



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina Veterinaria

CONTROLLO MICROBIOLOGICO DELLE CARNI DI CINGHIALE

MICROBIOLOGICAL CONTROL OF WILD BOAR MEAT

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa SILVIA BONARDI

Correlatore:

Dott. MAURO CONTER

Laureando:

MARTA FOZZER

Anno accademico 2021/2022

SOMMARIO

ABSTRACT	4
1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 Premessa	5
1.2 Cinghiale	9
1.2.1 Morfologia.....	9
1.2.2 Classi di età.....	11
1.2.3 Alimentazione	12
1.2.4 Distribuzione.....	12
1.2.5 Densità.....	13
1.2.6 Prelievi e gestione faunistica.....	14
1.2.7 Consumo di carne di selvaggina in Italia	15
1.2.8 Aspetti sanitari	15
1.2.9 Controllo dei patogeni zoonotici di origine alimentare provenienti dai cinghiali	17
1.3 <i>Salmonella</i> spp.....	20
1.3.1 Etimologia.....	20
1.3.2 Microrganismo.....	20
1.3.3 Tassonomia.....	21
1.3.4 Struttura antigenica e sierotipizzazione	23
1.3.5 Caratteristiche colturali.....	24
1.3.6 Caratteristiche biochimiche.....	25
1.3.7 Epidemiologia.....	25
1.3.8 Patogenesi.....	27
1.3.9 Manifestazioni cliniche.....	30
1.3.10 Dose infettante	32
1.3.11 Sistemi di sorveglianza delle infezioni da <i>Salmonella</i> in UE e in Italia.....	32
1.3.12 Prevalenza di <i>Salmonella</i> nel cinghiale	34
1.3.13 Criteri di controllo di <i>Salmonella</i>	35
1.4 <i>Yersinia enterocolitica</i> e <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	37
1.4.1 Etimologia.....	37
1.4.2 Microrganismo.....	37
1.4.3 Tassonomia.....	38
1.4.4 Caratteristiche colturali.....	40
1.4.5 Epidemiologia.....	42
1.4.6 Patogenesi.....	44
1.4.7 Manifestazioni cliniche.....	47
1.4.8 Dose infettante	49
1.4.9 Sistemi di sorveglianza delle infezioni da <i>Yersinia</i> in UE e in Italia	49
1.4.10 Prevalenza di <i>Yersinia</i> nel cinghiale.....	51
1.4.11 Criteri microbiologici per <i>Yersinia</i>	51
2. MATERIALI E METODI.....	52
2.1 Area di studio	52
2.2 Fase A: campionamento presso il centro di raccolta	53
2.3 Fase B: campionamento presso lo stabilimento di lavorazione delle carni di selvaggina (o stabilimento di macellazione)	54
2.4 Metodi colturali.....	55
2.4.1 Ricerca di <i>Salmonella</i> spp.....	55
2.4.2 Ricerca di <i>Y. enterocolitica</i> e <i>Y. pseudotuberculosis</i>	56

3. RISULTATI	62
4. DISCUSSIONE	69
4.1 Prevalenza di <i>Salmonella</i> spp. nei cinghiali	69
4.2 Prevalenza di <i>Y. enterocolitica</i> e <i>Y. pseudotuberculosis</i> nei cinghiali	73
4.3 Prevalenza di <i>Salmonella</i> spp. sulle carcasse di cinghiale	73
4.3.1 Campionamento A presso il centro di raccolta	73
4.3.2 Campionamento B presso lo stabilimento di lavorazione delle carni di selvaggina	76
4.4 Prevalenza di <i>Y. enterocolitica</i> e <i>Y. pseudotuberculosis</i> sulle carcasse di cinghiale	79
5. CONCLUSIONI	81
BIBLIOGRAFIA	82

ABSTRACT

Recently, the wild boar population has dramatically increased, both in Italy and worldwide, causing environmental issues as well as human health hazards, which are due to the increased consumption of wild boar meat.

Like many other animal products, wild boar meat can be a vehicle for foodborne diseases. In fact, pathogens such as *Salmonella* spp. and *Yersinia* spp. can be detected in wild boars.

The aim of the present study is to assess the prevalence of these pathogens in carcasses and mesenteric lymph nodes of wild boars hunted in the Italian region of Emilia-Romagna. In 2020, 79 wild boar carcasses were selected and sampled using sterile sponges at the game collection point (A), and 66/79 carcasses were re-sampled after transportation (average of 3.7 days after killing) at the game handling establishment (B). Due to Covid-19's restrictions, 13 carcasses were delivered to a nearby slaughterhouse, (average 2.3 days after the killing) to be re-sampled. In addition to carcass swabs, mesenteric lymph nodes were collected. All samples were tested for *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*.

The results showed a prevalence of *Salmonella* spp. on carcasses varying from 2,5% (A) to 5% (B) and a prevalence of 7.5 % in lymph nodes. *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* were never isolated. Among *Salmonella* isolates, the serovars *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Agama*, *S. Zaiman* and *S. diarizonae* were detected, either from carcasses and/or mesenteric lymph nodes.

The time interval between hunting and transportation to the game handling establishment was associated to a higher prevalence of *Salmonella* spp., suggesting that a longer carcass storage-time could affect microbial contamination.

Despite the recommendations of Regulation (CE) 853/2004 concerning quick evisceration of carcasses after hunting and their rapid transportation to a game handling establishment, hunting and processing of the wild boar meat are often delivered, mainly due to long distances between the hunting areas and the establishments. The lack of these infrastructures in the hunting territories causes eviscerated carcasses to be stored with skin and hair not removed, which increases the possibility of meat contamination.

In conclusion, cross-contamination of wild boar meat appears to pose a risk to the consumer, both in terms of hygiene and food safety. The study results confirm the urgent need for a better monitoring of the wild boar products, in order to guarantee the consumer's safety and an improved food supply system.

1. INTRODUZIONE

1.1 Premessa

I cinghiali (*Sus scrofa*) sono animali selvatici potenzialmente in grado di ospitare un'ampia gamma di patogeni di origine alimentare che possono causare gravi malattie nell'uomo. La popolazione europea di cinghiale ha assistito ad un drammatico aumento negli ultimi decenni (Brown *et al.*, 2018) ed è stata stimata una densità variabile da 0,00-0,05 a 2,32-10,5 animali/km² su tutto il territorio europeo (Pittiglio *et al.*, 2018). Questa specie di ungulati selvatici ha conosciuto un così rapido incremento in conseguenza di diversi fattori, quali la mancanza di predazione, la bassa pressione venatoria, il rapido tasso riproduttivo, le condizioni climatiche favorevoli, l'introduzione massiccia di cinghiali, da Paesi stranieri o da allevamento e, l'abbondanza di cibo disponibile, compresa l'alimentazione supplementare di origine antropica (Massei *et al.*, 2015; Oja *et al.*, 2015). Il cinghiale è un animale onnivoro che si nutre principalmente (circa il 90%) di materiale vegetale, con la possibilità di adattarsi a quello che è disponibile, compresi animali vivi e morti (Ballari e Barrios-García, 2014).

In Italia, i cinghiali sono tra gli ungulati selvatici più diffusi. La popolazione copre infatti tutto il Paese, concentrandosi maggiormente tra le montagne dell'Appennino (Carnevali *et al.*, 2009). Sempre nel recente lavoro di Pittiglio e collaboratori (2018), si estrapola una densità variabile tra 1,37-2,31 animali/km² nella regione Emilia-Romagna (22451 km²), area oggetto del presente lavoro di tesi. In questa regione sono stati abbattuti, complessivamente, tra l'attività venatoria e l'attività di controllo, 25.725 cinghiali durante la stagione venatoria 2019/2020. In provincia di Parma e Piacenza, 513 cinghiali sono stati abbattuti durante i piani di controllo e 6.545 durante la caccia di selezione (BURERT n°362, 2021).

In conseguenza dell'aumento della popolazione di cinghiali, la caccia al cinghiale ed il conseguente consumo di carne sono divenute più popolari (Ruiz-Fons, 2017). A differenza degli animali da allevamento intensivo, il cinghiale vive libero nel suo ambiente naturale, soddisfacendo le proprie esigenze fisiologiche ed etologiche senza ricevere alcun tipo di trattamento farmacologico. Tutte queste caratteristiche sono sempre più ricercate ed apprezzate dall'opinione pubblica e quindi dai consumatori di carne (Bruckner, 2007).

Non per ultimo, la carne di cinghiale presenta caratteristiche uniche, non solo dal punto di vista nutrizionale essendo più magra, poiché presenta un minor contenuto di grasso intramuscolare rispetto a quella di suino (Sales e Kotrba, 2013), ma anche da un punto di vista sensoriale.

A fonte di un potenziale incremento nel consumo di queste carni, il contatto con cinghiali infetti ed il consumo di carne di cinghiale contaminata possono essere responsabili di casi di tossinfezioni alimentari (EFSA, 2013; Brown *et al.*, 2018), e pertanto rappresentare una minaccia crescente per la salute pubblica (Miller *et al.*, 2017).

Nella produzione igienica delle carni di selvaggina si possono riscontrare alcune lacune, dato che il processo di raccolta è generalmente condotto in un ambiente selvatico, non sempre ideale per la produzione di carne. In tale ambiente, gli animali possono essere più facilmente contaminati durante la caccia e le pratiche correlate, oppure il tempo o le condizioni per lavorarli rapidamente e correttamente subiscono grandi variazioni (Gomes-Neves *et al.*, 2021). Inoltre, la filiera di produzione è organizzata in diverse fasi che comportano la responsabilità di diversi individui che devono garantire la sicurezza della carne e una qualità igienica ottimale (Marescotti *et al.*, 2021). Infatti, alcune parti della filiera sono sotto il controllo dei cacciatori, altre sono gestite nei centri di raccolta e solo negli stabilimenti di lavorazione della selvaggina si esegue il controllo da parte del veterinario ufficiale, seguendo le stesse regole della produzione della filiera della carne "d'allevamento".

Nell'Unione Europea, il Regolamento (CE) 853/2004 stabilisce le norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale. In tale regolamento è specificato che le carcasse di selvaggina selvatica di grossa taglia debbano essere esaminate, a breve distanza di tempo dall'abbattimento, da una "persona formata", al fine di individuare caratteristiche che possano indicare che la carne presenti un rischio per la salute del consumatore.

Alcuni agenti patogeni zoonotici non inducendo lesioni macroscopicamente visibili e, quindi, identificabili dall'incaricato (persona formata) al controllo delle carcasse, non possono in alcun caso essere rilevati, con il rischio di diffondersi all'uomo attraverso il consumo o la manipolazione di queste carni. Inoltre, le ferite inflitte ai cinghiali, durante la caccia, spesso non interessano solamente regioni anatomiche con organi vitali, ma possono coinvolgere altre parti, dando luogo ad una potenziale diffusione dei microrganismi nell'intera carcassa. Ciò avviene soprattutto quando il proiettile causa la

rottura di visceri contaminati (per esempio, l'intestino) con conseguente fuoriuscita e potenziale diffusione del loro contenuto all'intera carcassa (Massei *et al.*, 2015).

Questo primo esame della carcassa di cinghiale da parte della "persona formata" viene spesso effettuato nei centri di raccolta della selvaggina, dotati di cella frigorifera (le carni di selvaggina selvatica di grossa taglia devono essere refrigerate ad una temperatura massima di +7°C). Le carcasse devono essere eviscerate il più presto possibile, private di stomaco e intestino e trasportate in un centro di lavorazione della selvaggina, dove veterinari ufficiali effettuano l'ispezione *post mortem* delle carcasse, in conformità del Regolamento (CE) 2019/627.

Tra i vari microrganismi responsabili di tossinfezioni alimentari secondarie al consumo di carne di selvaggina selvatica, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* spiccano per la loro importanza (Al Dahouk *et al.*, 2005; Wacheck *et al.*, 2010; Bonardi *et al.*, 2019; Bessi *et al.*, 2020; Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2020; Bassi *et al.*, 2021).

Salmonella spp. è l'agente patogeno più comunemente associato a focolai di intossicazione alimentare in Europa. I sierotipi più frequentemente segnalati sono *Salmonella enterica* sottospecie (subsp.) *enterica* sierotipo Enteritidis e sierotipo Typhimurium che rappresentano rispettivamente il 54,6% e il 11,4% degli isolati (EFSA ed ECDC, 2022). La situazione italiana è caratterizzata da un elevato numero di casi di salmonellosi segnalati nell'uomo, in confronto ai casi complessivi della UE, con la serovar Infantis come sierotipo più comunemente isolato (EFSA ed ECDC, 2021). *Salmonella* spp. è stata recentemente rilevata nei cinghiali europei, ad esempio in Spagna e in Germania (Methner *et al.*, 2018; Gil Molino *et al.*, 2019).

Un'altra grave patologia di origine alimentare è la yersiniosi, che vede coinvolti tutti i ceppi di *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* biotipi 1B e 2-5, con particolare riferimento ai sierotipi O:3, O:5,27, O:9, O:8 (Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2010). La maggior parte (98,1%) dei casi confermati in Europa, secondo gli ultimi rapporti EFSA, è causata da *Y. enterocolitica* (EFSA ed ECDC, 2022). Recenti studi europei hanno dimostrato che sia *Y. enterocolitica* e sia *Y. pseudotuberculosis* si isolano anche dai cinghiali (Magistrali *et al.*, 2014; Arrausi-Subiza *et al.*, 2016; Reinhardt *et al.*, 2018; Bonardi *et al.*, 2020), con una maggiore prevalenza nei soggetti più giovani (Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2009).

Nello specifico, la salmonellosi e la yersiniosi sono malattie umane soggette a notifica, comunemente associate a tossinfezioni alimentari, con un tasso di notifica annuale rispettivamente di 15,7 casi/100.000 abitanti e 1,9 casi/100.000 abitanti (EFSA ed ECDC, 2022). Queste patologie sono rispettivamente la seconda e la terza zoonosi più frequenti in Europa.

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è rivolto all'isolamento di patogeni a trasmissione alimentare (*Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*) sia nelle carcasse di cinghiale subito dopo l'abbattimento, sia prima della successiva macellazione nei centri di lavorazione della selvaggina. Inoltre, si è eseguito il rilevamento degli stessi patogeni nei linfonodi mesenterici degli animali abbattuti al fine di identificare la prevalenza di soggetti portatori e acquisire informazioni sul ruolo epidemiologico del cinghiale in termini di rischio per la salute pubblica.

1.2 Cinghiale

Phylum: Cordati

Subphylum: Vertebrati

Classe: Mammiferi

Superordine: Ungulati

Ordine: Artiodattili

Sottordine: Suiformi

Famiglia: Suidi

Sottofamiglia: Suini

Genere: *Sus*

Specie: *Sus scrofa* (Linnaeus, 1758)

Il cinghiale (*Sus Scrofa*) è un mammifero ungulato appartenente alla famiglia *Suidae*, dal quale sono derivate, attraverso un lungo processo di domesticazione, gran parte delle razze di maiali domestici ed inselvatichiti (Monaco *et al.*, 2003; Carnevali *et al.*, 2009).

Ancora incerta e non completamente chiara risulta la sistematica a livello sottospecifico, complicata dal fatto che l'uomo sia intervenuto incrociando popolazioni di cinghiali selvatici con i conspecifici domestici, creando ibridi, e che abbia introdotto, in zone estranee al loro areale originario, cinghiali evolutisi in aree geografiche differenti (Carnevali *et al.*, 2009). In modo particolare, il fenomeno dell'ibridazione ha portato alla nascita di non poche problematiche: maggior prolificità della specie, cambiamenti sul comportamento e maggior adattamento all'ambiente naturale (Massei *et al.*, 2000).

1.2.1 Morfologia

Il cinghiale si presenta come un animale di aspetto robusto, con corpo allungato, arti corti e testa lunga un terzo dell'intero corpo. Vista di profilo la testa è di forma triangolare, più affilata nella femmina rispetto al maschio. Altri elementi distintivi nel capo sono gli occhi portati posteriormente, piccoli ed infossati ed orecchie piccole e poco emergenti; la coda

risulta pendente con un ciuffo di peli all'estremità. Il corpo appare complessivamente più robusto nella parte anteriore che in quella posteriore e, nel maschio, è dotato di tre gibbosità: fronte, garrese e posteriore (Marsan, 1998).

Le dimensioni sono variabili e dipendenti dalle condizioni fisiche dei soggetti; la lunghezza corporea totale degli adulti varia da 60 a 100-150 cm e l'altezza al garrese dai 60 ai 90cm.

Il peso vivo del cinghiale adulto italiano solitamente rientra nel range 80-100 kg per i maschi e 50-70 kg per le femmine (Carradori, 2008). Tuttavia, le misure corporee di riferimento possono essere molto variabili essendo condizionate dalla sottospecie, l'età e le disponibilità alimentari.

L'identificazione del sesso in ambiente naturale non è sempre semplice; negli individui adulti i maschi si distinguono dalle femmine per la presenza degli organi sessuali evidenti e di alcune caratteristiche sessuali secondarie come il ciuffo di peli con cui termina la guaina del pene, i testicoli ben visibili solo negli individui con mantello estivo ed i canini, superiori ed inferiori, ben sporgenti all'esterno della cavità orale (Massei e Toso, 1993). Nelle femmine i canini sono molto meno sviluppati e poco visibili; nel periodo primaverile-estivo quelle che hanno partorito presentano le mammelle ingrossate e ben evidenti (Massei *et al.*, 2000) (Figura 1).

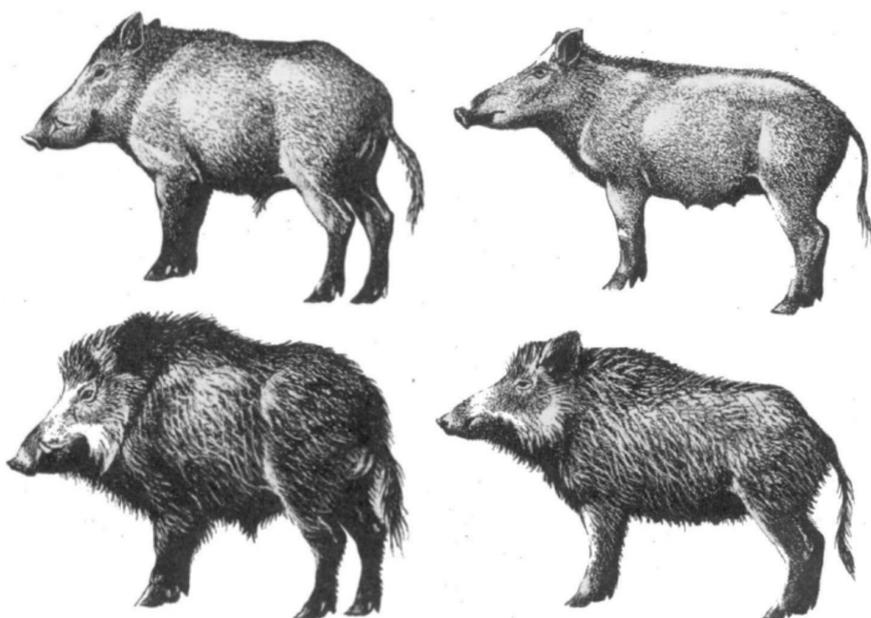


Figura 1. Riconoscimento del sesso in natura. Due esemplari di maschio adulto sulla sinistra e due esemplari di femmina adulta sulla destra (www.cilentoediano.it/biologia_del_cinghiale.pdf)

Anche la stagione caratterizza il mantello che subisce due mute annuali: in primavera-estate si presenta di colore grigio, con setole corte e sottili, mentre in autunno-inverno si presenta di colore bruno tendente al nero, con setole lunghe ed ispessite.

La dentatura dei cinghiali, importante per determinare l'età di un individuo, consta di 44 denti nell'animale adulto. I canini, grandi e sporgenti, a crescita continua, servono, oltre che come armi di difesa, per sbranare le carogne o per tagliare le radici e, nei maschi, per definire le gerarchie (Marsan, 1998). I premolari e molari sono molto robusti e sono importanti per triturare finemente il materiale ingerito, dal momento che il cinghiale è un ungulato monogastrico.

1.2.2 Classi di età

Per definire l'età dell'animale si può utilizzare come parametro il mantello che, cambiando nel tempo, ne permette un'agevole stima, fino al raggiungimento delle forme adulte. Di seguito sono riportate le quattro classi di età sulla base dei diversi mantelli:

- 1) *striati*: sono i nuovi nati, provvisti di una livrea a strisce longitudinali chiare e brune, che viene mantenuta fino a circa quattro mesi di vita;
- 2) *rossi*: caratterizzati da mantello di setole rossiccio e che rimane fino alla primavera successiva a quella della nascita;
- 3) *subadulti*: sono gli individui che si trovano nella fascia intermedia tra rossi e adulti, quindi con una età media compresa tra i 12 e i 23 mesi;
- 4) *adulti*: sono gli individui con età pari o superiore ai 24 mesi, caratterizzati da un mantello bruno più o meno scuro la cui tonalità dipende dalla popolazione di provenienza e risulta caratterizzata anche da un'ampia variabilità individuale (Massei e Toso, 1993) (Figura 2).

Gli individui striati e rossi appartengono alla stessa classe, denominata classe 0; i subadulti appartengono alla classe I; gli individui adulti appartengono alla classe II.

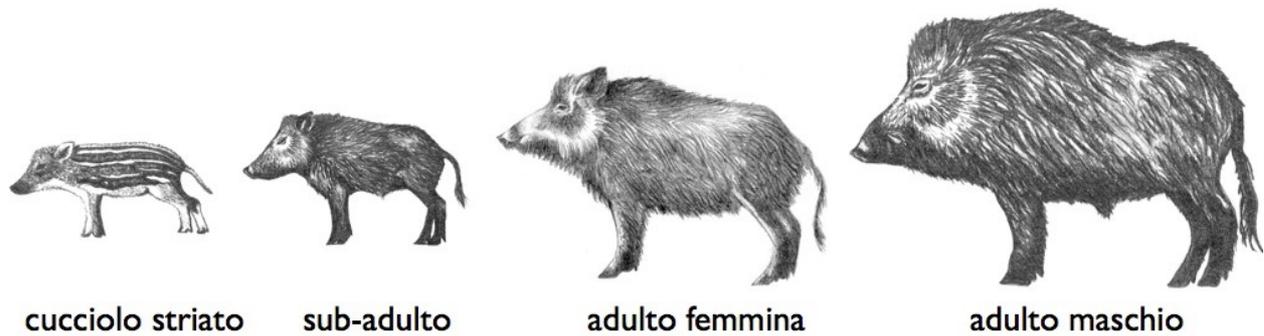


Figura 2. Riconoscimento classe d'età in natura (www.cilentoediano.it/biologia_del_cinghiale.pdf)

1.2.3 Alimentazione

Il cinghiale è onnivoro per eccellenza (Massei *et al.*, 2000), inoltre è in grado di modificare drasticamente la propria dieta in relazione alla disponibilità di cibo nei diversi ambienti e nelle varie regioni (Massei *et al.*, 2000). Essendo un monogastrico, di conseguenza la sua alimentazione deve essere integrata con proteine di origine animale, nonostante prediliga alimenti vegetali altamente energetici, come frutti, radici, tuberi e semi (ghiande, castagne, olive) (Massei e Genov, 2000). Tra le proteine di origine animale, le più frequenti sono quelle ottenute da larve ed insetti, piccoli roditori, uccelli e mammiferi, spesso sotto forma di carogne (Schley *et al.*, 2003).

1.2.4 Distribuzione

Il cinghiale ha un areale di diffusione che va dal continente euroasiatico alla parte settentrionale dell'Africa. A partire dalla seconda metà del secolo scorso la specie ha colonizzato vaste aree, sia dell'America del Nord che dell'America del Sud, ampi territori dell'Australia e alcune isole del Pacifico, in seguito al ritorno allo stato selvatico di suini domestici introdotti dagli europei e di piccoli gruppi di cinghiali, anche loro importati dal nostro continente (Massei e Toso, 1993). In Italia, come negli altri Stati europei, negli ultimi decenni si è assistito ad un incremento del numero degli individui, interessando interi settori geografici dove il cinghiale mancava dal secondo dopoguerra (Toso e Pedrotti, 2001).

Il cinghiale è oggi l'ungulato più diffuso in Italia, sia in termini distributivi che di consistenza, ed è la specie con la più alta capacità riproduttiva, se paragonato con gli altri Artiodattili selvatici della stessa taglia (Marsan, 1998). L'areale si estende per circa

190.000 Km², pari al 64% del territorio italiano. Il cinghiale è diffuso, senza soluzione di continuità, dalla Valle d'Aosta sino alla Calabria, in Sardegna, in Sicilia, isola d'Elba ed alcune piccole isole come frutto di immissioni assai recenti e, con modalità più frammentarie e discontinue, in alcune zone prealpine e dell'orizzonte montano di Lombardia, Veneto, Trentino-Alto Adige e Friuli-Venezia Giulia (Carnevali *et al.*, 2009).

Per quanto riguarda l'Emilia-Romagna, regione oggetto del presente studio, l'area frequentata dal cinghiale risulta ampia e diffusa lungo tutto l'arco appenninico, scemando verso i centri urbani, le pianure e la linea costiera (Figura 3).



Figura 3. Area di presenza del cinghiale in Emilia-Romagna. Rosso: presenza continuativa; blu: incursioni sporadiche (Piano faunistico venatorio regionale Emilia-Romagna 2018-2023).

1.2.5 Densità

Secondo una stima orientativa e largamente approssimata, sul territorio nazionale sarebbero presenti non meno di 900.000 capi (ISPRA, 2010).

In un recente studio, tramite un metodo geostatistico avanzato, si è stimata una densità che varia da 0,01 a 10,50 animali/km² sul territorio italiano (Figura 4). Ipotizzando una media di 5,25/301.230 km² (area italiana) si parlerebbe di circa 1,5 milioni di cinghiali (Pittiglio *et al.*, 2018).

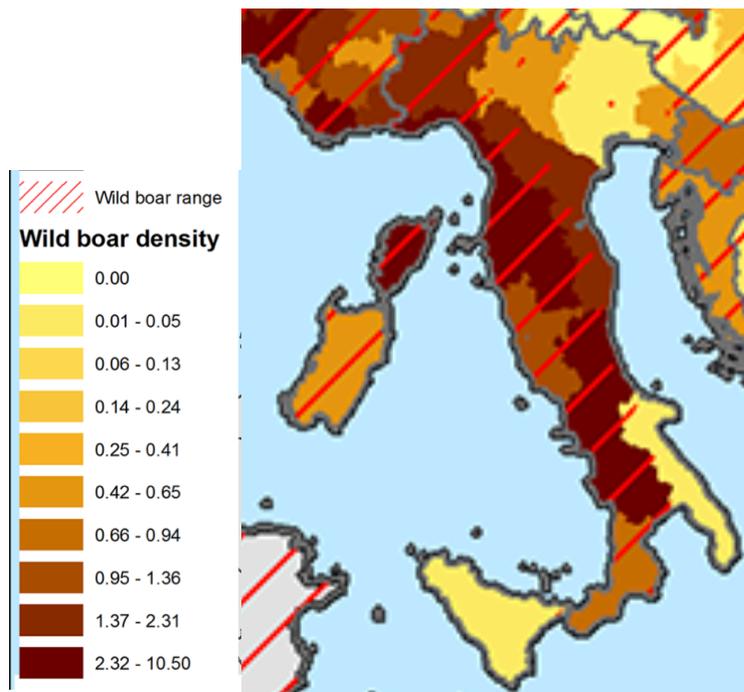


Figura 4. Densità del cinghiale in Italia (Pittiglio *et al.*, 2018).

1.2.6 Prelievi e gestione faunistica

Dal punto di vista giuridico, il cinghiale fa parte della fauna selvatica oggetto di tutela ai sensi della Legge 157/92 (art. 2, comma 1) ma, ai fini dell'esercizio venatorio, ne è consentito l'abbattimento nel periodo compreso tra il 1/10 ed il 31/12 o tra il 1/11 e il 31/01 (art. 18, comma 1, lettera d). La specie può inoltre essere sottoposta a piani di controllo numerico, autorizzati dalle Regioni e dalle Provincie, qualora si renda localmente responsabile di danni alle coltivazioni agricole o determini problemi di carattere sanitario (art.19, comma 2). I piani di controllo possono prescindere dai tempi e dalle modalità di prelievo stabiliti per la caccia, ma debbono essere attuati da personale appositamente autorizzato.

Il cinghiale, per effetto delle disposizioni della Legge Regionale e del Regolamento Ungulati, è cacciabile in Emilia-Romagna in forma selettiva dal 15/04 sino al 30/09 per tutte le classi e i sessi (fatta eccezione per le femmine adulte accompagnate, in aree a gestione conservativa) e dal 2/10 al 31/03 per tutti i sessi e le classi di età. Inoltre, il cinghiale risulta cacciabile in forma collettiva con le tecniche della *braccata* e della *girata* dal 2/10 al 30/01 (con tutte le eccezioni del caso). La braccata e la girata sono tecniche di caccia al cinghiale che prevedono l'azione combinata di uomini e di cani, constano di quattro fasi diverse: la tracciatura (eseguita coi cani lungo tutto il perimetro di un'area

scelta), la disposizione delle poste (dove si colloca il cacciatore), lo scovo e l'abbattimento. La differenza tra le due tecniche si evidenzia esclusivamente per il numero dei partecipanti e il numero di cani utilizzati (solo un cane specialista abilitato nella girata), maggiore nel primo caso. (Calendario venatorio 2020/2021, Emilia-Romagna; Carradori, 2008). Il suide è, in aggiunta, oggetto di consistenti abbattimenti effettuati in regime di piano di limitazione numerica, ai sensi dell'art. 19 della Legge Nazionale.

Durante la stagione venatoria 2019-2020, complessivamente sono stati abbattuti 25.725 cinghiali nella regione Emilia-Romagna (BURERT n° 362, pag. 102, anno 2021).

1.2.7 Consumo di carne di selvaggina in Italia

Il consumo pro capite annuo di carne di selvaggina in Italia è stimato in 0,1-0,3 kg, a seconda della regione, ma diventa più elevato se riferito ai cacciatori. In quest'ultimo caso il consumo può raggiungere infatti 1,0-4,0 kg (Ramanzin *et al.*, 2010). La carne degli ungulati selvatici è un alimento ricco di nutrienti con basso contenuto di grassi, un corretto rapporto tra acidi grassi polinsaturi (PUFA) e acidi grassi saturi (SFA), una giusta proporzione PUFA $\omega 6/\omega 3$ e un buon contenuto di acido linoleico coniugato (Zomborszky *et al.*, 1996; Summer *et al.*, 1997; Secchiari *et al.*, 2001; Ramanzin *et al.*, 2010). La carne di cinghiale, in particolare, è stata confrontata con quella del maiale domestico, risultando meno grassa e con un migliore rapporto PUFA/SFA (Marsico *et al.*, 2007; Ramanzin *et al.*, 2010; Barbani *et al.*, 2011; Sales e Kotrba, 2013). Oltre all'attività fisica, la dieta è considerata il principale fattore che induce questa differenza; infatti, sia nel cinghiale che nel maiale, l'assunzione di acidi grassi è direttamente legata alla loro concentrazione nei muscoli e nel tessuto adiposo (Nürnberg *et al.*, 1998; Wood *et al.*, 2008).

Si presume che il consumo pro capite annuo possa aumentare ulteriormente dato che, al giorno d'oggi, i consumatori sono sempre più attenti al benessere animale, talvolta disatteso nelle pratiche di allevamento intensivo, e la carne di selvaggina si presta ad avere un valore etico superiore.

1.2.8 Aspetti sanitari

Attualmente il cinghiale è una delle specie selvatiche maggiormente problematica dal punto di vista sanitario. Una delle principali cause è dovuta al fatto che il cinghiale ed il suino domestico, in quanto appartenenti alla stessa specie, sono recettivi alle stesse

malattie (Monaco *et al.*, 2003). Per questo motivo, l'aumento dell'allevamento all'aperto di animali domestici destinati alla produzione alimentare può far aumentare il rischio di contatto tra animali domestici e selvatici, e quindi la trasmissione di agenti patogeni a questi ultimi (Ruiz-Fons *et al.*, 2017). Molte sono le infezioni che colpiscono il cinghiale: il microrganismo della peste suina africana (Sauter-Louis *et al.*, 2021); della malattia di Aujeszky (Müller *et al.*, 2021); della tubercolosi (Muñoz-Mendoza *et al.*, 2013); della brucellosi (Montagnaro *et al.*, 2020); della leptospirosi (Cilia *et al.*, 2020); il virus dell'Epatite E (Bonardi *et al.*, 2020); *Toxoplasma gondii* (Bier *et al.*, 2020); *Salmonella* spp. (Sanno *et al.*, 2018); *Yersinia* (Bonardi *et al.*, 2020). Secondo Wiethoelter, sulla base dei dati pubblicati in letteratura, tra le prime 10 malattie zoonotiche dell'interfaccia fauna selvatica/zootecnica, ritroviamo la salmonellosi, la brucellosi, la toxoplasmosi, la trichinellosi, la leptospirosi e la tubercolosi (Wiethoelter *et al.*, 2015).

In Europa i più importanti patogeni zoonotici di origine alimentare, trasmessi dalla carne suina all'uomo, sono *Salmonella* spp., *Yersinia*, *Toxoplasma* e *Trichinella* (EFSA ed ECDC, 2011; Felin *et al.*, 2015). Essendo questi microrganismi presenti anche nei cinghiali, si deduce che possano esser trasmessi all'uomo, direttamente attraverso il contatto con cinghiali infetti o con le loro carcasse e frattaglie, oppure attraverso la manipolazione e il consumo di carne di cinghiale contaminata (Ruiz-Fons *et al.*, 2017; Brown *et al.*, 2018). Esiste anche una forma di trasmissione indiretta che può avvenire attraverso l'acqua, tipicamente quella dei bacini di irrigazione, o gli alimenti vegetali contaminati dalle feci di cinghiali infetti (Cummings *et al.*, 2016).

La trasmissione di origine alimentare è la forma che maggiormente interessa ai fini di questo studio, poiché la caccia al cinghiale e il consumo di carne di cinghiale sono in aumento, determinando quindi maggiori possibilità di esposizione diretta dell'uomo alle zoonosi da cinghiale (Sannö *et al.*, 2018). Il rischio di esposizione è infatti influenzato dalle abitudini alimentari, come il consumo di carne di cinghiale poco cotta o di salsicce di cinghiale stagionate e fermentate o altri prodotti a base di carne, che sono diffuse tra i consumatori di carne di selvaggina (Miller *et al.*, 2017).

1.2.9 Controllo dei patogeni zoonotici di origine alimentare provenienti dai cinghiali

I cinghiali, come ripetuto in precedenza, possono rappresentare una minaccia per la salute pubblica e animale, soprattutto nelle aree in cui la densità di popolazione è elevata. Ciò solleva preoccupazioni per l'esposizione diretta e indiretta dell'uomo ad agenti zoonotici (Touloudi *et al.*, 2015; Franco-Paredes *et al.*, 2017) ed è per questo motivo che si è reso necessario prevenire il contatto tra cinghiali e animali domestici, soprattutto suini.

Le condizioni di stabulazione controllata negli allevamenti di suini riducono il rischio di esposizione alle infezioni trasmesse dai cinghiali (Kärssin *et al.*, 2016); tuttavia, l'allevamento all'aperto potrebbe aumentare a causa della domanda pubblica di una produzione animale più etica e naturale e di prodotti a base di carne di qualità superiore (Murrell, 2016; Jori *et al.*, 2017). Di conseguenza, gli allevamenti di suini che abbiano accesso all'aperto, in aree con popolazioni di cinghiali ad alta densità, dovrebbero applicare pratiche di biosicurezza idonee per evitare il contatto tra gli animali allevati e i cinghiali (Pearson *et al.*, 2016).

La caccia si rende necessaria per il mantenimento di una bassa densità di popolazione di cinghiali e controllare così la diffusione di patogeni intra-specie e diminuire il rischio di trasmissione di patogeni dai cinghiali al bestiame e all'uomo (Cano-Manuel *et al.*, 2014).

Le carcasse e le frattaglie di cinghiale non dovrebbero essere lasciate sul campo durante la caccia e la tolettatura, perché possono essere fonte di infezione per gli animali selvatici e domestici. Il corretto smaltimento dei rifiuti di caccia, come stomaco e intestino che vanno rapidamente rimossi dal corpo degli animali, è altresì molto importante per controllare le malattie dei cinghiali e la trasmissione di patogeni ad altri animali da pascolo destinati alle produzioni alimentari (Cano-Terriza *et al.*, 2018; Carrasco-Garcia *et al.*, 2018).

Una buona igiene venatoria, soprattutto durante l'eviscerazione sul campo, è essenziale per controllare la diffusione di batteri zoonotici di origine alimentare provenienti dai cinghiali e quindi per la sicurezza della carne (Franco-Paredes *et al.*, 2017). Le persone coinvolte nelle attività di caccia sono le più a rischio e devono essere formate sui potenziali rischi di zoonosi e sull'importanza di una corretta e attenta manipolazione delle carcasse (Holzbauer *et al.*, 2014).

I requisiti di sicurezza delle carni di selvaggina nella UE sono disciplinati dai Regolamenti (CE) 178/2002, 852/2004, 853/2004 e 2019/627 per quanto riguarda la responsabilità, la tracciabilità e la sicurezza delle carni di selvaggina, garantendo un controllo il più possibile sovrapponibile a quello delle carni degli animali domestici. Tuttavia, alcune fasi critiche non vengono affrontate da questi regolamenti, anche se sono considerate fondamentali per garantire la sicurezza e la qualità della carne di selvaggina cacciata. Ad esempio, il tempo che intercorre tra lo sparo e l'eviscerazione deve essere il più breve possibile. Dopo che una persona esperta, definita "persona formata" in quanto deve aver seguito appositi corsi di formazione istituiti dall'Autorità Competente, ha valutato l'assenza di comportamenti anomali nell'animale ancora in vita e di lesioni macroscopiche, la carcassa deve essere trasportata il prima possibile ad uno stabilimento di lavorazione dove deve essere raffreddata a un massimo di +7° C. Risulta fondamentale evitare la contaminazione dei muscoli con residui provenienti dal tratto gastrointestinale eventualmente rimasti nell'addome e, allo stesso tempo, prevenire la contaminazione attraverso la pelle e il pelo.

L'ispezione veterinaria *post mortem* della carcassa, ed eventualmente dei visceri che accompagnano la carcassa qualora la persona formata avesse rilevato anomalie, è svolta dal veterinario ufficiale o da un assistente ufficiale, sotto la supervisione o la responsabilità del veterinario ufficiale (articolo 18, Regolamento (CE) 2017/625), è necessaria per dichiarare la carne idonea al consumo umano e quindi commercializzabile (articolo 12-14 e 28, Regolamento (CE) 2019/627).

Inoltre, ciò che ancora manca per le carni di selvaggina sono i criteri di igiene di processo stabiliti dal Regolamento (CE) 2073/2005, applicato alle carni di ungulati domestici. L'assenza di criteri microbiologici per le carni di selvaggina ostacola qualsiasi tipo di controllo igienico e di sicurezza da parte dell'Autorità competente e non supporta le azioni di autocontrollo da parte degli Operatori del settore alimentare.

I consumatori di carne di cinghiale devono essere informati dei potenziali rischi di malattie alimentari e dell'importanza di una corretta manipolazione e cottura della carne di cinghiale ad una temperatura adeguata (temperatura interna tra 70° C e 75° C); mani, coltelli, attrezzature e superfici di lavorazione e preparazione devono essere

accuratamente lavate e sanificate per evitare cross-contaminazione (Holzbauer *et al.*, 2014).

Si raccomanda altresì di evitare il consumo di salsicce e salami crudi di cinghiale (soprattutto prodotti a breve stagionatura con elevata attività dell'acqua) (Turiac *et al.*, 2017), mentre il congelamento della carne prima del trattamento termico rappresenta un passo efficace per ridurre il rischio di infezioni trasmesse dalla carne.

1.3 *Salmonella* spp.

1.3.1 Etimologia

Il termine *Salmonella* è stato ufficialmente accettato nel 1930 dal Comitato internazionale per la tassonomia e deriva dal nome del batteriologo e veterinario statunitense D.E. Salmon (1850-1914) che aveva per primo descritto, nel 1884, un batterio della “peste suina”, poi assunto come specie tipo del genere *Salmonella*, con il nome di *Salmonella Cholerae suis*. Da allora si sono succedute numerosissime revisioni e modifiche del sistema di classificazione (Ajmera *et al.*, 2022).

1.3.2 Microrganismo

Il genere *Salmonella* (Figura 5) appartiene alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, include microrganismi Gram negativi, di forma bastoncellare, che misurano tipicamente 0,7-1,5 x 2,0-5,0 micrometri, aerobio-anaerobi facoltativi, asporigeni, catalasi positivi, ossidasi negativi,



Figura 5. Immagine di *Salmonella* spp. al microscopio elettronico (Brower/CDC, 2013)

prevalentemente lattosio e indolo negativi che crescono sui comuni terreni anche in presenza di sali biliari, generalmente mobili per la presenza di flagelli peritrichi, ad eccezione di *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Pullorum, che sono immobili (Lopes *et al.*, 2016).

La famiglia delle *Enterobacteriaceae* comprende numerosi generi di interesse sanitario, come riportato in tabella 1. L'identificazione di genere viene effettuata principalmente tramite l'utilizzo di test biochimici che permettono di individuare le differenze all'interno della famiglia. Questi test si basano, nella maggior parte dei casi, sulla capacità di utilizzare determinati substrati, di reagire in presenza di particolari enzimi, di produrre specifici prodotti metabolici e di fermentare particolari zuccheri.

Principali caratteri differenziali	Genere								
	<i>Salmonella</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Proteus</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Citrobacter</i>
Mobilità	-	-	+	+	+	-	+	-	+
Produzione di H ₂ S	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Voges-Proskauer	-	+	+	+	V	-	-	-	-
Produzione di indolo	-	-	-	V	V	V	+	+	-
β-galattosidasi	-	+	+	+	-	+	+	V	+
Ureasi	-	+	-	V	+	V	-	-	V
Lisina decarbossilasi	+	+	+	+	-	V	V	-	-
Fermentazione lattosio	-	+	+	V	-	V	+	-	+
Fermentazione saccarosio	-	+	+	+	V	V	V	-	V

V variabile; + positivo; - negativo

Tabella 1. Caratteristiche biochimiche dei principali generi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Graziani *et al.*, 2005).

1.3.3 Tassonomia

Lungo tutto il XX secolo, si sono succedute varie fasi per arrivare all'odierna tassonomia di *Salmonella*. Una prima classificazione si basava sull'espressione clinica dell'infezione: gli isolati di *Salmonella* venivano considerati come specie distinte, a cui veniva attribuita una nomenclatura che faceva riferimento alla patologia di cui si presumeva fossero specificatamente causa, o all'ospite da cui venivano isolate.

Successivamente, a partire dagli anni '30 del secolo scorso, lo studio degli antigeni somatici (O) e flagellari (H), iniziato da White e portato avanti da Kauffmann, portò alla descrizione di un enorme numero di sierogruppi e sierotipi all'interno del genere *Salmonella*, a sua volta suddiviso, su base biochimica, in quattro *subgenera* (I, II, III, IV) (Tabella 2) (Kauffmann *et al.*, 1966; D'Aoust e Maurer, 2007).

Test	I	II	III	IV
Fermentazione dulcete	+	+	-	-
Fermentazione lattosio	-	-	+	-
Fermentazione salicina	-	-	-	+
Fermentazione malonato	-	+	+	-
Crescita in terreno KCN	-	-	-	+

Tabella 2. Prove biochimiche per differenziare i sottogeneri di *Salmonella* spp. (Kauffmann *et al.*, 1966)

Negli anni '80 Le Minor e Popoff conducono un'analisi genotipica e fenotipica del genere *Salmonella*, permettendo di differenziare le sottospecie del microrganismo e differenziare

la specie *S. enterica* da *S. bongori*. Gli autori concludono che tutti i sierotipi, un tempo inclusi nei quattro *subgenera* di Kauffmann, appartengano ad un'unica specie, denominata *Salmonella enterica* (Le Minor e Popoff, 1987). La specie *enterica* è a sua volta suddivisa in sei sottospecie: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtanae*, *indica*. Ogni sottospecie possiede a sua volta numerosi sierotipi, o serovar.

La classificazione è riportata sinteticamente nella tabella 3: il nome proprio, per identificare i sierotipi, è ammesso solo per i sierotipi della subspecie *enterica*, più frequentemente implicati nella patologia umana, mentre i sierotipi appartenenti alle altre subspecies sono indicati con la formula antigenica. Il nome del sierotipo è scritto in maiuscolo e non in corsivo, contrariamente al nome di specie che va scritto in minuscolo e in corsivo (Ryan *et al.*, 2017).

Test	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
	I	II	IIIa	IIIb	IV	VI	V
Fermentazione:							
<i>dulcitate</i>	+	+	-	-	-	+/-	+
<i>lattosio</i>	-	-	-	+	-	+/-	-
<i>salicina</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>sorbitolo</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>malonato</i>	-	+	+	+	-	-	-
<i>d(+)</i> tartrato	+	-	-	-	-	-	-
Crescita in terreno KCN	-	-	-	-	+	-	+
ONPG	-	-	-	+	-	+/-	+

Genere <i>Salmonella</i>		Corrispondenza con lo schema di Kauffmann-White	N° sierotipi	Habitat naturale	Esempi di sierotipi
Specie <i>S. enterica</i>					
	subsp. <i>enterica</i> (I)	I subgenus	1586	Vertebrati a sangue caldo (uomo incluso)	Typhi, Typimurium, Enteritidis
	subsp. <i>salamae</i> (II)	II subgenus	522	Vertebrati a sangue freddo e ambiente	9,46;z:z39
	subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	III subgenus	102		43:z29:-
	subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)		308		6,7:l,v:1,5,7
	subsp. <i>houtanae</i> (IV)	IV subgenus	76		21:m,t:-
	subsp. <i>indica</i> (VI)	non definibile	13		59:z36:-
Specie <i>S. bongori</i>					
	subsp. V	V subgenus	22		

Tabella 3. Classificazione del genere *Salmonella* secondo lo schema di White-Kauffman-Le Minor (Grimont e Weill, 2007).

La classificazione dei sierotipi di *Salmonella* secondo lo schema di White-Kauffmann-Le Minor è soggetta ad aggiornamenti annuali curati dal Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* dell'Organizzazione Mondiale della Sanità presso l'Istituto Pasteur di Parigi, con cui collaborano vari laboratori di riferimento internazionali. L'ultimo aggiornamento risale al 2014 e riporta l'esistenza di 2659 sierotipi nel genere *Salmonella*: 2639 in *S. enterica* e 22 in *S. bongori* (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014; Ryan *et al.*, 2017).

1.3.4 Struttura antigenica e sierotipizzazione

La cellula batterica di *Salmonella* possiede numerosi antigeni (D'Aoust e Maurer, 2007), tra questi, quelli più importanti per la classificazione su base sierologica e per la patogenicità sono:

- 1) antigeni O (somatici) di natura polisaccaridica, combinati con un lipide a formare un complesso liposaccaridico (responsabili della tossicità). Termostabili, resistono alla temperatura di 100° C fino a 2 ore e sono resistenti all'azione di acidi e alcool (Ryan *et al.*, 2017). Nello schema di Kauffmann-White i sierogruppi sono definiti in base alla specificità dell'antigene somatico; si conoscono 67 diversi antigeni O, indicati con numeri arabi; da O:2 A O:67;
- 2) antigeni H (ciliari o flagellari) di natura proteica, vengono denaturati alla temperatura di 100 °C e sono sensibili all'alcool. Ciascun isolato può presentare gli antigeni H in due fasi, chiamate fase 1 (o specifica, perché propria di quel sierotipo) e fase 2 (o aspecifica, perché comune a più sierotipi). Le fasi 1 e 2 possono essere presenti contemporaneamente (sierotipo bifasico, anche se frequentemente una *Salmonella* bifasica sviluppa in prevalenza una sola delle due fasi), o può essere presente una sola delle due fasi (sierotipi monofasici); molto raramente sono osservati sierotipi trifasici. Gli antigeni H di fase 1 vengono indicati da lettere alfabetiche minuscole (a, b, c, ecc.), mentre quelli di fase 2 vengono indicati da numeri arabi e lettere (1, 2, 2, e, n, x, ecc.);
- 3) antigeni K (capsulari) di natura polisaccaridica, denaturati dalla temperatura di 60 °C per un'ora. Il più noto è l'antigene Vi ("virulenza"), tipico di *S. Typhi*, ma presente anche in *S. Paratyphi C* e *S. Dublin*. L'antigene Vi ha la caratteristica di mascherare gli antigeni O, eludendo il sistema immunitario.

La prova sierologica più comunemente utilizzata per identificare i ceppi di *Salmonella* è

quella dell'agglutinazione, basata sul fatto che una miscela di anticorpi monoclonali reagiscano contro gli antigeni di *Salmonella* sopra descritti, creando una reazione antigene-anticorpo chiaramente visibile tramite la formazione di agglutinati.

1.3.5 Caratteristiche colturali

Le condizioni ottimali di crescita, per *Salmonella*, sono rappresentate da una temperatura di 37°C e un valore di pH pari a 6.5-7.5, ma il microrganismo è in grado di moltiplicarsi tra i 5°C e i 54°C e in un intervallo di pH compreso tra 3.8 e 9.5 (Adley *et al.*, 2016; Ryan *et al.*, 2017). Il valore di attività dell'acqua (a_w) necessaria per lo sviluppo deve essere almeno pari a 0.94 (Ryan *et al.*, 2017). Diversamente da quanto osservato per altri generi della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, il congelamento in acqua e la presenza di alcune sostanze chimiche (ad esempio, verde brillante, tetrionato di sodio e sali biliari) non risultano inibenti nei confronti di *Salmonella* spp.; quest'ultima caratteristica è alla base di alcune tecniche per l'isolamento selettivo di questi microrganismi da diverse matrici organiche (Ryan *et al.*, 2017). Le salmonelle non tollerano elevate concentrazioni di sale, e a valori superiori al 9% è stato riportato un effetto inibente sulla loro crescita (Jay, 2009). Disinfettanti a base di cloro e iodio risultano efficaci nei confronti di *Salmonella* (Bell *et al.*, 2002). Per quanto riguarda l'inattivazione con il calore si è visto che tutte le salmonelle vengono inattivate alla temperatura di pastorizzazione del latte (72° C per 15 secondi) (Jay, 2009).

Salmonella spp. cresce facilmente sui comuni terreni sintetici, sia liquidi che solidi. Nei terreni liquidi, come ad esempio nel Buffered Peptone Water (BPW), si sviluppa una torbidità uniforme dopo 18-24 ore d'incubazione a 37°C. Su Agar sangue le colonie raggiungono dimensioni leggermente maggiori rispetto ai comuni terreni solidi e non presentano emolisi. In alcuni casi, si osservano salmonelle a crescita lenta, con colonie del diametro di 0,5-1 mm, tendenti a rimanere tali anche dopo prolungata incubazione. Si tratta delle cosiddette colonie "nane", tipiche quasi esclusivamente di stipiti di *Salmonella* "ospite adattata" più difficili da coltivare (tra cui *S. Choleraesuis*, *S. Abortusequi*, *S. Abortusovis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*). Colonie di dimensioni maggiori si possono ottenere aggiungendo al terreno colturale sodio tiosolfato allo 0,1% (metodo applicabile per le sub-colture in terreni non selettivi), oppure incubando per ulteriori 24 ore le piastre dei terreni di primo isolamento che mostrano microcolonie sospette. Sui terreni solidi selettivi e/o differenziali le colonie si presentano con diametro inferiore e colorazioni

diverse a seconda dei componenti del terreno. Trattandosi di terreni contenenti sostanze inibenti, dopo incubazione a 37°C per 24 ore il numero di colonie formate diminuisce di un logaritmo rispetto a terreni non selettivi presi a paragone. In provette di Kligler Iron Agar, seminate per infissione e successivo strisciamento, *Salmonella* cresce in genere abbondantemente, mostrando uno “slant” alcalino in superficie, dovuto ad un attacco catabolico dei peptoni con produzione di ione ammonio e viraggio dell’indicatore rosso fenolo verso il rosso, ed un fondo acido (giallo), mascherato dalla formazione di solfuro di ferro nero (reazione H₂S positiva), accompagnato spesso da bolle di gas originato dalla fermentazione del glucosio (Guthrie, 1992).

1.3.6 Caratteristiche biochimiche

Le caratteristiche biochimiche tipiche, utilizzate per identificare *Salmonella*, includono la produzione di idrogeno solforato, la decarbossilazione di lisina e ornitina e la mancata idrolisi dell'urea (Tabella 4) (D’Aoust e Maurer, 2007; Ryan *et al.*, 2017).

Reazione	Risultato
Produzione di indolo	-
Idrolisi dell’urea	-
Rosso metile	+
Voges-Proskauer	-
Riduzione dei nitrati	+
Fermentazione del glucosio con produzione di gas	+
Produzione di H ₂ S	+
Fermentazione del lattosio	-
Fermentazione del saccarosio	-
Fermentazione della salicina	-
Fermentazione dell’adonite	-
Fermentazione del mannitolo	+
Fermentazione del maltosio	+
Fermentazione dell’inosite	-
Fermentazione del sorbitolo	+
Presenza dell’enzima gelatinasi	-
Sviluppo con NH ₄ citrato	+
Sviluppo in presenza di KCN	-

Tabella 4. Caratteristiche biochimiche di *Salmonella* (Ryan *et al.*, 2017).

1.3.7 Epidemiologia

Da un punto di vista epidemiologico, *Salmonella* presenta serovar adattate all’ospite (specie-specifiche) e serovar non ospite-adattate. Gli stipti di *Salmonella* ospite-adattate riescono prevalentemente ad infettare una sola specie animale nella quale provocano

generalmente una malattia con sintomatologia conclamata, setticemica, spesso grave. Di questo gruppo fanno parte i sierotipi *S. Gallinarum* per il pollame, *S. Dublin* per i bovini, *S. Abortusovis* per gli ovini, *S. Abortusequi* per gli equidi, *S. Choleraesuis*, *S. Typhisuis* e *S. Derby* per i suini (quest'ultima decorre più frequentemente in forma asintomatica), *S. Typhi* e *S. Paratyphi A e C* per l'uomo. Il concetto che le sierovarianti adattate ad un ospite specifico non causino malattia in altri ospiti, alla luce delle attuali conoscenze, va modificato, come nel caso di *S. Choleraesuis* e *S. Derby*, tradizionalmente ospite-specifiche per il suino, che tendono a infettare anche l'uomo (Bangtrakulnonth *et al.*, 2004; Bonardi, 2017).

Le sierovarianti di *Salmonella* non adattate all'ospite non presentano alcuna specificità d'ospite e sono quindi in grado di infettare sia l'uomo, sia diverse specie animali. Ubiquitarie, possono causare forme morbose di gravità estremamente variabile a seconda del sierotipo, della dose infettante, delle modalità di infezione e delle caratteristiche intrinseche all'ospite (età, specie, stato immunitario, etc.) (Rondanelli *et al.*, 2005). Queste sierovarianti rivestono un grande interesse perché sono causa di tossinfezioni alimentari nell'uomo.

L'habitat primario di *Salmonella* spp. è rappresentato dal tratto intestinale dell'uomo e degli animali d'allevamento. Può essere presente anche nel tratto intestinale di uccelli e animali selvatici, rettili e, occasionalmente, insetti (Jay *et al.*, 2009). Il microrganismo viene eliminato tramite le feci, distribuendosi nell'ambiente; *Salmonella* è molto comune nelle acque reflue, attraverso le quali può diffondersi in ambienti acquatici come torrenti, fiumi, laghi o artificialmente tramite l'irrigazione e rappresentare una fonte di contaminazione del suolo e, di conseguenza, anche dei vegetali (Lemarchand *et al.*, 2002). L'ambiente rappresenta un ottimo serbatoio di mantenimento per molti sierotipi e *Salmonella* è in grado di sopravvivere per lunghi periodi, fino a nove mesi, nell'ambiente esterno se si trova in substrati come acqua, feci o mangimi (Markey, 2013).

Nel presente lavoro di tesi, si pone l'attenzione sul ruolo del cinghiale quale serbatoio di *Salmonella*; data la sua natura onnivora, il cinghiale può essere esposto a patogeni di origine animale, come *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (Gortàzar *et al.*, 2007; Bonardi *et al.*, 2019).

Si è stimato che il 95% dei casi di salmonellosi umana siano di origine alimentare

(Cianflone, 2008). I principali veicoli alimentari di infezione sono rappresentati dalla carne, dalle uova e dal latte, ma la diffusione ubiquitaria e la capacità di crescita di questi batteri a temperature comprese fra 5° C e i 54° C fa sì che un alimento manipolato o conservato in modo non corretto possa essere veicolo di infezione (Cianflone, 2008).

1.3.8 Patogenesi

La patogenesi delle infezioni da *Salmonella* è un fenomeno complesso e multifattoriale. La via di trasmissione avviene principalmente attraverso l'ingestione di alimenti o acqua contaminati (Bueno *et al.*, 2012). Una volta ingerito, il batterio colonizza l'intestino, invade la mucosa intestinale e induce un'inflammatione locale che culmina con degenerazione e distacco degli enterociti, provocando diarrea, e passaggio ai linfonodi mesenterici e al circolo ematico, causando stati settici (Darwin *et al.*, 1999).

Le manifestazioni cliniche dipendono da molti fattori, quali il numero di batteri ingeriti, la virulenza del ceppo e le condizioni immunitarie dell'ospite.

Salmonella spp. possiede diversi fattori di virulenza, necessari ad attuare tutte le varie fasi dell'infezione:

- 1) sistemi di difesa che permettono la sopravvivenza in ambienti a pH acido, utili per superare la barriera gastrica (Slauch *et al.*, 1997): il microrganismo attiva la risposta di tolleranza all'acido (ATR), che mantiene il pH intracellulare più alto di quello extracellulare (Fàbrega *et al.*, 2013);
- 2) fattori che intervengono al momento della colonizzazione dell'intestino, permettendo al batterio di aderire alle cellule del lume intestinale (Bäumler *et al.*, 1997): l'adesione di *Salmonella* all'epitelio è ottenuta grazie all'interazione ospite-recettore con molti dei fattori di adesione presenti sulla sua superficie cellulare (Lopez *et al.*, 2012);
- 3) fattori di invasività che eludono le difese dell'ospite e che consentono di attraversare l'epitelio intestinale e permettere una diffusione sistemica del patogeno; sono per lo più proteine effettrici immesse dal microrganismo nel citosol della cellula ospite, che permettono l'internalizzazione del batterio (Bonardi *et al.*, 2008)
- 4) fattori antifagocitari che impediscono la digestione del patogeno, l'opsonizzazione e l'attivazione a cascata del complemento (Bassi *et al.*, 2008)

- 5) fattori tossici: le esotossine (sintetizzate *ex novo* dal microrganismo) e le endotossine (parte integrante della parete batterica dei Gram negativi) (Bassi *et al.*, 2008).

Ognuno di questi fattori di virulenza è codificato da geni localizzati in più loci cromosomali specifici, denominati isole di patogenicità (indicate con l'acronimo SPI, *Salmonella* Pathogenicity Island), mentre altri sono associati a plasmidi di virulenza (D'Aoust e Maurer, 2007). SPI-1 e SPI-2 sono le più studiate e quelle di cui si conoscono meglio struttura e funzioni: SPI-1 è principalmente implicata nei processi di invasione della mucosa intestinale, mentre SPI-2 influenza la virulenza sistemica, permette la sopravvivenza e la moltiplicazione del batterio all'interno dei macrofagi (Ehrbar *et al.*, 2003; Hensel, 2004; Sabbagh *et al.*, 2010). Nelle due isole di patogenicità SPI-1 e 2 sono localizzati i geni che codificano per le proteine coinvolte nella formazione del Sistema di Secrezione di Tipo III (Type Three Secretion System, TTSS), che permette ai patogeni Gram-negativi di trasportare proteine effettrici dal citosol batterico all'interno del citoplasma della cellula ospite. È stato dimostrato che i batteri del genere *Salmonella* possiedono due sistemi TTSS, denominati TTSS-1 e TTSS-2 (Hensel, 2004; Velge *et al.*, 2012).

Salmonella, a livello intestinale, viene fagocitata da parte di cellule dendritiche che la trasportano nella lamina propria e, successivamente, verso fegato e milza, per via linfematogena; inoltre, i batteri del genere *Salmonella* sono caratterizzati dalla capacità di aderire, tramite le fimbrie e le adesine, e di invadere sia le cellule M delle placche di Peyer sia gli enterociti, tramite il sistema TTSS-1. Mediante il TTSS-1, essi traslocano, nel citoplasma delle cellule invase, particolari proteine effettrici denominate Sop (*Salmonella* outer proteins), quali SopE, SopE2, SopD e SopB. Le proteine Sop causano cambiamenti nella struttura del citoscheletro della cellula intestinale (Lopez *et al.*, 2012). Queste modifiche portano alla formazione di estensioni di membrana, note come "ruffles" (Eng *et al.*, 2015), che favoriscono l'internalizzazione della cellula batterica (Bueno *et al.*, 2012). In aggiunta le Sop provocano infiammazione intestinale, con perdita di ioni cloro e secrezione di fluidi nel lume intestinale e conseguente diarrea di tipo secretorio (Ehrbar *et al.*, 2003; Velge *et al.*, 2012).

Una volta penetrati negli enterociti o nelle cellule M, i batteri continuano l'esportazione di

proteine effettrici tramite il sistema TTSS-2 e determinano la formazione di una particolare struttura, chiamata *Salmonella* containing vacuoles (SCV), che ha una funzione di protezione dall'azione tossica dei leucociti e nella quale si moltiplicano (Steele- Mortimer *et al.*, 2008).

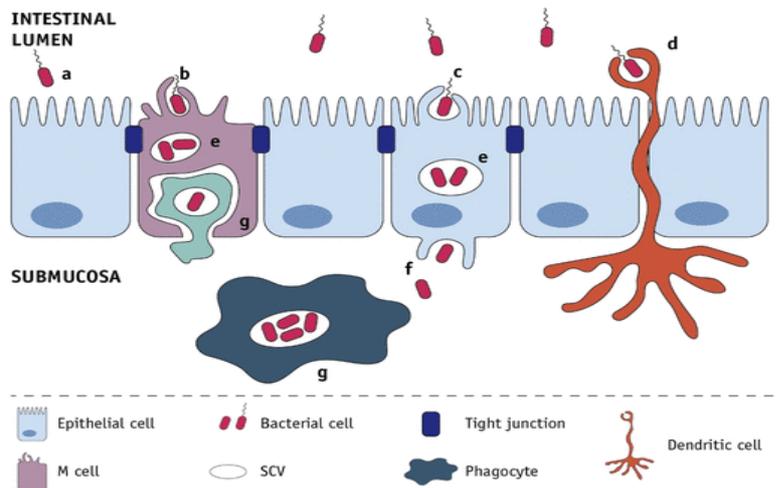


Figura 6. Patogenesi dell'infezione da *Salmonella* (dos Santos *et al.*, 2019).

Come conseguenza dell'invasione, vengono generati attivatori della trascrizione che portano alla produzione di citochine proinfiammatorie, come l'interleuchina IL-8, che inducono la risposta infiammatoria, stimolando la migrazione transepiteliale di linfociti T helper 1, con conseguente liberazione di IFN- γ e altre citochine infiammatorie, che sono rilevabili nel siero di soggetti infetti (Mizuno *et al.*, 2003; Stoycheva *et al.*, 2005). L'espressione di tali citochine comporta il reclutamento e l'attivazione di macrofagi e cellule dendritiche e un significativo afflusso di granulociti neutrofili all'interno del lume intestinale, fenomeno tipico delle gastroenteriti causate dalle salmonelle non tifoidee (Gal-Mor *et al.*, 2014). I batteri, all'interno del SCV, raggiungono la lamina propria, dove vengono fagocitati dai macrofagi. All'interno dei macrofagi, i batteri sopravvivono grazie alle proteine effettrici codificate dai geni plasmidici SPV (*Salmonella* plasmid virulence). Tali proteine vengono traslocate nel citoplasma dei macrofagi tramite il TTSS-2 con la funzione di inibire il richiamo di NADPH-ossidasi a livello di fagosoma, riducendo la produzione di radicali superossidi nel SCV, promuovendo la produzione di fattori pro-apoptotici; inoltre, riducono la produzione di fattori dell'infiammazione, impedendo così l'attivazione dei macrofagi, che vanno incontro ad apoptosi, prevenendo l'azione litica sui batteri (Kaur *et al.*, 2012).

A differenza delle forme di salmonellosi non tifoidee, che comportano, generalmente, un'infezione localizzata a livello della mucosa intestinale, nel caso della febbre tifoide l'infezione evolve in forma invasiva, attraverso la via linfatica; i batteri superano i linfonodi mesenterici e, mediante il dotto toracico, giungono nel torrente circolatorio, provocando una prima batteriemia transitoria, che viene interrotta dai macrofagi del fegato e della milza. In queste sedi, tuttavia, i meccanismi di difesa non sono in grado di assicurare una completa inibizione e quindi la moltiplicazione del patogeno prosegue e determina una seconda fase batteriemia persistente che corrisponde alla manifestazione della sintomatologia clinica. Successivamente, i batteri raggiungono la colecisti e, da qui, si riversano nuovamente nell'intestino, il cui tessuto linfoide (placche di Peyer e follicoli linfatici solitari) è coinvolto in una reazione infiammatoria e in un'infiltrazione di linfociti e di cellule istiocitarie, seguite da necrosi, desquamazione e formazione di caratteristiche ulcere tifoidi (Zhang *et al.*, 2003; D'Aoust *et al.*, 2007).

1.3.9 Manifestazioni cliniche

Le malattie legate a *Salmonella enterica* possono essere suddivise in tre gruppi: febbre tifoide, causata da *S. Typhi*; febbre enterica, causata da *S. Paratyphi A, B e C*; e gastroenterite febbrile o salmonellosi, causata dagli altri sierotipi (Shinohara *et al.*, 2008). Secondo Connor e Schwartz (2005), poiché i loro sintomi sono indistinguibili in un'analisi clinica, sia *S. Typhi* che *S. Paratyphi* sono classificati come agenti causali della febbre tifoidea. Le cosiddette salmonelle tifoidi hanno come unico serbatoio l'uomo e alcuni primati di grandi dimensioni (Garai *et al.*, 2012).

Nella sua forma tipica e comune il tifo spesso mostra un'evoluzione clinica che si suole suddividere in quattro periodi, detti settenari, perché hanno la durata ciascuno di circa 7 giorni. Il primo settenario è caratterizzato da febbre ascendente a gradinate, cefalea intensa, epistassi e alvo per lo più stitico. Nel secondo settenario si manifesta un disordine del sensorio con stupore, delirio e adinamia; compare il segno patognomiconico della malattia: la rosolia (eruzione cutanea costituita da piccole chiazze tondeggianti, lievemente in rilievo e di colore rosso sbiadito). L'alvo da stitico diviene diarroico, l'addome è meteorico, la lingua è a dardo (disepitelizzata, secca, grigio-nerastra con screpolature). Il paziente si presenta bradicardico con attenuazione del primo tono cardiaco nonostante sia presente ipertermia (dissociazione polso-temperatura). Il terzo periodo è caratterizzato da accentuate oscillazioni termiche con forti remissioni fino ad

arrivare ad una attenuazione progressiva della sintomatologia e discesa graduale della temperatura, tipiche del quarto settenario (Hornick *et al.*, 1970).

L'infezione da parte dei sierotipi non tifoidei, invece, può essere asintomatica (stato di portatore) (McGovern *et al.*, 1979; Glynn *et al.*, 1992), ma frequentemente si manifesta come un'enterocolite acuta con inizio da 6 a 72 ore dall'ingestione di alimenti contaminati (Gal-Mor *et al.*, 2014). Nella maggior parte dei casi la malattia ha un decorso benigno e non richiede l'ospedalizzazione, ma talvolta può aggravarsi fino a rendere necessario il ricovero.

I sintomi più comuni sono dolori addominali, diarrea, nausea, vomito, frequentemente accompagnati da febbre (38-39 °C). Per lo più le feci sono non formate, sfatte, di volume modesto e senza sangue. Raramente sono acquose e di volume elevato. Non frequentemente si osservano cefalea e mialgia (Buchwald *et al.*, 1984; Gal-Mor *et al.*, 2014). Il quadro clinico si risolve, in genere, nell'arco di 4-5 giorni. In qualche caso, tuttavia, la febbre e le alterazioni dell'apparato gastroenterico si prolungano per 10-15 giorni (Gal-Mor *et al.*, 2014). Dopo la guarigione può insorgere un'artrite reattiva (sindrome di Reiter) che si verifica, nella maggior parte dei casi, in soggetti con antigene di istocompatibilità HLA-B27 (Jones *et al.*, 1979; Dworkin *et al.*, 2001). Generalmente, le gastroenteriti da salmonelle non tifoidee sono autolimitanti.

Nel caso di infezioni invasive sostenute da sierotipi non tifoidei, solitamente associate a pazienti affetti da immunodeficienze, la sintomatologia appare molto simile a quella della febbre tifoide: febbre alta, epatosplenomegalia, complicazioni respiratorie, con sintomi intestinali spesso assenti, e possibili localizzazioni extra-intestinali (Gal-Mor *et al.*, 2014). Qualsiasi organo e apparato può essere coinvolto. Le vie urinarie rappresentano la sede extra-intestinale più frequentemente interessata, ma si deve ricordare che in relazione alla capacità di infettare le strutture endovascolari, la batteriemia da *Salmonella* può portare allo sviluppo di endocarditi, soprattutto in presenza di lesioni valvolari preesistenti. L'infezione a carico del sistema nervoso centrale può manifestarsi con quadri di meningite, ventriculite, ascesso cerebrale o empiema subdurale. Altra sede di localizzazione relativamente frequente del patogeno è l'apparato osteoarticolare, con quadri di artrite settica e osteomieliti (Cianflone, 2008). La batteriemia è la complicanza più comune della gastroenterite e si verifica in circa l'1-4% dei soggetti

immunocompetenti (Buchwald *et al.*, 1984; Hohmann, 2001).

1.3.10 Dose infettante

Nel caso delle salmonellosi non tifoidee, la dose minima infettante necessaria per provocare la malattia è ipotizzata tra 10⁵ e 10⁶ cellule, ma può variare nei diversi sierotipi e in dipendenza delle condizioni dell'ospite (Blaser *et al.*, 1982; Cianflone, 2008). L'ingestione di dosi elevate di microrganismi è generalmente associata ad una ridotta durata del periodo di incubazione e a manifestazioni cliniche più gravi (Cianflone, 2008). In letteratura è riportato che, in alcuni casi, l'ingestione di 10²-10³ batteri è sufficiente per causare la salmonellosi, in modo particolare nei pazienti con basso pH gastrico, nei neonati e nei soggetti che fanno uso di farmaci antiacidi (Cianflone, 2008). Evidenze epidemiologiche mostrano come le infezioni da sierotipi non tifoidei, soprattutto di tipo invasivo, siano spesso associate a soggetti immunocompromessi e, in modo particolare, a individui affetti da infezione da HIV (Gordon, 2008). Studi presenti in letteratura hanno dimostrato, inoltre, come pazienti che presentano deficienze ereditarie del sistema IL-12/IL-23 risultino essere particolarmente suscettibili alle infezioni da sierotipi non tifoidei ma non alle infezioni da sierotipi tifoidei (MacLennan *et al.*, 2004; Van de Vosse e Ottenhoff, 2006). Tali osservazioni supportano l'ipotesi che salmonelle non tifoidee e tifoidee divergano tra loro, oltre che per le caratteristiche antigeniche ed epidemiologiche, anche per i meccanismi infiammatori di cui sono responsabili (Gal-Mor *et al.*, 2014).

1.3.11 Sistemi di sorveglianza delle infezioni da *Salmonella* in UE e in Italia

La prevenzione delle Malattie Trasmissibili di origine Alimentare (MTA) costituisce una priorità per l'Unione Europea (UE). Gli Stati Membri, secondo quanto disposto dalla Decisione n° 2000/96/CE, hanno il compito di raccogliere e trasmettere i dati di sorveglianza relativi ai casi di infezione da patogeni trasmessi da alimenti allo European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).

Tra le malattie a trasmissione alimentare sottoposte a sorveglianza, la salmonellosi è la seconda malattia zoonotica più comunemente segnalata nella UE dopo la campilobatteriosi. L'EFSA ha stimato che l'aggravio economico complessivo causato dalla salmonellosi umana può arrivare sino a tre miliardi di euro l'anno (EFSA ed ECDC, 2010).

Nel 2020, le notifiche delle infezioni sostenute da *Salmonella* hanno fatto registrare il numero più basso di casi umani dal 2007, anno in cui è iniziata la sorveglianza della salmonellosi, a causa dell'impatto dell'uscita del Regno Unito dalla UE da un lato e della pandemia da COVID-19 dall'altro. Nel 2020, si sono confermati 52.702 casi di salmonellosi umana, corrispondenti a un tasso di notifica nella UE di 13,7 casi per 100.000 abitanti. Si tratta di una diminuzione del 29,7% e del 32,8% rispetto al tasso del 2019 (19,5 e 20,4 per 100.000 abitanti) rispettivamente con e senza i dati del 2019 del Regno Unito. Ciononostante, il trend complessivo della salmonellosi nel periodo 2016-2020 non ha mostrato alcun aumento o diminuzione statisticamente significativa (EFSA ed ECDC, 2021).

Nel 2021, il numero di casi umani di salmonellosi è stato di 60.050, corrispondenti ad un tasso di notifica nella UE di 15,7 casi per 100.000 abitanti, di cui 11.785 ricoveri ospedalieri e 71 decessi (trentuno in più rispetto al 2018).

Inoltre, 27 Paesi dell'Unione europea hanno segnalato un numero maggiore di focolai epidemici di origine alimentare rispetto al 2020 pur rimanendo inferiore rispetto al periodo pre-pandemico (5.175 focolai nel 2019). *Salmonella* è l'agente maggiormente identificato (773 focolai confermati) con 6,755 casi di malattia e 1.123 ricoveri ospedalieri.

Le principali fonti di infezione sono state "uova e prodotti a base di uova", seguiti da "alimenti composti", "prodotti da forno", "carne suina e prodotti derivati" e "verdure e succhi" (EFSA ed ECDC, 2022).

Per quanto concerne la situazione italiana, il numero di casi confermati di salmonellosi umana, nel 2020 e nel 2021, è stato rispettivamente di 2.626 e 3.768, con 94 focolai di MTA che hanno coinvolto 1.142 persone con 115 ospedalizzazioni e nessun decesso tra i casi epidemici del 2021 (EFSA ed ECDC, 2022).

Le cinque principali serovars di *Salmonella* responsabili delle infezioni umane riportate in Europa nell'anno 2021, erano le seguenti: *S. Enteritidis* (54,6%), *S. Typhimurium* (11,4%), *S. Typhimurium* variante monofasica (1,4, [5],12:i:-) (8,8%), *S. Infantis* (2,0%) e *S. Derby* (0,93%) (Tabella 5) (EFSA ed ECDC, 2022). L'Italia ha invece riportato *S. Infantis* (43%) come primo sierotipo isolato nei casi di salmonellosi umana, seguito da *S. Derby* (38,3%); *S. Typhimurium* variante monofasica (1,4, [5],12:i:-) e *S. Enteritidis* (EFSA ed ECDC, 2021).

Serovar	2021			2020			2019		
	Cases	MSs	%	Cases	MSs	%	Cases	MSs	%
Enteritidis	27,734	24	54.6	24,008	25	51.8	39,451	27	50.4
Typhimurium	5,781	24	11.4	5,337	25	11.5	9,288	27	11.9
Monophasic Typhimurium 1.4.[5] 0.12:;-	4,495	14	8.8	4,697	16	10.1	6,432	18	8.2
Infantis	1,019	24	2.0	1,064	23	2.30	1,912	26	2.4
Derby	474	17	0.93	525	20	1.13	719	23	0.92
Coeln	463	15	0.91	324	19	0.70	441	18	0.56
Braenderup	373	15	0.73	93	12	0.20	292	18	0.37
Napoli	352	12	0.69	412	12	0.89	493	18	0.63
Chester	316	12	0.62	129	13	0.28	340	17	0.43
Newport	311	20	0.61	336	21	0.73	846	24	1.08
Montevideo	219	11	0.43	102	14	0.22	244	19	0.31
Brandenburg	213	15	0.42	309	16	0.67	288	17	0.37
Bovismorbificans	205	14	0.40	337	15	0.73	452	19	0.58
Oranienburg	193	14	0.38	90	14	0.19	236	19	0.30
Stanley	190	16	0.37	208	21	0.45	509	19	0.65
Virchow	170	16	0.33	121	16	0.26	469	21	0.60
Dublin	148	10	0.29	196	9	0.42	207	13	0.26
Anatum	143	11	0.28	57	7	0.12	134	15	0.17
Rissen	139	14	0.27	114	13	0.25	252	19	0.32
Agona	137	16	0.27	157	18	0.34	490	20	0.63
Other	7,742		15.2	7,725		16.7	14,787		18.9
Total^{(a),(b)}	50,817	24	100	46,341	25	100	78,282	27	100

Tabella 5: I venti sierotipi di *Salmonella* più frequentemente riscontrati nei casi confermati di salmonellosi nell'uomo (EFSA ed ECDC, 2022).

1.3.12 Prevalenza di *Salmonella* nel cinghiale

Considerando tutti i dati raccolti sulla presenza di *Salmonella* in categorie di animali di diversa specie nella UE, sono stati analizzati 70.326 campioni da 14 Stati Membri. La prevalenza complessiva di campioni risultati positivi per *Salmonella* è stata del 4% (2.843) (Tabella 6).

Per quanto riguarda il cinghiale, tre Stati membri (Germania, Italia e Svezia) hanno analizzato complessivamente 1.175 campioni nel 2021, di cui il 6,6% (78 campioni) sono risultati positivi per *Salmonella*.

Animals	EU ^(a) MSs				Non-MS countries			
	N reporting countries	N tested animals	Positive animals		N reporting countries	N tested animals	Positive animals	
			N	%			N	%
Birds ^(b)	12	13,150	480	3.7	3	336	21	6.3
Cats	5	1,072	50	4.7	2	559	20	3.6
Cattle (bovine animals)	14	26,412	920	3.5	4	5,390	242	4.5
Dogs	8	1,995	53	2.7	2	1,082	46	4.3
Pigs	17	17,927	520	2.9	3	4,517	151	3.3
Small ruminants ^(c)	9	5,622	505	9.0	3	262	28	10.7
Solipeds	7	616	18	2.9	2	364	11	3.0
Wild boar	3	1,175	78	6.6	1	287	13	4.5
Wild ungulates ^(d)	3	388	2	0.52	1	1	0	0
Others/Not specified ^(e)	13	1,969	217	11.0	2	422	68	16.1
Total	20	70,326	2,843	4.0	5	13,220	600	4.5

Tabella 6: Incidenza di *Salmonella* nelle principali specie animali, riportate dagli Stati della UE e fuori dalla UE, 2020 (EFSA ed ECDC, 2022).

1.3.13 Criteri di controllo di *Salmonella*

Il Regolamento (CE) 2073/2005 stabilisce criteri microbiologici, intesi come criteri di sicurezza alimentare e criteri di igiene di processo, per *Salmonella* in specifiche categorie di alimenti.

La conformità a questi criteri deve essere verificata dal singolo operatore del settore alimentare (OSA) nell'ambito del proprio programma HACCP, attraverso il proprio sistema di controllo della qualità durante l'attuazione delle misure d'igiene generali e specifiche del Regolamento (CE) 852/2004. Inoltre, l'Autorità competente (AC), attraverso il campionamento ufficiale o la supervisione dei dati, deve garantire che l'OSA rispetti i requisiti normativi.

I criteri di sicurezza alimentare per *Salmonella* richiedono che il patogeno non venga rilevato in 25 o 10 g di diversi prodotti carnei, incluso carni macinate, preparazioni a base di carne, prodotti a base di carne e carni separate meccanicamente quando sono sul mercato, durante la loro vita commerciale.

I criteri di igiene di processo relativi a *Salmonella* sono regolamentati per le carcasse di suini, bovini, ovini, caprini, equini, polli da carne e tacchini. Valutano la presenza dell'agente patogeno in un'area specifica di una carcassa esaminata o in un campione di pelle del collo di polli da carne e tacchini, considerando un insieme di 50 unità campionarie ottenute in 10 sessioni di campionamento consecutive.

In base all'articolo 35 del Regolamento (CE) 2019/627, l'autorità competente deve eseguire controlli sul corretto operato degli OSA, mediante un campionamento ufficiale di 49 carcasse per anno, utilizzando lo stesso sistema di campionamento dell'operatore, oppure raccogliendo tutte le informazioni sulle analisi eseguite nel piano di autocontrollo e sulla loro rispondenza ai criteri del Regolamento (CE) 2073/2005 (EFSA ed ECDC, 2021).

1.4 *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis*

1.4.1 Etimologia

Il genere *Yersinia* fu proposto da Van Loghem nel 1944 (Alonso et al., 1975), in onore del batteriologo franco-svizzero A.J.E. Yersin (1863-1943) che per primo isolò il bacillo della peste a Hong Kong nel 1894, per riclassificare questo patogeno fino ad allora appartenente al genere *Pasteurella* (Yersin, 1894; Gyles e Thoen, 1993).

Tuttavia, la *Yersinia* è stata descritta negli Stati Uniti già nel 1923 da McIver e Pike (McIver e Pike, 1923) ed è stata riconosciuta come patogeno umano solo nel 1963.

Yersinia enterocolitica fu descritta per la prima volta nel 1939, con il nome di *Bacterium enterocoliticum*, poiché fu isolata dal contenuto intestinale di pazienti con enterocolite (Cover e Aber, 1989). Successivamente rinominata *Pasteurella pseudotuberculosis rodentium*, quindi *Pasteurella X*, infine prese il nome di *Y. enterocolitica* nel 1964 (Bottone, 1977).

Yersinia pseudotuberculosis fu isolata per la prima volta da Malassez e Vignal nel 1883, a seguito dell'inoculazione di materiale proveniente da una lesione cutanea di un bambino deceduto per meningite in cavie da laboratorio. L'incubazione dell'agente infettivo produsse lesioni simili alla tubercolosi, che gli autori denominarono tubercolosi zoologica (Malassez e Vignal, 1884). Due anni dopo, lo scienziato tedesco Eberth utilizzò per la prima volta il termine "*pseudotuberculosis*" per descrivere un'epizoozia di *Yersinia* che aveva provocato lesioni simili alla tubercolosi in suini e in conigli (Eberth, 1885).

1.4.2 Microrganismo

Yersinia è un batterio ossidasi-negativo, catalasi-positivo, Gram-negativo di forma bastoncellare (o coccobacilli), che misura tipicamente 0,5-0,8x1,3 micrometri. Questi batteri sono anaerobi facoltativi, prevalentemente mesofili, anche se mostrano una crescita a basse temperature (ad esempio, 0-4°C). Questi batteri, grazie alla loro capacità di crescere a temperature estreme, si sono ben adattati alla sopravvivenza nell'ambiente. Tutte le specie di *Yersinia* crescono facilmente su agar nutritivo, fermentano il glucosio ed altri zuccheri senza produrre gas, sono in grado di ridurre i nitrati e sono microrganismi ureasi positivi (eccetto *Y. pestis*). Questi batteri non sono acidi, non formano endospore

e sono mobili a 25°C (con range 22-30°C) (ad eccezione di *Y. pestis*), ma non a 37°C (Bottone *et al.*, 2005; Percival *et al.*, 2014).

1.4.3 Tassonomia

Il genere *Yersinia* è attualmente classificato come genere XI della famiglia delle *Enterobacteriaceae* e comprende importanti patogeni umani e animali ben caratterizzanti, quali *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*. *Y. pestis* si è evoluta da *Y. pseudotuberculosis* tra 1.500 e 20.000 anni fa ed entrambe le specie condividono oltre il 90% di omologia del DNA (Achtman *et al.*, 1999). Nonostante la stretta relazione genetica con *Y. pestis*, agente causale della peste bubbonica, *Y. pseudotuberculosis* si comporta clinicamente in modo più simile a *Y. enterocolitica*, provocando un'infezione enterica, denominata yersiniosi, che viene trasmessa attraverso il consumo di cibo o acqua contaminata (Zhang *et al.*, 2008).

Altre specie, precedentemente note come “organismi simili a *Y. enterocolitica*”, considerate avirulente o la cui presunta patogenicità non è stata ancora studiata o confermata, sono *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. aldovae*, *Y. aleksiciae*, *Y. entomophaga*, *Y. watersii*, *Y. massiliensis*, *Y. nurmii*, *Y. pekkanenii* e *Y. similis* (Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2018).

Rimane ancora oggi controversa la classificazione di *Y. ruckeri*, agente patogeno della malattia della bocca rossa dei pesci, poiché geneticamente è la specie più distante all'interno dell'intero genere *Yersinia*. *Y. entomophaga* è invece un patogeno degli insetti (McNally *et al.*, 2016).

Storicamente, la tassonomia di *Yersinia* è stata rivoluzionata da Brenner (1976) in seguito all'applicazione della tecnica di ibridazione DNA-DNA, in aggiunta ai classici test biochimici impiegati per la classificazione di *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*.

Ad oggi i test di identificazione biochimica e l'ibridazione DNA-DNA sono le principali tecniche utilizzate per sottotipizzare le specie del genere *Yersinia* (Sulakvelidze *et al.*, 2000).

Y. pseudotuberculosis è una specie biochimicamente omogenea, a differenza di *Y. enterocolitica* che appare altamente eterogenea (Tennant *et al.*, 2003), e viene

classificata in sei biotipi sulla base di una serie di reazioni biochimiche (Singhal *et al.*, 2014) descritte nella tabella 7.

Questi sei biotipi (1A, 1B, 2, 3, 4 e 5) vengono ulteriormente classificati in tre gruppi, sulla base della loro patogenicità nei confronti del modello di infezione animale del topo: biotipo 1A non patogeno, biotipo 1B ad alta patogenicità e biotipi 2, 3, 4 e 5 a bassa patogenicità. (Bottone, 1999; Lepka *et al.*, 2010).

Biochemical Reaction	Reactions in different <i>Y. enterocolitica</i> biotypes					
	1A	1B	2	3	4	5
Inositol fermentation	+	+	+	+	+	+
Salicin fermentation	+	-	-	-	-	-
Sorbose fermentation	+	+	+	+	+	-
Trehalose fermentation	+	+	+	+	+	-
Ornithine decarboxylase activity	+	+	+	+	+	+
Lipase activity	+	+	-	-	-	-
Pyrazinamidase activity	+	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	-
Esculin hydrolysis	+/-	-	-	-	-	-

+: (activity present) ; -: (activity absent)

Tabella 7: Schema dei biotipi di *Y. enterocolitica* da Bialas *et al.* (2012).

La specie *Y. enterocolitica* comprende circa 70 sierotipi (Pajunen *et al.*, 2001; Garzetti *et al.*, 2012) che vengono caratterizzati sulla base della struttura variabile dell'antigene O della membrana esterna (Simonova *et al.*, 2007) mediante l'utilizzo di test sierologici (Saleh *et al.*, 2012). Tra questi 70 sierotipi, solo i sierotipi O:3, O:9, O:8 e O:5,27 sono risultati patogeni per l'uomo (Chart e Cheasty, 2006; Saleh *et al.*, 2012). Tuttavia, l'individuazione precisa degli isolati patogeni di *Y. enterocolitica* richiede la caratterizzazione sia del biotipo che del sierotipo del ceppo isolato. La maggior parte dei ceppi di *Y. enterocolitica* collegati a casi clinici umani appartiene ai sierotipi 4/O:3, 1B/O:8, 2/O:5,27, 2/O:9 e 3/O:3 (Rahman *et al.*, 2011; Schaake *et al.*, 2013). I sierotipi O:3, O:9 e O:5,27 sono risultati essere i più dominanti in Europa (Chart e Cheasty, 2006),

mentre il sierotipo O:8 è quello predominante in Nord America (Schaaque *et al.*, 2013).

La specie *Y. pseudotuberculosis* può essere suddivisa in 4 biotipi (Tsubokura e Aleksic 1995), 15 sierotipi O (O:1-O:15) e 10 sottotipi (O:1a-O:1c, O:2a-O:2c, O:4a-O:4b, O:5a-O:5b) rispettivamente in base alle reazioni biochimiche, variabilità dei profili dell'antigene O e del lipopolisaccaride (LPS) (Skurnik *et al.*, 2000). Questi sierotipi si differenziano per la loro distribuzione geografica. Tutti i ceppi di *Y. pseudotuberculosis* sono considerati potenzialmente patogeni.

1.4.4 Caratteristiche colturali

Le condizioni ottimali di crescita, per il batterio *Yersinia*, sono una temperatura di 25-30°C ed un valore di pH pari a 7.2-7.4, anche se questo microrganismo è in grado di replicare ad intervalli di temperatura compresi tra i 4°C e i 43°C ed intervalli di pH compresi tra 4 e 10 (Percival *et al.*, 2014).

Y. enterocolitica è psicrofila e crescendo bene a basse temperature (prossime ma anche al di sotto dello 0°C) è in grado di replicare anche su alimenti refrigerati (Bari *et al.*, 2011). Inoltre, è in grado di resistere al congelamento e sopravvivere in cibi congelati per lunghi periodi, perfino dopo ripetuti cicli di congelamento e scongelamento (Toora *et al.*, 1992). Anche *Y. pseudotuberculosis* è estremamente tollerante al freddo, infatti la sua crescita è rilevabile entro 17 giorni di incubazione a 0°C (Keto-Timonen *et al.*, 2018).

Di contro *Yersinia* è sensibile al riscaldamento e viene facilmente distrutta dalle tecniche di pastorizzazione del latte a temperature di 72°C per 15 secondi (Toora *et al.*, 1992).

Un altro importante fattore di crescita che influenza lo sviluppo di questo microrganismo è l'attività dell'acqua (a_w) che deve essere almeno pari a 0.96. Sia *Y. pseudotuberculosis* che *Y. enterocolitica* sono in grado di crescere a concentrazioni di sale fino al 5% (Bari *et al.*, 2011).

Yersinia cresce facilmente su Agar MacConkey, fatta eccezione per *Y. pseudotuberculosis* la cui crescita è variabile, mentre su Agar sangue la maggior parte di questi microrganismi non determina emolisi.

Anche per *Yersinia*, come d'altronde per molti altri batteri associati all'ambiente, la differenziazione tra specie e sierotipi patogeni e non patogeni è fondamentale per ottenere dati epidemiologicamente significativi. Tuttavia, viene regolarmente descritto che l'inibizione della crescita da parte di altri batteri rappresenta il problema principale per le tecniche di coltura quando si cerca di recuperare e poi purificare batteri specifici.

È stato infatti ipotizzato che l'inibizione della crescita sia la causa del comune fallimento nell'isolare specie patogene di *Yersinia* da acqua contaminata (Waage *et al.*, 1999) e ciò è stato riportato quando sono stati confrontati metodi differenti per l'identificazione di *Y. enterocolitica* patogena in campioni ambientali (Sandery *et al.*, 1996; Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2000; Fredriksson-Ahomaa e Korkeala, 2003).

L'infezione da *Yersinia* viene determinata utilizzando solitamente campioni clinici di linfonodi, sangue o feci e isolando i batteri su Agar sangue o MacConkey. L'arricchimento a freddo delle colture può aumentare i tassi di isolamento di *Y. pseudotuberculosis* in campioni fortemente contaminati, e può essere realizzato in brodo di tetrionato o selenite F, oppure semplicemente in soluzione fisiologica o brodo nutritivo. In tutti i casi i campioni vengono conservati a 4°C per un massimo di 6 settimane con sottocoltura periodica per il recupero degli agenti (Reinhardt *et al.*, 2018).

Tra i terreni selettivi più comunemente utilizzati per la rapida identificazione del gruppo enterocolitico di *Yersinia* vi sono l'agar Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) (Schiemann, 1979) e l'agar VYE (agar *Y. enterocolitica* virulenta) (Fukushima, 1987).

Le colonie sospette si presentano di piccole dimensioni, lisce, opache e possono essere caratterizzate da un colore rosso intenso oppure presentare un centro rosso con bordo traslucido. Al momento dell'isolamento iniziale, le colonie si presentano lisce e con diametro di circa 0,5-2,0 mm, mentre alla subcoltura possono presentarsi forme ruvide (Mollaret e Thal, 1974).

L'identificazione di *Yersinia* è determinata da test biochimici e il sierotipo è confermato dall'agglutinazione su vetrino con antisieri di coniglio. *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* sono mobili, con flagelli peritrici o paripolari, se coltivate a 22°C, ma non a 37°C. È stato dimostrato biochimicamente e mediante visualizzazione al microscopio elettronico che, a temperatura ambiente, i ceppi di *Y. enterocolitica* possono passare a una forma sferoplastica di tipo L, per poi tornare ad una struttura di forma irregolare con una parete cellulare intatta (Pease, 1979).

Tutte le specie di *Yersinia* hanno bisogno di ferro per crescere, mentre i ceppi virulenti di *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* hanno bisogno di una bassa concentrazione di calcio per esprimere alcuni degli antigeni coinvolti nella virulenza di queste specie (Rakin *et al.*, 2012).

1.4.5 Epidemiologia

La yersiniosi è una malattia che colpisce animali selvatici, domestici e uomo. La yersiniosi enterica è causata da *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*, ed è proprio quest'ultima la causa principale della yersiniosi umana, molto diffusa in Europa (EFSA ed ECDC, 2007).

L'epidemiologia della yersiniosi è piuttosto complessa e non è stata ancora pienamente compresa.

Sulla base di dati clinici ed epidemiologici, la via di ingresso più probabile di *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, nell'uomo e negli animali, è il tratto digestivo visto l'alto numero di isolati dal contenuto intestinale di molti animali e dalle feci di persone affette. Pertanto, si presume che questo organismo segua lo stesso modello epidemiologico degli altri membri delle *Enterobacteriaceae*, come ad esempio varie specie di *Salmonella* spp. ed *Escherichia coli* (Hurvell, 1981).

Il microrganismo viene eliminato tramite le feci contaminate di animali infetti, distribuendosi in questo modo nell'ambiente dove può sopravvivere a lungo perché resistente a temperature estreme. L'infezione può quindi essere trasmessa ad altri soggetti tramite l'ingestione di acqua e alimenti (tra cui mangimi, erba) contaminati (Bottone, 1999).

È noto che l'infezione umana sia legata al consumo di carni di maiale poco cotte e che i suini sani rappresentino il principale serbatoio di *Yersinia* (Nesbakken *et al.*, 1985; Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2006). Infatti, questo patogeno viene spesso isolato dalle tonsille, dall'intestino e dalle feci dei suini asintomatici al momento del macello e, inoltre, è stato dimostrato il legame tra suini, carcasse di maiale, cinghiali e prodotti a loro associati (Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2007; Virtanen *et al.*, 2012; EFSA, 2014; Von Altröck *et al.*, 2015). *Yersinia* è stata infatti isolata anche nel cinghiale e recenti studi europei hanno dimostrato una prevalenza che varia tra il 3,5% e l'11% (Von Altröck *et al.*, 2015; Arrausi-Subiza *et al.*, 2016; Sanno *et al.*, 2018).

Y. enterocolitica e *Y. pseudotuberculosis* sono state però isolate anche da fonti ambientali, come il suolo e l'acqua (stagni e laghi), in cui sono in grado di sopravvivere per lunghi periodi di tempo (Rakin *et al.*, 2015) anche se la maggior parte di questi isolati sono risultati non patogeni come *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* e *Y. kristensenii* (Falcao *et al.*, 2008).

Y. pseudotuberculosis può persistere in campioni di terreno per più di 9 mesi, ma la virulenza plasmidica viene persa dopo 6 mesi di persistenza nel suolo (Buzoleva *et al.*, 2003), anche se la sua sopravvivenza può essere supportata dalla capacità di questo patogeno di colonizzare e persistere nei nematodi (Joshua *et al.*, 2003; Gengler *et al.*, 2015).

Yersinia enterocolitica si può isolare sia da animali selvatici che domestici, così come in uccelli, rane, pesci e pulci (Kapperud, 1991; Bottone, 1997). Questa *Yersinia* causa gastroenterite (Huhulescu *et al.*, 2009), sebbene la malattia clinica negli animali non sia molto comune (Bottone, 1999). Anche le infezioni, per lo più asintomatiche, di *Y. pseudotuberculosis* sono state documentate in numerosi animali, tra cui canidi, zibetti, cinghiali, cervidi, lagomorfi, piccoli roditori e uccelli (Mackintosh e Henderson, 1984; Fukushima e Gomyoda, 1991; Niskanen *et al.*, 2003; Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2009; Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; La Guern *et al.*, 2016; Joutsen *et al.*, 2017); i quali sono quindi in grado di diffondere il patogeno nell'ambiente anche senza manifestazione clinica di yersinosi (Hodges e Carman, 1985; Fukushima *et al.*, 1989; Niskanen *et al.*, 2008; Stanger *et al.*, 2018).

Le infezioni da *Y. pseudotuberculosis* negli animali allevati al pascolo si verificano principalmente in inverno, durante i periodi di clima fresco e di forti precipitazioni (Stranger *et al.*, 2018) quando piogge ed inondazioni possono accelerare la diffusione oro-fecale di queste infezioni nei ruminanti al pascolo (Stranger *et al.*, 2018).

Gli animali selvatici sono considerati un importante serbatoio di *Y. pseudotuberculosis* (Mair, 1973; Fukushima e Gomyoda, 1991; La Guern *et al.*, 2016); per questo motivo l'eliminazione dei contatti con gli animali selvatici lungo la catena alimentare è un fattore chiave per prevenire le infezioni umane causate da *Y. pseudotuberculosis* (Mair, 1973). Studi trasversali hanno identificato *Y. pseudotuberculosis* nel 40-78% degli allevamenti di suini (Laukkanen *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010; Novoslavskij *et al.*, 2013) e nell'84% degli allevamenti di bovini (Hodges e Carman, 1985), dimostrando quindi che la maggior parte degli allevamenti è occasionalmente esposta al patogeno. Negli allevamenti ad alta prevalenza, *Y. pseudotuberculosis* può essere rilevata in più del 25% di suini clinicamente sani (Niskanen *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010), vacche (Hodges e Carman, 1985) e pecore (Stanger *et al.*, 2018).

Y. enterocolitica è l'agente eziologico responsabile del maggior numero di casi di malattia in tutti i continenti, rispetto a *Y. pseudotuberculosis*. Diversi biotipi di *Y. enterocolitica* sono stati associati a casi di infezione in tutto il mondo, ma il biotipo isolato più frequentemente risulta 4/O:3 (FDA, 2012).

Le fonti di contagio ritenute più comuni sono le carni (maiale, manzo, agnello, ecc), prodotti della pesca, vegetali e latte crudo. La prevalenza di questo patogeno nel suolo, nell'acqua e negli animali (come i castori, maiali e scoiattoli) aumenta le probabilità di contaminazione della catena alimentare (FDA, 2012).

1.4.6 Patogenesi

Y. enterocolitica e *Y. pseudotuberculosis* sono enteropatogeni intracellulari facoltativi (Beuscher *et al.*, 1995) che vengono trasmessi prevalentemente per via oro-fecale (Bari *et al.*, 2011; Guinet *et al.*, 2011) attraverso alimenti e acqua contaminati (Siriken, 2004). Una volta ingerito, il batterio migra attraverso lo stomaco dove produce ureasi per resistere all'elevata acidità gastrica per poi passare nell'intestino tenue e da qui fino alla porzione terminale dell'ileo. (Handley *et al.*, 2004).

Yersinia patogena replica (Oellerich *et al.*, 2007), colonizza rapidamente il lume dell'intestino tenue (Trulzsch *et al.*, 2004) e penetra la lamina propria della mucosa passando attraverso le cellule epiteliali. A questo livello il batterio invade le cellule M e tramite queste trasloca alle placche di Peyer, situate nella parte distale dell'intestino, causando una tipica lesione detta ileite terminale (Oellerich *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2010). Qui il patogeno bloccando l'azione di fagocitosi dei macrofagi e dei leucociti polimorfonucleati (PMN), inibisce la cascata infiammatoria rendendo possibile la colonizzazione delle placche del Peyer (Handley *et al.*, 2006).

Generalmente l'infezione è limitata a questo distretto, ma alcune volte i microrganismi riescono a raggiungere i linfonodi mesenterici, procedendo così alla disseminazione in altri distretti organici e dando origine ad un'infezione sistemica (Trcek *et al.*, 2010).

La patogenicità di molti sierotipi di *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* è correlata alla presenza di diversi fattori di virulenza, sia di origine plasmidica sia di origine cromosomica, molto variabile tra una specie e l'altra.

Il plasmide pYV di 70kb (plasmide di virulenza di *Yersinia*) è presente soltanto nei ceppi patogeni, codifica per i principali fattori di virulenza, come il sistema di secrezione di *Yersinia* di tipo III (TTSS-Type three secretion system), la proteina di adesione di *Yersinia* A (YadA) e le proteine esterne di *Yersinia* (Yops).

Secondo Farmer *et al.*, (1992) la perdita di pYV è accompagnata da una perdita della capacità di invadere i tessuti (Farmer *et al.*, 1992).

Il TTSS è un complesso che permette la secrezione di diversi tipi di proteine a diversa funzione ed è altamente conservato tra i patogeni Gram-negativi. *Y. enterocolitica* possiede tre diversi sistemi di secrezione di tipo III:

- 1) Ysc TTSS (*Yersinia secretion* TTSS), codificato a livello plasmidico dal gene *ysc* e coinvolto nella secrezione delle Yops (Schmiel *et al.*, 2000)
- 2) Ysa TTSS (*Yersinia secretion apparatus* TTSS), codificato a livello cromosomiale dal gene *ysa* e coinvolto nella secrezione di una particolare famiglia di proteine, le Ysps (*Yersinia secreted proteins*), dalla funzione ancora sconosciuta (Young e Miller, 2002)
- 3) TTSS flagellare, coinvolto nella sintesi dei flagelli batterici (Young e Miller, 2002)

Tra le proteine codificate dal plasmide, YadA è un importante fattore di virulenza di *Y. enterocolitica* mentre in *Y. pseudotuberculosis* questa proteina non è essenziale per la virulenza (Schutz *et al.*, 2010). YadA non viene espressa in *Y. pestis* a causa di una mutazione frameshift che silenzia il gene *yadA* trasformandolo in uno pseudogene (El Tahir e Skurnik, 2001; Mikula *et al.*, 2013). YadA è una proteina di membrana esterna, espressa a 37°C ma non a 25°C, di natura fibrillare che ricopre la superficie batterica e media l'adesione del patogeno alle cellule della mucosa intestinale, specialmente a livello della zona ileo-ciecale (Kapperud *et al.*, 1987). Inoltre YadA possiede altre funzioni, come mediare l'agglutinazione, inibire l'attivazione del complemento e aumentare la resistenza alla fagocitosi (Mikula *et al.*, 2013). La presenza di questa proteina promuove l'adesione del batterio al muco, in questo modo lo strato di muco, solitamente posto a difesa, diventa un elemento facilitante la colonizzazione del batterio (Paerregaard *et al.*, 1991).

Le proteine Yops sono tossiche iniettate nel citosol della cellula eucariotica bersaglio, dove causano l'interruzione delle vie di trasduzione del segnale e alterano la struttura del

citoscheletro, portando all'apoptosi cellulare (Lee *et al.*, 2000; Cornelis, 2002). Queste alterazioni cellulari inibiscono la capacità di fagocitosi di molti fagociti, tra cui macrofagi, leucociti polimorfonucleati e cellule dendritiche (Cornelis, 2002; Koberle *et al.*, 2009). Ciò consente ai ceppi patogeni di *Y. enterocolitica* di eludere il sistema immunitario (Koberle *et al.*, 2009). La secrezione delle proteine Yops nell'ambiente esterno è controllata da un complesso proteico chiamato "Calcium Block". Questo complesso blocca il passaggio delle proteine Yops sintetizzate attraverso il canale di secrezione in presenza di un'elevata concentrazione di calcio (Ca^{2+}) e in assenza di contatto con le cellule ospiti. La secrezione di Yop avviene quando le cellule di *Y. enterocolitica* inducono il contatto con le cellule eucariotiche e i livelli di Ca^{2+} si abbassano (Dewoody *et al.*, 2013).

I loci cromosomici sono denominati *inv* che codifica per l'invasina, *ail* che codifica per la proteina AIL e *yst* che codifica per un'enterotossina.

I geni cromosomici, *ail* e *inv*, codificano per proteine di membrana che coadiuvano l'adesione alla mucosa e ne condizionano l'invasione. L'ingresso nelle cellule mucosali, possibile solo nei ceppi *ail+* e *inv+*, consente il raggiungimento del sito di elezione del microrganismo rappresentato dalle cellule M delle placche di Peyer; successivamente, viene trasportato dalle cellule M nella lamina propria della sottomucosa, dove si moltiplica, e da dove, per via linfo-ematogena, può disseminarsi in tutto l'organismo (Cattabiani, 2002).

Ail è altamente correlato con la virulenza del batterio, viene ritrovato esclusivamente nei ceppi patogeni di *Y. enterocolitica*, a differenza del gene *inv* che invece è presente in tutti i ceppi di *Yersinia* isolati. AIL è coinvolta nell'adesione e nel processo di invasione delle specifiche colture cellulari, così come nella sopravvivenza contro gli effetti battericidi del siero (Fabrega e Vila, 2012).

Il gene *inv* codifica per una proteina d'ingresso denominata anche "invasina", che dà inizio all'ingresso nelle cellule epiteliali legandosi a recettori specifici (Cattabiani, 2002). Ceppi mutanti *inv-* aderiscono alle cellule M, ma in misura minore rispetto ai ceppi positivi e il loro livello potenziale di colonizzazione delle placche del Peyer è notevolmente ridotto (Bari *et al.*, 2011).

Prima che il batterio stabilisca uno stretto contatto con l'epitelio intestinale, è stato riportato che i flagelli e, quindi, la motilità, svolgono un ruolo importante nell'iniziare l'invasione della cellula ospite. L'inattivazione dei geni che codificano per i flagelli, richiesti per l'espressione della motilità, è associata con la diminuzione del grado di invasività paragonabile a quella riscontrata nei ceppi in cui il gene *inv* è stato inattivato (Fabrega e Vila, 2012).

Infine, il gene *yst*, codifica per l'elaborazione di un'enterotossina termostabile denominata YST, *Yersinia stable toxins* (Pai, 1978). Il significato patogenetico dell'enterotossina, che si forma soltanto a una temperatura inferiore ai 30°C, è ancora poco chiara. Dopo essere stata riscaldata a 100°C per 20 minuti la tossina è ancora attiva (Cantoni, 2011). La YST è un fattore di virulenza che consente ai ceppi di *Y. enterocolitica* di invadere e danneggiare i tessuti dell'epitelio intestinale causando diarrea (Platt-Samoraj *et al.*, 2006; Bancercz-Kisiel *et al.*, 2012).

Esiste inoltre l'isola di alta patogenicità (HPI) contenuta solamente nel biotipo 1B ad alta patogenicità di *Y. enterocolitica* (Carniel, 1999) ed in *Y. pseudotuberculosis* (Schubert *et al.*, 2004). L'isola HPI è chiamata così perché differenzia i ceppi ad alta patogenicità da quelli a bassa patogenicità di *Y. enterocolitica* (Bach *et al.*, 1999). L' HPI di *Y. enterocolitica* è di 45 kbp e trasporta i geni di virulenza chiamati locus *yersiniabactin*, responsabili dell'assorbimento del ferro (Carniel *et al.*, 1996; Bach *et al.*, 1999). Di conseguenza, l'HPI di *Yersina* è chiamato anche "isola di cattura del ferro" (Carniel, 1999). I geni del locus *yersinabactin* codificano per la biosintesi, il trasporto e la regolazione della yersinabactina (YBT). Quest' ultima è un sideroforo e consente al batterio di ottenere molecole di ferro necessarie per la sua crescita e diffusione in vivo (Bach *et al.*, 1999).

1.4.7 Manifestazioni cliniche

I ceppi patogeni di *Y. enterocolitica* causano sintomi clinici intestinali ed extraintestinali. Le forme cliniche delle infezioni da *Y. enterocolitica* variano a seconda del biosierotipo e dell'età, del sesso e dello stato immunitario dell'ospite (Zadernowska *et al.*, 2014).

La gastroenterite acuta, relativamente rara nelle infezioni da *Y. pseudotuberculosis*, è la manifestazione clinica più comune dell'infezione da *Y. enterocolitica* (Cover e Aber, 1989). Colpisce più frequentemente i neonati e i bambini di età inferiore ai 5 anni senza

differenze significative tra i sessi. Ciò può essere dovuto al fatto che il loro sistema immunitario è stato relativamente poco sollecitato e quindi risulta immaturo (Lee *et al.*, 1991; Koehler *et al.*, 2006; Boqvist *et al.*, 2008).

Questo quadro, spesso indistinguibile da quello causato da altri enteropatogeni ed enteroinvasivi come *Shigella* o *Salmonella* spp. è caratterizzato da febbre, diarrea e dolore addominale. Nausea e vomito si verificano solo occasionalmente.

Il periodo di incubazione, dopo contaminazione orale, varia da 3 a 10 giorni. L'esordio della diarrea è generalmente iperacuto e caratterizzato da 6-8 episodi giornalieri, con feci quasi sempre liquide e talvolta accompagnate da muco o sangue. Molto frequente è la comparsa di leucocitosi fecale (60-80%). Oltre alla diarrea, nei primi giorni della malattia, i sintomi più comuni sono rappresentati da febbre e dolore addominale che può essere diffuso o localizzato all'epigastrio o alla fossa iliaca destra (Bennett *et al.*, 2020).

Una caratteristica che distingue questa infezione da altre gastroenteriti è la durata relativamente lunga della diarrea.

Altre presentazioni della malattia meno frequenti includono i seguenti disturbi sistemici: ascessi focali a livello di fegato, milza, reni e polmoni, eritema nodoso, poliartrite, sindrome di Reiter, miocardite, polmonite, meningite, setticemia e osteomielite (Fisch *et al.*, 1989; Lecomte *et al.*, 1989). Le manifestazioni locali comprendono cellulite e infezioni delle ferite, pustole, congiuntivite e panoftalmite (Bottone, 1992).

Sono stati descritti portatori asintomatici e sono stati segnalati focolai epidemici, intra-familiari o nosocomiali.

Yersinia enterocolitica è stata infine segnalata come un importante rischio per i pazienti umani che hanno ricevuto trasfusioni di sangue, poiché se il donatore risulta batteriemico, il microrganismo è in grado di crescere anche durante la conservazione del sangue a basse temperature e causare quindi gravi infezioni nei riceventi (Arduino *et al.*, 1989).

L'infezione da *Yersinia pseudotuberculosis* nell'uomo si presenta come una grave malattia tifoidea, caratterizzata da febbre, porpora, spleno ed epatomegalia, ed è frequentemente associata a linfadenite mesenterica. Questa patologia colpisce più comunemente i bambini e i giovani adulti. L'ileite terminale è poco frequente nelle infezioni da *Y. pseudotuberculosis* rispetto a quelle da *Y. enterocolitica*. Sono stati riportati casi di setticemia fatale in corso di infezione da *Y. pseudotuberculosis* (Bennett *et al.*, 2020).

A differenza dell'uomo, la yersiniosi negli animali è più frequentemente causata da *Y. pseudotuberculosis* e decorre solitamente in forma asintomatica o accompagnata da diarrea di breve durata (Shayegani *et al.*, 1986). In caso di malattia acuta la sintomatologia è caratterizzata da enterite, linfadenomegalia e splenomegalia mentre le infezioni croniche possono causare noduli granulomatosi e ascessi localizzati che interessano vari organi, tipicamente fegato e polmoni (Brügmann *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2008).

1.4.8 Dose infettante

La dose infettante minima per l'uomo, nel caso di yersiniosi, non è conosciuta, ma si stima essere piuttosto elevata, pari a circa 10^8 batteri ingeriti (Fleming *et al.*, 2006).

La dose infettante e la comparsa di sintomatologia dipendono dal patogeno (ceppo dipendente) e dalle condizioni dell'ospite (età e stato immunitario). La dose infettante può essere inferiore nei soggetti con ipoacidità gastrica, in modo particolare nei neonati e nei soggetti che fanno uso di farmaci antiacidi (Foberg *et al.*, 1986; de Koning-Ward e Robins-Browne, 1995).

1.4.9 Sistemi di sorveglianza delle infezioni da *Yersinia* in UE e in Italia

Nella UE la yersiniosi è la terza zoonosi più comunemente segnalata nell'uomo. Nel 2021, il numero di casi confermati è risultato di 6.789 corrispondenti a un tasso di notifica di 1,9 per 100.000 abitanti. Si tratta di un aumento del 11,8% e di una diminuzione del 8,9% rispetto al tasso del 2020, rispettivamente con (1,7 per 100.000 abitanti) e senza (2,1 per 100.000 abitanti) i dati del Regno Unito.

Per questo motivo, il trend complessivo della yersiniosi del periodo 2017-2021 non ha dimostrato un aumento o una diminuzione statisticamente significative (EFSA ed ECDC, 2022).

Nel 2021 si sono verificate 21 epidemie alimentari di yersiniosi, nel corso delle quali sono stati colpiti 125 soggetti, di cui solo 14 hanno necessitato di cure ospedaliere (EFSA ed ECDC, 2022).

Nella UE la notifica della yersiniosi è obbligatoria in 22 Stati membri mentre in quattro (Belgio, Francia, Grecia e Italia) è basata su un sistema volontario. Nei Paesi Bassi non esiste alcun sistema di sorveglianza.

Per quanto riguarda gli alimenti e gli animali non vi è alcuna obbligatorietà nella segnalazione della presenza di *Yersinia*. Nonostante ciò, gli Stati membri possono riferire all'EFSA i dati di monitoraggio sulla *Yersinia*, in conformità alla Direttiva sulle zoonosi 2003/99/CE. Attualmente, nella UE non esiste un piano di monitoraggio della *Yersinia* uniforme per gli alimenti o gli animali. Pertanto, i dati sulla presenza di questo microrganismo negli alimenti e negli animali presentati all'EFSA dagli Stati membri non sono armonizzati (EFSA ed ECDC, 2022).

In Italia, a differenza di quanto riscontrato in Europa, è stato registrato un aumento statisticamente significativo di casi di yersiniosi umana nel periodo di tempo 2017-2021. Infatti, i casi umani segnalati nel 2017 e nel 2021 sono stati rispettivamente 8 e 35; da sottolineare che questi dati facciano riferimento ad una sorveglianza basata su un sistema volontario (EFSA ed ECDC, 2022).

Y. enterocolitica con 5.950 casi umani è stata la specie più comunemente segnalata in tutta Europa (98,1% dei casi disponibili con informazioni sulla specie). Di questa specie il sierotipo più comunemente riportato è stato O3 (83,1% dei casi con informazioni sul sierotipo), seguito da O9 (12,3%). Gli altri sierotipi (O8, O1 e O5, O27 e altri) hanno complessivamente rappresentato il 4,6% dei casi. Il biotipo più comune invece è stato il biotipo 4 (82,3%), seguito dal biotipo 2 (16,7%), dal biotipo 1B (0,6%) e dal biotipo 3 (0,4%) (EFSA ed ECDC, 2022).

Y. pseudotuberculosis è risultata la seconda specie più comune, con un totale di 113 casi riportati in undici Paesi membri (EFSA ed ECDC, 2022).

La principale fonte di infezione alimentare è risultata essere "carne e prodotti a base di carne pronti al consumo" ed in particolare "carne mista e prodotti a base di carne di bovini e suini". Tra gli alimenti "non pronti al consumo", "carne e prodotti a base di carne" è risultata nuovamente la fonte più frequentemente causa di tossinfezione, seguita da "latte e prodotti a base di latte". Tra le "carni fresche", le "carni fresche di suini" sono state quelle maggiormente contaminate da *Yersinia* (EFSA ed ECDC, 2022).

1.4.10 Prevalenza di *Yersinia* nel cinghiale

Nel 2021, sette Stati membri della UE hanno riportato dati sul monitoraggio di *Yersinia* in categorie di animali di diversa specie: Complessivamente sono stati analizzati 27.756 campioni per la ricerca di *Yersinia*. Oltre ai suini, e al “bestiame domestico diverso dai suini”, viene riportata la categoria “animali selvatici”, nella quale viene incluso il cinghiale, che riscontra un 2,0% di positività per *Yersinia* (EFSA ed ECDC, 2022).

I dati raccolti rimangono però pochi, probabilmente in relazione al fatto che manca l’obbligo di istituire programmi di controllo per *Yersinia* sugli animali. Infatti, a livello europeo, sono presenti solamente piani di monitoraggio volontari che differiscono tra i vari Stati membri su molti aspetti, a seconda della specifica situazione epidemiologica, come ad esempio sul piano di campionamento e sulle specie animali bersaglio. Per questi motivi la prevalenza di *Yersinia* nel cinghiale è probabilmente sottostimata. Andando ad analizzare la recente letteratura scientifica si possono trovare alcuni studi a supporto di questa teoria. In Svezia, ad esempio, è stata riportata una prevalenza di *Yersinia enterocolitica* e di *Yersinia pseudotuberculosis* rispettivamente del 31% e 22% (Sanno *et al.*, 2018), mentre nella Germania del Nord Reinhardt *et al.* (2018) riportano una prevalenza di *Y. pseudotuberculosis* del 6,4%. In Italia, dal recente studio pubblicato da Cilia *et al.* (2021) è stata descritta una prevalenza di *Y. enterocolitica* del 17,8%.

1.4.11 Criteri microbiologici per *Yersinia*

La ricerca di *Yersinia* non è prevista dal Regolamento (CE) 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. Per quanto riguarda la normativa italiana, anche in questo caso *Yersinia* non viene presa in considerazione nel controllo igienico-sanitario dei prodotti alimentari.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Area di studio

In questo studio sono stati inclusi 225 campioni (79 carcasse campionate in due diverse strutture e 67 linfonodi) prelevati da 79 cinghiali cacciati tra i mesi di gennaio e dicembre 2020. Da 12 capi, appartenenti a lotti diversi di animali, non è stato possibile prelevare i linfonodi.

Gli animali sono stati cacciati all'interno del distretto di caccia dell'area collinare dell'Appennino occidentale, sito in provincia di Parma e di Piacenza, regione Emilia-Romagna.

I cinghiali sono stati abbattuti nell'ambito di attività di controllo della fauna selvatica, disposte dalle Amministrazioni Provinciali, secondo i piani di diradamento della regione Emilia-Romagna, attuati dall'Ente di Gestione per i Parchi e la Biodiversità Emilia Occidentale. Le carni degli animali abbattuti erano destinati esclusivamente alla commercializzazione, come previsto dal Regolamento (CE) 853/2004.

Lo studio è basato sulla ricerca di *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis* nei campioni prelevati in due distinte situazioni, che caratterizzano la filiera della selvaggina cacciata: il centro di raccolta (A) e lo stabilimento di lavorazione della selvaggina (B). Il primo campionamento veniva eseguito nel momento immediatamente successivo all'eviscerazione, effettuata nel centro di raccolta dei "Boschi di Carrega" (provincia di Parma), situato in prossimità del territorio di caccia. Il secondo campionamento veniva invece eseguito presso il centro di lavorazione delle carni di selvaggina, sito a Montereenzio, in provincia di Bologna (a circa 150 km di distanza), con eccezione fatta per 13 carcasse, trasportate in un macello di suini in provincia di Parma.

Il materiale, conservato a temperatura di refrigerazione, è stato consegnato e analizzato presso il Laboratorio di microbiologia degli alimenti dell'Unità Operativa di Ispezione degli alimenti di origine animale del Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università degli studi di Parma.

2.2 Fase A: campionamento presso il centro di raccolta

All'interno dell'area, sopra descritta, è presente un centro di raccolta dove venivano trasportati, nel più breve tempo possibile, i capi abbattuti. Nel centro di raccolta dei "Boschi di Carrega", ogni animale è stato identificato mediante l'applicazione, al tendine calcaneale, di una fascetta metallica, con inciso un numero di serie; in seguito, come da obbligo, sono stati registrati i rilevamenti biometrici di ogni cinghiale. In questo elaborato sono stati presi in considerazione, tra i dati morfometrici, il peso pieno, la classe di età e il sesso dell'animale. Da sottolineare che i cinghiali abbattuti, prima di essere eviscerati, rimanevano esposti alle condizioni ambientali per un breve periodo di tempo.

Una volta trascritti i dati biometrici, ogni cinghiale è stato appeso per le zampe posteriori ed eviscerato; successivamente si sono seguite le consuete procedure di toelettatura e lavaggio delle parti interne della carcassa con abbondante acqua corrente potabile fredda, per rimuovere eventuali detriti organici (come sangue e feci). Durante queste operazioni, per ogni carcassa che rientrava nel piano di campionamento è stata compilata una scheda dati (Allegato 1) che riportava: data e luogo di abbattimento, temperatura ambientale e regione anatomica interessata dal foro di entrata e dal foro di uscita del proiettile. I dati riguardanti l'entrata e l'uscita del proiettile sono stati presi in considerazione in quanto si suppone che animali colpiti nella regione addominale possano andare incontro ad un rischio maggiore di contaminazione fecale della carcassa. Infine, prima che le 79 carcasse venissero refrigerate, è stato eseguito un tampone su di un'area di 100 cm², denominato "campione A", mediante l'uso di una spugna sterile già addizionata con 10 ml di acqua peptonata (Buffered Peptone Water, BPW; Oxoid, Milano, Italia). Il campionamento è stato eseguito posizionando il delimitatore 10x10 cm sulla parete addominale di destra, a livello del muscolo psoas, e strofinando energicamente la spugna sull'area superficiale delimitata (Immagine 1). Tale spugna è stata riposta in un sacchetto sterile, precedentemente identificato con la sigla CC (cinghiale carcassa) e con un numero progressivo.

Oltre al campionamento mediante spugna sterile, 67 campioni di linfonodi mesenterici sono stati isolati dal pacchetto intestinale di altrettanti animali e raccolti con l'ausilio di pinze e forbici sterili, evitando il contatto con l'operatore (Immagine 2). I linfonodi sono stati refrigerati in contenitori singoli sterili, precedentemente identificati con la sigla CL (cinghiale linfonodi) e con lo stesso numero progressivo attribuito alla corrispondente carcassa.

Tutti i campioni sono stati conservati a temperatura di refrigerazione e sono stati recapitati al Laboratorio di microbiologia degli alimenti dell'UO di Ispezione degli alimenti di origine animale del Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, presso il quale sono stati analizzati entro 24 ore dal prelievo.

Al termine di queste operazioni le carcasse sono state appese in cella frigorifero (4 ± 1 °C) e mantenute refrigerate per un tempo variabile da 1 a 7 giorni. È importante sottolineare che la selvaggina di grossa taglia viene mantenuta refrigerata "in pelo", cioè non scuoiata.

L'intervallo di tempo tra l'abbattimento degli animali e l'inizio della refrigerazione non ha superato le 5 ore.

Dalla cella del centro di raccolta, le carcasse sono state trasportate con un camion refrigerato presso il centro di lavorazione delle carni di selvaggina in provincia di Bologna, come da Regolamento (CE) 853/2004.

2.3 Fase B: campionamento presso lo stabilimento di lavorazione delle carni di selvaggina (o stabilimento di macellazione)

Nel centro di lavorazione delle carni di selvaggina, 66 carcasse di cinghiale refrigerate sono state campionate nuovamente, prima di esser scuoiate, sezionate, disossate, porzionate e confezionate per esser destinate all'uso alimentare umano. Per ogni carcassa è stata riportata, sempre in Allegato 1, la data di arrivo allo stabilimento di lavorazione delle carni di selvaggina di Bologna e la data di campionamento.

Da ogni carcassa è stato prelevato un campione utilizzando lo stesso procedimento precedentemente descritto, con la differenza che è stato tamponato il muscolo psoas a livello di parete addominale sinistra. La spugna è stata quindi riposta in un sacchetto sterile identificato con lo stesso numero progressivo utilizzato in precedenza presso il centro di raccolta, con l'aggiunta della lettera B (campione B). I sacchetti sono stati quindi conservati a temperatura di refrigerazione fino all'esecuzione delle analisi.

Il tempo trascorso tra l'eviscerazione delle carcasse, nel centro di raccolta, e la loro lavorazione, al centro di lavorazione della selvaggina, variava tra 1 e 8 giorni.

A causa delle limitazioni di viaggio durante la pandemia da COVID-19, 13 carcasse di cinghiale sono state trasportate in un macello suino situato a 50 km di distanza dal centro

di raccolta. I tamponi di queste carcasse sono stati eseguiti seguendo la medesima procedura. Il tempo trascorso tra l'eviscerazione della carcassa nel centro di raccolta e la lavorazione al macello variava da 1 a 5 giorni.

2.4 Metodi colturali

2.4.1 Ricerca di *Salmonella* spp.

Tutti i campioni sono stati analizzati per la ricerca di *Salmonella* con metodi di coltura standard, secondo la norma ISO 6579-1:2017. I linfonodi mesenterici sono stati liberati da grasso e mesentere mediante l'utilizzo di pinze e forbici sterili, sciacquati con acqua distillata sterile e decontaminati esternamente con etanolo, prima di esser tagliati in piccole parti mediante l'ausilio di strumentario sterile. Nonostante i linfonodi analizzati presentassero un peso differente gli uni dagli altri, sulla base delle dimensioni degli animali e del loro stato sanitario, in media, sono stati esaminati 10 g di tessuto linfonodale per soggetto. Di questi, 5 g in media sono stati utilizzati per la ricerca di *Salmonella* spp. Le spugne sono state divise in due parti mediante l'utilizzo di forbici sterili, di cui una parte è stata utilizzata per la ricerca di *Salmonella* e l'altra per la ricerca di *Yersinia* spp. dato che ogni spugna era stata imbevuta con 10 ml di BPW, il peso di ogni sua mezza porzione è stato considerato pari a 5 g.

Il metodo di isolamento prevedeva una fase di pre-arricchimento che consisteva nel diluire 1:10 le spugne e i campioni di tessuto linfonodale, aggiungendo acqua peptonata sterile (BPW) ai sacchetti sterili che li contenevano, lavorando sotto cappa a flusso laminare per mantenere la sterilità.

Successivamente, i campioni di tessuto linfonodale sono stati omogenati per 1 minuto in Stomacher peristaltico, mentre le spugne sono stati sottoposti a massaggio manuale. Al termine dell'omogeneizzazione i campioni sono stati incubati a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ per 18-24 ore.

Superato il periodo di incubazione, i campioni sono stati sottoposti ad arricchimento secondo la norma ISO 6579-1:2017. Un'aliquota di 1 ml di ciascun campione pre-arricchito (spugna e linfonodi) veniva inoculata in una provetta contenente 10 ml di Müller-Kauffmann Tetrathionate Broth addizionato con novobiocina (MKTT-n; Oxoid, Milano, Italia), mentre un'aliquota di 0,1 ml veniva inoculata in una provetta contenente 10 ml di Rappaport Vassiliadis Broth (RV-Oxoid; Milano, Italia). Dopo l'incubazione per 24 ± 3 ore rispettivamente a 42°C per RV e 37°C per MKTT, il campione veniva seminato, per

mezzo di un'ansa sterile, su due terreni solidi selettivi: Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD; Oxoid, Milano, Italia) e terreno cromogeno specifico per *Salmonella* (CR; Oxoid, Milano, Italia). Le piastre sono state quindi incubate a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore.

Una selezione di colonie riferibili per morfologia e colore a *Salmonella* spp. cresciute su XLD (lisce, color fucsia, con o senza centro nero) e cresciute su cromogeno (color malva) (Immagine 3) sono state trapiantate su tre terreni idonei a mettere in evidenza alcuni caratteri biochimici tipici di *Salmonella*: Triple Sugar Iron Agar (TSI; Oxoid, Milano, Italia) per la fermentazione del glucosio e la mancata fermentazione di lattosio e saccarosio, Lysine Iron Agar (LIA; Oxoid, Milano, Italia) per la decarbossilazione della lisina (Immagine 4) e Christensen Urea Agar (Oxoid, Milano, Italia) per la mancata idrolisi dell'urea. Le colonie sono state trapiantate per infissione nei primi due terreni mentre per striscio sull'ultimo terreno. I terreni per le prove biochimiche di screening sono stati incubati a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 3 ore.

In seguito, gli isolati, conformi alle prove biochimiche, sono stati testati mediante una prova di agglutinazione rapida con siero polivalente anti-antigene O di *Salmonella* (Omnivalent *Salmonella* serum, Biogenetics, Padova); in caso di agglutinazione, le colonie sono state analizzate con test miniaturizzato Microgen GNA (Biogenetics, Padova, Italy) e/o con strisce API 20 E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) (Immagine 5).

I ceppi di *Salmonella* spp. correttamente identificati sono stati inviati alla Sezione di Parma dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) per eseguire la sierotipizzazione secondo la norma ISO/TR 6579-3:2014.

2.4.2 Ricerca di *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*

I campioni di linfonodi (aliquota di 5g in media) e di spugne sono stati pre-arricchiti 1:10 con il brodo Phosphate Buffered Saline (PBS; Biolife Italiana, Milano, Italia) specifico per *Yersinia* e omogenati in Stomacher per 1 minuto (linfonodi) o manualmente (spugne). Si è proceduto con l'utilizzo di tre metodiche diverse, seguendo la norma ISO 10273:2017; il primo metodo è il cosiddetto "arricchimento a freddo" che consisteva nel prelevare 10 ml di sospensione ottenuta dal campione iniziale, versare il medesimo in un sacchetto sterile e aggiungere 90 ml di PBS e lasciare la sospensione a temperatura ambiente per 6 ore. Successivamente le brodocolture sono state conservate per una settimana alla temperatura di refrigerazione (4°C); il passaggio successivo prevedeva la semina su piastra di *Yersinia* Selective Agar addizionato di Cefsulodin Irgasan e Novobiocina

(*Yersinia* CIN Agar, Biolife Italiana, Milano, Italia). Dopo incubazione delle piastre a $30 \pm 1^\circ \text{C}$ per 48 ore, le colonie caratteristiche sono state sottoposte a prove biochimico-sierologiche di conferma.

In parallelo, il secondo metodo prevedeva la semina di 1 ml, prelevato dalla sospensione iniziale, su tre piastre di terreno *Yersinia* CIN agar, da incubare a $30 \pm 1^\circ \text{C}$ per 48 ore.

Il terzo metodo si basava sull'incubazione per 48 ore a $30 \pm 1^\circ \text{C}$ di 10 ml prelevati dalla sospensione iniziale e versati in una provetta sterile. Successivamente si sottoponeva 0,5 ml di campione ad un trattamento alcalino, aggiungendovi 4,5 ml di soluzione KOH (idrossido di potassio); dopo 20 ± 5 secondi si seminavano 10 μl con ansa sterile su piastra di *Yersinia* CIN agar, da incubare a $30 \pm 1^\circ \text{C}$ per 48 ore.

Le colonie tipiche di *Yersinia* appaiono di colore rosa intenso, lisce, opache con centro rosso caratterizzato da bordo traslucido, trasparente o lattescente, di forma tondeggiante con un aspetto caratteristico "ad occhio di bue" (Immagine 6).

Le colonie sospette di *Yersinia* venivano sottoposte a prove biochimiche di screening utilizzando due terreni selettivi: Kligler Iron Agar (KIA; Biolife Italiana, Milano, Italia) per mettere in evidenza la fermentazione del glucosio e la mancata fermentazione del lattosio e Christensen Urea Agar per l'idrolisi dell'urea. Il KIA si presenta con lo slant del becco di clarino di colore rosso ed il fondo giallo, in quanto viene fermentato il glucosio ma non il lattosio; il terreno all'urea vira al fucsia per l'idrolisi dell'urea e l'alcalinizzazione del terreno (Immagine 7).

In seguito, sulle colture glucosio-positive, lattosio-negative e ureasi-positive, si eseguivano altre prove preliminari basate sulla fermentazione di quattro zuccheri: saccarosio, melibiosio, ramnosio e sorbitolo (incubazione a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ per 24 ore).

Il profilo corrispondente a *Y. enterocolitica* prevede reazione positiva alla fermentazione del saccarosio e del sorbitolo, e reazione negativa a ramnosio e melibiosio; il profilo corrispondente a *Y. pseudotuberculosis* prevede la fermentazione del melibiosio e del ramnosio, e reazione negativa a saccarosio e sorbitolo. I brodi contenenti gli zuccheri si presentano di colore rosso prima dell'inoculo, ma in caso di fermentazione virano al giallo (Norma ISO 10273:2017).

L'identificazione di specie si ottiene utilizzando il sistema miniaturizzato API 20E.



Immagine 1. Campionamento con delimitatore e spugna.



Immagine 2. Prelievo linfonodi mesenterici.

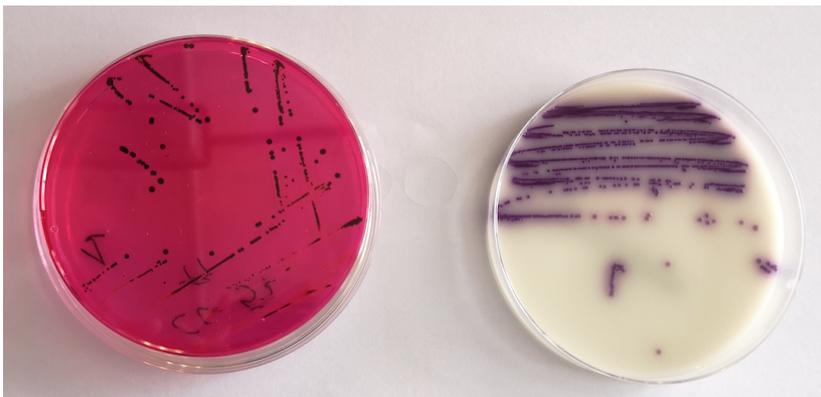


Immagine 3. Colonie *Salmonella* spp. su piastre di XLD e terreno cromogeno.



Immagine 4. Caratteri biochimici tipici *Salmonella* spp. su TSI e LIA.



Immagine 5. Gallerie di prove biochimiche per *Salmonella* spp. con sistema API 20E (in alto) e Microgen GNA (in basso)



Immagini 6 e 7. Colonie di *Yersinia* spp. su piastra CIN (a sinistra) e prove biochimiche su KIA e terreno all'urea (a destra).

Campione n°

Fascetta n°

Sesso cinghiale: M F

Centro raccolta

Comune

Località

Data arrivo al centro di lavorazione: .../.../..... Ora arrivo al centro di lavorazione: ... : ...

Data abbattimento: .../.../..... Ora abbattimento: ... : ...

Data eviscerazione: .../.../... Ora eviscerazione: ... : ...

Palla con piombo: SI NO

Punto ingresso: indicare fig 1

Punto uscita: indicare fig 2

Regione colpita: torace addome testa altro

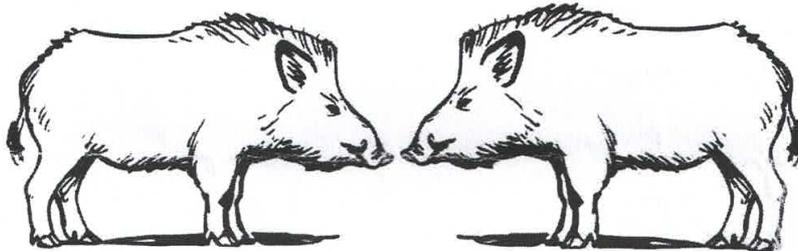


fig 1: foro ingresso

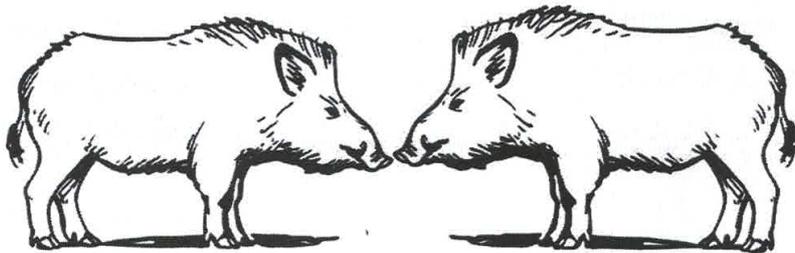


fig. 2: foro uscita

Luogo campionamento	Data e ora campionamento	Temperatura
Sala Baganza (PR) Centro di sosta		ambiente
Monterenzio (BO) Centro di lavorazione		cella

Note:.....
.....
.....

Data: ... / ... /

3. RISULTATI

Durante l'anno 2020 sono stati raccolti in totale 225 campioni da 79 cinghiali, prelevati in provincia di Parma e Piacenza, Emilia-Romagna. I campioni raccolti comprendevano 158 campioni di carcassa (79 campioni A e 79 campioni B) e 67 campioni di linfonodi mesenterici (Tabella 8).

Dei 79 cinghiali abbattuti, 40 (50,6%) erano di sesso maschile e 39 (49,4%) di sesso femminile, ed il peso medio è risultato 59 kg (range: 10-153 kg, mediana 56 kg). Venti (25,3%) cinghiali sono stati abbattuti in inverno, 13 (16,5%) in estate e 46 (58,2%) in autunno. Nessun abbattimento è stato effettuato durante il periodo primaverile. Dei cinghiali abbattuti 25 (31,6%) erano di classe 0, 20 (25,3%) di classe 1 e 34 (43%) di classe 2.

In 18 (22,8%) dei 79 cinghiali abbattuti il proiettile ha attraversato l'addome, in 42 (53,2%) il torace e in 19 (24%) la testa (Tabella 9).

L'analisi statistica dei dati ottenuti ha permesso di rilevare che non sono state osservate differenze statisticamente significative per la presenza di *Salmonella* spp. nei campioni né in relazione al sesso degli animali (maschi: $P=0,6609$; $OR=1,5$; femmine: $P=0,6669$; $OR=0,6667$), né in relazione alla stagione (calda: $P=0,8256$; $OR=1,2917$; fredda: $P=0,8256$; $OR=0,7742$) o alla regione anatomica colpita dal proiettile (addome: $P=0,7033$; $OR=1,4$).

Le 79 carcasse di cinghiale sono state campionate due volte e i campioni sono stati denominati "campione A" e "campione B".

Il campione A ($n=79$) è stato prelevato presso il centro di raccolta dei Boschi di Carrega, immediatamente dopo le fasi di eviscerazione e pulizia.

Il campione B ($n=79$) è stato prelevato dalle stesse carcasse a seguito del trasporto presso lo stabilimento di lavorazione delle carni di selvaggina di Bologna (66 carcasse), mentre per le restanti 13 carcasse si è eseguito il campionamento presso un macello di suini sito in provincia di Parma.

In concomitanza del primo campionamento presso il centro di raccolta è stato prelevato, per 67 cinghiali, un campione di linfonodi mesenterici.

I dati mostrano che 2/79 campioni A (2,5%) e 4/79 campioni B (5%) sono risultati positivi a *Salmonella* spp. I campioni B positivi per *Salmonella* provenivano dallo stabilimento di lavorazione delle carni di selvaggina della provincia di Bologna, mentre nessuno dei 13 campioni B provenienti dal macello di suini sito in provincia di Parma è risultato positivo. Per quanto riguarda i campioni di linfonodi meseraici, 5/67 (7,5%) sono risultati positivi a *Salmonella* spp.

In merito all'isolamento di *Salmonella* spp., le positività riscontrate a seguito delle analisi dei campioni A non sono mai state riconfermate all'analisi dei campioni B; quindi nessuna corrispondenza tra i risultati del campionamento pre- e post-trasporto è stata rilevata.

I campioni linfonodali positivi a *Salmonella* spp. non hanno trovato corrispondenza nelle positività rilevate nelle carcasse analizzate a seguito del trasporto (campione B).

Solamente un capo è risultato positivo a *Salmonella* spp. sia al campione A sia nel corrispondente campione linfonodale; la sierotipizzazione ha messo in evidenza lo stesso sierotipo di *Salmonella* (*S. Agama*) nei due siti oggetto del campionamento.

I 12 animali, ai quali non sono stati prelevati i linfonodi, non presentavano positività a *Salmonella* né al campione A, né al campione B.

Le serovar isolate sono rappresentate da *S. Enteritidis*, *S. Agama*, *S. Typhimurium*, *S. Zaiman*, *S. houtenae*, *S. diarizonae* (Figura 7).

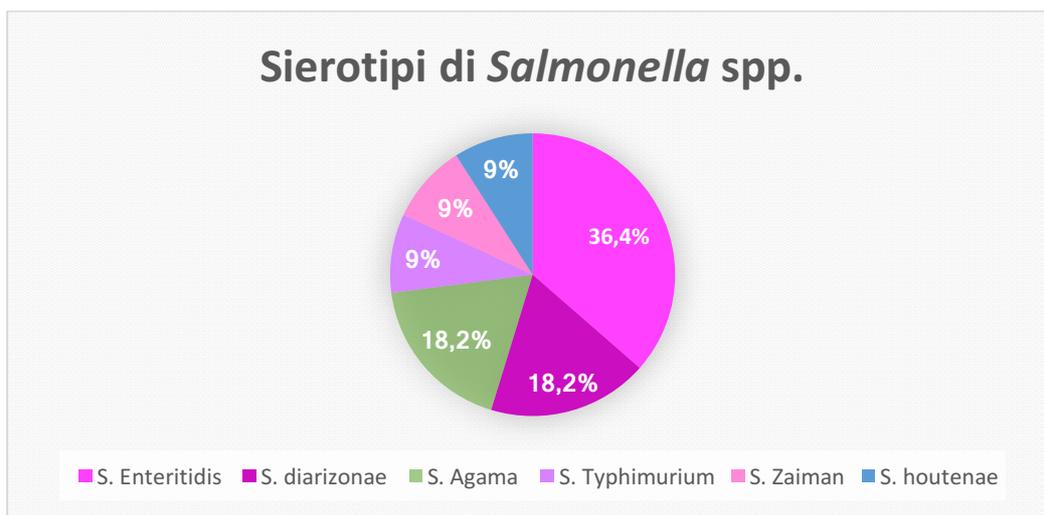


Figura 7. Sierotipi di *Salmonella* spp. isolati da carcasse e linfonodi di cinghiale.

Per quanto riguarda i soggetti risultati contaminati da *Salmonella*, i due cinghiali positivi (campione A-carcassa) erano entrambi di sesso maschile e di classe 2. Il peso era di 85 kg e 122 kg; il proiettile ha colpito il torace in un caso e la testa nell'altro. I due cinghiali sono stati abbattuti uno in inverno e uno in estate.

I quattro cinghiali positivi (campione B) erano tutti di sesso maschile, tre appartenenti alla classe 2 ed uno alla classe 1. Il peso è risultato di 101 kg, 98 kg, 82 kg e 52 kg. Un cinghiale è stato abbattuto in inverno mentre i restanti tre in autunno; le regioni colpite sono risultate l'addome in due casi, la testa e il torace in un caso ciascuno.

Dei cinque capi positivi al campione linfonodale, tre erano di sesso maschile e due di sesso femminile; tre appartenevano alla classe 1 e due alla classe 2. Il loro peso è risultato di 85 kg, 52 kg, 73 kg, 41 kg e 48 kg. Quattro cinghiali sono stati abbattuti in autunno mentre uno in estate; la regione colpita è risultata l'addome e la testa in due casi ciascuno e il torace in un caso (Tabella 10).

Y. enterocolitica e *Y. pseudotuberculosis* non sono mai state isolate da nessun campione. Solamente 3/79 (3,8%) campioni A sono risultati contaminati da microrganismi del genere *Yersinia*, rispettivamente un ceppo di *Y. frederiksenii*, *Y. bercovieri* e *Y. aldovae* (Tabella 11).

Nessun campione linfonodale e nessun campione B è risultato positivo per *Yersinia* spp.

I cinghiali abbattuti nella stessa giornata sono stati raggruppati in "lotti", dal momento che questi individui venivano eviscerati nel medesimo giorno e dagli stessi operatori. Gli animali di un lotto riportavano nella scheda dati la stessa data e luogo di abbattimento e le loro carcasse venivano conservate nella medesima cella frigorifera, presso il centro di raccolta. Sempre assieme, venivano trasportate allo stabilimento di lavorazione delle carni di selvaggina, riportando la stessa data di arrivo e la stessa data di campionamento. Analizzando quindi le positività all'interno dei diversi lotti (17 in totale), i nostri dati mostrano che i linfonodi positivi a *Salmonella* spp. (5/67) appartengono ad un capo del lotto n° 8, a due capi del lotto n° 13, ad un animale del lotto n° 14 ed un animale del lotto n° 17 (Tabella 10).

I capi a cui non è stato possibile prelevare i linfonodi (n=12) appartenevano a diversi lotti, in particolare un capo del lotto n° 6, cinque capi del lotto n° 12, uno del lotto n° 14 e cinque del lotto n° 16.

Delle carcasse risultate positive a *Salmonella* spp. nel campione A (2/79) una appartiene al lotto n° 8 e una al lotto n° 15, mentre di quelle positive a *Salmonella* spp. nel campione B (4/79), una appartiene al lotto n° 2, due al lotto n°13 ed una al lotto n° 14.

Incrociando i dati si può quindi stabilire che il lotto n° 13, formato da sette cinghiali, presenta una positività al campione B, due positività ai campioni linfonodali e una positività al campione A appartenenti a quattro capi differenti. Dalle prime tre positività è stata isolata *Salmonella* Enteritidis mentre dall'ultima è stata isolata *Y. aldovae*. Il tempo intercorso tra il primo campionamento ed il secondo è stato di 7 giorni.

Il lotto n° 14, formato da otto individui, risulta avere un campione linfonodale positivo e due campioni B positivi, ancora una volta appartenenti a tre individui differenti. Da questi campioni è stata isolata rispettivamente *S. Zaiman* (linfonodo), *S. diarizonae* e *S. Enteritidis*. Il tempo intercorso tra i due campionamenti è stato di 3 giorni.

Il lotto n° 15, formato da nove capi, ha presentato un solo campione A positivo, da cui è stata isolata *S. Typhimurium*. I due campionamenti sono stati effettuati a 24 ore di distanza.

Il lotto n° 17, formato da dodici individui, ha presentato un solo campione linfonodale positivo, da cui è stata isolata *S. diarizonae*. Anche in questo caso i due campionamenti sono stati effettuati a distanza di 24 ore.

Il lotto n° 2, formato da sei capi, ha presentato solo una positività al campione B, dal quale è stata isolata *S. houtenae* e due positività al campione A, dal quale sono state isolate *Y. bercovieri* e *Y. frederiksenii*. Il tempo intercorso tra i due campionamenti è stato di 6 giorni. Infine, il lotto n° 8 era formato da un solo individuo, risultato positivo sia al campione linfonodale che al campione A, ma non al campione B. Da questo capo è stata isolata *S. Agama* ed il tempo intercorso tra i due campionamenti è stato di 7 giorni.

Non sono state trovate altre corrispondenze tra le positività dei lotti del campione A e del campione linfonodale con quelli del campione B.

Il tempo medio trascorso, dal momento del primo campionamento fino al momento dell'esecuzione del campionamento presso il centro di lavorazione di Bologna, è stato di 3,7 giorni (range 1-8 giorni); invece 2,3 giorni (range 1-5 giorni) è stato il tempo medio trascorso dal momento del primo campionamento al secondo campionamento presso il macello di suini della provincia di Parma.

Campione	Numero totale campionati	Numero totale analizzati	Numero campioni positivi		
			<i>Salmonella</i> spp.	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
Carcassa	79 (x2)	79 (x2)	6	0	0
Linfonodo mesenterico	67	67	5	0	0
totale	304	235	11	0	0

Tabella 8. Risultati campioni raccolti e analizzati

LOTTE	N° CAPI	SALMONELLA			YERSINIA			sesso		Foro proiettile			Peso medio (Kg)	Tempo trascorso tra A-B in giorni	Stagione	Classe d'età		
		Carcassa A	linfonodi	Carcassa B	Carcassa A	linfonodi	Carcassa B	M	F	testa	torace	addome				0	1	2
1	6	0	0	0	0	0	0	4	2	3	1	2	55	3	inverno	1	2	3
2	6	0	0	1	2	0	0	3	3	0	3	3	58	6	inverno	2	1	3
3	2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	56	3	inverno	1	0	1
4	6	0	0	0	0	0	0	4	2	1	4	1	52	2	Inverno	2	2	2
5	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	58	4	estate	0	1	0
6	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	33	6	estate	1	0	0
7	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	103	8	estate	0	0	2
8	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	85	7	estate	0	0	1
9	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	86	1	estate	1	0	1
10	4	0	0	0	0	0	0	2	2	3	1	0	50	1	estate	1	2	1
11	2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	35	6	estate	2	0	0
12	5	0	0	0	0	0	0	2	3	1	4	0	38	4	autunno	4	0	1
13	7	0	2	1	1	0	0	5	2	1	3	3	66	6	autunno	0	3	4
14	8	0	1	2	0	0	0	5	3	2	5	1	61	3	autunno	0	6	2
15	9	1	0	0	0	0	0	5	4	3	3	3	57	1	autunno	4	1	4
16	5	0	0	0	0	0	0	1	4	0	5	0	67	1	autunno	1	1	3
17	12	0	1	0	0	0	0	2	10	1	9	2	63	1	autunno	5	1	6
TOTALE	79	2	5	4	3	0	0	40	39	19	42	18	59	3,7		25	20	34

Tabella 9. Risultati dati raccolti totali

LOTTI	N° CAPI positivi	SALMONELLA				sesso		Foro del proiettile			Peso (Kg)	Tempo trascorso tra A-B in giorni	Stagione	Classe d'età		
		Carcassa A	linfonodi	Carcassa B		M	F	testa	torace	addome				0	1	2
2	1			x	<i>S. houtenae</i>	X				x	52	6	inverno		x	
8	1	x	x		<i>S. Agama</i>	x		x			85	7	estate			x
13	3			x	<i>S. Enteritidis</i>	x				x	82	6	autunno			x
			x			x		52		x						
			x				x	73		x						
14	3			x	<i>S. diarizonae</i>	x			x		98	3	autunno			x
				x	<i>S. Enteritidis</i>	x		x			101					x
			x		<i>S. Zaiman</i>	x			x		41				x	
15	1	x			<i>S. Typhimurium</i>	x			x		122	1	autunno			x
17	1		x		<i>S. diarizonae</i>		x			x	48	1	autunno		x	

Tabella 10. Risultati dei campioni positivi per *Salmonella* spp.

LOTTI	N° CAPI positivi	YERSINIA				sesso		Foro del proiettile			Peso medio (Kg)	Tempo trascorso tra A-B in giorni	Stagione	Classe d'età		
		Carcassa A	linfonodi	Carcassa B		M	F	testa	torace	addome				0	1	2
2	2	x			<i>Y. bercovieri</i>		x			x	70	6	inverno			x
		X			<i>Y. frederiksenii</i>		x		x		40			x		
13	1	x			<i>Y. aldovae</i>		x		x		81	6	autunno			x

Tabella 11. Risultati dei campioni positivi per *Yersinia* spp.

4. DISCUSSIONE

Da diversi anni in Italia il numero totale di cinghiali è nettamente in aumento, così come l'interesse dei consumatori per la carne di selvaggina (Barbani *et al.*, 2011), delle quali la carne di cinghiale risulta la più consumata. Essa rappresenta, infatti, circa l'80% della carne ottenuta da ungulati selvatici. Ramanzin *et al.* (2010) hanno stimato una disponibilità di carne di cinghiale nella penisola italiana di oltre 5.000 tonnellate annue, ad oggi non più destinata solamente all'autoconsumo da parte delle famiglie di cacciatori, ma in parte destinata all'immissione sul mercato locale (direttamente al consumatore finale o al commercio al dettaglio) e alla commercializzazione su larga scala. In quest'ultimo caso è obbligatorio l'invio delle carcasse ad un centro di lavorazione della selvaggina riconosciuto dall'Autorità Competente ai sensi del Regolamento (CE) 853/2004.

Pertanto, visto il grande consumo di carne di cinghiale nel nostro paese, in questo lavoro di tesi si è indagato il ruolo che può assumere il cinghiale come portatore di *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis* trasmissibili all'uomo tramite il consumo delle carni di questa specie. In Italia mancano, infatti, sia un piano di epidemio-sorveglianza nel cinghiale di questi microrganismi zoonotici, che sono invece isolati da esseri umani affetti da malattie enteriche (EFSA ed ECDC, 2021), sia dei criteri microbiologici per le carni di selvaggina selvatica. Le carcasse o la carne di cinghiale, per l'appunto, non rientrano nel campo di applicazione del Regolamento (CE) 2073/2005.

4.1 Prevalenza di *Salmonella* spp. nei cinghiali

I risultati ottenuti in questo studio confermano la diffusione di *Salmonella* spp. nei cinghiali italiani ed evidenziano il loro potenziale ruolo di portatori di questo patogeno zoonotico.

La maggior parte degli autori indaga la presenza di *Salmonella* nei campioni fecali, mentre pochi studi ne includono il rilevamento nei tessuti linfatici. In questa indagine, il 7,5% (5/67) dei cinghiali è risultato positivo a *Salmonella* spp. nei linfonodi mesenterici. Questo risultato è compreso nei range sia con quanto descritto in studi simili italiani, i quali riportano positività in campioni di tessuto linfonodale comprese tra il 3,5% (2/57) ed il 15,9% (30/189) (Stella *et al.*, 2018; Bonardi *et al.*, 2019), sia con quanto descritto in studi internazionali dove la prevalenza del patogeno varia tra lo 0,2% ed il 18,69% (Sanno *et al.*, 2014; Gil Molino *et al.*, 2019; Petrovic *et al.*, 2022).

La presenza di *Salmonella* nei campioni linfonodali indica l'effettiva diffusione del patogeno dal tratto intestinale al sistema linfatico (EFSA, 2008). Esaminando quanto pubblicato da studi italiani, basati sull'analisi di campioni fecali, emerge come i dati, riguardanti la prevalenza di *Salmonella* nel cinghiale, varino molto da studio a studio con valori che oscillano tra il 2,4% ed il 35,6% (Chiari *et al.*, 2013; Zottola *et al.*, 2013; Stella *et al.*, 2018; Bonardi *et al.*, 2019; Cilia *et al.*, 2021; Piras *et al.*, 2021). Lo stesso scenario si presenta analizzando studi condotti in altri paesi europei dove questi valori variano tra lo 0% ed il 44%. (Wahlstrom *et al.*, 2003; Wacheck *et al.*, 2010; Vieira-Pinto *et al.*, 2011; Navarro-Gonzalez *et al.*, 2013; Ward *et al.*, 2013; Sannö *et al.*, 2014; Dias *et al.*, 2015; Cummings *et al.*, 2016; Glawischnig *et al.*, 2018; Sannö *et al.*, 2018).

Un ulteriore studio italiano, che può esser utile a livello conoscitivo, è quello condotto da Zottola *et al.* (2013) sulla sieroprevalenza di *Salmonella* nel cinghiale. In questo studio gli autori descrivono un valore di sieroprevalenza del 66,5%, che è risultato nettamente superiore rispetto a quelli ottenuti mediante analisi microbiologiche su altre matrici. Ovviamente questo valore permette di identificare, in termini numerici, la popolazione che è venuta a contatto con il patogeno nel tempo, ma non ha alcuna utilità nel determinare lo stato di infezione dei singoli animali al momento della caccia. La sieroprevalenza è infatti una misura dell'esposizione storica al patogeno, che può essere o meno correlata alla contaminazione microbiologica al momento del campionamento (Zottola *et al.*, 2013).

In questo lavoro di tesi la scelta di analizzare la matrice linfonodale, piuttosto che quella fecale, si è basata su studi precedenti dai quali era emersa una maggiore prevalenza di portatori linfonodali rispetto a quelli fecali, in linea con quanto riportato nei suini domestici (Hurd *et al.*, 2004; Wacheck *et al.*, 2010; Bonardi *et al.*, 2013; Bonardi *et al.*, 2016; Bonardi *et al.*, 2019; Sanno *et al.*, 2014 e 2018; Gil Molino *et al.*, 2019).

Un altro motivo che ha indotto ad analizzare la matrice linfonodale risiede nel fatto che le salmonelle non vengono escrete in modo continuo dagli animali infetti; l'escrezione diminuisce nel tempo e diventa intermittente al termine dell'infezione, quando l'animale diventa gradualmente un portatore asintomatico (Wood *et al.*, 1989; Beloeil *et al.*, 2003).

Mentre diversi studi suggeriscono una prevalenza simile o superiore di *Salmonella* nei linfonodi rispetto alle feci, altre indagini condotte in Italia ed in Serbia hanno evidenziato una maggior prevalenza nelle feci (35,6%; 3,1%) rispetto ai linfonodi (17,8%; 0,2%) (Piras *et al.*, 2021; Petrovic *et al.*, 2022).

Purtroppo, un reale confronto tra i risultati forniti dai diversi studi non è possibile a causa delle differenze nelle procedure analitiche utilizzate, che variano dalla rilevazione microbiologica (Chiari *et al.*, 2013; Ward *et al.*, 2013; Zottola *et al.*, 2013; Cummings *et al.*, 2016; Stella *et al.*, 2018; Bonardi *et al.*, 2019) all'utilizzo della PCR o di metodiche miste (PCR-microbiologia) (Sanno *et al.*, 2014 e 2018; Piras *et al.*, 2021). Le differenze di sensibilità tra i vari metodi analitici influenzano, infatti, la loro capacità di rilevare campioni positivi e, pertanto, possono contribuire alla variabilità osservata nei differenti studi per quanto riguarda la prevalenza dell'infezione da *Salmonella* spp. nei cinghiali.

Tra tutte le tecniche di analisi, la PCR è stata ritenuta la più sensibile nel rilevare *Salmonella* nel suino (Vieira-Pinto *et al.*, 2007; Wacheck *et al.*, 2010; Sanno *et al.*, 2014), anche se rimane la possibilità di falsi positivi dovuti a batteri non vitali (Eriksson e Aspan, 2007). Inoltre, come descritto in precedenza (Funk *et al.*, 2000), anche la quantità del campione analizzato (in termini di grammi processati) può influenzare la sensibilità del metodo (Wacheck *et al.*, 2010; Giorda *et al.*, 2014). Infine, vanno sicuramente considerate anche altre variabili, quali l'habitat, la stagione di campionamento, la tipologia di caccia, la distribuzione di età e sesso, la densità di popolazione (Wahlstrom *et al.*, 2003; Sanno *et al.*, 2014).

Viste le differenze nell'impostazione dei vari studi, non si può pertanto affermare con certezza che il tessuto linfatico sia la matrice preferibile per identificare i cinghiali portatori di *Salmonella*.

Sulla base dei risultati del presente lavoro di tesi, non è stata riscontrata alcuna correlazione statisticamente significativa ($P > 0,05$) tra la prevalenza di *Salmonella* ed il sesso degli animali (3 maschi e 2 femmine), in accordo con quanto riportato negli studi di Chiari *et al.* (2013), Al Dahouk *et al.* (2005) e Bonardi *et al.* (2019). Esistono però altri lavori nei quali è stata riportata una maggior prevalenza di *Salmonella* nei cinghiali di sesso femminile (Wacheck *et al.*, 2010; Cano-Manuel *et al.*, 2014; Gil Molino *et al.*, 2018).

Per quanto riguarda invece l'età dei cinghiali, si è osservato una prevalenza maggiore, anche se non statisticamente significativa, nella classe di animali di 13-24 mesi (classe 1), rispetto a quella di animali di età superiore a 24 mesi (classe 2), anche in accordo con quanto descritto negli studi di Fredriksson-Ahomaa *et al.* (2009), Chiari *et al.* (2013) e Zottola *et al.* (2013).

Per quanto riguarda la colonizzazione intestinale da parte di *Salmonella* spp., gli animali giovani, attorno all'anno d'età, sembrano essere più suscettibili rispetto agli animali più

vecchi, probabilmente per lo sviluppo di un'immunità acquisita all'interno della popolazione da parte di questi ultimi (Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2009).

Contrariamente a quanto descritto da studi precedenti, che dimostravano un aumento della prevalenza di *Salmonella* durante le stagioni calde (Haley *et al.*, 2009; Cummings *et al.*, 2016; Bonardi *et al.*, 2019), in questo studio l'80% (4/5) dei campioni linfonodali positivi sono stati prelevati durante la stagione autunnale, mentre solamente il 20% (1/5) è stato prelevato durante la stagione estiva. Questa differenza, tuttavia, non è risultata statisticamente significativa ($P = 0,8256$).

I ceppi isolati dai linfonodi meseraici, tipizzati dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER), sono risultati appartenere ai seguenti serovar:

- *S. Agama*
- *S. Zaiman*
- *S. enterica* subsp. *diarizonae*
- *S. Enteritidis*

S. Enteritidis è il sierotipo più frequentemente isolato nei cinghiali italiani (Razzuoli *et al.*, 2021) e ricopre un ruolo di notevole importanza ai fini della qualità sanitaria degli alimenti, poiché l'EFSA lo descrive come il serovar responsabile del maggior numero di casi di salmonellosi umana in Europa (54,6%) (EFSA ed ECDC, 2022).

Dato che in letteratura non esistono studi che riportino l'isolamento di *S. Agama* e *S. Zaiman* nei cinghiali in Europa, il loro ritrovamento riveste un particolare interesse. *S. Agama* è stata isolata solamente in tassi e bovini in Gran Bretagna (Wilson *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2004), nelle lucertole arcobaleno (*Agama agama*) e nell'uomo in Africa (Bélard *et al.*, 2007). *S. Zaiman*, invece, è un serovar raro, isolato per la prima volta nell'uomo e dalle acque del fiume Zaiman in Argentina da cui prende il nome (Vergara *et al.*, 1989). Recentemente in Italia è stata isolata dalla volpe (*Vulpes vulpes*), dimostrandone così la presenza negli animali selvatici (Rubini *et al.*, 2016).

In questo studio è stato, inoltre, isolato un ceppo di *S. enterica* subs. *diarizonae* che solitamente si trova, insieme ad altre sottospecie "non enteriche", negli animali a sangue freddo. Tuttavia, *S. enterica* subs. *diarizonae* si è adattata anche agli animali a sangue caldo, sia mammiferi selvatici e domestici che uccelli (Bonke *et al.*, 2012; Botti *et al.*, 2013; Chiari *et al.*, 2013; Evangelopoulou *et al.*, 2014; Lamas *et al.*, 2016). Questo dato è in accordo con studi italiani nei quali *S. enterica* subsp. *diarizonae* è stata comunemente

isolata nei cinghiali presenti in Italia (Chiari *et al.*, 2013; Zottola *et al.*, 2013; Giordia *et al.*, 2014).

4.2 Prevalenza di *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* nei cinghiali

In questo lavoro di tesi *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* non sono state isolate da nessun campione di linfonodi mesenterici. In letteratura *Y. enterocolitica* è stata rilevata con percentuali fortemente variabili nelle feci dei cinghiali, ed esattamente da nessun rilevamento al 25,3% (Sanno *et al.*, 2018; Syczylo *et al.*, 2018; Bonardi *et al.*, 2020; Cilia *et al.*, 2021), mentre valori con un range più ampio (0%-64,3%) sono stati descritti a partire da campioni di linfonodi e/o tonsille (Sanno *et al.*, 2014; von Altrock *et al.*, 2015; Bancercz-Kisiel *et al.*, 2016; Arrausi-Subiza *et al.*, 2014 e 2016).

Data l'ampia variabilità dei dati di prevalenza, si ipotizza che l'eliminazione fecale possa essere intermittente (Arguello *et al.*, 2019), come descritto per altre specie appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Inoltre, come già evidenziato in precedenza, in alcuni casi il confronto tra gli studi risulta difficile a causa delle diverse tecniche analitiche impiegate (metodo colturale vs PCR).

La prevalenza di *Y. pseudotuberculosis*, nei cinghiali, ottenuta mediante analisi microbiologica in campioni di tessuto linfonodale e di materiale fecale, si aggira intorno all'1-3%. Prevalenze più elevate (20-26%) sono state descritte nei cinghiali utilizzando solamente la PCR (Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2009). Inoltre, molti studi indicano le tonsille come materiale preferibile da campionare perché rappresentano una vera e propria nicchia per *Y. pseudotuberculosis* (Wacheck *et al.*, 2010; Sanno *et al.*, 2014; Reinhardt *et al.*, 2018; Sanno *et al.*, 2018).

Il risultato di questo lavoro di tesi rimane comunque in linea rispetto a studi condotti in precedenza, nella stessa area geografica, che riportano assenza di campioni positivi per *Y. enterocolitica* nei cinghiali (Bonardi *et al.*, 2020).

4.3 Prevalenza di *Salmonella* spp. sulle carcasse di cinghiale

4.3.1 Campionamento A presso il centro di raccolta

In questo studio le carcasse di cinghiale sono state campionate sia nel centro di raccolta (A) che nello stabilimento di lavorazione delle carni di selvaggina (B).

La prevalenza di *Salmonella* spp. osservata sulle carcasse nel centro di raccolta è risultata pari al 2,5% (2/79). Questo valore è decisamente superiore rispetto a quello pubblicato in altri studi italiani a parità di metodo di campionamento (Avagnina *et al.*, 2012; Stella *et al.*, 2018; Peruzzy *et al.*, 2022) nei quali è descritta l'assenza di *Salmonella* sulle carcasse (0/37; 0/30; 0/72). In altri studi nei quali è stato impiegato lo stesso metodo di campionamento, ma applicato su tagli di carne, la prevalenza di *Salmonella* a livello di centro di raccolta poteva variare tra lo 0% ed il 35,7% (Diaz-Sanchez *et al.*, 2013; Russo *et al.*, 2016; Peruzzy *et al.*, 2019; Orsoni *et al.*, 2020).

Tutte le carcasse risultate positive presso il centro di raccolta (A), sono risultate negative a seguito del campionamento presso lo stabilimento di lavorazione delle carni di selvaggina (B). Tuttavia, la prevalenza di carcasse positive al campionamento B è risultata due volte superiore (5%; 4/79) rispetto a quella delle carcasse al campionamento A (2,5%; 2/79). Confrontando questo dato con quanto riportato in bibliografia, dove in vari studi la prevalenza di carcasse positive presso lo stabilimento di lavorazione delle carni di selvaggina variava tra lo 0% ed il 2,5% (Asakura *et al.*, 2017; Mirceta *et al.*, 2017; Ranucci *et al.*, 2021), possiamo considerare come quanto descritto nel nostro studio sia nettamente superiore.

Per comprendere come possa verificarsi la contaminazione da patogeni enterici va specificato che il tessuto muscolare di animali sani è considerato generalmente sterile e la sua contaminazione potrebbe verificarsi per molteplici fattori, tra i quali il momento in cui gli animali vengono abbattuti in campo, i danni riportati ad organi interni o tessuti, il tragitto del proiettile, il tempo intercorso tra abbattimento ed eviscerazione, la temperatura esterna, il metodo di eviscerazione ed altri fattori legati all'animale, quali il sesso, il peso e la classe d'età (Gill *et al.*, 2007).

In questo studio, la percentuale di animali colpiti nella regione addominale, che rappresenta quella più a rischio in fatto di contaminazione, è stata del 22,8% (18/79) e risulta bassa se confrontata con quella riportata in altri studi italiani, nei quali variava tra il 35% ed il 43% (Avagnina *et al.*, 2012; Mirceta *et al.*, 2017).

Nonostante gli animali colpiti in un qualsiasi area posteriore al diaframma (abbattimenti addominali) vengano ragionevolmente considerati a più alto rischio di contaminazione

microbiologica rispetto a quelli colpiti in altre sedi (cuore, testa e collo, colonna vertebrale), non è sempre possibile osservare differenze statisticamente significative, come sostenuto nello studio di Winkelmayr *et al.* (2008). Nel presente lavoro di tesi, infatti, non è stato possibile osservare alcuna differenza significativa per quanto riguarda l'isolamento di *Salmonella* tra gli animali colpiti nella regione addominale e quelli colpiti altrove. Questo risultato potrebbe indicare che le positività riscontrate non sono correlate alla sola regione anatomica colpita al momento dell'abbattimento, ma che con grande probabilità esistono più co-fattori che influenzano l'igiene e la sicurezza delle carni di cinghiale.

Tra i fattori che possono influenzare la contaminazione della carcassa da parte di *Salmonella* vanno sicuramente annoverate le caratteristiche degli animali ed, in particolare, il peso; infatti, animali con peso superiore di 60 kg presentano generalmente a livello di carcassa un conteggio di *Enterobacteriaceae* più elevato rispetto a quelli con peso inferiore, dovuto probabilmente alla maggior difficoltà di gestione dell'animale abbattuto da parte dei cacciatori (Stella *et al.*, 2018; Orsoni *et al.*, 2020). La massiccia presenza di *Enterobacteriaceae* potrebbe influire sulla probabilità di riscontrare *Salmonella* sulle carcasse (Asakura *et al.*, 2017).

Nel presente studio tutte le carcasse contaminate da *Salmonella*, eccetto una, derivavano da animali il cui peso vivo era superiore a 82 kg ed appartenevano ad individui di sesso maschile, anche se la determinazione del sesso non è risultata statisticamente significativa ($P > 0,05$; 0,6609). Il sesso degli animali non è probabilmente correlato ad aumento dei livelli microbici, ma al peso vivo corporeo, che solitamente è maggiore nei cinghiali maschi. Un maggior peso vivo ed una maggior dimensione dell'animale rende più difficoltoso il trasporto dell'animale cacciato, richiede tempi di gestione più lunghi e procedure di eviscerazione più complesse, esponendo così la carcassa a maggior probabilità di contaminazione con materiale fecale (Stella *et al.*, 2018; Orsoni *et al.*, 2020).

Un altro fattore molto importante da analizzare è la temperatura ambientale, nonostante gli animali debbano essere inviati al centro di raccolta in tempi relativamente brevi, e solitamente sempre sotto le 5 ore dall'abbattimento (Gill, 2007; Avagnina *et al.*, 2012). Tuttavia, contrariamente a quello riportato in letteratura, nel presente studio la positività delle carcasse a *Salmonella* è risultata maggiore durante le stagioni fredde (autunno e inverno).

Infine, un altro fattore che potrebbe incidere sulla positività dei campioni prelevati al centro di raccolta è rappresentato dalla modalità di eviscerazione. Quando gli animali abbattuti vengono eviscerati dopo 3 ore dall'abbattimento la probabilità di diffusione batterica dall'intestino e la conseguente contaminazione della carcassa è più elevata (Avagnina *et al.*, 2012). In questo studio il tempo intercorso tra abbattimento ed eviscerazione rimaneva sotto le 5 ore.

La procedura di eviscerazione rimane comunque un fattore potenzialmente problematico indipendentemente dal tempo intercorso dall'abbattimento. *Salmonella*, infatti, è un batterio di origine enterica e la sua presenza sulla superficie della carcassa potrebbe essere il risultato di un'eviscerazione eseguita non correttamente (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018).

Nessun campione A, positivo per *Salmonella*, ha avuto riscontro in B. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che, in questo studio, i due campionamenti sono stati eseguiti su due punti differenti e speculari della carcassa, precisamente sulla parete addominale, in corrispondenza del muscolo psoas di sinistra e di destra.

4.3.2 Campionamento B presso lo stabilimento di lavorazione delle carni di selvaggina

Una prima ipotesi per spiegare la maggior prevalenza di carcasse positive al campionamento B rispetto a quella del campionamento A è che le carcasse siano state conservate in pelo e pertanto non scuoiate. La presenza del pelo, infatti, aumenta il rischio di contaminazione della carcassa, come descritto da numerosi autori (Casoli *et al.*, 2005; Marsico *et al.*, 2007; Ramanzin *et al.*, 2010), e dimostrato dal rilevamento di *Salmonella* sulla cute e sul pelo dei cinghiali (Mirceta *et al.*, 2017). Dall'esterno, attraverso l'apertura addominale e toracica, i batteri possono facilmente raggiungere l'interno della carcassa.

Un altro fattore di rischio per la contaminazione delle carcasse potrebbe essere rappresentato dal trasporto che, seppur eseguito tenendo conto del Regolamento (CE) 852/2004 e Regolamento (CE) 853/2004 sulle pratiche di igiene dei prodotti alimentari, può determinare il contatto tra la superficie interna e la superficie esterna delle carcasse.

Un'altra operazione a rischio potrebbe essere rappresentata dal lavaggio delle carcasse che, in questo studio, è stato eseguito routinariamente dopo l'eviscerazione ed il

dissanguamento, evitando di indirizzare il getto d'acqua sulla cute e sul pelo in modo da non contaminare la superficie interna. Il lavaggio è stato eseguito in modo particolarmente accurato nel momento in cui le cavità addominale e toracica si presentavano contaminate da materiale fecale, sangue, terra ed altri residui organici. Il lavaggio viene infatti solitamente utilizzato per asportare residui di sangue, terriccio, peli e altro materiale che potrebbe contaminare le parti interne della carcassa e quindi prevenire la crescita microbica durante lo stoccaggio in frigorifero, prima dell'arrivo al centro di lavorazione della selvaggina. In realtà, questa pratica è molto dibattuta poiché, in letteratura, sono pubblicati studi in cui è dimostrato che il lavaggio possa aumentare il rischio di contaminazione della carcassa con conseguente aumento significativo della carica microbica (Mirceta *et al.*, 2017).

Nel nostro caso, il lavaggio delle carcasse è stato eseguito da personale qualificato, nel centro di raccolta che garantiva adeguate procedure di igiene (le carcasse venivano appese per arti posteriori e non erano, pertanto, a contatto con superfici potenzialmente contaminate o adagiate sul terreno, come avviene talvolta nelle aree di caccia) e con l'utilizzo di acqua potabile. Per questo motivo, la procedura utilizzata non dovrebbe aver influito negativamente sul livello microbico delle carcasse esaminate.

Il rapido abbassamento della temperatura fino a valori di refrigerazione (massimo +7°C, secondo il Regolamento (CE) 853/2004) ed il suo mantenimento rappresentano fattori fondamentali per contenere la moltiplicazione batterica. Dato che le popolazioni microbiche di origine enterica, rappresentate soprattutto da batteri mesofili, tendono a crescere sulle carcasse soprattutto nella fase iniziale, quando la temperatura è ancora elevata, controllare e mantenere la temperatura di refrigerazione risulta fondamentale per ridurre la possibilità di crescita di *Salmonella*, sfruttando lo stress batterico che si verifica alle basse temperature (EFSA, 2011).

Nel nostro studio le carcasse sono state collocate nella cella frigorifera a +4±1° C immediatamente dopo l'eviscerazione ed il lavaggio delle cavità interne. Tuttavia, indipendentemente dal mantenimento della corretta temperatura di refrigerazione, si suppone che un tempo di stoccaggio prolungato delle carcasse possa influire sulla qualità sanitaria delle carni. Questa ipotesi è suffragata dalla richiesta, avanzata nelle "Linee guida sull'igiene delle carni di selvaggina selvatica" del 25 marzo 2021, del mantenimento delle carcasse allo stato refrigerato per massimo cinque giorni in un centro di raccolta, seguito dal loro invio ad un centro di lavorazione della selvaggina (Intesa Stato-Regioni, 2021).

Il tempo medio intercorso tra il campionamento A, presso il centro di raccolta, ed il campionamento B, presso lo stabilimento di lavorazione delle carni di selvaggina, è risultato di 3,7 giorni. Due delle carcasse risultate positive per *Salmonella* al campionamento B sono state trasportate allo stabilimento di lavorazione dopo 6 giorni e questo suggerirebbe che l'eccessiva permanenza presso il centro di raccolta possa aver influito sul risultato. Questa ipotesi è avvalorata dal fatto che le 13 carcasse, trasportate al macello in un tempo medio di 2,3 giorni, non siano risultate positive. Branciarì *et al.* (2020) indicano che le carcasse dovrebbero essere inviate ad un centro di lavorazione della selvaggina preferibilmente entro 4 giorni.

Gli animali testati sono stati raggruppati in 17 lotti in base al giorno di caccia, dal momento che venivano abbattuti, eviscerati, e refrigerati al centro di raccolta nel medesimo giorno. Le stesse sierovarianti di *Salmonella* non sono mai state riscontrate all'interno dei vari lotti tranne in un caso (lotto numero 13), nel quale sono stati isolati tre stipiti appartenenti alla stessa serovar (*S. Enteritidis*) su tre individui differenti, due positivi al campionamento della carcassa (campione B) e uno positivo nei linfonodi.

Come già descritto nella sezione dei risultati, le carcasse di cinghiale sono risultate contaminate da *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *diarizonae*.

S. Typhimurium è uno dei sierotipi più frequentemente isolati nei casi di salmonellosi umana in Europa, rappresentando l'11,4% dei serovar segnalati nel 2021 (EFSA ed ECDC, 2022). Questo serovar è stato rilevato nei cinghiali in diversi Paesi europei (Pérez *et al.*, 1999; Schulze *et al.*, 2003; Ecco *et al.*, 2006; Wacheck *et al.*, 2010; Caleja *et al.*, 2011; Vieira-Pinto *et al.*, 2011; Bonardi *et al.*, 2019; Gil Molino *et al.*, 2019), da esseri umani (Dionisio *et al.*, 2001) e da suini domestici (EFSA ed ECDC, 2022).

S. enterica subsp. *houtenae* è stata isolata raramente dai cinghiali; viene riportato un suo isolamento nei cinghiali da Zottola *et al.* (2013), altrimenti come tutte le sottospecie "non enteriche" viene principalmente isolata da animali a sangue freddo. In letteratura sono riportati isolamenti di *S. enterica* subsp. *houtenae* principalmente da rettili esotici (Bauwens *et al.*, 2006) e rapaci (Millan *et al.*, 2004) ed è stata anche isolata in casi di infezioni umane associate a contatto con rettili (Tabarani *et al.*, 2010).

Per quanto riguarda le altre sierovarianti (*Enteritidis*, *Agama* e *S. diarizonae*), si rimanda alla discussione alle pagine 73 e 74.

In conclusione, il punto debole della filiera delle carni di selvaggina cacciata sembra rappresentato dalla carenza di criteri microbiologici specifici codificati dalla legislazione dell'Unione Europea. Si tende, anche erroneamente, a paragonare la qualità microbiologica delle carni di cinghiale a quella dei suini domestici (Membre *et al.* 2011), nonostante le carcasse di cinghiale vengano refrigerate “in pelo” e pertanto non scuoiate, mentre le carcasse di suini domestici siano scottate, depilate, flambate e spazzolate per esser private delle setole. Secondo il Regolamento (CE) 1441/2007, quando più di 3/50 (6,0%) carcasse di suini domestici risultano contaminate da *Salmonella*, gli OSA devono adottare misure per migliorare l'igiene del processo di macellazione. Dato che nel nostro studio *Salmonella* è stata isolata da 2/79 (2,5%) carcasse (campione A) e 4/79 (5,1%) carcasse (campione B), l'igiene di processo nel centro di raccolta (A) e negli stabilimenti di lavorazione delle carni di selvaggina (B) potrebbe essere definito soddisfacente.

4.4 Prevalenza di *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* sulle carcasse di cinghiale

Y. enterocolitica e *Y. pseudotuberculosis* non sono mai state isolate dalle carcasse esaminate, anche se altre specie appartenenti al genere *Yersinia* (*Y. frederiksenii*, *Y. bercovieri* e *Y. aldovae*) sono state identificate sulle carcasse nel centro di raccolta. Il loro riscontro può suggerire che la contaminazione fosse legata all'ambiente o al contatto con la cute, piuttosto che alla contaminazione fecale. Queste specie apatogene sono state riscontrate nell'ambiente e sul pelo degli animali e potrebbero contaminare le carcasse dopo che gli animali sono stati feriti e trascinati, eventi frequenti nella caccia al cinghiale (Atanassova *et al.*, 2008).

Analizzando la suddivisione delle carcasse in lotti, è interessante notare come due delle tre carcasse positive a *Yersinia* spp. appartenessero allo stesso lotto. Inoltre, ai due lotti positivi per *Yersinia* spp. appartenevano anche carcasse positive per *Salmonella* che, in entrambi i casi, hanno impiegato 6 giorni ad arrivare allo stabilimento di lavorazione delle carni di selvaggina. Questo potrebbe avvalorare l'ipotesi che il tempo intercorso tra l'eviscerazione

e la lavorazione influisca in maniera importante sulla contaminazione delle carni di selvaggina cacciata.

5. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dal presente studio forniscono importanti informazioni sul ruolo epidemiologico del cinghiale come portatore di *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* nella regione Emilia-Romagna. I dati ottenuti permettono di porre ancora maggiore attenzione alla filiera della carne di cinghiale, in quanto l'isolamento di questi patogeni dalle carcasse di animali destinati al consumo umano indica la necessità di adottare misure di igiene di processo e di sicurezza alimentare anche nella gestione degli animali selvatici, criteri al momento non definiti dalla regolamentazione vigente.

La pratica della caccia, infatti, consente il maneggiamento delle carcasse di questi animali solo in condizioni igieniche minime, spesso in assenza di veterinari e ad opera esclusiva di cacciatori "formati". In queste condizioni, le condizioni igieniche diventano ancora più impattanti sul consumatore, soprattutto se relazionate al consumo di carne cruda, come nel caso di insaccati poco stagionati o salsicce poco cotte.

Nel presente studio è stata valutata la prevalenza di *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* sulle carcasse di cinghiale campionate in centri di raccolta (campionamento A) e, a seguito di trasporto, in centri di lavorazione selvaggina (campionamento B). In merito all'isolamento di *Salmonella* spp., le analisi hanno mostrato una maggior prevalenza del patogeno nel campionamento B permettendo di ipotizzare che il contatto tra le carcasse ed il pelo degli animali durante il trasporto ed i lunghi periodi di stoccaggio abbiano influito sulla contaminazione microbiologica delle stesse.

Inoltre, l'isolamento di sierotipi di *Salmonella* spp. (quali *S. Zaiman*, *S. Agama*) non frequentemente ritrovati in altri studi condotti sul territorio, potrebbe essere un punto di partenza per indagini epidemiologiche legate a casi umani di salmonellosi sostenuti da stipiti non comuni. Indipendentemente dal sierotipo identificato, il cinghiale si pone come serbatoio di agenti zoonotici che possono avere una notevole ricaduta sulla salute pubblica.

In conclusione, studi futuri incentrati sulla definizione di criteri microbiologici e di sicurezza alimentare, in particolare relativi a prodotti a base di carne di selvaggina a breve stagionatura o da consumare poco cotti, potrebbe definire nei relativi operatori del settore alimentare obiettivi prestazionali chiari che consentano loro di operare in modo soddisfacente, al fine di raggiungere la qualità microbiologica desiderata del prodotto finale, proteggere la salute pubblica ed implementare una filiera alimentare sostenibile.

BIBLIOGRAFIA

1. Adley C., Ryan M.P. (2016). The nature and extent of foodborne disease, in Antimicrobial Food Packaging, Barros-Velazquez Ed., chapter 1, pp. 1–10, Academic Press, San Diego, Calif, USA.
2. Al Dahouk S. (2005). Seroprevalence of brucellosis, tularemia, and yersiniosis in wild boars (*Sus scrofa*) from north-eastern Germany. *Vet J. Med*, 52: 444-445.
3. Argùello H., Estellé J., Leonard F.C., Crispie F., Cotter P.D., O' Sullivan O., Lynch H., Walia K., Duffy G., Lawlor P.G. (2019). Influence of the Intestinal Microbiota on Colonization Resistance to *Salmonella* and the Shedding Pattern of Naturally Exposed Pigs.
4. Arrausi-Subiza M., Gerrikagoitia X., Alvarez V., Ibabe J.C., Barral M. (2016). Prevalence of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in wild boars in the Basque Country, northern Spain. *Acta Vet Scand*. Jan 20;58:4.
5. Arrausi-Subiza M., Ibabe J.C., Atxaerandio R., Juste R.A., Barral M. (2014). Evaluation of different enrichment methods for pathogenic *Yersinia* species detection by real time PCR. *BMC Vet. Res.* 10, 192.
6. Asakura H., Kawase J., Ikeda T., Honda M., Sasaki Y., Uema M., Kabeya H., Sugiyama H., Igimi S., Takai S. (2017). Microbiological Quality Assessment of Game Meats at Retail in Japan. *J. Food Prot*, 80, 2119–2126.
7. Atanassova V., Apelt J., Reich F., Klein G. (2008). Microbiological quality of freshly shot game in Germany. *Meat Sci* 78:414–419.
8. Avagnina A., Nucera D., Grassi M., Ferroglio E., Dalmasso A., Civera T. (2012). The microbiological conditions of carcasses from large game animals in Italy. *Meat Sci* 91:266–271.
9. B.U.E.R.T. (Bollettino Ufficiale Regionale Emilia-Romagna Telematico) (2021). Consistenza e prelievi del cinghiale. n°362 del 22 dic, pag 102.
10. Ballari S.A., Barrios-Garcia M.N. (2014). A review of wild boar *Sus scrofa* diet and factors affecting food selection in native and introduced ranges. *Mammal Rev*; 44:124–134.
11. Bancercz-Kisiel A., Socha P., Szweda W. (2016). Detection and Characterisation of *Yersinia Enterocolitica* Strains in Cold-Stored Carcasses of Large Game Animals in

Poland. *Vet. J.* 208, 102–103.

12. Bangtrakulnonth A., Pornreonwong S., Pulsrikarn C., Sawanpanyalert P., Hendriksen R.S., Lo Fo Wong D.M. (2004). *Salmonella* serovars from humans and other sources in Thailand, 1993–2002. *Emerg Infect Dis.* 10:131-1
13. Barbani R., Santachiara F., Sabbioni V., Sangiorgi E., Simoni M., Pellegrini E., Meriardi G. (2011). Characteristic of the lipidic fraction of wild boars (*Sus scrofa*) hunted in Bologna province. *Progress in Nutrition* 13(1):31–38.
14. Bassi A.M.G., Steiner J.C., Stephen R., Nuesch-Inderbinen M. (2021). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Salmonella* in Hunted Wild Boars from Two Different Regions in Switzerland. *Animals (Basel)*. Jul 29;11(8):2227.
15. Bassi L., Bonardi S. (2008). I fattori di virulenza di *salmonella* enterica: meccanismi di interazione con l'organismo ospite; *salmonella* enterica virulence factors: mechanisms of interaction with the host organism
16. Bäumlér A.J., Tsolis R.M., Valentine P.J., Ficht T.A., Heffron F. (1997). Synergistic effect of mutations in *invA* and *lpfC* on the ability of *Salmonella typhimurium* to cause murine typhoid. *Infection and Immunity*. 65(6):2254-2259.
17. B elard S., Kist M., Ramharter M. (2007). Travel-related *Salmonella* Agama, Gabon. *Emerg Infect Dis* 13:790–791.
18. Bier N.S., Stollberg K., Mayer-Scholl A., Johne A., N ockler K., Richter M. (2020). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boar and deer in Brandenburg, Germany. *Zoonoses Public Health*. Sep;67(6):601-606.
19. Blaser M.J., Newman L.S. (1982). A review of human salmonellosis: I. Infective dose. *Rev Infect Dis* 4:1096–106.
20. Bonardi S., Bassi L., Brindani F., D'Incau M., Barco L., Carra E., Pongolini S. (2013). Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* enterica and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 163:248–257.
21. Bonardi S., Bolzoni L., Zanoni R.G., Morganti M., Corradi M., Gilioli S., Pongolini S. (2019). Limited exchange of *Salmonella* among domestic pigs and wild boars in Italy. *Ecohealth*. Sep;16(3):420-428.
22. Bonardi S., Br emont S., Vismarra A., Poli I., Diegoli G., Bolzoni L., Corradi M., Gilioli S., Le Guern A.S. (2020). Is *Yersinia bercovieri* surpassing *Yersinia enterocolitica* in Wild Boars (*Sus scrofa*)? *Ecohealth*. Sep;17(3):388-392.

23. Bonardi S., Bruini I., Alpigiani I., Vismarra A., Barilli E., Brindani F., Morganti M., Bellotti P., Bolzoni L., Pongolini S. (2016). Influence of pig skin on *Salmonella* contamination of pig carcasses and cutting lines in an Italian slaughterhouse. *Italian Journal of Food Safety* 5:65–68.
24. Bonardi S., Filipello V., Pavoni E., Carta V., Bolzoni L., Corradi M., Gilioli S., Losio M.N. (2020). Geographical restriction of Hepatitis E virus circulation in wild boars (*Sus scrofa*) in Emilia-Romagna region, Northern Italy. *Ital J Food Saf.* Apr 6;9(1):8463.
25. Botti V., Navillod F.V., Domenis L., Orusa R., Pepe E., Robetto S., Guidetti C. (2013). *Salmonella* spp. and antibiotic-resistant strains in wild mammals and birds in north-western Italy from 2002 to 2010. *Veterinaria Italiana* 49:195–202.
26. Bottone E.J. (1977). *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic microorganism. *Crit. Rev. Microbiol.* 5, 211-241.
27. Bottone E.J. (1992). The genus *Yersinia* (excluding *Yersinia pestis*). In: Balows A., Truper H.G. (Eds.), *The Prokaryotes*, second ed. Springer-Verlag, New York, pp. 2862-2887.
28. Bottone E.J. (1997). *Yersinia enterocolitica*: the charisma continueS. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 257-276
29. Bottone E.J. (1999). *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes and Infection/Institut Pasteur*, 1(4), 323-333.
30. Bottone E.J., Bercovier H., Mollaret H.H. (2005). Family I. *Enterobacteriaceae*. Genus XLI *Yersinia* Van Loghem 1994. In: *Systematic Bacteriology. The Protobacteria*, part B, *The Gammaprotobacteria*. *Bergey's Manual*, Vol. 2B: p. 838-848.
31. Branciarri R., Onofri A., Cambiotti F., Ranucci D. (2020). Effects of Animal, Climatic, Hunting and Handling Conditions on the Hygienic Characteristics of Hunted Roe Deer (*Capreolus capreolus* L.). *Foods*, 9, 1076.
32. Brown V.R., Bowen R.A., Bosco-Lauth A.M. (2018). Zoonotic pathogens from feral swine that pose a significant threat to public health. *Transbound Emerg Dis*; 65:649–659.
33. Bruckner D.W. (2007). Considerations on the morality of meat consumption: Hunted game versus farm-raised animals. *J Soc Philos* 38:311–330
34. Buchwald D.S., Blaser M.J. (1984). A Review of Human Salmonellosis: II. Duration of Excretion Following Infection with Nontyphi *Salmonella*. *Rev Infect Dis.*; 6:345–56.

35. Bueno S.M., Riquelme S., Riedel C.A., Kalergis A.M. (2012). Mechanisms used by virulent *Salmonella* to impair dendritic cell function and evade adaptive immunity. *Immunology* 137(1):28–36
36. Cano-Manuel F.J, Lopez-Olvera J., Fandos P., Soriguer R.C., Perez J.M., Granados J.E. (2014). Long-term monitoring of 10 selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Sierra Nevada National Park, southern Spain. *Vet Microbiol*; 174:148–154.
37. Cano-Terriza D., Risalde M.A., Jimenez-Ruiz S., Vicente J., Isla J., Paniagua J., Moreno I., Gortazar C., Infantes-Lorenzo J.A., Garcia-Bocanegra I. (2018). Management of hunting waste as control measure for tuberculosis in wild ungulates in south-central Spain. *Transbound Emerg Dis*; 65:1190–1196.
38. Cantoni C., Kramer J. (2011). *Alimenti, Microbiologia e Igiene*. Ed. Tecniche nuove.
39. Carnevali L., Pedrotti L., Riga F., Toso S. (2009). Ungulates in Italy: Status, distribution, abundance, management and hunting of Ungulate populations in Italy. *Biologia e Conservazione Della Fauna* 117:1–168.
40. Carniel E., Guilvout I., Prentice M. (1996). Characterization of a large chromosomal" high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *Journal of bacteriology*, 178(23): 6743-6751.
41. Carrasco-Garcia R., Barroso P., Perez-Olivares J., Montoro V., Vicente J. (2018). Consumption of big game remains by scavengers: A potential risk as regards disease transmission in central Spain. *Front Vet Sci*; 5:4.
42. Casoli C., Duranti E., Cambiotti F., Avellini P. (2005). Wild ungulate slaughtering and meat inspection. *Veterinary Research Communications*, 29(2), 89–95.
43. Chiari M., Zanoni M., Tagliabue S., Lavazza A., Alborali L.G. (2013). *Salmonella* serotypes in wild boars (*Sus scrofa*) hunted in northern Italy. *Acta Vet Scand* 55:42.
44. Cianflone N.F.C. (2008). Salmonellosis and the GI Tract: More than Just Peanut Butter. *Current gastroenterology reports*; 10(4):424-431.
45. Cilia G., Turchi B., Fratini F., Bilei S., Bossù T., De Marchis M.L., Cerri D., Pacini M.I., Bertelloni F. (2021). Prevalence, virulence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in European wild boar (*Sus scrofa*) hunted in Tuscany (Central Italy). *Pathogens* 10:93.
46. Cilia G., Turchi B., Fratini F., Bilei S., Bossù T., De Marchis M.L., Cerri D., Pacini M.I., Bertelloni F. (2021). Prevalence, Virulence and Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in European Wild

Boar (*Sus scrofa*) Hunted in Tuscany (Central Italy). *Pathogens*. Jan 20;10(2):93.

47. Connor B.A., Schwartz E. (2005). Typhoid and paratyphoid fever in travellers. *Lancet Infect Dis* 5(10):623–628.
48. Cornelis G.R. (2002). The *Yersinia* Ysc-Yop virulence apparatus. *Int J Med Microbiol IJMM*; 291(6–7):455–62.
49. Cornelis G.R., Boland A., Boyd A.P., Geuijen C., Iriarte M., Neyt C., Sory M.P., Stainier I. (1998). The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1315-1352.
50. Cover T.L., Aber R.C. (1989). *Yersinia enterocolitica*. *N. Engl. J. Med.* 321, 16-24.
51. Cummings K.J., Rodriguez-Rivera L.D., Grigar M.K., Rankin S.C., Mesenbrink B.T., Leland B.R., Bodenchuk M.J. (2016). Prevalence and characterization of *Salmonella* isolated from feral pigs throughout Texas. *Zoonoses Public Health*; 63:436– 441.
52. Cummings K.J., Rodriguez-Rivera L.D., Grigar M.K., Rankin S.C., Mesenbrink B.T., Leland B.R., Bodenchuk M.J. (2016). Prevalence and Characterization of *Salmonella* Isolated from Feral Pigs Throughout Texas. *Zoonoses Public Health*, 63, 436–441.
53. D’Aoust J., Maurer J. (2007). “*Salmonella* species,” in *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, Doyle M., Beuchat L. Eds., pp. 187–236, ASM Press, Washington, DC, USA, 3rd edition.
54. Davies R.H., Dalziel R., Gibbens J.C., Wilesmith J.W., Ryan J.M., Evans S.J., Byrne C., Paiba G.A., Pascoe S.J., Teale C.J. (2004). National survey for *Salmonella* in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain (1999–2000). *J Appl Microbiol* 96:750–760.
55. Dekker J., Frank K. (2015). *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia*. *Clin. Lab. Med.*, 35, 225–246.
56. Díaz-Sánchez S. (2013). Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in large game animals intended for consumption: relationship with management practices and livestock influence. *Vet Microbiol* 163:274–281.
57. Dworkin M.S., Shoemaker P.C., Goldoft M.J., Kobayashi J.M. (2001). Reactive arthritis and Reiter's syndrome following an outbreak of gastroenteritis caused by *Salmonella* Enteritidis. *Clin. Infect. Dis.*; 33:1010–1014.
58. EC (2002) Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the

Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. Official Journal of the European Union L 31:1–24

59. EC (2004) Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs. Official Journal of the European Union L 139
60. EC (2004) Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for food of animal origin. Official Journal of the European Union L 226:93–127
61. EC (2005) Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union L 338/1
62. EC (2007) Regulation (EC) No. 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No. 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union L 322/12
63. EC (2019) Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627 of 15 March 2019 laying down uniform practical arrangements for the performance of official controls on products of animal origin intended for human consumption in accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulation (EC) No 2074/2005 as regards official controls. Official Journal of the European Union L131/51.
64. EC (2019) Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council of 15 March 2017 on official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law, rules on animal health and welfare, plant health and plant protection products, amending Regulations (EC) No 999/2001, (EC) No 396/2005, (EC) No 1069/2009, (EC) No 1107/2009, (EU) No 1151/2012, (EU) No 652/2014, (EU) 2016/429 and (EU) 2016/2031 of the European Parliament and of the Council, Council Regulations (EC) No 1/2005 and (EC) No 1099/2009 and Council Directives 98/58/EC, 1999/74/EC, 2007/43/EC, 2008/119/EC and 2008/120/EC, and repealing Regulations (EC) No 854/2004 and (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, Council Directives 89/608/EEC, 89/662/EEC, 90/425/EEC, 91/496/EEC, 96/23/EC, 96/93/EC and 97/78/EC and Council Decision 92/438/EEC (Official Controls Regulation). Off J Eur Union L95:1–142

65. EFSA (2013). Technical specification on harmonised epidemiological indicators for biological hazards to be covered by meat inspection of farmed game. J 11:3267.
66. EFSA (European Food Safety Agency) (2007). The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. The EFSA Journal 130, 206–212.
67. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA J (19):6406.
68. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. EFSA J., 20(12):7666, 273 pp.
69. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA J., 15, e5077.
70. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2006). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005. EFSA J., 4, 94.
71. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA J. 2015, 13, 4329.
72. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority) (2011). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. EFSA Journal; 9(7):2154.
73. EFSA and ECDC (European Food Safety European Centre for Disease Prevention and Control) (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA J., 14, e 04634
74. Ehrbar K., Friebel A., Miller S.I., Hardt W-D. (2003). Role of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) Protein InvB in Type III Secretion of SopE and SopE2,

Two *Salmonella* Effector Proteins Encoded Outside of SPI-1. *Journal of Bacteriology*; 185(23):6950-6967.

75. Eng S-K., Pusparajah P., Mutalib N-SA., Ser H-L., Chan K-G., Lee L-H. (2015). *Salmonella*: a review on pathogenesis epidemiology and antibiotic resistance. *Front Life Sci* 8(3):284–293
76. Fàbrega A., Vila J. (2012). *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 30, 24–32.
77. Falcao J.P., Correa E.F., Martins C.H.G., Falcao D.P. (2008). Panoramic view of the occurrence of *Yersinia* species other than *Y. pestis* in Brazil. *Rev. Cienc. Farm. Basica Apl.* 29, 1-16.
78. FDA (Food and Drug Administration) (2012). *Bad bug book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook*. 2nd ed. US, Silver Spring., 18-21.
79. Felin E., Jukola E., Raulo S., Fredriksson-Ahomaa M. (2015). Meat juice serology and improved food chain information as control tools for pork-related public.
80. Fisch A., Prazuck T., Haroche G. (1989). Hematogenous osteitis due to *Yersinia enterocolitica*. *J. Infect. Dis.* 160, 554.
81. Fleming D., Hunt D. (2006). *Biological safety principles and practices* (4th ed.). Washington: ASM Press.
82. Franco-Paredes C., Chastain D., Taylor P., Stocking S., Sellers B. (2017). Boar hunting and brucellosis caused by *Brucella suis*. *Travel Med Infect Dis*; 16:18–22.
83. Fredriksson-Ahomaa M. (2009). Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in wild boars in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*; 135: 199-202.
84. Fredriksson-Ahomaa M., Korte T., Korkeala H. (2000). Contamination of carcasses, offals, and the environment with yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in a pig slaughterhouse. *J. Food Prot.* 63 (1), 31–35.
85. Fredriksson-Ahomaa M., Lindström M., Korkeala H. (2010). In: Jujena V., Sofos N.J. eds. *Pathogens and Toxins in Food: Challenges and Interventions*. Washington, DC: ASM Press.
86. Fredriksson-Ahomaa M., London L., Skrzypczak T., Kantala T., Laamanen I., Biström M., Maunula L., Gadd T. (2020). Foodborne Zoonoses Common in Hunted Wild Boars. *Ecohealth*. Dec;17(4):512-522.

87. Fredriksson-Ahomaa M., Stolle A., Siitonen A., Korkeala H. (2006). Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O: 3 originate mainly from pigs. *J Med Microbiol* 55:747-9.
88. Fredriksson-Ahomaa M., Stolle A., Stephan R. (2007). Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. *Int J Food Microbiol*; 119:207-212.
89. Fredriksson-Ahomaa M., Wacheck S., Bonke R., Stephan R. (2011). Different enteropathogenic *Yersinia* strains found in wild boars and domestic pigs. *Foodborne Pathog Dis* 8:733–737.
90. Fredriksson-Ahomaa, M., Korkeala, H. (2003). Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 220–229.
91. Fukushima H. (1987). New selective agar medium for isolation of virulent *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 25, 1068–1073.
92. Fukushima H., Gomyoda M. (1991). Intestinal carriage of *Yersinia pseudotuberculosis* by wild birds and mammals in Japan. *Appl Environ Microbiol.*; 57:1152-5.
93. Fukushima H., Gomyoda M., Ishikura S. (1989). Cat-contaminated environmental substances lead to *Yersinia pseudotuberculosis* infection in children. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2706–2709.
94. Funk J., Davies P.R., Nichols M.A. (2000). The effect of sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine feces. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12:412–418
95. Gal-Mor O., Boyle E.C., Grassl G.A. (2014). Same species, different diseases: how and why typhoidal and non- typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in Microbiology*; 5:391.
96. Garai P., Gnanadhas D.P., Chakravorty D. (2012). *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi as model organisms. *Virulence* 3(4):377–388
97. Gil Molino M., García Sánchez A., Risco Pérez D., Gonçalves Blanco P., Quesada Molina A., Rey Pérez J., Martín Cano F.E., Cerrato Horrillo R., Hermoso-de-Mendoza Salcedo J., Fernández Llario P. (2019). Prevalence of *Salmonella* spp. in tonsils, mandibular lymph nodes and faeces of wild boar from Spain and genetic relationship between isolates. *Transbound Emerg Dis.* May;66(3):1218-1226.

98. Gill C.O. (2007). Microbiological conditions of meats from large game animals and birds. *Meat Sci.*, 118, 71–77.
99. Glynn J.R., Palmer S.R. (1992). Incubation period, severity of disease, and infecting dose: evidence from a *Salmonella* outbreak. *Am J Epidemiol.* Dec 1;136(11):1369–1377.
100. Gomes-Neves E., Abrantes A.C., Vieira-Pinto M., Müller A. (2021). Wild Game Meat— a Microbiological Safety and Hygiene Challenge? *Curr. Clin. Microbiol. Rep.*, 8, 31-39.
101. Gordon M.A. (2008). *Salmonella* infections in immunocompromised adults. *J. Infect.*; 56:413–422.
102. Gortazar C., Ferroglio E., Hofle U., Frolich K., Vicente J. (2007). Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *Eur J Wildl Res*; 53:241-256.
103. Graziani C., Galetta P., Busani L., Dionisi A. M., Filetici E., Ricci A., Caprioli A., Luzzi I. (2005). Infezioni da *Salmonella*: diagnostica, epidemiologia e sorveglianza Rapporti ISTISAN, 05/27, 35.
104. Grimont P.A.D., Weill F.X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. In WHO collaborating center for reference and research on *salmonella*. 9th edition. Paris: Institut Pasteur
105. Gyles C.L., Thoen C.O. (1993). Pathogenesis of bacterial infections in animals, second ed. Iowa State University Press, Ames., 226–35.
106. Haley B.J., Cole D.J., Lipp E.K. (2009). Distribution, diversity and seasonality of waterborne *salmonellae* in a rural watershed. *Applied and Environmental Microbiology* 75:1248–1255.
107. Hensel M. (2004). Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 294:95–102.
108. Hohmann E. L. (2001). Nontyphoidal salmonellosis. *Clin. Infect. Dis.* 32 263–269.
109. Holzbauer S.M., Agger W.A., Hall R.L., Johnson G.M., Schmitt D., Garvey A., Bishop H.S., Rivera H., De Almeida M.E. (2014). Outbreak of *Trichinella spiralis* infections associated with a wild boar hunted at a game farm in Iowa. *Clin Infect Dis*; 59:1750–1756.
110. Hornick R.B. (1970). Typhoid fever: Pathogenesis and immunologic control. *N Engl Med.*; 283:686-691.
111. Horton R.A. (2013). Wild birds carry similar *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to those found in domestic animals and livestock. *Res Vet Sci.*; 95:45–8.

112. Huhulescu S., Kiss R., Brettlecker M. (2009). Etiology of acute gastroenteritis in three sentinel general practices. *Austria* 37 (2), 103–108.
113. Hurd H.S., McKean J.D., Griffith R.D., Rostagno M.H. (2004). Estimation of the *Salmonella enterica* prevalence in finishing swine. *Epidemiology and Infection* 132:127–135
114. Intesa Stato-Regioni (2021). “Linee guida in materia di igiene delle carni di selvaggina selvatica”. Rep. Atti n. 34/CSR del 25 mar.
115. ISO (2017). ISO 6579-1:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization.
116. ISO (2014). ISO/TR 6579-3:2014. Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*-Part 3: Guidelines for serotyping of *Salmonella* spp.
117. ISO (2017). ISO 10273:2017. Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*
118. ISPRA (2010). Banca dati degli Ungulati italiani
119. Issenhuth-Jeanjean S., Roggentin P., Mikoleit M., Guibourdenche M., de Pinna E., Nair S., Fields P.I., Weill F.X. (2014). Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol. Sep*;165(7):526-30.
120. Jay M.J., Loessner M.J., Golden D.A. (2009). *Microbiologia degli alimenti*; 11: 270; 26:667-678.
121. Jones M.B., Smith P.W., Olmhausen R.W. (1979). Reiter's syndrome after *Salmonella* infection: occurrence in HLA-B27 positive brothers. *Arthritis Rheum. Oct*;22(10):1141–1142.
122. Jori F., Relun A., Trabucco B., Charrier F., Maestrini O., Chavernac D., Cornelis D., Casabianca F., Etter E.M.C. (2017). Questionnaire based assessment of wild boar/domestic pig interactions and implications for disease risk management in Corsica. *Front Vet Sci.*; 4:198.
123. Kapperud G. (1987). *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia*-like microbes isolated from mammals and water in Norway and Denmark. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica: Section B: Microbiology and Immunology* 85, 129–135.
124. Kapperud G., Vardund T., Skjerve E. (1991). Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase

- chain reactions, and colorimetric detection of amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (9), 2938–2944.
125. Karssin A., Velstrom K., Gomez-Morales M.A., Saar T., Jokelainen P., Lassen B. (2016). Cross-sectional study of anti-*Trichinella* antibody prevalence in domestic pigs and hunted wild boars in Estonia. *Vector Borne Zoonotic Dis*; 16:604–610.
 126. Kauffmann F. (1966). *The Bacteriology of Enterobacteriaceae*. Baltimore, Md, USA: Williams & Wilkins.
 127. Kaur J., Jain S.K. (2012). Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. *Microbiol Res*; 167:199–210.
 128. Laukkanen R., Martinez P.O., Siekkinen K.M., Ranta J., Maijala R., Korkeala H. (2008). Transmission of *Yersinia pseudotuberculosis* in the pork production chain from farm to slaughterhouse. *Appl Environ Microbiol*; 74:5444–5450.
 129. Le Minor L., Popoff M.Y. (1987). Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*: request for an opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology*; 37:465–468.
 130. Lecomte F., Eustache M., Lemeland J.F. (1989). Purulent pericarditis due to *Yersinia enterocolitica*.
 131. Lee L.A., Gerber A.R., Lonsway D.R., Smith J.D., Carter G.P., Puhr N.D., Parrish C.M., Sikes R.K., Finton R.J., Tauxe R.V. (1990). *Yersinia enterocolitica* O:3 infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings. *N. Engl. J. Med.* 322: 984–987.
 132. Lemarchand K., Lebaron P. (2002). Influence of mutation frequency on the persistence of *Salmonella enterica* serotypes in natural waters. *FEMS Microbiol Ecol*; 41:125-31.
 133. Lopes P.D., Freitas Neto O.C., Batista D.F.A. (2016). “Experimental infection of chickens by a flagellated motile strain of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum,” *Veterinary Journal*, vol. 214, pp. 40–46.
 134. López F.E., de las Mercedes Pescaretti M., Morero R., Delgado M.A. (2012). *Salmonella* Typhimurium general virulence factors: a battle of David against Goliath? *Food Res Int* 45(2):842–851
 135. Lostroh C. P., Bajaj V., Lee C. A. (2000). The cis requirements for transcriptional activation by HilA, a virulence determinant encoded on SPI-1. *Mol. Microbiol.*, 37: 300-315.

136. Maclennan C.A. (2014). Out of Africa: links between invasive non typhoidal *Salmonella* disease, typhoid fever, and malaria. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am*; 58:648–650.
137. Magistrali C.F., Cucco L., Manuali E., Sebastiani C., Farneti S., Ercoli L., Pezzotti G. Atypical *Yersinia pseudotuberculosis* serotype O:3 isolated from hunted wild boars in Italy. *Vet Microbiol.* Jun 25;171(1-2):227-31.
138. Marescotti M.E., Demartini E., Gibbert M., Viganò R., Gaviglio A. (2021). Disentangling Individual Phases in the Hunted vs. Farmed Meat Supply Chain: Exploring Hunters' Perceptions in Italy. *Foods*, 10, 174.
139. Marsan A. (1998). Cinghiale in: *Principi e Tecniche di Gestione Faunistico Venatoria*. A cura di Simonetta A.M. e Dessì Fulgheri F., Greentime editore, pp.427
140. Marsico G., Rasulo A., Dimatteo S., Tarricone S., Pinto F., Ragni M. (2007). Pig, F1 (wild boar x pig) and wild boar meat quality. *Italian Journal of Animal Science*, 6, 701-703.
141. Massei G., Kindberg J., Licoppe A., Gacic D., Sprem N., Kamler J., Baubet E., Hohmann U., Monaco A. (2015). Wild boar populations up, numbers of hunters down? A review of trends and implications for Europe. *Pest Manage Sci*; 71:492–500.
142. Massei G., Toso S. (1993). *Biology and management of wild boar*. Documenti tecnici 5. istituto Nazionale per la Fauna Selvatica, Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy
143. McGovern V.J., Slavutin L.J. (1979). Pathology of *Salmonella* colitis. *Am. J. Surg. Pathol.*; 3:483–490.
144. Membre J.M., Laroche M., Magras C. (2011). Assessment of levels of bacterial contamination of large wild game meat in Europe. *Food Microbiol.* 28:1072–1079.
145. Methner U., Merbach S., Peters M. (2018). *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Choleraesuis in a German wild boar population: occurrence and characterisation. *Acta Vet Scand.* Oct 29;60(1):65.
146. Miller R.S., Sweeney S.J., Slotmaker C., Grear D.A., Di Salvo P.A., Kiser D., Shwiff S.A. (2017). Cross-species transmission potential between wild pigs, livestock, poultry, wildlife, and humans: Implications for disease risk management in North America. *Sci Rep*; 7:7821.
147. Mirceta J., Petrovic J., Malesevic M., Blagojevic B., Antic D. (2017). Assessment of microbial carcass contamination of hunted wild boars. *Eur J Wildl Res* 63:37.

148. Mizuno Y., Takada H., Nomura A., Jin C.H., Hattori H., Ihara K., Aoki T., Eguchi K., Hara T. (2003). Th1 and Th1-inducing cytokines in *Salmonella* infection. Clin Exp Immunol 131(1):111
149. Mollaret H.H., Thal E. (1974). Genus XI. *Yersinia* Van Loghem 1944. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins Co Baltimore, 330-332.
150. Monaco A., Franzetti B., Pedrotti L., Toso S. (2003). *Linee Guida per la gestione del Cinghiale*. Min. Pol. Agricole e Forestali – Ist. Naz. Fauna Selvatica, pp.116.
151. Montagnaro S., D'Ambrosi F., Petruccelli A., Ferrara G., D'Alessio N., Iovane V., Veneziano V., Fioretti A., Pagnini U. (2020). A Serological Survey of Brucellosis in Eurasian Wild Boar (*Sus scrofa*) in Campania Region, Italy. J Wildl Dis. Apr;56(2):424-428. Epub 2019 Oct 9.
152. Müller A., Melo N., González-Barrio D., Pinto M.V., Ruiz-Fons F. (2021). Aujeszky's disease in hunted wild boar (*Sus scrofa*) in the Iberian peninsula. J Wildl Dis. Jul 1;57(3):543-552.
153. Muñoz-Mendoza M., Marreros N., Boadella M., Gortázar C., Menéndez S., de Juan L., Bezos J., Romero B., Copano MF., Amado J., Sáez J.L., Mourelo J., Balseiro A. (2013). Wild boar tuberculosis in Iberian Atlantic Spain: a different picture from Mediterranean habitats. BMC Vet Res. Sep 8;9:176.
154. Murrell K.D. (2016). The dynamics of *Trichinella spiralis* epidemiology: Out to pasture? Vet Parasitol; 231:92–96.
155. Navarro-Gonzalez N., Casas-Díaz E., Porrero C.M., Mateos A., Domínguez L., Lavín S., Serrano E. (2013). Food-Borne Zoonotic Pathogens and Antimicrobial Resistance of Indicator Bacteria in Urban Wild Boars in Barcelona, Spain. *Vet. Microbiol.*, 167, 686-689.
156. Nesbakken T. (1985). Enterotoxin production at 4, 22, and 37 degrees C by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria isolated from porcine tonsils and pork products. *Acta Vet. Scand*, 26, 13–20.
157. Niskanen T., Waldenström J., Fredriksson-Ahomaa M., Olsen B., Korkeala H. (2003). virF-positive *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* found in migratory birds in Sweden. Appl Environ Microbiol.; 69:4670–5.
158. Oja R., Zilmer K., Valdmann H. (2015). Spatiotemporal effects of supplementary feeding of wild boar (*Sus scrofa*) on artificial ground nest depredation. PLoS One;

10:1–11.

159. Orsoni F., Romeo C., Ferrari N., Bardasi L., Merialdi G., Barbani R. (2020). Factors affecting the microbiological load of Italian hunted wild boar meat (*Sus scrofa*). *Meat Sci* 160:107967.
160. Pearson H.E., Toribio J.A.L.M.L., Lapidge S.J., Hernandez-Jover M. (2016). Evaluating the risk of pathogen transmission from wild animals to domestic pigs in Australia. *Prev Vet Med*; 123: 39–51.
161. Pedrotti L., Dupré E., Preatoni D., Toso S. (2001). *Banca Dati Ungulati: status, distribuzione, consistenza, gestione, prelievo venatorio e potenzialità degli Ungulati in Italia*. Biol. Cons. Fauna n.109: pp. 1-132
162. Peruzzy M.F., Murru N., Smaldone G., Proroga Y.T.R., Cristiano D., Fioretti A., Anastasio A. (2022). Hygiene Evaluation and Microbiological Hazards of Hunted Wild Boar Carcasses. *Food Control*, 135, 108782.
163. Peruzzy M.F., Murru N., Yu Z., Kerkhof P.-J., Neola B., Joossens M., Proroga Y.T.R., Houf K. (2019). Assessment of Microbial Communities on Freshly Killed Wild Boar Meat by MALDI-TOF MS and 16S rRNA Amplicon Sequencing. *Int. J. Food Microbiol.*, 301, 51–60.
164. Petrovic J., Mirceta J., Babić J., Malešević M., Blagojević B., Radulović J.P., Antić D. (2022). *Salmonella* in Wild Boars (*Sus scrofa*): Characterization and Epidemiology. *Acta Vet*, 72, 184-194..
165. Piras F., Spanu V., Siddi G., Gyomoese P., Spanu C., Cibir V., Schjørring S., De Santis E.P.L., Scarano C. (2021). Whole-Genome Sequencing Analysis of Highly Prevalent *Salmonella* Serovars in Wild Boars from a National Park in Sardinia. *Food Control*, 130, 108247.
166. Pittiglio C., Khomenko S., Beltran-Alcrudo D. (2018). Wild boar mapping using population-density statistics: from polygons to high resolution raster maps. *PLoS One* 13:e0193295.
167. Platt-Samoraj A., Ugorski M., Szweda W., Szczerba-Turek A., Wojciech K., Procajło Z. (2006). Analysis of the presence of *ail*, *ystA* and *ystB* genes in *Yersinia enterocolitica* strains isolated from aborting sows and aborted fetuses. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.*;53:341-6.

168. Rakin A., Garzetti D., Bouabe H., Sprague L.D. *Yersinia enterocolitica*. In *Molecular Medical Microbiology*, 2nd ed.; Tang Y.-W., Liu D., Schwartzman J., Sussman M., Poxton I., Eds. Academic Press: London, UK; Volume 2, pp. 1319–1344.
169. Rakin A., Schneider L., Podladchikova O. (2012). Hunger for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia*. *Front Cell Infect Microbiol.* Nov 30;2:151.
170. Ramanzin M., Amici A., Casoli C., Esposito L., Lupi P., Marsico G., Trabalza M.M. (2010). Meat from wild ungulates: Ensuring quality and hygiene of an increasing resource. *Ital J Anim Sci* 9:318– 331.
171. Ranucci D., Roila R., Onofri A., Cambiotti F., Primavilla S., Miraglia D., Andoni E., DiCerbo A., Branciarri R. (2021). Improving Hunted Wild Boar Carcass Hygiene: Roles of Different Factors Involved in the Harvest Phase. *Foods*, 10, 1548.
172. Razzuoli E., Listorti V., Martini I., Migone L., Decastelli L., Mingone W., Berio E., Battistini R., Ercolini C., Serracca L. (2021). Prevalence and Antimicrobial Resistances of *Salmonella* Spp. Isolated from Wild Boars in Liguria Region, Italy. *Pathogens*, 10, 568.
173. Reinhardt M., Hammerl J.A., Hertwig S. (2018). Complete genome sequences of 10 *Yersinia pseudotuberculosis* isolates recovered from wild boars in Germany. *Genome Announc*; 6: e00266-18.
174. Reinhardt M., Hammerl J.A., Kunz K., Barac A., Nöckler K., Hertwig S. (2018). *Yersinia pseudotuberculosis* Prevalence and Diversity in Wild Boars in Northeast Germany. *Appl Environ Microbiol.* Aug 31;84(18):e00675-18.
175. Ruiz-Fons F. (2017). A review of the current status of relevant zoonotic pathogens in wild swine (*Sus scrofa*) populations: changes modulating the risk of transmission to humans. *Transbound Emerg Dis.*; 64:68–88.
176. Russo C., Balloni S., Altomonte I., Martini M., Nuvoloni R., Cecchi F., Pedonese F., Salari F., Sant’ana Da Silva A.M., Torracca B. (2017). Fatty Acid and Microbiological Profile of the Meat (Longissimus Dorsi Muscle) of Wild Boar (*Sus Scropha Scropha*) Hunted in Tuscany. *Ital. J. Anim. Sci.*, 16, 1–8.
177. Ryan M.P., O’Dwyer J., Adley C.C. (2017). Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. *BioMed Research International.*; 2017:3782182.
178. Sabbagh S.C., Forest C.G., Lepage C., Leclerc J.M., Daigle F. (2010). So similar, yet

- so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. FEMS Microbiol. Lett. 305, 1–13.
179. Sales J., Kotrba R. (2013). Meat from wild boar (*Sus scrofa*): A review. Meat Sci 94:187–201.
180. Salmon D., Smith T. (1885). US Bureau of Animal Industries. 2nd Annual Report. 184. Washington, DC, USA: U.S. Government Printing Office; Report on swine plague.
181. Sánchez-Rodríguez J.A., Navas L., Vinuesa F.M., Castells C., Martínez M.A., López A., Lindez B., Cabrera-Vique C. (2018). New insights on the risk factors associated with the presence of *Salmonella* on pig carcasses. Lessons from small slaughterhouses. Food Control 87:46–52.
182. Sandery M., Stinear T., Kaucner C. (1996). Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in environmental waters by PCR. J. Appl. Bacteriol. 80 (3), 327-332.
183. Sannö A., Aspán A., Hestvik G., Jacobson M. (2014). Presence of *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli* O157:H7 in wild boars. Epidemiol Infect 142:2542–2547.
184. Sannö A., Rosendal T., Aspán A., Backhans A., Jacobson M. (2018). Distribution of enteropathogenic *Yersinia spp.* and *Salmonella spp.* in the Swedish wild boar population, and assessment of risk factors that may affect their prevalence. Acta Vet Scand 60:40
185. Sauter-Louis C., Conraths F.J., Probst C., Blohm U., Schulz K., Sehl J., Fischer M., Forth J.H., Zani L, Depner K., Mettenleiter T.C., Beer M., Blome S. (2021). African Swine Fever in Wild Boar in Europe-A Review. Viruses. 30;13(9):1717.
186. Schiemann D.A. (1978). Isolation of *Yersinia enterocolitica* from surface and well water in Ontario. Can. J. Microbiol. 24, 1048-1052.
187. Schiemann D.A. (1979). Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. Can J Microbiol. 25:1298–304.
188. Schley L., Ropert T.J. (2003). Diet of wild boar *Sus scrofa* in Western Europe, with particular reference to consumption of agricultural crops. Mammal Review, 33(1), 43–56
189. Schmiel D.H., Young G.M., Miller V.L. (2000). The *Yersinia enterocolitica* Phospholipase Gene *yplA* Is Part of the Flagellar Regulon. Journal of bacteriology, 182(8): 2314-2320.
190. Schubert S., Rakin A., Heesemann J. (2004). The *Yersinia* high-pathogenicity island

- (HPI): Evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol* 294:83- 94.
191. Shabbir N., Ajmera A. (2022). *Salmonella*. Aug 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 32310352.
192. Shayegani M., Morse D., DeForge I. (1986). Microbiology of a major foodborne outbreak of gastroenteritis caused by *Yersinia enterocolitica* serogroup O:8. *J. Clin. Microbiol.* 17, 35–40.
193. Shinohara N.K.S., Barros V.B., de Jimenez S.M.C., Machado E., de Dutra C.L., Filho R.A.F., De L.J.L. (2008). *Salmonella* spp., importante agente patogenico veiculado em alimentos. *Ciênc Amp Saúde Coletiva* 13(5):1675–1683
194. Steele-Mortimer O. (2008). The *Salmonella*-containing Vacuole – Moving with the Times. *Current opinion in microbiology.* 11(1):38-45.
195. Stella S., Tirloni E., Castelli E., Colombo F., Bernardi C. (2018). Microbiological evaluation of carcasses of wild boar hunted in a hill area of Northern Italy. *J Food Prot* 8:1519–1525.
196. Stoycheva M., Murdjeva M. (2005). Serum levels of interferon-*gamma*, interleukin-12, tumour necrosis factor-*alpha*, and interleukin-10, and bacterial clearance in patients with gastroenteric *Salmonella* infection. *Scandinavian journal of infectious diseases.* 37(1):11–4.
197. Sulakvelidze A. (2000). *Yersiniae* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. *Microbes. Infect.* 2 (5), 497–513.
198. Syczyło K., Platt-Samoraj A., Bancercz-Kisiel A., Szczerba-Turek A., Pajdak-Czaus J., Łabuć S., Procajło Z., Socha P., Chuzhebayeva G., Szweda W. (2018). The prevalence of *Yersinia enterocolitica* in game animals in Poland. *PLoS One* 13:e0195136.
199. Tennant S.M., Grant T.H., Robins-Browne R.M. (2003). Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. *FEMS Immunol Med Microbiol* 38: 127–137.
200. Toora S., Budu-Amoako E., Ablett R.F., Smith J. (1992). Effect of high-temperature short-time pasteurisation, freezing and thawing and constant freezing, on survival of *Yersinia enterocolitica* in milk. *J. Food Prot.* 55: 803–805.
201. Touloudi A., Valiakos G., Athanasiou L.V., Birtsas P., Gianna- kopoulos A., Papaspyropoulos K., Kalaitzis C., Sokos C., Tsokana C.N. (2015). A serosurvey for selected pathogens in Greek European wild boar. *Vet Rec Open* 2:e000077.

202. Turiac I.A., Cappelli M.G., Olivieri R., Angelillis R., Martinelli D., Prato R., Fortunato F. (2017). Trichinellosis outbreak due to wild boar meat consumption in southern Italy. *Parasit Vectors* 10:107.
203. Van de Vosse E., Ottenhoff TH. (2006). Human host genetic factors in mycobacterial and *Salmonella* infection: lessons from single gene disorders in IL-12 / IL-23 dependent signaling that affect innate and adaptive immunity. *Microbes Infect.* 8:1167–1173.
204. Velge P., Wiedemann A., Rosselin M. (2012). Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. *Microbiology Open.* 1(3):243-258.
205. Vergara M., Villalba V., Amer L., Centeno J., López O., Eiguer T., Caffer MI. (1989). The first isolations of *Salmonella Zaiman* in humans. *Rev Argent Microbiol* 2:89–91
206. Vieira-Pinto M., Morais L., Caleja C., Themudo P., Torres C., Igrejas G., Poeta P., Martins C. (2011). *Salmonella* sp. in game (*Sus scrofa* and *Oryctolagus cuniculus*). *Foodborne Pathog Dis* 8:739–740.
207. Virtanen S., Salonen L., Laukkanen-Ninios R., Fredriksson-Ahomaa M., Korkeala H. (2012). Piglets are a source of pathogenic *Yersinia enterocolitica* on fattening-pig farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3000–3003.
208. Von Altröck A., Seinige D., Kehrenberg C. (2015). *Yersinia enterocolitica* Isolates from Wild Boars Hunted in Lower Saxony, Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 4835–4840
209. Waage A.S., Vardund T., Lund V., Kapperud G. (1999). Detection of low numbers of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in environmental water and sewage samples by nested polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* 87 (6), 814–821.
210. Wacheck S., Fredriksson-Ahomaa M., König M., Stolle A., Stephan R. (2010). Wild boars as an important reservoir for foodborne pathogens. *Foodborne Pathog Dis,* 7:307-312.
211. Wahlstrom H., Tysen E., Olsson Engvall E., Brandstrom B., Eriksson E., Morner T., Vagsholm I. (2003). Survey of *Campylobacter* species, VTEC O157 and *Salmonella* species in Swedish wildlife. *Vet. Rec.* 153, 74– 80.
212. Ward M.P., Cowled B., Galea F., Graeme Garner M., Laffan S.W., Marsh I., Negus K., Sarre S.D., Woolnough A.P. (2013). *Salmonella* infection in a remote, isolated wild pig

population. *Veterinary Microbiology* 162:921–929

213. Wiethoelter A.K., Beltran-Alcrudo D., Kock R., Mor SM. (2015). Global trends in infectious diseases at the wildlife-livestock interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;112:9662–9667.
214. Wilson J.S., Hazel S.M., Williams N.J., Phiri A., French N.P., Hart C.A. (2003). Nontyphoidal *salmonellae* in United Kingdom badgers: prevalence and spatial distribution. *Appl Environ Microbiol* 69:4312–4315.
215. Winkelmayr R., Stangl P.V., Paulsen P. (2011). Assurance of food safety along the game meat production chain: Inspection of meat from wild game and education of official veterinarians and “trained persons” in Austria. In *Game Meat Hygiene in Focus: Microbiology, Epidemiology, Risk Analysis and Quality Assurance*; Paulsen P., Bauer A., Vodnansky M., Winkelmayr R., Smulders F.J.M. Eds., Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands, pp. 245-258.
216. Wood J. D., Enser M., Fisher A. V., Nute G. R., Sheard P. R., Richardson R. I., Whittington F. M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78, 343–358.
217. Yersin A. (1894). La peste bubonique a Hong Kong. *Ann. Inst. Pasteur. Paris* 8, 662-667.
218. Young B.M., Young G.M. (2008). Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (17), 5466–5474.
219. Zhang S., Kingsley R.A., Santos R.L., Andrews-Polymenis H., Raffatellu M., Figueiredo J., Nunes J., Tsolis R.M., Adams L.G., Bäumler A.J. (2003). Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype typhimurium induced diarrhea. *Infect. Immun.* 71, 1–12.
220. Zhang S., Santos R. L., Tsolis R. M., Stender S., Hardt W.-D., Bäumler A. J., Adams L. G. (2002). The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium effector proteins SipA, SopB, SopA, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect. Imm.*, 70: 3843-3855.
221. Zhou D., Yang R. (2011). Formation and regulation of *Yersinia* biofilms. *Protein Cell* 2 (3), 173–179.
222. Zottola T., Montagnaro S., Magnapera C., Sasso S., De Martino L., Bragagnolo A., D'Amici L., Condoleo R., Pisanelli G., Iovane G., Pagnini U. (2013). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* in European wild boar (*Sus scrofa*); Latium

Region, Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 36:161–168.