindi la concentrazione dei bradizoiti vitali potrebbe essere significativamente più bassa nelle carni.

Tuttavia, nella loro valutazione del rischio, diversi ricercatori hanno preso in considerazione la sieroprevalenza di *T. gondii* in diverse specie animali allevate a scopo alimentare, senza tener conto di eventuali dissimili concentrazioni nel tessuto muscolare o un più limitato periodo di vitalità delle cisti nell'animale in vivo (Mie et al., 2008; Opsteegh et al., 2010; Guo et al., 2015a).

CAPITOLO III – TOXOPLASMOSI OVINA IN CAMPANIA: MAPPATURA, RILEVAZIONE DI CLUSTER E FATTORI DI RISCHIO

1. Background

L'allevamento ovino ha un ruolo rilevante nell'economia di diverse nazioni, in particolare nei Paesi dell'area Mediterranea, incluso l'Italia (Musella et al., 2011; Rinaldi et al., 2015). Tuttavia, la zootecnia ovina nelle aree rurali del Mediterraneo è fortemente influenzata da diversi fattori quali i metodi di allevamento e la presenza di malattie infettive e parassitarie (Park and Haenlein, 2006). L'infezione provocata da *T. gondii* negli ovini è considerata una delle maggiori cause di aborto in diverse nazioni del mondo ed è in grado di provocare riassorbimento fetale, aborto ad ogni stadio della malattia, mummificazione fetale, morte neonatale o nascita di agnelli disvitali (Guo et al., 2015c). La toxoplasmosi è in grado di causare anche pesanti perdite economiche nel settore dell'allevamento ovino (Tenter et al., 2000; Innes et al., 2009). Inoltre, essendo *T. gondii* un agente zoonosico, la carne ovina infetta è una rilevante fonte di infezione per l'uomo (Dubey, 2009; Guo et al., 2015c). Uno studio di valutazione del rischio ha stimato che il consumo di carne ovina è responsabile del 14% delle infezioni legate al consumo di carne nella popolazione olandese (Opsteegh et al., 2011).

A causa dell'alta probabilità di infezione dei piccoli ruminanti al pascolo tramite la via orizzontale (ingestione di oocisti), le pecore possono rappresentare una sentinella biologica chiave nella circolazione del parassita in una data area. Dati relativi alla sieroprevalenza di *T. gondii* a livello internazionale dal 1988 sono stati riportati da Dubey (2009), e mostrano alti valori (sino a 95.7%), ma sono incomparabili tra le diverse aree perché sono utilizzati differenti test sierologici e differenti valori di *cut-off* per determinare la sieropositività. In maniera simile, una *review* di Rinaldi and Scala (2008) riguardante la diffusione della

toxoplasmosi negli allevamenti italiani mostra valori di sieroprevalenza nelle pecore molto alti (fino ad 88.6%) ma non uniformemente distribuiti sul territorio nazionale, dovuta all'utilizzo di differenti tecniche di laboratorio ma anche a differenti metodi di campionamento delle aziende e degli animali.

Inoltre, pochi studi hanno analizzato i fattori di rischio associati alla positività nei confronti di *T. gondii* nelle pecore (reviewed in Dubey, 2009), mentre non vi è evidenza in letteratura dell'utilizzo di sistemi geospaziali per la rilevazione di cluster o identificazione di fattori ambientali che possono influenzare la sieroprevalenza del parassita in questa specie. Come riportato da Casartelli-Alves et al. (2015), “*i pochi studi di georeferenziazione dell'infezione di T. gondii sono basati su studi di sieroprevalenza su capre (Djokič et al., 2014), gatti (Afonso et al., 2013) e lontre (Chadwick et al., 2013)*”. Gli obiettivi dello studio sono stati: 1) mappare la sieroprevalenza di *T. gondii* in allevamenti ovini uniformemente distribuiti in Campania, regione dove l'allevamento ovino è una realtà importante; 2) indagare sui fattori di rischio ambientale e di management dell'allevamento correlati all'infezione da *T. gondii*. Per entrambi gli scopi, ci si è avvalsi dell'utilizzo di Sistemi Informativi Geografici (*Geographical Information Systems - GIS*) (Rinaldi et al., 2015).

2. Materiali e Metodi

Dati sierologici

I dati sierologici utilizzati in questo studio derivano da una indagine sulla prevalenza di *T. gondii* condotto in 117 allevamenti ovini della regione Campania (Fusco et al., 2007). Il disegno dello studio prevedeva di testare 10 pecore adulte (> di 18 mesi) per ogni azienda con un test sierologico basato sull'immunofluorescenza indiretta (IFAT); 333 animali (28.5%) sono risultati positivi (titolo sierologico > 100) mentre 77.8% degli allevamenti aveva almeno

una pecora sieropositiva (per dettagli vedi Fusco et al., 2007).

E' importante sottolineare che i campioni di siero sono stati raccolti nelle diverse aziende ovine utilizzando un approccio “*grid-based*” mediante l'utilizzo di *geospatial tools*.

Sistema Informativo Geografico

Un GIS (GIS, ArcGIS version 9.2, ESRI, Redlands, CA, USA) è stato costruito utilizzando *data layers* riguardanti le seguenti caratteristiche ambientali: limiti amministrativi (a livello provinciale e municipale), tipologia di superficie (*land cover*), altitudine, pendenza e aspetto della superficie. Inoltre, le coordinate (longitudine e latitudine) dei punti corrispondenti alle aziende testate sono state inserite nel GIS (quindi sono state geo-referite) come mostrato nella Figura 6. La funzione di generazione del buffer del GIS è stata utilizzata per generare “*buffer zones*”, circolari di 1.5 km di diametro, disegnate intorno a ciascun punto geo-referito (Fig. 7).



Figura 6- Aziende testate inserite nel GIS

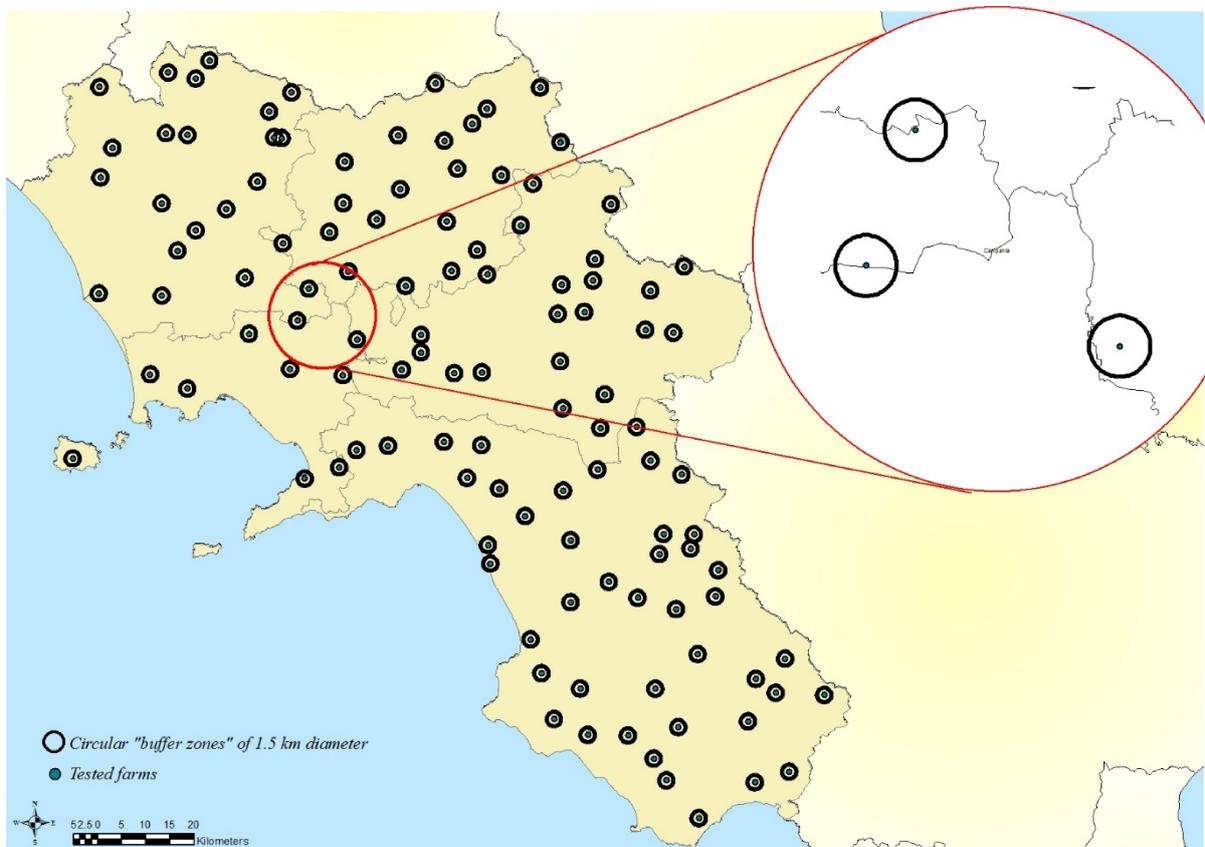


Figura 7 – “Buffer zones” dei punti geo-referiti

Corine Land Cover

I dati riguardanti la superficie dell’area di studio (Fig. 8) sono stati ottenuti dalla mappa *Corine Land Cover* (CLC) (version 8/2005, European Environment Agency, Kongens Nytorv 6, 1050 Copenhagen K, Denmark), avente una risoluzione spaziale di 100 m. CLC categorizza la tipologia di superficie (utilizzando anche alcune informazioni sull’utilizzo del territorio) in 44 classi, le quali sono organizzate gerarchicamente in tre livelli: il Livello 1 (5 classi) corrisponde alle maggiori categorie di tipologia/utilizzo della superficie (aree artificiali, aree agricole, foreste e aree semi-naturali, aree umide e superfici d’acqua); il Livello 2 (15 classi) che copre entità fisiche e fisiognomiche a più alto livello di dettaglio (es. zone urbane,

tipo di foreste e laghi); e il livello 3 che è composto da 44 classi basate su informazioni ancora più dettagliate. La mappa CLC è stata elaborata sulla base dell'interpretazione visuale delle immagini (SPOT, LANDSAT TM e MSS). Dati ancillari (es., fotografie aeree, topografiche e mappe della vegetazione, statistiche e informazioni locali) sono stati usati per rifinire l'interpretazione e l'assegnazione della zona alla relativa classe CLC. Per ogni area identificata con il GIS, è stata considerata la predominante classe di CLC. Nell'area di studio, sono state identificate 36 classi di livello 3.

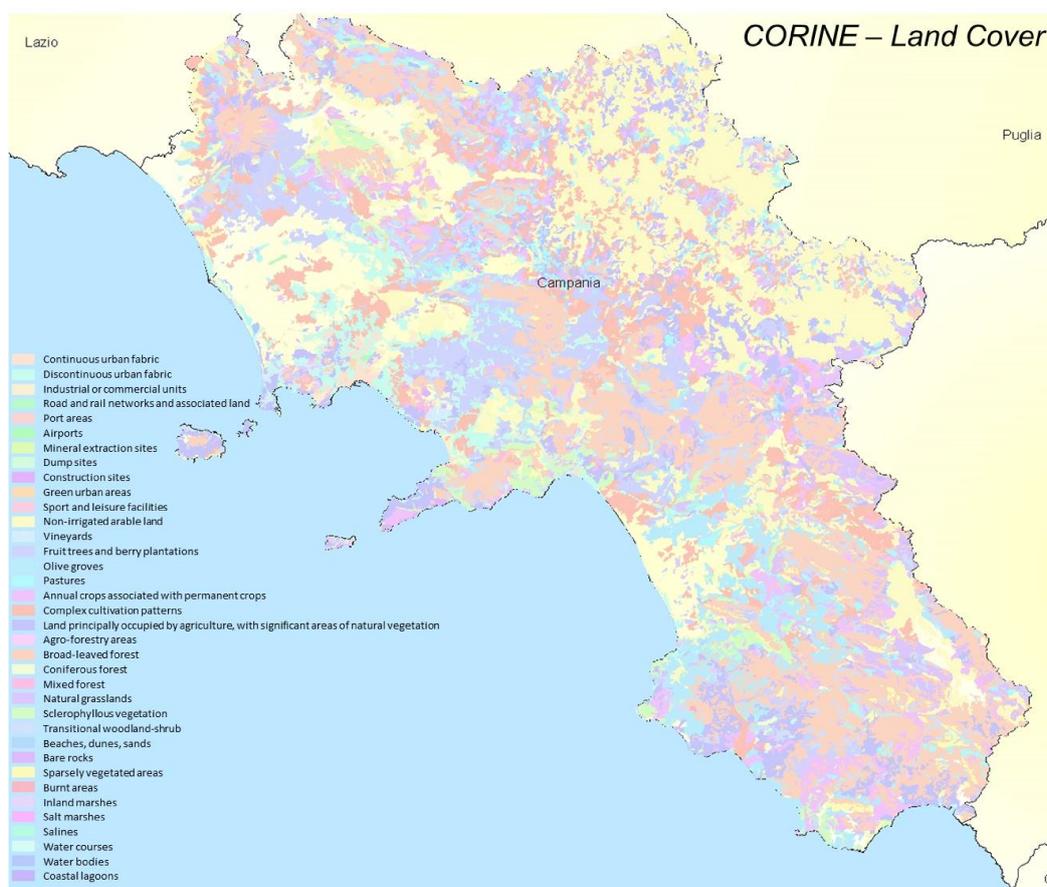


Figura 8 - Dati riguardanti la superficie dell'area di studio (Corine Land cover)

Altitudine, pendenza e aspetto della superficie

Dati sull'altitudine, pendenza e aspetto dell'area di studio (Fig. 9) sono stati ottenuti da un Modello di Altitudine Spaziale (Digital Elevation Model - DEM) con un alta risoluzione (40

m). La variabile “Aspect” è stata suddivisa in 8 classi: nord (337.5–360° and 0–22.5°), nord-est (22.5–67.5°), est (67.5–112.5°), sud-est (112.5–157.5°), sud (157.5–202.5°), sud-ovest (202.5–247.5°), ovest (247.5–292.5°), and nord-ovest (292.5–337.5°). La pendenza (slope) è stata suddivisa in 4 classi: piano (0°), bassa (1–15°), media (16–30°) e alta (31–54°).

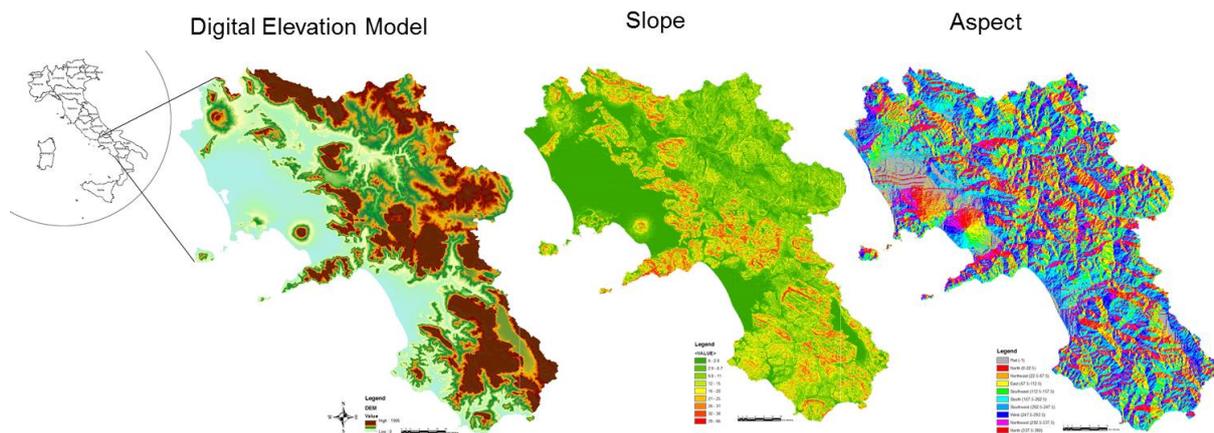


Figura 9 – Altitudine, pendenza e aspetto dell’area di studio

Mappatura e clustering

Mappe di distribuzione puntuale sono state ricavate tramite il GIS allo scopo di visualizzare la distribuzione spaziale di *T. gondii* nelle aziende ovine (usate come unità epidemiologiche nel nostro studio). Il *clustering* di aziende risultate positive è stato studiato sulla base della loro posizione determinata da coordinate esatte e utilizzando la statistica di scansione spaziale come descritto da Kulldorff (1997). Nello specifico, è stata utilizzata la funzione di “Average Nearest Neighbor” (ArcGis 9.3). Questa funzione statistica misura la distanza tra ogni centroide in relazione alla caratteristica analizzata e la più prossima posizione del centroide vicino. Viene quindi calcolata la media di tutte le distanze dei centroidi più vicini. Se la distanza è inferiore della media di una ipotetica distribuzione *at random*, la distribuzione analizzata è considerata essere un *cluster*. Se la distanza è più grande della ipotetica

distribuzione *at random*, la distribuzione è considerata dispersa.

Dati di management aziendale ottenuti dalla questionnaire survey

Oltre alle variabili ambientali ottenute dal GIS, nell'analisi dei fattori di rischio sono state incluse altre variabili (provenienti dalla *questionnaire survey*) riguardanti la gestione aziendale (tipo di produzione, numero di animali, presenza di altri animali nell'azienda ovina, frequenza delle macellazioni domestiche, frequenza del pascolo, transumanza, altitudine dell'area di pascolo, fonti d'acqua nell'area di pascolo principale) relative all'azienda o alla tipologia di pascolo.

Analisi statistiche

I risultati dei test sierologici eseguiti tramite IFAT (incluso il numero di animali positivi per azienda) e le variabili indipendenti associate all'azienda (dati ambientali ottenuti dal GIS e dati di management aziendali ottenuti dai questionari) sono stati inseriti in un foglio di calcolo Microsoft®Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA, v. 2010). Successivamente, è stato utilizzato un modello Poissoniano univariato per valutare l'associazione tra la prevalenza all'interno del gregge e ciascuna variabile indipendente utilizzando il numero di animali positivi come variabile dipendente (Cenci-Goga et al., 2013) e una funzione link Logaritmica. Le aziende nelle quali erano presenti solo animali dubbi (titolo sierologico 1:100) o per le quali non erano disponibili le informazioni ricavate tramite i questionari sono state escluse dall'analisi (n = 24 allevamenti). Entrambe le analisi sono state applicate a livello di allevamento (l'unità epidemiologica di riferimento) utilizzando i *dataset* delle variabili di gestione aziendale e ambientali come variabili indipendenti, e lo status sierologico verso *T. gondii* come variabile dipendente (positivo/negativo). Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SPSS (IBM, Armonk, NY, USA, v. 21).

3. Risultati

I risultati del modello di regressione ottenuto utilizzando dati ambientali e dati aziendali sono riportati nella seguente Tabella 4. L'unica variabile indipendente associata con la positività a *T. gondii* è risultata la “Tipologia di produzione” aziendale.

Tabella 4 – Sieroprevalenza media di *T. gondii* nelle aziende ovine (n=93) della Campania e fattori di rischio per il modello univariato (regressione di Poisson).

		Numero di aziende	Prevalenza (%)	P-value
Fattori ambientali				
Aspetto della superficie (<i>Aspect</i>)	1	19	40.5	0.19
	2	4	25.0	
	3	11	31.8	
	4	11	48.1	
	5	13	31.5	
	6	19	31.6	
	7	9	31.1	
	8	7	37.1	
Altitudine (DEM)	0 – 500 m s.l.m.	57	35.6	0.70
	501 – 1000 m s.l.m.	29	36.6	
	sopra 1000 m s.l.m.	7	30.0	
Pendenza (<i>Slope</i>)	Piano	14	43.5	0.12
	Bassa	68	34.4	
	Media	8	37.5	
	Alta	3	16.7	
Fattori di <i>management</i> aziendale				
Tipo di produzione	Carne	10	22.0	0.02*
	Latte e carne	83	37.1	
Numero di animali	Meno di 101 animali	31	36.8	0.64
	Tra 101 e 300 animali	33	33.0	
	Più di 300 animali	29	36.9	
Presenza di pecore di altre aziende	No	81	36.7	0.11
	Si	12	27.5	
Presenza di	No	24	37.9	0.46

animali di specie differenti	Si	69	34.6	
Presenza di animali provenienti da altre aziende	No	71	36.5	0.36
	Si	22	32.3	
Presenza di bovini	No	62	36.8	0.35
	Si	31	32.9	
Presenza di caprini	No	43	37.7	0.29
	Si	50	33.6	
Presenza di gatti	No	68	35.3	0.87
	Si	25	36.0	
Presenza di suini	No	82	34.8	0.31
	Si	11	40.9	
Presenza di animali selvatici	No	28	40.0	0.13
	Si	65	33.5	
Presenza di cani	No	11	38.2	0.61
	Si	82	35.1	
Frequenza delle macellazioni domestiche	Sporadica	58	33.3	0.42
	Mai	14	45.7	
	Spesso	8	27.5	
Frequenza del pascolo	Permanente	68	33.7	0.34
	Stagionale	19	40.5	
	Sporadica	3	40.0	
Transumanza	No	74	36.8	0.19
	Si	19	30.5	
Altitudine dell'area di pascolo	Pianura (<300 m s.l.m.)	22	33.6	0.08
	Collina (350-700 m s.l.m.)	36	39.4	
	Montagna (>700 m s.l.m.)	22	28.2	
Estensione dell'area di pascolo	Piccola (<= 10 ettari)	23	36.5	0.65
	Media (11 - 99 ettari)	27	37.4	
	Estesa (100+ ettari)	34	33.2	
Fonti d'acqua nell'area di pascolo principale	Assenti	31	36.1	0.81
	Presenti	62	35.2	

* Differenza significativa (P<0.05).

4. Discussione

I GIS sono stati utilizzati per studiare potenziali fattori di rischio associati a toxoplasmosi in differenti specie animali (Afonso et al., 2013; Chadwick et al., 2013; Djokic et al., 2014; Casartelli-Alves et al., 2015). Le analisi spaziali hanno permesso di evidenziare una significativa variazione della sieroprevalenza dell'infezione in capre e lontre tra differenti regioni rispettivamente della Serbia e della Gran Bretagna. Inoltre, una più alta prevalenza di toxoplasmosi è stata associata ad alcuni fattori geografici/climatici in alcuni studi. Afonso et al. (2013) hanno riportato che aree con una più alta densità di aziende zootecniche ed inverni freddi ed umidi potrebbero rendersi responsabili di un più alto rischio di toxoplasmosi nel gatto. La distanza da fonti d'acqua (>500 metri) e la vicinanza a zone a densa vegetazione (≤ 500 m) sono stati indicati quali fattori in grado di influenzare la probabilità di infezione nel pollo (Casartelli-Alves et al., 2015). Riguardo la specie ovina, questa è la prima analisi eseguita attraverso una mappatura mediante GIS, rilevazione di *clusters* e analisi di fattori di rischio. Nel presente studio non è stata rilevata alcuna associazione statisticamente significativa in relazione all'altitudine delle aziende considerate. Tuttavia, è importante sottolineare che il sistema di allevamento ovino nella regione Campania non è intensivo, quindi gli ovini sono raramente confinati in stalla e, al contrario, sono permanentemente o frequentemente tenuti al pascolo (Tabella 4). Di conseguenza, considerando questo scenario, la posizione dell'azienda potrebbe essere considerata un fattore minore rispetto alla posizione dell'area di pascolo. Non è stata riscontrata alcuna associazione neanche tra la sieroprevalenza e le altre variabili ambientali (land cover, aspect, slope); simili risultati sono stati riportati in allevamenti ovini in Serbia (Djokić et al., 2014) mentre Kantzoura et al. (2013) hanno riferito di una prevalenza verso *T. gondii* significativamente più elevata in aziende ovine localizzate in prossimità di foreste e aree urbane/coltivate in Grecia. Tuttavia, tali risultati sono difficili

da confrontare con quelli ottenuti dal nostro studio: nel nostro lavoro il territorio è stato mappato utilizzando un livello più dettagliato (terzo livello della *CORINE land cover*) quindi abbiamo ottenuto un maggior numero di classi relative alla copertura superficie rispetto ai succitati studi.

Diversi lavori presenti in letteratura hanno analizzato fattori di rischio “aziendali” associati a sieropositività per *T. gondii* (Klun et al., 2006; Vesco et al., 2007; Romanelli et al., 2007; Tzanidakis et al., 2012; Cenci-Coga et al., 2013; Alvarado-Esquivel et al., 2013; Kantzoura et al., 2013). Tuttavia, i risultati di tali studi dovrebbero essere confrontati con cautela in considerazione delle differenze nell’unità epidemiologica considerata (es. singolo animale *versus* allevamento), tipologia della tecnica di analisi (Klun et al., 2006; Vesco et al., 2007; Romanelli et al., 2007; Tzanidakis et al., 2012; Cenci-Coga et al., 2013; Alvarado-Esquivel et al., 2013; Kantzoura et al., 2013), metodi statistici o differenti fattori di rischio considerati.

Tra i fattori di management aziendale presi in considerazione nel presente studio, la “tipologia di produzione” è stata l’unica variabile statisticamente associata alla prevalenza intra-allevamento; il ritrovamento di *T. gondii* è stato significativamente più alto in aziende con una produzione mista (latte e carne) rispetto ad aziende dove gli animali erano allevati solo per la produzione di carne. Nessuno dei sopracitati studi includeva tale variabile nella loro analisi statistica quale potenziale fattore di rischio per la toxoplasmosi ovina. Tale ritrovamento suggerisce che le pratiche di mungitura possano influenzare la diffusione dell’infezione nell’allevamento e diverse cause possono essere ipotizzate a riguardo. La mungitura implica una più alta frequenza di contatto tra gli animali e, conseguentemente, potrebbe favorire la probabilità di contaminazione da parte delle oocisti di *T. gondii* presenti nell’ambiente. La diffusione delle oocisti può essere ulteriormente favorita se l’allevatore non rispetta le adeguate misure igieniche durante la mungitura degli animali o le basilari operazioni di pulizia e disinfezione degli ambienti. Inoltre, anche la mancanza di dispositivi di biosicurezza

nella sala di mungitura, in particolare quelli necessari per limitare l'accesso di gatti e animali selvatici, potrebbe essere rilevante. Tuttavia, non sono state raccolte informazioni riguardanti le condizioni o la gestione della area adibita alla mungitura negli allevamenti ovini oggetto della presente indagine. Inoltre, bisogna considerare che la proporzione di aziende da carne era molto piccola se confrontata al numero complessivo di aziende considerate nella *survey* e quindi non è possibile escludere che i risultati possano essere influenzati da un *bias* di campionamento.

I risultati dell'analisi statistica non hanno mostrato associazione tra la presenza di gatti nell'allevamento e la prevalenza sierologica negli ovini. Molti studi hanno riportato una relazione tra lo status sierologico degli ovini e la presenza di felini domestici (Vázquez-Boland et al., 1996; Skjerve et al., 1998; Vesco et al., 2007; Romanelli et al., 2007; Andrade et al., 2013). Tuttavia, un altrettanto cospicuo numero di ricerche, analogamente ai nostri risultati, non hanno riscontrato alcuna associazione tra prevalenza di *T. gondii* negli ovini e presenza di gatti in allevamento (Cosendey-KezenLeite et al. 2014; Cenci-Coga et al., 2013; García-Bocanegra et al. 2013; Tzanidakis et al., 2012). Cenci-Coga et al. (2013) hanno riportato una prevalenza più alta in aziende dove ai gatti randagi è consentito l'accesso alle fonti d'acqua mentre la sola presenza degli stessi in allevamento non era significativa. In maniera simile, Romanelli et al. (2007) hanno rilevato una relazione positiva tra il numero di pecore infette e la possibilità dei gatti di accedere alla zona di stoccaggio del mangime.

Pochi studi hanno valutato se la presenza nella stessa area di allevamento o il pascolo di animali di specie differente da quella ovina (ad esclusione del gatto) possa influenzare la prevalenza di *T. gondii* nel gregge (Waltner-Toews et al. 1991; Tzanidakis et al., 2012). Mediante un modello multivariato, Waltner-Toews et al. (1991) hanno rinvenuto una più alta prevalenza in aziende dove gli ovini erano allevati insieme ai suini o in greggi che condividevano il pascolo con animali appartenenti ad altre specie. Tuttavia, né il presente

studio né altri lavori hanno rilevato che il contatto ripetuto con altre specie animali durante le fasi di allevamento possa essere un fattore di rischio per la toxoplasmosi ovina.

Nonostante la tipologia della fonte di approvvigionamento dell'acqua sia stata frequentemente indicata come potenziale fattore di rischio, l'analisi dei dati non ha evidenziato alcuna relazione tra la sieroprevalenza in azienda nei confronti del parassita e la presenza di una fonte d'acqua nella zona di pascolo (Waltner-Toews et al. 1991; Vesco et al., 2007; Tzanidakis et al., 2012; Andrade et al., 2013). L'analisi è stata eseguita anche testando singolarmente le differenti fonti d'acqua (sorgente naturale, fiume, ruscello e lago) ma nessun effetto sulla prevalenza intra-allevamento è stata rilevata (dati non presentati).

L'altitudine dell'azienda è stata correlata alla frequenza di ritrovamento di *T. gondii* da parte di diversi autori (Skjerve et al., 1998; Alvarado-Esquivel et al., 2013; Kantzoura et al. 2013). In base ai nostri risultati, come precedentemente menzionato, l'altitudine dell'azienda non era legata alla sieroprevalenza ma, similmente allo studio di Kantzoura et al. (2013), la sieroprevalenza dei greggi che pascolavano in montagna era quasi significativamente più bassa dei greggi che utilizzavano pascoli a minore altitudine ($p\text{-value}=0.08$). I pascoli di montagna potrebbero essere meno contaminati da oocisti a causa del più basso livello di antropizzazione e, di conseguenza una più bassa densità della popolazione felina; questa potrebbe essere la ragione di tali differenze in termini di sieroprevalenza evidenziati nello studio.

In Italia, poiché è consentita la macellazione di maiali in azienda destinati al consumo familiare, gatti stanziali o randagi sono potenzialmente in grado di cibarsi delle rimanenze delle carcasse contaminate e infettarsi. Sinora, nessuno studio scientifico ha verificato se tale attività può supportare la persistenza del parassita in allevamento, e di conseguenza avere una rilevanza epidemiologica nella toxoplasmosi ovina. Per tale motivazione, il modello di regressione è stato utilizzato per verificare se la frequenza della macellazione aziendale possa

influenzare il tasso di sieropositività del gregge ma nessuna associazione statisticamente significativa è stata rilevata.

Al contrario di studi simili, il presente lavoro ha utilizzato un approccio “*grid-based*”, ovvero a griglia con maglie regolari, per selezionare le aziende oggetto dello studio. Questo tipo di campionamento è particolarmente efficace per le indagini geo-spaziali perché permette di ottenere dati omogenei dall’intera area di studio e, di conseguenza, avere un quadro rappresentativo del territorio. Inoltre, lo studio coinvolge un rilevante numero di aziende ovine. Tuttavia, considerando il tipo di modello di regressione adottato, il numero di animali testati per ogni azienda potrebbe non essere stato sufficiente per stimare la prevalenza intra-allevamento con un adeguato livello di accuratezza. Inoltre, il numero di aziende non era equamente distribuito tra le diverse categorie per alcuni fattori di rischio (es. il tipo di produzione) e questo potrebbe aver influenzato i risultati dell’analisi.

In conclusione, sebbene questo studio abbia ampliato le conoscenze epidemiologiche sulla toxoplasmosi negli ovini in Campania, alcuni aspetti dell’infezione non sono ancora del tutto chiariti. Con l’esclusione dell’attitudine produttiva degli animali, l’ambiente o le variabili riguardanti la gestione dell’allevamento analizzate sembrano non condizionare il rischio di toxoplasmosi. La popolazione oggetto dello studio riflette le condizioni di allevamento della regione Campania, quindi una vasta percentuale di greggi erano stagionalmente o permanentemente tenuti all’aperto (96.0% - Tabella 4). Questa tipologia di allevamento implica che gli animali abbiano maggiori opportunità di entrare in contatto con le oocisti di *T. gondii* disperse nell’ambiente (Guo et al., 2015c) e potrebbe quindi essere responsabile, più di ogni altra variabile, della sieroprevalenza intra-allevamento.

In ogni caso, uno studio di prevalenza coordinato su scala nazionale riguardante la toxoplasmosi negli animali domestici da reddito sarebbe fortemente necessario, in modo da

meglio valutare l'attuale situazione epidemiologica di questa sottostimata zoonosi e chiarire i fattori che influenzano la sua presenza e distribuzione (Rinaldi e Scala, 2008).

CAPITOLO IV - RISCHIO DI TOXOPLASMOSI ASSOCIATO AL CONSUMO DI CARNE DI MAIALE IN ITALIA

1. Background

1.1. La valutazione del rischio alimentare secondo il *Codex Alimentarius*

La valutazione del rischio alimentare è la metodologia adottata a livello internazionale per determinare con approccio scientifico il livello di rischio per la salute umana di un alimento in relazione ad uno specifico pericolo alimentare. Le linee guida emanate dal *Codex Alimentarius* (CAC, 1999), un ente internazionale frutto della collaborazione tra *Food Agriculture Organization* e Organizzazione Mondiale della Sanità, definiscono le quattro fasi di una valutazione del rischio microbiologico:

- Identificazione del pericolo: identificazione dell'agente microbico mediante la raccolta di informazioni provenienti da studi clinici, studi di epidemiologia e sorveglianza, indagini riguardo le capacità di sopravvivenza ed iterazione con l'ambiente... Qualunque fonte disponibile può essere utilizzata (letteratura scientifica, *database* dell'industria alimentare o enti pubblici, pareri di esperti, ecc...).
- Valutazione dell'esposizione: è la fase durante la quale si stima "la probabilità di esposizione di un individuo o di una popolazione ad un pericolo microbiologico e la concentrazione probabile ingerita del patogeno" (Lammerding e Fazil, 2000; Ferri e Giaccone, 2002). A tal fine vengono quindi acquisite informazioni riguardo la concentrazione del patogeno nell'alimento o nelle materie prime durante i diversi *steps* della catena alimentare, a partire dalle fasi di produzione primaria fino al momento del consumo. In alcuni casi vengono realizzati dei modelli predittivi in grado di stimare la variazione della concentrazione dell'agente patogeno in base alle diverse condizioni a cui è sottoposto (es. sopravvivenza dei un microrganismo durante la cottura delle carni).

- Caratterizzazione del pericolo: studio dell'effetto o gli effetti dell'agente patogeno sulla salute umana (sintomi provocati nell'uomo, sensibilità di individui appartenenti a diverse fasce della popolazione, ecc.) quindi comprende anche una valutazione della relazione tra la dose ingerita e la probabilità che un individuo sviluppi una risposta (*end-point*).
- Caratterizzazione del rischio: fase finale che integra tutte le evidenze delineate in quelle precedenti al fine di fornire una stima del rischio associato al consumo di un alimento.

In una valutazione del rischio microbiologico/parassitologico, i risultati di diverse tipologie di studi scientifici (come indagini sui consumi alimentari, studi di prevalenza e esperimenti sulla sopravvivenza di un microrganismo) sono quindi integrati allo scopo di comprendere le modalità di trasmissione di un patogeno, il suo impatto sulla salute pubblica e di supportare decisioni d'intervento basate sul rischio (Opsteegh et al. 2011). Le valutazioni del rischio quantitative (QRA) si distinguono da quelle qualitative perché esprimono il rischio attraverso stime numeriche e non qualitative (es. rischio alto, basso, ecc.). Le QRA sono sostanzialmente dei modelli matematici approntati allo scopo di simulare una serie di fenomeni/eventi e predirne l'esito con la maggiore accuratezza possibile. Quando la stima del rischio è fornita mediante stime numeriche "puntuali" vengono chiamate "deterministiche" mentre quando la stima è espressa mediante *range* di valori numerici associati ad una probabilità di accadimento vengono dette appunto "probabilistiche" o "stocastiche". In quest'ultimo caso, i valori attribuiti alle diverse variabili di *input* dello studio non sono dei valori fissi ma sono molteplici ed ognuno è associato ad una probabilità di accadimento diversa: ne scaturisce che ogni variabile è associata ad una distribuzione di probabilità che permette di riprodurre la variabilità di un determinato fenomeno, evento o carattere. Una volta che sono stati definiti gli *input* del modello vengono utilizzati *software* che permettono di condurre una "simulazione

Montecarlo” ovvero strumenti informatici che per ogni parametro del modello “estraggono” per un numero elevatissimo di volte (chiamate “ripetizioni”) un valore casuale tra quelli possibili tenendo però conto delle distribuzioni di probabilità precedentemente definite (valori più probabili saranno scelti più frequentemente rispetto agli altri). Quindi, la conseguente stima del rischio del rischio sarà rappresentata da una distribuzione di valori ognuno dei quali associato ad una probabilità di accadimento. Infine, il risultato finale con il quale una QRA esprime il rischio (chiamato anche *output*) può essere espresso in differenti modalità, ad esempio stimando il numero dei casi di malattia previsti in un anno nella popolazione o la probabilità di causare una patologia dopo l’assunzione di una singola porzione.

1.2. Il rischio di toxoplasmosi derivante dal consumo di carne in Italia

Come discusso nei capitoli precedenti, numerose evidenze scientifiche dimostrano che il consumo di carne rappresenta un rischio concreto per il consumatore. Almeno due valutazioni del rischio pubblicate a livello internazionale hanno tentato di stimare in termini qualitativi il rischio di contrarre la toxoplasmosi associato alle diverse tipologie di alimenti a base di carne (Mie et al., 2008; Guo et al., 2015a) mentre soltanto una invece ha fornito stime quantitative (Opsteegh et al. 2011). Sebbene tali studi offrano dati e spunti metodologici estremamente interessanti per comprendere le problematiche connesse alla toxoplasmosi umana, i loro risultati non sono trasferibili alla situazione italiana perché fanno spesso riferimento a prodotti o abitudini alimentari significativamente differenti da quelle presenti nel nostro Paese.

Per tale motivazioni, il presente studio propone un modello quantitativo di valutazione del rischio allo scopo di: 1) stimare i prodotti a base di carne di maiale maggiormente a rischio commercializzati in Italia; 2) identificare i principali fattori di rischio connessi all’esposizione al parassita; 3) evidenziare gli attuali “*gaps*” della ricerca scientifica in merito all’argomento.

E' stato scelto di trattare unicamente prodotti a base di carne di maiale perché la specie suina è ritenuta maggiormente rilevante per quanto riguarda il rischio toxoplasmosi umana oltre ad essere stata maggiormente studiata rispetto alle altre specie e per la quale è quindi disponibile la maggior quantità di dati.

2. Materiali e metodi

2.1. Overview sul modello

La presente simulazione stima il rischio di toxoplasmosi associato ai diversi alimenti a base di carne di maiale consumati in Italia e, sulla base dei consumi di suddetti prodotti, il relativo numero di nuovi casi attesi ogni anno nella popolazione adulta e delle donne in stato di gravidanza. Il modello proposto riflette quello dell'unica valutazione del rischio quantitativa pubblicata sinora a livello internazionale riguardante *T. gondii*, la quale è stata condotta riferendosi alla popolazione olandese (Opsteegh et al., 2011). Tuttavia, benché la struttura dei due modelli sia simile, vi sono profonde differenze riguardanti le fonti dati consultate, la tipologia dei prodotti consumati e le abitudini alimentari.

Come nelle altre valutazioni del rischio (Guo et al., 2015a; Opsteegh et al. 2011; Mie et al., 2008), tutti i ceppi di *T. gondii* sono stati considerati potenzialmente patogeni per l'uomo senza distinzione. Sebbene sia evidente che alcuni ceppi siano correlati ad una più alta incidenza di toxoplasmosi umana o a manifestazioni morbose più severe, i dati presenti nella letteratura scientifica non permettono ancora di prevedere, neanche su base genetica, eventuali variazioni di virulenza (Xiao et al., 2015).

La struttura del modello, comprensiva di tutti gli “*steps*” considerati per stimare l'esposizione al consumatore di *T. gondii*, è rappresentata nella Figura 10.

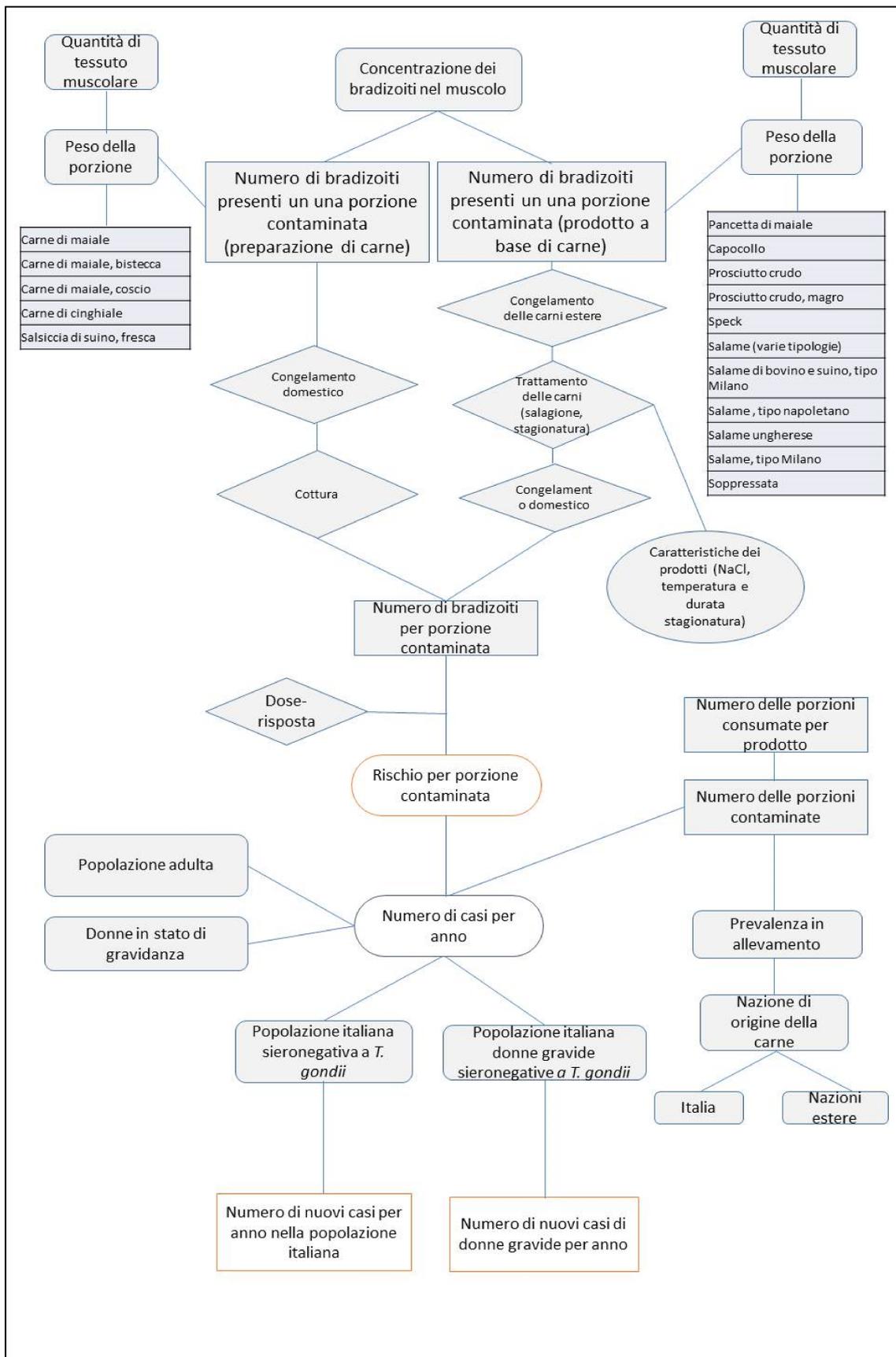


Figura 10 - Struttura del modello di esposizione adottato dalla valutazione

La prima parte del modello stima il numero di bradizoiti presenti in una porzione di un alimento a base di carne di maiale contaminata. Tale modello predittivo è legato principalmente alle seguenti variabili:

- Tipologia dei prodotti consumata dagli italiani che contengono carne di maiale
- Peso della porzione ingerita
- Quantità di muscolo di maiale effettivamente presente nella porzione
- Quantità di bradizoiti presente nel muscolo di un suino infetto
- Effetto dei trattamenti sulla carne e quindi sulla quantità di parassiti presenti.

La seconda parte, sulla base della concentrazione di bradizoiti stimata precedentemente, calcola il rischio associato ad ogni porzione di ogni tipologia di alimento e il numero di nuovi casi per anno nelle due popolazioni oggetto di studio, popolazione adulta e donne in stato di gravidanza.

2.2. Tipologia degli alimenti a base di carne di maiale consumati in Italia

L'elenco dei prodotti alimentari consumati dalla popolazione italiana è stato tratto dalla *“Italian National Food Consumption Survey INRAN-SCAI 2005–06”*, il più recente studio sui consumi alimentari eseguito in Italia con metodologia scientifica (Leclercq et al., 2009; INRAN-SCAI 2005-06 Study Group, 2010). In tale indagine, il sistema di classificazione dei prodotti alimentari utilizzato era organizzato in tre livelli gerarchici: il primo livello era molto generale (es. carne, vegetali, ecc.) mentre il secondo e terzo livello descrivevano ulteriormente il prodotto (es. II livello= carne fresca di maiale, III livello= Bistecca di suino). Riguardo la scelta dei prodotti del primo livello, è stata considerata solo la categoria *“Carne, prodotti a base di carne e sostituti”* dove erano incluse tutte le carni fresche e lavorate di diverse specie animali. Sebbene la carne di maiale fosse potenzialmente presente in prodotti

non appartenenti a questa categoria come, ad esempio, i prodotti misti (pizza, panini, ecc.) è stato assunto che l'esposizione al parassita tramite tali prodotti, e quindi il rischio di malattia, fosse minima per le seguenti ragioni: i) la quantità di carne di maiale contenuta è marginale rispetto ad altri prodotti a base di carne; ii) gli ingredienti utilizzati per tali prodotti sono spesso sottoposti a trattamenti in grado di inattivare *T. gondii* (sono ad esempio precotti); iii) non sono disponibili informazioni riguardo l'effettiva presenza di carne di maiale in tali prodotti.

Dopo questa prima selezione, sono state escluse le sottocategorie che evidentemente includevano alimenti a base di carne proveniente da specie diversa da quella suina come le carni di bovino, pollame, ecc. Le carni di cinghiale sono state incluse in quanto tale specie è ritenuta sensibile a *T. gondii* al pari del suino domestico. Un'ulteriore selezione è stata fatta escludendo i prodotti elencati nel terzo livello sulla base di tali criteri:

- L'alimento non conteneva chiaramente carne di maiale (es. lingua bovina)
- Il prodotto alimentare è consumato tradizionalmente dopo trattamenti/processi di manipolazione sicuramente in grado di uccidere *T. gondii* (es. notoriamente soggetti ad alte temperature o lunghi tempi di cottura; è tipico il caso delle preparazioni a base di cotenna di maiale o frattaglie)
- Il prodotto deriva da processi di produzione che prevedono trattamenti sicuramente in grado di uccidere il parassita (es. wurstels, carne in scatola, prosciutto cotto, ecc.).

I prodotti alimentari "insaccati" e "salsiccia di suino, secca" sono stati raggruppati in un'unica categoria "salame generico" (rappresentavano un basso numero di osservazioni relative a salumi diversi da quelli specificati in altre voci).

Le rimanenti 16 classi alimentari considerate potenzialmente a rischio sono state distinte in due categorie nelle successive fasi sulla base delle seguenti definizioni:

- Preparazioni a base di carne fresca: tagli di carne che non sono sottoposti ad alcun processo di trasformazione (cioè la struttura muscolare è ancora riconoscibile) e che sono destinati ad essere consumati dopo un trattamento termico
- Prodotti a base di carne: alimenti consumati principalmente da carne i quali sono stati trasformati attraverso stagionatura o processi di salagione (la struttura del muscolo non è più riconoscibile) e sono pronti al consumo cioè non è necessario alcun trattamento (es. cottura) prima dell'ingestione.

La tabella successiva riporta l'elenco dei prodotti valutati e di quelli considerati a rischio.

Tabella 5- Prodotti a base di carne suina riportati dall'indagine Italian National Food Consumption Survey INRAN-SCAI 2005–06

INRAN CATEGORY (II Lev.)	INRAN FOOD FOOD – (III Lev.)	RISCHIO T. GONDII*	TIPO DI PRODOTTO
CARNE DI SUINO	carne di maiale (taglio generico)	X	Preparazione a base di carne
CARNE DI SUINO	carne di maiale, bistecca	X	Preparazione a base di carne
CARNE DI SUINO	carne di maiale, coscio	X	Preparazione a base di carne
CARNE DI SUINO	omogeneizzato di prosciutto		
CARNE DI SUINO	pancetta di maiale	X	Prodotto a base di carne
CARNE DI SUINO	porchetta alla romana		
CARNE DI SUINO	salsiccia di suino, fresca	X	Preparazione a base di carne
CARNE DI SUINO	salsiccia di suino, secca	X	Prodotto a base di carne
CARNE DI SUINO	wurstel di suino		
CARNE, ALTRI TIPI	carne di anatra		
CARNE, ALTRI TIPI	carne di cervo		
CARNE, ALTRI TIPI	carne di cinghiale	X	Preparazione a base di carne
CARNE, ALTRI TIPI	carne di faraona, coscia		
CARNE, ALTRI TIPI	carne di faraona, petto		
CARNE, ALTRI TIPI	carne di lumaca		
CARNE, ALTRI TIPI	carne di oca		
CARNE, ALTRI TIPI	carne di piccione		
CARNE, ALTRI TIPI	carne di quaglia		
CARNE, ALTRI TIPI	prosciutto di cervo		
FRATTAGLIE E COTICHE	cervello di bovino		
FRATTAGLIE E COTICHE	cervello di vitello e agnello		
FRATTAGLIE E COTICHE	coratella di agnello		
FRATTAGLIE E COTICHE	cotiche		
FRATTAGLIE E COTICHE	fegatini di pollo		

FRATTAGLIE E COTICHE	fegato di bovino		
FRATTAGLIE E COTICHE	fegato di ovino		
FRATTAGLIE E COTICHE	fegato di suino		
FRATTAGLIE E COTICHE	lingua di bovino		
FRATTAGLIE E COTICHE	midollo osseo di bue		
FRATTAGLIE E COTICHE	omento di maiale		
FRATTAGLIE E COTICHE	orecchie di maiale		
FRATTAGLIE E COTICHE	piede di maiale		
FRATTAGLIE E COTICHE	trippa di bovino		
INSACCATI	capocollo	X	Prodotto a base di carne
INSACCATI	cotechino		
INSACCATI	insaccati	X	Prodotto a base di carne
MORTADELLA	mortadella di bovino e suino		
MORTADELLA	mortadella di suino		
PROSCIUTTO COTTO	liofilizzato di prosciutto		
PROSCIUTTO COTTO	prosciutto cotto		
PROSCIUTTO CRUDO	prosciutto crudo	X	Prodotto a base di carne
PROSCIUTTO CRUDO	prosciutto crudo, magro	X	Prodotto a base di carne
SALAMI, VARI TIPI	salame di bovino e suino, tipo milano	X	Prodotto a base di carne
SALAMI, VARI TIPI	salame equino		
SALAMI, VARI TIPI	salame, tipo Napoli	X	Prodotto a base di carne
SALAMI, VARI TIPI	salame ungherese	X	Prodotto a base di carne
SALAMI, VARI TIPI	salame, tipo Milano	X	Prodotto a base di carne
SOPPRESSATA	soppressata	X	Prodotto a base di carne
SPECK	speck	X	Prodotto a base di carne

2.3. Peso delle porzioni

Al fine di stimare l'esposizione a *T. gondii* attraverso la via alimentare è stato ovviamente necessario quantificare il peso delle porzioni ingerite per tipologia di alimento dal consumatore. Tali dati sono stati richiesti specificamente al "Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura" (CRA) e derivano dall'indagine sui consumi precedentemente menzionata (*Italian National Food Consumption Survey* INRAN-SCAI 2005–06).

Il numero delle osservazioni non era sufficiente per definire delle distribuzioni di probabilità relative al peso della porzione ingerita dai consumatori per ogni singolo prodotto, quindi si è provveduto a raggruppare le tipologie di alimento in cinque categorie in accordo alle loro affinità chimico-fisiche e al numero necessario di osservazioni disponibili:

- Carne fresca di maiale/cinghiale: carne; carne maiale (taglio generico); carne di maiale, bistecca; carne di maiale, coscio.
- Salsicce fresche
- Carni salate: capocollo; prosciutto crudo; prosciutto crudo, magro; pancetta di maiale.
- Salami: salame generico; salame, tipo Milano; salame napoletano; soppressata; salame di bovino e suino; insaccato; salame ungherese; salame equino.
- Speck: Speck

Utilizzando i percentili di consumo medio giornaliero della popolazione adulta, sono state costruite delle distribuzioni cumulative che stimano la grammatura della porzione ingerita su base probabilistica. La tabella successiva riporta tali distribuzioni: ognuna di queste riporta i percentili considerati (es. 0.95 rappresenta il 95esimo percentile) ed il relativo valore. Per esempio, il valore del 95° percentile per la “Carne di maiale/cinghiale fresca” è 100.3 grammi ovvero la probabilità che la porzione ingerita dal soggetto abbia un peso maggiore di tale valore è del 5%. I limiti minimi e massimi di tali distribuzioni sono stati stabiliti in base ai consumi più bassi e più alti registrati dall’indagine per ogni categoria di alimento e riportati all’inizio dell’equazione che definisce la distribuzione (es. Carni fresche, la grammatura minima è 4.9 gr mentre la massima 386 gr).

Tabella 6 - Consumo medio (g/giorno) per popolazione adulta

Alimento	Media	SD	Mediana	P95	P99	Distribuzione cumulativa
Carni di maiale/cinghiale fresca	51,4	28,5	46,7	100,3	140,2	Cumul(4,9;386;{6,7\20\29,3\35\38,6\46,7\46,7\46,9\52,8\58,6\89,1\100,3\140,2};{0,01\0,05\0,1\0,2\0,3\0,4\0,5\0,6\0,7\0,8\0,9\0,95\0,99})
Carni salate	22,2	13,8	20,0	46,7	73,3	Cumul(3,3;165;{6\7,5\10\13,3\13,3\20\20\20\24,2\26,7\40\46,7\73,3};{0,01\0,05\0,1\0,2\0,3\0,4\0,5\0,6\0,7\0,8\0,9\0,95\0,99})
Salami	11,9	8,7	8,7	26,7	46,7	Cumul(1,5;77,3;{1,5\4\4,4\6\7,1\8\8,7\13,3\13,3\14,2\21,3\26,7\46,7};{0,01\0,05\0,1\0,2\0,3\0,4\0,5\0,6\0,7\0,8\0,9\0,95\0,99})
Salsiccia di suino fresca	43,7	20,5	41,7	81,1	135,1	Cumul(5,4;154,7;{12,2\19,5\25\28,3\31,3\40,5\41,7\41,7\50,5\54,0\66,5\98,1\135,1};{0,01\0,05\0,1\0,2\0,3\0,4\0,5\0,6\0,7\0,8\0,9\0,95\0,99})

Speck	18,6	10,2	13,3	40,0	41,7	Cumul(2,7;41,7;{2,7\2,7\6,7\6,7\13,3\13,3\13,3\20\20\33,3\40\41,7};{0,01\0,05\0,1\0,2\0,3\0,4\0,5\0,6\0,7\0,8\0,9\0,95\0,99})
-------	------	------	------	------	------	---

2.4. Stima della quantità di tessuto muscolare contenuta in ogni porzione in base alla tipologia di alimento

2.4.1. Quantitativo di muscolo di maiale contenuta in ogni prodotto

Nella presente QMRA è stato assunto che *T. gondii* sia presente solo nel muscolo, quindi è stato necessario stimare l'effettiva quantità di tale tessuto presente in ogni tipologia di alimento che verrà effettivamente ingerita. La grammatura definita per ogni porzione nel precedente paragrafo è stata ridotta tramite un fattore di correzione che tiene conto di:

- Presenza di ingredienti che non derivanti dal tessuto muscolare di suino
- Presenza di ossa, cartilagini e altri parti non edibili dell'animale
- Presenza di tessuti edibili diversi dal tessuto muscolare di suino (sia naturalmente presenti che aggiunti). In particolare, alcuni alimenti contengono parti grasse (es. prosciutto) quindi sono state stimate le percentuali di grasso sottocutaneo e depositi di grasso intramuscolare attorno al muscolo al fine di ottenere un fattore di riduzione affidabile mentre non è stato possibile stimare la quantità di grasso intramuscolare. In maniera simile, è stata stimata la percentuale di grasso generalmente aggiunta all'impasto per la produzione di salsicce e salami, in modo da conoscere la reale quantità di muscolo di maiale nel prodotto.

Una ricerca bibliografica è stata eseguita per quantificare la proporzione di prodotto che rientra nei criteri succitati. La seguente tabella riporta i coefficienti (e la fonte di riferimento) che, moltiplicati con il peso della porzione, hanno permesso di ottenere una stima della quantità reale di muscolo di maiale presente in ogni porzione di alimento. Qualora fossero rinvenuti più valori, sono state definite delle distribuzioni di probabilità per simulare tale variabilità del prodotto.

Tabella 7 – Coefficienti per il calcolo della quantità di muscolo di maiale in ogni porzione

Alimento	Fattore di correzione	Fonte	Note
Carne di suino fresca (taglio generico)	Uniforme(0,74;1)	INRAN (2009)	E' stata stimata la parte edibile. Valori di diversi tagli di carne sono stati considerati per modellare tale distribuzione (bistecca, bistecca leggera, coscio, coscio leggero, lombo, lombo legger, spalla leggera e pesante)
Carne di maiale fresca (bistecca)	0,74	INRAN (2009)	E' stata stimata la parte edibile
Carne di maiale fresca (coscio)	0,87	INRAN (2009)	E' stata stimata la parte edibile
Carne fresca di cinghiale	Uniforme(0,74;1)	INRAN (2009)	I valori sono quelli della carne fresca di maiale (taglio generico)
Salsiccia fresca	Uniforme(0,60;0,70)	FAO (1985); Toldrà (2014)	E' stata stimata la parte edibile la percentuale di grasso
Pancetta	0,38	Swensen et al. (1998)	E' stata stimata la parte edibile escludendo la percentuale di grasso
Capocollo	1	INRAN (2009)	La proporzione di grasso presente è stata assunta essere non rilevante
Prosciutto crudo	Uniforme(0,87;0,91)	INRAN (2009)	E' stata stimata la percentuale di grasso esterna
Prosciutto crudo, leggero	Uniforme(0,87;0,91)	INRAN (2009)	E' stata stimata la percentuale di grasso
Speck	1	INRAN (2009)	La proporzione di grasso presente è stata assunta essere non rilevante
Salame generico	Triangolare(0,7;0,85; 0,9)	Ars Alimentaria (2015); Comi et al. (2005)	E' stata stimata la percentuale di grasso aggiunta all'impasto
Salame di bovino e suino, tipo Milano	0,5	Ars Alimentaria (2015)	E' stata considerate la presenza di carne bovina e la percentuale di grasso aggiunta all'impasto
Salame, tipo Napoli	Triangolare(0,7;0,85; 0,9)	Ars Alimentaria (2015)	E' stata stimata la percentuale di grasso aggiunta all'impasto.
Salame, tipo Ungherese	0,80	Meats and Sausages (2015)	E' stata stimata la percentuale di grasso aggiunta all'impasto
Salame, tipo Milano	Uniforme(0,75;0,80)	Meats and Sausages (2015); Cantoni (2003)	E' stata stimata la percentuale di grasso aggiunta all'impasto
Salame, tipo Soppressata	0,85	Romeo et al. (2014)	E' stata stimata la percentuale di grasso aggiunta all'impasto

2.4.2. Stima della quantità di tessuto muscolare presente in ogni porzione prima dei trattamenti

La grammatura della porzione ricavata dai dati provenienti dall'indagine INRAN-SCAI 2005–06 (vedi paragrafo precedente) era relativa al peso stimato immediatamente prima del consumo, cioè l'alimento era già stato sottoposto a trattamenti quali la cottura (per i prodotti destinati ad essere ingeriti cotti) o la salatura/stagionatura (per alcuni prodotti di carne come ad esempio il prosciutto). Tali trattamenti riducono il peso della carne/muscolo di maiale originariamente presente. Per esempio, una bistecca cotta può perdere il 20% del suo peso rispetto all'originale carne cruda. Poiché le stime della concentrazione del parassita a nostra disposizione sono relative al tessuto muscolare (vedi paragrafi successivi), è stato necessario calcolare la quantità originaria del muscolo stesso utilizzato per la preparazione di ogni specifico alimento. Questo è stato effettuato utilizzando un fattore di correzione per ogni prodotto. Tale valore tiene quindi conto di:

- Perdite di peso dovute alla cottura (per le preparazioni destinate ad essere consumate cotte).
- Calo di peso dovuto al processo di stagionatura (per i prodotti a base di carne).

Per quanto riguarda la cottura, alla maggior parte degli alimenti è stato applicato un modello di regressione lineare appositamente realizzato con dati riportati da Aaslyng et al. (2003). In tale studio, carni di maiale venivano cotte con diversi metodi di cottura (forno ad alta o bassa temperatura, padella) fino a raggiungere determinate temperature a cuore del prodotto, per poi essere pesati al fine di rilevare conseguente perdita di peso. Differenti tipologie di carni suine sono state utilizzate in tale lavoro. Il modello utilizza la temperatura di cottura stimata per il prodotto (vedi paragrafo successivo) per calcolare percentuale di peso persa durante il processo ad ogni ripetizione della simulazione. E' stato assunto che il calo di peso dovuto alla cottura non superi un certo valore quanto viene raggiunta la temperatura di 90 gradi a cuore

del prodotto. Per stimare il calo di peso dei salumi è stato invece adottato un modello predittivo di regressione lineare proposto da Bernardi et al. (2013) che si basa sul numero dei giorni di stagionatura a cui è sottoposto il prodotto. La grammatura della porzione di ogni prodotto è stata quindi aumentata durante ogni ripetizione della simulazione sulla base della perdita di peso stimata per ogni prodotto.

La seguente tabella riporta i valori/modelli che sono stati adottati nella simulazione a seguito dalla ricerca bibliografica e i relativi riferimenti.

Tabella 8 – Fattori di correzione a seguito della cottura e processo di stagionatura e relative riferimenti bibliografici

Prodotto alimentare	Perdita di peso stimata	Riferimento	Motivazione
Carne di suino fresca (taglio generico)	$(-41,39+0,92*T^{\circ})/100$	Modello di regressione lineare sulla base di Aaslyng et al. (2003)	Perdita di peso dovuta alla cottura
Carne di maiale fresca (bistecca)	$(-41,39+0,92*T^{\circ})/100$	Modello di regressione lineare sulla base di Aaslyng et al. (2003)	Perdita di peso dovuta alla cottura
Carne di maiale fresca (coscio)	$(-41,39+0,92*T^{\circ})/100$	Modello di regressione lineare sulla base di Aaslyng et al. (2003)	Perdita di peso dovuta alla cottura
Carne fresca di cinghiale	$(-41,39+0,92*T^{\circ})/100$	Modello di regressione lineare sulla base di Aaslyng et al. (2003)	Perdita di peso dovuta alla cottura
Salsiccia fresca	Triangolare(16,4;19,1;21,8)	Sheard et. al (1998)	Perdita di peso dovuta alla cottura
Pancetta	$(1,7852 + 2,8163*day - 0,04929*day^2);Max42\%$	Modello di regressione lineare sulla base di Aaslyng et al. (2003)	Perdita di peso dovuta alla stagionatura
Capocollo	Uniforme(0,38-0,45)	Matassino et al. (2012)	Perdita di peso dovuta alla stagionatura
Prosciutto crudo	Uniforme(0,24-0,32)	Scheda tecnica prosciutto Parma; Virgili et al. (2007); Schivazappa et al. (2002)	Perdita di peso dovuta alla stagionatura
Prosciutto crudo, leggero	Uniforme(0,24-0,32)	Scheda tecnica prosciutto Parma; Virgili et al. (2007); Schivazappa et al. (2002)	Perdita di peso dovuta alla stagionatura
Speck	0,35	Disciplinare di produzione della Indicazione Geografica Protetta «Speck Alto Adige»	Perdita di peso dovuta alla stagionatura

		(2012)	
Salame	$(1,7852 + 2,8163 \cdot \text{day} - 0,04929 \cdot \text{day}^2); \text{Max}42\%$	Modello di regressione da Bernardi et al. (2013)	Perdita di peso dovuta alla stagionatura
Salame, tipo Napoli	$(1,7852 + 2,8163 \cdot \text{day} - 0,04929 \cdot \text{day}^2); \text{Max}42\%$	Modello di regressione da Bernardi et al. (2013)	Perdita di peso dovuta alla stagionatura
Salame di bovino e suino, tipo Milano	$(1,7852 + 2,8163 \cdot \text{day} - 0,04929 \cdot \text{day}^2); \text{Max}42\%$	Modello di regressione da Bernardi et al. (2013)	Perdita di peso dovuta alla stagionatura
Salame, tipo Ungherese	$(1,7852 + 2,8163 \cdot \text{day} - 0,04929 \cdot \text{day}^2); \text{Max}42\%$	Modello di regressione da Bernardi et al. (2013)	Perdita di peso dovuta alla stagionatura
Salame, tipo Milano	$(1,7852 + 2,8163 \cdot \text{day} - 0,04929 \cdot \text{day}^2); \text{Max}42\%$	Modello di regressione da Bernardi et al. (2013)	Perdita di peso dovuta alla stagionatura
Salame, tipo Soppressata	$(1,7852 + 2,8163 \cdot \text{day} - 0,04929 \cdot \text{day}^2); \text{Max}42\%$	Modello di regressione da Bernardi et al. (2013)	Perdita di peso dovuta alla stagionatura
<ul style="list-style-type: none"> - Il modello di regressione lineare è stato costruito sulla base dei dati di Aaslyng et al. (2003) riportati in Figura 1 (senza tenere conto dei valori rilevati per le carni PSE e ad alto pH). “T” è la temperatura di cottura a cuore a cui viene sottoposto il prodotto (espressa in gradi celsius). “day” rappresenta il numero dei giorni di stagionatura. - Dopo i 30 giorni di stagionatura viene utilizzato il valore massimo possibile per la perdita di peso ovvero 42% 			

2.5. Quantità di bradizoiti presente nel muscolo di un suino infetto

L'unica stima esistente riguardo la quantità di parassiti presente nel tessuto muscolare di un capo infetto è quella riportata da Opsteegh et al. (2011) ed è stata ricavata utilizzando dati relativi a 35 campioni di cuore ovino analizzati con una particolare real-time PCR. I valori ottenuti sono stati trasformati in scala logaritmica (base 10) e rappresentati tramite una distribuzione Beta($\alpha_1=6.5$; $\alpha_2=5.7$) (Figura 11). In base a tale distribuzione, il numero medio di bradizoiti in una porzione contaminata di 100 grammi è 3890.

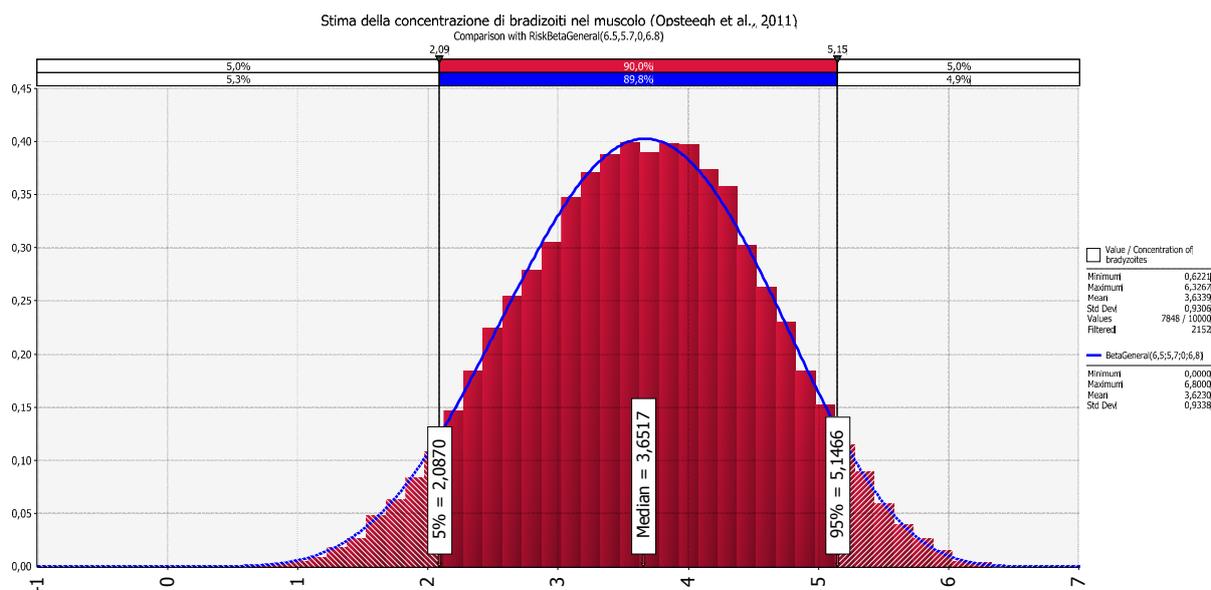


Figura 11 - Stima della concentrazione dei bradizoiti nel muscolo di un animale infetto (Log/100 gr) (secondo Opsteegh et al., 2011).

2.6. Effetto dei trattamenti sulla vitalità dei bradizoiti

Le preparazioni a base di carne possono subire un: i) congelamento prima del consumo; ii) cottura mentre i prodotti a base di carne non subiscono processi di cottura ma di salagione/salatura. Tutti questi processi possono incidere sulla vitalità del parassita e ridurre la quantità di bradizoiti infettanti. Al fine di stimare tale riduzione, sono stati applicati dei modelli di regressione predittivi proposti da Opsteegh et al. (2011) ma attribuendo ai diversi parametri dei valori relativi ai prodotti alimentari italiani. I modelli si basano su dati sperimentali riportati nei lavori di Kotula et al. (1991), Dubey et al. (1990) e Dubey (1997). Il disegno di tali studi è simile: diversi gruppi di topi sono stati inoculati con carne (dopo digestione artificiale) o tessuto cerebrale di topo contaminati (solo Dubey et al, 1997) da *T. gondii* precedentemente sottoposti a congelamento (Kotula et al., 1991) o cottura (Dubey et al., 1990) o salagione/stagionatura (Dubey et al, 1997). Ogni gruppo di topi veniva inoculato con tessuti che aveva subito un trattamento differente. Kotula et al. (1991) hanno congelato le

porzioni di carne contaminata applicando diverse combinazioni di tempo/temperatura. Allo stesso modo, Dubey et al. (1990, 1997) hanno cotto la carne utilizzata per l'inoculo a differenti combinazioni tempo/temperatura, mentre in un altro esperimento hanno salato il tessuto cerebrale da inoculare utilizzando diverse concentrazioni di NaCl e variando le temperature e i tempi di trattamento. In ognuno dei lavori citati, i topi di ogni gruppo venivano quindi sacrificati e analizzati al fine di quantificare il numero di soggetti che si erano infettati per ogni gruppo. Il rapporto topi infetti/topi inoculati permetteva di capire il grado di efficacia del trattamento di inattivazione che era stato eseguito sul tessuto usato per l'inoculo.

I risultati ottenuti da tali lavori sono stati utilizzati da Opsteegh et al. (2011) che hanno applicato un modello logistico in grado di stabilire il legame tra la probabilità di infezione del topo (P_{inf}) ricavata dagli esperimenti succitati con i parametri che regolavano ognuno processi di trattamento:

$$P_{inf} = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 * x_1 + \beta_2 * x_2 + \beta_3 * x_1 * x_2)}} \quad (1)$$

Dove $x_{1,2,...n}$ rappresentavano i valori dei diversi parametri del trattamento considerati dal modello (es. la temperatura di congelamento in gradi Celsius) o il loro effetto iterazione mentre $\beta_{1,2,...n}$ rappresentano i relativi coefficienti di regressione. Per associare la probabilità d'infezione con la quantità di parassiti presenti nella carne è stato applicato un modello esponenziale che spiega la relazione tra dose di un microrganismo e probabilità di infezione (chiamata anche "relazione dose-risposta"; Haas et al., 1983):

$$P_{inf} = 1 - e^{-r * D} \quad (2a) \Rightarrow D = -\frac{\ln(1 - P_{inf})}{r} \quad (2)$$

dove il valore della costante “r” è scelto tra quelli proposti dalla *French Food Safety Agency* (AFSSA, 2005). In questa maniera Opsteegh et al. (2011) hanno potuto stimare la dose iniziale (D) di *T. gondii* presente nei tessuti contaminati utilizzati per l’inoculazione in ognuno dei tre studi (non riportata in nessuno dei succitati lavori). Poiché i valori $x_{1,2,...n}$ (relativi ai parametri che regolano ogni processo di trattamento dell’inoculo) erano dichiarati nell’esperimento, il modello è stato adattato stimando i coefficienti di regressione “ β ” dei singoli parametri per ciascun trattamento (Fig. 12) in grado di provocare la probabilità d’infezione riportata per ogni gruppo di topi. I parametri di ogni trattamento che non miglioravano la capacità di predizione del modello (es. il tempo di cottura) sono stati esclusi dal modello finale. La figura successiva riporta i valori riportati da Opsteegh et al. (2011) e adottati nello studio.

Estimated β -coefficients (standard errors) for variables in the logistic regression models fitted to data from salting, freezing, and heating experiments.

Variable	Salting	Freezing	Heating
Constant (β_0)	22.349 (3.992)	9.536 (0.642)	44.181 (6.001)
Temperature ($^{\circ}$ C)	-0.412 (0.134)	1.269 (0.090)	-0.834 (0.113)
Treatment duration ^a	-0.193 (0.057)	-0.021 (0.002)	NA ^b
NaCl conc. (%w/v)	-3.316 (0.548)	NA	NA
Temp*duration	-0.022 (0.006)	-0.001 (0.0003)	NA
Temp*NaCl	NS ^c	NA	NA
Duration*NaCl	NS	NA	NA
Temp*duration*NaCl	NS	NA	NA

^a In days for salting, hours for freezing, and minutes for heating.

^b NA: not applicable.

^c NS: not significant.

Figura 12 – Parametri utilizzati per stimare la riduzione di carica batterica a seguito dei diversi trattamenti

Nella presente simulazione sono stati ripresi i modelli di Opsteegh et al. (2011) utilizzando le medesime stime del parametro “r”, della Dose iniziale presente nella carne (D₀) per ogni esperimento e dei coefficienti di regressione stimati per ogni parametro. I valori dei parametri di ogni trattamento sono stati invece ricavati dalle informazioni disponibili nella letteratura al fine di adattarli ai prodotti e alle condizioni presenti in Italia (vedi paragrafi successivi). Il

modello permetteva di calcolare il valore P_{inf} per ogni trattamento applicato al prodotto alimentare e quindi risalire alla quantità di bradizoiti presenti dopo il trattamento (D_p) tramite l'equazione dose-risposta di Hass et al. (1999). Il rapporto tra D_p e dose iniziale D_0 (cioè prima del trattamento) è stato calcolato per ogni iterazione della simulazione al fine di stimare un Fattore di Riduzione della carica parassitaria ($RF = D_p/D_0$) che rappresenta la proporzione di bradizoiti ancora vitali dopo l'applicazione di un trattamento alle date condizioni. Quindi tale Fattore di Riduzione è stato impiegato per ogni ripetizione della simulazione per calcolare la quantità di bradizoiti vitali rimasti nella porzione dopo l'applicazione di un trattamento di salatura, congelamento e cottura. Quando il valore di RF risultava essere estremamente basso (inferiore a 10^{-9}) è stato assunto che tutti i bradizoiti presenti erano stati inattivati dal trattamento.

Tabella 9 - Riepilogo dei parametri utilizzati per i modelli predittivi di riduzione della concentrazione parassitaria tramite i diversi trattamenti

Parametri per la salatura ¹		Parametri per il congelamento ¹		Parametri per la cottura	
(β_0) Costante	22,349	(β_0) Costante	9,536	(β_0) Costante	44,181
(β_1) Temperatura (°C)	-0,412	(β_1) Temperatura (°C)	1,269	(β_1) Temperatura (°C)	-0,834
(β_2) Durata trattamento	-0,193	(β_2) Durata trattamento	-0,021		
(β_3) NaCl conc. (%/v)	-3,316	(β_3) Temp*durata	-0,001		
(β_4) Temp*durata	-0,022				
$r_{salting}$	0,011	$r_{freezing}$	0,011	$r_{heating}$	0,011
D_0 (Dose iniziale)	1882	D_0 (Dose iniziale)	1328	D_0 (Dose iniziale)	2121
¹ La durata del trattamento è stata espressa in giorni per il modello di salatura e in ore per quello di congelamento					

2.6.1. Congelamento

Mentre le temperature di refrigerazione non sono in grado di inattivare *T. gondii*, il congelamento è in grado di ridurre il numero di parassiti vitali. Tuttavia, è stato necessario stimare con quale frequenza alimenti a base di carne di suini vengano congelate prima del

consumo (in relazione alla loro tipologia) in Italia. Dati riguardanti la frequenza di congelamento delle carni di maiale sono stati recentemente pubblicati da Migliorati et al. (2015).

Macro-category	LanguaL Category	(n)	Stored at home before consumption		Storage conditions (preservation method)		
			YES	NO	Room temp.	Chilling	Freezing
Meat and meat products	Product type/food Source						
	Red meat/cattle	(3117)	55%	45%	0.1%	46.1%	53.1%
	Poultry/chicken	(1316)	52.8%	47.2%	0.6%	40.8%	57.3%
	Sausage or similar/swine	(920)	61%	39%	5.7%	73.4%	19.4%
	Red meat/swine	(997)	56.9%	43.1%	0.9%	53.8%	44.7%
	Preserved meat/swine	(2265)	72.4%	27.6%	2.6%	73.4%	19.4%
	Poultry/turkey	(416)	54.4%	45.6%	0%	48.7%	51.3%
	Red meat/sheep	(165)	43.8%	56.3%	1.8%	43.9%	54.3%
	Red meat/rabbit	(116)	58.1%	41.3%	0%	28.2%	71.8%
Meat dish/cattle	(97)	51.1%	48.9%	0%	47.8%	52.2%	

Figura 13 – Frequenza percentuale di conservazione e congelamento a livello domestico di carni e prodotti a base di carne (da Migliorati et al., 2015)

Sebbene il lavoro riportasse i dati d'interesse in tabella (Figura 13), sono state richieste informazioni in dettaglio agli Autori dello studio che hanno cortesemente contribuito. Nel compiere tale verifica, gli stessi Autori hanno rilevato un errore nel lavoro pubblicato e questo spiega la discrepanza tra i dati descritti di seguito e quelli riportati nel loro lavoro. In breve, le carni di maiale fresche, le salsicce fresche e le carni conservate acquistate dai consumatori venivano congelate il 25%, 12% e 0.4% delle volte rispettivamente (ad esempio le carni fresche erano conservate prima del consumo nel 56.9% delle occasioni e il 44.7% delle volte il metodo di conservazione impiegato era il congelamento: la percentuale complessiva rispetto al totale è quindi 25%). Poiché erano disponibili dati di dettaglio e non solo aggregati per categoria come riportato nella succitata tabella, viene proposta una stima della probabilità di congelamento dei singoli prodotti da parte del consumatore italiano. La tabella successiva riporta i valori adottati.

Tabella 10 – Probabilità di congelamento di ogni prodotto alimentare a livello domestico (stime sulla base dei dati di Migliorati et al., 2015).

Prodotto alimentare	Probabilità di congelamento
Carne di suino fresca (taglio generico)	0,25
Carne di suino fresca (bistecca)	0,25
Carne di suino fresca (coscio)	0,25
Carne di cinghiale fresca	0,25
Salsicce fresche	0,20
Pancetta	0,04
Capocollo	0,01
Prosciutto crudo	0,04
Prosciutto crudo, leggero	0,04
Speck	0,04
Salame generico	0
Salame di bovino e suino, tipo Milano	0
Salame, Tipo Napoli	0
Salame, Tipo ungherese	0
Salami, Tipo Milano	0
Salame, Soppressata	0

2.6.2. Parametri del modello di congelamento

Il modello utilizza due parametri:

- temperatura di congelamento
- durata del congelamento

Riguardo la temperatura di congelamento applicata in ambiente domestico, non essendoci dati disponibili, è stata adottata una ripartizione omogenea tra le quattro classi di congelatori ad uso privato attualmente in commercio. Il sistema di classificazione “a stelle” prevede le seguenti classi di temperatura: -6 C° (1 stella), -12 C° (2 stelle), -18 C° (3 stelle), -24 C° (4 stelle). Lo stesso approccio è stato utilizzato da Opsteegh et al. (2011).

Allo stesso modo, sono assenti in letteratura dati in grado di definire i tempi di conservazione/congelamento di qualsiasi tipo di alimento prima del consumo. E’ stato quindi ipotizzato un periodo di conservazione compreso tra uno e trenta giorni come riportato anche dallo studio olandese.

Tabella 11 – Parametri per il congelamento utilizzati a livello domestico

Parametro	Valore/Distribuzione	Riferimento
Temperatura di congelamento adottata a livello domestico (°C)	Discreta($\{-6\}$ - $12\}$ - $18\}$ - $24\}$; $\{0,25\}$ $\{0,25\}$ $\{0,25\}$ $\{0,25\}$	Opsteegh et al. (2011)
Tempo di congelamento adottato a livello domestico (ore)	Uniforme($24*1$; $24*30$)	Opsteegh et al. (2011)

2.6.3. Parametri per il modello di salagione/stagionatura

T. gondii può essere inattivato se si verificano determinate i) condizioni di salinità (concentrazione di NaCl nel prodotto) per un ii) determinato periodo di tempo (tempo di stagionatura) a determinate iii) temperature (temperatura di stagionatura). Tali condizioni si verificano nel processo di produzione di molti alimenti a base di carne di maiale e portano ad una diminuzione più o meno significativa del numero di bradizoiti presenti nel prodotto contaminato. Una ricerca bibliografica (sia la letteratura internazionale che degli standard di produzione dichiarati da diversi produttori), è stata condotta per stimare e, laddove possibile, modellizzare i valori dei 3 parametri succitati per ciascun prodotto oggetto della presente QRMA e che subiscono un processo di salagione/stagionatura. E' da sottolineare che molti di questi prodotti presentano ampie variazioni nel loro processo produttivo e, di conseguenza, anche una variabilità nei parametri d'interesse. La successiva tabella riporta i valori che sono stati adottati per stimare la variazione di carica parassitaria tramite un modello predittivo (i riferimenti bibliografici sono riportati in dettaglio in Appendice). Per i "Salumi generici" sono stati utilizzati i valori minimi e massimi rinvenuti in letteratura per i salami tramite una distribuzione uniforme.

Tabella 12 –Parametri stimati per ogni prodotto alimentare sottoposto a salatura/stagionatura

Prodotto	NaCl (%)	Temperature di stagionatura (°C)	Tempo di stagionatura (giorni)
Pancetta	Uniforme(2,5-3,5)	Uniforme(14-18)	Uniforme(30-60)
Capocollo	Uniforme(4,3-9)	Uniforme(14-16)	Uniforme(90-150)
Prosciutto crudo	Uniforme(4,5-8,3)	Uniforme(12-22)	Uniforme(210-360)
Prosciutto crudo, magro	Uniforme(4,5-8,3)	Uniforme(12-22)	Uniforme(210-360)
Speck	4,1	Uniforme(10-15)	Uniforme(140-224)
Salame generico	Uniforme(2,5-3,5)	Uniforme(14-16)	Uniforme(10-60)
Salame di bovino e suino, tipo Milano	3,9	Uniforme(12-14)	90-120
Salame napoletano	4,1	Uniforme(10-15)	120
Salame ungherese	4	Uniforme(12-14)	30
Salame, tipo Milano	3,9	Uniforme(12-14)	90-120
Soppressata	Uniforme(2,0-3,5)	Uniforme(10-14)	Uniforme(40-50)

2.6.4. Parametri per il modello di cottura

Come riportato nei precedenti paragrafi, *T. gondii* può essere eliminato mediante il processo di cottura. Nella presente QRMA, la temperatura raggiunta al cuore del prodotto è stato l'unico parametro considerato per stimare la riduzione del numero di parassiti; è stato assunto quindi che il tempo o la modalità di cottura (es. forno, in padella, bollito, ecc.) avessero un impatto trascurabile rispetto al raggiungimento di una data temperatura.

Non sono state ritrovate in letteratura, né da altre fonti, dati riguardanti le temperature di cottura di alimenti carnei praticate da consumatori italiani o europei. E' stata quindi utilizzata come fonte il *dataset* messo a disposizione da EcoSure (2007 U.S. Cold temperature Evaluation): si trattava di 275 misurazioni della temperatura di alimenti operate da consumatori americani al termine della cottura. Tutte le osservazioni erano relative esclusivamente a preparazioni di carne di specie suina e compiute posizionando la sonda a cuore del prodotto. Tali dati sono stati utilizzati per calcolare i relativi percentili e quindi creare una distribuzione cumulativa (vedi tabella).

Tabella 13 – Distribuzione delle temperature di cottura utilizzate nel modello

Parametro	Valori/Distribuzione	Fonte
Temperatura di cottura a livello domestico(C°)	Cumulativa(27,8;100,6;{32,6\43,3\49\60\65,6\70\71,1\73,9\76,7\80\82,2\87,8\96,1};{0,01\0,05\0,1\0,2\0,3\0,4\0,5\0,6\0,7\0,8\0,9\0,95\0,99})	Ecosure (2008)

2.7. Stima del numero di porzioni contaminate

Come riportato nel capitolo I, la sieropositività è ritenuta un buon indicatore della presenza di parassiti vitali (Dubey & Jones, 2008). Come altre valutazioni del rischio precedentemente pubblicate (Guo et al, 2015a; Opsteegh et al., 2011, Mie et al., 2008), la presenza di anticorpi contro il parassita è stata correlata alla contaminazione del tessuto muscolare dell'animale; è stato quindi assunto che ogni suino sieropositivo per *T. gondii* sia portatore di cisti tissutali e che quindi il numero di porzioni contaminate rifletta il tasso d'infezione riscontrato nei suini a livello aziendale e nel cinghiale cacciato. La provenienza delle carni da cui è deriva il prodotto può quindi rappresentare un fattore importante perché la sieroprevalenza di *T. gondii* varia in base alla nazione in cui sono allevati gli animali.

2.7.1. Provenienza delle carni

Per risalire alla provenienza delle carni di maiale consumate dalla popolazione italiana sono stati utilizzati Dati ISMEA riportati nella Figura 14 e dai quali si ricava che

- Il numero di suini vivi importati da altre nazioni è limitato (2%); è stato quindi assunto che tutti gli animali macellati in Italia siano non provengano dall'estero;
- L'83% delle carni utilizzare per la produzione di preparazioni di carne destinate al mercato italico sono di provenienza italiana mentre il restante 18% è di provenienza estera;

- Il 51% di carni destinate alla produzione di prodotti a base di carne sono di origine italiana mentre il restante 49% proviene da stati esteri;
- Il numero di prodotti a base di carne prodotti all'estero e consumati in Italia è esiguo (53.000 ton. equivalente carcassa su un totale di 1946.000) e si assume quindi che i “prodotti a base di carne” consumati in Italia siano stati prodotti nel nostro paese (anche se con carni fresche provenienti da altri Paesi).

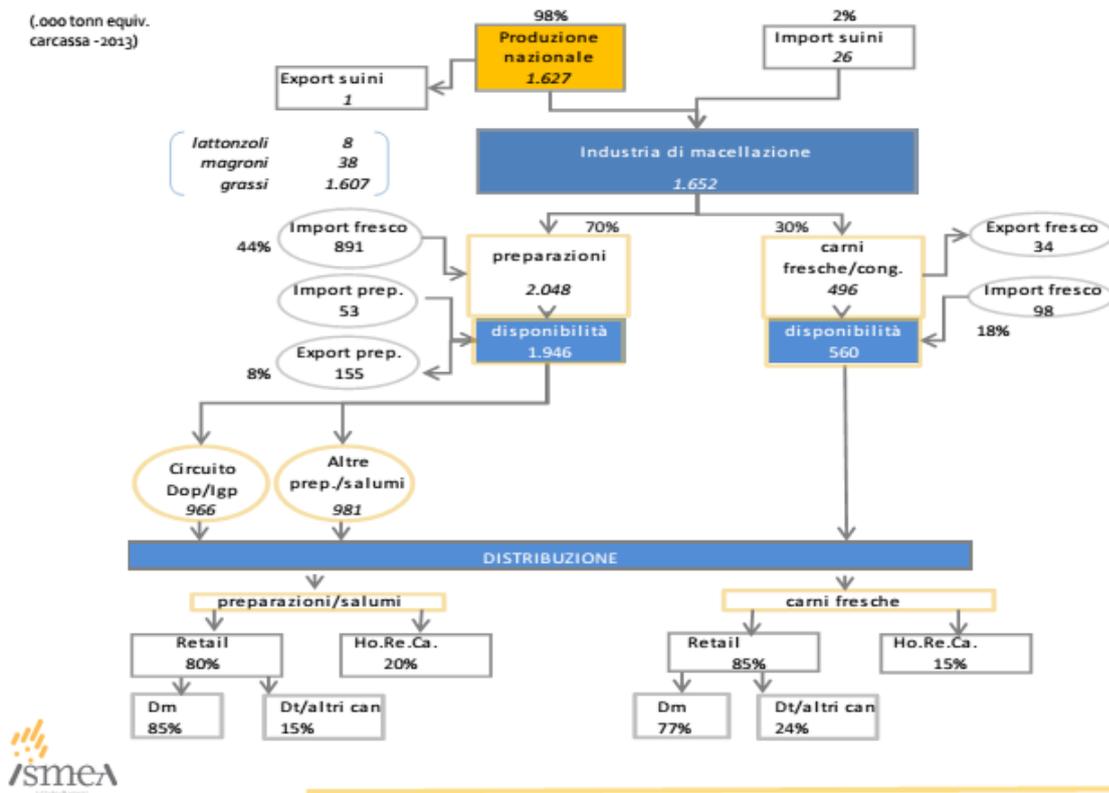


Figura 24 – Rappresentazione schematica della provenienza delle carni di maiale consumate dalla popolazione italiana (tratto ISMEA – AcNielsen, 2006)

Per le carni di cinghiale, a causa della mancanza di dati, è stato assunto che tutte le carni derivino dalla cacciagione locale. La tabella successiva riepiloga i dati essenziali utilizzati per le due classi di prodotti valutate nella presente valutazione del rischio.

Tabella 15 – Provenienza delle carni di suidi consumate in Italia ripartite per classi

Tipologia carni	Quantità di carni commercializzate in Italia all'anno (.000 tonn equiv. Carcassa)	Provenienza delle carni			
		Italia	Italia (%)	Estero	Estero (%)
Carni fresche/congelate	560	462	82,5	98	17,5
Preparazioni/salumi	1946	1002	51,5	944	48,5
Carne di cinghiale	-	-	100	-	0

Elaborazione su dati ISMEA -I FLUSSI DI SETTORE da ALLEVAMENTO SUINI Scheda di settore 2013 URL: <http://www.ismeaservizi.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/3516Last> access: 14/07/2015

Riguardo i Paesi di provenienza delle carni importate dall'estero, le principali nazioni sono comunitarie e il volume dei loro flussi commerciali tende a rimanere costante durante gli anni (vedi tabella 16).

Tabella 16 – Maggiori paesi importatori di carni di maiale in Italia per anno

Origine delle carni*	2012		2011		2010	
	n	%	n	%	n	%
Germania	191,0	31,6	216,4	33,6	194,1	30,8
Olanda	94,2	15,6	101	15,7	110,4	17,5
Spagna	82,1	13,6	70,3	10,9	72,5	11,5
Francia	75,4	12,5	85,4	13,3	93,8	14,9
Danimarca	65,4	10,8	75,2	11,7	69,6	11,1
Altre nazioni	97,1	16,0	95,6	14,8	89,3	14,2
Totale carni importate fresche/congelate in Italia	605,2	100,0	643,9	100,0	629,7	100,0

* in 1000 di ton./anno
Elaborazione su dati riportati da The pig site – Italy Country Report 2013- <http://www.thepigsite.com/reports> Fonte dati: ISTAT, GTIS

Sulla base di tutti i dati precedentemente riportati, è stata quindi stimata la probabilità che la carne utilizzata di una porzione di una preparazione o prodotto a base di carne di suino consumata in Italia provenga da tali nazioni.

Tabella 17 – Nazione di provenienza delle carni utilizzate per il prodotto alimentare

Origine delle carni (nazione)	Probabilità per le preparazioni a base di carne	Probabilità per i prodotti a base di carne
Italia	0,83	0,51
Germania	0,05	0,16
Olanda	0,03	0,08
Spagna	0,02	0,07
Francia	0,02	0,06
Danimarca	0,02	0,05
Altre nazioni	0,03	0,08

Una ricerca bibliografica al fine di determinare i tassi di sieroprevalenza di *T. gondii* a livello aziendale è stata successivamente condotta per ogni nazione riportata nella precedente tabella. E' stato quindi calcolato un tasso di sieroprevalenza medio derivante da uno o più studi tra quelli considerati più rappresentativi sulla base di: i) data di pubblicazione del lavoro (sono stati scelte le indagini più recenti); ii) presenza di dati riguardanti l'allevamento intensivo/convenzionale di suini. Sono stati esclusi quindi lavori riguardanti allevamenti estensivi e/o biologici perché ritenuti di minore importanza rispetto al volume di carni consumate in Italia. Tuttavia, poiché è risaputo che i valori di prevalenza in tali allevamenti sono significativamente più elevati rispetto all'allevamento intensivo/tradizionale, successivi scenari potrebbero considerare l'utilizzo di tali dati per stimare il rischio di alimenti che utilizzano carni da questa tipologia di allevamenti, quali i prodotti biologici e tradizionali. Per le carni provenienti da nazioni diverse da quelle elencate in tabella, è stata utilizzata una distribuzione uniforme che variava dal valore più alto a quello più basso. Il dato sulla sieroprevalenza di *T. gondii* nel cinghiale (14%), è stato ricavato da un recente studio condotto in Italia (Ranucci et al., 2013).

Tabella 18 - Sieroprevalenza di *T. gondii* stimata in Italia e nei maggiori paesi importatori

Origine delle carni	Proporzione di animali infetti	Riferimento
Italia	0,158	Villari et al. (2009); Veronesi et al. (2011); Scala et al. (2008)
Germania	0,078	De Buhr et al (2008); Meemken et al. (2014)
Olanda	0,0038	Van der Giessen et al. (2007)
Spagna	0,168	Garcia-Bocanegra et al. (2010)
Francia	0,028	Blaga et al. (2015)
Danimarca	0,031	Lind et al (1994)
Altre Nazioni	Uniforme(0,0038; 0,168)	-

2.7.2. Numero di porzioni

L'esposizione al parassita attraverso gli alimenti considerati può essere stimato sulla base del numero di porzioni consumate annualmente in Italia. La *Italian National Food Consumption Survey INRAN-SCAI (2005–06)* ha rilevato il numero delle occasioni di consumo per ogni prodotto durante un periodo di tre giorni in una popolazione di 2313 adulti.

La tabella successiva riporta il numero delle occasioni di consumo riportate dai partecipanti all'indagine (2313 individui adulti) ai quali veniva chiesto di indicare quali alimenti avessero consumato durante i tre giorni precedenti (metodi dettagliati dell'indagine sono disponibili presso il sito Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'analisi dell'Economia Agraria: http://nut.entecra.it/710/I_consumi_alimentari__INRAN-SCAI_2005-06.html)

Tabella 19 - Numero di occasioni di consumo (aggregate per tipologia di alimento) riportate dall'indagine "Italian National Food Consumption Survey INRAN-SCAI 2005–06" per gli individui adulti

Categoria	Numero occasioni di consumo durante l'indagine	Numero di porzioni
Carne fresca di maiale/cinghiale	662	1,67E+09
Salsicce fresche	323	8,16E+08
Carni salate	1011	2,56E+09
Salame	346	8,74E+08

Come nello studio di Opsteegh et al. (2011), è stato moltiplicato il numero delle occasioni di consumo per 365/3 in maniera da stimare il numero di porzioni per ogni alimento consumato annualmente dai partecipanti all'indagine. Tali stime sono state poi rapportate al numero di individui adulti presenti in Italia e al numero di donne in gestazione per stimare il numero di porzioni consumate complessivamente per ogni prodotto da tali popolazioni (vedi paragrafo successivo).

2.7.3. Numero di porzioni derivanti da con ingredienti congelati

Alcuni prodotti alimentari possono derivare da carni di maiale che hanno già subito un processo di congelamento. Questo avviene principalmente per alcune tipologie di prodotti alimentari quali i salumi. Non sono state reperite informazioni riguardanti la percentuale di carni suine congelate e poi scongelate per essere utilizzate come ingrediente dai produttori italiani, mentre si stima che il 7,4% delle carni importate in Italia siano congelate (CUNsuini - Elaborazione dati ISMEA su dati ISTAT, 2014). Poiché tali carni sono state presumibilmente state conservate in impianti industriali a temperature molto basse e per lunghi periodi, nella simulazione è stato assunto che tale percentuale di porzioni derivanti da carne estera ed utilizzate per la produzione di prodotti di carne siano esenti dalla presenza di bradizoiti vitali.

2.8. Stima della popolazione sensibile

Per quanto concerne la stima delle nuove infezioni causate da *T. gondii* ogni anno in Italia sono state considerate:

- La popolazione adulta
- Le donne in stato di gravidanza

Riguardo la popolazione adulta, il numero degli individui residenti in Italia è stato tratto dagli ultimi dati ISTAT disponibili (età superiore ai 18 anni, 48×10^6 individui– Fonte ISTAT,

2015). Il numero di donne in stato di gravidanza ogni anno è stato stimato sulla base del numero di nuovi nati nel 2014 (ISTAT, 2015) corretto per il numero di mesi di durata di una gestazione (numero stimato: $3,8 \times 10^5$).

Poiché solo gli individui sieronegativi sono sensibili all'infezione da *T. gondii*, il numero di nuovi casi di toxoplasmosi sono stati calcolati moltiplicando il numero di casi stimati annualmente con la proporzione di individui immuni ad una nuova infezione del parassita (per entrambe le popolazioni). Per la popolazione adulta, è stato stimato che il 25,9% dei consumatori abbia anticorpi contro *T. gondii* (Mosti et al., 2013). La percentuale media di prevalenza nelle donne in età riproduttiva (25,2%) è stata calcolata considerando diverse *surveys* condotte negli ultimi 15 anni in diverse zone d'Italia (Ricci et al, 2003; Beccara et al., 2005; De Pascale et al. 2006; Masini et. al, 2008; Mosti et al., 2013).

Sebbene sia noto che in Italia le donne in stato di gravidanza evitino il consumo di alcuni alimenti non cotti su indicazioni del medico (es. prosciutto crudo), non sono state reperite informazioni dettagliate per stimare la ridotta assunzione di alcuni prodotti alimentari, quindi, si è assunta una dieta identica alla popolazione generale. Allo stesso modo, non è stato simulato un diverso comportamento per quanto riguarda la cottura delle preparazioni alimentari che potrebbe derivare da una maggiore attenzione delle consumatrici in stato di gravidanza.

2.9. Relazione dose-risposta

Il numero dei bradizoiti stimati in ogni porzione contaminata è stato utilizzato per stimare la probabilità di infezione a seguito del consumo (Opsteegh et al., 2011) mediante il modello dose-risposta riportato precedentemente (Equazione 2 - paragrafo 2.6) (Haas et al., 1983). A causa di evidenti problemi etici, nessuna relazione tra la dose di bradizoiti ingeriti e probabilità di contrarre la toxoplasmosi è stata sviluppata utilizzando dati provenienti da

esperimenti eseguiti sull'uomo (al contrario di quanto fatto per altri patogeni alimentari). Il parametro "r" dell'equazione è stato valorizzato sulla base della modello dose-risposta validato e recentemente pubblicato da Guo et al. (2015b). Il modello esponenziale proposto da tale studio è basato su esperimenti eseguiti sul topo impiegando ceppi di *T. gondii* tipo II ed è stato dimostrato essere più accurato di quello precedentemente adottato da Opsteegh et al. (2011). Il parametro "r" stimato per la specie murina ($r = 0,0015$) è stato adattato alla specie umana moltiplicando per un "Fattore di Scala" dedotto da un modello predittivo derivante da dati epidemiologici ($FS=0,005$) (Guo et al., 2015b).

2.10. Output della valutazione del rischio

Gli *output* della valutazione del rischio calcolati sono stati:

- Rischio per porzione contaminata: rappresenta il rischio di contrarre un'infezione da *T. gondii* consumando una porzione derivante dalle carni di un animale sierologicamente positivo.
- Numero di nuovi casi di toxoplasmosi: rappresenta il numero di casi attesi nelle due popolazioni oggetto dello studio. E' stato calcolato moltiplicando il rischio medio per ogni porzione di alimento e il numero di porzioni consumate dagli individui sensibili di ogni popolazione.

Le stime sono state riportate per ognuno dei prodotti alimentari oggetto dello studio mentre in fase di discussione gli alimenti sono stati trattati per categoria commerciale (vedi tabella 20).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando i software Microsoft ®Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA, v. 2010) e SPSS (IBM, Armonk, NY, USA, v. 21). Il modello è stato sviluppato utilizzando un foglio di calcolo Microsoft ®Excel e tutte le

simulazioni sono state implementate mediante Risk software (Palisade Corporation, Ithaca, NY, USA, v. 6.2), con campionamento basato su *Latin Hypercube* e utilizzando 100.000 ripetizioni. I dati disponibili non hanno permesso di separare la variabilità dall'incertezza.

Risultati

La tabella 20 riporta i risultati generati dal modello riguardo la probabilità media di infezione per porzione e il numero annuale di casi attesi nelle due popolazioni per ogni prodotto alimentare. La maggior parte delle porzioni di alimenti considerati potenzialmente in grado di veicolare *T. gondii* erano preparazioni di carni fresche da consumarsi cotte (44,4%) e carni salate stagionate (41,1%) mentre un numero minore di porzioni erano rappresentate dai salumi (13,5%).

Tabella 20 – Rischio per porzione contaminata, numero annuale di nuovi casi di toxoplasmosi nella popolazione adulta e di donne in gestazione

Prodotto alimentare		Rischio per porzione contaminata	Numero delle infezioni per anno nella popolazione adulta	Numero delle infezioni per anno (donne gravide)
Preparazioni di carne fresca	Carne di maiale (taglio generico)	2,79E-03	307360	1791
	Carne di maiale, bistecca	2,33E-03	124156	724
	Carne di maiale, coscio	2,72E-03	33410	195
	Carne di cinghiale fresca	2,75E-03	3618	21
	Salsiccia di suino, fresca	2,35E-03	203305	1185
Carni salate	Pancetta	2,25E-10	0	0
	Capocollo	0	0	0
	Prosciutto crudo	0	0	0
	Prosciutto crudo, magro	0	0	0
	Speck	0	0	0
Salami	Salame generico	2,67E-04	969	6
	Salame di bovino e suino, tipo Milano	0	0	0
	Salame, tipo Napoli	0	0	0
	Salame ungherese	1,05E-09	0	0
	Salame, tipo Milano	0	0	0
	Salame, tipo Soppressata	4,41E-08	0	0
TOTALE			672818	3922

Il prodotti a maggior rischio per l'infezione da *T. gondii* sono risultati quelli appartenenti alla categoria alimentare delle preparazioni di carne fresca destinate alla cottura; la loro probabilità di causare infezione dopo l'ingestione è molto simile ed risulta essere compresa tra $2,3 \times 10^{-3}$ e $2,7 \times 10^{-3}$ ovvero uno caso è atteso ogni 370-435 porzioni potenzialmente contaminate. La metà delle porzioni di preparazioni di carne, dopo l'eventuale cottura e congelamento e a prescindere dalla tipologia, conteneva una quantità media di bradizoiti superiore a 125 (2,1 Log/porzione) (Figura 15).

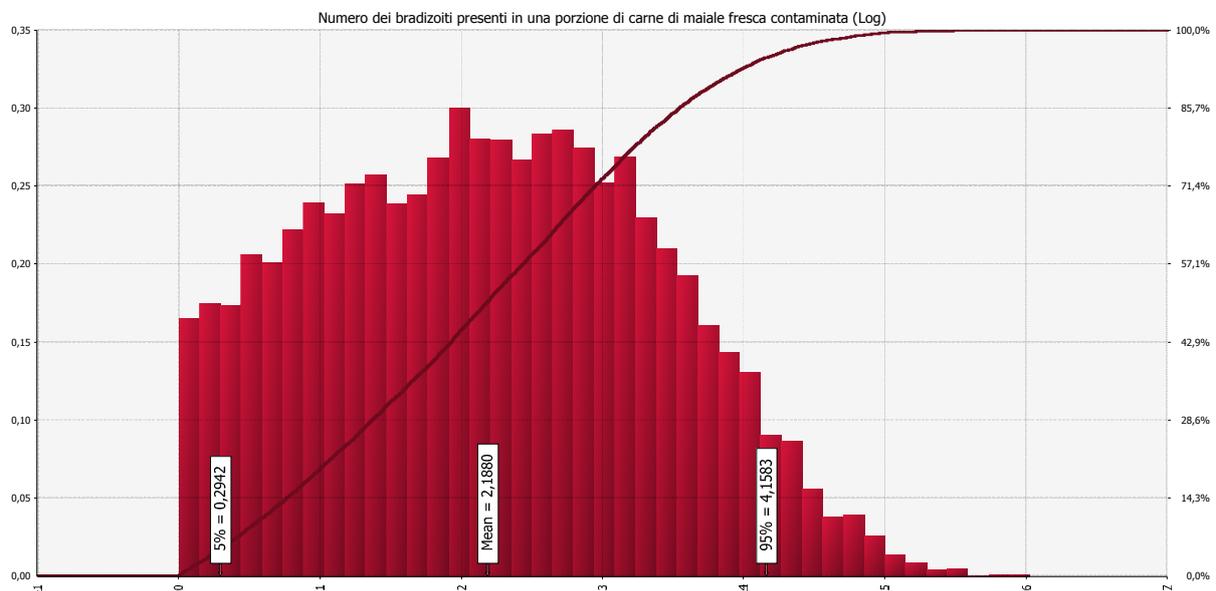


Figura 15 - Stima del numero di bradizoiti in una porzione di carne fresca di maiale (Log/porzione)

Il numero di adulti che contraggono annualmente la toxoplasmosi a causa del consumo di carne di maiale è stato stimato essere $6,7 \times 10^5$ mentre $4,0 \times 10^3$ casi sono attesi per quanto riguarda le donne in gestazione. Le carni fresche, secondo la simulazione, si rendono responsabili della quasi totalità dei casi di toxoplasmosi (99,8%). Al contrario, il rischio è risultato trascurabile per le carni salate come anche per la maggior parte dei salumi. Fanno

eccezione i salami appartenenti alla categoria generica, che comprende i prodotti a breve stagionatura, la quale si rende di una piccola frazione di casi (0,2%).

Discussione

Lo scopo della valutazione del rischio era quello di stimare la rilevanza dei diversi prodotti alimentari a base di carne di maiale consumati dalla popolazione italiana e i fattori di rischio associati in relazione alla probabilità di contrarre un'infezione da *T. gondii*. Un simile studio è stato pubblicato da Autori olandesi utilizzando dati provenienti da fonti differenti; in particolare le due valutazioni differiscono notevolmente per quanto riguarda la tipologia e le caratteristiche degli alimenti considerati, la prevalenza del parassita negli animali, la relazione tra dose di bradizoti ingeriti e probabilità di infezione dell'uomo. Inoltre, nel presente studio è stata simulata la possibilità che i diversi tipi di alimenti vengano congelati prima del consumo e che le carni consumate provengano da diversi Paesi (influenzando quindi la probabilità di contaminazione della porzione ingerita).

I sistemi di sorveglianza europei hanno riportato un tasso di incidenza della toxoplasmosi congenita umana in Europa compreso tra 0,3 e 10,5 casi ogni 100,000 abitanti e circa il 22% delle infezioni viene attribuito al consumo di consumo di carne (ECDC, 2014; FAO/WHO, 2014); sulla base di tali stime, il numero di casi attesi calcolati dal modello risulta essere probabilmente sovrastimato. La stessa discrepanza è stata osservata da Opsteegh et al. (2011) nella loro QRA, ma in misura decisamente maggiore. Molte delle cause di tale sovrastima sono state descritte dagli autori olandesi, ovvero i modelli sviluppati dai due studi risentono di diversi fattori d'incertezza legati alla durevole mancanza di alcuni dati in letteratura scientifica (discussi successivamente).

I risultati dello studio indicano che le preparazioni di carni fresche sono i prodotti alimentari a maggior rischio e responsabili del maggior numero di casi nella popolazione italiana. Questi prodotti si differenziano dalle carni salate e dai salumi per il fatto che non subiscono trattamenti in grado di ridurre la concentrazione di *T. gondii* diversi dalla cottura ed eventualmente dal congelamento. Proprio il processo di cottura, il quale se adeguatamente

eseguito è in grado di garantire l'inattivazione di tutti i parassiti presenti, sembra essere quindi un fattore di rischio cruciale. In base alla distribuzione adottata per il presente studio per simulare la cottura, in una significativa percentuale di casi non si verificano le condizioni sufficienti a garantire eliminazione del parassita. Dubey et al. (1990) hanno riportato che *T. gondii* non è in grado di sopravvivere quando sottoposto a temperature superiori a 61 °C, una temperatura risultata inferiore a cuore del prodotto nel 21% dei casi nella nostra simulazione. Tuttavia, poiché nessuna informazione è tuttora disponibile a livello europeo, i dati citati sono stati tratti da una indagine condotta negli Stati Uniti, dove le modalità di preparazione degli alimenti a livello domestico potrebbero differire in maniera significativa rispetto a quelle adottate dai consumatori italiani. In Italia, infatti, le carni suine fresche sono abitualmente consumate previa completa cottura. Nonostante ciò, non è da escludere che in alcuni casi non venga raggiunta una adeguata temperatura al cuore del prodotto durante la preparazione dei cibi. Ciò può essere dovuto all'impiego di alcuni sistemi/modalità di cottura che non garantiscono una diffusione del calore omogenea in tutto l'alimento, come ad esempio l'impiego del forno a microonde (Shafiur Rahman, 2007). Da sottolineare inoltre come alcuni alimenti quali le salsicce fresche, sebbene siano generalmente cotte prima del consumo, possano essere ingerite crude da una piccola fascia della popolazione italiana sulla base di abitudini locali e per tale ragione si sono già rese responsabili di casi accertati di toxoplasmosi (Vitale et al., 2014). Al contrario di quelle applicate da Opsteegh et al. (2011), le temperature di cottura su cui si è basato il modello si riferivano specificatamente a prodotti a base di carne della specie suina. Tuttavia i dati (tratti da Ecosure, 2008) erano relativi a prodotti generici, cioè non è stato possibile differenziare tali temperature in base ai diversi alimenti oggetto dallo studio. L'assunzione che le modalità di cottura siano le medesime per tutte le preparazioni di carne potrebbe influenzare la stima di rischio di alcuni prodotti che hanno una maggiore probabilità di essere consumati meno cotti (es. le carni con osso come le bistecche)

mentre altri alimenti sono presumibilmente soggetti ad una maggiore temperatura durante la preparazione (es. alimenti a base di carne macinata come le salsicce).

Il congelamento degli alimenti prima del consumo ha un significativo impatto sulla concentrazione dei bradizoiti e quindi sul rischio, in particolare delle carni fresche che sono più frequentemente soggette a questa pratica (il 25% delle volte). Sulla base delle condizioni definite dal modello, il rischio associato a porzioni di carne congelata è circa 200 volte inferiore rispetto a quello di porzioni la cui carne non ha subito tale trattamento (dati non riportati). In ogni caso, la durata del congelamento ha rappresentato un fattore d'incertezza importante (Kotula et al., 1991, Dubey et al., 1988) poiché non sono state rinvenute informazioni riguardo la durata media di tale trattamento in Italia o in altri Paesi, ma sono stati ipotizzati dei valori ritenuti possibili. Lo stesso approccio è stato applicato per la presunta temperatura di conservazione a causa della mancanza di dati riguardo la potenza dei congelatori domestici adoperati in Italia. Sebbene la presente valutazione integri i dati di Migliorati et al. (2015) che stimano la probabilità dei singoli prodotti alimentari di essere sottoposti al congelamento a livello domestico, non è stato possibile reperire le medesime informazioni riguardo gli alimenti preparati presso esercizi di ristorazione pubblica (es. ristoranti, mense) che potrebbero quindi avere un diverso grado di rischio per il consumatore.

I risultati della valutazione indicano che il rischio di toxoplasmosi umana associato alle carni lavorate (carni salate e salumi) consumate in Italia è trascurabile contrariamente a quanto riportato per l'Olanda dove il 40% dei casi è stato stimato essere causato da prodotti a base di carne non sottoposti a cottura prima del consumo (Opsteegh et al., 2011). Tale differenza probabilmente riflette la differente tipologia di prodotti alimentari consumati nei due Paesi. In particolare, la durata della stagionatura sembra essere un fattore significativo. I prodotti a base di carne consumati dagli olandesi subiscono processi di stagionatura generalmente più brevi

rispetto a quelli censiti in Italia (Opsteegh et al., 2011) e quindi, almeno sulla base del modello predittivo applicato, il trattamento non è in grado di garantire una altrettanto efficace riduzione della concentrazione del parassita. Questo sembra confermato dal fatto che, tra le tipologie di salumi considerati nel nostro studio, solamente quelli che contemplano una stagionatura più breve si sono rivelati potenzialmente in grado di provocare casi di toxoplasmosi umana. La sopravvivenza dei bradizoiti in questa tipologia di prodotti fermentati è in linea con quanto riportato da Abdulmawjood et al. (2014) che hanno rilevato la presenza di *T. gondii* vitale in salumi stagionati fino a 10 giorni (anche se con un basso tasso di isolamento). Al contrario, Warnekulasuriya et al. (1998) non hanno rilevato il parassita in alcuna salsiccia fermentata prelevata in fase di commercializzazione sebbene non siano state fornite informazioni riguardo la tipologia di suddetti prodotti.

Per quanto riguarda le carni salate (prosciutto, capocollo, speck), i risultati della presente QMRA escludono la possibilità di un rischio concreto per il consumatore. Alle condizioni di salinità, tempo e temperatura di stagionatura stimate per tali prodotti, il modello di regressione applicato prevedeva la totale inattivazione dei bradizoiti presenti. Lo stesso risultato è stato riportato, ma a seguito di indagini sperimentali, da Bayarri et al. (2010) che non hanno rilevato *T. gondii* vitale in prosciutto crudo al termine della stagionatura. Al contrario, Warnekulasuriya et al. (1998) e Gomez-Samblas (2015) hanno isolato il parassita vitale sempre in campioni di prosciutto crudo prelevati in fase di vendita al dettaglio. Il gruppo di ricercatori spagnoli, in particolare, ha riscontrato un significativo tasso di isolamento del protozoo (4,8%) e concentrazioni parassitarie rilevanti ($2,3 \times 10^5$) in una tipologia di prosciutto (“Hamon Serrano”) che deve essere stagionato per un periodo minimo di 9 mesi secondo la normativa spagnola. Nello studio viene ipotizzato che tali contaminazioni, rilevate solo in prosciutti commercializzati da pochi produttori, derivino dal fatto che non siano stati rispettati i tempi di stagionatura previsti dalla legge e che *T. gondii*

possa quindi sopravvivere per alcuni mesi in questa tipologia di prodotti. Ulteriori indagini dovrebbero essere condotte, anche in Italia, in considerazione del consistente consumo di carni salate registrato nel nostro Paese.

La presente valutazione del rischio contempla diversi fattori non trattati dallo studio simile condotto da Opsteegh et al. (2011) quali una diversa probabilità di contaminazione degli alimenti in base all'origine delle carni e la probabilità che questi siano congelati prima del consumo sulla base di dati certi (Migliorati et al., 2015). Tuttavia, a causa di diversi “gaps” nella letteratura scientifica, permangono numerose incertezze come sottolineato da studi simili (Opsteegh et al., 2011; Guo et al., 2015a).

Siccome la positività sierologica del suino viene considerata un buon indicatore della presenza di cisti tissutali di *T. gondii* nell'animale, è stato assunto che la sieroprevalenza stimata nei diversi Paesi produttori rifletta la probabilità di ingerire una porzione contaminata. Tuttavia, la relazione tra la presenza di anticorpi e la presenza di bradizoiti vitali nel tessuto muscolare non è stata ancora completamente chiarita. La ricerca bibliografica riportata nel capitolo I mostra una rilevante associazione tra sieropositività e isolamento del parassita nella specie suina ma non tutti in tutti i soggetti vengono rilevate cisti tissutali infettanti. Inoltre, poche informazioni si hanno sulla effettiva distribuzione del parassita nelle diverse parti della carcassa utilizzate per la produzione di prodotti carnei, come già segnalato nelle QRA finora pubblicate (Mie et al., 2008, Opsteegh et al., 2011).

Sulla base delle considerazioni precedenti, l'utilizzo di valori di sieroprevalenza degli animali senza adottare fattori di correzione potrebbe aver portato ad una sovrastima della probabilità di ingerire una porzione contaminata. Tale *bias* potrebbe aver pesato in maniera ancora più incisiva considerando che la maggior parte delle porzioni deriva da carni di provenienza italiana e che la prevalenza del parassita riscontrata nel nostro Paese è risultata decisamente più alta rispetto ad altre nazioni come Olanda, Francia e Danimarca (15,8% rispetto a 0,3%,

2,8 e 3,1%, rispettivamente). E' da sottolineare comunque che, sebbene l'utilizzo della sieroprevalenza come "*proxy*" presenti delle limitazioni, la riduzione del numero dei capi infetti negli allevamenti italiani determinerebbe comunque un'apprezzabile diminuzione dell'esposizione al parassita. Inoltre, i valori di prevalenza stimati nel presente lavoro non includono indagini condotte su animali allevati all'aperto dove viene osservato un incremento del numero dei capi sieropositivi rispetto agli allevamenti intensivi (vedi Capitolo I): il consumo di preparazioni alimentari tradizionali o biologiche, spesso prodotti con carni di animali provenienti da allevamenti di questo tipo, potrebbe implicare un maggior livello di rischio.

In mancanza di dati migliori, il presente studio si basa sull'assunzione che la concentrazione di bradizoiti rilevata a livello cardiaco (da Opsteegh et al., 2011) sia simile a quella presente in altri distretti muscolari anche se il cuore sembra essere invece una sede preferenziale per la formazione delle cisti tissutali (Esteban-Redondo e Innes, 1998): questo rappresenta un importante fattore d'incertezza che potrebbe portare ad una sovrastima della contaminazione dei diversi prodotti. Gli studi che hanno indagato riguardo la concentrazione di bradizoiti vitali nel tessuto muscolare di animali da reddito sono ancora pochi (Opsteegh et al., 2010; Jurankova et al., 2013); solo negli ultimi anni sono state sviluppate tecniche di biologia molecolare in grado di quantificare la presenza del protozoo in maniera accurata (Opsteegh et al. 2010; Jurankova et al., 2014) ed in ogni caso devono essere ancora abbinate a laboriose e costose prove biologiche per dimostrare la vitalità del parassita.

Nella simulazione sono stati impiegati dei modelli predittivi che stimano la capacità di sopravvivenza dei bradizoiti nelle carni mettendo in relazione la probabilità d'infezione del topo con i parametri di trattamento (congelamento, cottura, salatura) a cui sono stati sottoposti i tessuti biologici utilizzati per l'inoculo; essendo basati su osservazioni indirette potrebbero quindi mancare di accuratezza e non essere affidabili in talune condizioni che si verificano nei

prodotti alimentari. In particolare, il modello di regressione utilizzato per stimare la riduzione del numero di parassiti vitali in carni sottoposte a salatura/stagionatura si basa su un esperimento condotto con un limitato numero di osservazioni e inoculando tessuti trattati per non più di 56 giorni (Dubey et al., 1990): il numero di parassiti stimato per i prodotti a lunga stagionatura, che sono frequentemente consumati in Italia, potrebbe risentire di tali fattori d'incertezza. Nessuno dei tre modelli predittivi inoltre considera la possibile esistenza di ceppi maggiormente resistenti in condizioni ambientali sfavorevoli.

La relazione tra dose di bradizoiti ingerita e probabilità di sviluppare la malattia è stata tratta da un recente studio basato su prove di inoculo sul topo (Guo et al., 2015b). Al contrario di quello proposto da Opsteegh et al. (2011), il modello esponenziale utilizzato nel nostro lavoro è stato validato per la specie umana ed introduce un fattore di scala in grado di compensare la minore suscettibilità dell'uomo a *T. gondii* rispetto al topo. Tali caratteristiche lo rendono decisamente più accurato ed ha infatti contribuito a ridurre in maniera significativa la notevole sovrastima di casi osservata invece dai ricercatori olandesi. Tuttavia, come riportato dagli stessi Autori che lo hanno realizzato, presenta anche dei limiti che possono aver influenzato i risultati della valutazione. In particolare, gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando soltanto un ceppo di *T. gondii*, quindi non viene considerata la differente virulenza che hanno i diversi ceppi del parassita. Inoltre, non è stata considerata la maggiore suscettibilità che alcune fasce della popolazione possiedono nei confronti di tale agente zoonosico (es. donne in gravidanza o individui immunodepressi).

Durante la raccolta dei dati necessari allo sviluppo del modello sono state rilevate diverse carenze informative che riguardano specificatamente le abitudini alimentari dei consumatori italiani. La mancanza d'informazioni per alcune variabili è già stata sottolineata precedentemente, ad esempio non sono note le temperature di cottura a cui sono sottoposti i diversi prodotti alimentari preparati dai consumatori italiani, alcune informazioni riguardo il

congelamento dei prodotti a livello domestico e negli esercizi commerciali, ecc. Le future indagini sui consumi potrebbero raccogliere informazioni riguardo la natura dei prodotti con un maggior grado di dettaglio in modo da risalire più agevolmente a caratteristiche importanti del prodotto (ad esempio il grado di stagionatura per i salumi). I dati gentilmente messi a disposizione per questo studio si riferiscono alle occasioni di consumo riportate da un campione di individui adulti scelti casualmente tra la popolazione italiana. Studi specifici sulle abitudini alimentari di persone appartenenti a fasce della popolazione particolarmente a rischio, come le donne in gestazione, sarebbero utili per comprendere l'effettiva esposizione al parassita da parte di individui che notoriamente hanno consumi alimentari differenti dal resto della popolazione.

In conclusione, la presente valutazione del rischio, pur presentando dei fattori d'incertezza, ha rivelato che, tra i prodotti alimentari a base di carne di suino consumati in Italia, le preparazioni di carne fresche sono responsabili del maggiore numero di casi di toxoplasmosi umana mentre le carni lavorate sembrano avere un ruolo nettamente marginale. I trattamenti di congelamento e salatura/stagionatura rappresentano, sulla base della tipologia di prodotti consumati e delle abitudini alimentari delineati, un fattore di protezione rilevante mentre la fase di cottura delle carni è risultata avere un ruolo chiave nel limitare l'esposizione del parassita al consumatore. Molteplici linee d'indagine sono state suggerite al fine di stimolare proficuamente la ricerca scientifica e migliorare la conoscenza sulle modalità di trasmissione all'uomo di *T. gondii*.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano per avermi supportato per il mio Dottorato di Ricerca e per aver contribuito alla presente tesi:

- La Dott.ssa Stefania Sette e Dott.ssa Aida Turrini del Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria – Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione
- Dott. Luigi Iannetti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Abruzzo e Molise “G. Caporale”
- Dott.ssa Francesca Iaconi dell'Osservatorio Epidemiologico Veterinario dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e Toscana “M. Aleandri”
- Dott. Ziad Mezher del Centro Studi per la Sicurezza Alimentare dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e Toscana “M. Aleandri”

Ed in particolare il Ch.mo Prof. Giuseppe Cringoli, Ch.ma Laura Prof.ssa Rinaldi, il Prof. Enzo Musella, il Dr. Antonio Bosco e tutto lo staff di Parassitologia del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali dell'Università degli Studi di Napoli Federico II.

APPENDICE

Tabella 29 - Riferimenti bibliografici da cui sono stati tratti i valori di concentrazione di NaCl (5), temperatura (°C) e periodo di stagionatura (giorni) nel modello

Prodotto	Fonti	Temperature di stagionatura	Periodo di stagionatura
Salsiccia di suino, secca	Toldrà (2014); Zanardi et al. (2010)	Toldrà (2014); Ars Alimentaria (2015)*	Toldrà (2014);
Capocollo	La Pietra et al, (1998)	Ars Alimentaria (2015)	Ars Alimentaria (2015)**
Salame generico	Toldrà (2014), Zanardi et al. (2010)	Toldrà (2014); Ars Alimentaria (2015)	Ars Alimentaria (2015)***
Prosciutto crudo	Benedini et al. (2012), Laureati et al. (2014), Disciplinare di produzione del prosciutto Toscano	Shahidi et al. (2004)	Shahidi et al. (2004)
Prosciutto crudo, magro	Benedini et al. (2012), Laureati et al. (2014), Disciplinare di produzione del prosciutto Toscano	Shahidi et al. (2004)	Shahidi et al. (2004)
Salame di bovino e suino, tipo Milano	Ars Alimentaria (2015), Novelli et al. (1998); INRAN (2009)	Ars Alimentaria (2015)	Ars Alimentaria (2015)
Salame, tipo Napoli	Ars Alimentaria (2015), INRAN (2009)	Ars Alimentaria (2015)	Ars Alimentaria (2015)
Salame ungherese	Ars Alimentaria (2015); INRAN (2009)	Ars Alimentaria (2015)	Ars Alimentaria (2015)
Salame, tipo Milano	Ars Alimentaria (2015), INRAN (2009) Novelli et al. (1998), Casiraghi et al. (1996);	Ars Alimentaria (2015)	Ars Alimentaria (2015)
Soppressata	Albenzio et al. (2014) Cantoni et al. (2007)	Albenzio et al. (2014)	Iaccarino et al. (2006)
Speck	INRAN (2009)	Disciplinare di produzione della Indicazione Geografica Protetta «Speck Alto Adige», «Südtiroler Markenspeck», «Südtiroler Speck»	Disciplinare di produzione della Indicazione Geografica Protetta «Speck Alto Adige», «Südtiroler Markenspeck», «Südtiroler Speck»
<p>* Informazioni dal sito Ars Alimentaria: Le informazioni sono state tratte consultando la scheda di ogni specifico prodotto. Sono stati utilizzati i valori di due o più schede di prodotto quando erano riconducibili alla stessa tipologia di alimento).</p> <p>** I dati riassumo quelli riportati per 4 tipi di prodotto: Capocollo generico, Capocollo Calabria DOP, Capocollo lucano, Capocollo di Martina Franca</p> <p>*** Essendo la descrizione del prodotto generica sono stati considerati i prodotti che presentavano il più basso numero di giorni di stagionatura (Cacciatorini)</p>			

BIBLIOGRAFIA

- Aaslyng, M. D., C. Bejerholm, P. Ertbjerg, H. C. Bertram, and H. J. Andersen. 2003. Cooking loss and juiciness of pork in relation to raw meat quality and cooking procedure. *Food Quality and Preference* 14:277-288.
- Abdulmawjood, A., S. Rosa, A. Taubert, C. Bauer, K. Failing, H. Zahner, and M. Buelte. 2014. Investigation of persistence of infectious *Toxoplasma gondii* in raw sausages using in-house developed and validated real time-PCR. *Meat Sci.* 97:542-547.
- Albenzio, M., A. Santillo, R. Marino, F. d'Angelo, M. Caroprese, and A. Sevi. 2014. Quality of Soppressata salami from Pugliese Pigs as Affected by Rearing System. *Food and Nutrition Sciences*, 5:626.
- Alvarado-Esquivel, C., D. Silva-Aguilar, I. Villena, and J. P. Dubey. 2013. Seroprevalence and correlates of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep in Michoacan State, Mexico. *Prev. Vet. Med.* 112:433-437.
- Andrade, M. M. C., M. Carneiro, A. D. Medeiros, V. A. Neto, and R. W. A. Vitor. 2013. Seroprevalence and risk factors associated with ovine toxoplasmosis in Northeast Brazil. *Parasite* 20:20. *Ars Alimentaria*. 2015. Salame Milano. Available at: <http://www.ars-alimentaria.it/>. Accessed 18/12 2015.
- Ars Alimentaria. 2015. Salame. Available at: <http://www.ars-alimentaria.it/> Accessed 12/18 2015. .
- ASFSSA. 2015. Toxoplasmose: état des connaissances et evaluation du risque lié à l'alimentation. agence francaise de securite sanitaire des aliments. Available at: <http://lesrapports.ladocumentationfrancaise.fr/BRP/064000311/0000.pdf>. Accessed 02/08 2015. .
- Assadi-Rad, A. M., J. C. New, and S. Patton. 1995. Risk factors associated with transmission of *Toxoplasma gondii* to sows kept in different management systems in Tennessee. *Vet. Parasitol.* 57:289-297.
- Bacci, C., A. Vismarra, C. Mangia, S. Bonardi, I. Bruini, M. Genchi, L. Kramer, and F. Brindani. 2015. Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range, organic pigs in Italy using serological and molecular methods. *Int. J. Food Microbiol.* 202:54-6.
- Baer, A. A., M. J. Miller, and A. C. Dilger. 2013. Pathogens of Interest to the Pork Industry: A Review of Research on Interventions to Assure Food Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12:183-217.
- Bayarri, S., M. J. Gracia, C. Perez-Arquillue, R. Lazaro, and A. Herrera. 2012. *Toxoplasma gondii* in Commercially Available Pork Meat and Cured Ham: A Contribution to Risk Assessment for Consumers. *J. Food Prot.* 75:597-600.
- Bayarri, S., M. J. Gracia, R. Lazaro, C. Perez-Arquillue, M. Barberan, and A. Herrera. 2010. Determination of the Viability of *Toxoplasma gondii* in Cured Ham Using Bioassay: Influence of Technological Processing and Food Safety Implications. *J. Food Prot.* 73:2239-2243.
- Bénard, A., E. Petersen, R. Salamon, G. Chêne, R. Gilbert, and L. R. Salmi. 2008. Survey of European programmes for the epidemiological surveillance of congenital toxoplasmosis. *Euro Surveill.* 13:.
- Benedini, R., G. Parolari, T. Toscani, and R. Virgili. 2012. Sensory and texture properties of Italian typical dry-cured hams as related to maturation time and salt content. *Meat Sci.* 90:431-437.
- Boughattas, S., K. Ayari, T. Sa, K. Aoun, and A. Bouratbine. 2014. Survey of the Parasite *Toxoplasma gondii* in Human Consumed Ovine Meat in Tunis City. *PLoS One* 9:e85044-e85044.
- Buffolano, W., R. E. Gilbert, F. J. Holland, D. Fratta, F. Palumbo, and A. E. Ades. 1996. Risk factors for recent toxoplasma infection in pregnant women in Naples. *Epidemiol. Infect.* 116:347-351.
- Burrells, A., J. Benavides, G. Canton, J. L. Garcia, P. M. Bartley, M. Nath, J. Thomson, F. Chianini, E. A. Innes, and F. Katzer. 2015. Vaccination of pigs with the S48 strain of *Toxoplasma gondii* - safer meat for human consumption. *Vet. Res.* 46:47-47.
- Cantoni, C., M. A. Marzano. 2007. Le sopresse, la soprassata e le soppressate. *Eurocarni* 2:.
- Cantoni, C. 2003. Il salame Milano: tecnologia e sua origine probabile. *Premiata Salumeria Italiana* .
- Casini, L., C. Contini, C. Romano, and G. Scozzafava. 2015. Trends in food consumptions: what is happening to generation X? *Br. Food J.* 117:705-718.
- Casarosa, L. 1985. Parassitologia negli animali domestici. Casa Editrice Ambrosiana

- Casiraghi, E., C. Pompei, S. Dellaglio, G. Parolari, and R. Virgili. 1996. Quality attributes of Milano salami, an Italian dry-cured sausage. *J. Agric. Food Chem.* 44:1248-1252.
- CDC. 02/2016. Neglected Parasitic Infections (NPIs) in the United States. Available at: Accessed 15/02 02/2016.
- Cenci-Goga, B. T., A. Ciampelli, P. Sechi, F. Veronesi, I. Moretta, V. Cambiotti, and P. N. Thompson. 2013. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep in Grosseto district, Tuscany, Italy. *BMC Vet. Res.* 9:25.
- Choi, W. -, H. -. Nam, N. -. Kwak, W. Huh, Y. -. Kim, M. -. Kang, S. -. Cho, and J. P. Dubey. 1997. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 175:1280-1282.
- Codex Alimentarius Commission. 2016. Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment. Available at: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/download/standards/357/CXG_030e_2014.pdf. Accessed 02/02 2016. .
- Comi, G., R. Urso, L. Iacumin, K. Rantsiou, P. Cattaneo, C. Cantoni, and L. Cocolin. 2005. Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Sci.* 69:381-392.
- Cook, A. J. C., R. E. Gilbert, W. Buffolano, J. Zufferey, E. Petersen, P. A. Jenum, W. Foulon, A. E. Semprini, and D. T. Dunn. 2000. Sources of *toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *Br. Med. J.* 321:142-147.
- Cosendey-KezenLeite, R. I., F. C. Rodrigues de Oliveira, E. Frazao-Teixeira, J. P. Dubey, G. N. de Souza, A. M. Reis Ferreira, and W. Lilenbaum. 2014. Occurrence and risk factors associated to *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Rio de Janeiro, Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 46:1463-1466.
- Cringoli 2010. Mappa parassitologiche. Edited by Vincenzo Musella, Antonio Bosco, Laura Rinaldi
- Davies, P. R. 2011. Intensive Swine Production and Pork Safety. *Foodborne Pathogens and Disease* 8:189-201.
- De Paschale, M., C. Agrappi, P. Clerici, P. Mirri, M. T. Manco, S. Cavallari, and E. F. Viganò. 2008. Seroprevalence and incidence of *Toxoplasma gondii* infection in the Legnano area of Italy. *Clinical Microbiology and Infection* 14:186-189.
- Dias, R. A. F., I. T. Navarro, B. B. Ruffolo, F. M. Bugni, M. V. De Castro, and R. L. Freire. 2005. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná State, Brazil(1). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 47:185-189.
- Djurkovic-Djakovic, O., B. Bobic, A. Nikolic, I. Klun, and J. Dupouy-Camet. 2013. Pork as a source of human parasitic infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 19:586-594.
- Dubey, J. P., C. Rajendran, L. R. Ferreira, J. Martins, O. C. H. Kwok, D. E. Hill, I. Villena, H. Zhou, C. Su, and J. L. Jones. 2011. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. *Int. J. Parasitol.* 41:827-833.
- Dubey, J. P. 2010. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Dubey, J. P. 2009. Toxoplasmosis in sheep—The last 20 years. *Vet. Parasitol.* 163:1-14.
- Dubey, J. P. 2009b. Toxoplasmosis in pigs—The last 20 years. *Vet. Parasitol.* 164:89-103.
- Dubey, J. P., Jones J. L., 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int. J. Parasitol.* 38:1257-1278.
- Dubey, J. P., Huong L. T. T., B. W. L. Lawson, D. T. Subekti, P. Tassi, W. Cabaj, N. Sundar, G. V. Velmurugan, O. C. H. Kwok, and C. Su. 2008. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens in Ghana, Indonesia, Italy, Poland, and Vietnam. *J. Parasitol.* 94:68-71.
- Dubey, J. P., R. Edelhofer, P. Marcet, M. C. B. Vianna, O. C. H. Kwok, and T. Lehmann. 2005. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* infections in free-range chickens from Austria. *Vet. Parasitol.* 133:299-306
- Dubey, J. P., H. Salant, C. Sreekumar, E. Dahl, M. C. B. Vianna, S. K. Shen, O. C. H. Kwok, D. Spira, J. Hamburger, and T. V. Lehmann. 2004. High prevalence of *Toxoplasma gondii* in a commercial flock of chickens in Israel, and public health implications of free-range farming. *Vet. Parasitol.* 121:317-322.
- Dubey, J. P. 1998. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. *Parasitology* 116:43-50.

- Dubey, J. P., C. D. Andrews, P. Thulliez, P. Lind, and O. C. H. Kwok. 1997. Long-term humoral antibody responses by various serologic tests in pigs orally inoculated with oocysts of four strains of *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 68:41-50.
- Dubey, J. P., J. K. Lunney, S. K. Shen, O. C. H. Kwok, D. A. Ashford, and P. Thulliez. 1996. Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. *J. Parasitol.* 82:438-443.
- Dubey, J. P., P. Thulliez, and E. C. Powell. 1995. *Toxoplasma gondii* in Iowa sows: Comparison of antibody titers to isolation of *T. gondii* by bioassays in mice and cats. *J. Parasitol.* 81:48-53.
- Dubey, J. P., P. Thulliez. 1993. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am. J. Vet. Res.* 54:270-273.
- Dubey, J. P., A. W. Kotula, A. Sharar, C. D. Andrews, and D. S. Lindsay. 1990. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J. Parasitol.* 76:201-204.
- Dubey, J. P., C. A. Kirkbride. 1989. Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 195:1715-1716.
- 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. *Am. J. Vet. Res.* 49:910-913.
- Dubey, J. P. 1983. Distribution of cysts and tachyzoites in calves and pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Vet. Parasitol.* 13:199-211.
- Dunn, D., M. Wallon, F. Peyron, E. Petersen, C. Peckham, and R. Gilbert. 1999. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: Risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 353:1829-1833.
- EcoSure. 2016. 2007 U.S. Cold Temperature Evaluation. Available at: <http://foodrisk.org/exclusives/ecosure/>. Accessed 02/02 2016. .
- Esteban-Redondo, I., E. A. Innes. 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. *Int. J. Parasitol.* 28:1459-1466.
- Edelhofer, R. 1994. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in pigs in Austria - an evaluation of data from 1982 and 1992. *Parasitol. Res.* 80:642-644.
- Feitosa, T. F., V. L. R. Vilela, L. R. Bezerra de Melo, J. L. De Almeida Neto, D. V. De Oliveira Souto, D. F. De Moraes, A. C. R. Athayde, S. S. Azevedo, and H. F. De Jesus Pena. 2014. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. *Vet. Parasitol.* 202:305-309.
- Ferri, M., V. Giaccone. 2016. Il sistema Monte Carlo e la Valutazione Quantitativa del Rischio microbiologico nell igiene degli alimenti. Available at: http://r.search.yahoo.com/_ylt=A9mSs3HBDNhWvpgAXgobDQx.;_ylu=X3oDMTE0c2NuOG02BGNvbG8DaXIyBHBvcwMxBHZ0aWQDVUIJVEMwMV8xBHNiYwNzcg--/RV=2/RE=1457028418/RO=10/RU=http%3a%2f%2fwww.ordiniveterinaripiemonte.it%2frivista%2f03n05%2fspec02.pdf/RK=0/RS=z5laOvO6HnGb8Gvsy402DeHnKzU-. Accessed 01/02 2016. .
- Ferroglio, E., F. Bosio, A. Trisciunglio, and S. Zanet. 2014. *Toxoplasma gondii* in sympatric wild herbivores and carnivores: epidemiology of infection in the Western Alps. *Parasites & Vectors* 7:196-196.
- Figliuolo, L. P. C., N. Kasai, A. M. A. Ragozo, V. S. O. De Paula, R. A. Dias, S. L. P. Souza, and S. M. Gennari. 2004. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 123:161-166.
- Fonseca, A. L., R. A. Silva, B. Fux, A. P. Madureira, F. F. de Sousa, and C. Margonari. 2012. Epidemiologic aspects of toxoplasmosis and evaluation of its seroprevalence in pregnant women. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45:357-364.
- Food and Agriculture Organization, World Health Organization. 2016. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i3649e.pdf>. Accessed 02/01 2016. .
- Garcia, J. L., S. M. Gennari, R. Z. Machado, and I. T. Navarro. 2006. *Toxoplasma gondii*: Detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. *Exp. Parasitol.* 113:267-271.

- Garcia-Bocanegra, I., O. Cabezon, E. Hernandez, M. S. Martinez-Cruz, A. Martinez-Moreno, and J. Martinez-Moreno. 2013. *Toxoplasma gondii* in Ruminant Species (Cattle, Sheep, and Goats) from Southern Spain. *J. Parasitol.* 99:438-440.
- Gebremedhin, E. Z., M. Abdurahaman, T. S. Tessema, G. Tilahun, E. Cox, B. Goddeeris, P. Dorny, S. De Craeye, M. - Dardé, and D. Ajzenberg. 2014. Isolation and genotyping of viable *Toxoplasma gondii* from sheep and goats in Ethiopia destined for human consumption. *Parasites Vectors* 7:.
- Gebremedhin, E. Z., M. Abdurahaman, T. Hadush, and T. S. Tessema. 2014. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in sheep and goats slaughtered for human consumption in Central Ethiopia. *BMC research notes* 7:696.
- Genchi C, **Pozio E**, 2004. ed. *De Carneri parassitologia generale e umana, 13. ed.* Milano: Casa Editrice Ambrosiana.
- Gomez-Samblas, M., S. Vilchez, J. C. Racero, M. V. Fuentes, and A. Osuna. 2015. Quantification and viability assays of *Toxoplasma gondii* in commercial "Serrano" ham samples using magnetic capture real-time qPCR and bioassay techniques. *Food Microbiol.* 46:107-113.
- Guo, M., R. L. Buchanan, J. P. Dubey, D. E. Hill, E. Lambertini, Y. Ying, H. R. Gamble, J. L. Jones, and A. K. Pradhan. 2015a. Qualitative assessment for *Toxoplasma gondii* exposure risk associated with meat products in the United States. *J. Food Prot.* 78:2207-2219.
- Guo, M., A. Mishra, R. L. Buchanan, J. P. Dubey, D. E. Hill, H. R. Gamble, J. L. Jones, X. Du, and A. K. Pradhan. 2015b. Development of Dose-Response Models to Predict the Relationship for Human *Toxoplasma gondii* Infection Associated with Meat Consumption. *Risk Anal.* .
- Guo, M., J. P. Dubey, D. Hill, R. L. Buchanan, H. R. Gamble, J. L. Jones, and A. K. Pradhan. 2015c. Prevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in Meat Animals and Meat Products Destined for Human Consumption. *J. Food Prot.* 78:457-476.
- Haas, C. N. 1983. Estimation of risk due to low doses of microorganisms: A comparison of alternative methodologies. *Am. J. Epidemiol.* 118:573-582.
- Halkjaer, J., A. Olsen, L. J. Bjerregaard, G. Deharveng, A. Tjonneland, A. A. Welch, F. L. Crowe, E. Wirfalt, V. Hellstrom, M. Niravong, M. Touvier, J. Linseisen, A. Steffen, M. C. Ocke, P. H. M. Peeters, M. D. Chirlaque, N. Larranaga, P. Ferrari, P. Contiero, G. Frasca, D. Engeset, E. Lund, G. Misirli, M. Kostis, E. Riboli, N. Slimani, and S. Bingham. 2009. Intake of total, animal and plant proteins, and their food sources in 10 countries in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Eur. J. Clin. Nutr.* 63:S16-S36.
- Halos, L., A. Thébault, D. Aubert, M. Thomas, C. Perret, R. Geers, A. Alliot, S. Escotte-Binet, D. Ajzenberg, M. - Dardé, B. Durand, P. Boireau, and I. Villena. 2010. An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France. *Int. J. Parasitol.* 40:193-200.
- Hassanain, M. A., H. A. Elfadaly, R. M. Shaapan, N. A. Hassanain, and A. M. Barakat. 2011. Biological assay of *Toxoplasma gondii* Egyptian mutton isolates. *Int. J. Zool. Res.* 7:330-337.
- Hill, D. E., C. Haley, B. Wagner, H. R. Gamble, and J. P. Dubey. 2010. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the US swine herd using sera collected during the national animal health monitoring survey (Swine 2006). *Zoonoses Public Health* 57:53-59.
- Hill, A. E., S. M. C. Benedetto, C. Coss, J. L. McCrary, V. M. Fournet, and J. P. Dubey. 2006. Effects of time and temperature on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in enhanced pork loin. *J. Food Prot.* 69:1961-1965.
- Hill, D., C. Sreekumar, H. Gamble, and J. Dubey. 2004. Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin. *J. Food Prot.* 67:2230-2233.
- Iaccarino, T., R. Di Monaco, A. Mincione, S. Cavella, and P. Masi. 2006. Influence of information on origin and technology on the consumer response: The case of soppressata salami. *Food Qual. Preference* 17:76-84.
- Howe, D. K., L. D. Sibley. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172:1561-1566.

- INRAN. 2015. Tabelle di composizione degli alimenti. Available at: http://nut.entecra.it/718/SALUMI_ITALIANI_aggiornamento_dei_dati_di_composizione.html. Accessed 12/18 2015. .
- INRAN-SCAI 2005-06 Study Group. 2016. I consumi alimentari: INRAN-SCAI 2005-06. Available at: http://nut.entecra.it/710/I_consumi_alimentari_INRAN-SCAI_2005-06.html. Accessed 02/02 2016.
- Innes, E. A. 2010. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses Public Health* 57:1-7.
- Jones, J. L., M. E. Parise, and A. E. Fiore. 2014. Neglected parasitic infections in the United States: Toxoplasmosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 90:794-799.
- Jones, J. L., J. P. Dubey. 2012. Foodborne toxoplasmosis. *Clin. Infect. Dis.* 55:845-851.
- Jones, J. L., A. Lopez, M. Wilson,. 2003. Congenital toxoplasmosis. *Am Fam Physician.* 2003 May 15;67(10):2131-2138.
- Jones, J. L., A. Lopez, M. Wilson, J. Schulkin, and R. Gibbs. 2001. Congenital toxoplasmosis: A review. *Obstet. Gynecol. Surv.* 56:296-305
- Juránková, J., L. Hurková-Hofmannová, J. Volf, V. Baláž, and J. Piálek. 2014. Efficacy of magnetic capture in comparison with conventional DNA isolation in a survey of *Toxoplasma gondii* in wild house mice. *Eur. J. Protistol.* 50:11-15.
- Kantzoura, V., A. Diakou, M. K. Kouam, H. Feidas, H. Theodoropoulou, and G. Theodoropoulos. 2013. Seroprevalence and risk factors associated with zoonotic parasitic infections in small ruminants in the Greek temperate environment. *Parasitol. Int.* 62:554-560.
- Khan, A., J. P. Dubey, C. Su, J. W. Ajioka, B. M. Rosenthal, and L. D. Sibley. 2011. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int. J. Parasitol.* 41:645-655
- Kijlstra, A., B. Meerburg, J. Cornelissen, S. De Craeye, P. Vereijken, and E. Jongert. 2008. The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. *Vet. Parasitol.* 156:183-190.
- Kijlstra, A., E. Jongert. 2008. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int. J. Parasitol.* 38:1359-1370.
- Klun, I., O. Djurković-Djaković, S. Katić-Radivojević, and A. Nikolić. 2006. Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: Seroprevalence and risk factors. *Vet. Parasitol.* 135:121-131.
- Kotula, A. W., J. P. Dubey, A. K. Sharar, C. D. Andrews, S. K. Shen, and D. S. Lindsay. 1991. Effect of Freezing on Infectivity of *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts in Pork. *Journal of Food Protection* 9:662.
- Kravetz, J. D., D. G. Federman. 2005. Toxoplasmosis in pregnancy. *Am. J. Med.* 118:212-216.
- La Pietra, L., G. Pirone, M. Longo, and C. Diaferia. 1998. Indagine merceologica sul capocollo prodotto tradizionale campano. *Industria conserve* 73:117.
- Lass, A., H. Pietkiewicz, B. Szostakowska, and P. Myjak. 2009. Occurrence of *Toxoplasma gondii* parasite in food (meat, meat products, fruits and vegetables). *Tropical Medicine & International Health* 14:200-200.
- Laureati, M., S. Buratti, G. Giovanelli, M. Corazzin, D. P. Lo Fiego, and E. Pagliarini. 2014. Characterization and differentiation of Italian Parma, San Daniele and Toscano dry-cured hams: A multi-disciplinary approach. *Meat Sci.* 96:288-294.
- Leclercq, C., D. Arcella, R. Piccinelli, S. Sette, C. Le Donne, A. Turrini, and INRAN-SCAI 2005-06 Stu. 2009. The Italian National Food Consumption Survey INRAN-SCAI 2005-06: main results in terms of food consumption. *Public Health Nutr.* 12:2504-2532.
- Lim, S. J., S. E. Lee, S. H. Kim, S. Hong, Y. S. You, O. W. Kwon, and H. S. Kim. 2015. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Toxocara canis* among Patients with Uveitis. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 23:111-117.
- Lindsay, D., M. Collins, D. Holliman, G. Flick, and J. Dubey. 2006. Effects of high-pressure processing on *Toxoplasma gondii* tissue cysts in ground pork. *J. Parasitol.* 92:195-196.
- Liu, Q., Z. -. Wang, S. -. Huang, and X. -. Zhu. 2015. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasites Vectors* 8:.

- Maksimov, P., S. Buschtöns, D. C. Herrmann, F. J. Conraths, K. Görlich, A. M. Tenter, J. P. Dubey, U. Nagel-Kohl, B. Thoms, L. Bötcher, M. Kühne, and G. Schares. 2011. Serological survey and risk factors for *Toxoplasma gondii* in domestic ducks and geese in Lower Saxony, Germany. *Vet. Parasitol.* 182:140-149.
- Mancianti, F., S. Nardoni, C. D'Ascenzi, F. Pedonese, L. Mugnaini, F. Franco, and R. Papini. 2013. Seroprevalence, Detection of DNA in Blood and Milk, and Genotyping of *Toxoplasma gondii* in a Goat Population in Italy. *Biomed Research International* 905326-905326.
- Masala, G., R. Porcu, L. Madau, A. Tanda, B. Ibba, G. Satta, and S. Tola. 2003. Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. *Vet. Parasitol.* 117:15-21.
- McDonald, J. C., T. W. Gyorkos, B. Alberton, J. D. MacLean, G. Richer, and D. Juranek. 1990. An outbreak of toxoplasmosis in pregnant women in northern Québec. *J. Infect. Dis.* 161:769-774.
- Meats and Sausages. 2015. Making sausages. Available at: <http://www.meatsandsausages.com/sausage-making/meat-selection>. Accessed 12/18 2015. .
- Mie, T., A. M. Pointon, D. R. Hamilton, and A. Kiermeier. 2008. A qualitative assessment of *Toxoplasma gondii* risk in ready-to-eat smallgoods processing. *J. Food Prot.* 71:1442-1452.
- Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali. 2012. Modifica del disciplinare di produzione della denominazione «Speck Alto Adige/Südtiroler Markenspeck / Südtiroler Speck» registrata in qualità di indicazione geografica protetta in forza del Regolamento CE n. 1107 del 12 giugno 1996. *Gazzetta ufficiale della Repubblica Italiana* 19:.
- Ministero della Salute. 2014. <http://www.salute.gov.it/pianoNazionaleIntegrato2015/>. Ultimo accesso: 04/03/2016
- Ministero della Salute. 2015. <http://www.salute.gov.it/relazioneAnnuale2013/>
- Mosti, M., B. Pinto, A. Giromella, S. Fabiani, R. Cristofani, M. Panichi, and F. Bruschi. 2013. A 4-year evaluation of toxoplasmosis seroprevalence in the general population and in women of reproductive age in central Italy. *Epidemiol. Infect.* 141:2192-2195.
- Natale, A., M. Porqueddu, G. Capelli, G. Mocchi, A. Marras, G. N. Sanna Coccone, G. Garippa, and A. Scala. 2007. Sero-epidemiological update on sheep toxoplasmosis in Sardinia, Italy. *Parassitologia* 49:235-8.
- Nissapatorn, V. 2009. Toxoplasmosis in Hiv/aids: a Living Legacy. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 40:1158-1178.
- Novelli, E., E. Zanardi, G. P. Ghiretti, G. Campanini, G. Dazzi, G. Madarena, and R. Chizzolini. 1998. Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame Milano and mortadella. *Meat Sci.* 48:29-40.
- Omata, Y., C. Dilorenzo, C. Venturini, L. Venturini, I. Igarashi, A. Saito, and N. Suzuki. 1994. Correlation between antibody levels in *Toxoplasma gondii* infected pigs and pathogenicity of the isolated parasite. *Veterinary parasitology* 51, Issue 3-4:205-210.
- Opsteegh, M., T. M. Kortbeek, A. H. Havelaar, and J. W. B. van der Giessen. 2015. Intervention Strategies to Reduce Human *Toxoplasma gondii* Disease Burden. *Clin. Infect. Dis.* 60:101-107.
- Opsteegh, M., S. Prickaerts, K. Frankena, and E. G. Evers. 2011. A quantitative microbial risk assessment for meatborne *Toxoplasma gondii* infection in The Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* 150:103-114.
- Opsteegh, M., M. Langelaar, H. Sprong, L. den Hartog, S. De Craeye, G. Bokken, D. Ajzenberg, A. Kijlstra, and J. V. der Giessen. 2010. Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 139:193-201.
- Pappas, G., N. Roussos, and M. E. Falagas. 2009. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* 39:1385-1394.
- Pastiu, A. I., A. Györke, R. Blaga, V. Mircean, B. M. Rosenthal, and V. Cozma. 2013. 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.* 112:2403-2407.
- Pekeles, G. S., J. C. McDonald, T. W. Gyorkos, B. Alberton, J. D. MacLean, G. Richer, and D. Juranek. 1991. An outbreak of congenital toxoplasmosis in northern Quebec. *Arctic Med. Res. Suppl.* 360-362.

- Pinheiro Jr., J. W., R. A. Mota, A. A. Da Fonseca Oliveira, E. B. Faria, L. F. P. Gondim, A. V. Da Silva, and G. A. Anderlini. 2009. Prevalence and risk factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in ovine in the State of Alagoas, Brazil. *Parasitol. Res.* 105:709-715.
- Pordeus, V., O. Barzilai, Y. Sherer, R. R. Luiz, M. Blank, N. Bizzaro, D. Villalta, J. Anaya, and Y. Shoenfeld. 2008. A latitudinal gradient study of common anti-infectious agent antibody prevalence in Italy and Colombia. *Isr. Med. Assoc. J.* 10:65-68.
- Pott, S., M. Koethe, B. Bangoura, B. Zoeller, A. Dausgchies, R. K. Straubinger, K. Fehlhaber, and M. Ludewig. 2013. Effects of pH, Sodium Chloride, and Curing Salt on the Infectivity of *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts. *J. Food Prot.* 76:1056-1061.
- Puccio, G., C. Cajozzo, L. A. Canduscio, L. Cino, A. Romano, M. G. Schimmenti, M. Giuffrè, and G. Corsello. 2014. Epidemiology of *Toxoplasma* and CMV serology and of GBS colonization in pregnancy and neonatal outcome in a Sicilian population. *Ital. J. Pediatr.* 40:.
- Radostits O, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable, P. D., 2006. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats, 10e Publisher: Saunders Elsevier
- Ragozo, A. M. A., L. E. O. Yai, L. N. Oliveira, R. A. Dias, J. P. Dubey, and S. M. Gennari. 2008. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from sheep from São Paulo State, Brazil. *J. Parasitol.* 94:1259-1263.
- Ranucci, D., F. Veronesi, A. Moretti, R. Branciarri, D. Miraglia, M. T. Manfredi, and D. P. Fioretti. 2013. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boars (*Sus scrofa*) from Central Italy. *Parasite* 20:48-48.
- Rinaldi, L., A. Scala. 2008. Toxoplasmosis in livestock in Italy: an epidemiological update. *Parassitologia* 50:59-61. Publisher: Saunder Elsevier.
- Roghamm, M. -, C. T. Faulkner, A. Lefkowitz, S. Patton, J. Zimmerman, and J. G. Morris Jr. 1999. Decreased seroprevalence for *Toxoplasma gondii* in Seventh Day Adventists in Maryland. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60:790-792.
- Romanelli, P. R., R. L. Freire, O. Vidotto, E. R. M. Marana, L. Ogawa, V. S. O. De Paula, J. L. Garcia, and I. T. Navarro. 2007. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. *Res. Vet. Sci.* 82:202-207.
- Romeo, F. V., A. Runcio, A. Piscopo, T. Iaccarino, A. Mincione, and M. Poiana. 2014. Characterization of Four Typical Calabrian Cured Meat Products: Spicy Sausage, Soppresata, 'Nduja and Capocollo. *Acta Aliment.* 43:564-573.
- Samra, N. A., C. M. McCrindle, B. L. Penzhorn, and B. Cenci-Goga. 2007. Seroprevalence of toxoplasmosis in sheep in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 78:116-120.
- Savic I, V., 1985. Small-scale sausage production.
- Scala A, Giobbe M, Mula PP, Pipia AP, Sanna-Coccone G, Firinu A, Varcasia A, Marrosu R, Garippa G (2008). Toxoplasmosi dei suidi in Sardegna: indagine sieroepidemiologica. *Parassitologia* 50.
- Sechi, P., A. Ciampelli, V. Cambiotti, F. Veronesi, and B. T. Cenci-Goga. 2013. Seroepidemiological study of toxoplasmosis in sheep in rural areas of the Grosseto district, Tuscany, Italy. *Italian Journal of Animal Science* 12:e39-e39.
- Shafiur Rahman (ed). 2007. Handbook of Food Preservation, Second Edition. CRC, USA.
- Shahidi, F., A. M. Spanier, Chi-Tang Ho, and T. Braggins. 2004. Quality of Fresh and Processed Foods. Springer, .
- Shapira, Y., B. P. Katz, B. Gilburd, O. Barzilai, M. Ram, M. Blank, S. Lindeberg, J. Frostegard, J. Anaya, N. Bizzaro, L. J. Jara, J. Damoiseaux, Y. Shoenfeld, and N. A. Levin. 2012. Geographical Differences in Autoantibodies and Anti-infectious Agents Antibodies Among Healthy Adults. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 42:154-163.
- Skjerve, E., H. Waldeland, T. Nesbakken, and G. Kapperud. 1998. Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. *Prev. Vet. Med.* 35:219-227.
- Spickler, A. R. 2016. Toxoplasmosis - Date of Factsheet (Last Updated). Available at: At <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>. Accessed 02/02 2016.

- Swensen, K., M. Ellis, M. Brewer, J. Novakofski, and F. McKeith. 1998. Pork carcass composition: II. Use of indicator cuts for predicting carcass composition. *J. Anim. Sci.* 76:2405-2414.
- Swierzy, I. J., M. Muhammad, J. Kroll, A. Abelmann, A. M. Tenter, and C. G. K. Lueder. 2014. *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells: a critical interplay for food-borne parasite transmission. *Int. J. Parasitol.* 44:91-98.
- Tenter, A. M. 2009. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104:364-369.
- Tenter, A., A. Heckeroth, and L. Weiss. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30:1217-1258.
- Toldrá, F. 2014. Handbook of Fermented Meat and Poultry, 2nd Edition. .
- Tzanidakis, N., P. Maksimov, F. J. Conraths, E. Kioussis, C. Brozos, S. Sotiraki, and G. Schares. 2012. *Toxoplasma gondii* in sheep and goats: Seroprevalence and potential risk factors under dairy husbandry practices. *Vet. Parasitol.* 190:340-348.
- Urquhart G.M. Parassitologia Veterinaria. A cura di Genchi C. Publisher: UTET
- Valcavi, P., A. Natali, L. Soliani, S. Montali, G. Dettori, and C. Cheezi. 1995. Prevalence of Anti*Toxoplasma gondii* Antibodies in the Population of the Area of Parma (Italy). *Eur. J. Epidemiol.* 11:333-337.
- van der Puije, W. N. A., K. M. Bosompem, E. A. Canacoo, J. M. Wastling, and B. D. Akanmori. 2000. The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Ghanaian sheep and goats. *Acta Trop.* 76:21-26.
- van Knapen, F., A. F. Kremers, J. H. Franchimont, and U. Narucka. 1995. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cattle and swine in The Netherlands: towards an integrated control of livestock production. *Vet. Q.* 17:87-91.
- Vázquez-Boland, J. A. 1996. Prevalence of agglutinating antibodies to *Toxoplasma gondii* in small ruminants of the Madrid region, Spain, and identification of factors influencing seropositivity by multivariate analysis. *Vet. Res. Commun.* 20:153-159
- Verhelst, D., S. De Craeye, M. Jennes, P. Dorny, B. Goddeeris, and E. Cox. 2015. Interferon-gamma expression and infectivity of *Toxoplasma* infected tissues in experimentally infected sheep in comparison with pigs. *Vet. Parasitol.* 207:7-16.
- Verhelst, D., S. De Craeye, M. Vanrobaeys, G. Czaplicki, P. Dorny, and E. Cox. 2014. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic sheep in Belgium. *Vet. Parasitol.* 205:57-61.
- Veronesi, F., D. Ranucci, R. Branciaro, D. Miraglia, R. Mammoli, and D. P. Fioretti. 2011. Seroprevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection on Finishing Swine Reared in the Umbria Region, Central Italy. *Zoonoses and Public Health* 58:178-184.
- Vesco, G., W. Buffolano, S. La Chiusa, G. Mancuso, S. Caracappa, A. Chianca, S. Villari, V. Currò, F. Liga, and E. Petersen. 2007. *Toxoplasma gondii* infections in sheep in Sicily, southern Italy. *Vet. Parasitol.* 146:3-8.
- Villari, S., G. Vesco, E. Petersen, A. Crispo, and W. Buffolano. 2009. Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. *Vet. Parasitol.* 161:1-8.
- Vitale, M., G. Tumino, S. Partanna, S. La Chiusa, G. Mancuso, M. La Giglia, and V. D. M. Lo Presti. 2014. Impact of Traditional Practices on Food Safety: A Case of Acute Toxoplasmosis Related to the Consumption of Contaminated Raw Pork Sausage in Italy. *J. Food Prot.* 77:643-646.
- Waltner-Toews, D., R. Mondesire, and P. Menzies. 1991. The seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Ontario sheep flocks. *Can. Vet. J.* 32:734-737.
- Warnekulasuriya, M., J. Johnson, and R. Holliman. 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. *Int. J. Food Microbiol.* 45:211-215.
- Xiao, J., R. H. Yolken. 2015. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. *Acta Physiol. (Oxf)* 213:828-845.
- Zanardi, E., S. Ghidini, M. Conter, and A. Ianieri. 2010. Mineral composition of Italian salami and effect of NaCl partial replacement on compositional, physico-chemical and sensory parameters. *Meat Sci.* 86:742-747.

Zanet, S., V. Palese, A. Triscioglio, C. C. Alonso, and E. Ferroglio. 2013. Encephalitozoon cuniculi, *Toxoplasma gondii* and Neospora caninum infection in invasive Eastern Cottontail Rabbits *Sylvilagus floridanus* in Northwestern Italy. *Vet. Parasitol.* 197:682-684.