UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Corso di Laurea in Medicina Veterinaria

Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica

RICERCA DI *Toxoplasma gondii* IN UNGULATI SELVATICI: IMPLICAZIONI ZOONOSICHE E GESTIONALI

Relatore: Prof. Paolo LANFRANCHI

Correlatori: Dr.ssa Nicoletta FORMENTI
Dr. Roberto VIGANÒ

Tesi di Laurea di:
Michele CAVALLINI
Matr. 648081

Anno Accademico 2011/2012

Sommario

1.INTRODUZIONE

Gli agenti patogeni degli animali a vita libera sono parte integrante della biodiversità degli ecosistemi naturali, numerosi studi infatti evidenziano il loro ruolo chiave nei processi ecologici, come la regolazione del numero di animali all'interno delle popolazioni (Anderson e May, 1979) e il mantenimento della diversità genetica (May e Anderson, 1983; Read et al., 1995; Daszak et al., 2000; Fiona Mattews 2009). Tuttavia va considerato che alcuni di detti patogeni non giocano soltanto un importante ruolo ecologico, ma possono rappresentare un rischio concreto per la salute umana, in quanto zoonosici e a questo proposito va osservato che più del 70% delle malattie emergenti o ri-emergenti originano dagli animali selvatici (Jones et al., 2008).

Esempi di patogeni con una importanza primaria a livello di sanità pubblica riscontrati anche nella realtà faunistica italiana possono essere quelli di *Brucella* sp. e *Mycobacteium bovis* (Ferroglio et al., 2000; Dini et al., 2003; Dondo et al., 2007; Bergagna et al., 2009; Montagnaro et al., 2010; Magnino et al., 2011).

Risulta quindi di fondamentale importanza il costante monitoraggio sanitario degli animali selvatici al fine di stabilire la presenza, la circolazione di queste patologie sul territorio, il rischio di trasmissione all'uomo ed agli animali domestici ed eventualmente attuare provvedimenti atti al controllo di queste.

Nonostante molte di queste patologie figurino nella lista dell'OIE (http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2012/), non c'è un accordo sull'attuazione di programmi di sorveglianza sistematici (Kulken et al., 2005) ed essi vengono definiti più che altro rispetto a situazioni di crisi; anche dove esistono mancano di integrazioni con la sorveglianza anche sull'uomo e sugli animali domestici.

Relativamente alla realtà italiana va sottolineato che negli ultimi anni si è verificato un marcato incremento delle popolazioni di ungulati selvatici (Pedrotti et al., 2001), tra l'altro in un territorio fortemente antropizzato: questi due fattori comportano un aumento delle interazioni tra animali selvatici, domestici e uomo, con intrinseche implicazioni a livello sanitario.

L'incremento demografico delle popolazioni di ungulati selvatici ha permesso oltretutto un aumento dei prelievi venatori (ad esempio oltre 100.000 capi sono stati regolarmente abbattuti solo nella regione Piemonte nel periodo 2002-2011 www.regione.piemonte.it/agri/osserv_faun/index.htm), quindi il problema sanitario va

visto anche rispetto all'utilizzo delle carcasse per l'alimentazione umana e quindi al possibile rischio zoonosico.

Va inoltre considerato che le normative europee nell'ambito del Pacchetto Igiene (Reg. CEE 852, 853, 854 /2004) permettono la commercializzazione delle carni di ungulati selvatici provenienti dall'attività venatoria rendendo di fatto il cacciatore un produttore primario (http://www.izsler.it/izs_home_page/archivio_news00001344_Il cacciatore produttore primario.html). Va inoltre considerato che mentre tradizionalmente queste carni venivano consumate principalmente a livello famigliare o per la produzione di prodotti tipici a consumo locale, oltre a tutto in poche realtà territoriali, oggi il panorama è in sostanziale evoluzione, sia per la maggior disponibilità del prodotto che per una maggior richiesta da parte del consumatore. Emerge pertanto l'opportunità di una adeguata valorizzazione anche economica del patrimonio faunistico, non solo per la sua forte valenza "produttiva", ma anche per il significativo valore di mercato per qualità organolettiche delle carcasse e tipicità dei prodotti (Winkelmayer, 2010).

A tal fine è necessario offrire adeguate garanzie sanitarie a tutela del consumatore, sia a livello di autoconsumo che di prodotto commercializzato, aspetti di fatto ancora poco considerati nel nostro Paese (Citterio et al., 2011). E' bene inoltre sottolineare che un tempo il rischio di assumere agenti patogeni attraverso consumo alimentare era di fatto limitato dalla consuetudine di utilizzare la carne di selvaggina solo dopo lunga cottura. Attualmente invece con l'aumentata diffusione del consumo di carni crude o poco cotte, ovvero di insaccati freschi, carpaccio, *roast beef* ed altre preparazioni, è evidente come detto rischio aumenti considerevolmente. In particolare l'attenzione va posta alla trasmissione di parassitosi sostenute da elminti e/o protozoi. A questo proposito va osservato che per *Trichinella* sp. (Romano et al., 2011) esistono precise disposizioni legislative che prevedono il controllo di tutti i capi di cinghiale abbattuti (Reg. C.E. 2075/2005). Relativamente a *Toxoplasma gondii*, la cui valenza zoonosica è ampiamente documentata (Kjilsta e Jongert, 2009) esiste la direttiva CE 2003/99 (recepita in Italia dal D.L. Del 4 Aprile 2006, n 191) che ha inserito la Toxoplasmosi tra le zoonosi oggetto di piani di sorveglianza in funzione della situazione nazionale.

Nonostante ciò non esistono dati epidemiologici esaustivi a livello nazionale né per l'infezione nell'uomo, né negli animali e nemmeno sull'effettiva presenza del parassita negli alimenti. Tanto meno esiste un piano di ricerca sistematico di questo protozoo nelle carni sia di ungulati selvatici, che degli altri animali a rischio. Peraltro per calcolare il reale

rischio per i consumatori e definire le migliori pratiche di *management* al fine di prevenire o almeno ridurre la probabilità di trasmissione all'uomo, è necessario identificare ed armonizzare accurati e sensibili test diagnostici per individuare animali e carcasse infette lungo la filiera produttiva (Hill et al., 2006).

2. SCOPO DELLA TESI

- Rilevare la sieroprevalenza di *Toxoplasima gondi* nelle popolazioni delle quattro specie di ungulati selvatici oggetto di prelievo venatorio nell'area di studio: Cinghiale (*Sus scrofa*), Cervo europeo (*Cervus elaphus*), Capriolo (*Capreolus capreolus*) e Camoscio alpino (*Rupicapra rupicapra*);

- Confrontare i risultati del test immunologico utilizzato rispettivamente su campioni di siero e di estratto di carne per evidenziarne l'attendibilità;

- Valutare il potenziale rischio zoonosico collegato al consumo di carne di ungulati selvatici.

3. MATERIALI E METODI

3.1 AREA DI STUDIO

La ricerca è stata effettuata all'interno di due distinte realtà territoriali, rispettivamente in Ossola (VB) e Valtellina (SO):

OSSOLA

L'indagine è stata condotta nell'ambito del Comprensorio Alpino di Caccia VCO2 – Ossola Nord (successivamente nominato come C.A. VCO2), situato nelle Alpi Lepontine Occidentali (VB). Il suo territorio, la cui superficie misura complessivamente su 72.740 ha, si estende su tre valli principali: Antigorio, Formazza e Vigezzo e sulle secondarie Isorno e Devero. Una piccola area del comprensorio, relativa ai comuni di Trontano e Masera, appartiene geograficamente alla Val d'Ossola (Figura 1).

Figura 1: localizzazione geografica dell'area di studio dell'Ossola.

L'ambiente è caratterizzato da un'elevata estensione di vegetazione forestale ed arbustiva: i boschi di latifoglie occupano il 27,9% della superficie totale, quelli di conifere il 24,0%, le formazioni arbustive e i cespugli circa il 13%. La vegetazione forestale è caratterizzata,

lungo l'asse vallivo principale, da cedui di castagno e boschi di latifoglie a struttura irregolare (castagno, rovere, tiglio, frassino, acero di monte, faggio) (Figura 2).

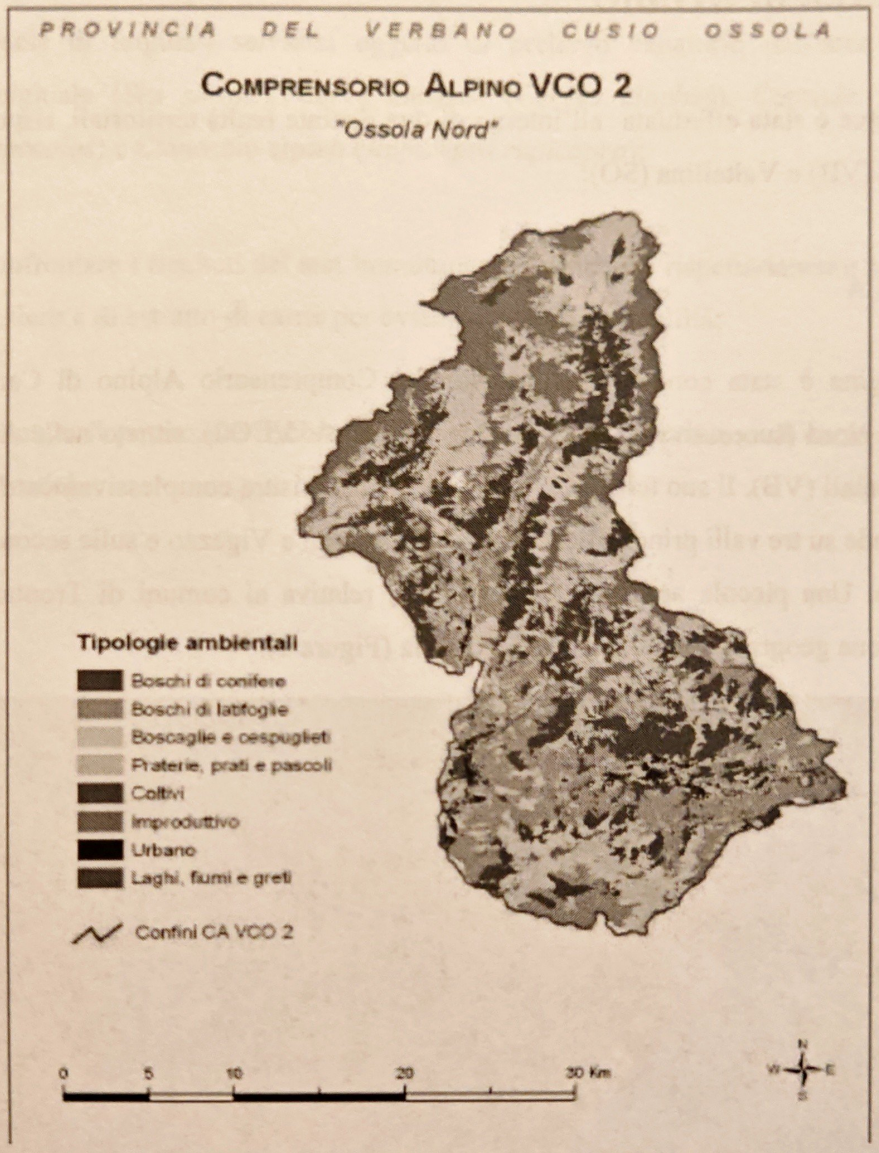

Figura 2: tipologia ambientale dell'area di studio.

All'interno di detto territorio sono presenti consistenti popolazioni di ungulati selvatici quali: Cervo europeo, Capriolo, Camoscio alpino e Stambecco. Va segnalato inoltre che nel C.A. È presente il cinghiale, peraltro risultato di immissioni illegali, la cui popolazione in questi ultimi anni è in costante aumento.

Le densità di queste specie sono rispettivamente: 5 capi per kmq Camoscio, 2,5 capi per kmq Capriolo, 2 capi kmq Cervo e per il cinghiale si è riscontrata una presenza sporadica (Viganò e Borretti, 2009).

Inoltre si ha la presenza di buone popolazioni di galliformi alpini, come Fagiano di Monte (*Tetrao tetrix*), Coturnice (*Alectoris graeca*), Pernice Bianca (*Lagopus Mutus*) e Lepre Bianca *(Lepus timidus);* la presenza di queste specie testimonia la buona qualità del territorio. A conferma di ciò anche la presenza, se pur sporadica, dei grossi predatori quali il Lupo (*Canis lupus*) e la Lince (*Lynx linx*).

VALTELLINA

L'attività di ricerca in Valtellina è stata condotta nell'ambito del Parco Nazionale dello Stelvio, settore lombardo, più precisamente in un'area situata sulla destra orografica della Val Furva facente parte dei comuni di Bormio e Valfurva, avente una superficie di circa 1400 ha (Figura 3).

Figura 3: localizzazione geografica dell'area di studio della Valtellina.

L'ambiente è caratterizzato da boschi di conifere frammisto a qualche pianta di latifoglia nelle zone più a valle, boschi di pino mugo caratteristici delle parti più calcaree ed intorno agli alpeggi o sopra il limite del bosco si hanno pascoli frammisti ad arbusti.

Anche per quanto riguarda la zona oggetto di studio all'interno del Parco Nazionale dello Stelvio si ha una popolazione di ungulati costituita da: Cervo europeo, Capriolo, Camoscio alpino e Stambecco. Per quanto riguarda la specie cervo, le concentrazioni demografiche in

questa zona sono molto elevate, difatti nel territorio della Val Furva e nel vicino settore di San Colombano nel 2011 sono stati censiti circa 1300 cervi, con densità che nell'area protetta si aggirano intorno ai 12 individui per Kmq e nelle zone di svernamento si arriva a più di 40 capi per Kmq (comunicato stampa del parco nazionale dello Stelvio 13/02/2012). Questo eccesso demografico va ad interferire sulle popolazioni di altre specie come camoscio e capriolo, oltre a creare danni nel settore agricolo e forestale. Proprio per questo motivo il parco ha deciso di effettuare un piano contenitivo atto a ridurre la densità a circa 9 cervi per Kmq.

3.2. RACCOLTA DEI CAMPIONI

OSSOLA

L'indagine è stata condotta nel corso della stagione venatoria 2011. Il materiale biologico è stato raccolto a Trontano presso la sede del Comprensorio. Qui i cacciatori trasportavano i loro capi per dichiarare l'abbattimento ed effettuare i controlli previsti. In particolare le carcasse venivano sottoposte ad ispezione *post mortem*, rilevazione dei dati morfobiometrici e georeferenziazione del luogo di abbattimento. Previo consenso del cacciatore, sono stati prelevati cuore, se presente, e cervello, per l'indagine siero epidemiologica di *Toxoplasma gondii*; gli organi raccolti sono stati immediatamente stoccati a -20°C. Per il prelievo di cervello è stata applicata la tecnica di asportazione dell'*obex* ordinariamente utilizzata negli animali domestici nell'ambito dei controlli delle malattie prioniche.

Coinvolgendo i cacciatori è stato possibile raccogliere anche campioni di sangue di buona qualità; a ciascun cacciatore era stata precedentemente consegnata una provetta così da poter raccogliere un quantitativo di sangue al momento del dissanguamento, direttamente dai grossi vasi. Una volta consegnate, le provette sono state centrifugate ed il siero prodotto è stato conservato in eppendorf e stoccato a -20°C.

Nel corso di 16 giornate di attività presso il Centro, di cui 10 hanno comportato una partecipazione diretta, sono stati prelevati complessivamente 85 campioni di siero, 92 di cuore e 77 di cervello (Tabella 1).

	SIERO	CUORE	CERVELLO
CERVO	21	13	13
CAMOSCIO	30	38	35
CINGHIALE	1	20	8
CAPRIOLO	33	21	21

Tabella 1 : Numero di Campioni di siero e cuore divisi per specie.

VALTELLINA

Il campionamento è stato effettuato durante degli abbattimenti contenitivi per il cervo organizzati dal Parco Nazionale dello Stelvio nel comprensorio lombardo. In particolare il piano di contenimento si è svolto in due periodi: dal 16 gennaio 2012 al 21 gennaio 2012 e dal 06 febbraio 2012 al 11 febbraio 2012. All'interno dell'area era previsto l'abbattimento di 100 cervi di cui: 8-10 femmine sottili, 40-42 femmine adulte, 30 piccoli, 12 fusoni e 8-10 maschi adulti. I prelievi sono stati effettuati da cacciatori appositamente formati dal Parco, organizzati in squadre formate da 2-4 persone; ogni squadra veniva assegnata giornalmente ad una sottozona (Figura 3).

Figura 4: cartina della zona di studio suddivisa in sottozone, i pallini rossi localizzano i precisi luoghi di ogni singolo abbattimento.

I capi abbattuti venivano consegnati dai cacciatori al centro di controllo allestito dal Parco, qui venivano registrati i dati morfobiometrici e georeferenziato il luogo di abbattimento. Dopo l'eviscerazione dell'animale si procedeva alla raccolta dei campioni di cuore e di sangue (subito centrifugato ed il siero ottenuto messo in provette eppendorf). Il midollo allungato è stato prelevato successivamente presso il macello convenzionato mediante la tecnica di asportazione dell'*obex* (Fig. 5).

Figura 5: foto del prelievo dell'*obex* con l'apposito cucchiaio.

Tutti i campioni prelevati sono stati immediatamente stoccati a -20°C in attesa delle analisi.

Nel complesso sono stati prelevati 24 campioni di siero, 71 di cuore e 71 di cervello nel corso di 12 giornate, con una partecipazione diretta e 3 di esse.

La totalità degli organi e dei sieri raccolti, provenienti sia dall'Ossola che dalla Valtellina, sono stati trasportati ai laboratori dell' l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini" –Sezione di Bergamo per le successive analisi diagnostiche.

3.3 ANALISI SIEROLOGICA

I campioni oggetto di analisi sierologica sono rappresentati dal siero e dall'estratto di carne. Quest'ultimo è stato ottenuto mediante scongelamento del campione (quando il muscolo viene congelato, l'acqua contenuta all'interno delle sue cellule forma dei cristalli di ghiaccio che vanno a ledere la membrana cellulare, al momento dello scongelamento, quindi, una parte di citoplasma fuoriesce dalle cellule andando a formare l'estratto di carne).

I campioni sono stati analizzati utilizzando il kit ELISA ID Screen® Toxoplasmosis Indirect MULTI-SPECIES. Questo kit ELISA ricerca anticorpi specifici per l'antigene P30 di *T.gondi* in siero, plasma ed estratto di carne nei ruminanti, gatti e suini.

Si utilizza una micropiastra da 96 pozzetti ai quali è adeso l'antigene P30, qui vene inserito il siero diluito 1:10 o il succo di carne diluito 1:2; si preparano inoltre quattro pozzetti rispettivamente 2 con siero di controllo negativo e 2 con siero di controllo positivo, incubando il tutto per 45 minuti. Gli anticorpi, se presenti, formano un complesso antigene-anticorpo. Successivamente si procede al lavaggio della piastra e l'aggiunta del coniugato anti-ruminanti-perossidasi (Po) (attesa di 30 minuti) che va a formare un complesso antigene-anticorpo-coniugato. Si procede quindi ad un secondo lavaggio, si aggiunge la soluzione substrato (TMB), si incuba per 15 minuti al buio ed infine viene aggiunta quella di stoppaggio.

Se il campione contiene anticorpi per *T. gondi* assume una colorazione gialla di intensità proporzionale al titolo anticorpale. La piastra successivamente viene letta con lo spettrofotometro ad una densità ottica di 450 nm.

Il test è ritenuto valido se il valore medio di densità ottica dei controlli positivi (DO_{cp}) è superiore a 0,350 e la proporzione tra valore medio della densità ottica dei controlli positivi (DO_{cp}) e valore medio dei controlli negativi (DO_{cn}) è superiore a 3,5.

Per l'interpretazione dei risultati bisogna calcolare la percentuale S/P con la seguente formula: $\%S/P = (DO_{campione} - DO_{cn} / DO_{cp} - DO_{cn}) \times 100$ (Tabella 2).

RISULTATO	STATUS
S/P ≤ 40%	NEGATIVO
40% < S/P> 50%	DUBBIO
S/P ≥ 50%	POSITIVO

Tabella 2: tabella esplicativa dei risultati del test.

3.4 ANALISI STATISTICA

E' stato calcolato l'indice epidemiologico di prevalenza (p = percentuale dei soggetti positivi al parassita sul totale degli individui esaminati); i valori dei titoli anticorpali evidenziati sono stati trasformati in logaritmo per essere analizzati con test parametrico ANOVA per il confronto tra le classi di età, sesso e altitudine per entrambe le aree di studio. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi quando $p<0,05$.

4. RISULTATI

4.1 SIEROPREVALENZA

OSSOLA

In tabella 3 sono riportati il numero di campioni su cui sono stati effettuata gli accertamenti.

	Siero	Estratto di carne
Capriolo	33	1
Cinghiale	1	19
Cervo	21	2
Camoscio	30	0

Tabella 3: Numero dei campioni di siero e di estratto di carne raccolti dalle 4 specie ospite.

I risultati complessivi scaturiti sia dagli accertamenti sul siero che sull'estratto di carne hanno evidenziato le seguenti prevalenze: Capriolo 41%, Cinghiale 15%, Cervo 4% e Camoscio 0% (Grafico 1)

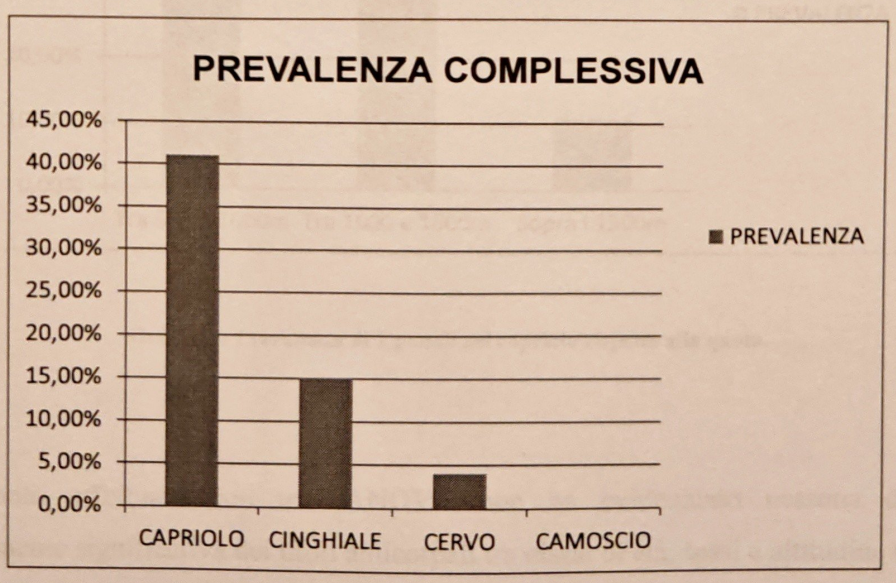

Grafico 1: rappresentazione delle prevalenze rispetto alle quattro specie prese in esame in Ossola.

Nel capriolo la prevalenza è stata calcolata rispetto a sesso (21 maschi, 13 femmine) (Grafico 2), classe di età (1 piccolo, 8 capi di un anno, 11 capi di età compresa tra 2 e 5 anni, 10 capi sopra i 5 anni) (Grafico 3) e quota dell'abbattimento (11 campioni abbattuti ad un altitudine compresa tra 500 e 1000 m s.l.m., 15 tra 1000 e 1500 m e 9 sopra i 1500m) (Grafico 4).

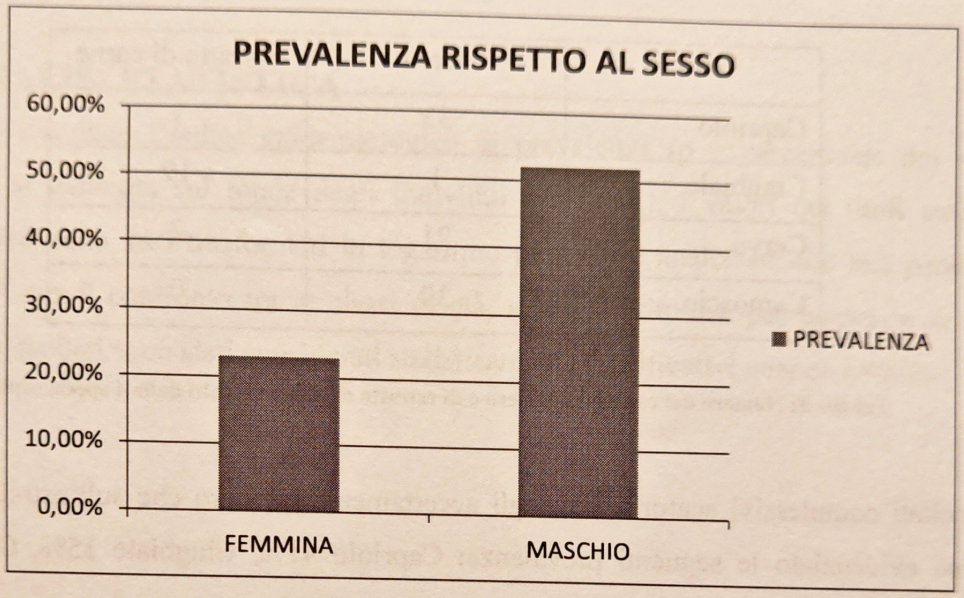

Grafico 2: Prevalenza di *T.gondii* nel capriolo rispetto al sesso.

Grafico 3: Prevalenza di *T.gondii* nel capriolo rispetto all'età.

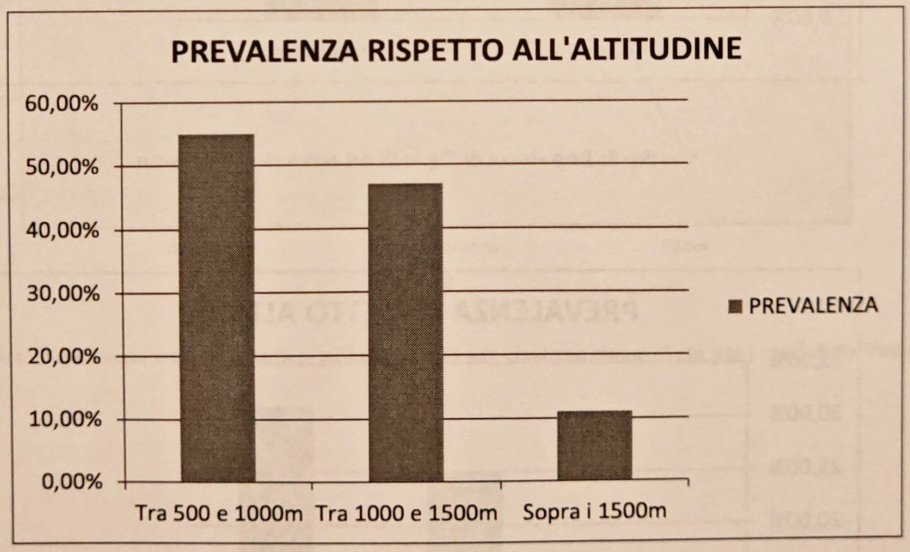

Grafico 4: Prevalenza di *T.gondii* nel capriolo rispetto alla quota.

Il confronto effettuato con test ANOVA non ha evidenziato nessuna differenza statisticamente significativa dei titoli anticorpali tra classi di età, sessi e altitudine ($p>0,05$).

VALTELLINA

Le analisi sierologiche dei cervi in questa zona sono state effettuate su 26 campioni di siero e su 22 di estratto di carne ed hanno evidenziato una prevalenza complessiva del 21%. Inoltre è stata calcolata la prevalenza rispetto a sesso (15 maschi, 33 femmine) (Grafico 5) e classe di età (15 piccoli, 15 animali di 1 anno di età, e 29 adulti) (Grafico 6).

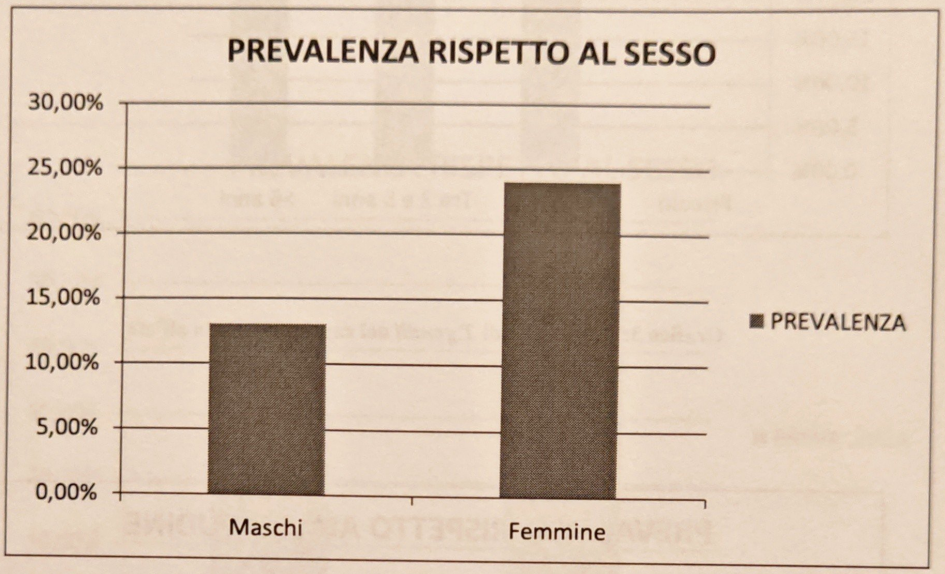

Grafico 5: Prevalenza di *T.gondii* nel cervo rispetto al sesso.

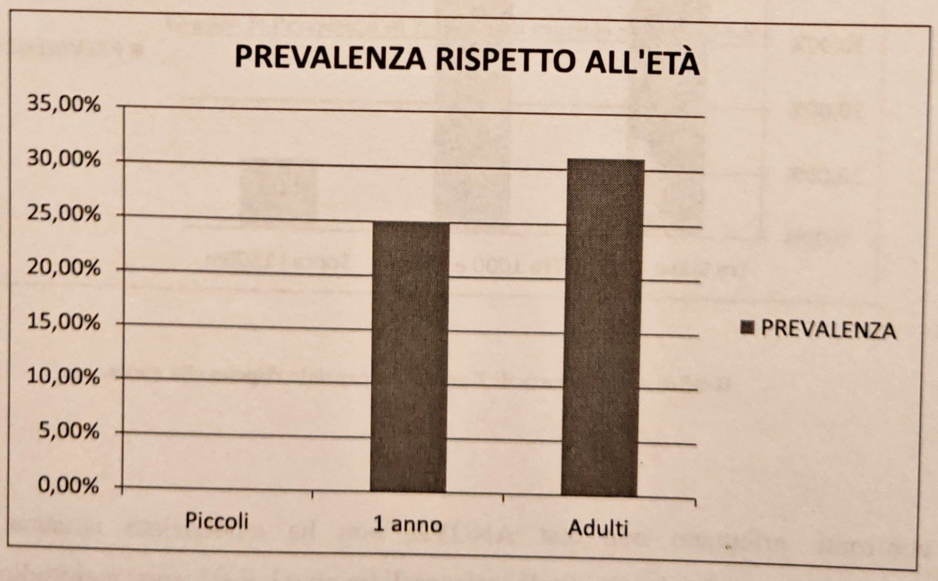

Grafico 6: Prevalenza di *T.gondii* nel cervo rispetto all'età.

Il confronto tra i titoli anticorpali rispetto al sesso, effettuato con test ANOVA, non ha evidenziato nessuna differenza statisticamente significativa ($p > 0,05$); al contrario è emersa una significatività ($p = 0,011$) dei titoli anticorpali tra classi di età: gli adulti e i giovani di un anno sono risultati significativamente più infestati rispetto ai piccoli.

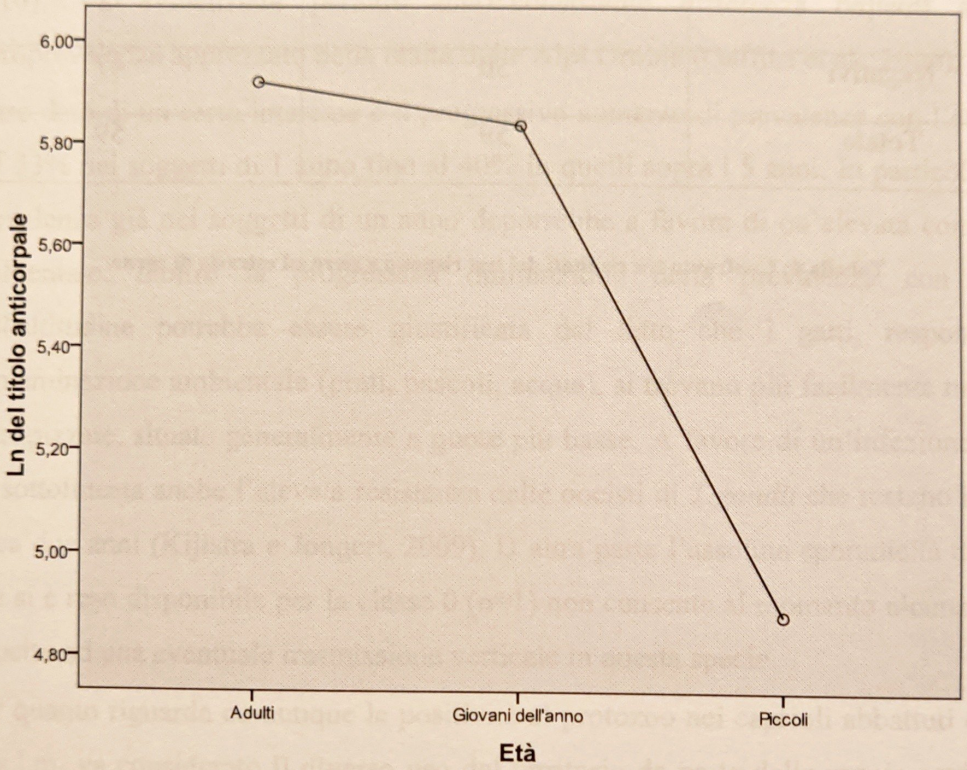

Grafico 7: confronto tra i titoli anticorpali riscontrati per ciascuna classe di età per i cervi della Valtellina.

4.2 CONFRONTO TRA TEST SIEROLOGICI

Per 59 individui, di cui si possedeva sia siero che estratto di carne dal cuore, è stato effettuato un confronto tra i rispettivi risultati dei test sierologici, per verificarne la concordanza (Tabella 4).

Confronto test diagnostici	Siero	Estratto di carne
Positivi	9	12
Negativi	50	47
Totale	59	59

Tabella 4: Confronto tra risultati del test rispetto a siero ed estratto di carne.

5. DISCUSSIONE

Relativamente alla Val d'Ossola i dati emersi mettono in evidenza come il capriolo sia la specie ospite che presenta la maggiore prevalenza (41%) tra le 4 monitorate. Questo valore risulta mediamente in linea con quanto emerso da precedenti indagini in diversi contesti europei (Gamarra et al., 2008; Vikoren et al., 2004; Panadero et al., 2010; Craeye et al., 2010). Va evidenziata peraltro una consistente differenza rispetto al 13% di sieroprevalenza apprezzato nella realtà delle Alpi Orobie (Gaffuri et al., 2006).

Altro dato di un certo interesse è il progressivo aumento di prevalenza con l'età, passando dal 33% nei soggetti di 1 anno fino al 40% in quelli sopra i 5 anni. In particolare l'elevata prevalenza già nei soggetti di un anno deporrebbe a favore di un'elevata contaminazione ambientale. Inoltre la progressiva diminuzione della prevalenza con l'aumentare dell'altitudine potrebbe essere giustificata dal fatto che i gatti, responsabili della contaminazione ambientale (prati, pascoli, acqua), si trovano più facilmente nelle zone più antropizzate, situate generalmente a quote più basse. A favore di un'infezione orizzontale va sottolineata anche l'elevata resistenza delle oocisti di *T.gondii* che restano infettanti per circa due anni (Kijlstra e Jongert, 2009). D'altra parte l'assoluta sporadicità del campione che si è reso disponibile per la classe 0 (n=1) non consente al momento alcuna valutazione rispetto ad una eventuale trasmissione verticale in questa specie.

Per quanto riguarda comunque le positività al protozoo nei caprioli abbattuti oltre i 1.500 m s.l.m. va considerato il diverso uso del territorio da parte della specie ospite nel corso dell'anno: infatti una buona parte di animali analizzati sono stati abbattuti a settembre, periodo in cui la specie utilizza un ben più ampio *range* di altitudine. Questo non esclude tuttavia che essi durante la stagione invernale si stabiliscano a quote più basse dove la probabilità di contagio è più elevata. Inoltre c'è da considerare anche la presenza di gatti negli alpeggi.

Per ciò che concerne l'analisi in rapporto al sesso, la maggiore prevalenza nei maschi potrebbe dipendere dalle differenze tra gli *home range* stagionali dei due sessi: essi variano nel periodo primaverile quando i maschi, probabilmente alla ricerca attiva dei territori, occupano *home range* di dimensioni maggiori rispetto a quelli delle femmine, per le quali al contrario, di norma non si osservano differenze significative tra le dimensioni medie dei territori stagionali (Mustoni et al., 2002).

Nel cinghiale la prevalenza del 15% risulta inferiore a quella attesa considerando che questi animali spesso vivono in zone antropizzate, quindi potenzialmente a rischio di contaminazione e sulla base di quanto noto in bibliografia (Bartova et al., 2006). Va detto però che la consistenza del campione analizzato per questa specie è piuttosto limitato (n= 20).

Dall'analisi dei cervi in Valtellina è emersa una prevalenza (21%), superiore a quella riscontrata in altri studi (7,7% da Vikoren et al.,2004 e 15,6% da Gauss et al.,2006), nonché da quella evidenziata dalla presente indagine in Ossola (4%). Anche in questo caso, si è proceduto a analizzare le prevalenze in relazione all'età e sesso. Considerando il fattore età, la sieronegatività dei piccoli (n=15) depone a favore dell'assenza di trasmissione verticale di *Toxoplasma*. La sieroprevalenza del 25% nei soggetti di un anno, che sale negli adulti al 31% mette in luce la probabilità che l'infezione aumenti con l'età. Inoltre l'alta prevalenza nei soggetti di un anno depone per una massiva contaminazione ambientale da parte delle oocisti. Analizzando invece i dati rispetto al sesso, la maggior positività delle femmine rispetto ai maschi, potrebbe essere giustificato dal fatto che in effetti le femmine con i piccoli durante il periodo invernale tendono a muoversi di più per la ricerca del cibo avvicinandosi ai centri abitati. D'altra parte il campione analizzato è rappresentato da una maggioranza di femmine rispetto ai maschi e questo fattore potrebbe falsare l'attendibilità dei risultati.

Vanno fatte ulteriormente delle considerazioni sulle due aree di studio del cervo: l'area oggetto di analisi in Valtellina presenta una ridotta superficie (1.400 ha) ed una elevata densità (40 capi per kmq) che porta i cervi, specialmente nella stagione invernale, ad avvicinarsi parecchio ai centri abitati e quindi alla frequentazione di zone più "rischiose" per la trasmissione di *T. gondii*. Al contrario, in Ossola la superficie è molto superiore (49.275 ha) e le densità molto inferiori (2 capi per kmq), andando a diminuire la probabilità di contagio in questa zona.

Valutando il confronto tra risultati ottenuti dal test effettuato su siero rispetto all'estratto di carne l'aumento di positività osservata in quest'ultimo rappresenta un fattore positivo perché nella realtà di campo è molto più facile reperire campioni di muscolo rispetto ad un buon siero. D'altro canto studi condotti a riguardo affermano che la sensibilità del test ELISA effettuato su siero sia del 90% con una specificità del 97% (Chong et al., 2006) mettendone in luce l'affidabilità, mentre la sensibilità scenderebbe a circa 76%. utilizzando estratto di carne (Hill et al., 2006). In questo senso il dato emerso dalla presente tesi contrasta con quanto noto in bibliografia e potrebbe essere riconducibile ad un'alterazione

della risposta del test dovuta probabilmente alla grossa componente proteica presente nell'estratto di carne. Va sottolineato che nonostante l'estratto sia stato accuratamente depurato da elementi grossolani e mantenuta la maggiore limpidezza possibile, è plausibile che qualche componente proteica possa comunque interferire con il legame tra l'antigene P30 e gli anticorpi dei soggetti. Va sottolineato che anche in questo caso la limitatezza del campione (solo di nove sieropositivi era disponibile anche il cuore) non permette di trarre conclusioni certe ma, alla luce di quanto emerso, l'analisi confermerebbe la riduzione di sensibilità riscontrata precedentemente in bibliografia.

6. CONCLUSIONI

L'esperienza condotta evidenzia innanzitutto le difficoltà organizzative per un'attività di monitoraggio in ambito di popolazioni selvatiche a vita libera e l'importanza della collaborazione tra tecnici, ricercatori, cacciatori ed Enti territoriali per aumentare la qualità e la quantità di un campione.

A livello operativo, va osservata la forte discrepanza tra numero di animali abbattuti e i corrispondenti campioni prelevati in particolare per quanto riguarda quelli di sangue, la cui raccolta è affidata totalmente alla volontà del cacciatore, che spesso anche se è ben disposto alla raccolta, preleva o conserva il campione in modo sbagliato. Tale problema appare superabile attraverso un attivo coinvolgimento della componente venatoria, quanto mai auspicabile attraverso un'adeguata formazione. In effetti l'attività venatoria, a prescindere da valutazioni di ordine etico, non può essere fine a se stessa come un mero prelievo faunistico, ma deve essere un momento basilare per la raccolta di dati, a partire da quelli con valenza sanitaria.

Il campionamento effettuato nel Parco dello Stelvio si è dimostrato valido con la raccolta di campioni da quasi tutti i capi abbattuti (nonostante anche in questo caso, il campionamento è assolutamente sbilanciato nei confronti degli organi, con la raccolta di soli 24 campioni di sangue su un totale di 48 soggetti monitorati). La situazione in questa realtà è comunque diversa da quella ossolana, in quanto gli animali abbattuti venivano rapidamente consegnati al centro di controllo senza essere stati eviscerati permettendo un'ampia raccolta di campioni dal personale addetto. Nonostante ciò anche in questa realtà, sebbene i campioni di sangue siano stati prelevati correttamente, alcuni si sono dimostrati di scarsa qualità, probabilmente per il tempo trascorso tra abbattimento e prelievo (animali presi in zone più lontane); altro inconveniente, per certi animali, era il fatto che dopo il trasporto al centro avevano perso praticamente tutto il sangue quindi non era più possibile la sua raccolta. Si evince quindi che per quanto riguarda la raccolta del sangue la soluzione migliore sia quella di formare correttamente il cacciatore perché quanto prima dopo l'abbattimento raccolga il sangue dalle giugulari o direttamente dalla cavità cardiaca, e lo conservi in maniera adeguata fino alla consegna ai centri di controllo.

Dalle analisi effettuate in questo studio si evidenzia come *T.gondii* circoli abbondantemente all'interno del territorio, creando diverse implicazioni a livello zoonosico e gestionale. D'altra parte per una corretta analisi del rischio zoonosico andrebbe definito il

ceppo di appartenenza e quindi la sua effettiva patogenicità per l'uomo. In questo senso sui campioni di animali sieropositivi è stata avviata un'indagine con utilizzo di PCR che permetta di isolare e genotipizzare il ceppo del patogeno presente. In effetti in Francia è stato isolato in più specie di ungulati selvatici il ceppo II, patogeno per l'uomo e gli animali domestici (Aubert et al., 2010).

In questo senso, a titolo precauzionale è auspicabile proporre alcune misure gestionali da mettere in atto a tutela della salute umana. In effetti situazioni a rischio possono verificarsi già a livello di eviscerazione degli animali, piuttosto che alla manipolazione delle loro carcasse (Tenter et al., 2000). Considerando poi il consumo di carne cruda o poco cotta è la più frequente via di infezione nell'uomo (Kapperud et al., 1996; Baril et al., 1999; Cook et al., 2000; Kijlstra e Jongert, 2008), è evidente come il problema non possa essere trascurato nel caso in cui venga consumata quella di ungulati selvatici.

La manovra più corretta da mettere in atto sarebbe di stabilire, uniformare e standardizzare un programma di controllo sistematico delle carcasse mediante, PCR che permetterebbe di individuare i soggetti positivi ed attuare procedure atte alla bonifica delle loro carni. Questi esami sono parecchio costosi e comunque di difficile accesso nei confronti dei singoli consumatori; una possibile soluzione sarebbe fornire a quest'ultimi un ente locale su cui appoggiarsi per lo svolgimento di queste analisi.

Per quanto riguarda la bonifica delle carni nei confronti di Toxoplasma si possono effettuare diverse operazioni. Il trattamento di bonifica più semplice ed economico è rappresentato dalla cottura delle carni, infatti sopra i 67°C si ha l'immediata distruzione del parassita (Dubey et al., 1990). Altra metodica di inattivazione per *T. gondii* è rappresentata dal congelamento delle carni, vari studi propongono diverse procedure tenendo in considerazione temperatura e tempistiche di refrigerazione: Kuticic e Wikerhauser (1996) hanno riscontrato che si ottiene l'inattivazione dopo 4 giorni ad una temperatura compresa tra -7°C e -12°C, Djurkovic-Djakovic e Milenkovic, (2000) affermano che il patogeno venga inattivato dopo tre giorni a -20°C. Tenendo conto che i comuni congelatori raggiungono queste temperature, è possibile fornire una buona metodica di bonifica delle carni accessibile alla maggioranza delle persone. D'altro canto va sottolineato che il congelamento porta degli svantaggi causando un impoverimento delle qualità organolettiche e nutrizionali della carne. In effetti durante questo processo l'acqua contenuta all'interno delle cellule forma dei cristalli di ghiaccio che vanno a ledere la membrana cellulare determinando la perdita di sostanze nutritive ed impoverendo dal punto di vista organolettico la qualità della carne. Per ovviare a ciò si può utilizzare un

abbattitore di temperatura, che diminuisce quest'ultima molto velocemente surgelando la carne e cosi mantenendone una buona qualità; questi macchinari però hanno dei costi elevati e sono difficilmente proponibili per la bonifica a livello casalingo e delle piccole realtà commerciali.

Per quanto riguarda l'inattivazione del patogeno nelle carni mediante salagione, pratica di interesse rilevante all'interno della realtà italiana alcuni studi hanno evidenziato che le cisti tissutali sono inattivate dalle procedure commerciali di stagionatura con sale ed altri additivi o l'affumicatura a basse temperature (Dubey, 1997; Lunden e Uggla, 1992). In ogni caso, i tempi di sopravvivenza delle cisti tissutali, varia in relazione alla concentrazione del sale nella soluzione ed alla temperatura di conservazione. In condizioni sperimentali, si è visto che le cisti vengono inattivate in una soluzione al 6% di NaCl a temperature tra i 4 e i 20°C, ma erano in grado di sopravvivere per alcune settimane in soluzioni acquose con concentrazioni di sale inferiori (Dubey, 1997). I salumi prodotti a livello industriale si possono definire sicuri, ad alto rischio rimangono invece i salumi prodotti a livello familiare, che tra l'altro possono essere proprio quelli in cui vengono utilizzate carni di ungulati selvatici. E' stato infatti dimostrato che i processi di salagione nei salumi realizzati a livello familiare non sempre sono in grado di inattivare le cisti: (Jamra et al., 1991). Difatti in questo studio di Jamra et al., (1991), si è riscontrato che le cisti tissutali di *Toxoplasma* venivano inattivate dal 3% di sale da tavola in 3-7 giorni, tale periodo può risultare superiore ai tempi di stagionatura normalmente utilizzati per alcuni tipi di salumi prodotti a livello familiare (soprattutto quelli poco stagionati, o addirittura freschi) e potrebbe indicare che il solo impiego del sale sia insufficiente ad inattivare le cisti di *Toxoplasma*.

Un altro tipo di prevenzione è rappresentata da una corretta formazione del personale che maneggia le carni degli ungulati selvatici, dal cacciatore stesso e dai vari utilizzatori, tenendo in considerazione che con la possibilità di effettuare la cessione primaria, (permette la cessione da parte del cacciatore di un capo all'anno di selvaggina di grossa taglia a ristoranti, piccoli esercizi commerciali e singoli privati). Tale possibilità che non necessita di visita regolare al macello e la responsabilità sulla salubrità delle carni ricade sul somministratore finale, comporta un aumento del consumo di queste carni. Queste persone vanno informate sui rischi inerenti al consumo delle carni, ai prodotti da esse derivati ed alle manovre da mettere in atto per garantire la sicurezza del consumatore, a partire dalle buone norme igieniche di lavorazione come la scrupolosa pulizia dell'attrezzatura e dei piani di lavoro, inoltre metterli a conoscenza dei vari processi (sopra

citati) atti alla bonifica delle carni. Per quanto riguarda invece la possibile prevenzione rispetto la diffusione della patologia negli animali selvatici si può far ben poco, il metodo più valido sarebbe quello di impedire la contaminazione dei pascoli con le feci dei gatti infetti, ma questa manovra risulta però estremamente difficile anche per la presenza di gatti randagi, o comunque lasciati liberi dai loro proprietari.

Nel complesso la complessità della problematica legata alla circolazione di *T.gondii* in ambito di popolazioni selvatiche a vita libera evidenzia la necessità di un adeguato approfondimento delle conoscenze epidemiologiche, sia rispetto alle modalità di trasmissione che alla definizione dei ceppi circolanti, in particolare per la loro eventuale valenza zoonosica. Peraltro a livello gestionale è quanto mai auspicabile un'azione di educazione sanitaria e sensibilizzazione dei diversi fruitori, a partire dal cacciatore al consumatore, rispetto ai possibili rischi legati a detta infezione in ambito di ungulati selvatici.

7. BIBLIOGRAFIA

- Anderson R. M, and May R. M (1979). Population biology of infectious diseases: Part I. *Nature* 280, pp. 361-367.

- Andreoletti O., Budka H., Buncis S., Colin J. D., De koeijer A., Griffin J., Havelaar A., Hope J., Klein G., Kruse H., Magnino S., Lòpez A. M., McLauchlin J., Nguyen-Thé C., Noeckler K., Noerrung B., Maradona M. P., Roberts T., Vagsholm I., Vanopdenbosch E., (2007). Surveillance and monitoring of *Toxoplasma gondii* in humans, food and animals. Scientific opinion of the panel on biological Hazards. *The EFSA journal*, 583.

- Aubert D, Ajzenberg D., Richomme C., Gilot-Fromont E., Terrier M.E., de Gevigney C., Game Y., Maillard D., Gibert P., Dardé M.L., Villena I., 2010. Molecular and biological characteristics of Toxoplasma gondii isolates from wildlife in France. *Veterinary parasitology,* 171, pp. 346-349.

- Bartova E., Sedla´k K., Litera´k I., (2006). Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in wild boars in the Czech Republic. *Veterinary parasitology,* 142, pp. 150-153.

- Ballarini G., Martelli P., (2000). The false myth of toxoplasmosis in salami. *Acta biomed ateneo parmense*, 71 suppl. 1

- Baril L., Ancelle T., Goulet V., Thulliez P., Tirard-Fleury V., Carme B., (1999) . Risk factors for *toxoplasma* infection in pregnancy : a case control study in France . *Scand. J. Infect Dis.* 31, pp. 305-309 .

- Bergagna S., Zoppi S., Ferroglio E., Gobetto M., Dondo A., Di Giannatale E., Gennero M.S., Grattarola C. (2009). Epidemiologic Survey for Brucella suis Biovar 2 in a Wild Boar (*Sus scrofa*) Population in Northwest Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, Vol. 45(4), pp. 1178–1181.

- Chom-Kyu C., Wooseog J., Hak-Yong K., Dong-Jun A., Hye-Young J., Jeong-Eun R., A-Ra K., Yong-Joo K., Sung-Jong H., Zaoshou Y., Ho-Woo N., (2011). Development and clinical evaluation of a rapid serodiagnostic test for *toxoplasmosis* of cats using recombinant SAG1 antigen . *Korean J Parasital* ,Vol. 49, No 3, pp. 207-212 .

- Citterio C.V., Bragagna P., Novelli E., Giaccone V. (2011). Approach to game hygiene in the province Belluno (Italy). *Training to meat microbiology*. Game meat hygiene in focus. 3, pp. 267-270.
- Comunicato stampa del parco nazionale dello Stelvio 13/02/2012.
- Cook A.J.C., Gilbert R.E., Buffolano W., Zufferey J., Petersen E., Jenum P.A., Foulon W., Semprini A.E., Dunn D.T. , (2000) . Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women : European multicenter case-control study. *Br. Med. J* 321 ,pp. 142-147.
- Daszak P., Cunningham A. A., Hyatt A. D. (2000). Emerging Infectious Disease of Wildlife- Threats to Biodiversity and Human Health. *Science*, Vol. 287, pp. 443-449.
- DeCraeye S.,*, Speybroeck N., Ajzenberg D., Dardé M.L., Collinet F., Tavernier P., VanGucht S., Dorny P., Dierick K., (2010). *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wildlife: Common parasites in Belgian foxes and Cervidae?. . *Veterinary parasitology,* journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar.
- Dini V., Ferroglio E., Serraino , Mignone W., Sanguinetti V., Bollo E., Rossi L. (2003). Epidemiologia delle micobatteriosi nel cinghiale in Liguria. *J. Mt. Ecol.*, 7 (Suppl.), pp. 145-153.
- Djurkovic-Diakovic O., Milenkovic V., (2000) Effect of refrigeration and freezing on survival of Toxoplasma gondii tissue cists . *Acta Vet. Beograd* 50, pp. 375-380.
- Dondo A., Zoppi S., Rossi F., Chiavacci L., Barbaro A., Garrone A., Benedetto, Goria M. (2007). Mycobacteriosis in wild boar: Results of 2000-2006 activity in North-Western Italy. *Epidémiol. et santé anim.*, Vol. 51 pp. 35-42.
- Dubey J. P., Graham D. H., De Young R. W., Dahl E., Eberhard M. L., Nace E. K., Won K., Bishop H., Punkosdy G., Sreekumar C., Vianna M. C. B., Shen S. K., Kwok O. C. H., Sumners J. A., Demarais S., Humphreys J. G., and Lehmann T., (2004). Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. *J. Parasitol.,* 90(1), pp. 67–71.
- Dubey J.P., (1997) . Survival of toxoplasma gondii tissue cysts in 0,85-6% NaCl solutions at 4-20° C. – *J. Parassitol*. 83 –pp. 946-949 .
- Dubey J.P., Kotula A.W., Sharar A., Andrews C.D., Lindsay D.S., (1990) Effect of high temperature on infectivity of Toxoplasma gondii tissue cysts in pork . *J Parasitol*. 76 pp. 201-204 .

- Ferroglio E., Rossi L., Gennero S. (2000). Lung-tissue extract as an alternative to serum for surveillance for brucellosis in chamois. *Preventive Veterinary Medicine* ,Vol. 43, pp. 117-122.
- Gaffuri A., Giacometti M., Tranquillo V.M., Magnino S., Cordioli P., Lanfranchi P. (2006). Serosurvey of roe deer, chamois and domestic sheep in the central Italian Alps. *Journal of Wildlife Diseases*, 42, pp. 685-690.
- Gamarra J.A., Cabezo´n O., Pabo´n M., Arnal M.C., Luco D.F., Dubey J.P., Gorta´zar C., Almeria S. (2008). Prevalence of antibodies against *Toxoplasma Gondii* in roe deer from Spain. *Veterinary parasitology*, 153, pp. 152-156.
- Gauss C.B.L., Dubey J.P., Vidal D., Cabezo´n O., Ruiz-Fons F., Vicente J., Marco I., Lavin S., Gortazar C., Alme ı´a S. (2006). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in red deer (Cervus elaphus) and other wild ruminants from Spain. *Veterinary parasitology,*136, pp. 193-200.
- Hill A.E., Benedetto S.M.C., Coss C., McCrary J.L., Fournet V.M., Dubey J.P., (2006) Effect of time temperature on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin . *J. food prot*. 67, pp. 1961-1965 .
- Hill D. E., Chirukandoth S., Dubey J.P., Lunney J. K., Gamble H. R. (2006). Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. *Veterinary parasitology*, 141, pp. 9-17.
- Hill D.E., Sreekumar C., Gamble H.R., Dubey J.P., (2004). Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin . *J. Food Prot*. 67 pp. 2230-2233 .
- IZS Brescia, (http://www.izsler.it/izs_home_page/archivio_news00001344_Il cacciatore produttore primario.html
- Jamra L.M., Martins M.C., Vieira M. De P.,(1991). Effect of table salt on *Toxoplasma gondii* . *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 33, pp. 359-363,
- Jones K.E., Patel N.G., Levy M.A., Storeygard A., Balk D., Gittleman J.L., Daszak P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature,* 451, pp. 990-993.
- Kapperud G., Jenum P.A., StrayPedersen B., Melby K.K., Eskild A., Eng J., (1996) . Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy – results of a prospective case-control study in Norway . *Am. J. Epidemiol*, 144 pp. 405-412 .
- Kijlstra A anh Jongert E. (2009). *Toxoplasma* safe meat: close to reality? *Trends Parassitol,* 25/1pp. 18-22.

- Kijlstra A:, Meerburg B., Cornelissen J. ,De Craeye S., Vereijken P., Jongert E., (2008) . The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs . *Vet. Parasitol. in press* (epub ahead of print) .
- Kulken T., Leighton F. A., Fouchier R. A. M., LeDuc J. W., Peiris J. S. M., Schudel A., Stohr K., Osterhaus A. D. M. E. (2005). Pathogen surveillance in animals. *Science*, 209, pp. 1680-1681.
- Kuticic V., Wikerhauser T., (1996) Studies of the effect of various treatments on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts and oocysts, Toxoplasma gondii . *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*. 219 pp. 261-265 .
- Lista OIE 2012. http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2012/
- Lundèn A., Uggla A. (1992). Infectivity of *Toxoplasma gondi*i in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. Int J Food Microbiol. Mar-Apr;15(3-4), pp. 357-63.
- Magnino S., Frasnelli M., Fabbi M., Bianchi A., Zanoni M.G., Merialdi G., Pacciarini M.L., Gaffuri A. (2011). The monitoring of selected zoonotic diseases of wildlife in Lombardy and Emilia-Romagna, northern Italy. *Game meat hygiene in focus*. Section 3, 223-244, DOI: 10.3920/978-90-8686-723-3_17.
- Masala G., Porcu R., Daga C., Denti S., Patta C., Tola S., (2007). Detection of phatogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *J. Vet. Diagn. Invest*, 19(1) pp., 96-8.
- Mattews F. (2009). Zoonosis in wildlife: Integrating Ecology into Management. *Advances in Parassitology*, Vol. 68, pp. 185-209.
- May R. M, and Anderson R. M (1983). Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. *Proc. R. Soc. Lond.* B 219, pp. 281-313.
- Montagnaro S., Simona Sasso S., De Martino L., Longo M., Iovane V., Ghiurmino G., Pisanelli G., Nava D, Baldi L., Pagnini U. (2010). Prevalence of Antibodies to Selected Viral and Bacterial Pathogens in Wild Boar (*Sus scrofa*) in Campania Region, Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, Vol. 46(1) pp. 316-319.
- Mustoni A., Pedrotti L., Zanone E., Tosi G. (2002). Ungulati delle alpi. Biologia-riconoscimento- Gestione. Nitida Immagine Editrice.

- Panadero R., Painceira A., López C., Vázquez L., Paz A., Díaz P., Dacal V., Cienfuegos S., Fernández G., Lago N., Díez-Baños P., Morrondo P (2010). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). *Veterinary Science*,88, pp. 111-115.
- Pedrotti L., Duprè E., Preatoni D., Toso S. (2001). Banca Dati Ungulati. Status, distribuzione, consistenza, gestione, prelievo venatorio e potenzialità delle popolazioni di Ungulati in Italia. Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica "Alessandro Ghigi". 9-13.
- Read A. F., Albon S. D., Antonovics J., Apanius, V., Dwyer G., and Holt R. D. (1995). Genetics and evolution of infectious diseases in natural populations. In " Ecology of Infectious Diseases in Natural Populations." (Grenfell and Dobson, eds.), pp. 450-477.
- Regione Piemonte(2002-2011)www.regione.piemonte.it/agri/osserv_faun/index.htm
- Romano F., Motta A, Melino M, Negro M, Gavotto G, Decasteli L, Careddu E, Bianchi C, Bianchi DM, Pozio E. (2011). Investigation on a focus of human trichinellosis revealed by an atypical clinical case: after wild-boar (Sus scrofa) pork consumption in northern Italy. *Parasite*, 18(1), pp. 85-7.
- Tenter A. M., Heckeroth A. R., Weiss L. M., (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30, pp.,1217-1258.
- Viganò R., Borretti M., (2009). - Piano di programmazione per la gestione degli ungulati selvatici ruminanti 2009/2013. Comprensorio Alpino VCO2 - Ossola Nord.,
- Vikøren T., Tharaldsen J., Fredriksen B., (2004). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild red deer, roe deer, moose, and reindeer from Norway. *Veterinary parasitology,* 120, pp. 159-169.
- Winkelmayer R. (2010). Igiene ed ispezione della carne di selvaggina in Austria e in E.C.. Evento formativo: "il cacciatore: produttore primario". Brescia, 5 ottobre 2010. http://formazione.izs.glauco.it/Index.aspx.

8. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Paolo Lanfranchi, la dottoressa Nicoletta Formenti e il dottor Roberto Viganò che mi hanno seguito, consigliato ed aiutato durante tutto lo svolgimento della tesi.

La direzione del Parco Nazionale dello Stelvio, settore lombardo, in particolare il dottor. Luca Pedrotti e il dott. Alessandro Gugiatti che ci hanno permesso di effettuare il campionamento e ci hanno fornito i dati necessari.

L'ASL di Sondrio in particolare al dott. Armando Scarì per la sua indispensabile collaborazione.

Il Comprensorio Alpino VCO2 in particolare a. Mauro Borretti e Nadia Matli che ci hanno permesso di effettuare il campionamento e ci ha fornito molti dati.

I cacciatori, che hanno collaborato nella raccolta dei campioni.

La dottoressa Alessandra Gaffuri, il dottor Franco Paterlini e tutto il gruppo della sezione di Diagnostica dell'IZLER, sez. di Bergamo, per la preziosa collaborazione nell'analisi dei campioni.

I miei genitori i nonni e il Laio che mi hanno sostenuto moralmente ed economicamente nella mia lunga carriera di studio.

I miei fratelli che mi hanno sopportato durante questi anni di università.

A Giulia che mi ha dato la serenità e la forza per superare i momenti difficili ed arrivare a questo traguardo.

Ringrazio i miei compagni di studio con i quali ho passato tanti bei momenti, in particolare:

Eli, Eros, Ste, Ele, Gio, Robbè, Saretta, Ale.

Lorenz, Fabio e Ivan.

Dante, Fede, Fausto e Luca.

A Ingrid e Enri.

Al Vegetti.

Marcolino, Save, Denis e Marcone.

Serena e Silvia

Alessandra, Vittoria e Cesare

Jonny e Cate.

Ringrazio tutti i miei amici che da sempre mi hanno sostenuto e mi sono stati vicini.

Bele, Guido, Omar, Rondo, Toio, Cisti, Budin, Tisic, Fabio, Piolo, Mirco, Juri, Gloria, Giorgio, Pata Laura.

Ringrazio anche tutti quelli che sicuramente mi sono dimenticato.