



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA TERRA,
DELL'AMBIENTE E DELLA VITA (DISTAV)

Classe delle Lauree Magistrali in Biologia LM/6

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Applicata e Sperimentale
Curriculum Forense

**Piroplasmidi nella fauna selvatica:
indagine molecolare in Italia nord-occidentale**

Laureanda:
Alessandra Pinto

Relatore:
Prof. Luigi Vezzulli
Dott.ssa Elisabetta Razzuoli

Correlatore:
Prof. Emanuele Bosi

ANNO ACCADEMICO 2024-2025

RIASSUNTO

Negli ultimi decenni è aumentato l'interesse verso le malattie trasmesse da zecche (indicate anche come *Tick-borne diseases* - TBD), la quali rappresentano un rilevante problema per la salute umana e animale. L'incremento delle interazioni tra fauna selvatica, animali domestici e uomo potrebbe favorire la diffusione di tali malattie, ma anche l'insorgenza di nuovi patogeni.

Babesia spp. e *Theileria* spp. sono emoprotozoi patogeni trasmessi da zecche, caratterizzati dalla capacità di parassitare gli eritrociti di un ampio spettro di ospiti vertebrati, tra cui ungulati e carnivori. Le piroplasmosi assumono rilevanza sia per gli animali domestici che per la fauna selvatica, in quanto possono compromettere lo stato sanitario degli animali infetti, determinare perdite economiche a livello globale ed incidere negativamente sui programmi di conservazione e gestione. Inoltre, alcune specie sono trasmissibili all'uomo.

I cambiamenti ambientali e climatici globali influenzano la diffusione delle TBD, modificando la distribuzione dei vettori competenti e quindi aumentando le opportunità di contatto con gli ospiti vertebrati. Inoltre, l'aumento di alcune specie di ungulati e carnivori selvatici e l'adattabilità a vari habitat favorisce l'espansione di queste popolazioni verso ambienti urbani e suburbani con significative implicazioni sull'epidemiologia dei parassiti zoonotici.

Ad oggi, i dati disponibili relativi alla presenza di piroplasmidi nell'Italia nord-occidentale risultano limitati, particolarmente per il cinghiale. Pertanto, l'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di indagare l'epidemiologia di *Babesia* spp. e *Theileria* spp. nel cinghiale e nei carnivori selvatici delle regioni Liguria, Piemonte e Valle d'Aosta.

È stato campionato il tessuto splenico di 1819 animali selvatici, di cui 1654 cinghiali (*Sus scrofa*), 97 volpi rosse (*Vulpes vulpes*), 45 tassi (*Meles meles*), 9 lupi grigi (*Canis lupus*), 13 faine (*Martes foina*) e 1 lontra europea (*Lutra lutra*), cacciati o rinvenuti morti. Il DNA di tutti i campioni è stato estratto e successivamente amplificato mediante Real-Time PCR.

Dei cinghiali testati, nessun esemplare è risultato positivo a *Babesia* o *Theileria* spp. Tuttavia, l'analisi molecolare ha consentito di rilevare delle positività tra i carnivori selvatici, successivamente confermate da sequenziamento, che ha consentito di identificare la specie parassitaria responsabile dell'infezione. Nel dettaglio, *Babesia canis* è stata rilevata nel 22,2% (IC 95% 0-49,4%) dei lupi (n pos = 2), *Babesia vulpes* (*Theileria annae*) nel 3,1% (IC 95% 0-

6,5%) delle volpi (n pos = 3) e *Babesia type badger* nel 8,9% (IC 95% 0,6-17,2%) dei tassi (n = 4).

Benché ulteriori indagini siano necessarie per approfondire il quadro epidemiologico, i risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi contribuiscono ad arricchire le conoscenze sulla diffusione dei piroplasmidi nella fauna selvatica dell'Italia nord-occidentale, suggerendo un ruolo trascurabile del cinghiale e un maggior coinvolgimento dei carnivori selvatici.

ABSTRACT

In recent decades, there has been growing interest in tick-borne diseases (TBDs), which represent a significant concern for both human and animal health. The increasing interactions among wildlife, domestic animals, and humans may promote the spread of these diseases and facilitate the emergence of new pathogens.

Babesia spp. and *Theileria* spp. are pathogenic hemoprotozoa transmitted by ticks, characterized by their ability to parasitize the erythrocytes of a wide range of vertebrate hosts, including ungulates and carnivores. Piroplasmoses are of particular relevance for both domestic animals and wildlife, as they can compromise the health status of infected hosts, cause economic losses on a global scale, and negatively affect conservation and wildlife management programs. Moreover, some species are zoonotic and can infect humans.

Global environmental and climatic changes influence the distribution of TBDs by altering the geographic range of competent vectors, thereby increasing the likelihood of contact with vertebrate hosts. In addition, the rising populations of certain wild ungulates and carnivores, along with their adaptability to various habitats, favor their expansion into urban and suburban environments, with significant implications for the epidemiology of zoonotic parasites.

To date, data on the presence of piroplasmids in northwestern Italy remain limited, especially concerning wild boars. Therefore, the aim of this thesis was to investigate the epidemiology of *Babesia* spp. and *Theileria* spp. in wild ungulates and carnivores from the Liguria, Piemonte, and Valle d'Aosta regions.

Spleen tissue samples were collected from 1,819 wild animals, including 1,654 wild boars (*Sus scrofa*), 97 red foxes (*Vulpes vulpes*), 45 eurasian badgers (*Meles meles*), 9 grey wolves (*Canis lupus*), 13 beech martens (*Martes foina*), and 1 european otter (*Lutra lutra*), either hunted or found dead. DNA was extracted from all samples and analyzed using Real-Time PCR.

None of the tested wild boars were positive for *Babesia* or *Theileria* spp. However, molecular analysis detected positive cases among wild carnivores, which were confirmed by sequencing, allowing the identification of the infecting parasite species. Specifically, *Babesia canis* was detected in 22.2% (95% CI: 0–49.4%) of wolves (n = 2), *Babesia vulpes* (*Theileria annae*) in 3.1% (95% CI: 0–6.5%) of foxes (n = 3), and *Babesia type badger* in 8.9% (95% CI: 0.6–17.2%) of badgers (n = 4).

Although further research is needed to deepen the epidemiological understanding, the results of this thesis contribute to the current knowledge on the distribution of piroplasmids in the wildlife of northwestern Italy, suggesting a negligible role for wild boars and a greater involvement of wild carnivores.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 I patogeni	1
1.1.1 Biologia e tassonomia.....	1
1.1.2 Gli ospiti vertebrati.....	4
1.1.3 Il ciclo vitale dei piroplasmidi	7
1.1.4 Distribuzione geografica, aspetti zoonotici e impatto clinico	9
1.2 I vettori	13
1.3 Il cinghiale	17
1.3.1 Aspetti ecologici e distribuzione	17
1.3.2 Ruolo come serbatoio di patogeni	18
1.4 I carnivori selvatici	19
1.4.1 Il lupo grigio	20
1.4.2 La volpe rossa.....	21
1.4.3 Il tasso europeo	22
1.5 Tecniche diagnostiche per la ricerca di <i>Babesia/Theileria</i>	23
2. SCOPO DELLA TESI	27
3. MATERIALI E METODI	29
3.1 Raccolta dei campioni	29
3.2 Prelievo dell'aliquota analitica, lisi del tessuto ed estrazione del DNA.....	31
3.3 Real-time PCR (qPCR).....	34
3.3.1 Preparazione della mix di reazione.....	34
3.3.2 Amplificazione ed analisi dei dati	36
3.4 PCR end-point e sequenziamento di Sanger	37
3.5 Analisi statistica.....	37
4. RISULTATI	38
5. DISCUSSIONE	42

6. CONCLUSIONI	47
7. BIBLIOGRAFIA	48
8. RINGRAZIAMENTI	55

1. INTRODUZIONE

1.1 I patogeni

1.1.1 Biologia e tassonomia

Babesia e *Theileria* sono due generi di protozoi emoparassiti appartenenti al phylum Apicomplexa, classe Aconoidasida e ordine Piroplasmida. Possono essere ulteriormente classificati, rispettivamente, nelle famiglie Babesiidae e Theileriidae (Schnittger et al., 2012). In generale, il phylum Apicomplexa comprende un ampio gruppo di organismi eucarioti complessi, caratterizzati dal fatto di essere parassiti obbligati intracellulari di vertebrati e invertebrati. Una caratteristica distintiva di questi organismi è la presenza di un complesso apicale che ospita organelli secretori ritenuti coinvolti nei processi di invasione e/o insediamento del parassita all'interno dell'ospite, sia esso un mammifero o un invertebrato (Bishop et al., 2004).

Il genere *Babesia* è stato descritto per la prima volta da Victor Babes nel 1888, mentre *Theileria* fu identificato successivamente da Arnold Theiler nel 1904 (Uilenberg, 2006). Il nome dell'ordine e il termine “piroplasmidi” con cui sono comunemente indicati tali patogeni deriva dalla morfologia “a pera” (Figura 1) dello stadio di replicazione asessuata dei parassiti nelle cellule sanguigne dell'ospite vertebrato.

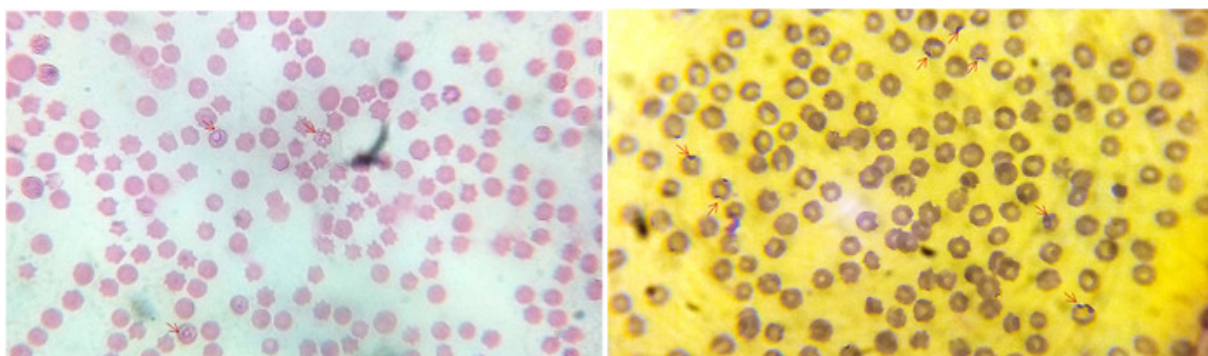


Figura 1 – Osservazione microscopica di *Babesia* spp. (sinistra) e *Theileria* spp. (destra) all'interno degli eritrociti di bovini, in strisci di sangue colorati con metodo Giemsa. Immagine tratta dallo studio di Hossain et al. (2022).

Storicamente, il genere *Babesia* era classificato utilizzando due principali criteri: la morfologia dei trofozoiti all'interno degli eritrociti, inclusa la loro dimensione relativa ed il numero, e l'ospite da cui il parassita era stato isolato. In base alle loro dimensioni, la classificazione tradizionale distingue *Babesie* piccole (Figura 2) (0,5-2,5 um, indicativamente inferiori a metà

diametro dell'eritrocita) o grandi (Figura 3) (3-5 um, indicativamente più grandi di metà diametro dell'eritrocita) (Lempereur et al., 2017).

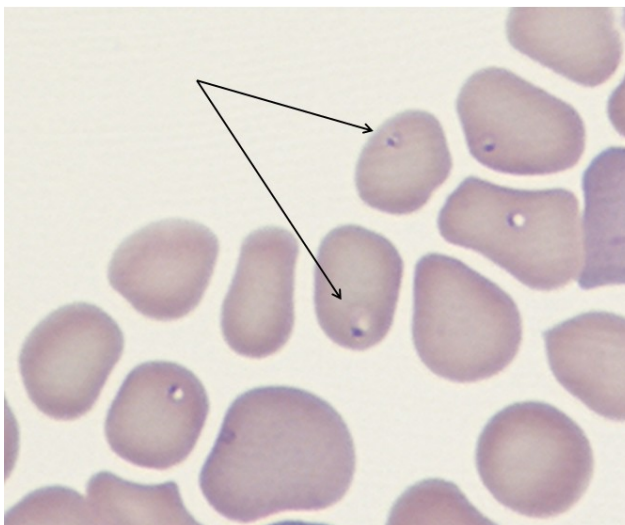


Figura 2 – Osservazione microscopica di un piccolo parassita di *B. microti*-like. Immagine tratta dallo studio di Simões et al. (2011).

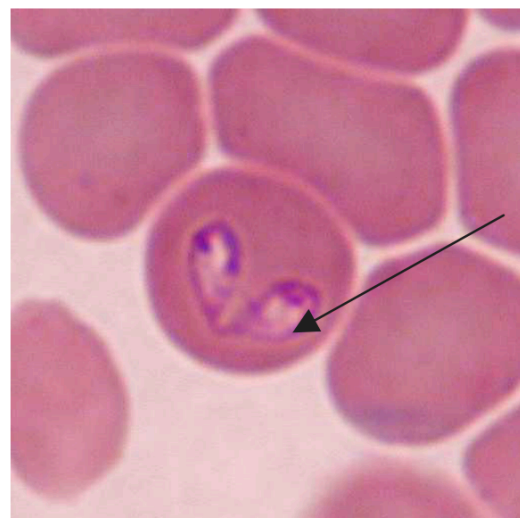


Figura 3 – Osservazione microscopica di due grandi parassiti di *B. canis*. Immagine tratta dall'articolo di Duh et al. (2004).

Inoltre, la classificazione basata sull'ospite assumeva che questi parassiti fossero altamente specifici per un determinato organismo, un'ipotesi che studi successivi hanno smentito per numerose specie (Yabsley and Shock, 2013).

Analisi molecolari recenti basate su diversi marcatori genetici hanno dimostrato l'esistenza di una varietà molto più ampia di specie di *Babesia*, anche se alcune possiedono dimensioni simili e stessi ospiti serbatoio. Tali studi hanno suggerito una distinzione in cinque o sei gruppi distinti. Tra questi, uno comprende piccole *Babesie* isolate da roditori selvatici, felidi, canidi e altri mammiferi di medie dimensioni (denominati archaeopiroplasmidi o gruppo *Microti*); un altro include parassiti rinvenuti in cervidi, cani ed esseri umani (definiti piroplasmidi occidentali, gruppo *Duncani* o prototheileridi); un terzo raggruppa specie canine, bovine e cervine (babesidi); un ulteriore gruppo comprende parassiti di bovini, equini e ovini (unguilibabesidi); infine, un ultimo raggruppamento include le specie appartenenti ai generi *Theileria* e *Cytauxzoon* (theileridi) (Criado-Fornelio et al., 2003).

Ad oggi sono state identificate circa 111 specie di *Babesia* e 39 di *Theileria*, basandosi quasi completamente su caratteristiche morfologiche, biologiche e genetiche (Levine, 1988; Mehlhorn et al., 1994; Reichard et al., 2005; Penzhorn and Oosthuizen, 2020). Nello specifico, la presenza o assenza di schizogonia e la modalità di trasmissione sono state considerate caratteristiche fondamentali per la loro distinzione (Uilenberg, 2006). L'assenza di schizonti e la trasmissione transovarica sono esclusive di *Babesia* sensu strictu (ss), mentre la presenza di schizonti e la

trasmissione transstadiale sono tipiche di *Theileria* (Mehlhorn et al., 1994; Kakoma and Mehlhorn, 1994). Un terzo gruppo esistente è rappresentato da *Babesia* sensu lato (sl) che in origine comprendeva tutti i piroplasmidi che non potevano essere ascritti ad alcuno degli altri gruppi. Sebbene condividano caratteristiche morfologiche e tassonomiche, *Babesia* e *Theileria* si diversificano nel ciclo vitale e nell'interazione con gli ospiti (vedere sezione 1.1.3).

1.1.2 Gli ospiti vertebrati

La specificità di *Babesia* spp. e *Theileria* spp. per l'ospite vertebrato è stata inizialmente descritta come limitata. Tuttavia, l'introduzione e l'impiego di nuovi approcci molecolari hanno rivelato che alcune specie presentano uno spettro di ospiti molto più ampio rispetto a quanto ipotizzato (Chauvin et al., 2009). La trasmissione di *Babesia* spp. risulta tanto più efficiente quanto la specificità della zecca è ridotta, poiché la distribuzione geografica del parassita tende a coincidere con quella del vettore. I cambiamenti ambientali e climatici globali hanno influenzato la diffusione delle malattie trasmesse da zecche, modificando la distribuzione e l'abbondanza delle zecche e aumentando le opportunità di contatto con gli ospiti vertebrati (Randolph, 2004).

Nel complesso, specie di zecche e di *Babesia* con un ampio spettro d'ospite risultano in grado di adattarsi facilmente a nuovi contesti ecologici, facilitando la trasmissione e incentivando l'evoluzione verso nuove specie. I merozoiti di *Babesia* spp. possiedono una spiccata capacità infettiva per gli eritrociti di diverse specie animali e, potenzialmente, si replicano in vitro (Gaffar et al., 2003; Zintl et al., 2003), dimostrando una significativa flessibilità biologica.

Tra gli animali domestici, diverse specie di *Babesia* interessano cane, gatto, bovino e ovicapri, mentre il cavallo è interessato sia da *T. equi* che da *B. caballi*. La babesiosi canina in Europa è molto diffusa, la specie segnalata più frequentemente è *B. canis*. Nel gatto, l'infezione da *Babesia* in Europa è più sporadica, pertanto le specie interessate e i relativi vettori sono meno noti (ESCCAP Linea guida 5 – Terza edizione – Aprile 2016). Diversamente, numerose specie di *Babesia* sono state segnalate in altre zone del mondo, specialmente in Sud Africa. Le specie di *Babesia* che interessano il cane e il gatto in Europa sono riportate in Tabella 1.

Tabella 1 – *Babesia* spp. infettanti il cane e il gatto in Europa con relativi vettori di trasmissione (ESCCAP - Linee guida per il trattamento ed il controllo dei parassiti degli animali da compagnia).

Agente eziologico	Ospite	Vettore
<i>B. canis</i>	Cane	<i>Dermacentor reticulatus</i>
<i>B. vogeli</i>	Cane	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>B. (Theileria) annae</i>	Cane	<i>Ixodes hexagonus</i> , <i>Ixodes ricinus</i>
<i>B. gibsoni</i> e <i>B. gibsoni</i> -like	Cane	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> <i>Haemaphysalis</i> spp. <i>Dermacentor</i> spp.
<i>Babesia</i> spp.	Gatto	<i>Rhipicephalus</i> spp.

Il bovino in Europa è prevalentemente interessato da *B. divergens*, *B. bigemina*, *B. bovis* e *B. major*, mentre il cavallo è interessato sia da *T. equi* che da *B. caballi* (Bajer et al., 2022).

Anche gli animali selvatici possono ospitare gli emoparassiti *Babesia* e *Theileria*. Negli ultimi anni, grazie soprattutto al maggior impiego delle tecniche biomolecolari, è stato infatti possibile identificare numerose specie di *Babesia* e *Theileria* negli animali selvatici, sia specifiche di tali specie che condivise con specie domestiche (Holman et al., 2011; Bastian et al., 2012). Piroplasmii sono stati riscontrati ad esempio in canidi, come il lupo grigio (*Canis lupus*) e la volpe (*Vulpes vulpes*); in cervidi, come il capriolo (*Capreolus capreolus*), il cervo rosso (*Cervus elaphus*) e il daino (*Dama dama*); in bovidi, tra cui il camoscio alpino (*Rupicapra rupicapra*) e lo stambecco spagnolo (*Capra pyrenaica*); nonché i suidi, nello specifico il cinghiale (*Sus scrofa*) (Sawczuk et al., 2008; Tampieri et al., 2008; Ferrer et al., 1998).

Recenti studi indicano che le specie di *Babesia* patogene per i mammiferi carnivori possono essere suddivise in tre gruppi principali. Il primo è rappresentato da *B. microti* che interessa felidi, canidi, mustelidi e procionidi. Il secondo è il gruppo prototeileridi che infetta felidi, canidi, erpestidi e ienidi. Infine vi è il gruppo *Babesia sensu stricto* che comprende specie patogene per canidi, procionidi e ursidi (Alvarado-Rybak et al., 2016; Schreeg et al., 2016; Hornok et al., 2018).

Nei carnivori selvatici europei, è stata segnalata l'infezione da almeno tre specie di *Babesia*. In particolare, *B. canis* è stata identificata nel lupo grigio (*Canis lupus*) (Beck et al., 2017), mentre nella volpe rossa (*Vulpes vulpes*) sono state rilevate sia *B. canis* che *B. vulpes* (descritta in letteratura anche come *Babesia* "Spanish dog isolate", *B. microti*-like, *B. annae* e *Theileria annae*) (Baneth et al., 2015). Inoltre, *B. vogeli* è stata diagnosticata in una faina (*Martes foina*). Per quanto riguarda il tasso europeo (*Meles meles*), sono stati identificati almeno due genotipi di *Babesia* spp. ad esso associati (Alvarado-Rybak et al., 2016; Hornok et al., 2018; Barandika et al., 2016), oltre a un ulteriore genotipo filogeneticamente correlato agli isolati di *B. vulpes* (Gimenez et al., 2009).

Per quanto riguarda i ruminanti selvatici, sono tre le specie maggiormente diffuse in Europa: *B. divergens*, *B. capreoli* e *B. venatorum* (Herwaldt et al., 2003). *Babesia venatorum* è strettamente correlata al capriolo (*Capreolus capreolus*) (Zintl et al., 2011); *B. capreoli* interessa prevalentemente i caprioli allo stato brado (Bastian et al., 2012) e occasionalmente i Caprinae selvatici (Hoby et al., 2007) ma è stata riscontrata anche nel cervo rosso in Irlanda (Zintl et al.,

2011). Inoltre *B. divergens* è stata riscontrata negli ungulati selvatici europei e si distingue per il suo ampio spettro di ospiti descritti finora per una specie di *Babesia* (Zintl et al., 2003).

In Europa sono stati condotti diversi studi molecolari basati sull'analisi del gene 18S rRNA, rilevando l'assenza di piroplasmidi nei cinghiali selvatici in Ungheria, Slovacchia, Germania e Portogallo (Hornok et al., 2018; Kazimírová et al., 2018; Pereira et al., 2016; Silaghi et al., 2014). Tuttavia ci sono state segnalazioni di alcune specie di *Theileria* nei cinghiali selvatici in Italia e Portogallo (Pereira et al., 2016; Tampieri et al., 2008; Zanet et al., 2014), mentre un solo caso di *Babesia bigemina* è stato registrato in Italia (Zanet et al., 2014).

L'agente patogeno della babesiosi suina, descritto nei suini domestici in Sardegna (Zobba et al., 2011), non è stato riscontrato nei cinghiali della stessa regione (Zobba et al., 2014). *B. trautmanni* e *B. perroncitoi*, le uniche due specie di *Babesia* note per infettare i suini e quindi anche i cinghiali, sono state descritte inizialmente negli anni '90 sulla base di osservazioni morfologiche, senza però alcuna conferma molecolare (Penzhorn, 2006).

1.1.3 Il ciclo vitale dei piroplasmidi

I piroplasmidi sono caratterizzati da una fase di riproduzione asessuata all'interno delle cellule sanguigne dell'ospite vertebrato. L'infezione dell'ospite vertebrato avviene durante il pasto di sangue della zecca, con il trasferimento degli sporozoiti all'ospite attraverso la secrezione salivare. Gli sporozoiti invadono diverse cellule del sangue, a seconda della specie di piroplasma (Shaw, 2003; Lobo et al., 2012). I parassiti del genere *Theileria* sono caratterizzati da schizogonia nei leucociti (monociti, macrofagi o linfociti T) prima dell'invasione dei globuli rossi (Schein et al., 1981; Moltmann et al., 1983; Conrad et al., 1985; Webster et al., 1985; Dobbelaere e Heussler, 1999; Dobbelaere e Rottenberg, 2003; Shaw, 2003). Diversamente, per i parassiti del genere *Babesia* non è mai stata accertata una schizogonia e si suppone che si moltiplichino esclusivamente negli eritrociti (Mehlhorn and Schein, 1993; Lobo et al., 2012 ; Schreeg et al., 2016).

Gli sporozoiti (Sz) di *Babesia* vengono quindi inoculati nell'ospite vertebrato insieme alla secrezione salivare della zecca e infettano direttamente gli eritrociti. Dopodiché gli sporozoiti si differenziano in trofozoiti (T), che si dividono in maniera asessuata (merogonia) in due o quattro merozoiti (M), i quali lasciano la cellula ospite e si dirigono verso altri eritrociti. In tal modo continua il ciclo replicativo. Diversamente, come anticipato, gli sporozoiti di *Theileria* non infettano gli eritrociti bensì penetrano nei linfociti (o macrofagi), dove successivamente si sviluppano in schizonti (Sc). Gli schizonti rilasciano i merozoiti, i quali entrano nei globuli rossi e si sviluppano in piroplasmidi non pigmentati. Questi si moltiplicano, tramite gemmazione, in quattro cellule figlie, con formazione di tetradi (la cosiddetta “croce maltese”).

La zecca si infetta quando ingerisce cellule sanguigne contenenti piroplasmidi, le quali possono essere considerati gametociti (Wenyon, 1926). I gametociti vengono assorbiti nel lume intestinale della zecca e si sviluppano ulteriormente in gameti, denominati corpi raggiati o Strahlenkörper (Sk). I microgameti si fondono con i macrogameti per formare zigoti mobili diploidi (Z) chiamati oocineti (Mehlhorn and Schein, 1984), che andranno successivamente incontro alla fase di sporogonia nelle ghiandole salivari della zecca, un ciclo di differenziazione e moltiplicazione in cui i cineti diventano sporozoiti che invaderanno un nuovo ospite vertebrato quando la zecca avrà effettuato la muta allo stadio di sviluppo successivo (trasmissione transstadiale, Ts) (Jalovecka et al., 2018). Quindi la sporogonia avviene nelle ghiandole salivari di tutti gli stadi di sviluppo delle zecche della generazione successiva. Nel momento in cui la zecca si nutrirà di un nuovo ospite, avrà luogo la maturazione degli sporozoiti e la saliva della

zecca infetterà l'ospite. Nel caso di *Babesia* ss, la sporogonia avviene anche nelle ovaie, consentendo quindi una trasmissione transovarica (To).

Gli zigoti di *Theileria* sono molto più grandi di quelli di *Babesia*, ma meno numerosi e prendono anch'essi il nome di oocineti. La sporogonia e la maturazione degli sporozoiti avvengono nelle ghiandole salivari della zecca nel suo stadio di sviluppo successivo, quando questa si attacca a un nuovo ospite. Tuttavia, la zecca, dopo aver trasmesso il patogeno, perde il suo potere infettivo: al contrario di *Babesia*, l'infezione da *Theileria* non persiste nei diversi stadi di sviluppo della zecca e nemmeno nelle generazioni posteriori (Schnittger et al., 2022).

Gli stadi del ciclo vitale di *Theileria* e *Babesia* nella zecca e nell'ospite vertebrato sono schematizzati in Figura 4.

È utile sottolineare che, per entrambi i parassiti, gli sporozoiti devono prima conseguire la maturazione per poter infettare. Pertanto, la zecca vettore al momento dell'attacco non è prontamente infettiva, la trasmissione avviene circa quattro giorni dopo l'attacco (McKeever and Declan, 2009).

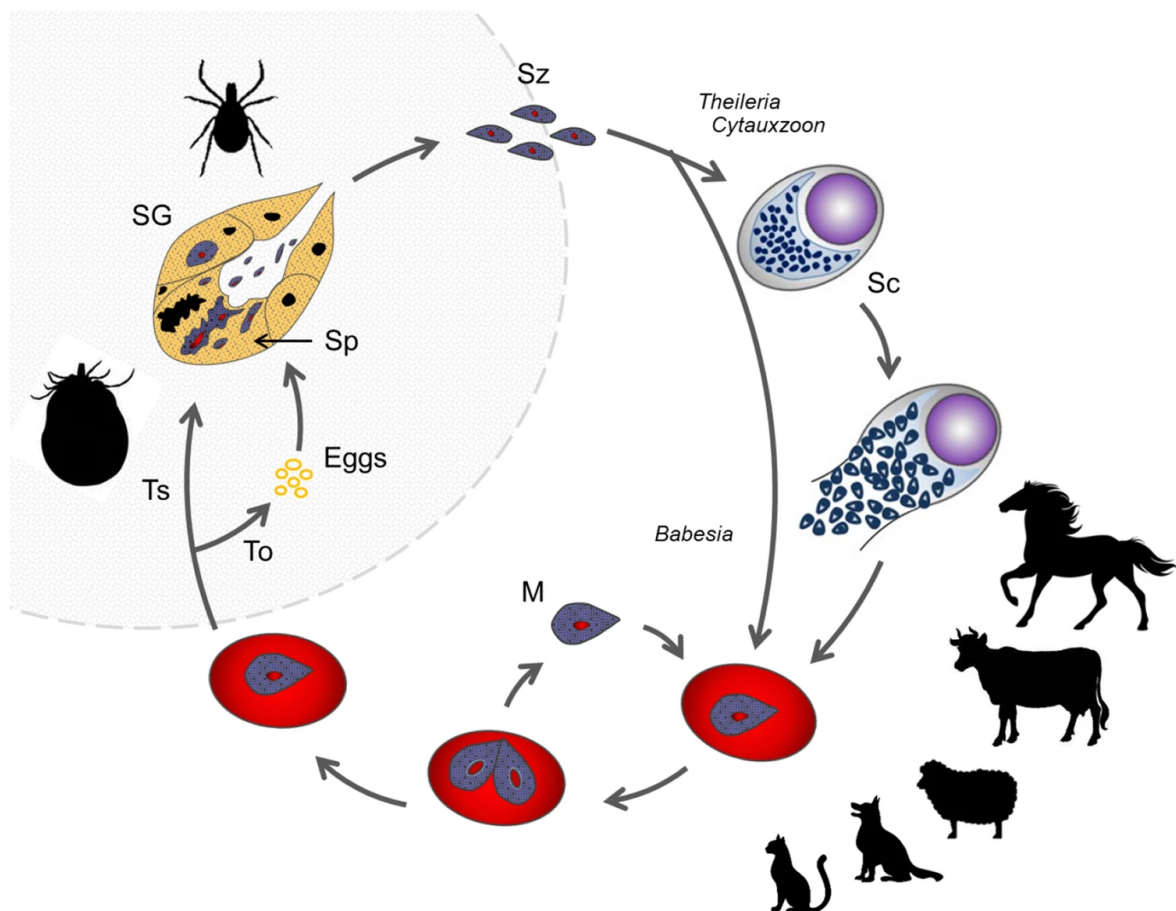


Figura 4 – Rappresentazione grafica del ciclo vitale dei piroplasmidi. Immagine tratta dall'articolo Schnittger et al. (2022).

1.1.4 Distribuzione geografica, aspetti zoonotici e impatto clinico

Nel complesso, i piroplasmidi possono determinare perdite economiche notevoli, in particolare il genere *Babesia* rappresenta il secondo parassita ematico più diffuso nei mammiferi dopo i tripanosomi (Yabsley and Shock, 2013). Inoltre, alcune specie di *Theileria* come *T. annulata* e *T. parva* sono ritenute altamente patogene per il bestiame e provocano una mortalità significativa tra gli animali esposti (Tait and Hall, 1990; Gitau et al., 1999).

I generi *Babesia* e *Theileria* presentano una distribuzione globale, con maggiore prevalenza nelle regioni tropicali e subtropicali, in cui le zecche sono più abbondanti. Ad esempio, *B. bovis* e *B. bigemina* sono diffuse in America Latina, Asia e Africa (Schnittger et al., 2012). *T. parva*, invece, è prevalente in Africa orientale e meridionale, dove causa la “East Coast fever”, una malattia ad alta mortalità nei bovini (Norval et al., 1992).

Come anticipato nella sezione precedente, l’infezione da piroplasmidi è stata riportata in tutto il mondo in diverse famiglie di carnivori selvatici, quali Canidae, Felidae, Mustelidae, Procyonidae, Ursidae, Viverridae, Hyaenidae e Herpestidae (Rybak et al., 2016) (Figura 5).



Figura 5 – Distribuzione mondiale dell’infezione da piroplasmidi in specie animali selvatiche. Immagine tratta dall’articolo Rybak et al. (2016).

In Italia *Babesia* spp. è largamente distribuita, soprattutto nelle regioni meridionali dove il clima è subtropicale (Torina and Carappa, 2007). In particolare, nello studio condotto da Torina e Carappa (2007) sono state raccolte le segnalazioni disponibili in letteratura sulla babesiosi in Italia e i dati degli archivi storici del “Centro Nazionale di Referenza per *Anaplasma*, *Babesia*, *Rickettsia* e *Theileria*”. Pertanto sono stati identificati i patogeni coinvolti nell’infezione di diverse specie animali sul territorio italiano (Figura 6).



Figura 6 – Panoramica della distribuzione di *Babesia* spp. e *Theileria* spp. all'interno delle regioni italiane. Immagine tratta dall'articolo Torina and Carappa (2007).

L'uomo può rappresentare un ospite occasionale di alcune specie di *Babesia* (Sojka et al., 2022). Furono Wilson e Chowing nel 1904 a dimostrare che anche l'essere umano potesse essere infettato da questo emoparassita, osservando inclusioni piriformi intraeritrocitarie come quelle descritte da Smith e Kilbourne nel 1893. Tra le varie specie, *B. divergens* è la principale causa di babesiosi umana in Europa, mentre *B. microti* negli Stati Uniti (Hunfeld et al., 2008). Sia nell'uomo che negli animali, l'effetto patologico principale legato a questa parassitosi è la distruzione dei globuli rossi, che determina un'anemia emolitica, spesso aggravata dal rilascio di tossine e prodotti di scarto nel torrente circolatorio. Inoltre, la risposta immunitaria dell'ospite all'infezione può innescare il rilascio di citochine, contribuendo a danneggiare ulteriormente l'ospite (Montero et al., 2022).

Sotto vari aspetti, il quadro patologico della babesiosi presenta analogie con quello della malaria, una malattia più nota causata però da protozoi del genere *Plasmodium* (Montero et al., 2022). La malaria rappresenta la principale diagnosi differenziale, in quanto anche *Plasmodium* spp. può manifestarsi con forme ad anello intraeritrocitario (Figura 7). Sebbene nella malaria il pigmento parassitario (emozoina) sia generalmente visibile, le fasi iniziali dello sviluppo del parassita possono esserne prive e, inoltre, non si è da escludere la possibilità di co-infezioni (Bush et al., 1990). Questo può facilmente portare a errori diagnostici, identificando *Babesia*

spp. come *Plasmodium* spp. o viceversa, soprattutto nei soggetti provenienti da aree endemiche per la malaria o nei viaggiatori di ritorno da regioni in cui la malaria è nota ma la babesiosi non è mai stata precedentemente riportata (Hunfeld et al., 2008).

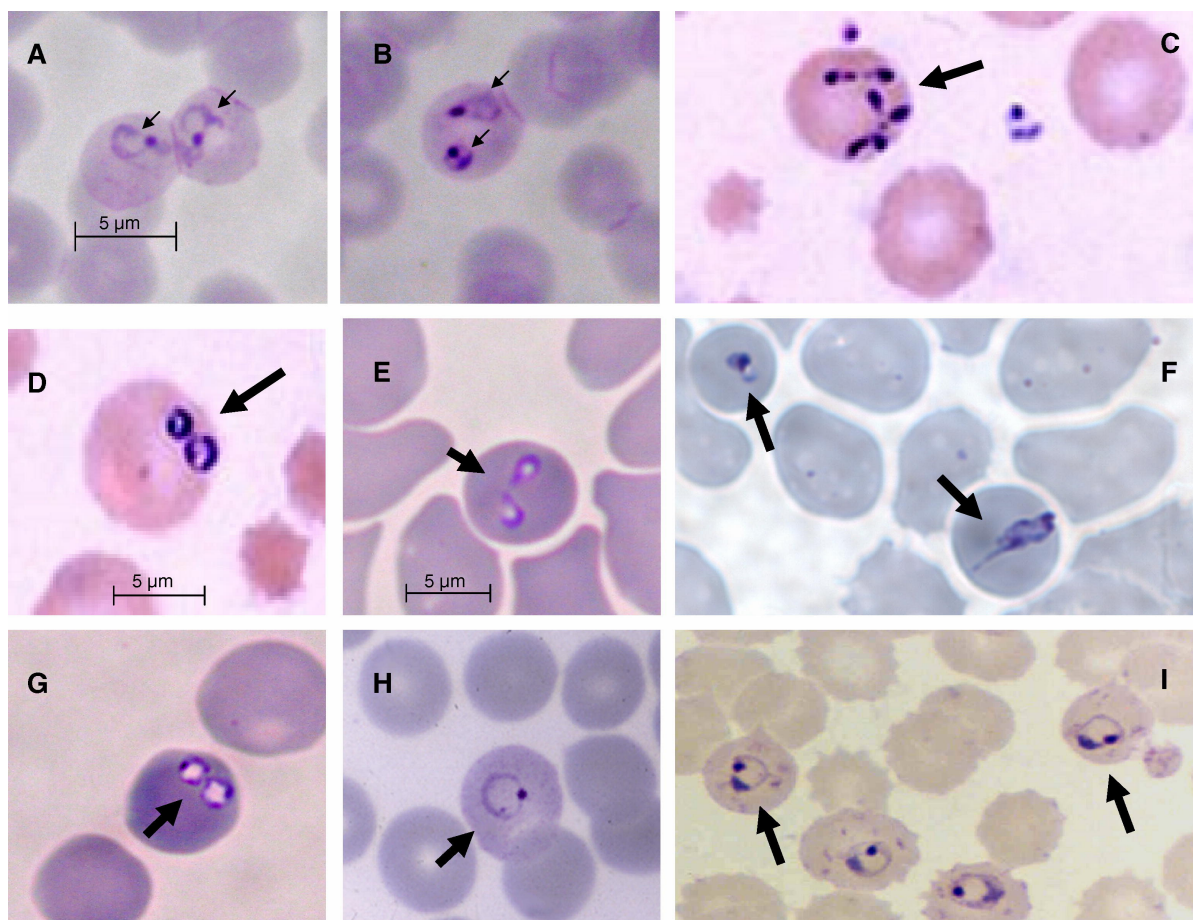


Figura 7 – Osservazione microscopica di *Babesia* su strisci di sangue periferico colorati mediante metodo Giemsa. Le frecce nere indicano i parassiti inclusi negli eritrociti infetti. Immagine tratta dall'articolo di Hunfeld et al. (2008).

(A, B) *B. microti* – diametro di circa 1,5-2,5 μm . (C, D) *B. divergens* – diametro di circa 1-2,5 μm . (E, G) *B. venatorum* – diametro di circa 1-3 μm . (H) *Plasmodium vivax* – diametro di circa 2,5 μm . (I) *Plasmodium falciparum* – diametro di circa 2,5 μm .

La babesiosi nell'uomo può variare da forme asintomatiche a forme gravi con febbre, anemia emolitica e insufficienza multiorgano, soprattutto nei soggetti immunodepressi. Similmente, i segni clinici di babesiosi nel cane possono manifestarsi in forma acuta, iperacuta o cronica. In forma acuta l'infezione spesso comporta anoressia, letargia, febbre, ittero, vomito. Altri segni frequenti sono anemia emolitica, trombocitopenia e neutropenia. In forme croniche i segni comprendono anemia, febbre intermittente, miositi e artriti. La babesiosi nel gatto, invece, è spesso incentivata da altre infezioni causate soprattutto da retrovirus e micoplasmi. Gli aspetti clinici riguardano soprattutto anoressia, letargia, debolezza e diarrea; in stadi avanzati dell'infezione possono manifestarsi anche febbre e ittero (ESCCAP Linea guida 5 – Terza edizione – Aprile 2016).

I protozoi del genere *Theileria* non hanno un impatto zoonotico documentato ma rappresentano, come *Babesia* spp., una minaccia significativa per l'allevamento, determinando gravi perdite economiche nelle aree endemiche (Tretina et al., 2015). Negli animali, similmente alla babesiosi, anche la theileriosi clinica si manifesta principalmente con anemia, risultante dalla distruzione eritrocitaria e dall'emolisi; tuttavia, è spesso accompagnata da ingrossamento dei linfonodi.

In generale, i meccanismi immunopatogenetici di entrambi i parassiti risultano analoghi. Tuttavia, il quadro clinico può variare in funzione delle varie specie implicate. Nel complesso, l'impatto della theileriosi in Europa appare relativamente contenuto, attribuibile alla presenza predominante di specie a bassa patogenicità (Stuen, 2016). Diversamente, in altre aree geografiche si registrano perdite economiche considerevoli. In alcune regioni, inoltre, è stata rilevata la coesistenza di due specie di *Theileria* e la conseguente possibilità di coinfezione nei piccoli ruminanti (Al-Hamidhi et al., 2021). Dal punto di vista clinico, *T. lestoquardi* rappresenta la principale specie responsabile di manifestazioni cliniche negli ovini europei (Panel and Ahaw, 2010), seguita da *T. uilenbergi* e *T. luwenshuni* [Kumar et al., 2020; Yin et al., 2003; Phipps et al., 2016]. Diversamente, specie come *T. ovis* tendono a determinare infezioni subcliniche negli animali immunocompetenti, sebbene le condizioni di stress possano favorire la comparsa di sintomatologia clinica. *T. separata* è generalmente considerata non patogena, ma in animali immunocompromessi può indurre quadri clinici fatali (Yin et al., 2007). Infine, *T. recondita* è stata considerata patogena in presenza di condizioni di stress (Alani and Herbert, 1988).

1.2 I vettori

La trasmissione dei piroplasmidi è influenzata non solo dalla varietà di specie ospiti suscettibili all'infezione, ma anche dalla presenza dei vettori. Infatti, la principale modalità di trasmissione è rappresentata dal morso di zecca, sebbene vada sottolineato che esistono anche altri meccanismi di diffusione, come la trasmissione diretta da animale ad animale (es. in caso di morsi con scambio di sangue) o la trasmissione transplacentare per alcune specie di piroplasmidi (Alvarado-Rybak et al., 2016). Inoltre, la trasfusione di sangue rappresenta una via alternativa di trasmissione diretta, anche nel caso della babesiosi umana (Young et al., 2012).

Le zecche (Arachnida: Ixodida) sono classificate in due principali famiglie: Argasidae (zecche molli) e Ixodidae (zecche dure), che si distinguono per le loro caratteristiche ecologiche e per il loro impatto sulla salute umana e animale (Parola and Raoult, 2001; Sonenshine and Roe, 2014).

A differenza delle zecche dure, le zecche molli appartenenti alla famiglia Argasidae si nutrono rapidamente, in un intervallo temporale che varia da pochi minuti a circa un'ora, e possono effettuare più pasti ematici per ciascuna fase del loro ciclo vitale (Vial, 2009). Inoltre, presentano diversi stadi di sviluppo tra una muta e l'altra e colonizzano prevalentemente ambienti specifici come nidi, tane e grotte di fauna selvatica, il che ne limita l'habitat rispetto alle zecche dure (Sonenshine, 2005; Uspensky, 2005).

Le zecche dure, appartenenti alla famiglia Ixodidae, presentano una distribuzione geografica più ampia e possono essere rinvenute in un'ampia varietà di habitat, inclusi ambienti naturali, suburbani e persino urbani (Sonenshine, 2005). Nel loro ciclo biologico, le zecche dure attraversano tre fasi di alimentazione attiva: larva, ninfa e adulto. Gli stadi giovanili, ovvero larve e ninfe, compiono il pasto di sangue principalmente su piccoli mammiferi, spesso roditori, che rappresentano i serbatoi naturali per numerosi patogeni veicolati da questi artropodi (Parola and Raoult, 2001). La specificità dell'ospite vertebrato su cui le zecche compiono il pasto di sangue varia a seconda della specie e dello stadio di sviluppo (Rochlin and Toledo, 2020). Il comportamento di ricerca dell'ospite varia tra le specie, e generalmente dopo aver individuato l'ospite e aver iniziato il pasto di sangue questi ectoparassiti si alimentano per lunghi periodi, che possono estendersi da 3 a 12 giorni, a seconda della specie e dello stadio di sviluppo (Sonenshine and Roe, 2014). Oltre a provocare danni diretti associati al pasto ematico e talvolta all'espulsione di tossine nelle secrezioni salivari, le zecche sono in grado di trasmettere agli

animali e all'uomo un ampio spettro di patogeni, tra cui virus, protozoi ed elminti (Jongejan e Uilenberg, 2004; Estrada-Peña et al., 2014), Pertanto, sono riconosciute come il secondo vettore più importante di patogeni a livello mondiale, dopo le zanzare (de la Fuente et al., 2008).

Le malattie trasmesse da zecche sono comunemente indicate con il termine “*Tick-borne diseases*” (TBD). Il prolungato contatto con l'ospite facilita infatti la trasmissione di agenti patogeni, che in genere necessitano di un periodo superiore alle 24 ore per essere trasferiti in modo efficiente all'ospite (Eisen, 2018).

L'insorgenza sempre più diffusa delle TBD è determinata da molteplici fattori, tra cui le variazioni climatiche e la grande disponibilità di ospiti idonei (Ogden et al., 2021). È stato dimostrato che i patogeni trasmessi dalle zecche colpiscono l'80% della popolazione bovina mondiale con un costo stimato tra 13,9 e 18,7 miliardi di dollari USA (De Castro et al., 1997). L'impatto rilevante di queste patologie sulla salute umana e animale evidenzia l'importanza di un monitoraggio accurato delle popolazioni di zecche, nell'ottica di strategie volte a contenerne la diffusione. Un aspetto fondamentale della sorveglianza epidemiologica consiste nell'analisi degli agenti patogeni all'interno delle specie sentinella e serbatoio (Matei et al., 2023).

Le zecche possono essere suddivise in due categorie principali sulla base delle loro caratteristiche alimentari. Il primo gruppo comprende la maggior parte delle zecche, che possiedono un'elevata specificità d'ospite, come *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, noto vettore di *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, che si nutre prevalentemente di bovini e altri ruminanti. Il secondo gruppo, più ristretto, è rappresentato dai parassiti opportunisti o generalisti, caratterizzati da una scarsa selettività nella scelta dell'ospite. Tra questi vi è *Ixodes ricinus*, un'ectoparassita in grado di nutrirsi di un'ampia varietà di vertebrati ed è implicato nella trasmissione di *Babesia divergens*, *Babesia venatorum* e probabilmente *Babesia capreoli* (Chauvin et al., 2009).

In generale, le zecche con comportamento trofico generalista tendono ad essere più efficaci nella trasmissione di *Babesia* spp. a nuovi ospiti potenzialmente suscettibili. Un aspetto degno di nota riguarda *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Babesia divergens*, le quali mostrano una specificità d'ospite relativamente ridotta rispetto ad altre specie dello stesso genere (Chauvin et al., 2009). Questo tratto è strettamente correlato all'ampia distribuzione e al comportamento ecologico dei loro principali vettori: *Rhipicephalus microplus* e *Rhipicephalus annulatus* per *B. bovis* e *B. bigemina* (de la Fuente et al., 2017) e *Ixodes ricinus* per *B. divergens* (Vannier and Krause,

2012). Tali zecche sono caratterizzate da un ampio spettro di ospiti vertebrati su cui possono compiere il pasto ematico. Inoltre, la stretta affinità genetica tra alcune specie di *Babesia* che infettano ruminanti, come *B. divergens* e *B. capreoli*, entrambe veicolate da *I. ricinus*, potrebbe riflettere una divergenza evolutiva relativamente recente, suggerendo una possibile co-evoluzione con il medesimo vettore (Chauvin et al., 2009).

In Europa, le specie di zecche maggiormente coinvolte nella trasmissione di piroplasmosi sono *Dermacentor* spp., *Rhipicephalus sanguineus*, *Haemaphysalis* spp., *Ixodes hexagonus* (non ancora dimostrato sperimentalmente) (ESCCAP – Linee guida per il trattamento ed il controllo dei parassiti degli animali da compagnia).

Ixodes ricinus è risultata essere la specie di zecca più abbondante in Europa (Medlock et al., 2013) e nell'Italia centro-settentrionale, sia negli esemplari prelevati da ospiti animali che in quelli raccolti dall'ambiente (Iori et al., 2010). Inoltre, è risultata essere il vettore con la maggiore diversità di specie di piroplasmidi, seguita da *R. sanguineus*, *Hy. marginatum* e *R. turanicus* (Iori et al., 2010). In particolare, il ruolo vettoriale di questa specie di zecca è stato confermato in almeno quattro specie di *Babesia*: *B. venatorum*, *B. microti*, *B. divergens* e *B. capreoli* (Bajer and Dwużnik-Szarek, 2021).

I. ricinus (Figura 8) è caratterizzata da un ciclo di vita trifasico e da una bassa specificità di ospite, qualità che le consentono di veicolare una vasta gamma di microrganismi patogeni, tra cui virus, batteri e protozoi (Medlock et al., 2013). La distribuzione e l'abbondanza di *I. ricinus* sono attualmente in espansione sia in termini di altitudine che di latitudine, a causa di molteplici fattori, tra cui i cambiamenti climatici e le variazioni nella gestione del territorio (Medlock et al., 2013; Ogden, 2013). In Europa *I. ricinus* è stato documentato come vettore di *Babesia divergens*, *B. venatorum* e *B. microti*, responsabili della babesiosi umana (Herwaldt et al., 2004; Vannier and Krause, 2012; Krause, 2019).

Dermacentor reticulatus (Figura 9) rappresenta la seconda specie di zecca più diffusa in Europa e, parallelamente, la seconda più studiata del continente – dopo *I. ricinus*. Al contrario, le restanti specie appartenenti al genere *Dermacentor* risultano oggetto di un interesse scientifico inferiore. In *D. reticulatus* è stata documentata la presenza di diverse specie di *Babesia*; tuttavia, la più frequente e geograficamente distribuita è *Babesia canis*, riconosciuta come il principale agente eziologico della babesiosi canina nell'Europa centrale e nord-orientale. Di particolare rilevanza epidemiologica è la recente espansione dell'areale di distribuzione di *D. reticulatus* in numerosi

paesi europei, fenomeno che risulta strettamente correlato all'aumento dei casi di babesiosi canina. È opportuno sottolineare, tuttavia, che in alcune popolazioni locali di questa specie non è stata ancora rilevata la presenza di DNA di *B. canis*.



Figura 8 – Esemplare di *Ixodes ricinus* osservato tramite stereomicroscopia all'interno dei laboratori dell'IZSPLV (Genova).



Figura 9 – Microfotografia di *Dermacentor reticulatus* tratta dall'articolo di Földvári et al. (2016).

In Nord America, *Ixodes scapularis* rappresenta il principale vettore di trasmissione di *Babesia microti* all'uomo (Yabsley and Shock, 2013). Lungo la costa pacifica degli Stati Uniti e del Canada è stata identificata una nuova specie zoonotica, *Babesia duncani*, i cui vettori riconosciuti appartengono al genere *Ixodes*, in particolare *I. scapularis* e *I. pacificus* (Vannier and Krause, 2012; Herwaldt et al., 2004). Recentemente uno studio ha attribuito la trasmissione di *B. duncani* anche alla zecca invernale *Dermacentor albipictus*, con la sua specie ospite, il cervo mulo (*Odocoileus hemionus*), ipotizzando una distribuzione geografica ancora più vasta (Swei et al., 2018). Nell'Asia meridionale, invece, *Ixodes ovatus* è il vettore principale di *B. microti*, mentre in Cina settentrionale sono stati segnalati casi di *B. venatorum*, probabilmente veicolato da *I. persulcatus* (Krause, 2019).

Per quanto riguarda invece *Theileria*, la zecca solitaria (*Amblyomma americanum*) è attualmente l'unico vettore noto di *T. cervi*, un parassita che infetta prevalentemente i ruminanti selvatici, in particolare il cervo dalla coda bianca (*Odocoileus virginianus*) (Laird et al., 1988; Chae et al., 1999). Negli Stati Uniti la theileriosi è stata documentata solo in casi sporadici, tuttavia tale scenario potrebbe mutare rapidamente a seguito della recente introduzione della zecca asiatica dalle lunghe corna, *Haemaphysalis longicornis* (Rainey et al., 2018; Rochlin, 2019). Questa specie, riconosciuta come vettore di *Theileria orientalis* (Fujisaki et al., 1994; Hammer et al., 2015) è stata recentemente identificata in bovini dello stato della Virginia, segnalando un potenziale rischio di diffusione della malattia (Oakes et al., 2019).

1.3 Il cinghiale

1.3.1 Aspetti ecologici e distribuzione

Il cinghiale (*Sus scrofa*), originario dell'Eurasia, è attualmente diffuso in tutti i continenti ad eccezione dell'Antartide e di numerose isole oceaniche (Long, 2003), risultando uno dei mammiferi con la più ampia distribuzione globale (Massei and Genov, 2004) (Figura 10).

Questa specie fu una delle prime ad essere introdotta intenzionalmente dall'uomo in nuove aree diverse da quelle native (Vigne et al., 2009), prima per sfruttarne la carne, successivamente la sua circolazione è stata incentivata da attività venatorie commerciali (Courchamp et al., 2003; Long, 2003). Il successo ecologico del cinghiale è dovuto principalmente alle sue caratteristiche biologiche, quali alto tasso di riproduzione (Wood and Barrett, 1979; Coblenz and Baber, 1987; Pavlov et al., 1992; Taylor et al., 1998; Rosell et al., 2001) e notevole capacità di adattamento a diverse condizioni ambientali, come dimostrato dalla sua ampia diffusione naturale (Baskin and Danell, 2003).

La dieta versatile, che varia a seconda della localizzazione geografica e della stagionalità (Stegeman, 1938; Genov, 1981; Baubet et al., 2004), e la ridotta presenza di predatori naturali, dovuta alla naturale scarsità o alla rimozione antropica (Tolleson et al., 1995; Ickes, 2001; Massei and Genov, 2004), hanno favorito ulteriormente l'insediamento dei cinghiali.

L'espansione delle popolazioni è stata inoltre incentivata dall'allevamento illegale (Wood and Barrett, 1979; Spencer and Hampton, 2005) e dallo sviluppo dell'agricoltura (O'Brien, 1987).



Figura 10 – Mappa di distribuzione del cinghiale (*Sus scrofa*) a livello globale. In nero si osserva l'areale nativo della specie, mentre in grigio l'areale di introduzione da parte dell'uomo. Immagine tratta dall'articolo di Barrios-Garcia e Ballari (2012).

Tuttavia, tale espansione è stata causa di numerose problematiche quali il danneggiamento del raccolto (Lombardini et al., 2017), la riduzione della varietà e della presenza di specie animali e vegetali (Oja et al., 2017), e infine il ruolo di sentinella per numerosi patogeni.

Il cinghiale è un animale altamente adattabile, in grado di colonizzare un'ampia varietà di habitat, che spaziano dalle zone semi-aride alle paludi, fino alle foreste e alle praterie alpine. Negli ultimi decenni, la sua presenza si è estesa anche alle aree urbane e periurbane di numerose città europee (Licoppe et al., 2013).

1.3.2 Ruolo come serbatoio di patogeni

I cinghiali giocano un ruolo importante come serbatoi di numerose malattie causate da virus, batteri e parassiti (Rosell et al., 2001; Baubet et al., 2003; de la Fuente et al., 2004; Gortázar et al., 2007; Ruiz-Fons et al., 2008), determinando un grave rischio per l'uomo e per gli animali.

Tali malattie e zoonosi possono essere trasmesse attraverso il contatto diretto con il cinghiale o i suoi escrementi, oppure attraverso l'ingestione della sua carne cruda o di alimenti contaminati. A tal proposito il cinghiale può provocare un drastico quadro economico che include la mortalità del bestiame, la sorveglianza delle malattie e programmi di eradicazione.

Le patologie di rilevante preoccupazione per la salute umana comprendono la brucellosi, la leptospirosi, l'infezione da *Escherichia coli* (Browning, 2008), la trichinellosi (Pavlov et al., 1992; Pavlov and Edwards, 1995), la tubercolosi (Gortázar et al., 2007), la toxoplasmosi (Antolova et al., 2007) e le malattie trasmesse da zecche (de la Fuente et al., 2004).

Per quanto riguarda il bestiame e la fauna selvatica le principali malattie che possono essere veicolate dal cinghiale sono la brucellosi, la tubercolosi (Gortázar et al., 2007), la peste suina classica (Wood and Barrett, 1979), il parvovirus suino (Ruiz et al., 2009), la trichinellosi (Gortázar et al., 2007), la peste suina africana e la salmonellosi (Vengust et al., 2006).

Tra gli ectoparassiti più diffusi negli ecosistemi dell'Europa centrale vi è *Ixodes ricinus*, una zecca ematofaga che si nutre di circa 300 specie di vertebrati, tra cui il cinghiale (Rizzoli et al., 2014). Ulteriori studi hanno riportato occasionalmente infestazioni anche da parte di *Dermacentor reticulatus* (Kazimírová et al., 2018) e *D. marginatus* (Maioli et al., 2012; Ortuño et al., 2006) nei cinghiali.

Sebbene il ruolo del cinghiale come ospite per le zecche sia stato ampiamente documentato in diverse aree del mondo (Lim et al., 2020; Masatani et al., 2017; Merrill et al., 2018), le informazioni specifiche relative all'Europa risultano ancora limitate (Hrazdilová et al., 2021).

Infatti, gli studi condotti in Europa sulla trasmissione di patogeni da parte delle zecche nei cinghiali restano ancora poco numerosi (Hrazdilová et al., 2021).

1.4 I carnivori selvatici

Nel corso del XIX e XX secolo, la composizione della fauna carnivora in Europa ha subito significative trasformazioni. Negli ultimi dieci anni, tutte le specie autoctone precedentemente estinte a livello locale hanno progressivamente riconquistato i loro habitat originari (Daněk et al., 2023). Tra i grandi carnivori presenti in Europa, si annoverano principalmente il lupo grigio (*Canis lupus*), la lince eurasiatica (*Lynx lynx*) e l'orso bruno (*Ursus arctos*). Il mesocarnivoro più diffuso è la volpe rossa (*Vulpes vulpes*), seguita in termini di diffusione dal tasso europeo (*Meles meles*). Infine, tra i piccoli carnivori, predominano le specie appartenenti al genere *Martes*, quali la martora (*Martes martes*) e la faina (*Martes foina*) (Pyšková et al., 2018).

I mesocarnivori selvatici europei includono la volpe rossa (*Vulpes vulpes*), lo sciacallo dorato (*Canis aureus*), il gatto selvatico europeo (*Felis silvestris*), i mustelidi dei generi *Meles*, *Martes*, *Mustela*, *Lutra*, i procioni (*Procyon lotor*) e il visone americano (*Neogale vison*) (Veronesi et al., 2023). La loro posizione apicale nella catena alimentare unita all'assenza di competitori naturali significativi incrementa la loro capacità adattativa. Inoltre, le dimensioni contenute e la versatilità ambientale rendono i mesocarnivori in grado di insediarsi in vari tipi di ecosistemi (Roemer et al., 2009).

Alcuni mesocarnivori come la volpe sono frequentemente soggetti ad attività venatorie in numerosi paesi europei, facilitando così la raccolta di campioni biologici come sangue e tessuti. I grandi carnivori del continente, invece, godono di un regime di protezione legale, seppur variabile, all'interno dell'Unione Europea (Direttiva 92/43/CEE della Commissione Europea, 1992).

Nel complesso, i carnivori possiedono una notevole capacità di adattamento a diversi tipi di habitat, esercitando un'influenza rilevante sugli ecosistemi locali (Dahl et al., 2019). Tali caratteristiche spingono la fauna selvatica a espandere i propri territori verso aree suburbane e urbane, influenzando l'epidemiologia dei parassiti zoonotici, compresi quelli trasmessi da vettori ematofagi (Kilpatrick and Randolph, 2012).

1.4.1 Il lupo grigio

Il lupo è una specie adattabile e generalista, in grado di occupare ambienti diversi e tollerare il disturbo da parte dell'uomo (Mech and Boitani, 2003; MacDonald and Sillero-Zubiri, 2004). In passato i lupi erano largamente distribuiti nell'emisfero settentrionale, tuttavia c'è stata una drastica riduzione in seguito alla marcata pressione antropica (Mech, 1970; Carbyn, 1987). In Europa, a seguito di uno status di protezione speciale e a partire dagli anni '80, alcune popolazioni hanno iniziato a espandersi in aree poco antropizzate e ricche di prede (Promberger and Schröder, 1993; Boitani, 2000), rimanendo tuttavia per lo più confinati in zone lontane, di collina o di montagna (Mech and Boitani, 2003; Okarma et al., 1998; Corsi et al., 1999; Salvador and Abad, 1987). Attualmente, la popolazione di lupo è in aumento in numerosi paesi europei, compresa l'Italia, e i lupi si osservano sempre più spesso anche in aree urbanizzate (<https://www.lifewolfalps.eu/category/lupi-urbani/>). La popolazione di lupi presente in Italia, possiede una rilevanza conservazionistica sia nazionale che europea. Negli ultimi decenni ha mostrato una significativa crescita numerica e una progressiva espansione dall'Appennino verso le Alpi occidentali (Scandura et al., 2001; Fabbri et al., 2007).

Il lupo è in grado di modificare la propria strategia di caccia in funzione delle condizioni ecologiche locali, adattandosi all'ambiente, alla densità delle prede e all'influenza delle attività antropiche. Nelle aree caratterizzate da un'elevata presenza di ungulati selvatici, la selezione delle prede avviene secondo un bilanciamento tra il rendimento energetico, lo sforzo necessario per la cattura e le difese adottate dalle prede stesse. Tale flessibilità alimentare consente al lupo di modificare rapidamente la propria dieta in risposta a cambiamenti nella composizione faunistica e nell'alterazione antropica. Proprio questa plasticità ecologica ha favorito, negli ultimi decenni, la ricolonizzazione di porzioni significative dell'areale storico europeo (Zlatanova et al., 2014).

1.4.2 La volpe rossa

La volpe rossa è il carnivoro generalista con la più ampia distribuzione a livello globale. Il suo areale naturale copre l'intero artico, mentre l'areale introdotto comprende, tra gli altri, il continente australiano (Schipper et al., 2008). In Italia, è presente lungo tutto il territorio nazionale, con maggiore frequenza nelle regioni settentrionali e centrali (Magi et al., 2016). Si tratta di una specie estremamente adattabile, in grado di colonizzare ambienti molto diversi tra loro, dalla tundra ai deserti. Tuttavia, l'ampiezza del suo areale ecologico non è necessariamente indice di una marcata plasticità fenotipica all'interno delle popolazioni; potrebbe piuttosto derivare da adattamenti locali specifici in risposta alle condizioni ambientali (Sacks et al., 2010). La volpe rappresenta un ottimo esempio di specie con comportamento di foraggiamento adattivo, il quale le permette di avvalersi di prede alternative qualora la disponibilità della sua preda principale sia ridotta (Kjellander and Nordström, 2003). La sua dieta, opportunistica e altamente variabile, si adatta alla disponibilità di prede presenti nell'ambiente (Larivière and Pasitschniak-Arts, 1996). In Europa i roditori rappresentano il cibo principale delle volpi, seguiti da piante, invertebrati, uccelli, lagomorfi, rettili e anfibi (Soe et al., 2017). La flessibilità alimentare ha favorito la recente espansione della specie anche in contesti urbani e periurbani (Contesse et al., 2004), dove negli ultimi decenni si è osservato un aumento significativo della densità e della distribuzione in numerosi paesi europei (Romig et al., 1999; Eckert et al., 2000; Vervaeke et al., 2005; Veronesi et al., 2014).

1.4.3 Il tasso europeo

Il tasso europeo rappresenta anch'esso una specie generalista e altamente adattabile (Feore and Montgomery, 1999; Kauhala and Auttila, 2010). La specie è relativamente comune in Europa, con densità più basse o presenza sporadica nei Paesi Bassi, Belgio, Estonia, Slovacchia e Polonia (Kranz et al., 2008). Tuttavia, nel corso del secolo scorso, sono state osservate significative fluttuazioni numeriche in diverse popolazioni, suscitando preoccupazioni a livello conservazionistico (Griffiths and Thomas, 1993). Pertanto, a partire dagli anni '70 e '80, il tasso ha ottenuto protezione legale in molti Stati europei, tra cui Regno Unito, Irlanda, Spagna, Portogallo, Italia, Belgio, Paesi Bassi, Albania, Grecia, Estonia, Lussemburgo e Ungheria (Griffiths, 1991). L'elevata adattabilità ecologica del tasso si riflette nella sua capacità di utilizzare habitat eterogenei, trovando rifugio in ambienti boschivi, siepi, aree rocciose e paesaggi agricoli frammentati. La dieta, anch'essa flessibile, è costituita principalmente da lombrichi — predati preferenzialmente quando disponibili — ma può includere anche piccoli vertebrati, insetti, cereali, frutta selvatica, noci e persino alimenti di derivazione antropica trovati nelle aree periurbane (Piza-Roca et al., 2015).

Diversi fattori ambientali e antropici influenzano la distribuzione e la dinamica spaziale del tasso in Europa. Tra questi, si segnalano il clima, le caratteristiche del terreno (quali tipo di suolo, pendenza, eterogeneità e copertura vegetale), la composizione dell'habitat (boschi, pascoli, colture come mais, grano e orzo) e la disponibilità di cibo (Kruuk, 1989; Feore and Montgomery, 1999). Le infrastrutture antropiche, in particolare le strade, contribuiscono alla distruzione dell'habitat e rappresentano una delle principali cause di mortalità per il tasso. Sebbene la caccia sia oggi vietata o strettamente regolamentata nella maggior parte dei paesi europei, in alcune aree è ancora praticata legalmente, e insieme al bracconaggio costituisce un ulteriore fattore di pressione per la specie (Piza-Roca et al., 2015).

1.5 Tecniche diagnostiche per la ricerca di *Babesia/Theileria*

La diagnosi microbiologica della babesiosi e della theileriosi si è storicamente principalmente fondata sull'osservazione microscopica dei parassiti in strisci di sangue periferico sottoposti a colorazione con il metodo May-Grünwald-Giemsa o analoghi, per facilitare l'identificazione dei parassiti. *Babesia* spp. si presenta tipicamente sotto forma di strutture ad anello all'interno degli eritrociti o come inclusioni piriformi caratterizzate da citoplasma di colore azzurro (vedi sezione 1.1.4, Figura 7). Tuttavia, la conferma diagnostica e la determinazione della specie protozoaria responsabile dell'infezione possono risultare complesse con tale metodica. Ad esempio, negli animali che superano la fase acuta della malattia, il numero di parassiti circolanti si riduce drasticamente, rendendone difficoltosa l'osservazione microscopica.

Oltre alla diagnosi diretta microscopica, altre tecniche diagnostiche largamente utilizzate sono le metodiche sierologiche per la ricerca di anticorpi. L'individuazione di animali portatori, che fungono da serbatoio dell'infezione, associata a strategie di controllo delle zecche, risulta infatti essenziale per l'attuazione di efficaci programmi di prevenzione delle malattie emoparassitarie. Sono state sviluppate diverse tecniche sierologiche per il rilevamento di anticorpi circolanti contro questi parassiti, tra cui la più usata è la metodica dell'immunofluorescenza indiretta (IFAT), dimostratosi utile per l'identificazione degli anticorpi specifici contro le specie del genere *Theileria* e *Babesia* (Leemans et al., 1997). Tuttavia, tali metodiche presentano alcune limitazioni, tra cui la possibilità di ottenere risultati falsi positivi o falsi negativi, dovuti rispettivamente a reazioni crociate o a una risposta immunitaria non sufficientemente specifica o non ancora sviluppatasi (Passos et al., 1998). Un'ulteriore criticità è rappresentata dall'incapacità di discriminare le infezioni pregresse da quelle in corso, compromettendo l'accuratezza della diagnosi.

Pertanto, l'impiego di tecniche biomolecolari per il rilevamento del DNA di *Babesia* e *Theileria* negli animali portatori risulta essenziale (Criado-Fornelio et al., 2009). Il materiale genetico dei parassiti, analogamente a tutti gli organismi eucariotici, è localizzato nel nucleo e nei mitocondri. Come in tutti gli esseri viventi, il genoma dei parassiti è strutturato in sequenze codificanti, generalmente presenti in singola copia, e sequenze non codificanti, generalmente in copie ripetute. L'applicazione di tecniche di biologia molecolare a fini diagnostici consente di rilevare specifiche regioni del DNA parassitario, nonché markers genetici, permettendo l'identificazione della specie in esame. Inoltre, tali metodiche possono essere impiegate per

discernere ceppi resistenti o suscettibili a diversi farmaci antiparassitari. Le peculiarità genetiche delle diverse specie parassitarie si rilevano soprattutto nelle sequenze ripetute del genoma (Nantulya, 1991). Pertanto, i geni localizzati nel DNA ribosomiale possono essere utilizzati per l'identificazione delle specie, rappresentando un valido strumento di caratterizzazione molecolare dei parassiti.

A tal scopo, la tecnica maggiormente utilizzata è la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) o reazione a catena della polimerasi. Si tratta di una reazione enzimatica che prevede la replicazione e quindi l'amplificazione di un tratto specifico di DNA (template), attraverso cicli termici ripetuti. Il processo ha inizio con l'ibridazione di due primers, sequenze oligonucleotidiche complementari alle estremità della regione bersaglio, i quali fungono da innesco per l'attività catalitica della DNA polimerasi, l'enzima responsabile della sintesi del nuovo filamento di DNA. La conferma del test viene poi raggiunta attraverso il sequenziamento degli ampliconi ottenuti.

La PCR è altamente sensibile e specifica poiché è in grado di identificare frammenti genomici caratteristici di specifici agenti patogeni, anche qualora il campione biologico di partenza contenga un numero limitato di molecole target. Per la diagnosi di malattie parassitarie, le reazioni di amplificazione vengono progettate per individuare sequenze di DNA specifiche del parassita appartenenti, ad esempio, al DNA ribosomiale. A tal proposito, la PCR convenzionale seguita dall'analisi elettroforetica su gel di agarosio è stata largamente utilizzata in numerosi studi (Bishop et al., 1992; Pienaar et al., 2011a).

Altri approcci includono la PCR-RFLP, che sfrutta l'azione di enzimi di restrizione per discriminare varianti genetiche (Bishop et al., 1992; Geysen et al., 1999; Heidarpour Bami et al., 2009; Zaeemi et al., 2011), e la nested-PCR, caratterizzata da una maggiore sensibilità grazie a un doppio ciclo di amplificazione (Odongo et al., 2010).

Ulteriori metodologie basate sulla PCR prevedono l'ibridazione con sonde marcate mediante radioisotopi, impiegando tecniche come il dot blotting, il capillary blotting o lo slot blotting (Bishop et al., 1992; Allsopp et al., 1993; Collins et al., 2002; Skilton et al., 2002). Un'evoluzione di questi approcci è rappresentata dal metodo del reverse line blot non radioattivo, che utilizza la chemiluminescenza per un rilevamento più efficiente (Gubbels et al., 1999; Schnittger et al., 2004). Più recentemente, questa tecnica è stata ulteriormente ottimizzata

attraverso l'impiego di array in sospensione basati su microsfere di DNA (Ros-García et al., 2012a; Ros-García et al., 2013).

L'innovazione tecnologica ha poi portato all'introduzione di sistemi diagnostici basati sulla Real-time PCR con sonde specifiche (Jeong et al., 2003; Kim et al., 2008; Sibeko et al., 2008; Bhoora et al., 2010a; Pienaar et al., 2011b; Pienaar et al., 2014; Ros-García et al., 2012b) e sulla Real-Time PCR con colorante intercalante SYBR Green (Pienaar et al., 2013). Parallelamente, sono stati introdotti metodi di amplificazione isoterma mediata da loop (LAMP), che offrono rapidità e semplicità di esecuzione (Alhassan et al., 2007a; Alhassan et al., 2007b; Liu et al., 2008; Liu et al., 2012; Liu et al., 2013; Salih et al., 2008; Salih et al., 2012; Thekiso et al., 2010; Wang et al., 2010a; Xie et al., 2013).

La Real-Time PCR consiste nell'analisi del genoma parassitario mediante la combinazione di sonde fluorogeniche che emettono un segnale fluorescente durante la reazione di amplificazione (Figura 11).

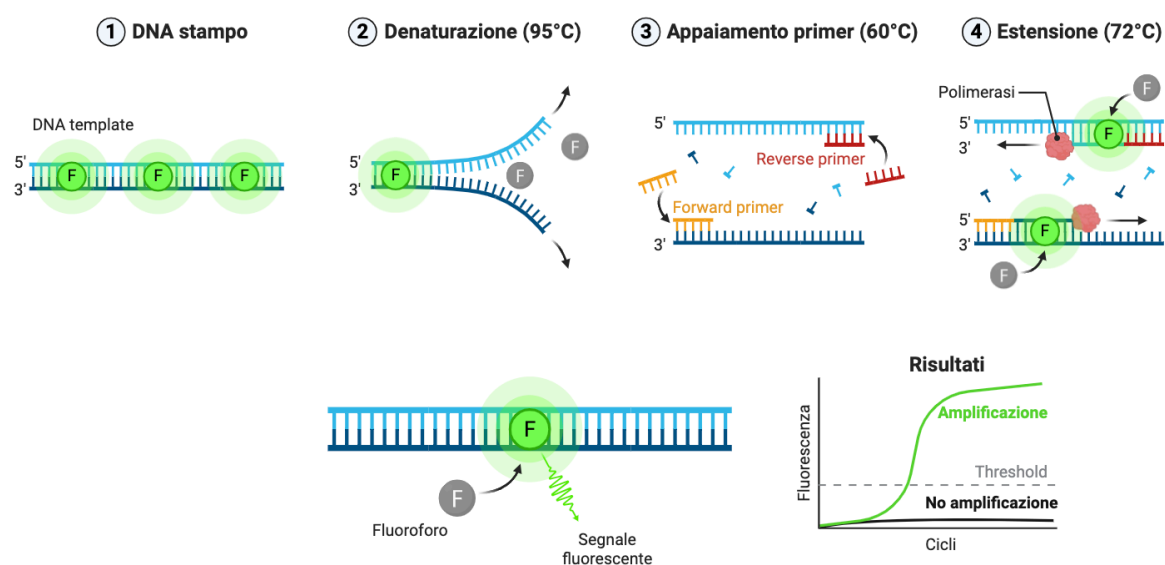


Figura 11 – Rappresentazione schematizzata del funzionamento della Real-Time PCR.

I vantaggi della RT-PCR rispetto alla PCR classica sono rappresentati dalla possibilità di visualizzazione in assenza di elettroforesi su gel, rapido rendimento, ridotto rischio di contaminazioni incrociate e risultati quantitativi oltre che qualitativi. Il segnale generato dalla reazione è proporzionale alla quantità di DNA target amplificato in tempo reale. Inoltre, la RT-PCR necessita di una quantità inferiore di materiale genetico di partenza rispetto alla PCR convenzionale, risultando pertanto generalmente più specifica. Tuttavia, questa tecnica presenta alcuni svantaggi, quali l'elevato costo dell'attrezzatura e dei reagenti.

Per l'identificazione di *Babesia* spp., molti saggi PCR mirano all'amplificazione del gene 18S rRNA (Kordick et al., 1999). Tali sequenze comprendono regioni ipervariabili e segmenti altamente conservati, permettendo così la rilevazione di numerose specie di *Babesia*. Tuttavia, considerate le differenze nella sequenza del gene 18S rRNA tra cladi filogeneticamente distanti, non si può escludere l'eventuale amplificazione di altri eucarioti.

A tal proposito e dunque al fine di amplificare selettivamente tutte le specie di *Babesia*, sono stati progettati nuovi saggi PCR che prendessero come target il genoma mitocondriale (mtDNA) del patogeno in questione, migliorando così la sensibilità diagnostica e incrementando le capacità di differenziazione e identificazione di *Babesia* spp (Quorollo et al., 2017).

Il DNA mitocondriale di *Babesia* può essere presente in un numero di copie superiore rispetto a quello nucleare, inoltre comprende geni altamente conservati a livello evolutivo, tra cui citocromo b (*cytb*), cicloossigenasi (*cox*) e DNA ribosomiale a subunità grande (*lsu*) (Wilson and Williamson, 1997). È stato dimostrato che l'impiego di target mitocondriali (mtDNA) in diversi saggi PCR di Apicomplexa, inclusi *Babesia* e *Theileria* spp., offre una sensibilità maggiore rispetto all'utilizzo del gene 18SrDNA (Schreeg et al., 2016; Isozumi et al., 2014).

Nello studio di Quorollo et al. (2017), dal quale è stato ottenuto uno dei protocolli molecolari impiegato in questa tesi ed in particolare i primers B-lsu F e B-lsu R2 (Tabella 2), sono state utilizzate una vasta gamma di sequenze mtDNA di *Babesia* per identificare una regione che comprende due ampi frammenti dei geni della subunità dell'RNA ribosomiale (*lsu5* e *lsu4*) (Hikosaka et al., 2010; Schreeg et al., 2016) (Figura 8). Lo scopo era quello di progettare un nuovo saggio di PCR quantitativa (LSU qPCR) in grado di amplificare numerose specie di *Babesia* partendo dall'allineamento di 13 sequenze mitocondriali quali: *B. bovis* (AB499088), *B. bigemina* (AB499085), *B. caballi* (AB499086), *B. coco* (KC207824), *B. canis* (KC207822), *B. rossi* (KC207823), *B. vogeli* (KC207825), *B. conradae* (KC207826), *B. divergens* (LK935355), *B. gibsoni* (AB499087), *B. microti* tipo II (AB624354), *B. microti* tipo IV (AB624356) e *B. microti-like* (KC207827).

Tabella 2 – Sequenze dei primers per il genere *Babesia* tratte dall'articolo Quorollo et al. (2017) ed utilizzati in questo lavoro di tesi.

Nome del primer	Target genico	Sequenza (5'-3')
B-lsu-F	<i>Babesia lsu-5-lsu4</i>	ACCTGTCAARTTCCTTCACTAAMTT
B-lsu-R2	<i>Babesia lsu-5-lsu4</i>	TCTTAACCCAACTCACGTACCA

2. SCOPO DELLA TESI

Più del 70% delle malattie infettive emergenti di origine zoonotica a livello globale proviene dalla fauna selvatica, con un impatto crescente sulla salute umana e animale (Jones et al., 2008). L'aumento del contatto tra uomo, animali domestici e fauna selvatica — dovuto a progressiva urbanizzazione, crescita demografica e distruzione degli habitat naturali — è ritenuto un fattore chiave nell'insorgenza di nuovi patogeni (Mackenstedt et al., 2015).

Il cinghiale (*Sus scrofa*) è una specie selvatica con abbondanza e distribuzione geografica in continua crescita (Matei et al., 2023). È presente in una vasta gamma di habitat e, di recente, ha colonizzato anche gli ambienti urbani e periurbani di diverse città europee (Licoppe et al., 2013). Analogamente, anche le popolazioni di carnivori sono in crescita, e si sono dimostrati capaci di colonizzare un ampio spettro di habitat, incluse le aree in prossimità degli insediamenti umani (Veronesi et al., 2023).

In Europa, carnivori selvatici come la volpe rossa, il tasso europeo e il lupo grigio sono ampiamente distribuiti, anche in aree antropizzate (Spagnesi and De Marinis, 2002; Bateman and Fleming, 2012; Chapron et al., 2014).

L'espansione e l'urbanizzazione delle popolazioni selvatiche vengono considerate fattori di rischio per la trasmissione di patogeni zoonotici, come quelli trasmessi da zecche (Kilpatrick and Randolph, 2012). Tra questi, gli emoparassiti dei generi *Babesia* e *Theileria* sono noti per l'infezione di animali domestici e selvatici in tutto il mondo (Alvarado-Rybak et al., 2016; Solano-Gallego et al., 2016). Inoltre, alcune specie sono zoonotiche e rappresentano pertanto un rischio per la salute umana (Bajer et al., 2022)

Le indagini condotte in Europa su tali patogeni nei cinghiali sono poco numerose, e pertanto il ruolo epidemiologico di questa specie non è ancora ben chiarito (Hrazdilová et al., 2021). Diversamente, il ruolo dei carnivori selvatici come serbatoi di questi protozoi è stato maggiormente documentato (Alvarado-Rybak et al., 2016).

La crescente incidenza delle malattie trasmesse da zecche (TBD) è il risultato di una complessa interazione di fattori, come le alterazioni climatiche e l'elevata densità di ospiti suscettibili

(Ogden et al., 2021). In particolare, le piroplasmosi determinano rilevanti perdite economiche a livello globale, principalmente a causa della diminuzione della produzione di carne e latte da parte degli animali colpiti (Caracappa, 1999). Ad aggravare l'impatto economico si aggiungono ulteriori costi derivanti sia dalla mortalità diretta che dalle spese associate alle terapie necessarie (De Castro et al., 1985; Sevinc et al., 2007). Inoltre, la presenza di animali portatori asintomatici rappresenta un fattore di rischio per la diffusione delle infezioni verso aree generalmente considerate non endemiche, in associazione con la movimentazione internazionale di animali e l'esistenza di vettori idonei alla trasmissione di tali patogeni (Savini et al., 1999).

Considerato l'impatto significativo di tali infezioni sulla salute animale e il potenziale zoonotico di alcune specie, e considerata la scarsa presenza di informazioni sull'epidemiologia dei piroplasmidi nella fauna selvatica in Italia nord-occidentale – specialmente nel cinghiale – (Tampieri et al., 2008; Zanet et al., 2014), obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di indagare la prevalenza dell'infezione da piroplasmidi (*Babesia* spp. e *Theileria* spp.) nel cinghiale e in carnivori selvatici cacciati o accidentalmente rinvenuti morti nelle regioni Liguria, Piemonte e Valle d'Aosta.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Raccolta dei campioni

I campioni inclusi nello studio sono stati ottenuti da esemplari soggetti ad abbattimento venatorio, o da carcasse di animali accidentalmente rinvenuti morti, conferiti presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZSPLV) nell'ambito del piano di sorveglianza ed eradicazione della peste suina africana o del progetto di ricerca finalizzata GR-2021-12374932. Nel dettaglio, i campioni liguri sono stati conferiti e campionati presso tutte le sezioni regionali (Imperia, Savona, Genova, La Spezia), quelli piemontesi presso la sede di Torino e quelli della Valle d'Aosta presso il Centro di riferimento delle malattie degli animali selvatici (CERMAS). I campioni sono stati successivamente inviati alla sezione di Genova dell'IZSPLV, dove sono state condotte le successive procedure analitiche. I soggetti analizzati comprendono ungulati e carnivori selvatici provenienti dalle regioni di competenza territoriale dell'IZSPLV (Liguria, Piemonte e Valle d'Aosta) (Figura 12).

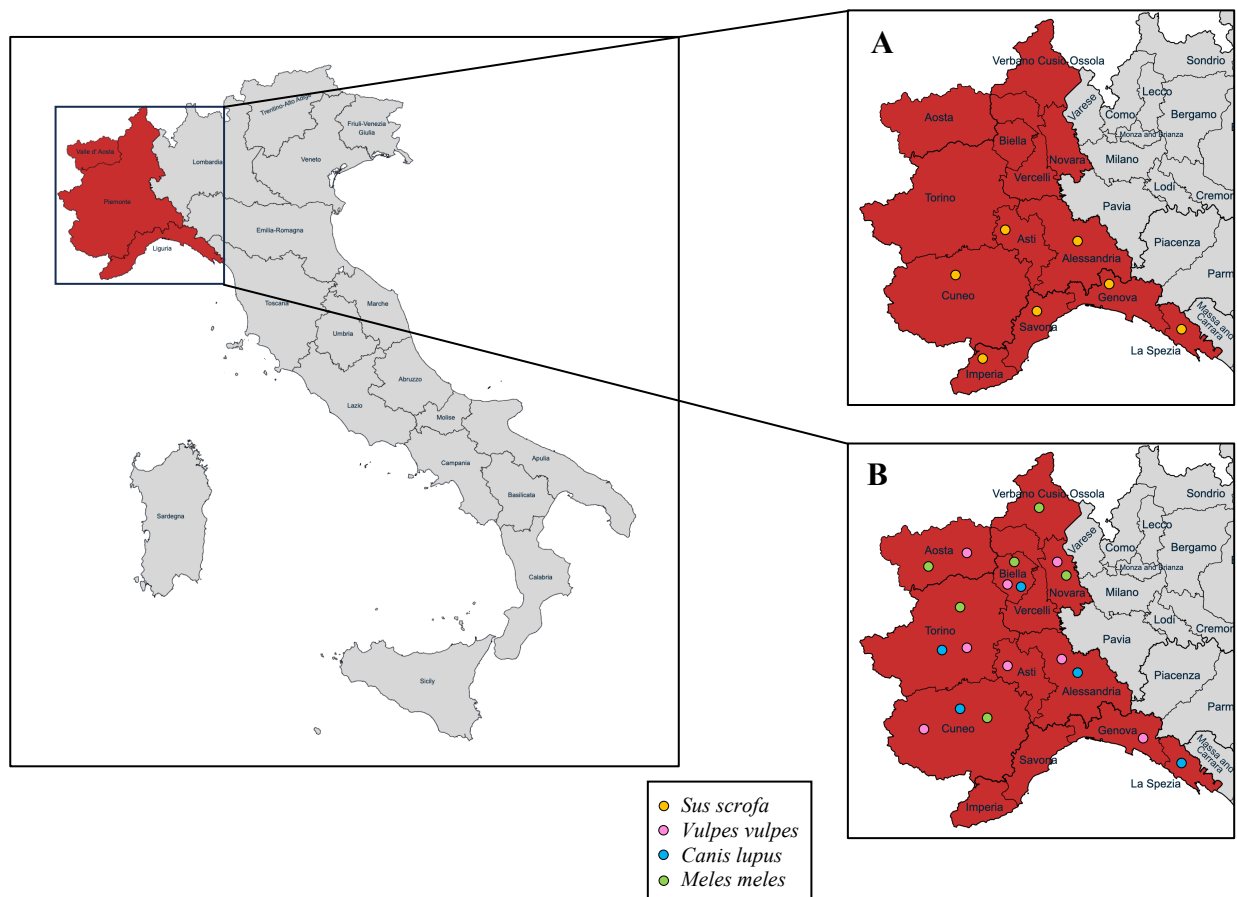


Figura 12 – Mappa dei siti di campionamento della fauna selvatica. **(A)** Province di raccolta dei campioni di cinghiali. **(B)** Province di raccolta dei campioni di carnivori.

Nello specifico è stato campionato il tessuto splenico di 1654 cinghiali (*Sus scrofa*), 97 volpi rosse (*Vulpes vulpes*), 45 tassi europei (*Meles meles*), 9 lupi grigi (*Canis lupus*), 1 lontra europea (*Lutra lutra*) e 13 faine (*Martes foina*) (Tabella 3). I dettagli della provenienza di ciascuna specie sono riportati in Tabella 3.

Tabella 3 – Fauna selvatica campionata con relative regioni e province italiane di provenienza.

REGIONE	PROVINCIA	ANIMALI SELVATICI CAMPIONATI					
		<i>Sus scrofa</i>	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Canis lupus</i>	<i>Meles meles</i>	<i>Martes foina</i>	<i>Lutra lutra</i>
Liguria	Genova	274	10	0	1	0	0
	La Spezia	234	0	1	0	0	0
	Imperia	16	0	0	0	0	0
	Savona	529	0	0	0	0	0
Piemonte	Torino	0	9	4	6	1	0
	Alessandria	170	5	1	0	0	0
	Asti	300	2	0	0	0	0
	Novara	0	2	0	1	0	0
	Biella	0	2	1	3	0	0
	Cuneo	131	10	2	3	0	0
	Verbano-Cusio-Ossola	0	0	0	2	0	0
Valle d'Aosta	Aosta	0	57	0	29	12	1
TOTALE		1654	97	9	45	13	1

3.2 Prelievo dell'aliquota analitica, lisi del tessuto ed estrazione del DNA

Materiali utilizzati:

- DPI monouso (camice, guanti, calzari)
- Pinze, bisturi e forbici sterili
- Pipette sterili
- Puntali sterili dotati di filtro
- Provette sterili di tipo Eppendorf da 1,5 mL e 2 mL
- Rack per supporto provette
- Biglie metalliche di acciaio inossidabile da 5 mm

Reagenti e strumenti utilizzati:

- PBS (tampone fosfato salino) sterile a pH 7,2
- Lysis buffer
- Proteinasi K
- Tissue lyser
- Centrifuga
- Vortex
- ThermoMixer C (Eppendorf)
- Kit Maxwell RSC Viral TNA (Promega)
 - Cartucce contenenti lysis buffer e biglie magnetiche (una per campione)
 - Lysis buffer
 - Acqua per biologia molecolare
 - Puntali appositi (uno per campione)
- Estrattore automatico Maxwell RSC 48 (Promega)

Tutte le operazioni relative al prelievo e alla manipolazione dei campioni sono state effettuate rigorosamente sotto cappa di sicurezza biologica di classe II, indossando i DPI (dispositivi di protezione individuale) monouso quali camice, guanti e calzari.

Per ciascun tessuto di milza esaminato, è stata rimossa una porzione di 2-3 mm³ con l'aiuto di un bisturi sterile (Figura 13). Questa è stata poi introdotta in una provetta di tipo Eppendorf da 2 mL e sono stati aggiunti 300 µl di PBS sterile. Al contempo è stato preparato il controllo di estrazione negativo aggiungendo 300 µl di PBS sterile ad una nuova provetta da 2 mL.

Attraverso l'ausilio di una pinza sterile, in tutte le provette (campioni e controllo negativo) è stata introdotta una singola biglia magnetica; successivamente queste sono state processate in TissueLyser LT (QIAGEN) a 40 Hz per 2 minuti al fine di ottenere il disgregamento del tessuto (digestione meccanica). Dopo una rapida centrifugazione, 300 μ l della soluzione ottenuta sono stati trasferiti in nuove provette alle quali sono stati poi aggiunti 300 μ l di lysis buffer e 30 μ l di proteinasi K. Infine, le provette sono state vortexate e poste in agitazione nel ThermoMixer C (Eppendorf) a 70°C per 30 minuti, secondo procedura (digestione enzimatica).

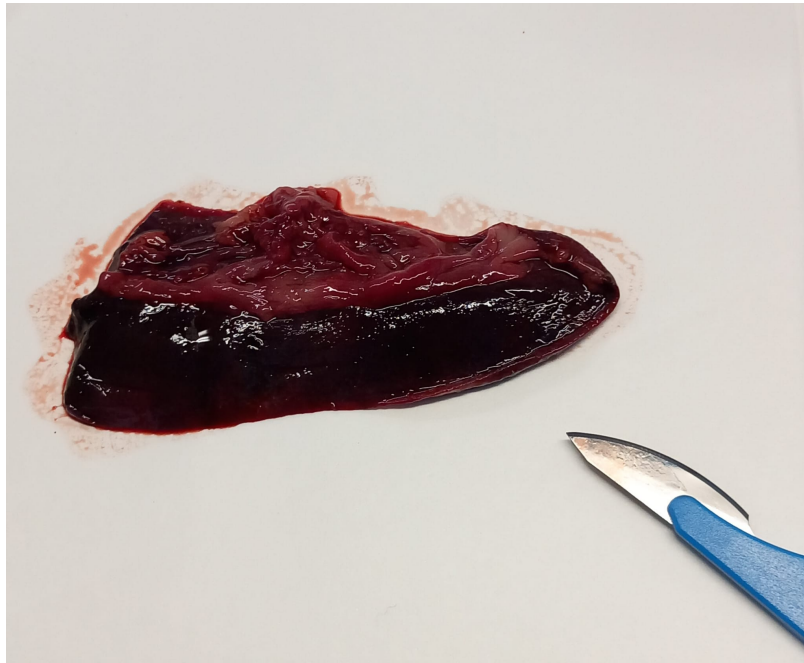


Figura 13 – Tessuto splenico di cinghiale campionato attraverso l'uso di un bisturi sterile.

Tutti i passaggi relativi al campionamento e alla preparazione dei campioni sono stati schematizzati in Figura 14.

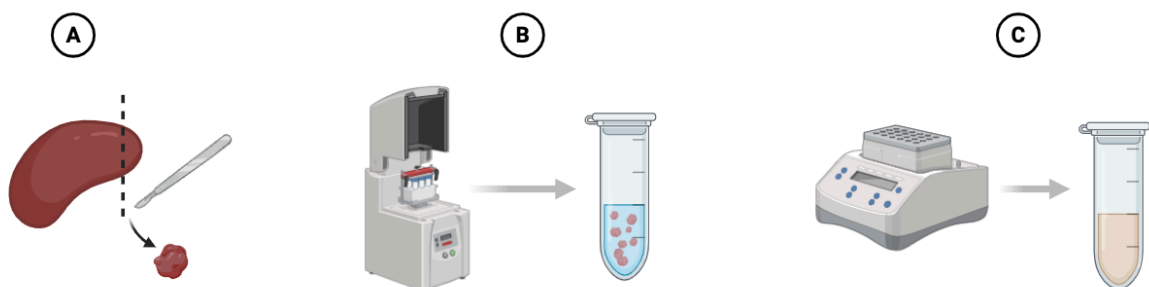


Figura 14 – Rappresentazione schematizzata del prelievo e della preparazione all'estrazione dei campioni esaminati. **(A)** Rimozione di una porzione di 2-3 mm³ di tessuto splenico attraverso l'utilizzo di un bisturi sterile. **(B)** Digestione meccanica del campione effettuata tramite TissueLyser LT (QIAGEN). **(C)** Digestione enzimatica del campione eseguita attraverso ThermoMixer C (Eppendorf).

Le successive operazioni sono state condotte in condizioni di sterilità e sicurezza nei locali dedicati.

Per l'estrazione del DNA è stato utilizzato il kit "Maxwell RSC Viral TNA" della ditta Promega, seguendo le istruzioni operative indicate dal produttore nel manuale d'uso specifico. Sotto cappa chimica, i campioni sono stati caricati nei pozzetti dedicati della cartuccia e nelle provette vuote fornite sono stati aggiunti 100 µl di acqua per biologia molecolare. Dopodiché le cartucce sono state processate dall'estrattore automatico Maxwell per 30 minuti selezionando previamente l'apposito programma, come indicato nelle istruzioni fornite dal produttore. Al termine dell'operazione gli estratti sono stati processati subito oppure conservati a 5°C per 24-48 ore o a -20°/-80 °C per periodi più lunghi.

Tutti i campioni di cinghiale inclusi nello studio sono stati testati per la Peste Suina Africana (PSA), utilizzando un kit ID VET (<https://www.innovative-diagnostics.com/produit/id-gene-african-swine-fever-duplex/>) che prevede l'amplificazione di un controllo endogeno, rappresentato da un frammento genico della β -actina. Sono stati considerati validi – e quindi sottoposti ad analisi PCR per la ricerca di *Babesia/Theileria* – esclusivamente i campioni che mostravano amplificazione di tale gene, e pertanto l'effettiva estrazione del DNA e la sua integrità.

Inoltre, i campioni sono stati quantificati mediante microspettrofotometro *Nanodrop* ed opportunamente diluiti laddove necessario.

3.3 Real-time PCR (qPCR)

3.3.1 Preparazione della mix di reazione

Per il presente studio è stato applicato un protocollo molecolare basato su PCR real-time quantitativa, utilizzando il metodo SYBR Green.

Materiali utilizzati:

- DPI monouso (camice, guanti)
- Pipette sterili
- Puntali sterili dotati di filtro
- Provette sterili di tipo Eppendorf da 1,5 mL e da 2 mL
- Rack per supporto provette
- Micropiastre per PCR da 96 pozzetti
- Tappi ottici

Reagenti e strumenti utilizzati:

- Acqua per biologia molecolare
- Sso Fast Evagreen Supermix 2x (BioRad)
- Primers (forward e reverse)
- DNA estratto da *Babesia/Theileria*
- Vortex
- Centrifuga
- Termociclatore Real Time CFX96
- Computer

Nella fase iniziale dello studio sono state eseguite delle prove di amplificazione su campioni noti positivi (DNA di *Babesia e Theileria* estratto da campioni organici – sangue – di cane e di cavallo) e negativi. In questa fase, e nell'analisi dei primi campioni di milza di cinghiale, sono state testate due coppie di primers descritte da due diversi autori (Beck et al., 2009; Quorollo et al., 2017). Pertanto, i saggi di Real-Time PCR sono stati eseguiti sfruttando l'ibridazione molecolare dei primers Mic1 (GTCTTGTAATTGGAATGATGG) e Mic2 (CCAAAGACTTTGATTTCTCTC) descritti da Beck et al. (2009) e, successivamente, dei

primers B-lsu-F (ACCTGTCAARTTCCTTCACTAAMTT) e B-lsu-R2 (TCTTAACCCAACTCACGTACCA) descritti da Qurollo et al. (2017).

Per le reazioni è stato utilizzato il reagente per qPCR SsoFast EvaGreen Supermix 2x (BioRad). I reagenti sono stati previamente scongelati e la mix di reazione è stata preparata sotto cappa, in condizioni di sterilità, in un locale appositamente dedicato. La mix di reazione è stata preparata con un volume totale di 25 μ l, costituita da 20 μ l di mix e 5 μ l di DNA. Nel dettaglio, la mix di reazione è composta da 2,5 μ l di acqua per biologia molecolare, 12,5 μ l di Sso Fast Evagreen Supermix 2x (BioRad) e 2,5 μ l di primers forward e reverse, come riportato in Tabella 4.

Tabella 4 – Protocollo di preparazione della mix di reazione.

Reagenti	x 1 campione
Acqua per biologia molecolare	2,5 μ l
Sso Fast Evagreen Supermix 2x	12,5 μ l
Primer forward (10 μ M)	2,5 μ l
Primer reverse (10 μ M)	2,5 μ l

La mix ottenuta è stata poi vortexata e centrifugata per qualche secondo in modo tale da omogenizzare il contenuto. Sono stati dispensati nella micropiastra 20 μ l di mix per ciascun campione, includendo i controlli positivi ai patogeni e il controllo negativo. In un'ulteriore zona dedicata, sotto cappa chimica, sono stati dispensati 5 μ l di ciascun campione e controllo positivo, seguendo lo schema della piastra prestabilito. Per il controllo negativo sono stati dispensati 5 μ l di acqua per biologia molecolare, per un totale di 25 μ l in ogni pozzetto. La micropiastra è stata poi chiusa con gli appositi tappi ottici e centrifugata a 3000 rpm per qualche minuto al fine di eliminare eventuali bolle d'aria.

3.3.2 Amplificazione ed analisi dei dati

Per il processo di amplificazione è stato impiegato il termociclatore Real Time CFX96 (BioRad) e il computer ad esso collegato.

La micropiastra è stata sistemata nello strumento secondo la disposizione prevista dallo schema prestabilito. Il protocollo di amplificazione può variare a seconda dei primers utilizzati per la reazione, pertanto, per le due differenti coppie di primers, il programma di PCR è stato impostato secondo i passaggi descritti in Tabella 5. Il primo step (98°C per 2 minuti), necessario per l'attivazione dell'enzima e la denaturazione iniziale del DNA, è stato seguito da 40 cicli costituiti ciascuno da denaturazione ed appaiamento-estensione. Alla fine dei 40 cicli è stata effettuata un'analisi della curva di melting effettuata da 65°C a 95°C, con un aumento della temperatura di 0,5°C ogni 3 secondi.

Tabella 5 – Protocollo di amplificazione.

	Mic1 e Mic2		B-lsu-F e B-lsu-R2	
	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo
Attivazione enzima e denaturazione iniziale	98°C	2 minuti	98°C	2 minuti
Denaturazione	98°C	5 secondi	98°C	15 secondi
Appaiamento-estensione	55°C	5 secondi	60°C	15 secondi
Analisi curva di melting	65-95°C	0,5°C ogni 3 secondi	65-95°C	3 secondi

I dati riportati dal computer collegato al termociclatore sono stati successivamente analizzati, prestando particolare attenzione ai grafici relativi alla curva di melting.

Sono stati considerati positivi i campioni che hanno mostrato un picco della curva di melting (temperatura di melting) in corrispondenza di quello mostrato dai controlli positivi, e che presentavano una fluorescenza al di sopra della linea di *threshold*.

Sono stati considerati negativi i campioni che non hanno mostrato un picco di melting o il cui picco era spostato o la fluorescenza non superava la linea di *threshold*.

3.4 PCR end-point e sequenziamento di Sanger

Il DNA dei campioni risultati positivi o dubbi all'analisi in real-time PCR è stato sottoposto a PCR end point (su termociclatore Biorad T100) utilizzando i primers Mic1 e Mic2, con il seguente protocollo di amplificazione: 95°C per 5 minuti, seguito da 40 cicli di: 95°C per 30 secondi, 50°C per 30 secondi, 72°C per 60 secondi; infine, 72°C per 7 minuti.

I prodotti di PCR sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel d'agarosio al 2% e gli ampliconi di dimensione attesa sono stati inviati al sequenziamento Sanger presso Eurofins genomics (<https://eurofinsgenomics.eu/>). Tale approccio prevede che il DNA amplificato venga ibridato ad un primer e poi allungato dall'enzima DNA polimerasi, il quale unisce un mix di 4 deossinucleotidi trifosfati (dNTP) o dideossinucleotidi trifosfati a catena terminale (ddNTP). L'incorporazione di questi provoca l'arresto dell'allungamento da parte dell'enzima e dunque la generazione di frammenti di DNA con varie lunghezze (Sanger and Coulson, 1975; Sanger et al., 1977). Le sequenze ottenute sono state editate in BioEdit e sottoposte ad analisi BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) per confrontarle con le sequenze disponibili nel database NCBI.

3.5 Analisi statistica

Per il cinghiale la numerosità campionaria è stata calcolata considerando una prevalenza del 6% (SgROI et al., 2023), un margine di errore del 2% e un livello di confidenza del 95%, ottenendo un valore di almeno 542 animali per regione. Per le altre specie, non oggetto di abbattimento, è stato condotto un campionamento opportunistico e sono stati analizzati tutti i soggetti disponibili. Laddove possibile sono stati calcolati la prevalenza e l'intervallo di confidenza al 95%.

4. RISULTATI

Nell'ambito di questo lavoro di tesi sono stati campionati ed analizzati 1819 campioni di tessuto splenico di cinghiale e carnivori selvatici. Nel dettaglio, sono stati campionati in totale 1654 esemplari di cinghiale, di cui 1053 dalla regione Liguria e 601 dalla regione Piemonte (Tabella 7). Inoltre, sono stati analizzati 165 carnivori selvatici provenienti dalle regioni Liguria, Piemonte e Valle d'Aosta (Tabella 7).

Sono stati classificati come positivi alla qPCR i campioni che presentavano una curva di melting coincidente con il controllo positivo, alla medesima temperatura di melting e che superavano la linea di *threshold* prima del 38° ciclo. Tutti questi campioni sono stati successivamente sottoposti a PCR endpoint e, in caso di amplificazione di un frammento di lunghezza attesa, inviati al sequenziamento per conferma e identificazione a livello di specie.

Le Figure 15 e 16 mostrano due esempi di curve di melting – e i relativi picchi – ottenute dall'analisi simultanea di più campioni. In Figura 15 si osservano due picchi parzialmente sovrapposti, con temperatura di melting uguale e rappresentano rispettivamente il campione positivo e il suo controllo. La Figura 16, invece, mostra un set di campioni risultati negativi, rappresentati da curve piatte e privi di picchi significativi sopra la linea di *threshold*.

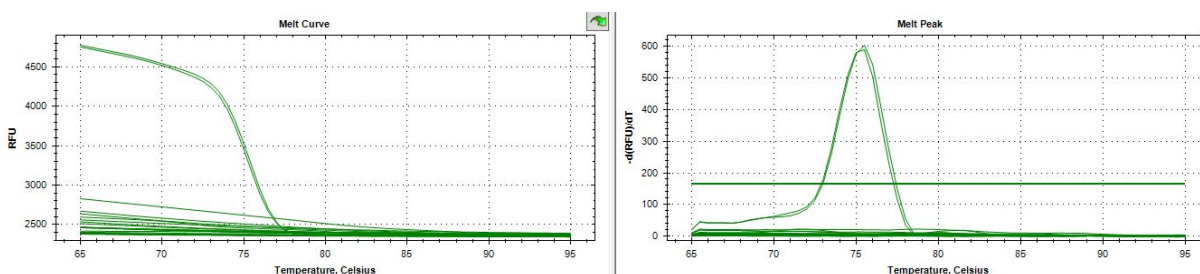


Figura 15 – Rappresentazione grafica della positività di un campione del set analizzato. Notare le curve di melting (a sinistra) e i picchi (a destra) parzialmente sovrapposti.

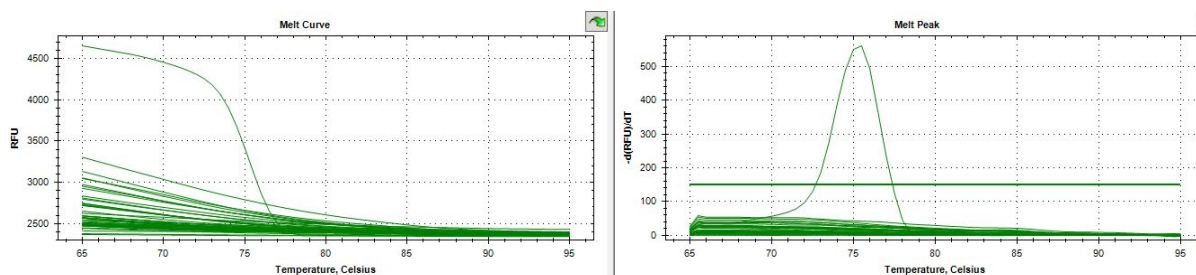


Figura 16 – Rappresentazione grafica della negatività del set di campioni analizzati. Notare l'assenza di curve significative (a sinistra) e di picchi (a destra) coincidenti con quello del controllo positivo.

Nessun cinghiale è risultato positivo all'analisi molecolare mediante Real-Time PCR per la ricerca di DNA di *Babesia/Theileria* (Tabella 6).

Diversamente, nei carnivori selvatici sono state rilevate delle positività a *Babesia* spp. mediante Real-Time PCR (Tabella 6 e 7).

Il sequenziamento ha permesso l'identificazione di alcune specie di *Babesia* nei campioni risultati positivi allo screening molecolare, mentre non è stata riscontrata alcuna positività per *Theileria* spp. Nello specifico, il DNA di *B. canis* è stato rilevato in 2 lupi, il DNA di *B. vulpes* in 3 volpi e il DNA di *B. type badger* in 4 tassi (Tabella 7).

Tabella 6 - Risultati Real-Time PCR e sequenziamento dei campioni positivi a *Babesia* spp.

Campioni totali	Real-Time PCR		Sequenziamento Sanger
	Negativi	Positivi	
<i>Sus scrofa</i> (n = 1654)	1654	0	/
<i>Canis lupus</i> (n = 9)	7	2	<i>B. canis</i>
<i>Vulpes vulpes</i> (n = 97)	94	3	<i>B. vulpes</i>
<i>Meles meles</i> (n = 45)	41	4	<i>B. type badger</i>
<i>Lutra lutra</i> (n = 1)	1	0	/
<i>Martes foina</i> (n = 13)	13	0	/

I risultati ottenuti hanno permesso di calcolare la prevalenza di *Babesia* spp. in ciascuna specie ospite esaminata. La stima della prevalenza è stata effettuata distintamente per specie e per area geografica, con un intervallo di confidenza al 95% (Tabella 7).

Tabella 7 – Prevalenza di *Babesia* spp. nelle diverse specie ospite e relative regioni di provenienza.

Specie ospite	Località	Numero testati	Numero positivi	Prevalenza per regione (IC al 95%)	Prevalenza per specie (IC al 95%)
<i>Sus scrofa</i>	Liguria	1053	0	0 %	0%
	Piemonte	601	0	0 %	
<i>Canis lupus</i>	Liguria	1	0	0 %	22,2% (0-49,4%)
	Piemonte	8	2	25% (3-65%)	
<i>Vulpes vulpes</i>	Liguria	10	0	0 %	3,1% (0-6,5%)
	Piemonte	30	2	6,7% (0,8-22,1%)	
	Valle d'Aosta	57	1	1,7% (0-9,4%)	
<i>Meles meles</i>	Liguria	1	0	0 %	8,9% (0,6-17,2%)
	Piemonte	15	3	20% (4,3-48,1%)	
	Valle d'Aosta	29	1	3,4% (0-17,8%)	
<i>Lutra lutra</i>	Valle d'Aosta	1	0	0%	0%
<i>Martes foina</i>	Piemonte	1	0	0%	0%
	Valle d'Aosta	12	0	0%	

La Figura 17 riporta i risultati dell'indagine molecolare effettuata sulle diverse specie di carnivori selvatici, evidenziando la distribuzione dei campioni positivi e negativi per la presenza di *Babesia* spp.

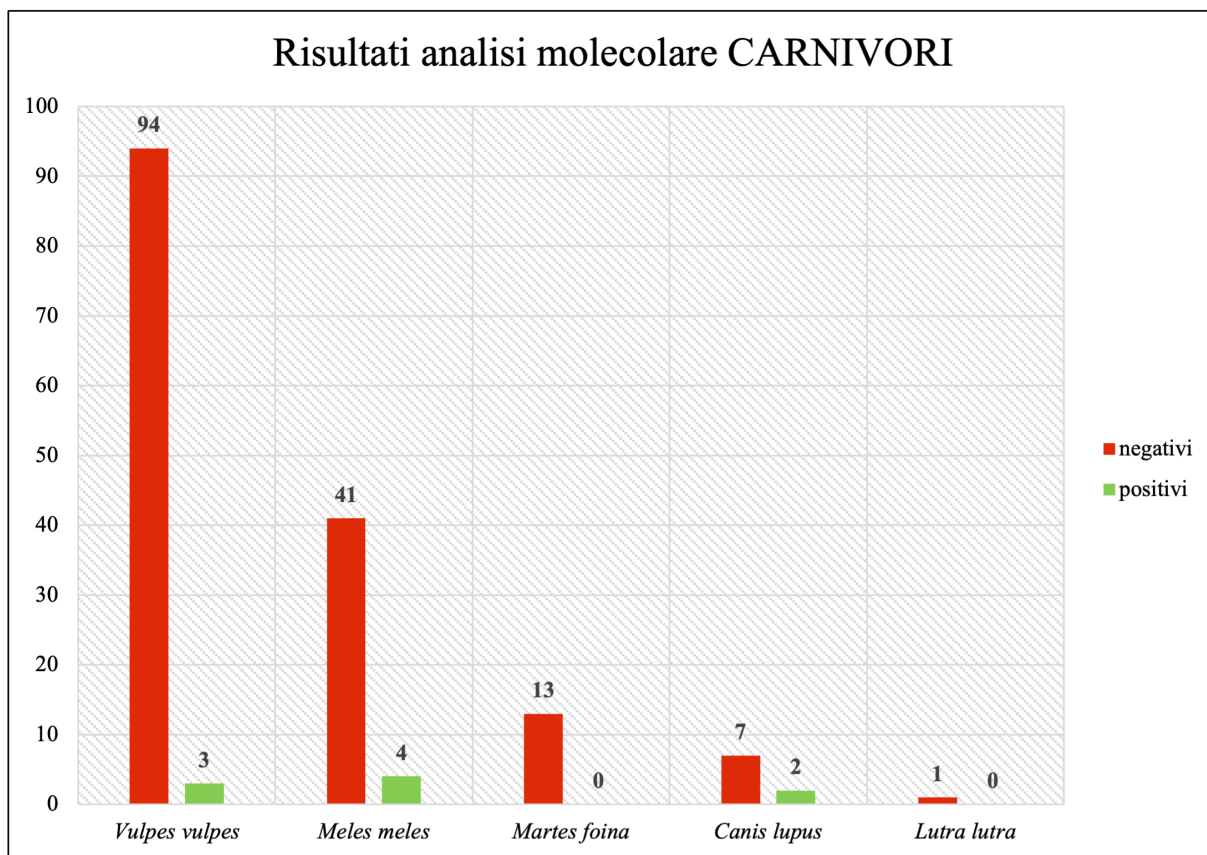


Figura 17 – Risultati dell'analisi molecolare per la rilevazione di *Babesia* spp. nei campioni provenienti da carnivori selvatici. I valori indicano il numero di soggetti risultati positivi (in verde) e negativi (in rosso) per ciascuna specie ospite.

5. DISCUSSIONE

I piroplasmidi sono emoparassiti comunemente rilevati nella fauna domestica e selvatica a livello globale e stanno acquisendo crescente importanza anche per la rilevanza zoonotica di alcune specie, potenziali responsabili di malattie trasmesse da zecche (TBD) (Herwaldt et al., 2003; Homer et al., 2000; Schorn et al., 2011).

I generi *Babesia* e *Theileria*, noti per l'impatto economico nel settore zootecnico e per la loro rilevanza veterinaria, comprendono infatti anche alcune specie zoonotiche per le quali la fauna selvatica può fungere da serbatoio (Yabsley and Shock, 2013). L'incremento delle interazioni tra uomo e fauna selvatica, favorito da cambiamenti socio-economici, ha determinato un aumento del rischio di trasmissione di patogeni zoonotici (Tampieri et al., 2008). Questo vale in particolare per i patogeni trasmessi da vettori, la cui diffusione è stata agevolata sia dai cambiamenti climatici che da modificazioni ambientali e dalla distribuzione degli ospiti (Semenza and Menne, 2009; Daszak et al., 2000).

In questo studio, i campioni splenici di cinghiali e carnivori selvatici dell'Italia nord-occidentale sono stati sottoposti a un'indagine molecolare per la ricerca del DNA di *Babesia* spp. e *Theileria* spp.

Sebbene le analisi molecolari siano state condotte su un numero elevato di cinghiali, i nostri risultati suggeriscono l'assenza di infezioni da piroplasmidi nei cinghiali provenienti dal territorio delle regioni Liguria e Piemonte. Tale dato entra in contrasto con quanto riportato nello studio di Zanet et al. (2014), nel quale è stata rilevata una prevalenza di *Babesia/Theileria* pari al 4,67% (n = 12/257) nelle milze di cinghiali presenti sulle Alpi italiane. In due esemplari è stato possibile identificare la specie, ovvero *B. bigemina*, nota per infettare solitamente il bestiame domestico. Pertanto, la sua presenza nei cinghiali indica una possibile interazione tra fauna selvatica e animali domestici (Zanet et al., 2014). A supporto dei risultati dello studio di Zanet et al. (2014), un ulteriore studio nell'Italia settentrionale e centrale aveva già registrato la presenza di *Theileria* spp. in campioni di sangue del 2,6% dei cinghiali analizzati (n = 3/117) (Tampieri et al., 2008). Un recente lavoro ha inoltre dimostrato per la prima volta la presenza di *B. vulpes* e *B. capreoli* in campioni di milza di cinghiali presenti nel sud Italia (SgROI et al., 2023). Nello specifico, su 243 esemplari, 15 sono risultati positivi a *Babesia/Theileria* spp., di cui 13 a *B. vulpes* e 2 a *B. capreoli*.

Secondo quanto riportato in letteratura per il resto dell'Europa, è stata documentata la presenza di *Theileria* spp. in campioni di sangue di cinghiale ($n = 3/65$) in Portogallo (Pereira et al., 2016) e in Repubblica Ceca, dove è stato rilevato un singolo caso di *B. divergens* su 550 campioni di sangue analizzati (Hrazdilová et al., 2021).

Tuttavia, i nostri risultati negativi si trovano in accordo con uno studio recente condotto in Romania (Matei et al., 2023), il quale non ha registrato alcuna positività a *Babesia* spp. nei campioni di sangue di 203 cinghiali testati.

La scarsità di rilevamenti nonostante l'impiego di tecniche diagnostiche molecolari sensibili, quali qPCR e PCR convenzionale (Hrazdilová et al., 2021; Hrazdilová et al., 2019), potrebbe essere attribuita a una reale bassa prevalenza e intensità parassitaria, ma anche al numero limitato di soggetti analizzati in molti studi (spesso inferiore a 100) (Silaghi et al., 2014; Hornok et al., 2018; Kazimírová et al., 2018). Tuttavia, il potenziale ruolo epidemiologico del cinghiale nella diffusione dei piroplasmidi in Europa deve comunque essere monitorato. Infatti, la sua elevata densità in alcune aree (Pittiglio et al., 2018), l'espansione geografica (Fulgione et al., 2022) e la sovrapposizione spaziale con altre specie selvatiche potrebbero aumentare il rischio di infestazione da zecche e favorire la trasmissione di questi emoparassiti (Tampieri et al., 2008). Nonostante la negatività dei campioni analizzati in questo lavoro di tesi, la rilevazione di specie appartenenti ai generi *Babesia* e *Theileria* nei cinghiali nei sopra citati studi, evidenzia la necessità di indagare ulteriormente il potenziale ruolo di questa specie selvatica come serbatoio di piroplasmidi. Le interazioni ecologiche tra cinghiali, fauna selvatica e animali domestici possono facilitare la diffusione di questi emoparassiti, con possibili conseguenze per la salute animale e, in prospettiva, anche per quella umana. Alla luce di ciò, si conferma la necessità di ulteriori studi mirati a chiarire il contributo epidemiologico del cinghiale nella trasmissione di questi patogeni e a valutare i rischi associati in ambito veterinario e di sanità pubblica.

Inoltre, il presente lavoro ha permesso di indagare il ruolo dei carnivori selvatici come serbatoi per i patogeni in questione, anche se per questa categoria il numero di soggetti analizzati è inferiore e per alcune specie limitato. I nostri risultati hanno fornito informazioni aggiornate riguardo alla presenza di *Babesia* spp. in alcuni carnivori selvatici dell'Italia nord-occidentale. In particolare, è stato possibile identificare *B. vulpes* nelle volpi rosse, *B. canis* nei lupi grigi e *B. type badger* nei tassi europei, diversamente da quanto riportato nei risultati di Zanet et al. (2014), i quali non hanno segnalato la presenza di *B. canis* nel lupo ($n = 0/7$), mentre *B. vulpes* è stata rilevata nella volpe, seppur in un numero molto ridotto ($n = 2/205$).

Per quanto riguarda *B. vulpes*, il DNA è stato ritrovato in 3 esemplari di volpe rossa su 97 analizzati (3,1%). *B. vulpes* (precedentemente definito *Theileria annae*) è stata rinominata di recente (Baneth et al., 2015) ed è stata documentata nei cani in diversi paesi europei (Baneth et al., 2015; Solano-Gallego et al., 2016; Radyuk and Karan, 2020). Questa specie patogena è in grado di causare infezioni asintomatiche nelle volpi, le quali fungono da serbatoio, mentre nei cani provoca anemia, trombocitopenia e danno renale (Baneth et al., 2015; Baneth et al., 2019). Attualmente sono disponibili in letteratura alcuni studi focalizzati su *Babesia* spp. nei carnivori selvatici in Europa (Alvarado-Rybak et al., 2016; Hornok et al., 2018; Barandika et al., 2016; Hodžić et al., 2009), mentre in Italia i dati disponibili sono più limitati.

Nel dettaglio, in Italia *B. vulpes* è stata documentata solo nelle volpi rosse con i seguenti valori di prevalenza: 0,98% nel nord-ovest (Zanet et al., 2014), 13,6% e 22,88% nel centro (Ebani et al., 2022; Ebani et al., 2017), 43,9% nel sud (Santoro et al., 2019) e 54% nel nord-est (Da Rold et al., 2018). Tutti gli studi citati sono stati eseguiti su campioni di milza.

Per quanto riguarda il resto dell'Europa, *B. vulpes* è stata segnalata nelle volpi rosse in Portogallo con una prevalenza del 69,2% (Cardoso et al., 2013), in Galizia (Spagna) con una prevalenza variabile dal 61 al 79,8% (Checa et al., 2018), in Austria nel 50% delle volpi (Duscher et al., 2014), in Germania nel 46,4% (Najm et al., 2014), in Ungheria nel 20% (Farkas et al., 2015), in Croazia nel 5,2% (Deždek et al., 2010), in Polonia nel 30,7% (Mierzejewka et al., 2021) e infine in Bosnia nel 31,9% (Hodžić et al., 2015). In tutti questi studi le indagini molecolari sono state eseguite su campioni di sangue o di milza, mostrando una prevalenza maggiore nei campioni ematici rispetto a quelli splenici.

Nello studio di Checa et al. (2018) sono state riscontrate differenze significative nella prevalenza di *B. vulpes* tra le popolazioni di volpe rossa nelle province della Galizia. I risultati suggeriscono che i climi umidi tipici delle aree con maggiore prevalenza possono favorire una più elevata densità di zecche ixodidi, incrementando così il rischio di trasmissione di malattie veicolate da questi artropodi. Analogamente, le differenze osservate nella prevalenza di *B. vulpes* tra le diverse regioni italiane indicano una minore o maggiore circolazione del parassita e potrebbero essere correlate alla densità di popolazione di volpi rosse e zecche vettori nelle aree interessate. L'abbondanza di potenziali ospiti rappresenta infatti un fattore chiave per la proliferazione delle zecche e per la diffusione di piroplasmidi come *Babesia* spp. (Hornok et al., 2018; Beck et al., 2017; Checa et al., 2018).

Il DNA di *B. vulpes* è stato ricercato anche nelle zecche, ed identificato in diversi paesi europei in un numero ristretto di specie di zecche associate alla volpe rossa, quali *Ixodes canisuga*, *I. hexagonus*, *I. ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Dermacentor reticulatus*. Tra queste, *I.*

hexagonus è considerato il principale vettore di *B. vulpes* (Checa et al., 2018; Camacho et al., 2003).

Sebbene i cani domestici condividano alcuni vettori ixodidi e abbiano frequenti contatti con le volpi rosse, l'infezione da *B. vulpes* nei cani è rara, suggerendo che la volpe rossa ne rappresenti l'ospite naturale per eccellenza (Alvarado-Rybak et al., 2016; Nayyar Ghauri et al., 2018).

A tal proposito, un'indagine condotta nei cani da caccia nel sud Italia (Veneziano et al., 2018) ha rilevato solo *B. canis*, *B. gibsoni* e *B. vogeli* in tali animali, suggerendo che nell'area di studio cani e volpi tendono ad ospitare differenti specie di *Babesia* (Santoro et al., 2019).

Per quanto riguarda *Babesia canis*, in questo studio il DNA è stato rilevato in 2 esemplari di lupo grigio su 9 esaminati (22,2%), una delle prevalenze più elevate riscontrate finora nel lupo – sebbene il numero di soggetti sia ridotto e quindi il dato non robusto. Il riscontro di questa specie è in linea con quanto registrato in un altro studio italiano, il quale riporta una prevalenza del 7,7% (n = 1/13) nel tessuto splenico (Santoro et al., 2019).

Tra i pochi dati disponibili in letteratura sulla presenza di piroplasmi nel lupo grigio, sono state segnalate solo *Babesia canis* (Ristic, 1988; Neitz, 1956) e *Babesia gibsoni* (Yakimov and Shokhor, 1917; Mahoney, 1977).

Su scala continentale, sono state documentate infezioni da *B. canis* nel lupo grigio in Ungheria (n = 2/12) (Erdélyi et al., 2014) e in Croazia (n = 7/22) (Beck et al., 2017) – entrambe le indagini molecolari sono state eseguite su campioni di milza raccolti durante l'esame post-mortem.

Tuttavia, un recente studio ha documentato la presenza di *B. canis* anche nelle volpi rosse, sebbene in un numero molto ridotto di esemplari (9/381), con una prevalenza totale di 2,4%. Inoltre, questo dato è stato rilevato solo nei campioni di sangue (nessun campione di milza è risultato positivo alla specie). Gran parte delle sequenze di *B. canis* proviene dalla specie di zecca *Dermacentor reticulatus*, la seconda specie più diffusa in Europa – dopo *I. ricinus* (Bajer and Dwużnik-Szarek, 2021).

Negli ultimi anni, anche l'epidemiologia di *Babesia* nel tasso europeo ha suscitato un forte interesse nel campo della ricerca. Nel presente studio 4 su 45 esemplari testati (8,9%) sono risultati positivi alla specie di *Babesia* associata al tasso (*B. type badger*), una specie già riportata in altri due studi italiani con prevalenze più elevate. Nello specifico la prevalenza osservata negli studi condotti fino ad ora in Italia varia dal 53,8% al 91,1% (Santoro et al., 2019; Battisti et al., 2020) nei tessuti splenici. Tuttavia, è interessante notare come in questo studio la prevalenza vari tra il Piemonte, che presenta una prevalenza del 20% (sebbene su un numero molto ridotto

di soggetti), e la Valle d'Aosta, dove la prevalenza osservata sui 29 tassi analizzati è nettamente inferiore. Questo potrebbe essere legato a differenze climatiche e di altitudine tra le due regioni. Anche nel resto dell'Europa le percentuali indicano una certa diffusione di *B. type badger*: in Spagna le prevalenze riscontrate variano dal 20% al 35,2% (Barandika et al., 2016; Gimenez et al., 2009) mentre in Ungheria è stata riportata una prevalenza del 100% (Hornok et al., 2018) – sebbene siano stati analizzati solo 5 esemplari. Anche questi studi hanno utilizzato campioni splenici ed ematici per la ricerca dei protozoi d'interesse.

I potenziali vettori di tale specie sono *Ixodes canisuga* e *I. hexagonus*, zecche comunemente associate al tasso (Gallagher and Nelson, 1979).

Ad integrazione di quanto precedentemente detto riguardo all'infezione da *B. vulpes* nel cane, recenti evidenze hanno documentato infezioni da *Babesia* spp. associata al tasso nei cani con sintomatologia clinica riconducibile alla babesiosi (Hornok et al., 2018). Ciò potrebbe essere spiegato dall'utilizzo dei cani durante la caccia al tasso, poiché poche specie di *Babesia* appartenenti al gruppo *microti* possono essere trasmesse per via orale, mediante diretto contatto con il sangue infetto (Malagon and Tapia, 1994; Jefferies et al., 2007). In quest'ottica, l'attività venatoria e le escursioni nei boschi possono rappresentare fattori di rischio per l'infezione nei cani, favorendo l'esposizione a potenziali vettori come le zecche (Hornok et al., 2018).

La specie di *Babesia* associata al tasso si colloca filogeneticamente nel gruppo di *Babesia microti*-like che infettano cani e piccoli carnivori ed è correlata sia a *Theileria/Babesia annae* che a un piroplasmide rilevato nella lontra nordamericana (*Lontra canadensis*).

La presenza del DNA di *Babesia* associata al tasso è stata inoltre documentata in un esemplare di gatto selvatico europeo (*Felis silvestris*) in Bosnia ed Erzegovina, suggerendo un possibile coinvolgimento di tane condivise da tassi e altri carnivori nella trasmissione di patogeni da parte di artropodi nidicoli (Hodžić et al., 2018).

Nel complesso, la variabilità osservata nella prevalenza di *Babesia* spp. nelle varie specie di ospiti indica la possibile esistenza di differenze geografiche nella composizione e nell'abbondanza delle popolazioni di zecche e, dunque, del tasso di infezione (Santoro et al., 2019).

Pertanto, le differenze riscontrate nei tassi di positività della fauna selvatica a *Babesia/Theileria* spp. possono essere attribuite a molteplici fattori, tra cui la localizzazione geografica, la prevalenza del patogeno nell'area analizzata, la densità di popolazioni delle zecche e le caratteristiche biologiche degli animali esaminati, senza escludere la matrice di derivazione del campione e il protocollo diagnostico adottato.

6. CONCLUSIONI

Il presente studio ha permesso di approfondire la conoscenza sulla diffusione dei piroplasmidi (*Babesia* spp. e *Theileria* spp.) nella fauna selvatica delle regioni Liguria, Piemonte e Valle d'Aosta, con particolare attenzione al cinghiale e ai carnivori. I piroplasmidi sono microrganismi patogeni in grado di parassitare i globuli rossi di una vasta gamma di ospiti vertebrati. La trasmissione dell'infezione è sostenuta dalla presenza di vettori competenti, ovvero da zecche dure appartenenti alla famiglia Ixodidae.

I risultati ottenuti non hanno evidenziato la presenza di piroplasmidi nei cinghiali (*Sus scrofa*), suggerendo che, almeno per la popolazione studiata, questi animali non giocano un ruolo significativo come serbatoi di *Babesia* e *Theileria*. Tuttavia, sono state riscontrate infezioni da *Babesia* in carnivori selvatici, in particolare volpi (*Vulpes vulpes*), lupi (*Canis lupus*) e tassi (*Meles meles*), il che conferma la loro importanza come ospiti finali di tali parassiti. L'assenza di piroplasmidi nei cinghiali, contrariamente a quanto osservato in altre parti d'Europa, solleva interrogativi sull'eventuale variabilità geografica della distribuzione di questi patogeni e sul ruolo differente che le specie selvatiche possano svolgere nella trasmissione del patogeno. I risultati ottenuti sui carnivori selvatici, invece, supportano dati già esistenti e confermano la circolazione di determinate specie in questi animali selvatici.

Questi dati rappresentano un contributo alla conoscenza della distribuzione di piroplasmi nella fauna selvatica presente nel Nord-Ovest italiano, e sottolineano la necessità di ulteriori indagini. Saranno fondamentali futuri studi su campioni più ampi e geograficamente distribuiti, sia di animali selvatici che di zecche campionate sugli animali stessi e nell'ambiente, l'impiego di tecniche molecolari ad alta sensibilità e l'integrazione di dati ambientali e faunistici, quali densità di popolazione, interazioni interspecifiche e presenza di vettori.

Estendere la ricerca a una gamma più ampia di specie animali e ad aree geografiche più vaste permetterebbe di ottenere una mappa più completa della prevalenza di *Babesia* e *Theileria* nelle popolazioni selvatiche italiane, e di approfondire il ruolo degli ospiti nell'epidemiologia di questi parassiti. Inoltre, l'approccio "One Health" potrebbe favorire una visione integrata delle dinamiche epidemiologiche tra fauna selvatica, animali domestici e uomo, contribuendo così a una valutazione più precisa del rischio sanitario e alla definizione di adeguate strategie di sorveglianza.

7. BIBLIOGRAFIA

- Alvarado-Rybak, M., Solano-Gallego, L., & Millán, J. (2016). A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: Importance for domestic animal health and wildlife conservation. *Parasites & Vectors*, 9(1), 538.
- Alvarez, J. A., Rojas, C., & Figueroa, J. V. (2019). Diagnostic Tools for the Identification of *Babesia* sp. In Persistently Infected Cattle. *Pathogens*, 8(3), Article 3.
- Bajer, A., & Dwużnik-Szarek, D. (2021). The specificity of *Babesia*-tick vector interactions: Recent advances and pitfalls in molecular and field studies. *Parasites & Vectors*, 14(1), 507.
- Bajer, A., Beck, A., Beck, R., Behnke, J. M., Dwużnik-Szarek, D., Eichenberger, R. M., Farkas, R., Fuehrer, H.-P., Heddergott, M., Jokelainen, P., Leschnik, M., Oborina, V., Paulauskas, A., Radzijeuskaja, J., Ranka, R., Schnyder, M., Springer, A., Strube, C., Tolkacz, K., & Walochnik, J. (2022). Babesiosis in Southeastern, Central and Northeastern Europe: An Emerging and Re-Emerging Tick-Borne Disease of Humans and Animals. *Microorganisms*, 10(5), Article 5.
- Barrios-Garcia, M. N., & Ballari, S. A. (2012). Impact of wild boar (*Sus scrofa*) in its introduced and native range: A review. *Biological Invasions*, 14(11), 2283–2300.
- Bassi, E., Willis, S. G., Passilongo, D., Mattioli, L., & Apollonio, M. (2015). Predicting the Spatial Distribution of Wolf (*Canis lupus*) Breeding Areas in a Mountainous Region of Central Italy. *PLOS ONE*, 10(6), e0124698.
- Battisti, E., Zanet, S., Khalili, S., Trisciuglio, A., Hertel, B., & Ferroglio, E. (2020). Molecular Survey on Vector-Borne Pathogens in Alpine Wild Carnivorans. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 1.
- Beck, R., Vojta, L., Mrljak, V., Marinculić, A., Beck, A., Živičnjak, T., & Cacciò, S. M. (2009). Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *International Journal for Parasitology*, 39(7), 843–848.

- Bishop, R., Musoke, A., Morzaria, S., Gardner, M., & Nene, V. (2004). Theileria: Intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. *Parasitology*, *129*(S1), S271–S283.
- Cafiso, A., Bazzocchi, C., Cavagna, M., Di Lorenzo, E., Serra, V., Rossi, R., & Comazzi, S. (2021). Molecular Survey of Babesia spp. And Anaplasma phagocytophilum in Roe Deer from a Wildlife Rescue Center in Italy. *Animals*, *11*(11), Article 11.
- Castañeda, I., Doherty, T. S., Fleming, P. A., Stobo-Wilson, A. M., Woinarski, J. C. Z., & Newsome, T. M. (2022). Variation in red fox *Vulpes vulpes* diet in five continents. *Mammal Review*, *52*(3), 328–342.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., & Malandrin, L. (2009). Babesia and its hosts: Adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, *40*(2), 37.
- Chisu, V., Alberti, A., Zobba, R., Foxi, C., & Masala, G. (2019). Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Babesia* and *Theileria* spp. In ticks from domestic and wild hosts in Sardinia. *Acta Tropica*, *196*, 60–65.
- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, *32*(6), 767–775.
- Daněk, O., Lesiczka, P. M., Hammerbauerova, I., Volfova, K., Juránková, J., Frgelecová, L., Modrý, D., & Hrazdilova, K. (2023). Role of invasive carnivores (*Procyon lotor* and *Nyctereutes procyonoides*) in epidemiology of vector-borne pathogens: Molecular survey from the Czech Republic. *Parasites & Vectors*, *16*, 219.
- de la Fuente, J., Antunes, S., Bonnet, S., Cabezas-Cruz, A., Domingos, A. G., Estrada-Peña, A., Johnson, N., Kocan, K. M., Mansfield, K. L., Nijhof, A. M., Papa, A., Rudenko, N., Villar, M., Alberdi, P., Torina, A., Ayllón, N., Vancova, M., Golovchenko, M.,

-
- Grubhoffer, L., ... Rego, R. O. M. (2017). Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7.
- Ebani, V. V., Trebino, C., Guardone, L., Bertelloni, F., Cagnoli, G., Nardoni, S., Sel, E., Wilde, E., Poli, A., & Mancianti, F. (2022). Occurrence of Bacterial and Protozoan Pathogens in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Central Italy. *Animals*, 12(20), Article 20.
- Edwards, C. J., Soulsbury, C. D., Statham, M. J., Ho, S. Y. W., Wall, D., Dolf, G., Iossa, G., Baker, P. J., Harris, S., Sacks, B. N., & Bradley, D. G. (2012). Temporal genetic variation of the red fox, *Vulpes vulpes*, across western Europe and the British Isles. *Quaternary Science Reviews*, 57, 95–104.
- Erdélyi, K., Mezősi, L., Vladov, S., & Földvári, G. (2014). Fatal acute babesiosis in captive grey wolves (*Canis lupus*) due to *Babesia canis*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(3), 281–283.
- Estrada-Peña, A., & Salman, M. (2013). Current Limitations in the Control and Spread of Ticks that Affect Livestock: A Review. *Agriculture*, 3(2), Article 2.
- Földvári, G., Široký, P., Szekeres, S., Majoros, G., & Sprong, H. (2016). Dermacentor reticulatus: A vector on the rise. *Parasites & Vectors*, 9(1), 314.
- Guardone, L., Ebani, V. V., Verin, R., Nardoni, S., Consolazione, A., Bennett, M., & Mancianti, F. (2020). Molecular Detection of Arthropod-Borne Pathogens in Eurasian Badgers (*Meles meles*) from the United Kingdom. *Animals*, 10(3), Article 3.
- Hossain, Md. J., Raut, S., Singh, R. P., Mishra, P., Hossain, Md. S., Dey, A. R., Kabir, A., Anisuzzaman, Talukder, Md. H., & Shahiduzzaman, Md. (2022). Molecular detection of Babesia and Theileria from crossbred cattle in Sirajganj and Rangpur districts of Bangladesh. *Veterinary Medicine and Science*, 9(2), 899–906.

- Hrazdilová, K., Lesiczka, P. M., Bardoň, J., Vyroubalová, Š., Šimek, B., Zurek, L., & Modrý, D. (2021). Wild boar as a potential reservoir of zoonotic tick-borne pathogens. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *12*(1), 101558.
- Hunfeld, K.-P., Hildebrandt, A., & Gray, J. S. (2008). Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *International Journal for Parasitology*, *38*(11), 1219–1237.
- Iori, A., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Pietrobelli, M., Tampieri, M. P., Galuppi, R., & Cancrini, G. (2010). Tick reservoirs for piroplasms in central and northern Italy. *Veterinary Parasitology*, *170*(3), 291–296.
- Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., & Malandrin, L. (2018). The Complexity of Piroplasms Life Cycles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*, 248.
- Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnittger, L. (2019). Babesia Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. *Trends in Parasitology*, *35*(5), 356–368.
- Kjemtrup, A. M., & Conrad, P. A. (2000). Human babesiosis: An emerging tick-borne disease. *International Journal for Parasitology*, *30*(12), 1323–1337.
- Lempereur, L., Beck, R., Fonseca, I., Marques, C., Duarte, A., Santos, M., Zúquete, S., Gomes, J., Walder, G., Domingos, A., Antunes, S., Baneth, G., Silaghi, C., Holman, P., & Zintl, A. (2017). Guidelines for the Detection of *Babesia* and *Theileria* Parasites. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *17*(1), 51–65.
- Magi, M., Guardone, L., Mignone, W., Prati, M. C., & Macchioni, F. (2016). Intestinal helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in north-west Italy. *Helminthologia*, *53*(1), 31–38.
- Mans, B. J., Pienaar, R., & Latif, A. A. (2015). A review of Theileria diagnostics and epidemiology. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *4*(1), 104–118.

- Matei, I. A., Kalmár, Z., Balea, A., Mihaiu, M., Sándor, A. D., Cocian, A., Crăciun, S., Bouari, C., Briciu, V. T., & Fiț, N. (2023). The Role of Wild Boars in the Circulation of Tick-Borne Pathogens: The First Evidence of *Rickettsia monacensis* Presence. *Animals*, *13*(11), Article 11.
- McKeever, D. J. (2009). Bovine immunity – a driver for diversity in *Theileria* parasites? *Trends in Parasitology*, *25*(6), 269–276.
- Medlock, J. M., Hansford, K. M., Bormane, A., Derdakova, M., Estrada-Peña, A., George, J.-C., Golovljova, I., Jaenson, T. G. T., Jensen, J.-K., Jensen, P. M., Kazimirova, M., Oteo, J. A., Papa, A., Pfister, K., Plantard, O., Randolph, S. E., Rizzoli, A., Santos-Silva, M. M., Sprong, H., ... Van Bortel, W. (2013). Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasites & Vectors*, *6*(1), 1.
- Michel, A. O., Mathis, A., & Ryser-Degiorgis, M.-P. (2014). *Babesia* spp. in European wild ruminant species: Parasite diversity and risk factors for infection. *Veterinary Research*, *45*(1), 65.
- Mierzejewska, E. J., Dwuznik, D., Koczwarska, J., Stańczak, Ł., Opalińska, P., Krokowska-Paluszak, M., Wierzbicka, A., Górecki, G., & Bajer, A. (2021). The red fox (*Vulpes vulpes*), a possible reservoir of *Babesia vulpes*, *B. canis* and *Hepatozoon canis* and its association with the tick *Dermacentor reticulatus* occurrence. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *12*(1), 101551.
- Montero, E., Gray, J., Lobo, C. A., & González, L. M. (2022). *Babesia* and Human Babesiosis. *Pathogens*, *11*(4), 399.
- Nayel, M., El-Dakhly, K. M., Aboulaila, M., Elsify, A., Hassan, H., Ibrahim, E., Salama, A., & Yanai, T. (2012). The use of different diagnostic tools for *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle in Menofia, Egypt. *Parasitology Research*, *111*(3), 1019–1024.
- Penzhorn, B. L. (2006). Babesiosis of wild carnivores and ungulates. *Veterinary Parasitology*, *138*(1), 11–21.

- Prigioni, C., Balestrieri, A., Remonti, L., & Cavada, L. (2008). Differential use of food and habitat by sympatric carnivores in the eastern Italian Alps. *Italian Journal of Zoology*, 75(2), 173–184.
- Quorollo, B. A., Archer, N. R., Schreeg, M. E., Marr, H. S., Birkenheuer, A. J., Haney, K. N., Thomas, B. S., & Breitschwerdt, E. B. (2017). Improved molecular detection of Babesia infections in animals using a novel quantitative real-time PCR diagnostic assay targeting mitochondrial DNA. *Parasites & Vectors*, 10, 128.
- Roca, C. P. (n.d.). *Environmental drivers of the distribution and density of the European badger (Meles meles): A review*.
- Rochlin, I., & Toledo, A. (2020). Emerging tick-borne pathogens of public health importance: A mini-review. *Journal of Medical Microbiology*, 69(6), 781–791.
- Santoro, M., Auriemma, C., Lucibelli, M. G., Borriello, G., D'Alessio, N., Sgroi, G., Veneziano, V., Galiero, G., & Fusco, G. (2019). Molecular Detection of Babesia spp. (Apicomplexa: Piroplasma) in Free-Ranging Canids and Mustelids From Southern Italy. *Frontiers in Veterinary Science*, 6.
- Schnittger, L., Ganzinelli, S., Bhoora, R., Omondi, D., Nijhof, A. M., & Florin-Christensen, M. (2022). The Piroplasmida Babesia, Cytauxzoon, and Theileria in farm and companion animals: Species compilation, molecular phylogeny, and evolutionary insights. *Parasitology Research*, 121(5), 1207–1245.
- Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. A. (2012). Babesia: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1788–1809.
- Schuster, F. L. (2002). Cultivation of Babesia and Babesia-Like Blood Parasites: Agents of an Emerging Zoonotic Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 365–373.
- Sgroi, G., D'Alessio, N., Auriemma, C., Salant, H., Gallo, A., Riccardi, M. G., Alfano, F., Rea, S., Scarcelli, S., Ottaviano, M., De Martinis, C., Fusco, G., Lucibelli, M. G., &

-
- Veneziano, V. (2023). First molecular detection of *Babesia vulpes* and *Babesia capreoli* in wild boars from southern Italy. *Frontiers in Veterinary Science*, *10*.
- Sojka, D., Jalovecká, M., & Perner, J. (2022). *Babesia*, *Theileria*, *Plasmodium* and Hemoglobin. *Microorganisms*, *10*(8), Article 8.
- Torina, A., & Caracappa, S. (2007). Babesiosis in Italy: An overview. *Parassitologia*, *49 Suppl 1*, 23–28.
- Uilenberg, G. (2006). *Babesia*—A historical overview. *Veterinary Parasitology*, *138*(1), 3–10.
- Veronesi, F., Deak, G., & Diakou, A. (2023). Wild Mesocarnivores as Reservoirs of Endoparasites Causing Important Zoonoses and Emerging Bridging Infections across Europe. *Pathogens*, *12*(2), 178.
- Villanueva-Saz, S., Borobia, M., Fernández, A., Jiménez, C., Yzuel, A., Verde, M. T., Ramo, M. Á., Figueras, L., & Ruíz, H. (2022). Anaemia in Sheep Caused by *Babesia* and *Theileria* Haemoparasites. *Animals*, *12*(23), Article 23.
- Yabsley, M. J., & Shock, B. C. (2013). Natural history of Zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *2*, 18–31.
- Zanet, S., Trisciuglio, A., Bottero, E., de Mera, I. G. F., Gortazar, C., Carpignano, M. G., & Ferroglio, E. (2014). Piroplasmosis in wildlife: *Babesia* and *Theileria* affecting free-ranging ungulates and carnivores in the Italian Alps. *Parasites & Vectors*, *7*, 70.
- Zlatanova, D., Ahmed, A., Valasseva, A., & Genov, P. (n.d.). *Adaptive Diet Strategy of the Wolf (Canis lupus L.) in Europe: A Review*.

8. RINGRAZIAMENTI

Desidero esprimere la mia sincera gratitudine all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta per avermi accolto e offerto l'opportunità di svolgere il tirocinio curriculare all'interno dei propri laboratori.

Un ringraziamento particolare va alla responsabile della struttura complessa della Liguria, la Dott.ssa Elisabetta Razuoli, per aver reso possibile questa esperienza formativa e per avermi accolta con grande disponibilità, incoraggiandomi e supportandomi durante tutto il percorso.

Un riconoscimento speciale va alla Dott.ssa Lisa Guardone, che è stata una presenza costante e fondamentale in ogni fase di questo lavoro. La sua pazienza, la sua disponibilità e la sua gentilezza sono state per me un sostegno prezioso. A lei va tutta la mia profonda stima e gratitudine.

Ringrazio inoltre tutto il personale dell'Istituto per la calorosa accoglienza e per la costante collaborazione. In particolare, desidero esprimere la mia riconoscenza a Bianca Sacchegiani e a Simona Mella.

Un sentito ringraziamento va infine al Prof. Luigi Vezzulli, mio relatore universitario, per la guida scientifica, la disponibilità e i preziosi suggerimenti che hanno contribuito in maniera significativa alla realizzazione di questo lavoro.