



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
(XXIX CICLO)

Rilievi Epidemiologici e Biomolecolari della
Toxoplasmosi in Sardegna.

Docente Guida

Prof. Antonio Scala

Correlatore

Dott.ssa Anna Paola Pipia

Il Coordinatore

Prof. Salvatore Naitana

Tesi di dottorato della

Dott.ssa Romina Panzalis

ANNO ACCADEMICO 2016 - 2017

INDICE

INTRODUZIONE E OBIETTIVI GENERALI	1
CAPITOLO I	5
1. GENERALITA' SULLA TOXOPLASMOSI E SULLE SUE IMPLICAZIONI ZONOSICHE	5
1.1. AGENTE EZIOLOGICO	5
1.1.1. Riferimenti Storici: La scoperta di <i>T. gondii</i>	5
1.1.2. Classificazione e struttura di <i>T. gondii</i>	7
1.1.3. Stadi morfologici infettanti di <i>T. gondii</i>	8
1.1.4. Ciclo biologico	12
1.1.5. Suscettibilità dell'ospite	16
1.1.6. Genomica, genotipi e virulenza	18
1.1.7. Ruolo del gatto	21
1.2. TOXOPLASMOSI NELL'UOMO	25
1.2.1. Epidemiologia	25
1.2.2. Modalità di trasmissione del <i>T. gondii</i> e fattori di rischio per l'uomo	25
1.2.3. Patogenesi.....	29
1.2.4. Aspetti clinici	30
1.2.5. Riferimenti legislativi sulla Toxoplasmosi.....	32
CAPITOLO II	38
2. TOXOPLASMOSI NEGLI ANIMALI DA REDDITO E RISCHI PER L'UOMO	38
2.1. TOXOPLASMA GONDII IN ALLEVAMENTO	38
2.1.1. Toxoplasmosi nei piccoli ruminanti	38
2.1.2. Toxoplasmosi nel suino.....	47
2.1.3. Fattori di rischio negli animali da reddito	49
2.2. TOXOPLASMA GONDII NEGLI ANIMALI AL MATTATOIO	53
BIBLIOGRAFIA.....	56
TABELLE E GRAFICI	76
DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA	77
LISTA DEGLI ACRONIMI	84
CAPITOLO III	85
3. FASE SPERIMENTALE 1 – VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DELL'ELISA E PCR NEI CONFRONTI DI TOXOPLASMA GONDII NELL'OVINO.	85
3.1. BACKGROUND	85
3.2. OBIETTIVO	95

3.3. MATERIALI E METODI	96
3.3.1. Indagine sierologica	97
3.3.2. Indagine biomolecolare	98
3.3.3. Analisi dei dati	100
3.4. RISULTATI	101
3.4.1. Indagine sierologica	101
3.4.2. Indagine biomolecolare	101
3.5. CONSIDERAZIONI	103
BIBLIOGRAFIA	107
DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA	112
TABELLE E GRAFICI	113
CAPITOLO IV	115
4. FASE SPERIMENTALE 2 – SIEROEPIDEMIOLOGIA NELLE PECORE E NELLE CAPRE CONVIVENTI E TREND STAGIONALE DELLA TOXOPLASMOSSI IN SARDEGNA.	115
4.1. BACKGROUND	115
4.2. OBIETTIVO	117
4.3. MATERIALI E METODI	118
4.4. RISULTATI	120
4.5. CONSIDERAZIONI	123
4.6. CONCLUSIONI	128
BIBLIOGRAFIA	129
TABELLE E GRAFICI	131
CAPITOLO V	137
5. FASE SPERIMENTALE 3 – SIEROPREVALENZA E DINAMICA DEGLI ANTICORPI NEI CONFRONTI DI TOXOPLASMA GONDII IN AGNELLI DI RAZZA SARDA NATI DA MADRI SIEROPOSITIVE E SIERONEGATIVE. 137	
5.1. BACKGROUND	137
5.2. OBIETTIVO	139
5.3. MATERIALI E METODI	140
5.4. RISULTATI	142
5.5. CONSIDERAZIONI	144
5.6. CONCLUSIONI	147
BIBLIOGRAFIA	148
TABELLE E GRAFICI	150

CAPITOLO VI	153
6. FASE SPERIMENTALE 4 – INDAGINE PRELIMINARE SULLA TOXOPLASMOSI DEL SUINO IN SARDEGNA. 153	
6.1. BACKGROUND	153
6.2. OBIETTIVI.....	155
6.3. MATERIALI E METODI	156
6.4. RISULTATI	160
6.5. CONSIDERAZIONI	162
6.6. CONCLUSIONI	171
BIBLIOGRAFIA	172
DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA	176
TABELLE E GRAFICI	177
CONCLUSIONI GENERALI	179

CAPITOLO I

INTRODUZIONE E OBIETTIVI GENERALI

La toxoplasmosi, è una zoonosi parassitaria sostenuta da *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), un microrganismo protozoo ubiquitario di natura coccidica (Dubey J.P., 2010). Attualmente *T. gondii* è uno degli organismi maggiormente studiati, a causa della sua importanza medica e veterinaria (Weiss L.M. & Dubey J.P., 2009; Buxton D. *et al.*, 2007).

Ampiamente diffusa nell'uomo e negli animali di tutto il mondo (Dubey J.P., 2009; Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012), la toxoplasmosi, è stata riconosciuta dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA) tra le patologie emergenti di origine alimentare con la più alta incidenza umana (EFSA, 2007; Dubey J.P. 2000; Kijlstra A. & Jongert E., 2008; Dorny P. *et al.*, 2009). Rappresenta una malattia ad alto rischio di diffusione, in quanto il protozoo è presente in numerosi alimenti e spesso è difficile dimostrare una correlazione diretta tra i casi clinici e gli alimenti responsabili.

Si stima che circa un terzo della popolazione mondiale abbia contratto l'infezione (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012; Weiss L.M. & Kim K., 2013; Hill D.E. & Dubey J.P., 2015; Tenter A.M. *et al.*, 2000; Saadatnia G. & Golkar M., 2012). La prevalenza della toxoplasmosi varia ampiamente nei diversi Paesi (Nogareda F. *et al.*, 2014; Jones J.L. *et al.*, 2014; Flegr J. *et al.*, 2014) ed è fortemente influenzata dalle abitudini alimentari e igieniche e dalla suscettibilità dell'ospite (Hill D.E. *et al.*, 2005; Antczak M. *et al.*, 2016; Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012).

Nell'uomo si ritiene che solo una piccola percentuale di infezioni da *T. gondii* venga acquisita per trasmissione verticale materno-fetale, mentre nella maggior parte dei casi la malattia viene contratta per via orizzontale attraverso il consumo di carne cruda o insufficientemente cotta che alberga cisti tissutali parassitarie, oppure per ingestione di cibo, acqua o terra precedentemente contaminati da oocisti infettanti disseminate nell'ambiente dai felini, ospiti definitivi del parassita (Sukthana Y., 2006; Tenter A.M. *et al.*, 2000). Nei Paesi occidentali e asiatici il consumo di carne poco cotta è ritenuta la causa più frequente di infezione (Cook A.J.C. *et al.*, 2000; Fallah M. *et al.*, 2008; Dorny P. *et al.*, 2009) che ha maggior impatto sulla salute pubblica (Kijlstra A. & Jongert E., 2008). Ma evidenze indirette sulla sieroprevalenza dell'infezione nei vegetariani stretti, indicano che anche le oocisti giocano un importante ruolo nell'epidemiologia della toxoplasmosi (Hall S.M. *et al.*, 1999).

A sostegno di questa ipotesi, il consumo di verdure crude e frutta mal lavate è stato identificato tra le principali fonti d'infezione nelle gestanti (Cook A.J.C. *et al.*, 2000; Antoniou M. *et al.*, 2007; Cavalcante G.T. *et al.*, 2006; Fallah M. *et al.*, 2008; Liu Q. *et al.*, 2009).

I principali fattori di rischio per la toxoplasmosi umana sono correlati all'assunzione di carne cruda e di preparati di carne insaccata (Leroy V. *et al.*, 2005) e all'utilizzo inadeguato di alcuni metodi di cottura della carne, come il barbecue (Zhou J. & Tao L., 2015) o il microonde (Lunden A. & Ugglia A., 1992), che potrebbero non essere in grado di uccidere i bradizoiti contenuti nelle cisti tissutali, inoltre il rischio associato al consumo dei diversi tipi di carne varia grandemente tra i diversi Paesi come testimoniato dai lavori presenti in bibliografia (Amdouni Y. *et al.*, 2017; Cook A.J.C. *et al.*, 2000; Dubey J.P., 2009a; Dubey J.P., 2009b; Dubey J.P., 2010).

Nell'uomo la toxoplasmosi è asintomatica nei soggetti adulti immunocompetenti (Munoz M. *et al.*, 2011), al contrario è responsabile di aborto ed una serie di complicanze alla nascita, quali retinocoroiditi, idrocefalo, ritardo mentale, attacchi epilettici, o addirittura morte del feto se contratta per via congenita (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012; Jeffrey D. *et al.*, 2005; Jones J.L. *et al.*, 2003; Wallace G.R. & Stanford M.R., 2008), e causa manifestazioni cliniche a esito spesso fatale in pazienti immunocompromessi (Weiss L.M. & Kim K., 2013; Yildiz K. *et al.*, 2014; Tenter A.M. *et al.*, 2000; Weiss L.M. & Dubey J.P., 2009; Amdouni Y. *et al.*, 2017; Baril L. *et al.*, 1999). Non è noto se la diversa manifestazione dei segni clinici sia legata al diverso genotipo, alla variabilità della specie ospite o ad altri fattori (Dubey J.P., 2008).

Anche negli animali di maggiore interesse zootecnico la toxoplasmosi si manifesta per lo più subclinicamente. Fanno eccezione ovini e caprini nei quali *T. gondii* è causa di fenomeni di aborto, mortinatalità e infertilità (Borde G. *et al.* 2006; Dubey J.P., 2009b). In alcuni Paesi la sua presenza è di rilevanza economica per il settore ovino e caprino, poiché arreca notevoli perdite produttive negli allevamenti (Unzaga J.M. *et al.*, 2014; Buxton D. *et al.*, 2007; Chessa G. *et al.*, 2014; Innes E.A. *et al.*, 2009; Masala G. *et al.*, 2003; 2007).

Negli ultimi anni l'attenzione verso la toxoplasmosi degli animali allevati per la produzione di alimenti, è aumentata in virtù del loro ruolo assunto nella trasmissione di questa grave zoonosi all'uomo attraverso il contatto diretto o il consumo di prodotti carnei crudi o poco cotti (Cenci-Goga B.T. *et al.*, 2013). In Europa numerosi sono i casi di toxoplasmosi epidemiologicamente correlati al

consumo di alimenti contaminati e in particolare di carne ovina e suina (Guo M. *et al.*, 2015; Juránková J. *et al.*, 2014; Bezerra R.A. *et al.*, 2012; EFSA, 2007; Cook A.J.C. *et al.*, 2000; Dubey J.P., 2010; Yekkour F. *et al.*, 2017; Saadatnia G. & Golkar M., 2012; Camossi L.G. *et al.*, 2011; Holec-Gąsior L. *et al.*, 2015; Chessa G. *et al.*, 2014). Anche il consumo di carne di capra può essere fonte di toxoplasmosi umana, a causa dell'alta suscettibilità di questa specie a *T. gondii*. In alcuni Paesi la carne caprina distribuita sul mercato ha mostrato valori di sieroprevalenza spesso elevati (77%) (Neumayerova H. *et al.*, 2014; Dubey J.P. & Beattie C.P., 1988; Tenter A.M. *et al.*, 2000; EFSA, 2007; Dubey J.P. *et al.*, 2011; Hill D.E. & Dubey J.P., 2013), tuttavia non è stato possibile quantificare il livello di infezione che consenta un'appropriata valutazione del rischio (Dubey J.P. *et al.*, 2011).

L'attuale preoccupazione da parte della Comunità Europea, nei riguardi dei rischi sanitari connessi al consumo di alimenti di origine animale ed al ruolo da essi assunto nella trasmissione di *T. gondii* all'uomo è stata avvalorata dagli studi scientifici condotti dal *panel* sui pericoli biologici (*Biological Hazards*) dell'EFSA (EFSA, 2007) che, sulla base delle conoscenze acquisite, ha ritenuto opportuno incoraggiare gli Stati membri alla raccolta di dati epidemiologici soprattutto negli animali ad interesse zootecnico allevati per la produzione di carne.

Nonostante ciò in Italia, Sardegna compresa, non si annoverano molti lavori inerenti aspetti epidemiologici, immunologici e biomolecolari (Rinaldi L. & Scala A., 2008; Natale A. *et al.*, 2006; Masala G. *et al.*, 2003; 2007; Tola S. *et al.*, 2002; Scala A. *et al.*, 2008; Chessa G. *et al.*, 2014)(Tabella 1), per cui si è ritenuto opportuno indirizzare in questo senso l'attività di ricerca sperimentale per questo corso di Dottorato in Scienze Veterinarie, con l'obiettivo di colmare, almeno in parte tali lacune. Tutto questo anche al fine di fornire utili strumenti per la stima del rischio di trasmissione all'uomo di questa zoonosi attraverso la catena alimentare tra le specie animali ritenute più importanti (ovina, caprina e suina) presenti nel territorio sardo.

La ricerca è stata focalizzata su queste specie animali anche perché queste rappresentano in Sardegna dei settori zootecnici di particolare rilievo socio-economico. In particolare gli ovini da latte sono presenti nell'isola in quantità numericamente significative rispetto agli altri animali da reddito, poiché la Sardegna detiene 3. 300. 450 capi (ISTAT, 2016), la cui carne proveniente specialmente dalle pecore adulte a fine carriera e dai rispettivi agnelli, viene comunemente destinata al consumo umano, costituendo una possibile fonte di infezione.

Altrettanto importante risulta il settore caprino con gli oltre 237.000 capi allevati che rappresentano circa il 20% dell'intero patrimonio nazionale (ISTAT, 2016), nonché quello suinicolo (140.880 capi allevati) (ISTAT, 2017), per i quali gli unici dati inerenti la toxoplasmosi riguardano degli studi di tipo sieroepidemiologico condotti da Masala G. *et al.* (2003; 2007) e Tola S. *et al.* (2002) in aziende ovi-caprine colpite da episodi di aborto e presso allevamenti suinicoli di tipo intensivo e semi-intensivo da Scala A. *et al.* (2008), in cui venivano riportate delle sieroprevalenze per *T. gondii* pari al 15,2%.

Anche le informazioni riguardanti i genotipi di *T. gondii* circolanti nell'isola appaiono al momento lacunose. Soltanto Chessa G. *et al.* (2014), hanno recentemente condotto presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, la genotipizzazione mediante PCR-RFLP di ceppi del parassita isolati da campioni di feti ovini abortiti evidenziando la presenza esclusivamente del genotipo II.

Alla luce delle conoscenze attuali ed in considerazione di quanto sopra riportato, il progetto di ricerca è stato articolato in diverse fasi sperimentali, in ognuna delle quali sono stati affrontati degli aspetti relativi alla toxoplasmosi in ovini, caprini e suini presenti sull'isola:

- 1) FASE 1 - Valutazione dell'efficacia dell'ELISA e PCR nei confronti di *T. gondii* nell'ovino.
- 2) FASE 2 - Sieroepidemiologia nelle pecore e nelle capre conviventi e *trend* stagionale della toxoplasmosi in Sardegna.
- 3) FASE 3 - Sieroprevalenza e dinamica degli anticorpi nei confronti di *T. gondii* in agnelli di razza Sarda nati da madri sieropositive e sieronegative.
- 4) FASE 4 - Indagine preliminare sulla toxoplasmosi del suino in Sardegna.

CAPITOLO I

1. GENERALITA' SULLA TOXOPLASMOSI E SULLE SUE IMPLICAZIONI ZONOSICHE

1.1. AGENTE EZIOLOGICO

1.1.1. Riferimenti Storici: La scoperta di *T. gondii*

L'identificazione di *T. gondii* è attribuita a due scienziati francesi, Nicolle C. e Manceaux L., che nel 1908 nel laboratorio di Charles Nicolle, presso l'Istituto Pasteur di Tunisi, isolarono il protozoo dalla milza, dal fegato e dal sangue del gondi (*Ctenodactylus gundi*), un piccolo roditore selvatico del deserto del Nord Africa appartenente alla famiglia dei *Ctenodattilidi*, all'epoca utilizzato per lo svolgimento di ricerche sulla leishmaniosi (Nicolle C. & Manceaux L., 1908). Nel frattempo sempre nello stesso anno, il microbiologo calabrese Alfonso Splendore, nel corso di una riunione della Società Scientifica di San Paolo in Brasile, riportò come durante l'esame post-mortem di conigli da laboratorio avesse riscontrato, nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda per molti aspetti il *Kala Azar* dell'uomo, un "nuovo" parassita protozoo del coniglio (Splendore A., 1908 tradotto in inglese nel 2009). Quest'ultimo presentava infatti, cellule parassitarie simili a *Leishmania*, con la sostanziale differenza che il centromero non era rilevabile con la colorazione di Romanowsky (Splendore A., 2009).

A Splendore A. spetterebbe anche il merito di avere intuito per primo l'importanza di *T. gondii* per la patologia umana. Solo più tardi Charles Nicolle si rese conto che il parassita precedentemente descritto come *Leishmania*, non possedeva le caratteristiche del *Phylum Kinetoplastida*, così diede al nuovo microrganismo il nome di *T. gondii*, basandosi sulla morfologia (dal greco: *tòxon* = arco, *plasma* = forma), assunta dal parassita nella fase di tachizoite e in relazione all'ospite dal quale fu isolato per la prima volta, il gondi, erroneamente identificato da Nicolle C. e Manceaux L. come ospite definitivo di *T. gondii* (Nicolle C. & Manceaux L., 1909; Nicolle C. & Manceaux L., 2009; Ferguson D.J., 2009).

All'inizio l'organismo attirò l'attenzione come causa di malattia negli animali e solo in seguito venne progressivamente riconosciuto agente di zoonosi per l'uomo (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012).

Fu nel 1923 che Janku, un oculista di Praga, descrisse il primo caso di toxoplasmosi umana in un bambino di 11 mesi suggerendo un possibile collegamento tra la presenza di cisti parassitarie nella retina, l'idrocefalo congenito e la microftalmia (Remington J.S. *et al.*, 2011).

Tuttavia l'importanza medica di questo protozoo rimase sconosciuta fino a quando nella città di New York (USA), i due scienziati Wolf A. e Cowen D. (1937), scoprirono un caso fatale di encefalite granulomatosa infantile, che con l'isolamento di *T. gondii* venne ricondotta ad una forma di toxoplasmosi congenita (Dubey J.P. & Jones J.L., 2008; Weiss L.M. & Dubey J.P., 2009). Mentre il suo interesse in campo veterinario venne riscoperto nel 1957 in Australia, dove fu identificato come causa di aborto negli ovini (Dubey J.P. & Jones J.L., 2008).

Nel 1948, Sabin A.B. e Feldman H.A. misero a punto un test sierologico, per il rilevamento di anticorpi specifici per *Toxoplasma* ("Dye Test") che permise di effettuare i primi studi epidemiologici evidenziando la massiva diffusione del parassita sia nella popolazione umana che negli animali domestici.

Il ciclo vitale completo di *T. gondii* fu compreso e descritto solo nel 1970 da Frenkel J.K., circa 60 anni dopo la sua scoperta (Genchi C. & Pozio E., 2004). Hutchison W.M. (1965) fu il primo a collegare l'infettività di questo protozoo al gatto, che venne in questo modo classificato come coccidio intestinale dei *Felidi* successivamente caratterizzato dal punto di vista morfologico e biologico (Dubey J.P. *et al.*, 1970).

Fu dimostrato che esclusivamente i *Felidae*, in quanto ospiti definitivi, hanno un ruolo essenziale nel ciclo di vita del *T. gondii*, e nella sua diffusione perpetuata mediante la dispersione dello stadio infettante del parassita con le feci, denominato oocisti (Dubey J.P. & Su C., 2009; Hanafi E.M. *et al.*, 2014).

Sebbene *T. gondii* possa essere trasmesso in diversi modi, si è adattato per essere trasmesso in modo più efficiente mediante carnivorismo nel gatto e attraverso via oro-fecale (oocisti) negli altri ospiti. Suini e topi (e presumibilmente umani) possono essere infettati dall'ingestione anche di una sola oocisti, mentre 100 oocisti non sono in grado di infettare un gatto (Dubey J.P. *et al.*, 1996). I gatti possono spargere milioni di oocisti dopo aver ingerito un solo bradizoite, mentre 100 bradizoiti per via orale non possono infettare il topo (Dubey J.P., 2006).

Queste informazioni si sono mostrate molto utili negli studi epidemiologici e per il rilevamento di piccole quantità di *T. gondii* nelle prove biologiche su gatti che possono essere alimentati con grandi quantità di carne (Dubey J.P. *et al.*, 2005).

1.1.2. Classificazione e struttura di *T. gondii*

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) rappresenta l'unica specie conosciuta del Genere "*Toxoplasma*" (Nicolle C. & Manceaux L., 1909). Appartiene al *Phylum* "*Apicomplexa*" (Levine, 1970), Classe "*Sporozoasida*" (Leukart, 1879), Sottoclasse "*Coccidiasina*" (Leukart, 1879), Ordine "*Eimeriorina*" (Leger, 1911), Famiglia "*Toxoplasmatidae*" (Biocca, 1956) (Dubey J.P., 2010).

È un parassita endocellulare obbligato delle cellule nucleate degli animali omeotermi, caratterizzato dalla presenza di un complicato apparato citoscheletrico e vescicolare detto complesso apicale, che consente la penetrazione attiva del protozoo nelle cellule dell'ospite (macrofagi, cellule gliali o muscolari). Il parassita una volta insediatosi nel citoplasma, si moltiplica all'interno di un vacuolo parassitoforo.

Esistono quattro forme invasive di *T. gondii*: il tachizoite, il bradizoite, il merozoite e lo sporozoite. Tachizoiti e bradizoiti sono associati all'ospite intermedio, mentre merozoiti e sporozoiti all'ospite definitivo (Weiss L.M. & Kim K., 2013). Tachizoiti e merozoiti sono responsabili dell'espansione della popolazione parassitaria all'interno dell'ospite, mentre bradizoiti e sporozoiti sono gli stadi infettivi del protozoo a livello ambientale e trasmettono l'infezione ai nuovi ospiti.

Tutti gli stadi infettivi hanno la stessa morfologia di base con delle piccole variazioni. Le caratteristiche *standard* comunemente descritte sono basate principalmente sull'osservazione al microscopio elettronico dei tachizoiti (Figura 1). Il tachizoite è lo stadio più studiato nel ciclo di vita di *T. gondii* a causa della facilità con cui questo stadio infettante può essere ottenuto *in vivo* e *in vitro* (Weiss L.M. & Kim K., 2013). I tachizoiti sono le forme invasive a rapida moltiplicazione e sono cellule a forma di mezzaluna (approssimativamente da 2 x 7 µm) con un'estremità anteriore leggermente più acuta (definita dalla direzione della motilità). Ultrastrutturalmente sono costituiti da un apparato citoscheletrico, organi secretori (*rhoptries*, micronemi, granuli densi), organelli derivanti da processi endosimbiotici (mitocondri e apicoplasto), organuli eucariotici universali

(nucleo, reticolo endoplasmatico, apparato del Golgi, ribosomi) e strutture organiche specifiche (acidocalcisomi, vacuoli simili a quelli delle piante), tutte racchiuse da una complessa struttura membranosa chiamata pellicola (Figura 2) (Weiss L.M. & Kim K., 2013; Dubey J.P., 2010).

Il complesso apicale è formato da un citoscheletro comprensivo di due anelli polari, microtubuli subpellicolari e dal *conoide* (Figura 3). Quest'ultimo rappresenta il sistema di aggancio del parassita ed è adibito alla perforazione della parete della cellula ospitante. Da esso hanno origine i *toxonemi*, strutture contrattili, responsabili di un movimento rotatorio-ondulatorio che assicurano a *T. gondii* la mobilità e infine la penetrazione nella cellula ospite. È inoltre presente una componente vescicolare che include i *micronemi* e le *rhoptries*, organelli che secernono il proprio contenuto apicalmente ed infine localizzati più posteriormente, rispetto ai precedenti, si trovano i *granuli densi* (Montoya J.G. & Liesenfeld O., 2004; Hill D.E. & Dubey J.P., 2015).

1.1.3. Stadi morfologici infettanti di *T. gondii*

Nel corso del suo ciclo biologico *T. gondii* presenta tre forme biologiche potenzialmente infettanti per l'uomo e gli altri ospiti intermedi: la forma vegetativa o *Tachizoite*, la forma cistica dove si localizzano i *Bradizoiti* e la forma oocistica contenente gli *Sporozoiti* (Bowmann D.D. *et al.*, 2002).

1.1.3.1. *Tachizoiti*

La presenza di tachizoiti è indicazione di un'infezione acuta. Il termine "tachizoite" (*tachos*= in greco velocità), coniato da Frenkel J.K. (1973), descrive lo stadio del parassita a rapida moltiplicazione (forma proliferativa) nelle cellule dell'ospite intermedio e nelle cellule non intestinali dell'ospite definitivo; esso rappresenta la forma di diffusione del parassita, la stessa osservata da Nicolle C. e Manceaux L. nel 1909 nei gondi (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012; Dubey J.P., 2008).

I tachizoiti dotati di recettori biochimici coinvolti nell'adesione e nella penetrazione comuni a molte cellule animali, sono in grado di invadere una grande varietà di tipi cellulari (fibroblasti, epatociti, macrofagi e cellule miocardiche) di un ampio *range* di ospiti, dove si moltiplicano in un

vacuolo parassitoforo (Urquart G.M. *et al.*, 2005). Il meccanismo di invasione ha inizio con il riconoscimento della cellula bersaglio da parte del *T. gondii*, i *micronemi* provvisti di un corredo di proteine adesive, esposte sulla superficie del tachizoite, creano un punto di contatto tra la membrana del parassita e quella della cellula ospite (Figura 4). In seguito i *rhoptries* secernono un enzima proteolitico che esercita un'azione litica, promuovendo la perforazione del punto di attacco sulla superficie della cellula ospite da parte del *conoide* (Pereira K.S. *et al.*, 2010). Il processo di invasione culmina con la formazione di un vacuolo parassitoforo, che deriva dall'invaginazione della membrana plasmatica, all'interno del quale il parassita si moltiplica asessualmente. Una volta ristabilita la continuità della membrana plasmatica della cellula ospite, ha inizio la secrezione dei *granuli densi*, coinvolti nella formazione di un sistema tubulo-vescicolare, che mette in comunicazione il vacuolo parassitoforo con la membrana parassitaria, probabilmente deputato all'acquisizione di nutrienti dal citoplasma della cellula ospitante.

All'interno della cellula infetta i tachizoiti si moltiplicano asessualmente per endoduogenia fino a provocarne la rottura (Ferguson D.J., 2009). Il meccanismo di moltiplicazione innescato dal parassita genera da 8 a 20 organismi ognuno dei quali misura da 6 μm a 8 μm di lunghezza (Urquart G.M. *et al.*, 2005).

Quando la cellula si lisa i protozoi escono, e con il flusso sanguigno, o veicolati all'interno dei leucociti che non sono in grado di distruggerli, si diffondono in tutti i tessuti poiché il *Toxoplasma* è completamente aspecifico ed in grado di parassitare qualunque cellula dell'organismo (Unno A. *et al.*, 2008).

Il tachizoite è un organismo delicato incapace di sopravvivere al di fuori del suo ospite ed è solitamente distrutto dalle secrezioni gastriche. Esso può essere trasmesso per via transplacentare dalla madre al feto, mediante emotrasfusione o infezione accidentale durante le pratiche di laboratorio. I tachizoiti sono inoltre stati ritrovati in secreti ed escreti di diverse specie animali e nell'uomo. In particolare *T. gondii* è stato isolato dal liquido seminale di capre, pecore, suini e uomo (Santana L.F. *et al.*, 2010; Lopes W.D.Z. *et al.*, 2013; Moura A.B. *et al.*, 2007), ma più preoccupante rimane sicuramente il suo rinvenimento nel latte ovino (Fusco G. *et al.*, 2007; Camossi L.G. *et al.*, 2011; Dehkordi F.S. *et al.*, 2013) e caprino (Bezerra M.J.G. *et al.*, 2013; Mancianti F. *et al.*, 2013; Dubey J.P., 2010; Jones J.L. *et al.*, 2009).

1.1.3.2. Bradizoiti e Cisti tissutali

Il termine "bradizoite" (dal greco *brady* = lento) fu coniato da Frenkel J.K. (1973) per descrivere lo stadio a lenta moltiplicazione, che rappresenta la forma di resistenza del parassita nell'ospite in presenza di un'infezione cronica. Il bradizoite è la forma quiescente presente nei tessuti degli ospiti intermedi ed è infettante per i carnivori e gli onnivori (Dubey J.P. & Jones J.L., 2008). Esso è il risultato della conversione del tachizoite in uno stadio a lenta divisione e contribuisce alla formazione delle cisti tissutali circondate da una spessa parete cistica derivata dal vacuolo parassitoforo. Le cisti tissutali costituiscono la fase terminale del ciclo di vita del protozoo nell'ospite intermedio, la cui specie può influenzare la capacità di conversione dei tachizoiti in bradizoiti e la loro persistenza come cisti tissutali per tutta la vita dell'ospite (Lappin M.R., 2010). Il meccanismo di questa persistenza è sconosciuto. Tuttavia, molti ricercatori ritengono che la morte della cellula ospite inneschi la rottura della parete cistica e la conseguente liberazione e trasformazione dei bradizoiti in tachizoiti (Figura 5). Questa riattivazione può coincidere con la manifestazione di sintomi clinici e rappresenta una condizione grave e pericolosa per la vita nei soggetti immunocompromessi (Skariah S. *et al.*, 2010).

I bradizoiti hanno un metabolismo latente, ben adattato ad una sopravvivenza a lungo termine. Il nucleo è situato a livello dell'estremità posteriore, a differenza dei tachizoiti nei quali è localizzato centralmente (Figura 6). I tachizoiti si differenziano in bradizoiti circa 10-14 giorni dopo l'infezione. Non è ancora del tutto chiaro quali siano i meccanismi molecolari che regolano lo sviluppo da tachizoiti a bradizoiti; è probabile che la differenziazione in bradizoiti durante l'infezione *in vivo* sia multifattoriale e coinvolga anche l'immunità dell'ospite (Lyons L.E. *et al.*, 2002). I dati provenienti da studi sperimentali condotti *in vitro* indicano che il processo di differenziazione a bradizoiti è geneticamente programmato e si verifica dopo un breve periodo di rapida divisione come tachizoiti (Skariah S. *et al.*, 2010).

Anche se le cisti tissutali possono svilupparsi in qualsiasi tipo di cellula *in vitro*, negli animali infetti si rilevano prevalentemente nei tessuti neurali e muscolari, compreso cervello, occhi, muscoli scheletrici e cardiaci (Urquhart G.M. *et al.*, 2005; Dubey J.P. *et al.*, 1998). Le cisti sono più o meno sferoidali nelle cellule cerebrali (Figura 7A / 7B) e raramente raggiungono un diametro di 70 µm, mentre nelle cellule muscolari sono di forma allungata e possono raggiungere fino a 100 µm. Esse variano in dimensioni da 10 µm per le cisti più giovani, che contengono solo due bradizoiti, fino a

un massimo di 100 µm per quelle più vecchie, che contengono centinaia o migliaia di bradizoiti densamente impaccati.

La resistenza dei bradizoiti alla pepsina e di conseguenza ai processi digestivi, permette la loro trasmissione attraverso la via orale. Le cisti tissutali di *T. gondii* sono risultate sensibili a diverse procedure fisiche tra cui il trattamento termico, il congelamento, i raggi gamma (1.0 kGy) e le alte pressioni (300MPa) (Dubey J.P., 2000; Aymerich T. *et al.*, 2008; Lindsay D.S. *et al.*, 2006; El-Nawawi F.A. *et al.*, 2008; Kucicic V. & Wikerhauser T., 1996).

1.1.3.3. Sporozoiti

Gli sporozoiti si trovano nelle oocisti mature, strutture ovoidali di 12-13 µm che dopo la sporulazione contengono 2 sporocisti ellissoidali che misurano da 6-8 µm, ognuna delle quali contiene 4 sporozoiti, con un nucleo subterminale e sono ultrastrutturalmente simili ai tachizoiti (Figura 8).

I felini possono espellere fino a 360 milioni di oocisti nelle loro feci in un solo giorno e il periodo di espulsione dura in media 8 giorni, anche se può prolungarsi a 3 settimane (Däbritz H.A. & Conrad P.A., 2010). La sporulazione avviene entro 1-5 giorni dal rilascio nell'ambiente, in relazione all'ossigenazione e alla temperatura. Le oocisti diffondono nell'ambiente attraverso l'acqua, il vento e la pioggia, ma possono essere veicolate anche meccanicamente da insetti vettori come mosche, scarafaggi e lombrichi e trasportate con le acque di deflusso (Dubey J.P., 2010).

Le oocisti possiedono una parete estremamente robusta che protegge il parassita da danni meccanici e chimici e gli consente di sopravvivere per lunghi periodi, fino a più di un anno, in terreni umidi e in acqua (Dubey J.P. & Beattie C.P., 1988). Studi sperimentali hanno dimostrato che nel suolo, le oocisti sporulate rimangono infettive per un periodo di 18 mesi a seconda dell'umidità, della temperatura e all'esposizione della luce solare diretta (Yilmaz S.M. & Hopkins S.H., 1972, Frenkel J.K. *et al.*, 1975). In acqua dolce (Dubey J.P. & Beattie C.P., 1988) e acqua di mare (Lindsay D.S. & Dubey J.P., 2009) esse rimangono infettanti dai 6 mesi fino a 54 mesi ad una temperatura compresa tra 4 °C e 25 °C. Le oocisti sono risultate resistenti persino al gelo sperimentale, sopravvivendo fino a 28 giorni ad una temperatura di - 21 °C (Frenkel J.K. & Dubey J.P., 1973).

Inoltre dal momento che sono rivestite da una membrana impermeabile, sono altamente resistenti a molti disinfettanti (Wainwright K.E. *et al.*, 2007). Al contrario sono distrutte da temperature superiori ai 60 °C (Kuticic V. & Wikerhauser T., 1996; Jones J.L. & Dubey J.P., 2010), mentre i raggi ultravioletti hanno effetti deleteri sulle oocisti in relazione alla dose (Dubey J.P., 2010).

1.1.4. Ciclo biologico

T. gondii, è un coccidio intestinale dei felini facoltativamente eteroxeno (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012; Jones J.L. & Dubey J.P., 2012). Nel suo ciclo biologico indiretto alterna due fasi: intestinale (riproduzione sessuata) nell'ospite definitivo e extraintestinale (moltiplicazione asessuata) tipica dell'ospite intermedio. La riproduzione sessuata avviene unicamente nell'intestino dell'ospite definitivo, rappresentato da diverse specie di animali appartenenti alla famiglia *Felidae* (Gerhold R.W. & Jessup D.A., 2012; Tenter A.M. *et al.*, 2000), tra cui i gatti domestici e sinantropici che assumono un ruolo "chiave" essenziale per l'epidemiologia della toxoplasmosi umana ed animale (Tenter A.M. *et al.*, 2000; Dubey J.P. & Su C., 2009). Essi sono ospiti definitivi e "completi" perché sono gli unici ospiti in cui si svolge sia la riproduzione sessuata che la moltiplicazione asessuata del parassita, entrambe indispensabili per la produzione di oocisti che verranno eliminate attraverso le feci (Figura 9). Le oocisti rappresentano la forma di resistenza del parassita nell'ambiente e costituiscono una significativa fonte di infezione per gli ospiti intermedi tra cui l'uomo (Gotteland C. *et al.*, 2013; Boyer K.M. *et al.*, 2011).

La replicazione asessuata, negli ospiti intermedi si svolge in sede extra-intestinale, aumentando la probabilità di trasmissione della zoonosi. Infatti *T. gondii* può essere trasmesso orizzontalmente non solo tra ospite definitivo e ospite intermedio (oocisti), ma anche tra ospite intermedio e ospite definitivo (cisti tissutali), tra due ospiti definitivi (oocisti) e tra due ospiti intermedi (cisti tissutali e tachizoiti) (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012).

1.1.4.1. Riproduzione sessuata

Lo sviluppo sessuale di *T. gondii*, generalmente ha origine nell'intestino del felino nel momento in cui esso ingerisce una delle tre forme infettive del parassita: tachizoite, bradizoite o sporozoite. La maggior parte dei felini s'infetta ingerendo i bradizoiti contenuti nelle cisti tissutali di ospiti intermedi infetti o più raramente per ingestione di oocisti sporulate disperse nel suolo.

Nel gatto è stato studiato in dettaglio solo il ciclo indotto dal bradizoite (Dubey J.P. & Frenkel J.K., 1972). Dopo l'ingestione di carne cruda proveniente da un ospite intermedio infetto, la parete delle cisti tissutali viene dissolta dagli enzimi proteolitici gastrici o intestinali e i bradizoiti rilasciati nel lume intestinale, penetrano negli enterociti dell'intestino tenue (Figura 10) e iniziano il ciclo di sviluppo schizogonico (asessuale) e gametogonico (sessuale) che porteranno alla produzione di oocisti dopo 3-10 giorni (Dubey J.P., 2009). I cicli asessuali iniziali sono necessari per aumentare la densità del parassita e assicurare la produzione di milioni di oocisti nelle feci (Ferguson D.J., 2009). L'interazione tra *T. gondii* e la cellula ospite implica una fase iniziale di adesione e invasione della cellula; questi passaggi sono cruciali per l'instaurazione dell'infezione parassitaria che culmina con la formazione del vacuolo parassitoforo. Quest'ultimo funge da interfaccia tra le funzioni dei parassiti e quelle della cellula ospite e facilita la replicazione e la differenziazione del parassita; infatti esso oltre a fornire protezione contro i radicali liberi, i cambiamenti di pH e osmolarità, aiuta il parassita ad eludere il sistema immunitario dell'ospite (Laliberte J. & Carruthers V.B., 2008).

La fase proliferativa asessuata con divisioni nucleari ripetute è caratterizzata dallo sviluppo di 8-16 cellule figlie chiamate merozoiti all'interno della cellula madre (Ferguson D.J., 2009). Dopo cinque fasi di moltiplicazione asessuali, con la distruzione della cellula intestinale ospitante ha inizio il ciclo gametogonico; nel quale i merozoiti maturi rilasciati vanno ad invadere altri enterociti differenziandosi in macrogameti e microgameti (gametogonia).

Il macrogamete o gamete femminile, è di forma sub sferica e ha due funzioni molto importanti. In primo luogo, deve sintetizzare e immagazzinare tutti i principi nutritivi per consentire la sporulazione nell'ambiente esterno e sostenere la vitalità degli sporozoiti per lunghi periodi di tempo (superiori anche a 1 anno); in secondo luogo, deve sintetizzare le componenti specifiche necessarie a formare la parete delle oocisti (Ferguson D.J., 2009). Il microgamete o gamete maschile,

costituito principalmente dal nucleo, è allungato e presenta due lunghi flagelli proiettati posteriormente. I microgameti usano i flagelli per spostarsi, penetrare e fecondare i macrogameti maturi.

Lo sviluppo sessuale inizia 2 giorni dopo l'ingestione delle cisti tissutali da parte del gatto (Dubey J.P. *et al.*, 1998) ed i gameti si trovano in tutto l'intestino tenue, più comunemente nell'ileo, e si localizzano al di sopra del nucleo della cellula ospitante, vicino alle punte dei villi. I macrogameti rimangono all'interno della cellula infettata, mentre i microgameti distruggono l'enterocita in cui si trovano per raggiungere il macrogamete, con cui si uniranno andando a formare lo zigote (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012). Lo zigote, sempre all'interno dell'enterocita, si circonda di una parete cistica dando vita alle oocisti, formazioni tondeggianti di circa 10 µm di diametro.

Infine con la rottura delle cellule intestinali infettate, le oocisti non sporulate confluiscono nel lume intestinale del gatto che le disperde con le feci nella lettiera o nell'ambiente (Dubey J.P. *et al.*, 1998; Dubey J.P., 2009). Una volta all'esterno dopo pochi giorni le oocisti subiscono il processo di sporulazione che implica la formazione di due sporocisti ciascuna contenente quattro sporozoit (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012).

I risultati di diversi studi (Dubey J.P., 2006; Lappin M.R., 2010) confermano che nei felidi il periodo di prepatenza, ossia il tempo che passa dall'inizio dell'infezione e il rilascio delle oocisti varia in relazione allo stadio di *T. gondii* ingerito. Il periodo di prepatenza è di 3-10 giorni dopo l'ingestione di cisti tissutali (bradizoiti) e superiore ai 18 giorni dopo l'ingestione di oocisti sporulate, indipendentemente dalla dose, mentre il periodo di prepatenza dopo l'invasione da parte dei tachizoiti tipico della trasmissione transplacentare nei gattini può variare (tre settimane o più) (Dubey J.P., 2010). Le oocisti vengono escrete generalmente per 1-2 settimane. È probabile che la maggior parte dei gatti che si infettano con *T. gondii* rimangano sieropositivi per il resto della vita anche se eliminano le oocisti solo per un breve periodo di tempo (Urquhart G.M. *et al.*, 2005).

1.1.4.2. *Replicazione asessuata*

La replicazione asessuata di *Toxoplasma* si svolge sia negli ospiti intermedi che nel gatto. Nell'ospite intermedio, questa fase del ciclo biologico del protozoo è di tipo extra-intestinale ed è caratterizzata dallo sviluppo esclusivo di tachizoiti e bradizoiti (Urquart G.M. *et al.*, 2005). L'infezione può essere acquisita principalmente in due modi: tramite ingestione di oocisti sporulate in erbivori e onnivori oppure soprattutto nei carnivori attraverso il consumo di carni contenenti bradizoiti, mentre evenienza più rara è l'assunzione di tachizoiti mediante secreti di animali infetti.

Nel primo caso, le oocisti vengono ingerite e gli sporozoiti liberati durante il processo digestivo, attraversano l'epitelio intestinale e invadono per via ematogena le cellule di svariati tessuti. La forma invasiva e proliferativa viene chiamata "tachizoite". Essi replicano velocemente per endoduogenia e dopo la formazione di 8-16 tachizoiti (pseudociste), la cellula ospite si rompe, disseminando le forme infettive in tutto l'organismo. Questo stadio contrassegna la fase acuta della toxoplasmosi (Urquart G.M. *et al.*, 2005).

In genere, l'ospite intermedio sopravvive alla fase acuta e produce anticorpi che limitano l'invasività dei tachizoiti. Il processo porta alla formazione di cisti tissutali contenenti migliaia di organismi parassitari caratterizzati da endoduogenia e crescita rallentate, denominati bradizoiti, che permangono all'interno dell'ospite anche per tutta la vita, prevalentemente nel cervello e nella muscolatura (Urquart G.M. *et al.*, 2005; Dubey J.P., 2009; Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012).

Le cisti contenenti i bradizoiti rappresentano la forma latente dell'infezione e la moltiplicazione degli organismi è controllata dall'immunità acquisita dell'ospite. Se tale immunità viene a mancare, la ciste può rompersi e liberare i bradizoiti che si attivano e riprendono le caratteristiche di invasività dei tachizoiti (Urquart G.M. *et al.*, 2005).

Nel secondo caso, l'infezione dell'ospite si verifica in seguito all'ingestione di bradizoiti o tachizoiti presenti nei tessuti o nei secreti di un altro ospite intermedio. I carnivori e l'uomo possono infettarsi attraverso il consumo di carni crude o poco cotte. Il ciclo di sviluppo del protozoo conseguente all'ingestione di tachizoiti o bradizoiti è analogo a quello che avviene dopo l'ingestione delle oocisti (Urquart G.M. *et al.*, 2005; Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012).

In alcuni ospiti intermedi inoltre, è stata confermata la possibilità di una trasmissione congenita, se la fase acuta si manifesta durante la gravidanza (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012).

1.1.5. Suscettibilità dell'ospite

L'infezione da *Toxoplasma* è stata descritta per più di 350 specie ospiti (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012). A differenza degli altri protozoi del *Phylum Apicomplexa*, che presentano una forte specificità per l'ospite, *T. gondii* è stato isolato in animali sia terrestri che marini, poiché in grado di infettare un *range* estremamente ampio di vertebrati a sangue caldo, tra cui numerose specie di uccelli, mammiferi domestici e selvatici, uomo compreso, che rappresentano gli ospiti intermedi (Dubey J.P. *et al.*, 2011; Hanafi E.M. *et al.*, 2014; Hill D.E. & Dubey J.P., 2015; Lopes A.P. *et al.*, 2013; Pandey S. *et al.*, 2015; Shwab E.K. *et al.*, 2014).

Con la scoperta del ciclo di vita di *T. gondii* nel gatto è emerso chiaramente perché la suscettibilità nei confronti dell'infezione da *T. gondii* varia tra i differenti ospiti. In particolare i marsupiali australiani e le scimmie del Nuovo Mondo (*New Worldmonkeys*) presenti nelle regioni tropicali del Centro, Sud America e Messico, sono altamente suscettibili alla toxoplasmosi clinica. Contrariamente, agli esemplari di marsupiali nati in America e alle scimmie del Vecchio Mondo (*Old Worldmonkeys*), originarie dell'Africa e dell'Asia, che nonostante l'isolamento del protozoo, non presentano manifestazioni cliniche (Dubey J.P., 2010; Dubey J.P. *et al.*, 2011; Dubey J.P. & Beattie C.P., 1988). La spiegazione di queste differenze, apparentemente non chiara, potrebbe essere legata alla coevoluzione parassita-ospite. A sostegno di tale ipotesi, è evidente come i marsupiali australiani si siano evoluti in assenza del gatto (in Australia e Nuova Zelanda il gatto comparve solo dopo la colonizzazione europea), e le scimmie vivendo sulle cime degli alberi, non siano state esposte alle feci di gatto (Dubey J.P., 2010; Saraf P. *et al.*, 2017).

Conseguentemente a quanto detto la toxoplasmosi rappresenta un grave problema anche negli zoo, poiché i felini selvatici spesso eliminano oocisti di *T. gondii* con le feci. La contaminazione ambientale che ne deriva espone le specie altamente suscettibili (marsupiali australiani, "*New World monkey*" e più comunemente i lemuri), che entrano in contatto con il protozoo, a focolai di toxoplasmosi acuta, caratterizzata da gravi lesioni ai tessuti viscerali (Weiss L.M. & Kim K., 2013).

Tra gli animali da reddito, gli ovini, i caprini e i suini, risultano più suscettibili all'infezione e come ospiti intermedi del parassita costituiscono la principale fonte di toxoplasmosi per l'uomo (Pereira K.S. *et al.*, 2010; Chessa G. *et al.*, 2014; Pandey S. *et al.*, 2015; Dubey J.P., 2009b; Lopes A.P., 2013). Infatti, l'incistamento del parassita nelle porzioni edibili degli animali destinati alla produzione di carne (Dubey J.P., 2009a; Dubey J.P., 2009b; EFSA, 2011) contribuisce alla propagazione a livello mondiale di questa infezione (Weiss L.M. & Kim K., 2000; Sullivan W.J. & Jeffers V., 2012).

Accanto agli animali domestici, molte specie selvatiche possono fungere da ospiti intermedi (carnivori selvatici, orsi, felidi, volpi, procioni, ungulati, marsupiali, scimmie e cetacei, lontre di mare), aiutando a mantenere entrambi i cicli di vita del parassita domestico e silvestre (Weiss L.M. & Kim K., 2013; Conrad P.A. *et al.*, 2005; Sobrino R. *et al.*, 2007; Lopes A.P. *et al.*, 2011; De Craeye S. *et al.*, 2011), favorendo in questo modo, la diffusione e il mantenimento dell'infezione (Hill D.E. *et al.*, 2005). In Europa il consumo di carne poco cotta di cinghiali e visoni selvatici sono stati individuati come potenziale causa di toxoplasmosi (Opsteegh M. *et al.*, 2011).

Anche se il rilevamento delle oocisti di *T. gondii* in acqua di mare non è mai stato descritto, l'alta prevalenza dell'infezione in mammiferi marini (lontre marine, leoni marini, foche e delfini) sta ad indicare la sua importanza in ambiente marino (Weiss L.M. & Kim K., 2013; Dubey J.P. & Jones J.L., 2008; Dubey J.P. *et al.*, 2003; Kalzer F. *et al.*, 2014). Nei primi anni '90 con l'isolamento di *T. gondii* dai tessuti della lontra marina, la toxoplasmosi è stata definitivamente riconosciuta come principale causa di mortalità per encefalite di questi mammiferi marini (*Enhydra lutris nereis*) (Cole R.A. *et al.*, 2000; Lindsay D.S. *et al.*, 2001). È stato ipotizzato che le oocisti di *T. gondii* escrete con le feci dei gatti ferali che vivono lungo la costa del Pacifico pervengano nell'ambiente marino per mezzo del deflusso delle acque dolci costiere. Questo costituirebbe un fattore di rischio per la lontra di mare che potrebbe contrarre l'infezione mediante l'ingestione di ospiti paratenici che veicolano le oocisti infettanti (Hill D.E. & Dubey J.P., 2015; Weiss L.M. & Kim K., 2013; Miller M.A. *et al.*, 2002; 2008).

Effettivamente, anche se è risaputo che *Toxoplasma* non infetta animali a sangue freddo, le sue oocisti possono essere veicolate da molluschi lamellibranchi, come i mitili e le ostriche, che filtrano le acque contaminate fungendo da ospiti paratenici, influenzando la sopravvivenza delle oocisti e favorendo il meccanismo di trasmissione del *T. gondii* ai mammiferi marini (Conrad P.A. *et al.*, 2005; Dubey J.P. *et al.*, 2003, Lindsay D.S. *et al.*, 2001), e forse anche all'uomo (Gilot-Fromont E.

et al., 2012; Dubey J.P., 2010; Miller M.A. *et al.*, 2008; Putignani L. *et al.*, 2010). In uno dei suoi studi caso-controllo Jones J.L. *et al.* (2009) mostrò l'associazione tra il consumo di ostriche, vongole o cozze crude e toxoplasmosi (Kalzer F., 2014).

1.1.6. Genomica, genotipi e virulenza

Il genoma di *T. gondii* è composto da DNA nucleare, mitocondriale e da una sequenza di 35 kb di DNA extracromosomico, contenuto nell'apicoplasto (Ajioka J.W. *et al.*, 2001). Quest'ultimo è un organulo caratterizzato da quattro membrane derivate da un processo di endosimbiosi, che ha mostrato nell'analisi di sequenza una grande affinità con il genoma dei cloroplasti, elementi tipici delle piante superiori e delle alghe rosse e verdi, probabilmente coinvolto nel metabolismo dei lipidi (Ajioka J.W. *et al.*, 2001). La presenza di questo organello di origine vegetale ha destato particolare interesse perché potrebbe essere oggetto di trattamenti chemioterapici sperimentali per il controllo della toxoplasmosi (Ajioka J.W. *et al.*, 2001).

Rispetto ad altri protozoi, *T. gondii* possiede un genoma nucleare notevolmente conservato nonostante la vasta gamma di ospiti e il ciclo sessuale opzionale (Ajioka J.W. *et al.*, 2001). Il genoma nucleare rimane aploide per la maggior parte del ciclo biologico del parassita, eccetto che per una breve fase, che precede la meiosi che si compie nell'intestino del gatto, in cui diventa diploide (Hill D.E. & Dubey J.P., 2015). Con la mappatura genetica e l'analisi di sequenza è stato possibile rivelare un genoma di circa 65 Mb distribuito su quattordici cromosomi e 7793 geni (Khan A. *et al.*, 2007; Dubey J.P., 2010; Hill D.E. & Dubey J.P., 2015).

Poiché il potenziale zoonotico del *Toxoplasma* è strettamente legato alla diversità genetica del protozoo i risultati degli studi genomici hanno acquisito sempre maggiore importanza. La popolazione di *T. gondii* è altamente strutturata, più del 95% dei ceppi sono raggruppati in tre linee clonali, tipo I, II e III, differenti per virulenza e patogenicità ampiamente studiati mediante le varie tecniche biomolecolari di MLEE (*Multi-Locus Enzyme Electrophoresis*), PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism*) o l'analisi dei microsatelliti (Su C. *et al.*, 2010). Queste tre linee genetiche, sono il risultato di un processo di ricombinazione limitata, per lo più asessuata di pochi ceppi ancestrali (Abu-Dalbou M.A. *et al.*, 2010; Howe D.K. & Sibley L.D., 1995; Grigg M.E. *et al.*, 2001; Su C. *et al.*, 2003; Su C. *et al.*, 2012) e si differenziano solo per l'1-2% della

sequenza di DNA (Xiao J. & Yolken R.H., 2015). Inoltre alcuni studi suggeriscono l'esistenza di una IV linea clonale riscontrata in animali selvatici del continente Nord Americano (Khan A. *et al.*, 2011).

La maggior parte dei ceppi di *T. gondii* isolati dall'uomo e dagli animali in Nord America, Europa e Africa sono stati raggruppati in una delle tre linee clonali (Ajzenberg D. *et al.*, 2002a, Ajzenberg D. *et al.*, 2002b; Howe D.K. & Sibley L.D., 1995) e hanno mostrato un'elevata diversità biologica e genetica rispetto a quelli isolati in Brasile e in Columbia (Khan A. *et al.*, 2007; Lehmann T. *et al.*, 2006; Dubey J.P. & Su C., 2009; Su C. *et al.*, 2012).

Secondo il modello bifasico ipotizzato da Su C. *et al.* (2012) nell'emisfero settentrionale la popolazione di *T. gondii* sarebbe dominata solo da alcune linee clonali, ciò spiegherebbe perché genotipi altamente simili o identici sono stati rinvenuti in diverse aree geografiche del Nord America ed Europa (Sibley L.D. & Ajioka J.W., 2008); mentre nel Sudamerica, le popolazioni sarebbero geneticamente molto diverse (Su C. *et al.*, 2012; Hill D.E. & Dubey J.P., 2015). Fu Lehmann T. *et al.* (2006), che mediante l'utilizzo di nuovi marcatori per la caratterizzazione genetica rivelò, nelle diverse aree geografiche, l'esistenza di una variabilità genetica molto più elevata rispetto a quella stimata (Ajzenberg D. *et al.*, 2002a; Ajzenberg D. *et al.*, 2004; Khan A. *et al.*, 2006).

Howe D.K. e Sibley L.D. (1995) furono i primi ad analizzare campioni prelevati sia da ospiti apparentemente sani, che da quelli malati, classificando ceppi isolati dai casi positivi secondo le tre linee genetiche (tipo I, II e III) in base al polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) e al grado di virulenza manifestato sui topolini durante la prova biologica.

Secondo questa classificazione i ceppi di tipo I sono virulenti e causano infezioni letali nei topi "*outbred*" e si trovano raramente negli animali e nell'uomo; in letteratura sono stati associati con la toxoplasmosi oculare acquisita, l'infezione congenita e forme di toxoplasmosi cerebrale nei pazienti immunocompromessi (Khan A. *et al.*, 2005; Hunter C.A. & Sibley L.D., 2012). I ceppi di tipo II sono stati comunemente isolati sia negli animali che nell'uomo in Nord America e in Europa (Shwab E.K. *et al.*, 2014; Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012) ed hanno una virulenza intermedia che varia a seconda della specie di topi. Mentre i ceppi di tipo III sono considerati completamente avirulenti nei topi e sono caratterizzati da scarsa presenza di cisti tissutali e limitata capacità di causare infezioni e malattie umane (Sibley L.D. & Ajioka J.W., 2008; Hunter C.A. & Sibley L.D., 2012).

Le manifestazioni cliniche della toxoplasmosi umana sono generalmente associate al tipo II (Sibley D., 2003). Il quadro clinico e la gravità della malattia, e l'eventuale reinfezione, dipendono da diversi fattori alcuni dei quali legati al parassita, come la virulenza del ceppo, la carica infettante, lo stadio vitale, la via di infezione e altri all'ospite come l'efficienza della risposta immunitaria, l'età, il sesso e fattori genetici (Elbez-Rubistein A. & Ajzenberg D., 2009).

Il successo di un'infezione da *T. gondii* dipende dalla capacità del parassita di attraversare le barriere biologiche, come l'epitelio intestinale, la barriera emato-encefalica, la placenta e i siti immuno-privilegiati come il sistema nervoso. Le differenti capacità di migrazione sono legate a differenze ceppo-specifiche della diffusione del parassita e della motilità parassitaria. Studi *in vitro* hanno evidenziato che sottopopolazioni parassitarie del ceppo di tipo I mostrano una capacità di migrazione più elevata sia in lunga distanza che in tutta la matrice extracellulare, rispetto ai ceppi di tipo II e III (Saeij J.P. *et al.*, 2005). L'analisi genetica sostiene che l'associazione della capacità migratoria e la virulenza è legata alla stessa regione cromosomica responsabile della virulenza acuta (Barragan A. & Sibley L.D., 2002; Saeij J.P. *et al.*, 2005).

L'analisi della virulenza acuta del ceppo di tipo I, eseguita con la genetica classica, ha inoltre rivelato che l'alta virulenza è fortemente legata (90%) allo specifico allele del *locus ROP18*, un gene che codifica le proteine *rhoptries* (*ROP*) (Shwab E.K. *et al.*, 2016).

Gli studi di tipizzazione effettuati sui ceppi isolati da animali ed umani in tutto il mondo hanno consentito di ampliare le conoscenze sulla struttura della popolazione di *T. gondii*.

Il centro di ricerca francese per la toxoplasmosi *French Toxoplasma Biological Resource Center* (*Toxo BRC*, Francia) ha confermato che, in Francia, i ceppi di tipo II sono predominanti nei casi di toxoplasmosi congenita e nei soggetti immunocompromessi (Ajzenberg D. *et al.*, 2009). In Asia e nelle zone tropicali del Sud America, la sintomatologia dell'infezione si manifesta in modo più severo, e la diversità genetica del *T. gondii* è notevolmente più elevata (Shwab E.K., *et al.*, 2014; Ajzenberg D. *et al.*, 2016; Schwab E.K. *et al.*, 2016) per la presenza di genotipi atipici (Dubey J.P., 2008; Lehmann T. *et al.*, 2006), molto virulenti sia nei topi (Pena H.F. *et al.*, 2008) che in soggetti immunocompetenti (Carme B. *et al.*, 2009). In Brasile alcuni genotipi atipici hanno dimostrato di essere altamente patogeni per gli esseri umani, causando gravi casi di toxoplasmosi oculare acquisita e congenita (Ferreira Ade M. *et al.*, 2006; Khan A. *et al.*, 2006; Dubey J.P. *et al.*, 2007; Pena

H.F. *et al.*, 2008; Demar M. *et al.*, 2012; Grigg M.E. *et al.*, 2015; Maenz M. *et al.*, 2014; Ajzenberg D. *et al.*, 2016). Esistono sempre più prove che la maggiore gravità della toxoplasmosi in Sud America sia il risultato dello scarso adattamento degli ospiti ai diversi genotipi di *T. gondii* in questa regione geografica (De-la-Torre A. *et al.*, 2013). Inoltre nella Guiana Francese casi gravi e mortali di toxoplasmosi in individui immunocompetenti sono stati collegati a un ceppo atipico (Carme B. *et al.*, 2002; Demar M. *et al.*, 2007). Al contrario i dati genetici sugli isolati di *T. gondii* dell'Africa sono scarsi e non sufficienti a chiarire la struttura della popolazione in questo continente (Lindstrom I. *et al.*, 2008; Velmurugan G.V. *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda gli animali, negli Stati Uniti ulteriori studi di genotipizzazione condotti sui ceppi di *T. gondii* isolati da maiali, agnelli e capre dimostrano che la discendenza clonale di tipo II predomina negli animali destinati alla produzione di alimenti, seguita dal tipo III e dai genotipi atipici, raramente isolati in animali da reddito (Dubey J.P. *et al.*, 2008; Dubey J.P., 2008; Dubey J.P., 2011; Velmurugan G.V. *et al.*, 2009).

La struttura della popolazione del *T. gondii* e la variabilità genetica degli isolati sono oggi oggetto di numerose ed approfondite ricerche (Sibley L.D., 2009; Khan A. *et al.*, 2007; Grigg M.E. & Sundar N., 2009; Velmurugan G.V. *et al.*, 2008; Bontell I.L. *et al.*, 2009; Boothroyd J.C., 2009). Infatti grazie allo sviluppo delle tecniche di tipizzazione molecolare, è possibile associare le differenti virulenze alla diversità genetica e di indagare il tipo di correlazione tra i genotipi di *T. gondii* e la manifestazione della malattia negli animali e soprattutto nell'uomo (Saeij J.P. *et al.*, 2005). Ad oggi la genotipizzazione mediante PCR-RFLP di circa 1500 campioni in tutto il mondo ha rivelato l'esistenza di 189 differenti genotipi, che sono stati inseriti nel database genomico del *Toxoplasma* (ToxoDB) (<http://www.toxodb.org/toxo/>) (Liu Q. *et al.*, 2015).

1.1.7. Ruolo del gatto

Il gatto domestico (*Felis catus*), ospite definitivo del protozoo, gioca un ruolo cruciale nella diffusione e nel mantenimento del ciclo domestico di questa zoonosi poiché *T. gondii* vive e si può riprodurre esclusivamente nel tratto intestinale di questa specie animale.

È stato visto che i tassi di sieroprevalenza per *Toxoplasma* nel gatto domestico variano tra il 30-40% a seconda dello stile di vita del gatto (Elmore S.A. *et al.*, 2010). La sieroprevalenza è più elevata nei gatti adulti, poiché aumenta la possibilità di esposizione nel tempo, e in particolare nei gatti che hanno la possibilità di muoversi all'aperto rispetto ai gatti confinati tra le mura domestiche, questo supporterebbe l'ipotesi che l'infezione nella maggior parte dei casi viene acquisita dopo la nascita (Weiss L.M. & Kim K., 2013).

Toxoplasma è stato rinvenuto in gatti domestici di tutto il mondo, indipendentemente da età, sesso e razza (Weiss L.M. & Kim K., 2013). Generalmente i gatti nati e cresciuti all'aperto contraggono l'infezione dopo lo svezzamento cacciando piccole prede (uccelli e topi), mentre il gatto domestico adulto acquisisce l'infezione se nutrito con carni poco cotte contenenti la forma quiescente del protozoo. I gatti adulti espelleranno notoriamente una quantità inferiore di oocisti e per un periodo di tempo più breve rispetto ai gattini svezzati di recente (Weiss L.M. & Kim K., 2013). Al contrario l'infezione viene raramente contratta mediante l'ingestione di oocisti (Elmore S.A. *et al.*, 2010). Le oocisti sono infettanti anche per i gatti, anche se hanno una minore efficienza, poiché per sviluppare l'infezione devono essere ingerite in quantità elevata (almeno 1000 oocisti); mentre nel caso dei bradizoiti, ne è sufficiente solo uno (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012; Elmore S.A. *et al.*, 2010).

I gatti sono in grado di eliminare le oocisti durante l'infezione acuta. Il rilascio di oocisti inizia 3-7 giorni dopo l'ingestione della forma cistica del parassita e può continuare per periodi limitati, poi gli animali si immunizzano e guariscono. Nei gattini infettati per via transplacentare o per via galattogena, al contrario, il periodo di prepatenza è di solito di tre settimane o più, poiché i gattini sono stati infettati da tachizoiti (Dubey J.P. *et al.*, 1995).

Inizialmente, le oocisti non sono infettive, ma lo diventano con il processo di sporulazione, che avviene entro un periodo che varia da pochi giorni (2/3) sino a diverse settimane. I gatti infettati possono disseminare nell'ambiente più di 100 milioni di oocisti nei loro escrementi (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012). La manipolazione di materiali contaminati da gatti infettati, quali lettiera o terreno sporco di feci, costituisce un potenziale pericolo di infezione per l'uomo, dal momento che le oocisti sporulate sono molto resistenti nell'ambiente esterno e, grazie alle ridotte dimensioni, vengono facilmente disperse dagli agenti atmosferici e da vettori meccanici. Alcuni studi presenti in bibliografia evidenziano come, nonostante il gatto rivesta un importante ruolo nell'epidemiologia

dell'infezione, non vi sia una correlazione statisticamente significativa tra la malattia ed il possesso di un gatto; è stato dimostrato invece che le modalità più rilevanti di trasmissione sono legate all'ingestione di diverse varietà di cibo, di origine animale o vegetale, e acqua contaminati con le forme infettanti. In natura è stato documentato anche un ciclo silvestre di *T. gondii*, nel quale i felini selvatici agiscono da ospiti definitivi e le loro prede (roditori e volatili), fungono da ospiti intermedi. Il ciclo silvestre contribuirebbe in questo modo al mantenimento di questa zoonosi.

Le infezioni feline vengono acquisite dopo la nascita e sono tipicamente subcliniche, i gattini, congenitamente infetti, presentano con più probabilità i segni clinici dell'infezione, tuttavia anche gatti adulti clinicamente sani possono contrarre l'infezione (Elmore S.A. *et al.*, 2010). I sintomi comuni dell'infezione da *T. gondii* nei gatti possono includere febbre, infiammazione oculare, anoressia, letargia, disagio addominale e anomalie neurologiche (Vollaire M.R. *et al.*, 2005).

In generale, l'infezione intestinale nel gatto raramente porta a problemi. Solo il 10% -20% dei gatti infettati sperimentalmente sviluppa una diarrea del piccolo intestino auto-limitante, 1 o 2 settimane dopo l'inoculazione orale primaria di cisti tissutali di *T. gondii*, dovuta alla replicazione enteroepiteliale del protozoo. I gatti che hanno eliminato oocisti sviluppano una forte immunità intestinale verso *T. gondii* (Dubey J.P., 1995). La formazione di anticorpi sierici sembra non svolga un ruolo significativo nella resistenza all'infezione intestinale poiché l'immunità intestinale è molto probabilmente di tipo cellulo mediata (Weiss L.M. & Kim K., 2013).

Le oocisti iniziano a essere escluse nelle feci prima che gli anticorpi IgM, IgG o IgA siano presenti nel siero, per cui soggetti infetti possono risultare sieronegativi (Lappin M.R. *et al.*, 1989). In genere nell'intestino dei gatti immunizzati si ha lo sviluppo parziale degli stadi enteroepiteliale del parassita, ma viene impedita la produzione delle oocisti (Davis S.W. & Dubey J.P., 1995). Per questo motivo, la maggior parte dei gatti che hanno espulso le oocisti per la prima volta, non ri-espellono oocisti se testati entro sei mesi fino ad un anno. L'immunità intestinale ha una durata di circa sei anni nel 55% dei gatti (Dubey J.P., 1995; Weiss L.M. & Kim K., 2013).

Al contrario esiste una forma di toxoplasmosi extraintestinale fatale che può svilupparsi dalla schiacciante moltiplicazione intracellulare dei tachizoiti che si origina dall'infezione primaria. Sono comunemente coinvolti in questa forma: tessuti epatici, polmonari, sistema nervoso centrale e pancreas. I gattini infettati per via placentare o transmammaria, sviluppano i segni più gravi di

toxoplasmosi extraintestinale e generalmente muoiono di malattie polmonari o epatiche. La toxoplasmosi disseminata è stata documentata anche in gatti adulti con leucemia felina e immunodeficienza felina (Lappin M.R., 2010). Comuni riscontri clinici nei gatti con toxoplasmosi includono: depressione, anoressia e febbre seguita da ipotermia, versamento peritoneale, ittero e dispnea. La toxoplasmosi è frequentemente causa di disturbi oculari tra cui l'uveite e la retinocoroidite (Weiss L.M. & Kim K., 2013).

1.2. TOXOPLASMOSI NELL'UOMO

1.2.1. Epidemiologia

L'impatto sociale della toxoplasmosi è rilevante in tutto il mondo, sia per le sofferenze causate direttamente dalla patologia, sia per i costi legati all'assistenza sanitaria delle persone colpite, soprattutto bambini che presentano spesso i sintomi più importanti (il ritardo mentale e cecità) e i malati di AIDS, nei quali la toxoplasmosi è l'infezione opportunistica più comune (Dubey J.P. *et al.*, 1998).

Circa il 25 e 30% della popolazione umana è infettato da *T. gondii*. I dati riguardanti l'Europa sono molto variegati e allo stesso tempo discontinui. Tuttavia, la sieroprevalenza varia notevolmente tra i diversi Paesi (da 10 a 80%) e anche all'interno degli stessi (Maenz M. *et al.*, 2014). Negli Stati Uniti e Regno Unito, è stata riscontrata una prevalenza dell'8-22% (Dubey J.P. & Jones J.L., 2008; Jones J.L. *et al.*, 2001; Jones J.L. *et al.*, 2003; Jones J.L. *et al.*, 2007), mentre in America Centrale, Sud America e nell'Europa continentale, le stime variano dal 30 al 90% (Dubey J.P., 2010; Dubey J.P. & Jones J.L., 2008; Minbaeva G. *et al.*, 2013).

Nello specifico una bassa sieroprevalenza è stata riportata dall'Europa settentrionale (30%) (Dubey J.P. & Jones J.L., 2008), mentre prevalenze tra il 30 e il 50% sono state riportate per l'Europa centrale e meridionale (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012; Maenz M. *et al.*, 2014).

1.2.2. Modalità di trasmissione del *T. gondii* e fattori di rischio per l'uomo

A differenza dei *Coccidi* propriamente detti, che vengono trasmessi solo per via oro-fecale, *Toxoplasma*, può essere trasmesso anche per via transplacentare e carnivorismo (Jones J.L & Dubey J.P., 2010). Leon Jacobs (1960) fu il primo ad ipotizzare l'esistenza di una trasmissione orizzontale dell'infezione per carnivorismo, mediante l'ingestione di carne poco cotta, evidenziando la resistenza delle cisti tissutali di *T. gondii* agli enzimi proteolitici (Hanafi E.M. *et al.*, 2014).

A causa delle possibili vie di trasmissione di questo protozoo, la gestione e la prevenzione delle infezioni umane richiede un'approfondita comprensione delle dinamiche del suo ciclo di vita (Gilot-Fromont E. *et al.*, 2012), in quanto sebbene il ciclo di vita del *T. gondii* sia stato descritto da

Frenkel J.K. sin dal 1970, vi sono diversi aspetti correlati alle sue modalità di infezione che rimangono oscuri (Bastien P. *et al.*, 2002).

Nel corso dell'evoluzione, *T. gondii* ha sviluppato molteplici vie di trasmissione nelle diverse specie ospiti (Figura 11) (Dubey J.P., 2009) di seguito descritte:

1.2.2.1. Via Oro-fecale (orizzontalmente)

Gli ospiti intermedi, specialmente gli esseri umani e gli erbivori, ma anche l'ospite definitivo, possono essere infettati con l'ingestione di cibo (tra cui verdura cruda e frutta non lavata) o acqua contaminati da oocisti sporulate presenti nell'ambiente (Jones J.L. & Dubey J.P., 2012). Evidenze circostanziali suggeriscono che l'infezione indotta dalle oocisti è clinicamente più grave rispetto a quella acquisita con l'ingestione della forma cistica (Dubey J.P., 2010).

1.2.2.2. Carnivorismo (orizzontalmente)

L'ingestione di cisti tissutali (bradizoiti), localizzate nelle carni degli ospiti intermedi, consumate crude o poco cotte (compresi gli insaccati), è il meccanismo principalmente coinvolto nella trasmissione dell'infezione di carnivori e onnivori, compreso l'uomo. Il consumo di carne ovina (Boughattas S. *et al.*, 2014; Dubey J.P., 2009b; Guo M. *et al.*, 2015), caprina (Neumayerová H. *et al.*, 2014) e suina (Vitale M. *et al.*, 2014; Dubey J.P., 2009a) infetta è considerata una delle maggiori vie di esposizione al parassita in molte nazioni (Opsteegh M. *et al.*, 2016; EFSA, 2013; EFSA, 2011; Burrells A. *et al.*, 2015; Djurkovic-Djakovic O. *et al.*, 2013).

Attualmente non è possibile stabilire in che proporzione incida la carne come fonte di toxoplasmosi umana rispetto a quello esercitato dalle oocisti e non esistono test che possano stabilirlo discriminando tra le diverse fonti di infezione (Dubey J.P. *et al.*, 2011; Dubey J.P. & Jones J.L., 2008; Boyer K.M. *et al.*, 2011; Hill D.E. *et al.*, 2011). È invece certo, che lo stile di vita dell'individuo, sia determinante sulle modalità di trasmissione del parassita. In uno studio multicentrico europeo, condotto in diverse parti della Francia, dell'Italia, del Belgio, della Danimarca e della Svezia, tra il 30% e il 63% dei casi di toxoplasmosi sono stati attribuiti al consumo di prodotti a base di carne non

cotta o cruda e dal 6 al 17% delle infezioni è stato attribuito al contatto con il suolo contaminato da oocisti (Cook A.J.C. *et al.*, 2000).

1.2.2.3. *Via Transplacentare (verticalmente)*

La trasmissione transplacentare di tachizoiti al feto può verificarsi nelle donne sieronegative che hanno contratto l'infezione primaria durante la gravidanza. In seguito alla colonizzazione della placenta da parte dei tachizoiti durante la fase iniziale della gravidanza, essa resta fonte di potenziale contagio fetale, fino al momento del parto. La trasmissione congenita è stata documentata anche in altri ospiti intermedi.

1.2.2.4. *Ingestione di tachizoiti*

I tachizoiti sono stati ritrovati nel latte di diversi ospiti: piccoli ruminanti, bovini, cammelli e topi (Powell C.C.M. *et al.*, 2001; Dehkordi F.S. *et al.*, 2013). Ad oggi, la correlazione tra la Toxoplasmosi clinica acquisita nell'uomo e il consumo di latte non pastorizzato è stata documentata solo per il latte caprino (Riemann H.P. *et al.*, 1975; Sacks J.J. *et al.*, 1982, Veronesi R., 2005; Skinner L.J. *et al.*, 1990). Ma la presenza di DNA di *T. gondii* nel latte ovino (Fusco G. *et al.*, 2007; Camossi L.G. *et al.*, 2011; Dehkordi F.S. *et al.*, 2013) e caprino (Bezerra M.J.G. *et al.*, 2013; Mancianti F. *et al.*, 2013; Dubey J.P., 2010; Jones J.L. *et al.*, 2009) suggerisce che il consumo di latte crudo o prodotti lattiero-caseari a base di latte crudo, può essere causa di toxoplasmosi umana (Gazzonis A.L. *et al.*, 2015; EFSA, 2007).

Nonostante numerosi lavori scientifici abbiano affrontato questa tematica, ad oggi rimangono delle incongruenze sul ruolo svolto dai tachizoiti presenti nel latte. I tachizoiti sono sensibili agli enzimi proteolitici e sono generalmente distrutti dalla digestione gastrica, ma è stato suggerito che in rare occasioni, possano penetrare attraverso lesioni della mucosa e accedere alla circolazione o al sistema linfatico dell'ospite prima di raggiungere lo stomaco (Riemann H.P. *et al.*, 1975; Sacks J.J. *et al.*, 1982; Johnson A.M., 1997). Inoltre, i tachizoiti occasionalmente sopravvivono per un breve periodo di tempo (fino a 2 ore) in soluzioni acide di pepsina (Dubey J.P., 1998).

Nei soggetti adulti, durante i pasti, il pH dello stomaco può aumentare fino a 5 per diverse ore per cui i tachizoiti non riescono a raggiungere l'intestino tenue. Invece i neonati sono più suscettibili alla toxoplasmosi rispetto agli adulti, in quanto possiedono un apparato digerente non ancora completamente sviluppato che produce una bassa concentrazione di enzimi proteolitici, insufficienti a disattivare i tachizoiti durante la digestione gastrica (Tenter A.M. *et al.*, 2000). In letteratura abbiamo evidenza di come i tachizoiti presenti nel colostro o nel latte materno possano infettare i neonati durante l'allattamento se nella madre è in corso un'infezione primaria acuta da *T. gondii* (Bonametti A.M. *et al.*, 1997; Tavares A.L.C. *et al.*, 2006).

Costa V.M. e Langoni H. (2010) hanno confermato il passaggio dei tachizoiti nel latte materno secreto da ratte infettate sperimentalmente così come la sieroconversione della nidiata subito dopo l'allattamento.

Oltre che nel sangue e nel latte, i tachizoiti sono stati rilevati in altri fluidi del corpo, tra cui saliva, espettorato, urina, lacrime e liquido seminale degli ospiti intermedi (Dehkordi F.S. *et al.*, 2013; Pandey S. *et al.*, 2015; Wanderley F.S. *et al.*, 2015; Lopes W.D.Z., 2013; Santana L.F. *et al.*, 2010; Santana L.F. *et al.*, 2013; Moura A.B. *et al.*, 2007), ma nell'uomo non vi è attualmente alcuna prova di trasmissione orizzontale di *T. gondii* tramite queste vie.

Anche la prevalenza di *T. gondii* nelle uova è estremamente bassa e l'ingestione di uova crude non è considerata importante ai fini della trasmissione della malattia (Dubey J.P., 2010).

1.2.2.5. *Trasfusione di sangue, trapianto di organi o di cellule staminali*

Il trapianto di organi e cellule staminali infetti o la trasfusione di sangue di un soggetto con toxoplasmosi acuta possono dare origine ad infezioni fatali in un ricevente sieronegativo, che riceve una terapia immunosoppressiva, oppure può attivare un'infezione latente in un ricevente sieropositivo che riceve l'immunoterapia (Jones J.L. *et al.*, 2001; Slavin M. A. *et al.*, 1994; Wreghitt T.G. & Joynson D.H.M., 2001; Renoult E. *et al.*, 1997).

La trasfusione ordinaria del sangue è virtualmente priva di pericoli, ma in alcuni casi la trasfusione di sangue infetto e il trapianto di midollo osseo sono stati ricondotti ad episodi di toxoplasmosi. Sembra che il pericolo di trapianto di un organo da un donatore sieropositivo ad un

ricevente sieronegativo sia maggiore di rispetto al trapianto di un organo da un donatore sieronegativo ad un ricevente sieropositivo (Dubey J.P., 2010).

Meno frequente, ma non per questo meno importante, è l'accidentale inspirazione di polvere contaminata durante le operazioni di giardinaggio o di pulizia della lettiera del gatto (Pandey S. *et al.*, 2015).

Nella maggior parte dei casi, l'infezione umana è acquisita nella fase postnatale, ma attualmente non è stato ancora accertato quale tra queste vie di trasmissione sia la più importante dal punto di vista epidemiologico (Tenter A.M. *et al.*, 2000).

Gli studi effettuati sull'uomo, hanno dimostrato che le fonti d'infezione possono variare tra popolazioni con culture ed abitudini alimentari differenti (Dubey J.P. & Beattie C.P., 1988).

1.2.3. Patogenesi

Il meccanismo patogenetico responsabile della trasmissione di *T. gondii* risiede nella sua abilità di eludere il sistema immunitario dell'ospite persistendo per tutta la sua vita sotto forma di cisti tissutali latenti, che si localizzano principalmente nel cervello, muscoli e retina (Weiss L.M. & Kim K., 2000; Sullivan W.J. & Jeffers V., 2012). L'incistamento permette a *T. gondii* di persistere nell'ospite e offre al parassita l'occasione per diffondere a nuovi ospiti senza procedere attraverso la sua fase sessuale, che è limitata agli ospiti definitivi, ossia i felini. Le cisti tissutali contenenti i bradizoiti, se l'immunità dell'ospite viene compromessa, riattivandosi, possono causare la toxoplasmosi (Ajzenberg D. *et al.*, 2016; Sullivan W.J. & Jeffers V., 2012).

Gli effetti patologici della toxoplasmosi riguardano unicamente lo stadio di sviluppo extra-intestinale. La maggior parte delle infezioni ha inizio nel tratto intestinale e i protozoi vengono disseminati per via linfatica e attraverso il sistema portale con conseguente invasione dei vari organi e tessuti. Durante questa fase, l'ospite può presentare febbre e linfadenopatia di solito laterocervicale. Con la progressione della malattia, i tachizoiti sotto la pressione del sistema immunitario si trasformano in bradizoiti. La fase cronica dell'infezione è generalmente asintomatica. Se l'infezione viene contratta per la prima volta durante la gravidanza è possibile l'insorgenza di infezioni congenite.

1.2.4. Aspetti clinici

1.2.4.1. *Toxoplasmosi acquisita*

La maggior parte delle infezioni da *T. gondii* nell'uomo vengono acquisite nel periodo post-natale e decorrono in maniera silente o paucisintomatica, meno del 10-20% degli individui sviluppano i segni clinici della malattia (Holland G.N. *et al.*, 2003; Piergili Fioretti D., 2004). In quest'ultimo caso l'infezione primaria è associata a sintomi simil-influenzali, lievi e non specifici (astenia, mialgia, febbre, linfadenopatia di solito laterocervicale). Più raramente la toxoplasmosi si accompagna ad una sindrome simil-mononucleosica caratterizzata da febbre, mal di gola, cefalea e linfocitosi (Saadatnia G. & Golkar M., 2012). Gravi manifestazioni come encefalite, miocardite, polimiosite, pneumonite ed epatite sono molto rare e non frequenti (Montoya J.G. & Liesenfeld O., 2004). Tuttavia in Sud America (Guiana Francese), casi mortali di toxoplasmosi associati ad uno ceppo atipico altamente virulento sono stati riportati da individui immunocompetenti (Carme B. *et al.*, 2002; Demar M. *et al.*, 2012). E di recente altri due gravi casi di toxoplasmosi verificatisi in Francia descritti in individui immunocompetenti sono stati causati da ceppi atipici; per entrambi i pazienti la causa più probabile dell'infezione è stato il consumo di carne di cavallo infetta importata dal Brasile e dal Canada (Pomares C. *et al.*, 2011).

Non è noto se la diversa manifestazione dei segni clinici nei soggetti immunocompetenti sia legata al diverso genotipo, alla variabilità della specie ospite o ad altri fattori (Dubey J.P. *et al.*, 2008). Nei soggetti immunocompetenti l'infezione primaria viene facilmente contrastata, ma può portare alla formazione di cisti vitali che localizzandosi nei tessuti muscolare e cerebrale, in seguito a compromissione del sistema immunitario, possono riattivarsi, come nel caso di pazienti affetti da HIV, pazienti sottoposti a trapianti d'organo e pazienti oncologici trattati con farmaci immunosoppressivi, nei quali l'infezione ha implicazioni pericolose e fatali (Jones J.L. *et al.*, 2014; Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012).

T. gondii è una delle principali cause di malattie opportunistiche che colpiscono gli individui immunocompromessi, provocando encefaliti e persino la morte se non trattate adeguatamente (Montoya J.G. & Liesenfeld O., 2004; Jones J.L. *et al.*, 2014; Weiss L.M. & Kim K., 20013; Dubey J.P. *et al.*, 2012). L'encefalite toxoplasmica in pazienti con HIV è una malattia pericolosa, soprattutto a causa della riattivazione delle cisti di *T. gondii* nell'encefalo. Recentemente, l'incidenza

dell'encefalite da *T. gondii* nei pazienti con HIV è notevolmente diminuita dopo l'introduzione della Terapia Antiretrovirale Altamente Attiva (HAART). Tuttavia, in alcuni Paesi con un'alta prevalenza di *T. gondii*, l'encefalite toxoplasmica è ancora la lesione cerebrale più comune nei pazienti affetti da HIV (Antinori A. *et al.*, 2004; Mohraz M. *et al.*, 2011; Jones J.L. & Roberts J.M., 2012; George B.P. *et al.*, 2014).

1.2.4.2. *Toxoplasmosi congenita*

Anche se l'infezione primaria in gravidanza è nel 90% dei casi asintomatica ed autolimitante, il protozoo può attraversare la barriera placentare, infettare il feto, e causare retinocoroiditi, idrocefalo, ritardo mentale, attacchi epilettici, o addirittura la morte del feto (Weiss L.M. & Kim K., 2013; Jones J.L. *et al.*, 2003; Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012; Saadatian G. & Golkar M., 2012).

Il rischio che *Toxoplasma* superi la barriera placentare e possa quindi infettare il feto, dipende dall'età gestazionale in cui si verifica la sieroconversione materna. Secondo i dati forniti dal SYROCOT (*Systemic Review on Congenital Toxoplasmosis study group*) la probabilità di trasmissione stimata è il 15% a 13 settimane, il 44% a 26 settimane e il 71% a 36 settimane, per raggiungere il 90% nelle ultime settimane di gestazione (Thiébaud R. *et al.*, 2007). La gravità del danno embrio-fetale è invece inversamente correlata all'epoca di gravidanza della sieroconversione materna: i nati da madre con infezione nel primo trimestre di gravidanza, più frequentemente mostrano segni di una toxoplasmosi grave; al contrario, la maggior parte di quelli la cui madre ha contratto l'infezione nell'ultimo trimestre, ha un'infezione subclinica, confermata dagli accertamenti sierologici specifici eseguiti nel corso del primo anno di vita (Thiébaud R. *et al.*, 2007).

Il quadro clinico per un neonato che ha contratto la toxoplasmosi per via congenita, comprende diverse possibilità: dalla normalità alla morte in utero. La sintomatologia classica, descritta da Wolf A. nel 1939 come triade: idrocefalia, calcificazioni intracraniche e corioretinite, è divenuta molto rara (Remington J.S. *et al.*, 2006), mentre più del 75% dei neonati è asintomatico alla nascita e può presentare sintomi più tardivamente. Altre manifestazioni cliniche dell'infezione fetale sono il ritardo di accrescimento endouterino e la prematurità. I segni neurologici sono quelli

che più gravemente caratterizzano l'infezione congenita; i più frequenti sono le convulsioni, il nistagmo, la microcefalia.

L'infezione contratta in utero è spesso associata ad un elevato rischio di toxoplasmosi oculare dovuto alla riattivazione spontanea della malattia, per cui molti neonati infetti, spesso asintomatici alla nascita, possono presentare disabilità visive in un secondo momento (Peyron F. *et al.*, 2011; Wallace G.R. & Stanford M.R., 2008).

La toxoplasmosi oculare è una delle principali cause di retinocoroiditi in tutto il mondo, sia in individui immunocompromessi che immunocompetenti e può verificarsi immediatamente o molto tempo dopo l'infezione iniziale (Jones J.L. & Holland G.N., 2010).

Interessanti studi multicentrici e retrospettivi su casi clinici di toxoplasmosi oculare, hanno rivelato che la toxoplasmosi oculare è il risultato dell'infezione acquisita dopo la nascita in almeno due terzi dei pazienti, quando è stato possibile determinare l'origine dell'infezione (Gilbert, R.E. & Stanford, M.R. 2000; Delair E. *et al.*, 2008).

La toxoplasmosi oculare è molto comune nell'America meridionale e centrale, nei Caraibi e nelle parti dell'Africa tropicale rispetto all'Europa e all'America settentrionale. La malattia oculare in Sud America è più grave che in altri continenti e si manifesta con lesioni più grandi, più numerose e più ricorrenti che hanno delle ripercussioni particolarmente dannose per la vista, in quanto causate da genotipi atipici del parassita estremamente virulenti. La toxoplasmosi oculare in Sud America è una delle principali cause di cecità nella popolazione, sia nei bambini che negli adulti (Ajzenberg D., 2011; Petersen E. *et al.*, 2012).

1.2.5. Riferimenti legislativi sulla Toxoplasmosi

La toxoplasmosi è stata riconosciuta dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA, *European Food Safety Authority*) tra le zoonosi parassitarie con più alta incidenza umana (EFSA, 2007).

Il suo impatto sulla salute pubblica la rende oggetto di regolamentazioni a livello europeo e nazionale.

In Italia, la toxoplasmosi fa capo a due norme di carattere generale: il *Decreto Ministeriale della Sanità del 15 dicembre 1990*, ed il *Decreto Legislativo n. 191 del 4 aprile 2006*.

Secondo quanto previsto dal vigente *Decreto Ministeriale della Sanità del 15 dicembre 1990*, in ambito medico la sorveglianza della toxoplasmosi rientra nel “*Sistema Informativo delle Malattie Infettive e Diffusive*” (SIMID). Il suddetto decreto stabilisce cinque classi di notifica delle malattie infettive, sulla base della loro pericolosità e impatto sulla sanità pubblica. Esso stabilisce per quanto concerne l’obbligo di denuncia dei casi umani, che il medico curante segnali all’Azienda Sanitaria Locale le zoonosi incluse tra le malattie delle classi I, II, III, IV e V del presente decreto. Quest’ultima classe include anche le malattie infettive elencate nel *Regolamento di Polizia veterinaria (D.P.R. 320/54)*, ma non espressamente menzionate come la toxoplasmosi.

La denuncia all’autorità sanitaria di tali malattie è obbligatoria, a prescindere dalla classe di appartenenza. Tuttavia le modalità di segnalazione, notifica e il conseguente flusso informativo variano a seconda della classe in cui è inclusa la malattia.

In particolare, per le malattie appartenenti alla classe I, si richiede la segnalazione immediata perché soggette al regolamento sanitario internazionale o perché rivestono particolare interesse in quanto possono essere la causa di serie implicazioni in sanità pubblica (Botulismo, Rabbia, Trichinellosi). Mentre nel caso della toxoplasmosi, la segnalazione dev’essere fatta entro le 24 ore solo in caso di focolaio epidemico.

In linea generale, i report relativi alle notifiche vengono periodicamente trasmessi dalle ASL alla Regione d’appartenenza che, a sua volta trasmette i dati agli Organismi Centrali (Ministero della salute e Istituto Superiore di Sanità) ed eventualmente internazionali (UE, OMS). I dati acquisiti confluiscono nel SIMID, *Sistema Informativo delle Malattie Infettive e Diffusive*, finalizzato alla gestione della banca dati delle malattie infettive (Ministero della Salute, 2017).

A livello europeo notevole importanza ha assunto la *Direttiva (CE) 2003/99 sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici*, detta anche *Direttiva Zoonosi*, che ha inserito la toxoplasmosi tra le zoonosi da sottoporre a sorveglianza in funzione della situazione epidemiologica nazionale, vista la carenza di dati epidemiologici significativi dell’infezione nell’uomo e negli animali e delle tossinfezioni alimentari. Nell’allegato I della *Direttiva (CE) 2003/99* sono contenuti due

elenchi (A e B) delle patologie zoonotiche: nell'elenco A vi sono le zoonosi e gli agenti zoonotici da sottoporre a sorveglianza obbligatoriamente, mentre nell'elenco B vi sono i nomi delle zoonosi e degli agenti zoonotici da sottoporre a sorveglianza in base alla situazione epidemiologica dei singoli Paesi, tra cui si trova anche la toxoplasmosi.

La *Direttiva (CE) 2003/99* sulla sorveglianza e il controllo delle zoonosi è stata recepita in Italia, a livello nazionale, con il *Decreto Legislativo del 4 aprile 2006 n. 191*. Considerata l'epidemiologia della toxoplasmosi e delle altre zoonosi e le complesse interazioni tra uomo, animali ed ambiente, per il coordinamento dell'azione di lotta contro le zoonosi, la *Direttiva (CE) 2003/99*, raccomanda di svolgere attività di monitoraggio e sorveglianza degli agenti di zoonosi soprattutto a livello di produzione primaria ossia negli animali serbatoio presenti in allevamento. È necessario integrare le informazioni ottenute in allevamento con quelle delle patologie esistenti nella popolazione umana attraverso un approccio multidisciplinare tra il settore medico e quello veterinario, per poter stabilire le priorità degli interventi e misurare la loro efficacia in termini di prevenzione della malattia.

Al riguardo, l'art. 5, del *Regolamento di Polizia Veterinaria (DPR 320/54)* prevede che i casi di zoonosi vengano segnalati dal veterinario ufficiale al Servizio di Igiene Pubblica, unitamente alle misure urgenti adottate per impedire la trasmissione all'uomo. Parimenti il responsabile del Servizio di Igiene Pubblica deve segnalare al Servizio Veterinario i casi di zoonosi accertati nell'uomo.

I dati europei sulla sorveglianza delle zoonosi, raccolti sia in ambito veterinario che umano (in conformità dell'art. 5 della *Direttiva CE 92/117*) sono pubblicati in un rapporto annuale, curato dall'EFSA, che fornisce il quadro generale della situazione europea.

Nei prossimi anni, si dovrebbe assistere anche ad un sostanziale rafforzamento della rete di sorveglianza europea e a una progressiva armonizzazione dei sistemi di monitoraggio nazionali, soprattutto grazie al Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (ECDC, *European Centre for Disease Prevention and Control*). Questa Agenzia, istituita con il *Regolamento (CE) 851/2004* e inaugurata nel 2005, opera indipendente dall'UE e riunisce le funzioni precedentemente svolte da vari uffici e comitati. Essa è destinata, a creare una rete di sorveglianza delle malattie infettive a livello comunitario e alla diffusione delle relative informazioni.

Poiché la toxoplasmosi rimane una delle maggiori preoccupazioni della sanità pubblica soprattutto se contratta in gravidanza (Montoya J.G. & Liesenfeld O., 2004), un'interessante ricerca ha voluto descrivere l'eterogeneità dei sistemi di sorveglianza epidemiologica per la toxoplasmosi congenita implementati in Europa (Bénard A. *et al.*, 2008). Dai risultati del sondaggio fornito dal gruppo *Eurotox* solo 16 dei 28 Paesi investigati, hanno riferito un sistema di sorveglianza di *routine* per la toxoplasmosi. In particolare in 12 Paesi (Bulgaria, Cipro, Repubblica Ceca, Inghilterra e Galles, Estonia, Irlanda, Lettonia, Lituania, Malta, Polonia, Scozia e Slovacchia), la sorveglianza è stata progettata per individuare la toxoplasmosi clinica, sia congenita che acquisita. Mentre solo quattro Paesi hanno segnalato l'esistenza di un sistema di monitoraggio specifico per la toxoplasmosi congenita, su base regionale in Italia, e su base nazionale in Danimarca, Francia e Germania. In conclusione, la sorveglianza epidemiologica della toxoplasmosi congenita deve essere migliorata per poter determinare il vero peso della malattia e per valutare l'efficacia dei programmi di prevenzione esistenti.

La toxoplasmosi congenita ha un impatto socioeconomico importante, soprattutto sugli individui che in seguito all'infezione sono stati affetti da ritardo mentale e cecità, per questo motivo si distinguono tre livelli di misure di prevenzione. La prevenzione primaria è caratterizzata da programmi educativi e sanitari, in cui le gestanti sieronegative ricevono orientamenti sulle fonti di infezione e sull'adozione di misure preventive. Il livello secondario consiste nello *screening* sierologico durante la cura prenatale. Infine, il livello terziario opera sui neonati già infetti, cercando di prevenire i danni clinici e le complicazioni tardive.

In Italia, la sierologia per la toxoplasmosi è compresa negli esami previsti per il controllo della gravidanza ai sensi del *Decreto Ministeriale del 1998* (G.U. 20/10/98) con valutazione sierologica iniziale e controlli mensili o trimestrali nelle donne risultate sieronegative per *T. gondii*. Lo *screening* prenatale è stato adottato anche in altri Paesi europei: Francia, Austria, Slovenia, Germania, Svizzera e Belgio (Lopes-Mori F.M.R. *et al.*, 2011; Hill D.E. & Dubey J.P., 2002).

Alla luce di quanto detto, in linea all'art. 20 del *Regolamento (CE) 854/2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano*, la Commissione Europea (CE) ha manifestato le sue preoccupazioni sul ruolo svolto dagli alimenti di origine animale nella trasmissione della toxoplasmosi, presentando un mandato all'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) in merito ad alcuni aspetti riguardanti

l'ispezione delle carni. Il *panel Biological Hazards* dell'EFSA è stato invitato a rilasciare pareri scientifici relativi all'ispezione delle carni nelle diverse specie animali da reddito tra cui ovini, caprini e suini. Inoltre, è stata richiesta l'assistenza tecnica ai fini dell'armonizzazione dei criteri epidemiologici, inerenti specifici pericoli per la salute pubblica, da prendere in considerazione per l'adattamento delle procedure di ispezione delle carni definita dal *Regolamento (CE) 854/2004*.

L'EFSA in risposta ha emesso due report nei quali ha analizzato la corrente situazione in suini e piccoli ruminanti definendo le basi per la modernizzazione della visita ispettiva (EFSA 2011; 2013). L'assenza di alterazioni anatomopatologiche rilevabili nel corso dell'ispezione *post-mortem* tradizionale ha condotto ad un processo di revisione della metodologia ispettiva delle carni e la sua graduale evoluzione verso un sistema basato sull'analisi del rischio. Non essendo possibile svelare l'infezione al mattatoio, la tutela deve essere attuata a livello di produzione primaria. Il *panel* scientifico sui pericoli biologici (*Biological Hazards*) dell'EFSA a partire dall'analisi dei punti di forza e delle criticità della visita ispettiva *ante-* e *post-mortem* degli animali ed in relazione agli studi scientifici e ai dati epidemiologici disponibili, ha suggerito viste le caratteristiche subdole di questa zoonosi, la necessità di un approccio di filiera integrato, mirato all'individuazione e suddivisione degli animali in categorie di rischio (EFSA, 2011; 2013). L'ispezione semplificata delle carni dovrebbe procedere attraverso la preselezione degli animali, realizzata mediante un'ispezione *ante-mortem* in allevamento e l'esecuzione di esami di laboratorio sugli animali. In questo processo di revisione, notevole è l'importanza assunta dalle Informazioni sulla Catena Alimentare (ICA) che riportando indicazioni dettagliate sulla vita degli animali, nonché sui risultati delle ispezioni *ante-* e *post-mortem* dei soggetti provenienti dallo stesso allevamento macellati in precedenza, consentono di suddividere gli animali in gruppi sulla base del rischio. L'EFSA inoltre incoraggia nei sistemi di produzione integrata (che operano nel rispetto dei criteri definiti dal *Regolamento CE 1244/2007*) l'applicazione di procedure di corretta prassi operativa (*Good Manufacturing Practices*) e buone prassi igieniche (*Good Hygienic Practices*) implementando quando possibile protocolli basati sul sistema HACCP (EFSA, 2011; 2013).

Inoltre a causa dell'importanza zoonotica di *T. gondii*, l'EFSA, ha raccomandato l'introduzione di programmi di sorveglianza per la toxoplasmosi negli animali utilizzati dall'uomo a scopo alimentare (EFSA, 2007; 2011; 2013). Tali dati sono essenziali per chiarire l'importanza relativa alle varie fonti di infezioni nell'uomo, ai fini del controllo della malattia. Ad oggi, come visto

precedentemente, solo pochi Paesi controllano regolarmente la toxoplasmosi negli esseri umani, e finora, nessun Paese controlla l'infezione negli animali da reddito.

CAPITOLO II

2. TOXOPLASMOSI NEGLI ANIMALI DA REDDITO E RISCHI PER L'UOMO

2.1. TOXOPLASMA GONDII IN ALLEVAMENTO

L'importanza di raccogliere dati epidemiologici sulla toxoplasmosi degli animali allevati a scopo alimentare è correlata alla capacità del parassita di produrre cisti tissutali negli organi degli animali che hanno contratto l'infezione (EFSA, 2007).

Nella maggior parte dei Paesi, i dati epidemiologici sull'infezione da *T. gondii* negli animali da reddito non sono regolarmente monitorati e le informazioni sulla sua diffusione provengono principalmente da indagini locali. Diversi studi hanno evidenziato che la sieroprevalenza di *T. gondii* negli animali da reddito si è ridotta considerevolmente nelle aree in cui si utilizzano tecniche di allevamento intensivo con un aumento delle misure di biosicurezza per prevenire l'esposizione ai gatti e ai loro escrementi. Al contrario la prevalenza in altri animali da carne come pecore e capre non è cambiata nel corso del tempo perché la sorgente di infezione di questi erbivori, mantenuti prevalentemente sui pascoli, è rimasta invariata (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012). A causa infatti dell'elevata resistenza delle oocisti alle condizioni microclimatiche, qualsiasi tipo di materiale fecale proveniente da gatti infetti rappresenta un pericolo di infezione per questi ospiti intermedi (Nesbakken T., 2009).

2.1.1. Toxoplasmosi nei piccoli ruminanti

2.1.1.1. Epidemiologia

L'infezione da *T. gondii* è stata segnalata negli allevamenti ovini e caprini di tutto il mondo con tassi di sieroprevalenza che variano ampiamente tra i diversi Paesi, rispettivamente dal 4% al 95% per gli ovini (Glor S.B. *et al.*, 2013; Dubey J.P., 2009), e dal 4 al 77% per i caprini (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012). Trattandosi di animali che per la maggior parte del tempo vengono tenuti al pascolo, queste variazioni sono spesso influenzate dalla contaminazione ambientale. Se l'ambiente è fortemente contaminato da oocisti, la prevalenza dell'infezione può superare il 90% (Samra N.A.

et al., 2007). Ciò è particolarmente importante perché le cisti tissutali, negli ovini, sono state ritrovate in molte parti edibili (Dubey, J.P. & Jones, J.L. 2008) e dal momento che i piccoli ruminanti sono un'importante fonte di proteine (latte e carne), sia nei Paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo, essi rappresentano un'importante fonte di rischio per l'uomo.

In Europa sono stati riscontrati tassi di sieroprevalenza compresi in un range di 27,8-89% negli ovini e di 18,5-52,8% nei caprini (Halos L. *et al.*, 2010; Opsteegh M. *et al.*, 2010; Berger-Schoch A.E. *et al.*, 2011; Iovu A. *et al.*, 2012; Tzanidakis N. *et al.*, 2012; Garcia-Bocanegra I. *et al.*, 2013; Lopes A.P. *et al.*, 2013; Gazzonis A.L. *et al.*, 2015).

In Italia, la toxoplasmosi è ampiamente diffusa nell'uomo e negli animali (Tomasoni L.R. *et al.*, 2010). Per questo motivo la raccolta di dati epidemiologici sulla toxoplasmosi ovina e caprina è di fondamentale importanza, considerato che in Italia vengono allevati 7. 284. 874 di ovini, e 1. 026. 263 di caprini (ISTAT, 2016).

Rinaldi L. & Scala A. nel 2008 hanno recensito e pubblicato in una *review* i tassi di positività riscontrati nel corso di tre decenni in studi scientifici riguardanti le diverse specie di animali da reddito, tra cui quelli degli ovini (*range* 19,2 - 51,3%) e dei caprini (*range* 11,7- 95%) (Tabella 1). In studi epidemiologici più recenti, condotti nelle diverse regioni italiane, per le pecore sono stati riportati tassi di positività variabili: 59,3 % in Nord Italia (Gazzonis A.L. *et al.*, 2015), 78% in Italia Centrale (Gaffuri A. *et al.*, 2006), 28,5 in Campania ed infine 33,3% in Toscana (Fusco G. *et al.*, 2007; Cenci-Goga B.T. *et al.*, 2013) (Tabella 1). Mentre per i caprini le ultime indagini epidemiologiche, condotte in Toscana e in Lombardia, hanno evidenziato sieroprevalenze rispettivamente del 60,6% e 41,7% (Mancianti F. *et al.*, 2013; Gazzonis A.L. *et al.*, 2015) (Tabella 1). Tuttavia i dati disponibili non sono equiparabili a causa dell'uso di metodi sierologici non standardizzati e dell'eterogeneità dei metodi di campionamento (animali di età diverse e differenti condizioni di allevamento).

La Sardegna è la regione italiana con la più alta percentuale di capi, in possesso di circa la metà del patrimonio ovino complessivo italiano (3. 300. 450) e oltre il 20% dei capi totali di capre (237. 233) (ISTAT, 2016). Nonostante ciò, allo stato attuale, abbiamo poche informazioni sulla diffusione dell'infezione nei piccoli ruminanti presenti sull'isola, ottenuti principalmente da indagini mirate a svelare la presenza del parassita in allevamenti indagati a seguito di episodi di aborto (Masala G. *et al.*, 2003; Masala G. *et al.*, 2007; Chessa G. *et al.*, 2014). Le indagini

sieroepidemiologiche condotte da Masala G. *et al.* (2003) mediante l'uso della immunofluorescenza indiretta (IFI) hanno consentito di riferire valori di sieroprevalenza del 28,4% negli ovini e del 12,3% nei caprini. Mentre uno studio svolto da Natale A. *et al.* (2006) presso 22 allevamenti ovini della Sardegna, ha evidenziato anticorpi nei confronti del protozoo nel 51,3% degli ovini monitorati; nei vari allevamenti le sieropositività variavano dal 18,4% al 97,9%.

I pochi dati pubblicati sulla tipizzazione genetica di questo protozoo isolato in pecore indicano che il tipo II è il lignaggio predominante dei ceppi isolati (Dubey J.P., 2009b; Owen M.R. & Trees A.J., 1999; Jungersen G. *et al.*, 2002; Dumètre A. *et al.*, 2006).

Anche i dati sulla genotipizzazione dei ceppi di *T. gondii* circolanti nelle capre nel mondo sono molto limitati. Recentemente, Mercier A. *et al.* (2011) in Africa (Gabon), isolarono ceppi di *T. gondii* avirulenti di tipo III. Mentre negli USA, ceppi isolati dal miocardio di capre destinate al consumo umano, utilizzati per studi di genotipizzazione, hanno rivelato la presenza dei genotipi II, III e di alcuni genotipi atipici (Dubey J.P. *et al.*, 2011). Indipendentemente dai genotipi identificati, gli studi suggeriscono che capre e pecore possono essere un'importante fonte di toxoplasmosi per l'uomo.

Per quanto ne sappiamo, la tipizzazione genetica di *T. gondii* isolati in Italia è stata eseguita nelle capre da Mancianti F. *et al.* (2013) e nelle pecore da Chessa G. *et al.* (2014). Nel primo studio, condotto in Toscana, la caratterizzazione genetica ha rivelato la presenza di ceppi clonali di tipo III e I nella maggior parte dei campioni, ma anche la presenza di genotipi atipici in 2 campioni. La presenza di ceppi atipici potrebbe essere ricondotta a fenomeni di ricombinazione genetica avvenuti durante la riproduzione sessuale del parassita nei gatti, che convivono in promiscuità con le capre esaminate (Mancianti F. *et al.*, 2013). Nel secondo studio, condotto nella regione Sardegna, il DNA di *T. gondii* è stato rilevato in 5 placente, 14 cervelli, e 2 fegati analizzati mediante PCR; tutti gli isolati sono risultati appartenere al genotipo II, che come già ipotizzato in studi precedentemente svolti sull'isola potrebbe essere causa di aborto negli ovini (Chessa G. *et al.*, 2014).

2.1.1.2. Vie di trasmissione

La maggior parte delle pecore acquisisce la toxoplasmosi dopo la nascita (Innes E.A. *et al.*, 2009). L'infezione viene contratta principalmente orizzontalmente per via oro-fecale, mediante il consumo di mangimi o foraggi contaminati da oocisti sporulate (Innes E.A. *et al.*, 2009) e in minor misura può essere trasmessa verticalmente per via transplacentare (Esteban-Redondo L. *et al.*, 1999).

Sebbene non siano disponibili dati certi, si pensa che meno del 2% delle pecore contragga l'infezione da *T. gondii* per via congenita e che solo meno del 4% delle pecore, persistentemente infette, trasmetta il protozoo alla successiva generazione (Buxton D. *et al.*, 2007; Dubey J.P., 2009b). Diversi sono gli studi sulla trasmissione transplacentare da madre a feto attraverso placenta infetta (Dubey J.P. & Sharma S.P., 1980; Moura A.B. *et al.*, 2007; Dubey J.P., 2008; Dubey J.P. & Jones J.L., 2008; Scarpelli L. *et al.*, 2009). Tuttavia le modalità con cui avviene la trasmissione congenita in questa specie, non è ancora del tutto chiara. Si possono prevedere due possibili scenari: nel primo caso, l'esposizione primaria della pecora durante la gravidanza è seguita dalla trasmissione al feto, nel secondo caso, l'infezione del feto potrebbe essere conseguenza della riattivazione dell'infezione cronica nella femmina durante la gravidanza.

Tutt'oggi è in discussione l'importanza e la rilevanza della trasmissione congenita nella toxoplasmosi (Williams R.H. *et al.*, 2005). Negli agnelli e capretti neonati precolostrati, una sierologia positiva è diagnostica per forme congenite; il passaggio di anticorpi materni IgG con il colostro impone, in caso di sierologia positiva dopo assunzione del colostro, un secondo test a distanza di alcuni giorni per osservare la presenza di sieroconversione, significativa di infezione in atto, oppure il dosaggio delle IgM poiché non vengono trasmesse attraverso il colostro (Blewett D.A. & Watson W.A., 1984). La discriminazione isotipica tra i livelli degli anticorpi IgG1 (trasmessi principalmente per via colostrale) e IgG2 può portare un contributo nella determinazione tra passaggio passivo di anticorpi e produzione attiva (Piergili Fioretti D. & Manfredi M.T., 2014).

Tuttavia alcuni aspetti relativi alle possibili vie di trasmissione di questo protozoo sono ancora discutibili. La presenza di *T. gondii* nel seme dell'ariete (Lopes W.D.Z. *et al.*, 2009) e del becco (Santana L.F. *et al.*, 2010) hanno suggerito una possibile trasmissione per via venerea nelle pecore

e nelle capre e in considerazione dei notevoli disturbi riproduttivi che il protozoo arreca a queste specie esistono numerosi studi al riguardo.

Santana L.F. *et al.* (2013) sono stati tra i primi a sostenere l'esistenza di una possibile trasmissione venerea di *T. gondii* in capre coperte naturalmente da becchi infettati, con trasmissione verticale alla prole. Il loro progetto sperimentale prevedeva l'accoppiamento naturale di capre con maschi infettati sperimentalmente. I maschi da riproduzione sono stati divisi in tre gruppi di cui il primo è stato infettato per via orale con una dose di 2×10^5 oocisti; un secondo gruppo infettato con una dose di 1×10^6 di tachizoiti e il terzo gruppo utilizzato come controllo non è stato infettato.

Un ulteriore contributo scientifico a sostegno dell'ipotesi sulla trasmissione dell'infezione per via sessuale è stato dato da Wanderley F.S. *et al.* (2015) che per il loro lavoro di ricerca hanno utilizzato due becchi di cui uno infettato sperimentalmente per via orale con una dose di 2×10^5 oocisti del ceppo di *T. gondii* ME- 49 e uno non infettato usato come maschio di controllo. La sierconversione è stata osservata prima nel becco infettato e successivamente su 2 delle 5 capre con cui il becco è stato fatto accoppiare. Le due capre infettate hanno manifestato riassorbimento embrionico e aborto rispettivamente a distanza di 34 e 42 giorni dall'accoppiamento. Le restanti capre accoppiatesi con il becco infetto hanno portato a termine la gravidanza, ma l'80% dei capretti nati vivi sono risultati positivi alla PCR in almeno un organo.

Per quanto riguarda gli ovini, il gruppo di lavoro di De Moraes E.P.B.X. *et al.* (2010) ha effettuato delle sperimentazioni per valutare i potenziali disturbi riproduttivi indotti dalla somministrazione di liquido seminale di ariete contenente diverse dosi di tachizoiti di *T. gondii* in pecore. Diversamente dai precedenti studi, nelle pecore l'infezione dell'ariete e la fecondazione sono state eseguite nello stesso momento.

In conclusione, l'inseminazione con sperma fresco sperimentalmente contaminato con diverse dosi di tachizoiti di *T. gondii* ($6,5 \times 10^4$; 4×10^7) è stato in grado di infettare le pecore, suggerendo in questa specie la possibilità di trasmissione dell'infezione attraverso lo sperma.

Durante il corso della sperimentazione è stato possibile caratterizzare i disturbi riproduttivi che si sono manifestati nelle pecore infettate nelle fasi acute e croniche dell'infezione (De Moraes

E.P.B.X. *et al.*, 2010). Nelle pecore infettate il riassorbimento embrionale è stato osservato nella fase acuta dell'infezione; mentre anaestro persistente, idrometra, mucometra e cisti follicolari sono state osservate in un secondo momento. Le lesioni istopatologiche sono risultate simili a quelle riscontrate nella placenta di animali con toxoplasmosi. In conclusione, l'inseminazione artificiale con sperma, contenente tachizoiti sperimentalmente aggiunti, può portare all'instaurazione della toxoplasmosi nelle pecore e causare patologie riproduttive durante le fasi acute e croniche della malattia.

Anche in Brasile, i risultati preliminari ottenuti da Lopes W.D.Z. *et al.* (2009) relativi all'isolamento di *T. gondii* dal seme di arieti infettati sperimentalmente hanno suggerito che questo coccidio potesse essere trasmesso sessualmente. In relazione a tali presupposti, in una successiva sperimentazione Lopes W.D.Z. *et al.* (2013) hanno valutato la trasmissione sessuale di *T. gondii* in pecore in età riproduttiva sierologicamente negative alla toxoplasmosi prima dell'accoppiamento naturale con maschi infettati sperimentalmente. In breve, i maschi da riproduzione sono stati divisi in tre gruppi di cui il primo infettato mediante la somministrazione di una dose di oocisti del ceppo "P" di *T. gondii* (2×10^5), l'altro infettato con l'inoculazione di una dose di tachizoiti del ceppo RH di *T. gondii* (1×10^6) e l'ultimo gruppo non infetto che costituiva il maschio di controllo. Il controllo sierologico e le analisi biomolecolari eseguite rispettivamente mediante l'uso dell'IFA e della PCR hanno confermato anche in questa specie l'esistenza di una trasmissione per via venerea della toxoplasmosi con conseguente trasmissione verticale agli agnelli (Lopes W.D.Z. *et al.*, 2013).

2.1.1.3. Sintomi

La toxoplasmosi è una delle principali cause di aborto nelle pecore e nelle capre, ma in genere la manifestazione clinica è molto rara e la maggior parte delle infezioni sussiste subclinicamente nelle greggi (Dumètre A. *et al.*, 2006). Normalmente, i sintomi sono aspecifici e comprendono febbre, dispnea e tremori. La sintomatologia più importante riguarda gli animali in riproduzione. Pecore e capre sono suscettibili di toxoplasmosi congenita, che rappresenta una delle principali cause di aborto e mortalità neonatale (Borde G. *et al.*, 2006).

In pecore e capre gravide, il passaggio transplacentare del parassita (favorito dalla struttura sindesmocoriale della placenta) durante la fase parassitemica porta a manifestazioni diverse di

toxoplasmosi congenita, a seconda del momento gestazionale in cui si trova l'animale quando contrae l'infezione e di conseguenza in base alla maturità del sistema immunitario fetale (Piergili Fioretti D. & Manfredi M.T., 2014). La gravità dell'infezione transplacentare è più intensa se l'animale viene infettato durante i primi stadi di gravidanza (Dubey J.P., 2009b).

La scarsità di lavori sull'argomento non permette di valutare adeguatamente le possibili differenze patologiche tra capre e pecore. In linea di massima, si possono avere morte fetale e riassorbimento, morte embrionale e mummificazione (primi 40 giorni), morte fetale e aborto o natimortalità per malformazioni congenite (fra i 70 e 90 giorni), nascita di animali disvitali oppure sani, ma congenitamente infetti (dopo 110 giorni di gestazione) che possono comunque presentare segni di malattia dopo la nascita, contraddistinti da debolezza, mancanza di coordinazione muscolare e incapacità ad alimentarsi e possibile aborto al primo parto (Dubey J.P., 2009b; Guo M. *et al.*, 2015; Buxton D., 1998; Marquardt W.C. *et al.*, 2000; Smith M.C. & Sherman D.M. 2009; Solaiman S.G., 2010; Dubey J.P., 2010).

La presenza sporadica di aborti ripetuti può essere ascritta ad una riattivazione endogena con passaggio transplacentare da caduta dell'immunità cellulo-mediata (Piergili Fioretti D. & Manfredi M.T., 2014). L'indagine sierologica post-abortiva sulle madri è essenziale per validare i test istopatologici e biomolecolari sui materiali abortigeni, ma la sola positività sierologica delle madri non può essere correlata direttamente con l'aborto in quanto la presenza di infezioni croniche comporta positività sierologica (Piergili Fioretti D. & Manfredi M.T., 2014).

I feti abortiti vanno incontro a processi di autolisi o di mummificazione, ma più spesso presentano scarse lesioni o un semplice pallore della muscolatura scheletrica e del miocardio e degenerazioni necrotiche del cervello istologicamente apprezzabili. La diagnosi di aborto da toxoplasmosi è basata sul rilevamento di anticorpi specifici nella popolazione adulta mediante l'immunofluorescenza indiretta (IFI) o il test di agglutinazione su lattice (LAT) e all'esame istopatologico la presenza di lesioni caratteristiche nella placenta e negli organi del feto abortito.

La placenta mostra aree focali di necrosi e calcificazione dei cotiledoni fetali del diametro di 1-3 mm mentre il tessuto intercodiledonale è edematoso (Unzaga J.M. *et al.*, 2014).

Il protozoo può essere isolato nella placenta ed in miocardio, encefalo, polmoni o fegato fetali (Dubey J.P., 2008). Microscopicamente possono essere riscontrate aree di necrosi nella sostanza bianca del cervello e cervelletto del feto (Abu-Dalbou M. A. *et al.*, 2010). L'infezione nel feto è spesso associata a proliferazione focale delle cellule linfoidi e micro necrosi di reni, ghiandole surrenali, linfonodi e cervello (Buxton D., 1998; Dubey J.P., 2008; Dubey J.P. & Jones J.L., 2008).

Nella madre l'infezione determina lo sviluppo di una risposta immunitaria protettiva per le successive gravidanze (Radostits O.M. *et al.*, 2006; Buxton D. *et al.*, 2006; Buxton D. *et al.*, 2007; Innes E.A., 2009). Tuttavia, la protezione non è da considerare assoluta (Innes E.A., 2009; Edwards J.F. & Dubey J.P., 2013). Attualmente in Italia non esistono vaccini che prevengano l'aborto da toxoplasmosi nei piccoli ruminanti (Cenci-Goga G. *et al.*, 2013).

Per quanto riguarda i maschi, è stata constatata la presenza di *T. gondii* nel liquido seminale del becco (*Capra hircus*) infettato sperimentalmente (Santana L.F. *et al.*, 2010; 2013); e in alcuni studi condotti sull'ariete (*Ovis aries*) è stato visto come l'aumento della temperatura testicolare causata dall'infezione, favorirebbe la degenerazione del seme, correlata alla diminuzione della fertilità e ad alterazioni della sintesi proteica e dell'espressione genica nelle cellule germinative del Sertoli (Moreira E.P. *et al.*, 2001; Lopes W.D.Z. *et al.*, 2009).

La trasmissione congenita di *T. gondii* e i disordini riproduttivi, precedentemente descritti, generano notevoli perdite economiche negli allevamenti ovi-caprini, soprattutto nelle aree mediterranee vocate alla pastorizia come la Sardegna (Masala G. *et al.*, 2007; Pereira-Bueno J. *et al.*, 2004; Marquardt W.C. *et al.*, 2000; Ortega-Mora L.M. *et al.*, 2007; Innes E.A. *et al.*, 2009). Bisogna inoltre considerare che la trasmissione transplacentare nei piccoli ruminanti, rappresenta un considerevole rischio per la salute pubblica ed in particolare per le categorie sensibili, poiché non è infrequente che la prole sopravvissuta appaia clinicamente sana pur essendo cronicamente infetta. Questo problema riguarda soprattutto diverse popolazioni etniche e alcune parti dell'Europa, come la Francia ove è diffusa l'abitudine di consumare carne di agnello cruda o poco cotta considerata una prelibatezza (Ortega-Mora L.M. *et al.*, 2007).

Dubey J.P. & Jones J.L. (2008) osservarono come agnelli sopravvissuti alla prima settimana dopo la nascita, rimasero asintomatici sviluppando cecità a 3-4 mesi di età e alla macellazione risultarono positivi a *T. gondii* che fu isolato da vari organi: miocardio, lingua e muscoli scheletrici.

In Sardegna il ruolo svolto da *T. gondii* nell'aborto ovino e caprino è stato documentato da Masala G. *et al.* (2003; 2007) che hanno analizzato in due indagini i feti abortiti, raccolti in diversi allevamenti dell'isola. Gli studi, di seguito descritti, sono stati condotti presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale "G. Pregreffi" della Sardegna. Nel primo studio (1999-2002) vennero esaminati il siero e i prodotti di aborto (muscolo, fegato, IV stomaco, milza, cervello, placenta) provenienti da 964 aziende ovine e caprine dove si erano verificati aborti. Il siero degli animali adulti analizzato mediante immunofluorescenza indiretta, ha mostrato anticorpi specifici verso il *T. gondii*, in particolare negli ovini campionati son state ritrovate il 28,4% di positività per le anti-IgG e il 9% per le anti-IgM, mentre i caprini son risultati positivi per il 12,3% alle anti-IgG e per il 5,6% alle anti-IgM. Inoltre su 815 organi (670 feti e 145 placenti), l'11,1% dei tessuti ovini e il 6,4% di quelli caprini sono risultati positivi in PCR (Masala G. *et al.*, 2003).

Nella seconda indagine (2003-2005) furono esaminati 399 campioni ottenuti dai tessuti di feti abortiti e rispettive placenti (315 feti e 84 placenti) provenienti da 107 aziende ovine e caprine situate nel nord Sardegna. Il DNA di *T. gondii* fu riscontrato nel 18,1% dei feti e nel 13,1% delle placenti ovine e nel 13% dei feti e 25% delle placenti caprine (Masala G. *et al.*, 2007).

Pochi anni dopo, Zedda M.T. *et al.* (2010) monitorarono sierologicamente un'azienda sarda colpita da un focolaio di toxoplasmosi che provocò l'aborto del 7,2% di 430 pecore; negli animali adulti fu riferito un altissimo tasso di sieroprevalenza (IgG 31,52 – 62,56%; IgM 14,87%) e furono ritrovate IgG anti-*Toxoplasma* anche nel siero di uno degli allevatori, oltre che tracce di DNA di *T. gondii* in aliquote di grano e *pellets* prelevati da scorte di mangimi.

Tutti questi dati indicano chiaramente che in Sardegna le manifestazioni cliniche della toxoplasmosi svolgono un importante ruolo nelle perdite economiche legate alla mortalità degli agnelli e alla riduzione della produzione di latte (Masala G. *et al.*, 2003; 2007).

Uno studio più recente, eseguito sempre presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale "G. Pregreffi" della Sardegna, su diversi organi ovini analizzati attraverso *Nested* PCR ha evidenziato la presenza di *T. gondii* nel 3,5% delle placenti (5/142), nell' 87% dei cervelli (14/16) e nel 66,6% dei fegati (2/3) analizzati. Lo stesso studio ha dimostrato la presenza esclusiva del genotipo II nei campioni analizzati mediante PCR-RFLP (Chessa G. *et al.*, 2014).

2.1.2. Toxoplasmosi nel suino

2.1.2.1. Epidemiologia

La prevalenza della toxoplasmosi nei suini varia sia a livello globale che tra le diverse classi di suini in cui la sieroprevalenza è principalmente influenzata dai sistemi di gestione aziendale. L'adozione di sistemi di controllo nei riguardi della toxoplasmosi basati sull'applicazione di buone norme igieniche e misure di biosicurezza negli allevamenti suini ha condotto ad una drastica diminuzione della prevalenza dell'infezione negli ultimi dieci anni (Dubey J.P., 2009a). La prevalenza nei suini è diminuita dal 5,6% al 0,38 % in Europa e dal 23,3% al 3% negli Stati Uniti (Salant H. *et al.*, 2010). Nelle altre parti del mondo sono state osservate differenti situazioni. In Messico è stata riscontrata una prevalenza del 12,7% (Alvarado-Esquivel C. *et al.*, 2011) e nel Nord America e in Brasile rispettivamente del 2,7% e del 12,5%, (Hill D.E. *et al.*, 2010; Samico Fernandes E.F. *et al.*, 2012). Uno studio in dieci regioni della Cina ha rilevato una sieroprevalenza complessiva del 53,4% (Yu H. *et al.*, 2011). Mentre in Brasile, studi epidemiologici hanno evidenziato che la sieroprevalenza di *T. gondii* in questa specie varia da 0% a 90,4% (Bezerra R.A. *et al.*, 2012). Per quanto riguarda i dati raccolti sui suini selvatici hanno riportato una prevalenza media di circa il 20% (Dubey J.P., 2009).

Attualmente, in Europa, con le nuove normative sul benessere degli animali da allevamento (*Direttiva CE 2008/120*), ma anche per ragioni etiche e sociologiche, sono sempre più diffuse le aziende "*animal friendly*" che scelgono di allevare i suini all'aperto (Davies P.R. *et al.*, 2011). Si ritiene che questa recente tendenza possa aumentare la sieroprevalenza nei suini che sono maggiormente esposti alle fonti di infezione (García-Bocanegra I. *et al.*, 2010; Kijlstra A. & Jongert E., 2008; Meerburg B.G. *et al.*, 2006; Van der Giessen J. *et al.*, 2007). Inoltre, nei sistemi in cui manca un processo di filiera integrata, la sieroprevalenza nei suini arriva al 68% (Gamble H.R. *et al.*, 1999). È stato suggerito che una bassa o trascurabile seroprevalenza di *T. gondii* a livello aziendale possa essere un utile indicatore dell'utilizzo di buone pratiche igieniche (Van Knapen F. *et al.*, 1995).

Il settore suinicolo italiano conta circa 8.477. 930 di capi con oltre l'80% degli animali concentrati nel Nord Italia (ISTAT, 2017). La Lombardia è considerata la regione leader possedendo più del 45% della popolazione totale dei suini, seguita da Emilia-Romagna e Piemonte. In queste regioni, gli animali vengono allevati prevalentemente con metodi intensivi. Al contrario, nelle

regioni del Centro e Sud d'Italia, tra cui la Sardegna, i suini sono prevalentemente allevati in aziende di tipo misto o a conduzione familiare, con una media di 27 - 13 capi per azienda (Bellini S. *et al.*, 2010).

Poche sono le informazioni disponibili sulla toxoplasmosi dei suini italiani, e negli ultimi dieci anni sono state condotte poche indagini di tipo sieroepidemiologico su suini allevati in aziende situate nelle diverse parti d'Italia.

In Sardegna, Sicilia e Umbria, alcuni ricercatori, utilizzando diversi metodi sierologici hanno indagato animali allevati in differenti condizioni, riscontrando valori di sieroprevalenza simili, pari a circa il 16% (Scala A. *et al.*, 2008; Villari S. *et al.*, 2009; Veronesi F. *et al.*, 2011). Nonostante l'importanza economica dell'allevamento suino nel Nord Italia, solo in uno studio in cui è stato analizzato lo stato sierologico dei suini allevati con sistemi intensivi (Giacomini M. *et al.*, 2013) ed è stato riscontrato un valore di sieroprevalenza del 4,4%, molto vicino a quello dei Paesi Bassi, pari quasi allo 0% (Kijlstra A. *et al.*, 2004).

Villari S. *et al.* (2009) e Veronesi F. *et al.* (2011) hanno condotto studi di valutazione del rischio su *T. gondii* negli allevamenti di suini situati rispettivamente in Sicilia e Umbria. In entrambi gli studi emerse che lo *status* sierologico dei maiali non è influenzato solo dalla presenza di gatti, ma anche dagli alti livelli di contaminazione ambientale, dalle inadeguate condizioni igieniche e dai sistemi di gestione. L'alto livello di contaminazione ambientale in Sicilia è stato confermato anche dalla differenza di sieroprevalenza trovata tra gli animali importati e quelli allevati localmente: i suini provenienti da Francia e Spagna hanno mostrato una sieroprevalenza complessiva dello 0,7%, a differenza di quelli allevati localmente nei quali era del 16,4% (Villari S. *et al.*, 2009).

L'elevato rischio di esposizione a *T. gondii* nei suini è conseguentemente rischioso anche per la salute pubblica, in quanto la carne di maiale, cruda o poco cotta, rappresenta una fonte importante di toxoplasmosi umana. Poiché in Italia al momento della macellazione i maiali non sono testati per la toxoplasmosi, l'unico metodo disponibile per diminuire il rischio di infezione nell'uomo è di migliorare i sistemi di gestione e di introdurre moderni sistemi di allevamento intensivo (Kijlstra A. & Jongert E., 2008).

2.1.2.2. Sintomi

La specie suina è considerata altamente suscettibile e in caso di *outbreak* i suini di tutte le età possono essere infettati. L'infezione di solito rimane asintomatica (Dubey J.P. & Jones J.L., 2008). Il sintomo più comunemente osservato è un leggero aumento della temperatura rettale durante le fasi iniziali dell'infezione, che possono persistere per 1-2 giorni. I sintomi clinici più acuti, anche se rari, sono legati all'età, allo stato immunitario e alla razza dell'animale infetto (Dubey J.P., 2009a).

I soggetti adulti colpiti possono manifestare debolezza, tosse, tremori e diarrea in assenza di febbre, mentre i suini più giovani presentano una sintomatologia più acuta con febbre elevata (40-42 °C), diarrea e la morte sopraggiunge solitamente dopo un decorso di diverse settimane (Dubey J.P., 2009a). I lattonzoli (2 - 4 settimane di età) possono presentare ulteriori sintomi quali dispnea, tosse e soprattutto atassia e incoordinamento riferibili a un interessamento del sistema nervoso centrale. Le scrofe gravide solitamente abortiscono, oppure i suinetti nascono disvitali o sopravvivono e sviluppano la stessa sintomatologia descritta per i lattonzoli a 1 - 3 settimane di età (Radostits O.M. *et al.*, 2006).

2.1.3. Fattori di rischio negli animali da reddito

Diversi studi hanno indagato riguardo alcuni fattori di rischio che possono determinare un aumento della prevalenza di *T. gondii* a livello aziendale (Opsteegh M. *et al.*, 2016).

Management aziendale: Si ritiene che gli animali tenuti al pascolo e allevati in condizioni estensive o semi-estensive siano più esposti all'infezione poiché hanno una maggiore probabilità di ingerire oocisti di *Toxoplasma*, rispetto agli allevamenti intensivi dove gli animali sono confinati in strutture che limitano l'accesso all'ambiente esterno ed è possibile attuare più agevolmente ed efficacemente procedure di biosicurezza. (Guo M. *et al.*, 2015; Dubey J.P., 2009b; Gebremedhin E.Z. *et al.*, 2013).

Generalmente i piccoli ruminanti contraggono l'infezione principalmente al pascolo con l'ingestione di oocisti sporulate (Mancianti F. *et al.*, 2013; Dubey J.P., 2009b). Molti sono gli studi che hanno dimostrato che i fattori di rischio associati con l'infezione da *T. gondii* sono simili per la specie ovina e caprina (Tzanidakis N. *et al.*, 2012; García-Bocanegra I. *et al.*, 2013; Kantzoura V. *et*

al., 2013; Lopes A.P. *et al.*, 2013). Le capre sono ritenute maggiormente esposte alla toxoplasmosi rispetto alle pecore, a causa della loro più intensa attività e ai numerosi spostamenti, che aumentano la probabilità di contatto con fonti contaminate (Abu-Dalbouh M.A. *et al.*, 2012).

Una correlazione positiva tra allevamento estensivo ed aumento della prevalenza è stata ritrovata per la specie suina (Bacci C. *et al.*, 2015; Feitosa T.F. *et al.*, 2014; Pastiu A.I. *et al.*, 2013; Dubey J.P. *et al.*, 2012), ovina (Cenci-Goga B.T. *et al.*, 2013; Tzanidakis N. *et al.*, 2012; Klun I. *et al.*, 2006), e caprina (Mancianti F. *et al.*, 2013). Tuttavia AA hanno riscontrato un aumento del rischio di infezione anche per le pecore allevate in strutture aziendali intensive che vengono tenute in promiscuità a gatti e topi, considerati principali serbatoi nella diffusione dell'infezione (Tzanidakis N. *et al.*, 2012).

Anche l'affollamento è risultato essere un fattore di rischio significativo per l'infezione, in relazione alle condizioni di allevamento in cui sono tenuti gli animali (Cenci-Goga G. *et al.*, 2013).

Età degli animali: Differenti autori hanno osservato in pecore e capre una differenza significativa tra i tassi di positività degli animali giovani rispetto agli adulti che è stata correlata all'età (Romanelli P.R. *et al.*, 2007; Pinheiro J.W. *et al.*, 2009; Vesco G. *et al.*, 2007; Katzer F. *et al.*, 2011; Hutchinson J.P. *et al.*, 2011; Cavalcante A.C.R. *et al.*, 2008; Ramzan M. *et al.*, 2009). In realtà gli animali anziani che traggono nutrimento prevalentemente al pascolo, sono esposti alla fonte d'infezione per un periodo di tempo più lungo, mostrando tassi di sieroprevalenza più elevati (Opsteegh M. *et al.*, 2016; Dubey J.P., 2009b; Katzer F. *et al.*, 2011).

Anche nel suino, all'aumentare dell'età corrisponde un aumento della sieropositività nei confronti di *T. gondii*, motivo per il quale nelle scrofe la prevalenza è più alta rispetto ai suini industriali destinati alla produzione di carne che hanno una vita relativamente più breve (García-Bocanegra I. *et al.*, 2013; Berger-Schoch A.E. *et al.*, 2011; Halová D. *et al.*, 2013).

Fonti di approvvigionamento dell'acqua: La contaminazione delle acque con oocisti permette l'ulteriore diffusione del parassita. L'uso di acqua stagnante o di superficie, come fonte di approvvigionamento dell'acqua di abbeverata degli animali, aumenta in modo significativo il rischio di contrarre l'infezione. Questo rischio è stato segnalato soprattutto per i piccoli ruminanti (Tzanidakis N. *et al.*, 2012; Romanelli P.R. *et al.*, 2007).

Presenza di felini in allevamento: Il gatto domestico, in particolare i gattini rispetto agli adulti, rappresenta il principale fattore di rischio per gli animali da reddito (Buxton D. & Rodger S., 2008). Alte sieroprevalenze sono state associate alla presenza di gatti in quasi tutte le aziende campionate.

Nonostante la disseminazione della forma oocistica avvenga per un periodo di tempo limitato, l'elevato numero di elementi infettanti dispersi e la loro notevole resistenza alle condizioni ambientali avverse, aumenta in maniera significativa la possibilità di ingestione da parte degli animali e quindi la probabilità d'infezione. Tale fattore di rischio è stato riportato sia per gli ovini (Vesco G. *et al.*, 2007; Abu-Dalbouh M.A. *et al.*, 2012; Cenci-Goga G. *et al.*, 2013; Guimaraes L.A. *et al.*, 2013; Mendonca C.E. *et al.*, 2013; Romanelli P.R. *et al.*, 2007; Andrade M.M.C. *et al.*, 2013) che per i suini (García-Bocanegra I. *et al.*, 2013; Assadi-Rad A.M. *et al.*, 1995). Alcuni ricercatori, tuttavia, non hanno osservato alcun legame tra la presenza di gatti e la maggiore prevalenza del parassita in allevamento per la specie ovina (Cosendey-KezenLeite R.I. *et al.*, 2014; García-Bocanegra I. *et al.*, 2013) e caprina (Mancianti F. *et al.*, 2013). Tuttavia il loro accesso nei locali di stoccaggio delle derrate alimentari e all'acqua di abbeverata destinate al gregge è stata positivamente associata ad un elevato livello di sieroprevalenza (Cenci-Coga B.T. *et al.*, 2013; Romanelli P.R. *et al.*, 2007).

Presenza di roditori e di altri animali selvatici: La promiscuità con roditori, uccelli e piccoli animali selvatici, che fungono da ospiti intermedi veicolando le forme cistiche del protozoo, favorisce la persistenza del ciclo di *T. gondii* negli allevamenti. Essi infatti rappresentano non soltanto una possibile preda per l'ospite definitivo, ma anche per gli altri animali da reddito onnivori, come il maiale. La mancanza di sistemi di controllo per i roditori è stata associata ad una maggiore prevalenza del parassita soprattutto per la specie suina (Hill D.E. *et al.*, 2010; Kijlstra A. & Jongert E., 2008; Villari S. *et al.*, 2009; García-Bocanegra I. *et al.*, 2013), ma anche per quella ovina (Romanelli P.R. *et al.*, 2007).

Fattori climatici: Uno studio ha riportato che aziende agricole situate in regioni con umidità più elevata, caratterizzate da frequenti precipitazioni piovose e temperature elevate presentavano un maggiore rischio di seropositività (García-Bocanegra I. *et al.*, 2010). L'effetto delle variabili relative al clima potrebbe essere spiegato dal fatto che un'alta umidità può favorire la sopravvivenza delle oocisti mentre la temperatura elevata abbrevia il tempo di sporulazione delle oocisti.

Effetto Stagionale: Esiste un singolo studio che esamina l'effetto stagionale sulla seropositività di suini da ingrasso macellati. È stato osservato in un numero limitato di aziende che i suini macellati in autunno o in inverno hanno un rischio maggiore di contrarre l'infezione rispetto ai suini macellati in altre stagioni (Schulzig H. S. *et al.*, 2005). Questo studio concorda con altre ricerche riguardanti gli effetti stagionali sulla percentuale di gatti che disseminano oocisti di *T. gondii*; infatti è possibile che questi stessi effetti stagionali influenzino la prevalenza dei suini positivi all'infezione negli allevamenti.

2.2. TOXOPLASMA GONDII NEGLI ANIMALI AL MATTATOIO

È ormai noto che tutte le parti commestibili di un animale da reddito possono contenere cisti tissutali di *T. gondii* vive e vitali, e che le cisti tissutali possono persistere per diversi mesi e forse per tutta la vita dell'animale (Dubey J.P. & Jones J.L., 2008; Dubey J.P. *et al.*, 1986; Opsteegh M. *et al.*, 2011; EFSA, 2013; 2011). In risposta alle infezioni naturali, le pecore sieropositive hanno ripetutamente dimostrato di albergare le forme parassitarie infettanti sottoforma di cisti tissutali (Kijlstra A. & Jongert E., 2008; Opsteegh M. *et al.*, 2016).

Gli ovini assieme a caprini e suini possiedono la più alta incidenza di cisti nella carne svolgendo un ruolo centrale come fonte di infezione per l'uomo (Tenter A.M., 2009; Dubey J.P., 2010; Dubey J.P., 2009a; Dubey J.P., 2009b; Jones J.L. & Dubey J.P., 2012; Glor S.B. *et al.*, 2013; Steinparzer R. *et al.*, 2015; Felin E. *et al.*, 2017; EFSA, 2007; 2011; 2013).

I dati riportati dagli Stati membri dell'UE nell'ambito della *Direttiva Zoonosi (CE) 2003/99*, mostrano una sieroprevalenza relativamente elevata per questo pericolo biologico negli animali da reddito. Nonostante lo sviluppo delle recenti procedure di laboratorio, la percentuale di toxoplasmosi umana attribuibile al consumo di carne ovina, caprina e suina non è nota. Inoltre, il rapporto tra sieropositività nelle pecore e il numero di cisti vitali nel tessuto commestibile deve ancora essere stabilito (EFSA, 2013).

Nei pareri EFSA del 2011 e del 2013 inerenti la valutazione del rischio connessa alla presenza di *Toxoplasma* nei suini, ovini e caprini, è emerso che la maggior parte dei dati bibliografici disponibili relativi al rilevamento del parassita in queste specie animali derivano soltanto dall'impiego di metodiche sierologiche.

Infatti una delle principali problematiche sanitarie è connessa al rilevamento di *T. gondii* durante lo svolgimento delle normali procedure della visita ispettiva delle carcasse in sede di macellazione; poiché a causa delle microscopiche dimensioni, le cisti parassitarie di *T. gondii*, eventualmente presenti nelle carni, non sono visibili ad occhio nudo (EFSA, 2007). Per cui le metodiche diagnostiche comunemente utilizzate si basano sul rilevamento diretto di *T. gondii* nei tessuti o sull'individuazione indiretta di anticorpi specifici nel siero (EFSA, 2011; 2013). Tuttavia queste ultime confermano che l'animale è stato esposto all'agente patogeno, ma non danno informazioni sull'effettiva esistenza di cisti vitali alla macellazione, e sul reale pericolo di contrarre

la toxoplasmosi con l'assunzione di carne (EFSA, 2011; 2013). D'altra parte, sono disponibili pochissimi dati sul rilevamento di *T. gondii* nelle carni, ottenuti principalmente mediante l'uso di metodiche molecolari basate sulla PCR (Aspinall T.V. *et al.*, 2002). A questo proposito, l'EFSA (2011) ha sottolineato che i metodi molecolari o istologici attualmente in uso risultano insensibili per il rilevamento di *T. gondii* nel suino, perché la densità di questi parassiti nella carne è bassa (una ciste tissutale per 25 gr o più) (Dubey J.P., 2009).

Al momento si è ancora alla ricerca di metodi rapidi e poco costosi ad alto grado di automazione che possano essere impiegati nei mattatoi. Nel corso degli anni sono state sviluppate diverse metodiche tra cui si annovera la *Real-Time ToxoTaq Man assay* in grado di evidenziare 0,1 pg di DNA equivalenti ad 1 bradizoite, il cui limite è rappresentato dall'impiego di campioni < 1 gr (Jauregui L.H. *et al.*, 2001).

Un metodo più sensibile per il rilevamento di *T. gondii* nella carne è stato descritto da Opsteegh M. *et al.* (2010) che avvalendosi di un metodo di cattura magnetica per isolare il DNA di *T. gondii*, è stato in grado di quantificare in maniera accurata il numero di bradizoiti presenti in campioni di carne nonostante l'eterogenea distribuzione del parassita e la piccola quantità di campione sottoposto a prova.

Attualmente gli unici mezzi diagnostici applicabili nei mattatoi sono le prove digestive triptiche su campioni di 50 gr di carne (il carico parassitario è stimato < 1 ciste / 50 gr).

Anche se la sieropositività degli animali da carne non riflette necessariamente il rischio che questi animali rappresentano per i propri consumatori (Tenter A.M., 2009), è stato dimostrato che negli ovini (Dubey J.P., 2009b; Opsteegh M. *et al.*, 2016; EFSA, 2013) e nei suini (Dubey J.P., 2009a; EFSA, 2011; Gamble H.R. *et al.*, 2005; Hill D.E. *et al.*, 2006), la concentrazione anticorpale è fortemente correlata alla probabilità di rinvenire cisti tissutali nelle carni dell'animale (Opsteegh M. *et al.*, 2016; Herrero L. *et al.*, 2016). Ciò implica che i test sierologici possono essere utilizzati per stimare il numero di animali che veicolano cisti tissutali di *T. gondii* nella carne (Opsteegh M. *et al.*, 2010; Berger F. *et al.*, 2007; Dumètre A. *et al.*, 2006).

L'organotropismo di *Toxoplasma* e il numero di cisti tissutali prodotte variano con la specie ospite: tra gli animali da reddito, la forma cistica di *T. gondii* è stata rilevata più frequentemente in

suini, pecore e capre (EFSA, 2007; Tenter A.M., 2009; Dubey J.P., 2010; Jones J.L. & Dubey J.P., 2012; Glor S.B. *et al.*, 2013; Steinparzer R. *et al.*, 2015; Felin E. *et al.*, 2017) a livello di sistema nervoso centrale, occhi, muscolatura scheletrica e cardiaca (Dubey J.P., 2009a; EFSA, 2011; Kalambhe D. *et al.*, 2017).

L'evoluzione delle metodiche molecolari ha permesso di stimare la concentrazione parassitaria presente nelle matrici animali analizzate (Juránková J. *et al.*, 2013; 2014; 2015). In particolare nell'esperimento condotto da Juránková J. *et al.* (2013), mediante l'ausilio della PCR quantitativa, è stato possibile stimare che la più alta concentrazione di cisti tissutali di *T. gondii*, nei capretti esaminati, era localizzata a livello di tessuto polmonare e cerebrale. Sempre con la stessa metodica, il tessuto cerebrale è stato indicato come sito di elezione del parassita per la pecora e il suino, e secondariamente ad esso il miocardio e i muscoli scheletrici. Questi ultimi, anche se presentano una minore concentrazione di cisti tissutali, rappresentano sicuramente un rischio immediato per l'uomo, poiché sono gli organi più comunemente consumati (Juránková J. *et al.*, 2014; 2015).

BIBLIOGRAFIA

- Abu-Dalbou, M.A.; Ababneh, M.M.; Giadinis, N.D.; Lafi, S.Q. (2010). Ovine and Caprine Toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*). *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, **2**(2): 61-76.
- Abu-Dalbouh, M.A.; Ababneh, M.M.; Giadinis, N.D.; Lafi, S.Q. (2012). Ovine and caprine Toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) in aborted animals in Jordanian goat and sheep flocks. *Trop Anim Health Prod*, **44**(1): 49-54.
- Ajioka, J.W.; Fitzpatrick, J.M.; Reitter, C.P. (2001). *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert reviews in molecular medicine*, pp. 1-19.
- Ajzenberg, D. (2011). Unresolved questions about the most successful known parasite. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **9**(2): 169-171.
- Ajzenberg, D.; Bañuls, A.L.; Su, C.; Dumètre, A.; Demar, M.; Carme, B.; Dardé, M.L. (2004). Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, **34**: 1185-1196.
- Ajzenberg, D.; Bañuls, A.L.; Tibayrenc, M.; Dardé, M.L. (2002). Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int J Parasitol*, **32**: 27-38.
- Ajzenberg, D.; Cogné, N.; Paris, L.; Bessières, M.H.; Thulliez, P.; Filisetti, D.; Pelloux, H.; Marty, P.; Dardé, M.L. (2002). Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital Toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis*, **186**: 684-689.
- Ajzenberg, D.; Lamaury, I.; Demar, M.; Vautrin, C.; Cabié, A.; Simon, S.; Nicolas, M.; Desbois-Nogard, N.; Boukhari, R.; Riahi, H.; Dardé, M.L.; Massip, P.; Dupon, M.; Preux, P.M.; Labrunie, A.; Boncoeur, M.P. (2016). Performance Testing of PCR Assay in Blood Samples for the Diagnosis of Toxoplasmic Encephalitis in AIDS Patients from the French Departments of America and Genetic Diversity of *Toxoplasma gondii*: A Prospective and Multicentric Study. *PLOS Neglected Tropical Diseases*.
- Ajzenberg, D.; Yera, H.; Marty, P.; Paris, L.; Dalle, F.; Menotti, J.; Aubert, D.; Franck, J.; Bessières, M.H.; Pelloux, D.Q.H.; Dardé, M.L.; Villena, I. (2009). Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with Toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *J Infect Dis*, **199**: 1155-1167.
- Alvarado-Esquivel, C.; Rodriguez-Pena, S.; Villena I.; Dubey, J.P. (2012). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic horses in Durango State, Mexico. *J Parasitol*, **98**(5): 944-945.
- Amdouni, Y.; Rjeibi, M.R.; Rouatbi, M.; Amairia, S.; Awadi, S.; Gharbi, M. (2017). Molecular detection of *Toxoplasma gondii* infection in slaughtered ruminants (sheep, goats and cattle) in Northwest Tunisia. *Meat Science*, **133**: 180-184.
- Andrade, M.M.C.; Carneiro, M.; Medeiros, A.D.; Neto, V.A.; Vitor, R.W.A. (2013). Seroprevalence and risk factors associated with ovine Toxoplasmosis in Northeast Brazil. *Parasite 20:20. Ars Alimentaria*. 2015.
- Antczak, M.; Dzitko, K.; Długońska H. (2016). Human Toxoplasmosis—Searching for novel chemotherapeutics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume **82**: 677-684
- Antinori, A.; Larussa, D.; Cingolani, A.; Lorenzini, P.; Bossolasco, S.; Finazzi, M.G. (2004). Prevalence, associated factors, and prognostic determinants of AIDS-related toxoplasmic encephalitis in the era of advanced highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*, **39**: 1681-91.
- Antoniou, M.; Tzouvali, H.; Sifakis, S.; Galanakis, E.; Georgopoulou, E.; Tselentis, Y. (2007). Toxoplasmosis in pregnant women in Crete. *Parasitologia*, **49**: 231-233.
- Aspinall, T.V.; Marlee, D.; Hyde, J.E.; Sims, P.F.G. (2002). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction – food for thought? *International Journal of Parasitology*, **32**: 1193-1199.

- Assadi-Rad, A.M.; New, J.C.; Patton, S. (1995). Risk factors associated with transmission of *Toxoplasma gondii* to sows kept in different *management* systems in Tennessee. *Vet Parasitol*, **57**: 289-297.
- Aymerich, T.; Picouet, P.A.; Monfort, J.M. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, **78**(1-2): 114-129.
- Bacci, C.; Vismarra, A.; Mangia, C.; Bonardi, S.; Bruini, I.; Genchi, M.; Kramer, L.; Brindani, F. (2015). Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range, organic pigs in Italy using serological and molecular methods. *Int J Food Microbiol*, **202**: 54-56.
- Balbo, S.M.; Iannizzotto, G.; Jannotta, V. (1980). Indagine sierologia sulle forme più importanti di aborti infettivi degli ovini in Sicilia. *Clin Vet*, **104**: 46-52.
- 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. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **31**(3): 305-309.
- Barragan, A. & Sibley L.D. (2002). Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J Exp Med*, **195**(12): 1625-1633.
- Bastien, P. (2002). Diagnosis Molecular: diagnosis of Toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hug*, **96**: 205-215.
- Bellini, S.; Alborali, L.; Massiro I.; Cinotti S. (2010). Evoluzione del comparto suinicolo in Italia: criticità e fattori di rischio. *L'Osservatorio*. Brescia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "Bruno Ubertini", **2**: 1-8.
- Bénard, A.; Petersen, E.; Salamon, R.; Chêne, G.; Gilbert, R.; Salmi, L.R.; European Toxo Prevention Study Group (EUROTOX) (2008). Survey of European programmes for the epidemiological surveillance of congenital Toxoplasmosis. *Euro Surveill*, **13**(15): 1-7.
- Berger, F.; Goulet, V.; Le Stat, Y.; De Valk, H.; Desenclos, J.C. (2007). La toxoplasmose en France chez la femme enceinte en 2003: seroprevalence et facteurs associés. *Institut de veille sanitaire*.
- Berger-Schoch, A.E.; Bernet, D.; Doher, M.G.; Gottstein, B.; Frey, C.F. (2011). *Toxoplasma gondii* in Switzerland: a serosurvey based on meat juice analysis of slaughtered pigs, wild boar, sheep and cattle. *Zoonoses Public Health*, **58**: 472-478.
- Bezerra, M.J.G.; Kim, P.C.P.; Moraes, É.P.B.X.; Sá, S.G.; Albuquerque, P.P.F.; Silva, J.G.; Alves B.H.L.S.; Mota, R.A. (2013). Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected goats in the Northeast of Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*.
- Bezerra, R.A.; Carvalho, F.S.; Guimarães, L.A.; Rocha, D.S.; Maciel, B.M.; Wenceslau, A.A.; Lopes, C.W.G.; Albuquerque, G.R. (2012). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs intended for human consumption in Brazil. *Veterinary Parasitology*, **189**: 153-161.
- Bezerra, R.A.; Carvalho, F.S.; Guimarães, L.A.; Rocha, D.S.; Silva, F.L.; Wenceslau, A.A.; Albuquerque, G.R. (2012). Comparison of methods for detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of naturally exposed pigs. *Parasitol Res*; **110**: 509-514.
- Blewett, D.A. & Watson, W.A. (1984), The epidemiology of ovine Toxoplasmosis. III. Observations on outbreaks of clinical Toxoplasmosis in relation to possible mechanisms of transmission. *Br Vet J*, **140**(1): 54-63.
- Bonametti, A.M.; Passos, J.N.; Da Silva, E.M.K.; Macedo, Z.S. (1997). Probable transmission of acute Toxoplasmosis through breast feeding. *J Trop Pediatr*, **43**: 116.

- Bontell, I.L., Hall, N.; Ashelford, K.E.; Dubey, J.P.; Boyle, J.P.; Lindh, J.; Smith, J.E. (2009). Whole genome sequencing of a natural recombinant *Toxoplasma gondii* strain reveals chromosome sorting and local allelic variants. *Genome Biology*, **10**: R53.
- Boothroyd, J.C. (2009). *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. *Int J Parasitol, In press*.
- Borde, G.; Lowhar, G.; Adesiyun, A.A. (2006). *Toxoplasma gondii* and *Chlamydophila abortus* in caprine abortions in Tobago: a sero-epidemiological study. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, **53**(4): 188-193.
- Boughattas, S.; Ayari, K.; Sa, T.; Aoun, K.; Bouratbine, A. (2014). Survey of the Parasite *Toxoplasma gondii* in Human Consumed Ovine Meat in Tunis City. *PLoS One*, **9**: 85044-85044.
- Bowman, D.D.; Hendrix, C.M.; Lindsay, D.S.; Barr, S.C. (2002). Feline clinical parasitology. *Iowa State University Press, Wiley-Blackwell*.
- Boyer, K.M.; Hill, D.E.; Mui, E.; Wroblewski, K.; Karrison, T.; Dubey, J.P.; Sautter, M.; Noble, A.G.; Withers, S.; Study Group (2011). Unrecognized ingestion of *Toxoplasma gondii* oocysts leads to congenital Toxoplasmosis and causes epidemics in North America. *Clin Infect Dis*, **53**(11): 1081-1089.
- Burrells, A.; Benavides, J.; Canton, G.; García, J.L.; Bartley, P.M.; Nath, M.; Thomson, J.; Chianini, F.; Innes, E.A.; Katzer, F. (2015). Vaccination of pigs with the S48 strain of *Toxoplasma gondii* - safer meat for human consumption. *Vet Res*, **46**: 47-47.
- Buxton, D. & Rodger, S. (2008). Toxoplasmosis and neosporosis. In: *Diseases of sheep, 4th (Aitken, ID.) edn, Wiley-Blackwell, Hoboken*.
- Buxton, D. (1998). Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet Res*, **29**(3-4): 289-310.
- Buxton, D.; Maley, S.W.; Wright, S.E.; Rodger, S.; Bartley, P.; Innes, E.A. (2007). *Toxoplasma gondii* and ovine Toxoplasmosis: new aspects of an old story. *Vet Parasitol*, **149**: 25-28.
- Buxton, D.; Rodger, S.M.; Maley, S.W.; Wright, S.E. (2006). Toxoplasmosis: the possibility of vertical transmission. *Small Rumin Res*, **62**: 43-46.
- Camossi, L.G.; Greca-Júnior, H.; Corrêa, A.P.F.L.; Richini-Pereira, V.B.; Silva, R.C.; Da Silva, A.V.; Langoni, H. (2011). Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. *Veterinary Parasitology*, **177**: 256-261
- Carme, B.; Bissuel, F.; Ajzenberg, D.; Bouyne, R.; Aznar, C.; Demar, M.; Bichat, S.; Louvel, D.; Bourigot, A.M.; Peneau, C.; Neron, P.; Dardé M.L. (2002). Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol*, **40**: 4037-4044.
- Carme, B.; Demar, M.; Ajzenberg, D.; Dardé, M.L. (2009). Severe acquired Toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerg Infect Dis*, **15**: 656-658.
- Cavalcante, A.C.R.; Carneiro, M.; Gouveia, A.M.G.; Pinheiro, R.R.; Vitor, R.W.A. (2008). Risk factors for infection by *Toxoplasma gondii* in herds of goats in Ceara, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, **60**: 36-41.
- Cavalcante, G.T.; Aguilar, D.M.; Camargo, L.M.; Labruna, M.B.; de Andrade, H.F.; Meireles, L.R.; Gennari, S.M. (2006). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in humans from rural Western Amazon, Brazil. *J Parasitol*, **92**(3): 647-649.
- Cenci-Goga, B.T.; Ciampelli, A.; Sechi, P.; Veronesi, F.; Cambiotti, V.; Thompson, P.N.; Moretta, I. (2013). Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep in Grosseto district, Tuscany, Italy. *BMC Veterinary Research*, **9**: 25.

- Cenci-Goga, B.T.; Rossitto, P.V.; Sechi, P.; McCrindle, C.M.; Cullor, J.S. (2011). *Toxoplasma* in animals, food, and humans: an old parasite of new concern. *Foodborne Pathog Dis*, **8**(7): 751-762.
- Chessa, G.; Chisu, V.; Porcu, R.; Masala, G. (2014). Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* Type II in sheep abortion in Sardinia, Italy. *Parasite*, **21**: 6.
- Cole, R.A.; Lindsay, D.S.; Howe, D.K.; Roderick, C.L.; Dubey, J.P.; Thomas, N.J.; Baeten, L.A. (2000). Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *J Parasitol*, **86**: 526-530.
- Conrad, P.A.; Miller, M.A.; Kreuder, C.; James, E.R.; Mazet, J.; Däbritz, H.; Jessup, D.A.; Gulland, F.; Grigg, M.E. (2005). Transmission of *Toxoplasma*: Clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *International Journal for Parasitology*, **35**(11-12): 1155-1168.
- 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 multicentre case-control study. *BMJ*, **321**: 142-147.
- Cosendey-KezenLeite, R.I.; Rodrigues de Oliveira, F.C.; Frazao-Teixeira, E.; Dubey, J.P.; de Souza, G.N.; Reis Ferreira, A.M.; Lilenbaum, W. (2014). Occurrence and risk factors associated to *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Rio de Janeiro, Brazil. *Trop Anim Health Prod*, **46**: 1463-1466.
- Costa, V.M. & Langoni, H. (2010). Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected Wistar female rats. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, **16**: 368-374.
- Däbritz, H.A. & Conrad, P.A. (2010). Cats and *Toxoplasma*: implications for public health. *Zoonoses Public Health*, **57**(1): 34-52.
- Davies, P.R. (2011). Intensive swine production and pork safety. *Foodborne Pathog Dis*, **8**: 189-201.
- Davis, S.W. & Dubey, J.P. (1995). Mediation of immunity to *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in cats. *J Parasitol*, **81**: 882-886.
- De Capraris, D. & Gravino, E. (1981). Diffusione della Toxoplasmosi nella specie caprina: indagine sieroepidemiologica su un campione di animali del basso Lazio. *Acta Med Vet*, **27**: 261-265.
- De Craeye, S.; Speybroeck, N.; Ajzenberg, D.; Dardé, M.L.; Collinet, F.; Tavernier, P.; Van Gucht, S.; Dorny, P.; Dierick, K. (2011). *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wildlife: Common parasites in Belgian foxes and Cervidae? *Veterinary Parasitology*, **178**: 64-69.
- De Moraes, E.P.B.X.; Batista, A.M.; Faria, E.B.; Freire, R.L.; Freitas, A.C.; Silva, M.A.R.; Braga, V.A.; Mota, R.A. (2010). Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep. *Veterinary Parasitology*, **170**: 318-322.
- De Moraes, E.P.B.X.; Freitas, A.C.; Gomes-Filho, M.A.; Guerra, M.M.; Silva, M.A.; Pereira, M.F.; Braga, V.A.; Mota, R.A. (2010). Characterization of reproductive disorders in ewes given an intrauterine dose of *Toxoplasma gondii* tachyzoites during the intrauterine insemination. *Anim Reprod Sci*, **122**: 36-41.
- Dehkordi, F.S.; Borujeni, M.R.; Rahimi, E.; Abdizadeh, R. (2013). Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran. *Foodborne Pathog Dis*, **10**(2): 120-125.
- Delair, E.; Monnet, D.; Grabar, S.; Dupouy-Camet, J.; Yera H.; Brezin, A.P. (2008). Respective roles of acquired and congenital infections in presumed ocular Toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol*, **146**(6): 851-855.

- De-la-Torre, A.; Sauer, A.; Pfaff, A.W.; Bourcier, T.; Brunet, J.; Speeg-Schatz, C. (2013). Severe South American ocular Toxoplasmosis is associated with decreased Ifn-gamma/Il-17a and increased Il-6/Il-13 intraocular levels. *PLoS Negl Trop Dis*, **7**(11): 2541.
- Demar, M.; Ajzenberg, D.; Maubon, D.; Djossou, F.; Panchoe, D.; Punwasi, W.; Valery, N.; Peneau, C.; Daigre, J.L.; Aznar, C.; Cottrelle, B.; Terzan, L.; Dardé, M.L.; Carme, B. (2007). Fatal outbreak of human Toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clinical Infectious Diseases*, **45**: 88-95.
- Demar, M.; Hommel, D.; Djossou, F.; Peneau, C.; Boukhari, R.; Louvel, D. (2012). Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. *Clin Microbiol Infect*, **18**(7): E221-31.
- Direttiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003 sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la direttiva 92/117/CEE del Consiglio.
- Djurkovic-Djakovic, O.; Bobic, B.; Nikolic, A.; Klun, I.; Dupouy-Camet, J. (2013). Pork as a source of human parasitic infection. *Clin Microbiol Infect*, **19**: 586-594.
- Dorny, P.; Praet, N.; Deckers, N.; Gabriel S. (2009). Emerging food-borne parasites. *Veterinary Parasitology*, **163**: 196-206.
- Dubey, J. P. & Su, C. (2009). Population biology of *Toxoplasma gondii*: What's out and where did they come from? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **104**: 190-195.
- Dubey, J. P. (2007). The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. In: Weiss, L. & Kim, K. editors. *Toxoplasma gondii*. The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods. San Diego, CA: Academic Press. pp. 1-17
- Dubey, J.P. & Beattie C.P. (1988). Toxoplasmosis of Animals and Man. *Boca Raton, FL*, CRC Press.
- Dubey, J.P. & Frenkel, J.K. (1972). Cyst-induced Toxoplasmosis in cats. *J Protozool*, **19**(1): 155-177.
- Dubey, J.P. & Jones, J.L. (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*, **38**: 1257–1278.
- Dubey, J.P. & Sharma, S.P. (1980). Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. *Am J Vet Res*, **41**(5): 794-795.
- Dubey, J.P. & Su, C. (2009). Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. *Mem Instituto Oswaldo Cruz*, **104**: 190-195.
- Dubey, J.P. (1995). Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *J Parasitol*, **81**: 410-415.
- Dubey, J.P. (2000). The scientific basis for prevention of *Toxoplasma gondii* infection: studies on tissue cyst survival, risk factors and hygiene measures. In: Ambroise-Thomas P., Petersen E., editors. *Congenital Toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control*. Paris: Springer-Verlag, pp. 271-276.
- Dubey, J.P. (2006). Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Vet Parasitol*, **140**: 69-75.
- Dubey, J.P. (2008). The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. *J Eukaryot Microbiol*, **55**: 467-475.
- Dubey, J.P. (2009). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, **39**(8): 877-82.
- Dubey, J.P. (2009a). Toxoplasmosis in pigs— The last 20 years. *Veterinary Parasitology*, **164**: 89-103.

- Dubey, J.P. (2009b). Toxoplasmosis in sheep-the last 20 years. *Vet Parasitol*, **163**(1–2): 1-14.
- Dubey, J.P. (2010). Toxoplasmosis of animals and humans. 2nd edition. Boca Raton, Florida: CRC Press, p. 313.
- Dubey, J.P., Rajendran, C.; Ferreira, L.R.; Martins, J.; Kwok, O.C.H.; Hill, D.E.; Villena, I.; Zhou, H.; Su, C.; Jones, J.L. (2011). High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. *Int J Parasitol*, **41**: 827-833.
- Dubey, J.P.; Edelhof, R.; Marcet, R.; Vianna, M.C.B.; Kwok, O.C.H.; Lehmann, T. (2005). Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* infections in free-range chickens from Austria. *Vet Parasitol*, **133**: 299-306.
- Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Speer, C.A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*, **11**: 267-299.
- Dubey, J.P.; Lindsay, S.D.; Lappin, M.R. (2009). Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. *Vet Clin Small Anim*, **39**: 1009-1034.
- Dubey, J.P.; Lunney, J.K.; Shen, S.K.; Kwok, O.C.; Ashford, D.A.; Thulliez, P. (1996). Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. *J Parasitol*, **82**(3): 438-443.
- Dubey, J.P.; Lunney, J.K.; Shen, S.K.; Kwok, O.C.H. (1998). Immunity to Toxoplasmosis in pigs fed irradiated *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol*, **84**: 749-752.
- Dubey, J.P.; Miller, N.L.; Frenkel, J.K. (1970). The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med*, **132**(4): 636-662.
- Dubey, J.P.; Murrell, K.D.; Fayer, R. (1986). Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. *J Am Vet Med Assoc*, **188**: 1035-1037.
- Dubey, J.P.; Rajendran, C.; Ferreira, L.R.; Martins, J.; Kwok, O.C.H.; Hill, D.E.; Villena, I.; Zhou, H.; Su, C.; Jones J.L. (2011). High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. *Int J Parasitol*, **41**: 827-833.
- Dubey, J.P.; Tiao, N.; Gebreyes, W.A.; Jones, J.L. (2012). A review of Toxoplasmosis in humans and animals in Ethiopia. *Epidemiol Infect*, **140**: 1935-1938.
- Dubey, J.P.; Velmurugan, G.V.; Chockalingan, A.; Pena, H.F.; De Oliveira, L.N.; Leifer, C.A.; Gennari, S.M.; Bahia Oliveira, L.M.; Su, C. (2008). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Veterinary Parasitology*, **157**: 299-305.
- Dubey, J.P.; Velmurugan, G.V.; Rajendran, C.; Yabsley, M.J.; Thomas, N.J.; Beckmen, K.B.; Sinnett, D.; Ruid, D.; Hart, J.; Fair, P.A.; McFee, W.E.; Shearn-Bochsler, V.; Kwok, O.C.; Ferreira, L.R.; Choudhary, S.; Faria, E.B.; Zhou, H.; Felix, T.A.; Su, C. (2011). Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. *Int J Parasitol*, **41**: 1139-1147.
- Dubey, J.P.; Weigel, R.M.; Siegel, A.M.; Thulliez, P.; Kitron, U.D.; Mitchell, M.A.; Mannelli, A.; Mateus-Pinilla, N.E.; Shen, S.K.; Kwok, O.C.H.; Todd, K.S. (1995). Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J Parasitol*, **81**: 723-729.
- Dubey, J.P.; Zarnke, R.; Thomas, N.J.; Wong, S.K.; Van Bonn, W.; Briggs, M.; Davis, J.W.; Ewing, R.; Mense, M.; Kwok, O.C.H.; Romand, S.; Thulliez, P. (2003). *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Veterinary Parasitology*, **116**(4): 275-296.
- Dumètre, A.; Ajzenberg, D.; Rozette, L.; Mercier, A.; Dardé, M.L. (2006). *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Haute-Vienne, France: seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis. *Vet. Parasitol*, **142**: 376-379.

- Edwards, J.F. & Dubey, J.P. (2013). *Toxoplasma gondii* abortion storm in sheep on a Texas farm and isolation of mouse virulent atypical genotype *T. gondii* from an aborted lamb from a chronically infected ewe. *Veterinary Parasitology*, **192**: 129-136.
- EFSA European Food Safety Authority (2011). Scientific opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (swine). *EFSA Journal*, **9**: 1-198.
- EFSA European Food Safety Authority (2012). EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2010. *EFSA Journal*, **10**: 1-442.
- EFSA, European Food Safety Authority (2007). Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from EFSA on surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, foods and animals. *EFSA Journal*, **5**: 1-64.
- EFSA, European Food Safety Authority (2013). Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat from sheep and goats. *EFSA Journal*, **11**(6): 3265.
- Elbez-Rubistein A. & Ajzenberg D. (2009). Congenital Toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection and review. *J Infect Dis*, **199**: 280-285.
- Elmore, S.A.; Jones, J.L.; Conrad, P.A.; Patton, S.; Lindsay, D.S.; Dubey, J.P. (2010). *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in Parasitology*, **26**(4): 190-196.
- El-Nawawi, F.A.; Tawfik, M.A.; Shaapan, R.M. (2008). Methods for Inactivation of *Toxoplasma gondii* Cysts in Meat and Tissues of Experimentally Infected Sheep. *Foodborne Pathogens and Disease*, **5**(5): 687-690.
- Esteban-Redondo, L.; Maley, S.W.; Thomson, K.; Nicoli, S.; Wright, S.; Buxton, D.; Innes, E.A. (1999). Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. *Vet. Parasitol*, **86**: 155-171.
- Fallah, M.; Rabiee, S.; Matini, M.; Taherkhani, H. (2008). Seroepidemiology of Toxoplasmosis in primigravida women in Hamadan, Islamic Republic of Iran, 2004. *East Medit Health J*, **14**: 163-171.
- Feitosa, T.F.; Vilela, V.L.R.; Bezerra de Melo, L.R.; De Almeida Neto, J.L.; De Oliveira Souto, D.V.; De Moraes, D.F.; Athayde, A.C.R.; Azevedo, S.S.; De Jesus Pena H.F. (2014). *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. *Vet Parasitol*, **202**: 305-309.
- Felin, E.; Näreaho, A.; Fredriksson-Ahomaa, M. (2017). Comparison of commercial ELISA tests for the detection of *Toxoplasma* antibodies in the meat juice of naturally infected pigs. *Veterinary Parasitology*, **238**: 30-34.
- Ferguson, D.J. (2009). *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **104**(2): 133-148.
- Ferreira Ade, M.; Vitor, R.W.; Gazzinelli, R.T.; Melo, M.N. (2006). Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect Genet Evol*, **6**(1): 22-31.
- Flegr, J.; prandota J.; Sovičková, M.; Israili, Z.H. (2014). Toxoplasmosis – A Global Threat. Correlation of Latent Toxoplasmosis with Specific Disease Burden in a Set of 88 Countries. *PLOS ONE*, **9**(3): 90203.
- Frenkel, J. K. (1970). Pursuing *Toxoplasma*. *J Infect Dis*, **122**: 553-559.
- Frenkel, J. K. (1973). *Toxoplasma* in and around us. *BioScience*, **23**: 343-352.
- Frenkel, J.K. & Dubey, J.P. (1973). Effects of freezing on the viability of *Toxoplasma* oocysts. *J Parasitol*, **59** (3): 587-588.
- Frenkel, J.K., Ruiz, A.; Chinchilla, M. (1975). Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg*, **24**(3): 439-443.

- Fusco, G.; Rinaldi, L.; Guarino, A.; Proroga, Y.T.R.; Pesce, A.; Giuseppina, D.M.; Cringoli, G. (2007). *Toxoplasma gondii* in sheep from the Campania region (Italy). *Vet Parasitol*, **149**: 271-274.
- 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. *J Wildl Dis*, **42**(3): 685-690.
- Gamble, H.R.; Brady, R.C.; Dubey, J.P. (1999). Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in the New England states. *Vet Parasitol*, **82**: 129-136.
- Gamble, H.R.; Dubey, J.P.; Lambillotte, D.N. (2005). Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma* infection in the domestic pig. *Veterinary parasitology*, **128**: 177-181.
- Gangneux, F.R. & Dardé, M.L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Review*, **25**(2): 264-296.
- Gangneux, F.R. (2014). It is not only the cat that did it: How to prevent and treat congenital Toxoplasmosis. *Journal of Infection*, **68**: S125-S133.
- García-Bocanegra, I.; Dubey, J.P.; Simon-Grife, M.; Cabezon, O.; Casal, J.; Allepuz, A.; Napp, S.; Almeria, S. (2010). Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in pig farms from Catalonia, north-eastern Spain. *Res Vet Sci*, **89**: 85-87.
- García-Bocanegra, I.; Cabezon, O.; Hernandez, E.; Martinez-Cruz, M.S.; Martinez-Moreno, A.; Martinez-Moreno, J. (2013). *Toxoplasma gondii* in ruminant species (cattle, sheep, and goats) from Southern Spain. *J Parasitol*, **99**(3): 438-440.
- García-Bocanegra, I.; Simon-Grife, M.; Dubey, J.P.; Casal, J.; Martin, G.E.; Cabezon, O.; Perea, A.; Almeria S. (2010). Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic pigs from Spain. *Parasitology International*, **59**: 421-426.
- Gazzonis, A.L.; Veronesi, F.; Di Cerbo, A.R.; Zanzani, S.A.; Molineri, G.; Moretta, I.; Moretti, A.; Fioretti, D.P.; Invernizzi, A.; Manfredi, M.T. (2015). *Toxoplasma gondii* in small ruminants in Northern Italy – prevalence and risk factors. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **22**(1): 62-68.
- Gebremedhin, E.Z.; Agonafir, A.; Tessema, T.S.; Tilahun, G.; Medhin, G.; Vitale, M.; Di Marco, V.; Cox, E.; Vercruyssen, J.; Dorny, P. (2013). Seroepidemiological study of ovine Toxoplasmosis in East and West Shewa Zones of Oromia Regional State, Central Ethiopia. *BMC Veterinary Research* [Electronic Resource], **9**: 117.
- Genchi, C. & Pozio, E. (2004). *Parassitologia generale e umana*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
- Genchi, G.; Polidori, G.A.; Zaghini, L.; Lanfranchi, P. (1991). Aspetti epidemiologici della Toxoplasmosi nell'allevamento intensivo del suino. *Arch Vet Ital*, **42**: 105-111.
- George, B.P.; Schneider, E.B.; Venkatesan, A. (2014). Encephalitis hospitalization rates and inpatient mortality in the United States, 2000–2010. *PLoS One*, **9**(9): 104-169.
- Gerhold, R.W. & Jessup, D.A. (2012). Zoonotic Diseases Associated with Free-Roaming Cats. *Zoonoses Public Health*.
- Giacomini, E.; Lazzaro, M.; Bacci, C.; Giovannini, S.; Razzini, P.; Pozio, E.; Pasquali P.; Alborali, L.G. (2013). Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies IgG and IgM in heavy pigs reared in Northern Italy. *LXVII Convegno Nazionale S.I.S.Vet.*, Centro Congressi Camera di Commercio di Brescia.
- Gilbert, R.E. & Stanford, M.R. (2000). Is ocular Toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? *Br J Ophthalmol*, **84**(2): 224-226.

- Gilot-Fromont, E.; Lélou, M.; Dardé, M.L.; Richomme, C.; Aubert, D.; Afonso, E.; Mercier, A.; Gotteland, C.; Villena, I. (2012). The Life Cycle of *Toxoplasma gondii* in the Natural Environment. *Toxoplasmosis – Recent Advances*, Chapter 1, pp. 3-36.
- Glor, S.B.; Edelhofer, R.; Grimm, F.; Deplazes, P.; Basso, W. (2013). Evaluation of a commercial ELISA kit for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in serum, plasma and meat juice from experimentally and naturally infected sheep. *Parasites & Vectors*, **6**: 85.
- Gotteland, C.; Chaval, Y.; Villena, I.; Galan, M.; Geers, R.; Aubert, D.; Poulle, M.L.; Charbonnel, N.; Gilot-Fromont, E. (2013). Species or local environment, what determines the infection of rodents by *Toxoplasma gondii*? *Parasitology*, p. 1 of 10. ©Cambridge University Press.
- Grigg, M.E. & Sundar, N. (2009). Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. *Int J Parasitol*, **39**: 925-933.
- Grigg, M.E.; Bonnefoy, S.; Hehl, A.B.; Suzuki, Y.; Boothroyd, J.C. (2001). Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science*, **294**: 161-165.
- Grigg, M.E.; Dubey, J.P.; Nussenblatt, R.B. (2015). Ocular Toxoplasmosis lessons Braz. *Am J Ophthalmol*, **159**: 999-1001.
- Guimaraes, L.A.; Bezerra, R.A.; De Santana Rocha, D.; Albuquerque G.R. (2013). Prevalence and risk factors associated with anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in sheep from Bahia state, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, **22**: 220-224.
- Guo, M.; Buchanan, R.L.; Dubey, J.P.; Hill, D.E.; Lambertini, E.; Ying, Y.; Gamble, H.R.; Jones, J.L.; Pradhan A.K. (2015). Qualitative assessment for *Toxoplasma gondii* exposure risk associated with meat products in the United States. *J Food Prot*, **78**: 2207-2219.
- Guo, M.; Dubey, J.P.; Hill, D.E.; Buchanan, R.L.; Gamble, H.R.; Jones, J.L.; Pradhan, A.K. (2015). Prevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in Meat Animals and Meat Products Destined for Human Consumption. *J Food Prot*, **78**: 457-476.
- Guo, M.; Mishra, A.; Buchanan, R.L.; Dubey, J.P.; Hill, D.E.; Gamble, H.R.; Jones, J.L.; Du, X.; Pradhan, A.K. (2015). Development of Dose-Response Models to Predict the Relationship for Human *Toxoplasma gondii* Infection Associated with Meat Consumption. *Risk Anal*.
- Hall, S.M.; Pandit, A.; Golwilkar A.; Williams, T.S. (1999). How do Jains get *Toxoplasma* infection? *Lancet*, **354**: 486-487.
- Halos, L.; Thébault, A.; Aubert, D.; Thomas, M.; Perret, C.; Geers, R.; Alliot, A.; Escotte-Binet, S.; Ajzenberg, D.; Dardé, M.L.; Durand, B.; Boireau, P.; Villena, I. (2010). An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France. *Int J Parasitol*, **40**(2): 193-200.
- Halová, D.; Mulcahy, G.; Rafter, P.; Turceková, L.; Grant, T.; De Waal, T. (2013). *Toxoplasma gondii* in Ireland: seroprevalence and novel molecular detection method in sheep, pigs, deer and chickens. *Zoonoses and Public Health*, **60**: 168-173.
- Hanafi, E.M.; Taylan Ozkan, A.; Bowman, D.D. (2014). Protozoa: *Toxoplasma gondii*. *Encyclopedia of Food Safety*, **2**: 54-62.
- Herrero, L.; Gracia, M.J.; Pérez-Arquillué, C.; Lázaro, R.; Herrera, M.; Herrera, A.; Bayarri, S. (2016). *Toxoplasma gondii*: pig seroprevalence, associated risk factors and viability in fresh pork meat. *Vet Parasitol*, **224**: 52-59.
- Hill, D.E. & Dubey, J.P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*, **8**: 634-640.

- Hill, D.E. & Dubey, J.P. (2013). *Toxoplasma gondii* prevalence in farm animals in the United States. *Int J Parasitol*, **43**: 107-113.
- Hill, D.E. & Dubey, J.P. (2015). *Toxoplasma gondii* as a parasite in food: analysis and control. *Microbiology Spectrum*, **4**(4).
- Hill, D.E.; Chirukandoth, S.; Dubey, J.P. (2005). Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev*, **6**(1): 41-61.
- 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. *Vet Parasitol*, **141**: 9-17.
- Hill, D.E.; Coss, C.; Dubey, J.P.; Wroblewski, K.; Sautter, M.; Hosten, T.; Muñoz-Zanzi, C.; Mui, E.; Withers, S.; Boyer, K.; Hermes, G.; Coyne, J.; Jagdis, F.; Burnett, A.; McLeod, P.; Morton, H.; Robinson, D.; McLeod, R. (2011). Identification of a sporozoite-specific antigen from *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*, **97**: 328-337.
- Hill, D.E.; Haley, C.; Wagner, B.; Gamble, H.R.; Dubey, J.P. (2010). Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the US swine herd using sera collected during the national animal health monitoring survey (Swine 2006). *Zoonoses Public Health*, **57**: 53-59.
- Holec-Gąsior, L.; Dominiak-Górski, B.; Kur, J. (2015). First report of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in sheep in Pomerania, northern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **22**(4): 604-607.
- Holland, G.N. (2003). LX Edward Jackson memorial lecture – ocular Toxoplasmosis: a global reassessment. Part 1: epidemiology and course of disease. *Am J Ophthalmol*, **136**: 973-988.
- Howe, D.K. & Sibley, L.D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*, **172**(6): 1561-1566.
- Hunter, C.A. & Sibley, L.D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol*, **10**(11): 766-778.
- Hutchinson, J.P.; Wear, A.R.; Lambton, S.L.; Smith R.P.; Pritchard, G.C. (2011). Survey to determine the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in British sheep flocks. *Vet Rec*, **169**(22): 582.
- Hutchison, W.M. (1965). Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*, **206**(987): 961-962.
- Innes, E.A. (2009). A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses Public Health*, **57**: 1-7.
- Innes, E.A.; Bartley, P.M.; Buxton, D.; Katzer, F. (2009). Ovine Toxoplasmosis. *Parasitology*, **136**: 1887-94.
- Iovu, A.; Gyoerke, A.; Mircean, V.; Gavrea, R.; Cozma, V. (2012). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dairy goats from Romania. *Vet Parasitol*, **186**(3-4): 470-474.
- ISTAT. Istituto Nazionale di Statistica. <http://www.istat.it> (ultimo accesso 30/11/2017).
- Jacobs, L.; Remington, J.S.; Melton, M.L.; (1960). A survey of meat samples from swine, cattle, and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. *J Parasitol*, **46**: 23-28.
- Jauregui, L.H.; Higgins, J.; Zarlenga, D.; Dubey, J.P.; Lunney, J.K. (2001). Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Toxoplasma gondii* in Pig and Mouse Tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**(6): 2065-2071.
- Jeffrey, D.; Kravetz, M.D.; Daniel, G.; Federman, M.D. (2005). Toxoplasmosis in pregnancy. *The American Journal of Medicine*, **118**: 212-216.

- Johnson, A.M. (1997). Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*. *Parasitol Today*, **13**: 393-397.
- Jones, J.L. & Holland, G.N. (2010). Annual burden of ocular Toxoplasmosis in the United States. *Am J Trop Med Hyg*, **82**: 464-465.
- Jones, J.L.; Dargelas, V.; Roberts, J.; Press, C.; Remington, J.S.; Montoya, J.G. (2009). Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clin Inf Dis*, **49**: 878-884.
- Jones, J.L. & Dubey, J.P. (2010). Waterborne Toxoplasmosis – Recent developments. *Experimental Parasitology*, Volume 124, Issue 1, pp 10-25.
- Jones, J.L. & Dubey, J.P. (2012). Foodborne Toxoplasmosis. *Clin Infect Dis*, **55**(6): 845-851. doi: 10.1093/cid/ cis508 PMID: 22618566.
- Jones, J.L. & Roberts, J.M. (2012). Toxoplasmosis hospitalizations in the United States, 2008, and trends, 1993–2008. *Clin Infect Dis*, **54**(7): 58-61.
- Jones, J.L.; Dargelas, V.; Roberts, J.; Press, C.; Remington, J.S.; Montoya, J.G. (2009). Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, **49**: 878-884
- Jones, J.L.; Kruszon-Moran, D.; Sanders-Lewis, K., Wilson, M. (2007). *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999–2004, decline from the prior decade. *Am J Trop Med Hyg*, **77**: 405-410.
- Jones, J.L.; Kruszon-Moran, D.; Wilson, M. (2003). *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999–2000. *Emerg Infect Dis*, **9**: 1371-1374.
- Jones, J.L.; Kruszon-Moran, D.; Wilson, M.; McQuillan, G.; Navin, T.; McAuley, J.B. (2001). *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. *Am J Epidemiol*, **154**: 357-365.
- Jones, J.L.; Parise, M.E.; Fiore, A.E. (2014). Neglected Parasitic Infections in the United States: Toxoplasmosis. *Am J Trop Med Hyg*, **90** (5): 794-799.
- Jungersen, G.; Jensen, L.; Rask, M.R.; Lind, P. (2002). Non-lethal infection parameters in mice separate sheep type II *Toxoplasma gondii* isolates by virulence. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **25**: 187-195.
- Juránková, J.; Basso, W.; Neumayerová, H.; Baláz, V.; Jánová, E.; Sidler, X.; Deplazes, P.; Koudela, B. (2014). Brain is the predilection site of *Toxoplasma gondii* in experimentally inoculated pigs as revealed by magnetic capture and real-time PCR. *Food Microbiology*, **38**: 167-170.
- Juránková, J.; Basso, W.; Neumayerová, H.; Frencová, A.; Baláz, V.; Deplazes, P.; Koudela, B. (2015). Predilection sites for *Toxoplasma gondii* in sheep tissues revealed by magnetic capture and real-time PCR detection. *Food Microbiology*, **52**: 150-153.
- Juránková, J.; Opsteegh, M.; Neumayerová, H.; Kovařík, K.; Frencová, A.; Baláz, V.; Volf, J.; Koudela, B. (2013). Quantification of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of experimentally infected goats by magnetic capture and real-time PCR. *Vet Parasitol*, **193**: 95-99.
- Kalambhe, D.; Gill, J.P.S.; Singh, B.B. (2017). Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in the slaughter sheep and goats from North India. *Veterinary Parasitology*, **241**: 35-38.
- Kalzer, F.; Burrells, A.; Opsteegh, M. (2014). Microbiology of Waterborne Diseases, Chapter Twenty-One: *Toxoplasma gondii*, pp. 417-440.

- Kantzoura, V.; Diakou, A.; Kouam, M.K.; Feidas, H.; Theodoropoulou, H.; Theodoropoulos, G. (2013). Seroprevalence and risk factors associated with zoonotic parasitic infections in small ruminants in the Greek temperate environment. *Parasitol Int*, **62**(6): 554-560.
- Katzer, F.; Brulisauer, F.; Collantes-Fernandez, E.; Bartley, P.M.; Burrells, A.; Gunn, G.; Maley, S.W.; Cousens, C.; Innes, E.A. (2011). "Increased *Toxoplasma gondii* positivity relative to age in 125 Scottish sheep flocks; evidence of frequent acquired infection. *Vet Res*, **42**: 121.
- Khan, A., Su, C.; German, M.; Storch, G.A.; Clifford, D.B.; Sibley, L.D. (2005). Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *J Clin Microbiol*, **43**(12): 5881-5887.
- Khan, A.; Dubey, J.P.; Su, C.; Ajioka, J.W.; Rosenthal, B.M.; Sibley, L.D. (2011). Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int J Parasitol*, **41**: 645-655.
- Khan, A.; Fux, B.; Su, C.; Dubey, J.P.; Dardé, M.L.; Ajioka, J.W.; Rosenthal, B.M.; Sibley, L.D. (2007). Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**(37): 14872-14877.
- Khan, A.; Jordan, C.; Muccioli, C.; Vallochi, A.L.; Rizzo, L.V.; Belfort, R.; Vitor, R.W.; Silveira, C.; Sibley L.D. (2006). Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular Toxoplasmosis, Brazil. *Emerg Infect Dis*, **12**(6): 942-949.
- Khan, A.; Taylor, S.; Su, C.; Sibley, L.D.; Paulsen, I.; Ajioka, J.W. (2007). Genetics and genome organization of *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma molecular and cellular biology*, ed. Ajioka J.W. and Soldati D., 193-207. Norfolk, UK: *Horizon Bioscience*.
- Kijlstra, A. & Jongert, E. (2008). Control of the risk of human Toxoplasmosis transmitted by meat. *Int J Parasitol*, **38**: 1359-1370.
- Kijlstra, A. & Jongert, E. (2008). *Toxoplasma*-safe meat: close to reality? *Trend Parasitol*, **25**: 18-22.
- Kijlstra, A.; Eissen, O.A.; Cornelissen, J.; Munniksma, K.; Eijck, I.; Kortbeek, T. (2004). *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **45**: 3165-3169.
- 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*, **156**: 183-190.
- Klun, I.; Djurkovic-Djakovic, O.; Katic-Radivojevic, S.; Nikolic, A. (2006). Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. *Veterinary Parasitology*, **135**:121-31.
- Kuticic, V. & Wikerhauser, T. (1996). Studies of the effect of various treatments on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts and oocysts. *Curr Top Microbiol Immunol*, **219**: 261-265.
- Laliberte, J. & Carruthers, V.B. (2008). Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci*, **65**: 1900–1915.
- Lappin, M.R. (2010). Update on the diagnosis and management of *Toxoplasma gondii* Infection in cats. *Top Companion Anim Med*, **25**: 136-141.
- Lappin, M.R.; Greene, C.E.; Prestwood, A.K.; Dawe, D.L.; Tarleton, R.L. (1989). Diagnosis of recent *Toxoplasma gondii* infection in cats by use of an enzymelinked immunosorbent assay for immunoglobulin M. *Am J Vet Res*, **50**: 1580-1585.
- Lehmann, T.; Marcet, P.L.; Graham, D.H.; Dahl, E.R.; Dubey, J.P. (2006). Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci*, **103**: 11423-1428.
- Leroy, V.; Raeber, P.A.; Petersen, E.; Salmi, L.R.; Kaminski, M.; Gilbert, R. (2005). National public Health policies and routine programs to prevent congenital Toxoplasmosis in Europe. <http://www.eurotoxoplasmosis.org>.

- Lindsay, D.S. & Dubey, J.P. (2009). Long-term survival of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts in seawater. *J Parasitol*, **95**(4): 1019-1020.
- Lindsay, D.S.; Collins, M.V.; Holliman, D.; Flick, G.J.; Dubey, J.P. (2006). Effects of high pressure processing on *Toxoplasma gondii* tissue cysts in ground pork. *J Parasitol*, **92**: 195-196.
- Lindsay, D.S.; Phelps, K.K.; Smith, S.A.; Flick, G.; Sumner, S.S.; Dubey, J.P. (2001). Removal of *Toxoplasma gondii* oocysts from sea water by eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J Eukaryot Microbiol*, (Suppl.), 197S-198S.
- Lindsay, D.S.; Thomas, N.J.; Rosypal, A.C.; Dubey, J.P. (2001). Dual *Sarcocystis neurona* and *Toxoplasma gondii* infection in a Northern sea otter from Washington state, USA. *Vet Parasitol*, **97**: 319-327.
- Lindstrom, I.; Sundar, N.; Lindh, J.; Kironde, F.; Kabasa, J.D.; Kwok, O.C.; Dubey, J.P.; Smith, J.E. (2008). Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from Ugandan chickens reveals frequent multiple infections. *Parasitology*, **135**: 39-45.
- Liu, Q.; Wei, F.; Gao, S.; Jiang, L.; Lian, H.; Yuan, B.; Yuan, Z.; Xia, Z.; Liu, B.; Xu, X.; Zhu, X.Q. (2009). *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **103**: 162-166.
- Liu, Q.; Wang, Z.D.; Huang, Zhu, X.Q. (2015). Diagnosis of Toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasit Vectors*, **8**: 292.
- Lopes, A.P.; Dubey, J.P.; Neto, F.; Rodrigues, A.; Martins, T.; Rodrigues, M.; Cardoso, L. (2013). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, goats and pigs from the North of Portugal for human consumption. *Vet Parasitol*, **193**: 266-269.
- Lopes, A.P.; Sargo, R.; Rodrigues, M.; Cardoso, L. (2011). High seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild animals from Portugal. *Parasitol Res*, **108**: 1163-1169.
- Lopes, W.D.Z.; Costa, A.J.; Santana, L.F.; Santos, R.S.; Rossanese, W.M.; Lopes, W.C.Z.; Costa, G.H.N.; Sackamoto, C.A.; Santos, T.R. (2009). Aspects of *Toxoplasma* infection on the reproductive system of experimentally infected Rams (*Ovis aries*). *J Parasitol Res*, pp. 1-6.
- Lopes, W.D.Z.; D'Ark Rodriguez, J.; Souza, F.A.; dos Santos, T.R.; Dos Santos, R.S.; Rosanese, W.M.; Sakamoto, C.A.; Da Costa, A.J. (2013). Sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in sheep. *Vet Parasitol*, **195**: 47-56.
- Lopes-Mori, F.M.R.; Mitsuka-Breganò, R.; Capobianco, J.D.; Teruo Inoue, I.; Vissoci Reiche, E.M.; Kaminami Morimoto, H.; Barbante Casella, A.M.; De Barros Bittencourt, L.H.F.; Lemos Freire, R.; Navarro, I.T. (2011). Programs for control of congenital Toxoplasmosis. *Rev Assoc Med Bras*, **57**(5):581-586
- Lundén, A. & Uggla, A. (1992). Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *International Journal of Food Microbiology*, **15**: 357-363.
- Lyons, R.E.; McLeod R.; Roberts, C.W. (2002). *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol* **18**(5): 198-201.
- Maenz, M.; Schlüter, D.; Liesenfeld, O.; Schares, G.; Gross, U.; Pleyer, U. (2014). Ocular Toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, **39**: 77-106.
- Mancianti, F.; Nardoni, S.; D'Ascenzi, C.; Pedonese, F.; Mugnaini, L.; Franco, F.; Papini, R. (2013). Seroprevalence, detection of DNA in blood and milk, and genotyping of *Toxoplasma gondii* in a goat population in Italy. *BioMed Research International*, 905326.
- Marquardt, W.C.; Demaree, R.S.; Grieve, R.B. (2000). Parasitology and Vector Biology, second ed. *Academic Press, London*, pp. 165-178.

- Masala, G.; Porcu, R.; Daga, C.; Denti, S.; Canu, G.; Patta, C.; Tola, S. (2007). Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *J Vet Diagn Invest* **19**: 96-98.
- Masala, G.; Porcu, R.; Madau, L.; Tanda, A.; Ibba, B.; Satta, G.; Tola, S. (2003). Survey of ovine and caprine Toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. *Vet Parasitol*, **117**(1-2): 15-21.
- Meerburg, B.G.; Van Riel, J.W.; Cornelissen, J.B.; Kijlstra, A.; Mul, M.F. (2006). Cats and goat whey associated with *Toxoplasma gondii* infection in pigs. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **6**: 266-274.
- Mendonca, C.E.; Barros, S.L.; Guimaraes, V.A.; Ferraudo, A.S.; Munhoz, A.D (2013). Prevalence and risk factors associated to ovine Toxoplasmosis in northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, **22**: 230-234.
- Mercier, A.; Devillard, S.; Ngoubangoye, B.; Bonnabau, H.; Bañuls, A.L.; Durand, P.; Salle, B.; Ajzenberg, D.; Dardé, M.L. (2011). Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Negl Trop Dis*, **4**(11): 876.
- Miller, M.A.; Gardner, I.A.; Kreuder, C.; Paradies, D.M.; Worcester, K.R.; Jessup, D.A.; Dodd, E.; Harris, M.D.; Ames, J.A.; Packham, A.E.; Conrad, P.A. (2002). Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Int J Parasitol*, **32**(8): 997-1006.
- Miller, M.A.; Miller, W.A.; Conrad, P.A.; James, E.R.; Melli, A.C.; Leutenegger, C.M.; Däbritz, H.A.; Packham, A.E.; Paradies, D.; Harris, M.; Ames, J.; Jessup, D.A.; Worcester, K.; Grigg, M.E. (2008). Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and Toxoplasmosis of sea otters. *Int J Parasitol*, **38**(11): 1319-1328.
- Minbaeva, G.; Schweiger, A.; Bodosheva, A.; Kuttubaev, O.; Hehl, A.B.; Tanner, I.; Ziadinov, I.; Torgerson, P.R.; Deplazes, P. (2013). *Toxoplasma gondii* infection in Kyrgyzstan: seroprevalence, risk factor analysis, and estimate of congenital and AIDS-related Toxoplasmosis. *PLoS Negl Trop Dis*, **7**(2): 2043.
- Ministero Della salute <http://www.salute.gov.it/pianoNazionaleIntegrato/paginaInternaMenuPianoNazionaleIntegrato.jsp?id=3941&lingua=italiano&menu=capitolo3&sottomenu=2157> (ultimo accesso 6-11-2017).
- Mohraz, M.; Mehrkhani, F.; Jam, S.; SeyedAlinaghi, S.; Sabzvari, D.; Fattahi, F.; Jabbari, H.; Hajiabdolbaghi, M. (2011). Seroprevalence of Toxoplasmosis in HIV*/AIDS Patients in Iran. *Acta Med Iran*, **49**: 213-8.
- Montoya, J.G. & Liesenfeld, O. (2004) Toxoplasmosis. *Lancet*, **363**: 1965-1976.
- Moreira, E.P.; Moura, A.A.A.; Araújo, A.A. (2001). Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no Estado do Ceará. *Rev Bras Zootecn*, **6**: 1704-1711.
- Moura, A.B.; Costa, A.J.; Jordão Filho, S.; Paim, B.B.; Pinto, F.R.; Mauro, D.C. (2007). *Toxoplasma gondii* in sêmen of experimentally infected swine. *Braz J Vet Res Anim Sci*, **27**: 430-434.
- Munoz, M.; Liesenfeld, O.; Heimesaat, M.M. (2011). Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol Rev*, **240**(1): 269-285.
- Natale, A.; Porqueddu, M.; Capelli, G.; Mocci, G.; Marras, M.A.; Sanna Cocco, G.N.; Garippa, G.; Scala, A. (2006). Sero-epidemiological update on sheep Toxoplasmosis in Sardinia (Italy). *Atti Toxo & Food*, Palermo, Italy, 84-85.
- Nesbakken, T. (2009). Food safety in a global market – Do we need to worry? *Small Rumin Res*, **86**(1): 63-66.
- Neumayerová, H.; Juránková, J.; Saláková, A.; Gallas, L.; Kovarcík, K.; Koudela, B. (2014). Survival of experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in vacuum packed goat meat and dry fermented goat meat sausages. *Food Microbiology*, **39**: 47-52.
- Nicolle, C. & Manceaux, L. (1908). Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C. R. Seances Acad Sci*, **147**: 763-766.

- Nicolle, C. & Manceaux, L. (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C R Seances Acad Sci*, **148**: 369-372.
- Nicolle, C. & Manceaux, L. (2009). On a new protozoan in *gundis* (*Toxoplasma* N. Gen). *Memòrias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **104**(2).
- Nogareda, F.; Le Strat, Y.; Villena, I.; De Valk, H.; Goulet, V. (2014). Incidence and prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in women in France, 1980-2020: modelbased estimation. *Epidemiol Infect*, **142**: 1661-1670.
- Opsteegh, M.; Langelaar, M.; Sprong, H.; Den Hartog, L.; De Craeye, S.; Bokken, G.; Ajzenberg, D.; Kijlstra, A.; van der Giessen, J. (2010). Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *Int J Food Microbiol*, **139**(3): 193-201.
- Opsteegh, M.; Maas, M.; Schares, G.; Van der Giessena, J. on behalf of the consortium (2016). Relationship between seroprevalence in the main livestock species and presence of *Toxoplasma gondii* in meat (GP/EFSA/BIOHAZ/2013/01) *An extensive literature review*. Final report1. EFSA External Scientific Report.
- Opsteegh, M.; Prickaerts, S.; Frankena, K.; Evers, E.G. (2011). A quantitative microbial risk assessment for meatborne *Toxoplasma gondii* infection in The Netherlands. *Int J Food Microbiol*, **150**(2-3): 103-114.
- Opsteegh, M.; Teunis, P.; Mensink, M.; Zuchner, L.; Titilincu, A.; Langelaar, M.; Van der Giessen, J. (2010). Evaluation of ELISA test characteristics and estimation of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in Dutch sheep using mixture models. *Preventive Veterinary Medicine*, **96**(3-4): 232-240.
- Ortega-Mora, L.M.; Gottstein, B.; Conraths, F.J.; Buxton, D. (2007). Protozoal Abortion in Farm Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control. *CAB International; Wallington, UK*.
- Owen, M.R. & Trees, A.J. (1999). Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. *J Parasitol*, **85**: 382-384.
- Pandey, S.; Vandip, D.; Chauhan, B.; Parmar, C.; Nayak, J.B. (2015). Toxoplasmosis: A Food Borne Parasitic Zoonosis. *Journal of Foodborne and Zoonotic Diseases*, **3**(1): 11-14
- Pastiu, A.I.; Györke, A.; Blaga, R.; Mircean, V.; Rosenthal, B.M.; Cozma, V. (2013). In Romania, exposure to *Toxoplasma gondii* occurs twice as often in swine raised for familial consumption as in hunted wild boar, but occurs rarely, if ever, among fattening pigs raised in confinement. *Parasitol Res*, **112**: 2403-2407.
- Pena, H.F.; Gennari, S.M.; Dubey, J.P.; Su, C. (2008). Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol*, **38**: 561-569.
- Pereira, K.S.; Franco, R.M.B.; Leal, D.A.G. (2010). Transmission of Toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) by Foods. Chapter 1, *Advances in Food and Nutrition Research*, **60**: 1-19.
- Pereira-Bueno, J.; Quintanilla-Gozaolo, A.; Perez-Perez, V.; Alvarez-García, G.; Collantes Fernandez E.; Ortega-Mora, L.M. (2004). Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Vet Parasitol*, **121**(1-2): 33-43.
- Petersen, E.; Kijlstra, A.; Stanford, M. (2012). Epidemiology of ocular Toxoplasmosis. *Ocul Immunol Inflamm*, **20**(2): 68-75.
- Peyron, F.; Garweg, J.G.; Wallon, M.; Descloux, E.; Rolland, M.; Barth, J. (2011). Long-term impact of treated congenital Toxoplasmosis on quality of life and visual performance. *Pediatr Infect Dis J*, **30**: 597-600.
- Piergili Fioretti, D. & Manfredi, M.T. (2014). Aggiornamenti sulle infezioni protozoarie causa di aborto negli ovicapri in Italia. *Large Animal Review*, Supplemento 1 al N. 4 - Agosto 2014, ANNO 20.

- Piergili Fioretti, D. (2004). Problems and limitations of conventional and innovative methods for the diagnosis of Toxoplasmosis in humans and animals. *Parassitologia*, **46**(1-2): 177-181.
- Piergili Fioretti, D.; Veronesi, F.; Ranucci, D.; Miraglia, D.; Branciarì, R.; Diaferia, M. (2008). Seroprevalence and risk factors for transmission of *Toxoplasma gondii* on finishing swines raised in Umbria farms. *Parassitologia* 50: in press.
- Pinheiro, J.W.; Mota, R.A.; Oliveira, A.A.; Faria, E.B.; Gondim, L.F.; Da Silva, A.V.; Anderlini, G.A. (2009). Prevalence and risk factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in ovine in the State of Alagoas, Brazil. *Parasitology Research*, **105**: 709-715.
- Pomares, C.; Ajzenberg, D.; Bornard, L.; Bernardin, G.; Hasseine, L.; Dardé M.L.; Marty, P. (2011). Toxoplasmosis and horse meat, France. *Emerg Infect Dis*, **17**(7): 1327-1328.
- Powell, C.C.; Brewer, M.; Lappin, M.R. (2001). Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. *Vet Parasitol*, **102**: 29-33.
- Puccini, V.; Gatti, A.; Corsalini, T.; Tempesta, M. (1983). La Toxoplasmosi degli ovini in Puglia e Basilicata: indagine epizootologica. *Atti SIPAOC*: 283-261.
- Putignani, L.; Mancinelli, L.; Del Chierico, F.; Menichella, D.; Adlerstein, D.; Angelici M.C., Marangi M., Berrilli F., Caffara M., Frangipane di Regalbono D.A., Giangaspero, A. (2010). Investigation of *Toxoplasma gondii* presence in farmed shellfish by nested-PCR and real-time PCR Fluorescent Amplicon Generation Assay (FLAG). *Experimental Parasitology*, **127**(2): 409-417.
- Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Hinchcliff, K.W.; Constable, P.D. (2006). Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses. 10th ed. *Saunders, New York*, pp. 161–242.
- Ramzan, M.; Akhtar, M.; Muhammad, F.; Hussain, I.; Hiszczynska-Sawicka, E.; Haq, A.U.; Mahmood, M.S.; Hafeez, M.A. (2009). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in Rahim Yar Khan (Punjab), Pakistan. *Tropical Animal Health & Production*, **41**: 1225-1229.
- Ranucci, D.; Veronesi, F.; Branciarì, R.; Miraglia, D.; Piergili Fioretti, D. (2008). Preliminary Evaluation on the Prevalence of *Toxoplasma gondii* in Pig Reared and Slaughtered in Umbria Region. *A.I.V.I.*, settembre n.1, pp. 21-24.
- Remington, J.S.; Klein, J.O.; Wilson, C.B.; Baker, C.J. (2006). Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 6th edn. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition*, **92**(2): F156.
- Remington, J.S.; McLeod, R.; Wilson, C.B.; Desmonts, G. (2011). Chapter 31 – Toxoplasmosis. Infectious Diseases of the Fetus and Newborn (Seventh Edition). Section IV *Protozoan, Helminth, and Fungal Infections*, p. 918-1041
- Renoult, E.; Georges, E.; Biava M.F.; Hulin, C.; Frimat, L.; Hestin, D.; Kessler, M. (1997). Toxoplasmosis in kidney transplant recipients: Report of six cases and review. *Clin Infect Dis*, **24**: 625-634.
- Riemann, H.P.; Meyer, M.E.; Theis, J.H.; Kelso, G.; Behymer, D.E. (1975). Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. *J Pediatr*, **87**: 573-576.
- Rinaldi, L. & Scala, A. (2008). Toxoplasmosis in livestock in Italy: an epidemiological update. *Parassitologia*, **50**(1–2): 59-61.
- Roghamann, M.C.; Faulkner, C.T.; Lefkowitz, A.; Patton, S.; Zimmerman, J.; Morris, J.G. (1999). Decreased seroprevalence for *Toxoplasma gondii* in seventh day adventists in Maryland. *Am J Trop Med Hyg*, **60**: 790-792.
- Romanelli, P.R.; Freire, R.L.; Vidotto, O.; Marana, E.R.; Ogawa, L.; De Paula, V.S.; Garcia, J.L.; Navarro, I.T. (2007). Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Parana State, Brazil. *Research in Veterinary Science*, **82**: 202-207.

- Saadatnia, G. & Golkar, M. (2012). A review on human Toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis*, **44**: 805-814.
- Sabin, A.B. & Feldman, H.A. (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science*, **108**: 660–663.
- Sacks, J.J.; Roberto, R.R.; Brooks, N.F. (1982). Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. *J Am Vet Med Assoc*, **248**: 1728-1732.
- Saeij, J.P.; Boyle, J.P.; Boothroyd, J.C. (2005). Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol*, **21**(10): 476-481.
- Salant, H.; Spira, D.T.; Hamburger, J. (2010). A comparative analysis of coprologic diagnostic methods for detection of *Toxoplasma gondii* in cats. *Am J Trop Med Hyg*, **82**(5): 865-70.
- Samico Fernandes, E.F.; Samico Fernandes, M.F.; Kim, P.C.; De Albuquerque, P.P.; De Souza Neto, O.L.; De S. Santos, A.; De Moraes, E.P.B.X.; De Moraes, E.G.F.; Mota, R.A. (2012). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in slaughtered pigs in the state of Pernambuco, Brazil. *J Parasitol*, **98**(3): 690-691.
- Samra, N.A.; Mc Crindle, C.M.; Penzhorn, B.L.; Cenci Goga, B.T.(2007). Seroprevalence of Toxoplasmosis in sheep in South Africa. *JS Afr Vet Assoc*, **78**(3): 116-120.
- Santana, L.F.; Costa, A.J.; Pieroni, J.; Lopes, W.D.Z.; Santos, R.S.; Oliveira, G.P.; Mendonc, R.P.; Sakamoto, C.A.M. (2010). Detecion of *Toxoplasma gondii* in the reproductive system of male goats. *Rev Braz Parasitol Vet*, **19**(3): 179-182.
- Santana, L.F.; Rossi, G.A.M.; Gaspar, R.C.; Pinto, V.M.R.; De Oliveira, G.P.; Da Costa, A.J. (2013). Evidence of sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in goats. *Small Ruminant Research*, **115**(1-3): 130-133.
- Saraf, P.; Shwab, E.K.; Dubey, J.P.; Su, C. (2017). On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. *Experimental Parasitology*, **174**: 25-30.
- Scala, A.; Giobbe, M.; Mula, P.P.; Pipia, A.P.; Sanna-Coccone, G.; Firinu, A.; Varcasia, A.; Marrosu, R.; Garippa, G. (2008). Toxoplasmosi dei suidi in Sardegna: indagine sieroepidemiologica. *Parassitologia*, **50**: 235.
- Scarpelli, L.; Lopes, W.; Migani, M.; Bresciani, K.; Costa, A. (2009). *Toxoplasma gondii* in experimentally infected Bos taurus and Bos indicus semen and tissues. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **29**: 59-64.
- Schulzig, H.S. & Fehlhaver, K. (2005). Longitudinal study on the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in four German pig breeding and raising farms. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, **118**: 399-403.
- Shwab, E.K.; Jiang, T.; Pena, H.F.; Gennari, S.M.; Dubey, J.P.; Su, C. (2016). The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, **46**: 141-146.
- Shwab, E.K.; Zhu, X.Q.; Majumdar, D.; Pena, H.F.; Gennari, S.M.; Dubey, J.P.; Su, C. (2014). Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*, **141**: 453-461.
- Sibley, L.D. (2003). Recent origins among ancient parasites. *Veterinary Parasitology*, **115**: 185-198.
- Sibley, L.D. & J.W. Ajioka (2008). Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annu Rev Microbiol*, **62**: 329-351.
- Sibley, L.D. (2009). Development of forward genetics in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* **39**: 915-924.
- Skariah, S., McIntyre, M.K.; Mordue, D.G. (2010). *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol Res* **107**(2): 253-260.

- Skinner, L.J.; Timperley, A.C.; Wightman, D.; Chatterton, J.M.; Ho-Yen, D.O. (1990). Simultaneous diagnosis of Toxoplasmosis in goats and goat owner's family. *Scand J Infect Dis*, **22**: 359-361.
- Slavin, M.A.; Meyers, J.D.; Remington, J.S.; Hackman, R.C. (1994). *Toxoplasma gondii* infection in marrow transplant recipients: A 20 year experience. *Bone Marrow Transplant*, **13**: 549-557.
- Smith, M.C.; & Sherman, D.M. (2009). *Goat Medicine*, second ed. *Wiley and Blackwell Publishing, USA*, pp. 571-594.
- Sobrino, R.; Cabezòn, O.; Millàn, J.; Pabòn, M.; Arnal, M.C.; Luco, D.F.; Gortàzar, C.; Dubey, J.P.; Almeria, S. (2007). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology*, **148**: 187-192
- Solaiman, S.G. (2010). *Goat Science and Production*, first ed. *Wiley-Blackwell, Singapore*, pp. 139-241.
- Soldati, G.; Pavesi, M.; Marastoni, G.; Perini, S.; Barigazzi, G.; Scianchi, P. (1986). Toxoplasmosi suina. Indagine sierologica su suini delle province di Modena, Reggio Emilia e Parma. *Sel Vet*, **27**: 383-385.
- Splendore, A. (1908). Un nuovo protozoa parassita de' conigli. Incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. *Nota preliminare pel. Rev Soc Scient, Sao Paulo*, **3**: 109-112.
- Splendore, A. (2009). A new protozoan parasite in rabbits. *Int J Parasitol*, **39**(8): 861-862.
- Steinparzer, R.; Reisp, K.; Grünberger, B.; Köfer, J.; Schmoll, F.; Sattler, T. (2015). Comparison of Different Commercial Serological Tests for the Detection of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Serum of Naturally Exposed Pigs. *Zoonoses and Public Health*, **62**: 119-124.
- Su, C.; Evans, D.; Cole, R.H.; Kissinger, J.C.; Ajioka, J.W.; Sibley, L.D. (2003). Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*, **299**(5605): 414-416.
- Su, C.; Khan, A.; Zhou, P.; Majumdar, D.; Ajzenberg, D.; Dardé, M.L.; Zhu, X.Q.; Ajioka, J.W.; Rosenthal, B.M.; Dubey, J.P.; Sibley, L.D. (2012). Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**(15): 5844-5849.
- Su, C.; Shwab, E.K.; Zhou, P.; Zhu, X.Q.; Dubey, J.P. (2010). Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, **137**: 1-11.
- Sukthana, Y. (2006). Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trends in Parasitology*, **22**(3): 137-142.
- Sullivan, W.J. Jr. & Jeffers, V. (2012). Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *Federation of European Microbiological Societies Microbiol Rev*, **36**: 717-733.
- Tavares, A.L.C.; Souza, A.; Fabres, A.D.; Almeida, M.A.B.; Junior, L.R.A.; Carmo, G.M.I.; Araujo, W.N.; Garcia, M.H.O.; Reis, A.K.V.; Figueiredo, D.M.S.; Branco, N.; Franco, R.M.B.; Hatch, D.L. (2006). Surto intra-familiar de toxoplasmose, Santa Vitória do Palmar-RS. *Bol Eletronico Epidemiol*, http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_03_06.pdf.
- Tenter, A.M. (2009). *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **104**: 364-369.
- Tenter, A.M.; Heckeroth, A.R.; Weiss, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*, **30**: 1217-1258.
- Thiébaud, R.; Leproust, S.; Chêne, G.; Gilbert, R. (2007). Effectiveness of prenatal treatment for congenital Toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. *Lancet*, **369**: 115-22.
- Tola, S.; Porcu, R.; Macciocu, S.; Chessa, G.; Casu, L.M.; Sale, S.; Masala, G. (2002). Aborti ovini e caprini in Sardegna: analisi riferita a *Salmonella abortusovis*, *Toxoplasma gondii* e *Coxiella burnetii*. *ATTI XV Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C.*

- Tomasoni, L.R.; Sosta, E.; Beltrame, A.; Rorato, G.; Bigoni, S.; Frusca, T.; Zanardini, C.; Driul, L.; Magrini, F.; Viale, P.; Castelli, F. (2010). Antenatal screening for mother to child infections in immigrants and residents: the case of Toxoplasmosis in Northern Italy. *Journal of Immigrant and Minority Health*, **12**(6): 834-840.
- Tzanidakis, N.; Maksimov, P.; Conraths, F.J.; Kiossis, E.; Brozos, C.; Sotiraki, S.; Schares, G. (2012). *Toxoplasma gondii* in sheep and goats: Seroprevalence and potential risk factors under dairy husbandry practices. *Vet Parasitol*, **190**(3-4): 340-348.
- Unno, A.; Suzuki, K.; Xuan, X.; Nishikawa, Y.; Kitoh, K.; Takashima, Y. (2008). Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. *Parasitol Int*, **57**(4): 515-518.
- Unzaga, J.M.; Moré, G.; Bacigalupe, D.; Rambeaud, M.; Pardini, L.; Dellarupe, A.; De Felice, L.; Gos, M.L.; Venturini, M.C. (2014). *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goat abortions from Argentina. *Parasitology International*, **63**: 865-867
- Urquart, G.M.; Armour, J.; Duncan, J.L.; Dunn, A.M.; Jennings, F.W. (2005). Parassitologia veterinaria. *UTET, Milano, Italy*. 2nd edition a cura di Claudio Genchi, p. 277-286.
- Van der Giessen, J.; Fonville, M.; Bouwknegt, M.; Lanelaar, M.; Vollema, A. (2007). Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing system in the Netherlands. *Vet Parasitol*, **148**: 371-374.
- Van Knapen, F.; Kremers, A.F.; Franchimont, J.H.; Narucka, U. (1995). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cattle and swine in The Netherlands: towards an integrated control of livestock production. *Vet Q*, **17**: 87-91.
- Velmurugan, G.V.; Dubey, J.P.; Su, C. (2008). Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. *Vet. Parasitol*, **155**: 314-318.
- Velmurugan, G.V.; Su, C.; Dubey, J.P. (2009). Isolate designation and characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs in the United States. *J Parasitol*, **95**: 95-99.
- Veronesi, F.; Ranucci, D.; Branciarri, R.; Miraglia, D.; Mammoli, R.; Fioretti, D.P. (2011). Seroprevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection on Finishing Swine Reared in the Umbria Region, Central Italy. *Zoonoses Public Health*, **58**: 178-184
- Veronesi, R. (2005). *Tratado de Infectologia*. 3ª edn. Editor Científico Roberto Focaccia. São Paulo, Editora Atheneu.
- Vesco, G. & Villari, S. (2006). Sieroprevalenza di *Toxoplasma gondii* in suini macellati in Sicilia. *Proc LXI S.I.S.Vet* **207**: 111-112.
- Vesco, G.; Buffolano, W.; La Chiusa, S.; Mancuso, G.; Caracappa, S.; Chianca, A.; Villari, S.; Currò, V.; Liga, F.; Petersen, E. (2007). *Toxoplasma gondii* infections in sheep in Sicily, southern Italy. *Vet Parasitol*, **146**: 3-8.
- Villari, S.; Vesco, G.; Petersen, E.; Crispo, A.; Buffolano, W. (2009). Risk factors for Toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. *Vet Parasitol*, **161**: 1-8.
- Vitale, M.; Tumino, G.; Partanna, S.; La Chiusa, S.; Mancuso, G.; La Giglia, M.; Lo Presti, V.D.M. (2014). Impact of Traditional Practices on Food Safety: A Case of Acute Toxoplasmosis Related to the Consumption of Contaminated Raw Pork Sausage in Italy. *J Food Prot*, **77**:643-646.
- Vollaire, M.R.; Steven, D.V.M.; Radecki, V.; Michael, R.; Lappin, D.V.M. (2005). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in clinically ill cats in the United States. *Am J Vet Res*, **66**: 874-877.
- Wainwright, K.E.; Miller, M.A.; Barr, B.C.; Gardner, I.A.; Melli, A.C.; Essert, T.; Packham, A.E.; Truong, T.; Lagunas-Solar, M.; Conrad, P.A. (2007). Chemical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. *J Parasitol* **93**: 925-931.

- Wallace, G.R. & Stanford, M.R. (2008). Immunity and *Toxoplasma* retinochoroiditis. *Clinical and Experimental Immunology*, **153**: 309-315.
- Wanderley, F.S.; Nascimento Porto, W.J.; Câmara, D.R.; Gomes de Oliveira, V.V.; Garcia, J.L.; Feitosa de Albuquerque, P.P.; da Fonseca Oliveira, A.A.; Mota, R.A. (2015). Venereal transmission of *Toxoplasma gondii* in goats after abuck was experimentally infected. *Small Ruminant Research*, **123**: 301-305.
- Weiss, L.M. & Kim, K. (2013). *Toxoplasma gondii*: The Model Apicomplexan. Perspectives and Methods. *Second Edition*, Elsevier.
- Weiss, L.M. & Dubey, J.P. (2009). Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Int J Parasitol*, **39**: 895-901.
- Weiss, L.M. & Kim, K. (2000). The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci* 5, D391-D405 4.
- Williams, R.H.; Morley, E.K.; Hughes, J.M.; Duncanson, P.; Terry, R.S.; SMITH, J.E.; HIDE, G. (2005). High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. *Parasitology*, **130**: 301-307.
- Wolf, A. & Cowen, D. (1937). Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (*encephalitozic ancephalomyelitis*): A new protozoan disease of man. *Bull Neurol Inst NY*, **6**: 306-335.
- Wolf, A.; Cowen, D.; Paige, B. (1939). Human Toxoplasmosis: Occurrence in Infants as an Encephalomyelitis Verification by Transmission to Animals. *Science*, **89**(2306): 226-227.
- Wreghitt, T.G. & Joynton, D.H.M. (2001). *Toxoplasma* infection in immunosuppressed (HIVnegative) patients. In *Toxoplasmosis. A comprehensive clinical guide*, ed. Joynton D.H.M. & Wreghitt T.G., 178-192. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Xiao, J. & Yolken, R.H. (2015). Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. *Acta Physiol (Oxf)*, **213**: 828-845.
- Yekkour, F.; Aubert, D.; Mercier, A.; Murat, J.B.; Khames, M.; Nguewa, P.; Ait-Oudhia, K.; Villena, I.; Bouchene, Z. (2017). First genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in stray cats from Algeria. *Veterinary Parasitology*, **239**: 31-36.
- Yildiz, K.; Kul, O.; Gökpinar, S.; Atmaca, H.T.; Gençay, Y.E.; Gazyağci, A.N.; Babür, C.; Gürcan, İ.S. (2014). The relationship between seropositivity and tissue cysts in sheep naturally infected with *Toxoplasma gondii*. *Turk J Vet Anim Sci*, **38**: 169-175.
- Yilmaz, S.M. & Hopkins, S.H. (1972). Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol*, **58**(5): 938-939.
- Yu, H.; Zhang, Z.; Liu, Z.; Qu, D.; Zhang, D.; Zhang, H.; Zhou, Q.; Du, A. (2011). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Pigs, in Zhejiang Province, China. *J Parasitol*, **97**(4): 748-749.
- Zedda, M.T.; Rolesu, S.; Pau, S.; Rosati, I.; Ledda, S.; Satta, G.; Patta, C.; Masala, G. (2010). Epidemiological Study of *Toxoplasma gondii* Infection in Ovine Breeding. *Zoonoses Public Health*, **57**: 102-108.
- Zhou, J. & Tao, L. (2015). Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in Wuxi region. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, **27**(6): 604-607.

TABELLE E GRAFICI

Tabella 1. Prevalenze della Toxoplasmosi riscontrate in ovini, caprini e suini in Italia
(da Rinaldi A. & Scala A. 2008 modificato)

Specie	Regione	Sieroprevalenze (%)	Tecniche Diagnostiche	Referenze
Ovini	Sicilia	0,1	IFI	Balbo S.M. <i>et al.</i> , 1980
		49,9	ELISA	Vesco G. <i>et al.</i> , 2007
	Sardegna	28,4	IFI IgG	Masala G. <i>et al.</i> , 2003
		9,9	IFI IgM	
		19,2	IFI IgG	Tola S. <i>et al.</i> , 2002
		5,4	IFI IgM	
		51,3	ELISA	Natale A. <i>et al.</i> , 2006
		18,1 (feti)	PCR	Masala G. <i>et al.</i>, 2007
		13,1 (placenta)		
		31,52-62,56	IFI IgG	Zedda M.T. <i>et al.</i>, 2010
		23,88	IFI IgM	
		3,5 (placenta)	Nested PCR	Chessa G. <i>et al.</i>, 2014
		87 (cervello)		
	66,6 (fegato)			
	Italia Centrale	78	LAT	Gaffuri A. <i>et al.</i>, 2006
	Campania	28,5	IFI	Fusco G. <i>et al.</i>, 2007
	Toscana	33,3	IFI	Cenci-Goga B.T. <i>et al.</i>, 2013
	Lombardia	59,3	IFI	Gazzonis A.L. <i>et al.</i>, 2015
Capre	Lazio	95	MAT	De Capraris & Gravino, 1981
	Puglia e Basilicata	68,9	IFI	Puccini V. <i>et al.</i> , 1983
	Sardegna	12,3	IFI IgG	Masala G. <i>et al.</i> , 2003
		5,6	IFI IgM	
		11,7	IFI IgG	Tola S. <i>et al.</i> , 2002
		4	IFI IgM	
		13 (feto)	PCR	Masala G. <i>et al.</i>, 2007
		25 (placenta)		
Toscana	60,6	MAT	Mancianti F. <i>et al.</i>, 2013	
Lombardia	41,7	IFI	Gazzonis A.L. <i>et al.</i>, 2015	
Suini	Nord	64	IFI	Genchi G. <i>et al.</i> , 1991
	Emilia Romagna	9	LAT	Soldati G. <i>et al.</i> , 1986
	Umbria	16,7	IFI	Piergili Fioretti D. <i>et al.</i> , 2008
		14,58	IFI	Ranucci D. <i>et al.</i>, 2008
		16,5	IFI	Veronesi F. <i>et al.</i>, 2010
	Sicilia	21,3	ELISA	Vesco G. <i>et al.</i> , 2006
		20	IFI	
		16,3	ELISA	Villari S. <i>et al.</i>, 2009
	Sardegna	15,2	ELISA	Scala A. <i>et al.</i> , 2008

DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA

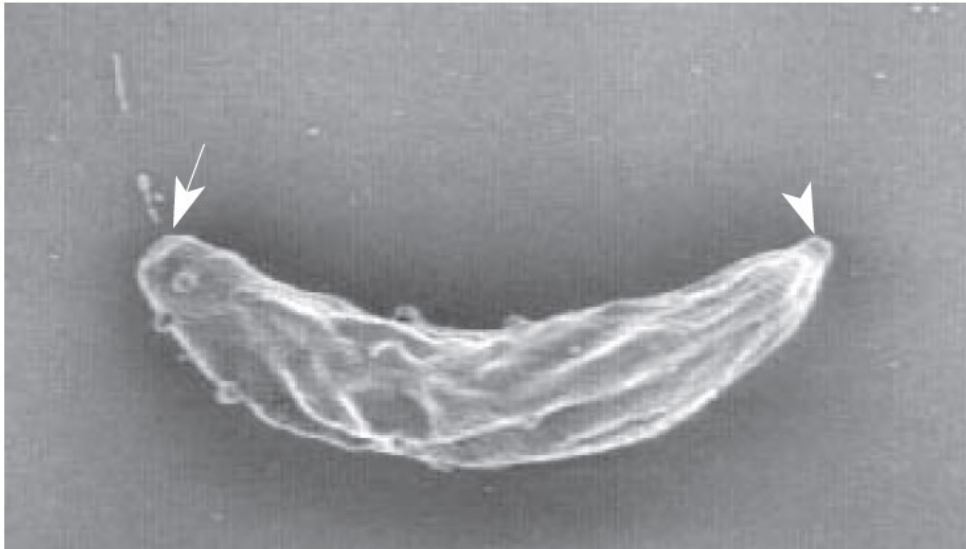


Figura 1. Immagine al microscopio elettronico di un tachizoite di *T. gondii* (Dubey J.P., 2010).

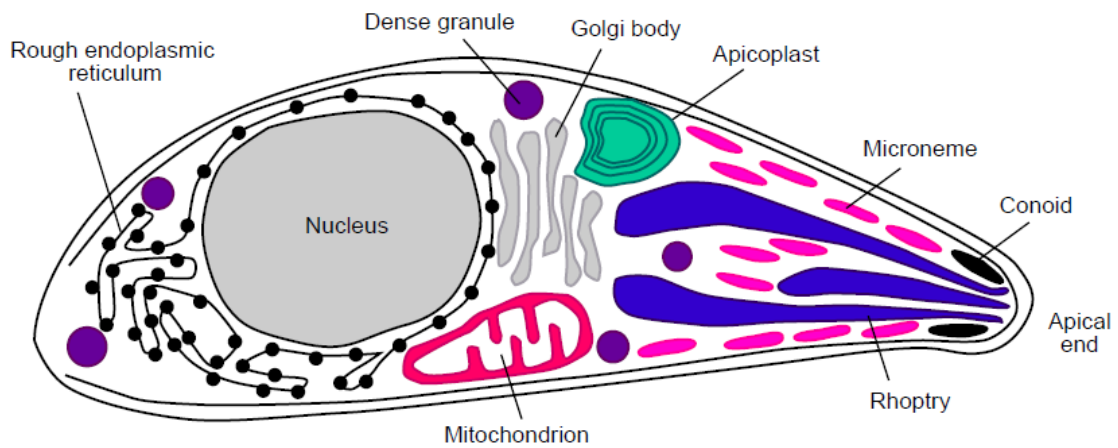


Figura 2. Ultrastruttura di un tachizoite di *T. gondii* (Ajioka J.W. et al., 2001).

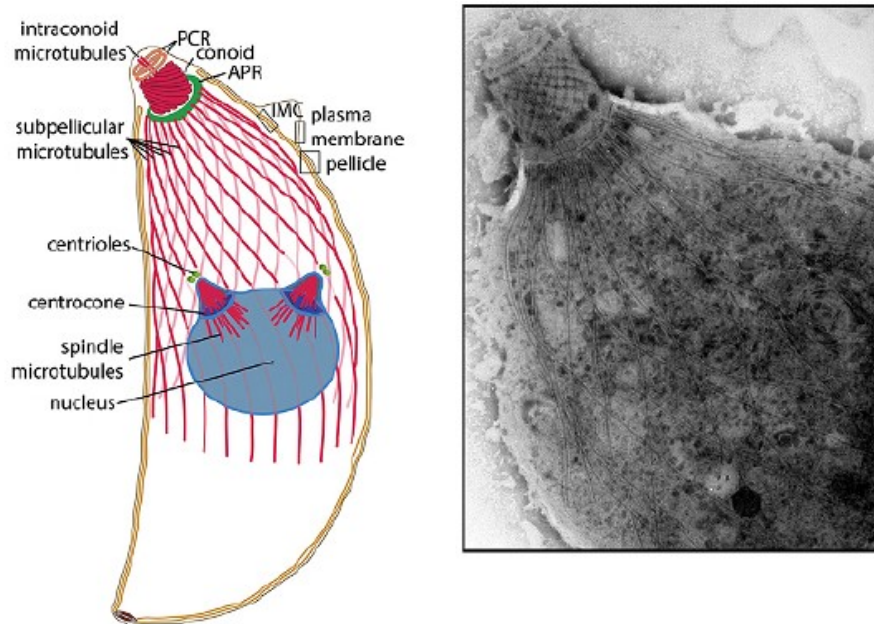


Figura 3. Complesso apicale del tachizoite di *T. gondii* (Weiss L.M. & Kim K. 2013).

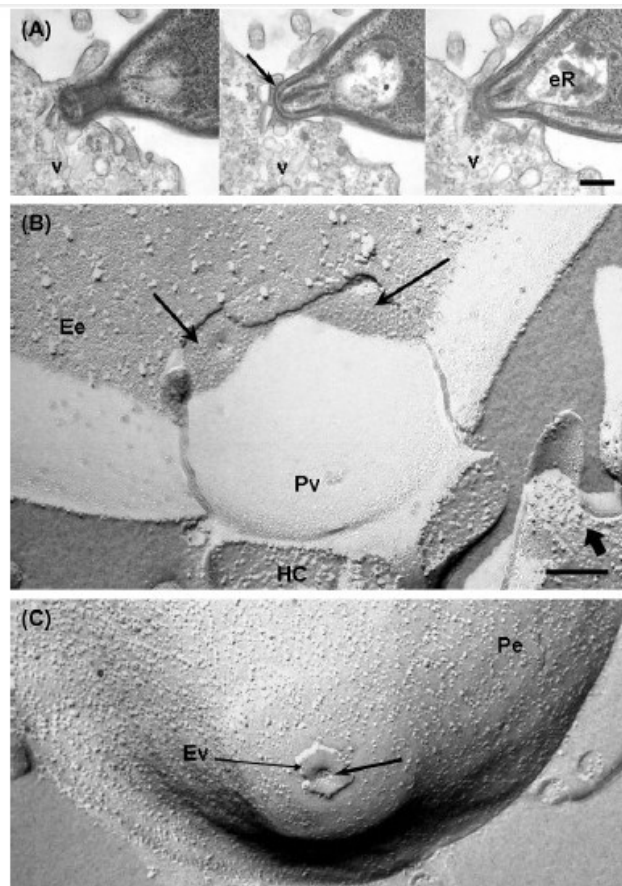


Figura 4. Tachizoite di *T. gondii* che invade la cellula ospite *in vitro* (Weiss L.M. & Kim K. 2013).

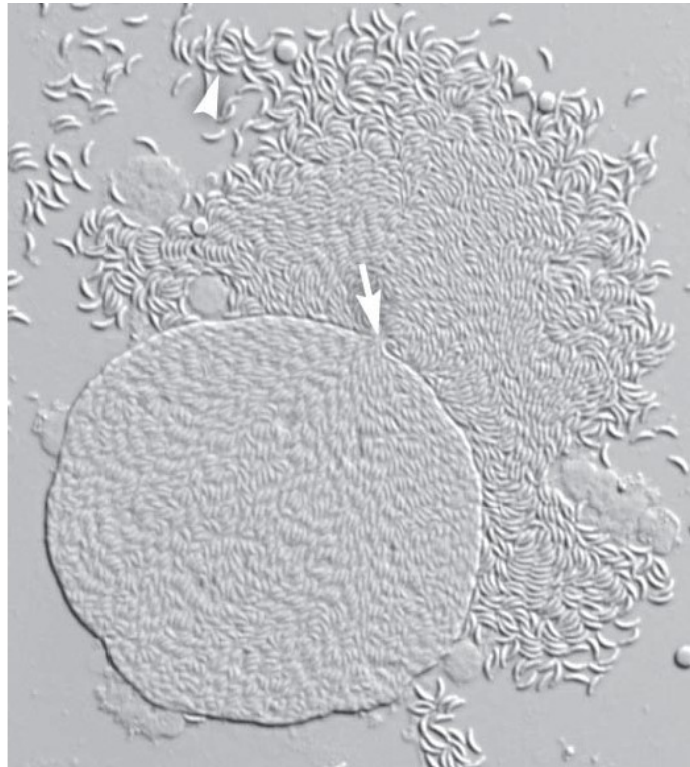


Figura 5. Cisti tissutale di *T. gondii* rotta meccanicamente che rilascia migliaia di bradizoiti attraverso il foro della parete della cisti (Dubey J.P., 2010).

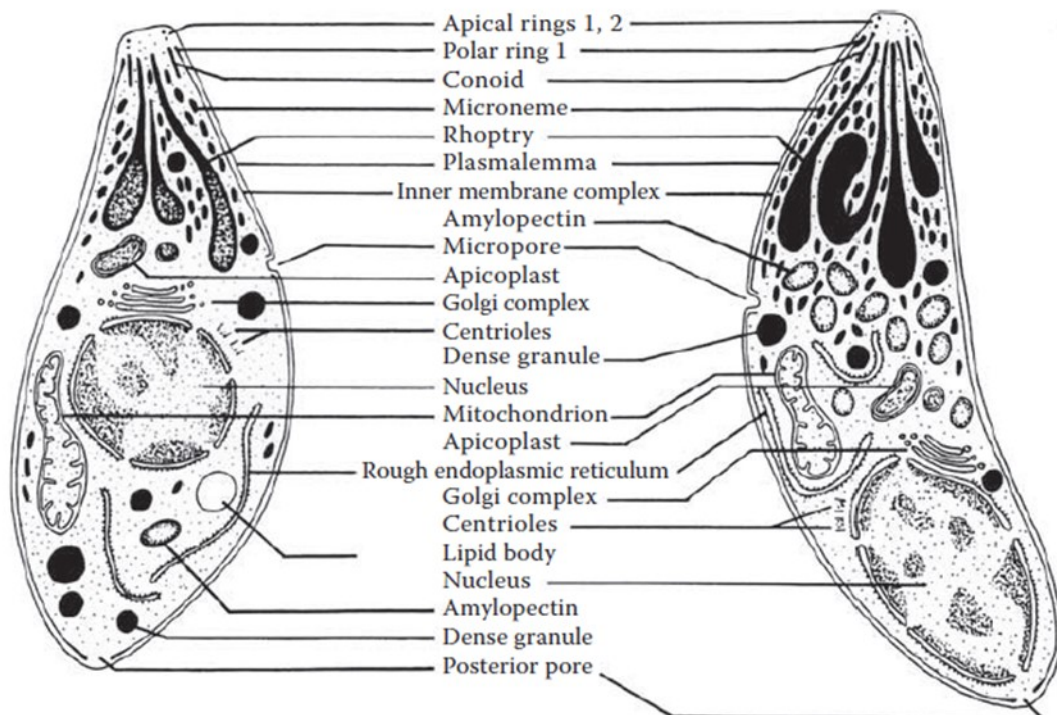


Figura 6. Disegno schematico di un tachizoite e di un bradizoite di *T. gondii* (Dubey J.P., 2010).

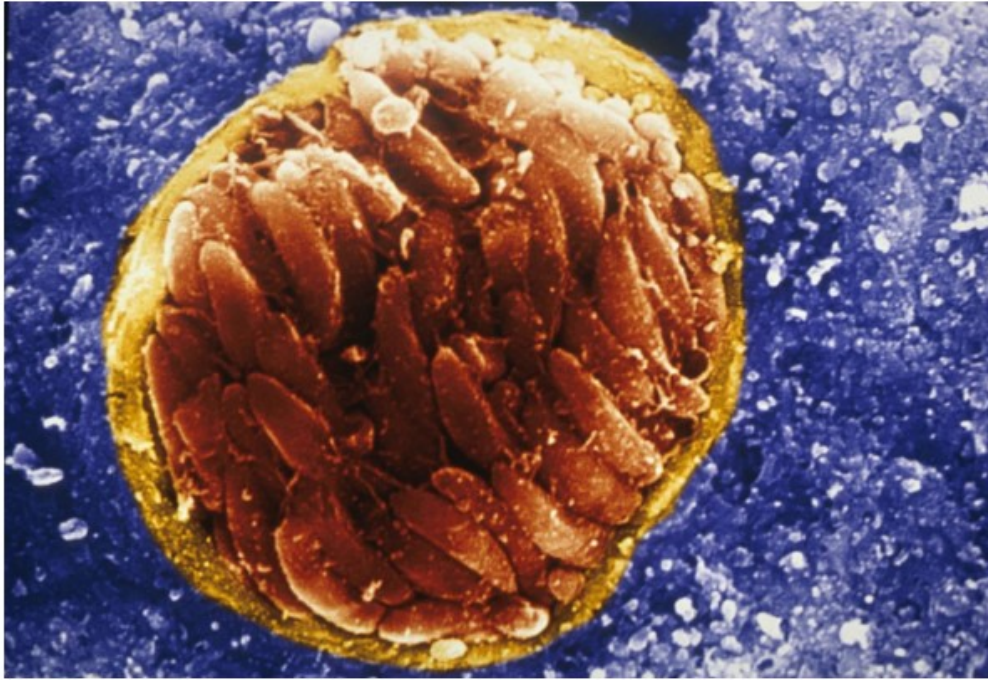


Figura 7A. Cisti tissutale di *T. gondii* contenente bradizoiti localizzata nel tessuto cerebrale di un topo infetto vista al microscopio elettronico a scansione (Ferguson D., Oxford University).

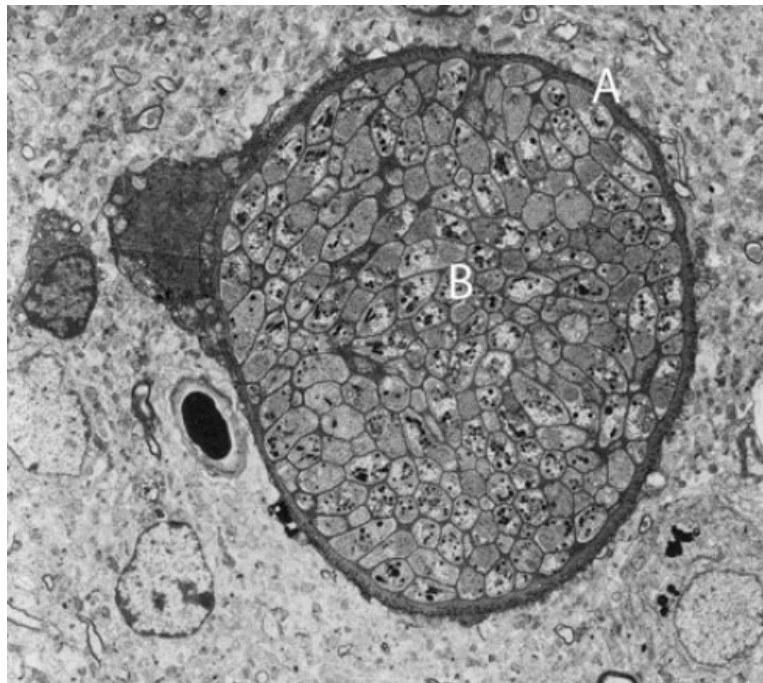


Figura 7B. Cisti tissutale di *T. gondii* in cervello di topo al Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM) (Baldelli, 1983 tratto da Cenci-Goga B.T. *et al.*, 2011).



Figura 8. Oocisti sporulata di *T. gondii* in feci di gatto.

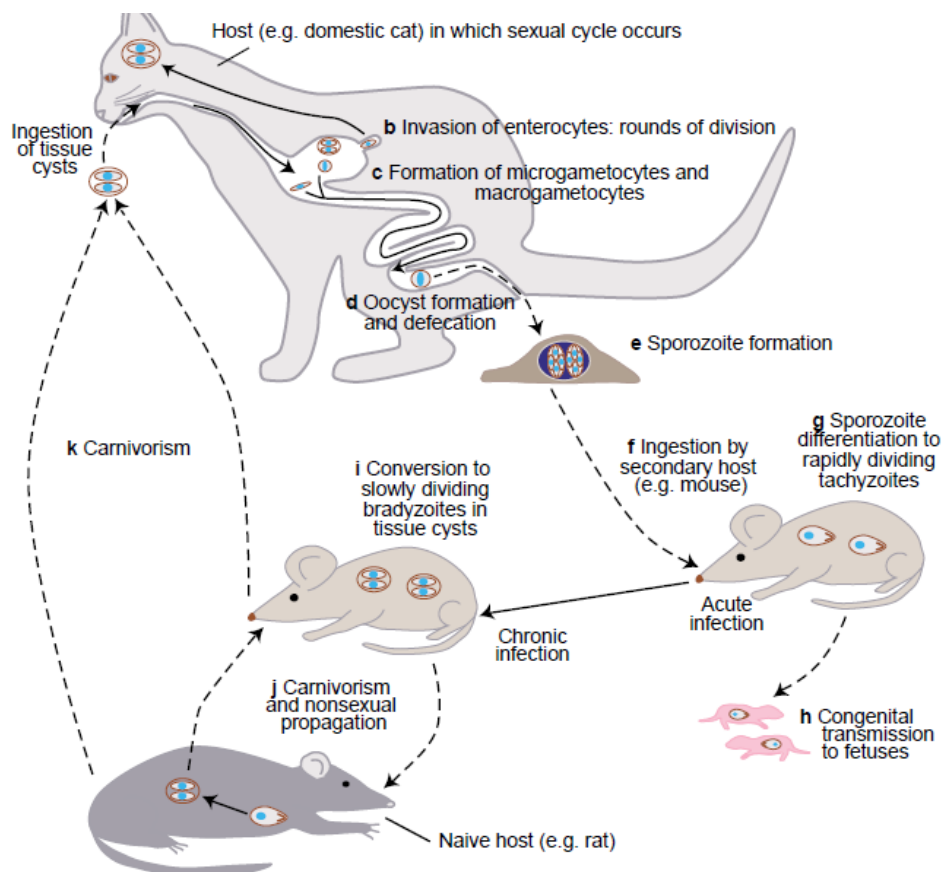


Figura 9. Ciclo biologico di *T. gondii* nel gatto (Ajioka J.W. et al., 2001).

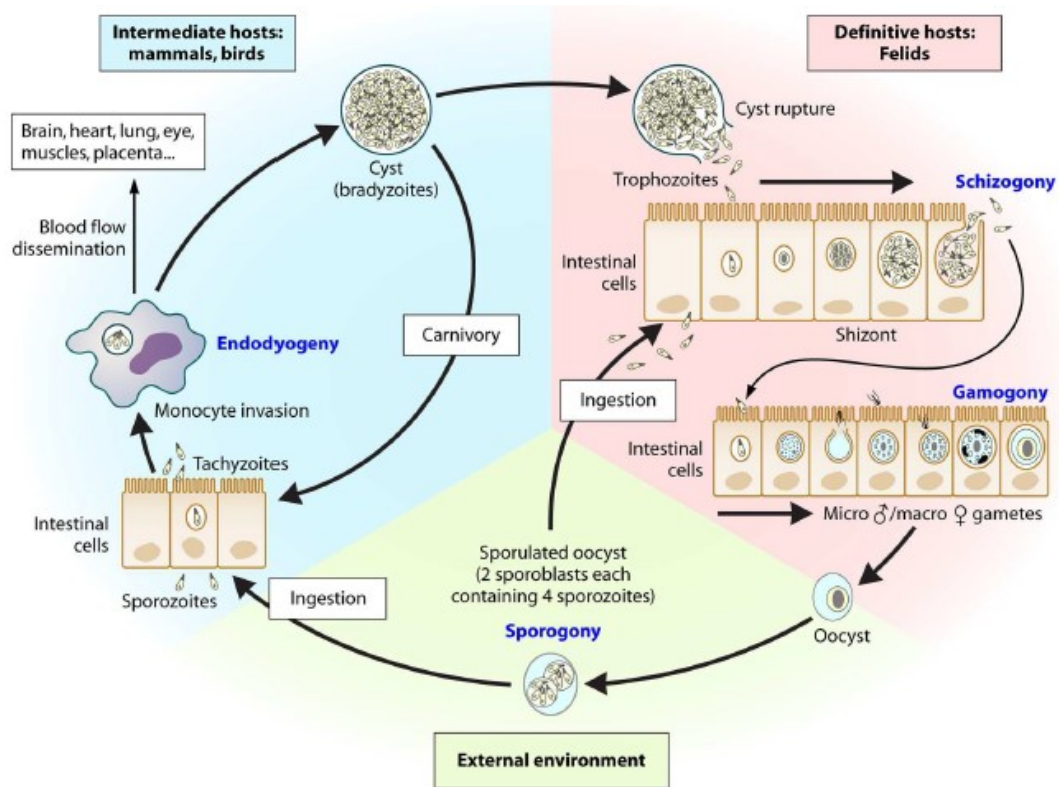


Figura 10. Ciclo biologico di *T. gondii*: intestinale (fase sessuata) e extraintestinale (fase asessuata) (Gangneux F.R. & Dardé M.L. 2012).

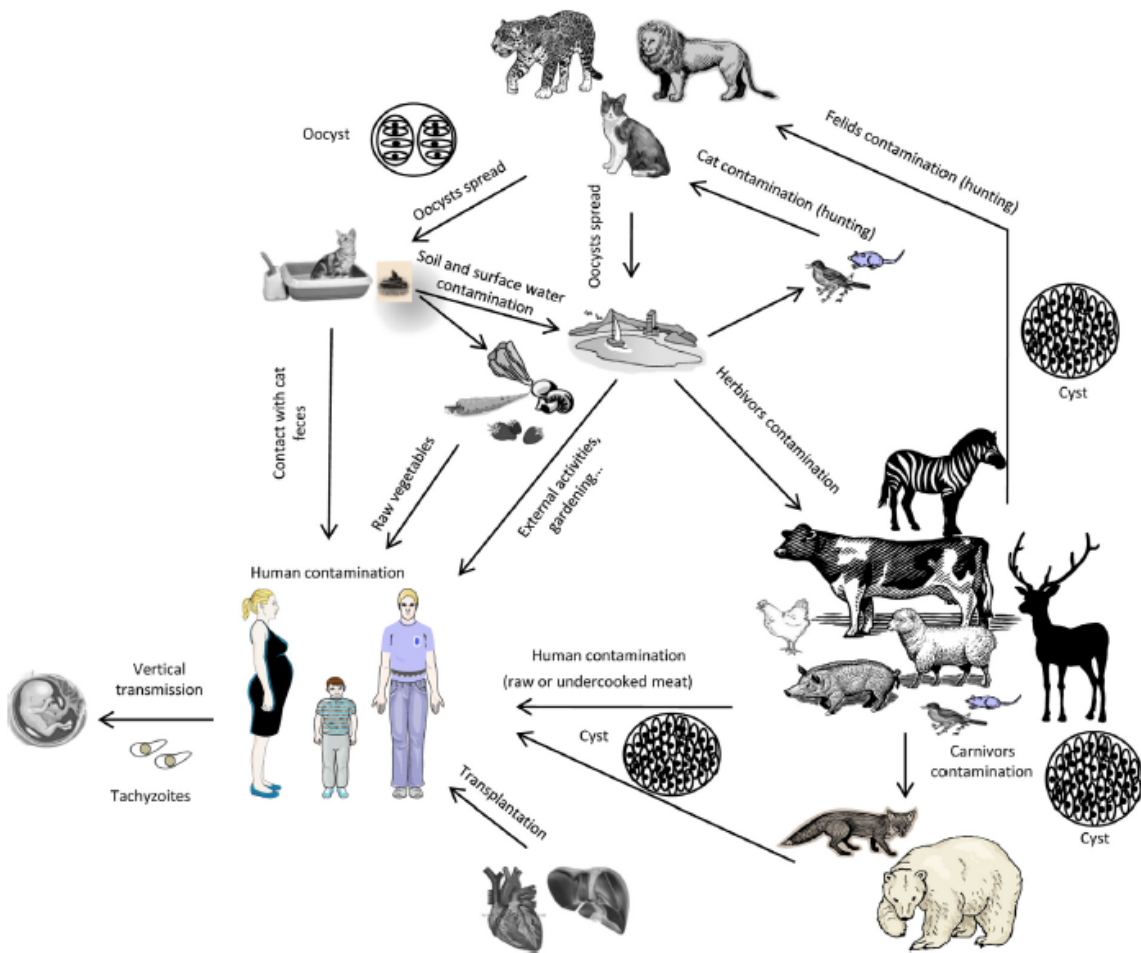


Figura 11. Modalità di trasmissione della Toxoplasmosi e rischi per l'uomo (Gangneux F.R., 2014).

LISTA DEGLI ACRONIMI

DT: *Dye Test*

ELISA: *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

IFI: Immunofluorescenza Indiretta

MAT: *Modified Agglutination Test*

WB: *Western Blot*

IHAT: *Indirect Hemoagglutination Antibodies Test*

LAT: *Latex Agglutination Test*

IgG: Immunoglobulina G

IgM: Immunoglobulina M

MLEE: *Multi-Locus Enzyme Electrophoresis*

PCR: Polymerase Chain Reaction

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RAPD: *Random Amplification of Polymorphic DNA*

HRM: *High Resolution Melting*

GRA: antigene granulare

ROP: proteine *rhoptries*

MAG: proteina di matrice

MIC: proteine micronemiche

SAG: antigeni superficiali

FcRn: *Neonatal Fc receptor*

p.s.: peso specifico

bp: *base pair*

rpm: *revolutions per minute* (rotazioni per minuto)

DO: Densità Ottica

OR: *Odds Ratio*

EFSA: *European Food Safety Authority*

ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*

CAPITOLO III

3. FASE SPERIMENTALE 1 – VALUTAZIONE DELL’EFFICACIA DELL’ELISA E PCR NEI CONFRONTI DI *TOXOPLASMA GONDII* NELL’OVINO.

3.1. BACKGROUND

Poiché una delle principali difficoltà nella diagnosi della toxoplasmosi è legata al riconoscimento delle manifestazioni cliniche che sono aspecifiche e non sufficientemente caratteristiche, è evidente quanto sia importante l’utilizzo di test diagnostici accurati e affidabili per la rilevazione, la sorveglianza e il controllo dell’infezione nell’ospite intermedio al fine di ridurre al minimo il rischio di infezione nell'uomo associato all'assunzione di carni insufficientemente cotte contenenti la forma infettante di *T. gondii*.

Finora, gli strumenti diagnostici disponibili per rilevare la toxoplasmosi negli ovini includono metodi diretti quali l’istopatologia, l’immunoistochimica, la PCR e le prove biologiche, sia metodi indiretti sierologici basati sulla rilevazione di anticorpi contro il parassita. Questi ultimi sono sicuramente i più usati nelle indagini epidemiologiche e le *performances* di quelli disponibili sul mercato sono stati oggetto di confronto e discussione (Dubey J.P., 2009). Tuttavia i metodi diagnostici utilizzati negli animali hanno dei limiti dati dalla mancanza di standardizzazione.

Per una maggiore comprensione, le metodiche diagnostiche (dirette e indirette) più conosciute sono state di seguito descritte.

TECNICHE DIRETTE

A. Metodiche diagnostiche tradizionali non basate sul DNA

Gli approcci tradizionali per la diagnosi della toxoplasmosi, basati principalmente sulle prove biologiche sono oggi considerati troppo costosi e inadeguati per l'applicazione di *routine*, in quanto richiedono tempo e spesso non portano a una diagnosi rapida e sensibile (Liu Q. *et al.*, 2015). Inoltre hanno delle limitazioni nel rilevamento e nella differenziazione dei differenti ceppi protozoari (Kotresha D. & Noordin R., 2010). Al contrario sempre più utilizzate, risultano le metodiche molecolari per la loro elevata sensibilità e specificità (Liu Q. *et al.*, 2015).

Prove biologiche (isolamento in vivo e in vitro)

L'isolamento in vivo del *T. gondii* consiste nell'inoculazione per via intraperitoneale in specie sensibili (topi *germ-free*), di emulsioni antibiotate ottenute da campioni bioptici infetti, prelevati da fluidi corporei, secrezioni, linfonodi, tessuti muscolari e cerebrali, ma anche da placenta e feti abortiti (Piergili Fioretti D. & Manfredi M.T., 2014; Dubey J.P. *et al.*, 2013). Gli animali vengono monitorati per valutare lo sviluppo della malattia e la sierconversione (Dubey J.P., 2010; Salant H. *et al.*, 2010).

L'inoculazione nei topi è ancora considerato il metodo di riferimento "*gold standard*" per la sua alta sensibilità e specificità (Homan W.L. *et al.*, 2000). Per ottenere un maggior successo nell'isolamento di *T. gondii*, si preferisce utilizzare i topi "*knockout INF-gamma*" (in cui non si esprime il gene dell'interferon gamma), a causa dell'elevata sensibilità di questi topi nei riguardi dell'infezione. Oppure in alternativa, i topi normali, possono essere sottoposti a terapie immunosoppressive mediante la somministrazione di cortisonici (desametasone 10-15 µg /ml) nell'acqua di bevanda durante il corso della prova (Liu Q. *et al.*, 2015). In caso di ceppi molto virulenti, i tachizoiti possono essere rilevati nei fluidi peritoneali 3-4 giorni dopo l'inoculazione, mentre l'individuazione delle classiche cisti terminali nel cervello dei topi mediante esame istologico richiede circa 6-8 settimane (Piergili Fioretti D. & Manfredi M.T., 2014). La mancata formazione di cisti tissutali non esclude una diagnosi positiva, pertanto nei topi infettati si valuta anche l'eventuale presenza di anticorpi specifici per *T. gondii*; se anche questa analisi è negativa, l'infezione è improbabile (OIE, 2008).

L'isolamento *in vivo* può essere effettuato anche utilizzando i gatti nel "*Cat feeding test*". Questa tecnica è più sensibile rispetto all'isolamento nei topi, in quanto consente di rilevare infezioni pauciparassitarie, poiché il gatto mangia fino a 500 gr di carne e può infettarsi con un solo bradizoita. La prova biologica consiste nell'alimentare i gatti con campioni di tessuto infetto di peso variabile ed esaminare poi le feci per valutare l'eventuale liberazione delle oocisti che avviene dai 3 a 14 giorni dall'inoculazione i.p. (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012).

L'isolamento *in vivo* poiché richiede l'uso di animali vivi (topo, gatto), non è adatto per lo *screening* di un numero elevato di campioni, oltre ad essere costoso e richiedere molto tempo, ha delle

implicazioni dal punto di vista etico (Opsteegh M. *et al.*, 2010; Gutierrez J. *et al.*, 2010; Bayarri S. *et al.*, 2012).

L'isolamento *in vitro* consiste nell'inoculazione di una sospensione di materiale biologico sospetto in colture cellulari di fibroblasti embrionali e rappresenta una valida alternativa all'isolamento *in vivo* su animali da laboratorio. Se il test risulta positivo, la presenza del parassita può essere rilevata già dopo 48-72 ore dall'inoculo con aree di lisi cellulare e il rilevamento di tachizoiti liberi. Poiché la produzione di linee cellulari avviene solo nei laboratori specializzati, questo potrebbe essere un limite (Piergili Fioretti D. & Manfredi M.T., 2014).

Esame istologico e Immunoistochimica

La diagnosi può essere effettuata mediante il ritrovamento del parassita nel tessuto dell'ospite, rimosso per biopsia o necropsia, attraverso esame istologico e immunoistochimica (Dubey J.P., 2010). Gli esami istologici vengono eseguiti su campioni biologici prelevati da organi *target* ossia linfonodi, milza, fegato, polmoni e SNC. La preparazione delle sezioni istologiche prevede l'utilizzo di tessuti fissati in formalina, processati fino ad ottenere vetrini con sezioni di tessuto dello spessore di circa 5 µm che vengono colorati con Ematossilina Eosina (EE) o Giemsa per consentire una più agevole distinzione del parassita dalle cellule dell'ospite (Liu Q. *et al.*, 2015).

In alcuni casi la diagnosi di toxoplasmosi può essere confermata mediante l'ausilio dell'immunoistochimica con l'utilizzo di anticorpi policlonali che permettono l'evidenziazione di forme parassitarie, pseudocistiche e tachizoitiche. Uno dei limiti di questo tipo di esame è dato dalla distribuzione non uniforme del parassita nei tessuti esaminati; le infezioni pauciparassitarie possono generare falsi negativi (Piergili Fioretti D., 2004; Cenci-Goga B.T. *et al.*, 2011). Inoltre questi metodi sono relativamente lunghi e richiedono una notevole abilità da parte dell'operatore che li esegue per ottenere risultati affidabili. Il microscopio elettronico è stato impiegato anche per rilevare cisti tissutali nel cervello del topo e oocisti nell'intestino tenue dei gatti infetti, ma è difficilmente applicabile come strumento di *routine* (Sims T.A. *et al.*, 1989; Hutchison W.M. *et al.*, 1979; Liu Q. *et al.*, 2015).

Esame coprologico nel gatto

Consente di rilevare la presenza di oocisti non sporulate nelle feci dei felini (ospiti definitivi) mediante tecnica di flottazione con soluzione satura di cloruro di sodio e solfato di zinco al 33% (p.s. 1200) o secondo la tecnica di Telemann che prevede la sedimentazione con acido acetico ed etere. L'importanza diagnostica di questa tecnica non è elevata perché il periodo di patenza è molto breve, circa 15 giorni (Piergili Fioretti D., 2004).

In genere i gatti che eliminano attivamente oocisti sono ancora sieronegativi per *T. gondii*, poiché la sierconversione avviene dopo che hanno terminato il rilascio delle oocisti, mentre quelli sieropositivi hanno già terminato il periodo di disseminazione delle oocisti ed è improbabile che lo ripetano (Elmore S.A. *et al.*, 2010; Lappin M.R., 2010). La maggior parte dei gatti infetti libererà oocisti solo in un unico momento della loro vita, in genere per un periodo di una o due settimane, ed è stato stimato che solo l'1% dei gatti eliminano le oocisti. Un'indagine condotta su gatti, in Germania e in altri Paesi europei, ha recentemente riferito il rilevamento di oocisti di *T. gondii* in soli 26 campioni fecali su 24. 106 (0,11%) complessivamente analizzati (Elmore S.A. *et al.*, 2010).

A complicare il rilevamento nelle feci è il fatto che è necessario effettuare una diagnosi differenziale con le oocisti di *Isospora* (*I. felis*, *I. rivolta*), *Sarcocystis* (*S. bovifelis*, *S. ovifelis*), *Hammondia* (*H. hammondi*) che sono morfologicamente simili a quelle di *T. gondii* (Piergili Fioretti D., 2004). È necessario l'impiego di tecniche molecolari e di laboratorio per consentire la distinzione tra i vari organismi e l'inoculazione nel topo è l'unico metodo di conferma definitiva (Elmore S.A. *et al.*, 2010).

B. Tecniche biomolecolari basate sul rilevamento degli acidi nucleici parassitari

Le tecniche biomolecolari, attualmente più utilizzate, basate sull'amplificazione di tratti di DNA caratteristici del patogeno, sono: la *Polymerase Chain Reaction* (PCR), la *Nested PCR* e la *PCR RealTime*. Poiché la diagnosi di certezza necessita sempre della messa in evidenza del parassita, le prove biomolecolari vanno sempre integrate dalle prove *in vitro* o dagli esami istopatologici (Piergili Fioretti D. & Manfredi M.T., 2014).

L'analisi molecolare del genoma parassitario tramite PCR mostra una specificità quasi del 100%, ma la difficoltà di estrarre il DNA e concentrare grandi quantità di campioni provoca una sensibilità limitata (Alfonso Y. *et al.*, 2009). Le principali regioni *target* del genoma patogeno, oggetto dell'amplificazione, maggiormente utilizzate sono i geni B1, SAG1 (P30), 18S rDNA e la sequenza 529 bp (Liu Q. *et al.*, 2015). Per migliorare il limite di rilevazione, il gene B1 e 18S rDNA vengono spesso amplificati mediante la *Nested PCR* (Homan W.L. *et al.*, 2000). La PCR delle regioni *target* B1 e 18S rDNA è stata ampiamente utilizzata con successo per la diagnosi di aborto nella toxoplasmosi ovina e caprina eseguita su tessuti di feti abortiti e placenta identificati come principali organi bersaglio di *T. gondii* (Hurtado A. *et al.*, 2001; Masala G. *et al.*, 2007; Pereira-Bueno J. *et al.*, 2004; Ahmed Y.F. *et al.*, 2008; De Moraes E.P.B.X. *et al.*, 2011; Moreno B. *et al.*, 2012).

Sebbene la PCR sia di solito sensibile nel rilevare il DNA di *T. gondii*, quando utilizzata su campioni di carne, presenta una sensibilità inferiore rispetto all'isolamento *in vivo* su topo e gatto (Da Silva A.V. & Langoni H., 2001; García J.L. *et al.*, 2006). La mancanza di sensibilità della PCR è dovuta alla distribuzione disomogenea delle cisti tissutali, in combinazione con la dimensione ridotta del campione utilizzato; solitamente per la PCR si utilizzano 50 mg di campione, mentre per l'isolamento *in vivo* se ne utilizzano 50-500 gr aumentando la probabilità di isolare il DNA di *T. gondii* (Bayarri S. *et al.*, 2012; Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012).

Per rilevare e quantificare *T. gondii* in campioni di tessuti animali attraverso una PCR *RealTime* è stato sviluppato un metodo altamente sensibile e specifico denominato *Toxo Taq Man* (Jauregui L.H. *et al.*, 2001). Questa metodica utilizza *primers* disegnati sulla regione ITS-1 e una sonda fluorogenica ed è capace di rilevare anche quantitativi di DNA genomico pari a 0,1 pg, equivalenti ad un bradizoita. In futuro potrebbe essere automatizzata per un potenziale uso nei mattatoi, sulle carcasse suine e prodotti derivati (Pièrgili Fioretti D., 2004).

Il gruppo di lavoro di Gutierrez J. *et al.* (2010) ha utilizzato una PCR *RealTime* quantitativa, basata sulla sequenza 529 bp, per rilevare il DNA di *T. gondii* nei feti abortiti e nella placenta proveniente da pecore infettate sperimentalmente (Liu Q. *et al.*, 2015).

Mentre più recentemente, Opsteegh M. *et al.* (2010) hanno descritto un metodo di cattura magnetica per l'isolamento di specifiche sequenze del DNA di *T. gondii*, utilizzabile anche con grandi campioni di tessuto, in grado di superare il limite dato dalla distribuzione eterogenea delle cisti di *T.*

gondii e la piccola dimensione del campione. Questa tecnica combinata con la PCR *RealTime* può essere usata su campioni di carne e fornire un'alternativa alle prove biologiche per valutare la gravità dell'infezione nei tessuti di animali allevati per la produzione di alimenti (Juránková, J. *et al.*, 2013; 2014; 2015).

Genotipizzazione

Per gli studi epidemiologici è importante individuare i genotipi responsabili della toxoplasmosi, a tal scopo sono state sviluppate alcune tecnologie molecolari, tra cui *Microsatellite Analysis*, *Multilocus Sequence Typing*, PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD-PCR (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), e HRM (*High Resolution Melting*) (Liu Q. *et al.*, 2015).

La genotipizzazione tramite PCR-RFLP consente di distinguere tra gli aplotipi identificati di *T. gondii*. La metodica messa a punto, prevede l'utilizzo di nove *markers* altamente specifici in grado di agire sul DNA amplificato con PCR e riconoscere i siti di restrizione in base allo specifico genotipo. Poiché i laboratori utilizzano *markers* diversi per la ricerca del genotipo, è difficile confrontare i risultati. Oggi con questo set di *markers* è possibile eseguire un test estremamente affidabile e facile da usare, in modo da facilitare gli studi epidemiologici (Su C. *et al.*, 2006).

TECNICHE INDIRECTE

La diagnosi di toxoplasmosi può essere effettuata mediante rivelazione sierologica di due classi anticorpali anti-*Toxoplasma*: le IgM e le IgG. Le IgM anti-*Toxoplasma*, sono presenti nella fase acuta della malattia ed indicano un contagio recente. Si ha infatti una loro positivizzazione dopo circa 15-20 giorni dal contagio con una elevazione massima del titolo dopo 1-2 mesi, successivamente il livello delle IgM tende a decrementare per poi negativizzarsi dopo molti mesi o anche dopo più di un anno. Le IgG anti-*Toxoplasma*, riferiscono invece di una infezione pregressa, ma non forniscono alcuna informazione sul *timing* di quest'ultima (Liu Q. *et al.*, 2015). Differenti tecniche basate sull'esame sierologico sono state messe a punto per il rilevamento della toxoplasmosi negli animali da allevamento (Ortega-Mora L.M. *et al.*, 2007). Secondo uno studio

condotto da Kijlstra A. *et al.*, 2004 i risultati dei test sierologici sono solo indicativi dell'infezione dell'animale, ma non danno nessuna informazione riguardo la presenza di cisti tissutali.

I test sierologici più conosciuti utilizzati per la rilevazione di anticorpi IgG e IgM per *T. gondii* sono: il *Sabin-Feldman Dye Test* (DT), l'*Emoagglutinazione Indiretta* (IHA), l'*Immunofluorescenza Indiretta* (IFI), il *Test di Agglutinazione Modificato* (MAT), *Test di Agglutinazione su Lattice* (LAT), le *Tecniche Immunoenzimatiche* (ELISA), il *Western Blot* (WB) e l'*IgG Avidity* ELISA (Dubey J.P., 2010). Solo alcuni di questi test sono in genere altamente sensibili e trovano largo impiego in campo diagnostico in tutto il mondo (Liu Q. *et al.*, 2015; Glor S.B. *et al.*, 2013).

Il ***Sabin-Feldman Dye Test*** (DT) e l'***Immunofluorescenza Indiretta*** (*Indirect Immunofluorescence Test*), poiché utilizzano come antigene il parassita intero, sono i test più precoci e specifici e, per questa ragione, sono considerati dall'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) le metodiche sierologiche di riferimento per *T. gondii*. Il DT è stato sviluppato da Sabin e Feldman nel 1948, ed è stato considerato come metodo "*gold standard*" per la diagnosi della toxoplasmosi nell'uomo (Sabin A.B. & Feldman H.A., 1948; Reiter-Owona I. *et al.*, 1999). È altamente specifico e sensibile, ma richiede tempo ed esperienza tecnica e può essere pericoloso a causa dell'utilizzo di tachizoiti vivi virulenti, per questi motivi è poco utilizzato ai fini diagnostici negli animali. L'IFI utilizza invece tachizoiti non vitali ed è relativamente poco costosa. Tuttavia, poiché si basa sulla rilevazione della fluorescenza indiretta scaturita dal complesso antigene-anticorpo, la lettura dei risultati è soggettiva e si presta a differenti interpretazioni da parte dell'operatore (EFSA, 2007; Cenci-Goga B.T. *et al.*, 2011). Esiste anche un test di IFI modificato per la rivelazione di IgM.

Il ***Test di Agglutinazione Modificato*** (*Modified Agglutination Test*, MAT) è stato utilizzato estensivamente per la diagnosi della toxoplasmosi negli animali domestici e selvatici e i suoi risultati concordano con quelli del DT. La sensibilità e la specificità del MAT sono stati validati mediante la comparazione di dati sierologici e l'isolamento del parassita in maiali infettati naturalmente e sperimentalmente (Dubey J.P., 2010). In questo test i tachizoiti fissati con formalina vengono fatti aderire alle pareti dei pozzetti di piastre per microtitolazione; dopo l'aggiunta del siero da testare, la valutazione dello strato di precipitazione che si viene a formare permette di stabilire l'eventuale presenza di anticorpi contro *T. gondii* nel siero. Il MAT rileva con accuratezza principalmente gli anticorpi IgG, è una tecnica facile da eseguire e, poiché non è particolarmente costosa, viene adottata nella diagnosi di laboratorio di *routine* o durante gli studi epidemiologici (Liu Q. *et al.*,

2015). In particolare, MAT è stato utilizzato per il rilevamento di anticorpi specifici nei fluidi cardiaci di pecore macellate destinate al consumo umano, con una maggiore sensibilità rispetto ad altri test sierologici (Villena I. *et al.*, 2012).

Il **Test Emoagglutinazione Indiretta** (*Indirect Haemagglutination Assays*, IHA) è semplice, ma diverse variabili tecniche ne rendono il suo utilizzo impraticabile. Si tratta di una agglutinazione di globuli rossi, sensibilizzati con antigeni solubili di *T. gondii*, che avviene in presenza di anticorpi specifici eventualmente presenti nel siero in esame (Dubey J.P., 2010). Il rilevamento degli anticorpi avviene più tardivamente rispetto al DT per cui poco adatto nella diagnosi di infezioni acute e congenite (Liu Q. *et al.*, 2015). Il test IgG-IHA è semplice e rapido, quindi raccomandato per lo *screening* di massa in indagini epidemiologiche. Un altro svantaggio è rappresentato dalla variabilità dei risultati e dalla scarsa standardizzazione della metodica.

Tecniche Immunoenzimatiche per le IgG e le IgM (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays*, ELISA) Le tecniche immunoenzimatiche più conosciute e utilizzate sono l'ELISA indiretta e l'ELISA a *sandwich* che mediante una reazione enzimatica-colorimetrica mettono in evidenza la presenza nel siero testato di anticorpi o antigeni del *T. gondii*.

Tra le metodiche che utilizzano antigeni endocitoplasmatici solo l'ELISA dimostra caratteristiche paragonabili all'IFI, anche se la minore sensibilità, ne consiglia l'uso per indagini epidemiologiche e non per una diagnosi clinica (Piergili Fioretti D. & Manfredi M.T., 2014).

Questo tipo di test sono quasi tutti usati per il rilevamento degli anticorpi anti- *T. gondii* IgG, IgM e IgA anziché degli antigeni, a seconda del tipo di anticorpo legato all'enzima. Gli ELISA indiretti convenzionali che utilizzano l'antigene lisato del tachizoite (TLA) come antigene di rivestimento, rilevano gli anticorpi IgG o IgM negli esseri umani e negli animali e mostrano un elevato grado di accordo con il DT, MAT o IFI (Liu Q. *et al.*, 2015). Nonostante i risultati soddisfacenti, l'ELISA che utilizza l'antigene lisato del tachizoite può variare in modo significativo tra i laboratori o tra i diversi lotti, quindi è difficilmente standardizzabile e i risultati dei test sono difficili da comparare. Un approccio alternativo consiste nell'utilizzare proteine ricombinanti, con il vantaggio di usare uno specifico antigene che permetta una semplice standardizzazione (Liu Q. *et al.*, 2015). Negli ultimi 20 anni, numerosi antigeni ricombinanti, inclusi gli antigeni granulari GRA1, GRA2, GRA4, GRA6, GRA7 e GRA8, le proteine *rhoptries* ROP1 e ROP2, la proteina di matrice MAG1, le proteine micronemiche

MIC2, MIC3, MIC4 e MIC5 e gli antigeni superficiali SAG1 e SAG2, sono stati espressi in *Escherichia coli* o nel lievito e il loro potenziale valore diagnostico è stato valutato mediante l'ELISA per individuare gli anticorpi IgG e IgM specifici (Kotresha D. & Noordin R., 2010; Lau Y.L. *et al.*, 2012; Wang Z. *et al.*, 2014). Tuttavia le combinazioni di antigeni ricombinanti si sono mostrate più sensibili e specifiche rispetto all'uso di singoli antigeni. Combinazioni di SAG2A, GRA2, GRA4, ROP2, GRA8 e GRA7 sono potenzialmente utili per rilevare gli anticorpi IgG negli esseri umani con infezione recentemente acquisita (Li S. *et al.*, 2000), ROP1, SAG1, GRA7, GRA8 e GRA6 permettono di rilevare anticorpi IgM specifici (Aubert D. *et al.*, 2000), mentre GRA7 e GRA8 sono usati per rilevare anticorpi IgA specifici (Kotresha D. & Noordin R., 2010; Pfrepper K.I. *et al.*, 2005).

Interessanti studi condotti da Hill D.E. *et al.* (2011) hanno portato all'identificazione di una proteina legata all'embriogenesi, sporozoite-specifica (ERP), che essendo in grado di reagire con specifici anticorpi indotti dalle oocisti potrebbe servire a differenziare l'infezione indotta da queste ultime, dall'infezione indotta dalle cisti tissutali (Liu Q. *et al.*, 2015).

I test ELISA permettono di testare in breve tempo un gran numero di campioni, per cui sono adatti allo *screening* di *routine* in allevamento o al macello. Esistono numerose pubblicazioni su test ELISA (Dubey J.P., 2010). Diversi sono i kit ELISA commercialmente disponibili per l'individuazione di anticorpi anti- *T. gondii* (sia IgG che IgM) nelle diverse specie di animali domestici (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012).

Questi test sierologici indiretti sono stati ampiamente utilizzati in studi epidemiologici su pecore e capre vive per la rilevazione di anticorpi diretti verso *T. gondii*, in quanto la sieropositività è stata correlata con la presenza di cisti tissutali negli animali non vaccinati (Buxton D., 1998; Dubey J.P., 2009; Opsteegh M. *et al.*, 2010). In alternativa al prelievo venoso, il sangue può essere più agevolmente raccolto durante la iugulazione al macello, inoltre questi test sono stati adattati anche per l'analisi su succo di carne, al fine di valutare il rischio di *Toxoplasma* nelle carni. L'analisi del succo di carne è meno sensibile, ma è il solo mezzo per rilevare anticorpi anti- *Toxoplasma* quando i sieri non sono disponibili (Gangneux F.R. & Dardé M.L., 2012; Glor S.B. *et al.*, 2013).

Nonostante i test sierologici siano tra le tecniche diagnostiche maggiormente utilizzate per la diagnosi della toxoplasmosi, presentano una serie di limiti. Per esempio, sono incapaci di rilevare IgG o IgM specifiche durante la fase attiva dell'infezione, perché questi anticorpi vengono prodotti

dopo alcune settimane di parassitemia. Nei soggetti immunocompromessi questo test non è attendibile poiché, anche in caso di infezione, non si rileva nessuna reazione anticorpale (Lin M. *et al.*, 2000).

Il **Western blotting (WB)** può essere utilizzato da ausilio alle prove sierologiche convenzionali descritte in precedenza. In questo test, i sieri vengono fatti reagire con l'antigene di *T. gondii* su una membrana trasferita da un gel di poliacrilammide e le bande risultanti vengono confrontate con quelle di uno *standard* a peso molecolare noto (Liu Q. *et al.*, 2015). Il test di *Immunoblot* ha mostrato una specificità del 100% e una sensibilità del 98,5% per rilevare specifici anticorpi IgG nella saliva umana, ma ha mostrato una specificità inferiore, dell'83%, per la corioretinite toxoplasmica (Stroehle A. *et al.*, 2005; Villard O. *et al.*, 2003). Il WB è un utile strumento complementare per la diagnosi post-natale precoce della toxoplasmosi congenita, come la combinazione di IgA e IgM-ELISA, IgG e IgM-WB, oppure la combinazione di entrambe le tecniche, che mostrano una sensibilità rispettivamente del 94%, 94% e 100% durante i primi 3 mesi di vita (Gangneux F.R. *et al.*, 1999).

IgG Avidity ELISA è un test sierologico di recente introduzione, messo a punto e validato sul modello di quello usato in medicina umana. Si è rivelato altamente sensibile nel discriminare tra infezione acuta e cronica utile ai fini della diagnosi nell'aborto da *Toxoplasma* degli ovi-caprini (Clementino M.M. *et al.*, 2007, Piergili Fioretti D. & Manfredi M.T., 2014). Il principio di reazione si basa sul fatto che le IgG prodotte nella fase acuta presentano una bassa forza di legame con l'antigene (bassa avidità), mentre presentano un'elevata avidità nella fase cronica (Piergili Fioretti D. & Manfredi M.T., 2014).

3.2. OBIETTIVO

Scopo del presente lavoro è stato valutare e confrontare le *performances* di diverse tecniche diagnostiche (sierologiche e biomolecolari) su un campione di ovini di razza Sarda regolarmente macellati per mettere a punto un protocollo diagnostico che potesse in futuro servire per uno studio epidemiologico più esteso. La conoscenza della diffusione della toxoplasmosi degli ovini allevati in Sardegna, potrebbe infatti fornire una stima sul rischio sanitario derivante dal consumo di carni, crude o poco cotte da essi ottenuti.

3.3. MATERIALI E METODI

La sperimentazione è stata condotta tra i mesi di Gennaio e Giugno 2014 su un campione randomizzato di 112 ovini adulti, che da un'analisi retrospettiva sono risultati appartenere a 14 allevamenti distribuiti in otto diversi Comuni della Sardegna (Fonni, Oschiri, Ozieri, Padria, Samassi, Semestene, Serramanna e Villamassargia). Gli animali sono stati regolarmente macellati presso due mattatoi dell'isola siti rispettivamente nella provincia di Cagliari (Mattatoio Comunale di Carbonia) e di Sassari (Cooperativa 27 Febbraio di Samassi). Durante le operazioni di campionamento, che con la collaborazione dei Veterinari Ispettori delle Aziende Sanitarie Locali (ASL), si sono svolte in catena di macellazione presso i mattatoi sopra citati, è stato possibile reperire il sangue e gli organi necessari per lo svolgimento delle successive indagini in laboratorio. In particolare, per ogni singolo capo, all'atto della iugulazione è stato raccolto in provette sterili prive di anticoagulante (tappo rosso) un campione di sangue. Mentre il prelievo del tronco encefalico è stato effettuato subito dopo la separazione della testa dell'animale dalla carcassa e infine durante le procedure di eviscerazione, con l'aiuto degli operatori, dalla corata sono stati separati miocardio e muscolo diaframmatico.

Tutti i campioni sono stati confezionati singolarmente in sacchetti di plastica precedentemente contrassegnati, e trasportati in adeguate condizioni di refrigerazione (4 °C), al laboratorio di Parassitologia dell'Ospedale Didattico Veterinario del Dipartimento di Medicina Veterinaria di Sassari. Per una maggiore accuratezza, su un'apposita scheda sono stati registrati tutti i codici identificativi di ciascun animale e delle aziende in modo da poter risalire con precisione alla provenienza dei campioni.

Il protocollo da noi studiato prevedeva lo svolgimento di un'indagine, sierologica e biomolecolare condotte in parallelo, mediante l'utilizzo di due differenti tecniche diagnostiche: ELISA e PCR. L'ELISA è stata eseguita su differenti matrici, ovvero siero e succo di carne, ottenuti dal tessuto muscolare cardiaco e diaframmatico degli ovini campionati. Mentre per l'indagine biomolecolare è stata realizzata una *Nested* PCR, sui campioni di DNA provenienti dal tronco encefalico e dal miocardio degli stessi animali, seguendo il protocollo descritto da Halová D. *et al.* (2013).

3.3.1. Indagine sierologica

In laboratorio, il siero è stato ottenuto per centrifugazione delle provette di sangue a 2000 rpm per 10 minuti (*Centrifuge 5804 R, Eppendorf*) e successiva separazione dalla parte corpuscolata. Il siero è stato opportunamente aliquotato in provette *Eppendorf* da 1,5 ml, congelato e stoccato a -20 °C fino all'esecuzione delle analisi.

Nel frattempo il tessuto muscolare cardiaco e diaframmatico sono stati congelati singolarmente in sacchetti di plastica, a -20 °C e scongelati *overnight* a temperatura ambiente per l'ottenimento del "succo di carne" secondo la tecnica descritta da Glor S.B. *et al.* (2013). Il "succo di carne" costituito dal liquido plasmatico rilasciato dalla carne durante il processo di scongelamento è stato aliquotato in provette *Eppendorf* da 1,5 ml e stoccato a -20 °C sino all'esecuzione delle analisi mediante test ELISA.

ELISA

Tutti i campioni raccolti sono stati testati tramite reazione ELISA indiretta. Per l'analisi è stato utilizzato un kit commerciale *PrioCHECK® Toxoplasma Ab SR (Prionics, Schlieren-Zurich, Switzerland)* per la ricerca di anticorpi di classe IgG specifici nei confronti di *T. gondii*.

Il siero ed il succo di carne sono stati testati con differenti diluizioni, rispettivamente con una diluizione finale di 1:100 il siero e di 1:10 il succo di carne. Ciascuna piastra fornita dal kit era composta da 96 pozzetti, sulle cui pareti vi era adsorbito l'antigene, derivato da lisati di tachizoiti di *T. gondii*. Secondo il nostro protocollo in ogni pozzetto sono stati dispensati 90 µl di diluente, a cui sono stati aggiunti 10 µl di *standard* (controllo positivo, controllo debolmente positivo e controllo negativo) nei primi sei pozzetti (C1-C6), mentre nei restanti pozzetti sono stati addizionati 10 µl dei campioni di siero/succo di carne in esame. Dopo un periodo di incubazione di circa 1 ora a temperatura ambiente (22 ± 3 °C), l'eccesso di siero veniva allontanato tramite lavaggi. A questo punto venivano aggiunti 100 µl di coniugato costituito da un anticorpo secondario anti-ovino marcato con perossidasi in grado di legarsi al complesso antigene-anticorpo, eventualmente formatosi ed adeso in fase solida, la cui presenza, dopo opportuna incubazione (1 ora), veniva rivelata mediante l'aggiunta di 100 µl di substrato cromogenico (tetrametil benzidina, TMB). Una

volta stabilizzata la reazione con l'aggiunta di una soluzione di arresto, entro 15 minuti veniva fatta la lettura allo spettrofotometro.

La densità ottica (DO) è stata misurata a 450 nm (filtro di riferimento 620 nm). I risultati sono stati interpretati calcolando, per ciascun campione, una Percentuale di Positività (PP) relativa al valore della DO del controllo positivo [PP campione = (DO 450 nm campione/DO 450 nm controllo positivo) x 100]. Un valore PP \geq 20 è stato considerato positivo (come suggerito dal produttore), mentre i valori PP < 20 sono stati considerati negativi.

3.3.2. Indagine biomolecolare

Estrazione del DNA

Per l'indagine biomolecolare sono state preparate delle aliquote costituite da 50 gr di tessuto omogenato ottenute rispettivamente da encefalo e miocardio. Da ciascun aliquota sono stati successivamente prelevati 0,05 gr di campione che sono stati raccolti in provette *Eppendorf* da 1,5 ml e congelati a -20 °C fino alla successiva fase di estrazione del DNA.

Per l'estrazione è stato utilizzato il kit commerciale, *Pure Link Genomic Dna Mini Kit (Invitrogen)*. Ogni aliquota, precedentemente preparata, è stata sottoposta ad una prima fase di lisi con un *buffer* e Proteinasi K a 55 °C per circa 1 ora in modo da avere una completa disgregazione del tessuto. Successivamente è stato aggiunto il *Binding buffer* lasciato a incubare a temperatura ambiente per favorire il legame con il DNA. In seguito è stato aggiunto isopropanolo e il DNA è stato fissato su colonnine dotate di un filtro di natura silicica. A questo punto, sono stati effettuati una serie di lavaggi con un *buffer* apposito per eliminare le impurità e ottenere un DNA pulito. Il DNA estratto è stato stoccato a -80 °C.

Le provette contenenti i diversi campioni di DNA sono state contrassegnate con numeri progressivi, ed i riferimenti riportati sia sul diario di laboratorio, che su un foglio di lavoro elettronico di *Excel*, per l'archiviazione dei dati in un apposito database.

Nested PCR

Sui campioni di DNA estratti si è proceduto alla rilevazione di *T. gondii* mediante una *Nested PCR* il cui target è un frammento di 302 paia di basi (bp) della regione *Internal Transcribed Spacers-1* (ITS1) dell'rRNA 18S-5,8S secondo il metodo descritto da Halová D. *et al.* (2013). Ciascuna reazione di PCR è stata condotta in un volume finale di 25 µl contenente PCR *buffer* (1X), MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM di ognuno), *primer FOR* (0,2 µM), *primer REV* (0,2 µM), 1 U di *Taq* polimerasi (*Invitrogen*), DNA, H₂O milliq.

In ciascuna reazione di PCR sono stati inclusi un controllo positivo e un controllo negativo per verificare la correttezza del procedimento.

Per l'amplificazione sono stati utilizzati due set di *primers*: una coppia di *primers* esterni per la prima reazione, NN1 (5'-CCT TTG AAT CCC AAG CAA AAC ATG AG-3') e NN2 (5'-GCG AGC CAA GAC ATC CAT TGC TGA-3'); ed una coppia di *primers* interni per la seconda reazione, *ITSfw* (5'-GAT TTG CAT TCA AGA AGC GTG ATA GTA T-3') e *ITSrev* (5'-AGT TTA GGA AGC AAT CTG AAA GCA CAT C-3').

Le amplificazioni sono state effettuate utilizzando il termociclatore *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems*, USA).

Le condizioni termiche per la prima reazione sono state le seguenti: 94 °C per 3'; 40 cicli dei tre *step* di denaturazione a 94 °C per 30'', *annealing* a 65°C per 45'' e allungamento a 72 °C per 1'; seguiti da un'estensione finale a 72 °C per 5'.

La seconda reazione di PCR è stata preparata con 1 µl di amplificato ottenuto nella prima reazione e le condizioni termiche sono state le seguenti: 95 °C per 5'; 50 cicli di 94 °C per 40'', 60 °C per 40'' e 72 °C per 1' e un'estensione finale a 72 °C per 7'.

Al fine di valutarne specificità e resa, un'aliquota dell'amplimero è stata sottoposta a elettroforesi in gel di agarosio all'1,5% in tampone TAE (Tris-Acetato 40 mM, Na₂EDTA 0,1 Mm, pH 8) e *Syber Safe DNA gel stain* (*Invitrogen*). La visualizzazione dei risultati e l'acquisizione dell'immagine veniva effettuata mediante lo strumento UVITEC (*Cambridge*). La stima della lunghezza del frammento è stata effettuata mediante l'utilizzo dello *standard* di pesi molecolari *Thermo Scientific GeneRuler* (100 bp DNA *ladder*).

Per confermare i risultati ottenuti attraverso la *Nested* PCR alcuni degli amplificati con le caratteristiche migliori, sono stati selezionati per la purificazione ed il successivo sequenziamento. I prodotti di PCR venivano purificati mediante il kit commerciale *ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit (Invitrogen)*, un sistema basato sull'utilizzo di biglie magnetiche alle quali si lega il DNA e che permette di separarlo dai vari inquinanti presenti nella mix di reazione. Il sequenziamento dei campioni purificati veniva effettuato presso un laboratorio esterno mediante un sequenziatore capillare (*Applied Bio-systems*).

Le sequenze ottenute, sono state appaiate ed analizzate mediante il *software Mega 6* e online mediante il *software BLAST* per confrontarle con le sequenze dell'NCBI depositate in rete.

3.3.3. Analisi dei dati

I risultati ottenuti sono stati registrati su un foglio di calcolo elettronico *Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)* e successivamente analizzati al fine di stabilire le performances delle metodiche diagnostiche da noi utilizzate.

Per il confronto tra le prevalenze è stato effettuato il test del *Chi-quadro* attraverso il *software Epi-Info (version 7.0, CDC/WHO, Atlanta, GA, USA)*. Dal momento che la maggior parte dei dati esaminati non è risultata distribuita normalmente, per il confronto delle Percentuali di Positività (PP) ottenute con la metodica ELISA è stata eseguita una valutazione con il test di *Kruskal-Wallis*, con l'utilizzo del *software Minitab®16.2 (Minitab Inc. 2012)*.

Al fine di valutare sensibilità, specificità e concordanza della metodica ELISA nelle matrici da noi esaminate, abbiamo utilizzato una tabella di contingenza 2X2 (Bottarelli, <http://www.quadernodiepidemiologia.it/>) assumendo come *Gold Standard* la positività alla PCR per almeno una dei due organi analizzati (encefalo e/o miocardio).

3.4. RISULTATI

3.4.1. Indagine sierologica

Il test ELISA condotto sui campioni di siero individuali, ha consentito di rilevare negli ovini esaminati una sieroprevalenza per *T. gondii* del 42% (47/112).

Lo stesso test ELISA condotto sul succo di carne ha consentito di rilevare una prevalenza dell'85,7% (96/112) e dell'84,8% (95/112) rispettivamente per il miocardio e il muscolo diaframmatico (Grafico 2).

Le positività stratificate in base alla Percentuale di Positività (PP) per il siero ed il succo di carne sono state riportate nel Grafico 1.

3.4.2. Indagine biomolecolare

L'indagine condotta mediante *Nested* PCR, sui campioni di encefalo e miocardio (Figura 1), ha messo in evidenza delle prevalenze rispettivamente del 77,7% (87/112) e del 82,1% (92/112), come riportato nel Grafico 2. I risultati ottenuti attraverso la *Nested* PCR sono stati confermati in seguito al sequenziamento di alcuni campioni. Le sequenze confrontate con quelle presenti in *Genebank*, tramite il *software* BLAST, hanno mostrato un'omologia del 99% (260/263) con la sequenza omologa (ITS-1) di *T. gondii* (GB: JX456457.1) isolata in Cina da Jang *et al.*, 2012.

Il confronto tra le positività riscontrate al test ELISA nelle diverse matrici, siero di sangue (42%), succo del muscolo cardiaco (85,7%) e succo del muscolo diaframmatico (84,8%), ha mostrato differenze statisticamente significative sia al test del *Chi-quadro* ($\chi^2 = 67,79$; $p = 0,0000$), sia al test di *Kruskal-Wallis* ($H = 34,85$; $p = 0,000$). In particolare, mentre non si evidenziano differenze statisticamente significative nel confronto tra ELISA succo del miocardio vs diaframma ($\chi^2 = 0,04$; $p = 0,850$), risultano significative quelle tra ELISA siero vs miocardio ($\chi^2 = 46,43$; $p = 0,000$) ed ELISA siero vs muscolo diaframmatico ($\chi^2 = 44,32$; $p = 0,000$).

Il confronto tra le positività riscontrate alla *Nested* PCR nelle due matrici, encefalo (77,7%) e miocardio (82,1%), non ha mostrato differenze statisticamente significative ($\chi^2 = 0,695$; $p = 0,404$).

Il 100% degli ovini esaminati (112/112) è risultato positivo ad almeno una delle metodiche diagnostiche utilizzate (ELISA su siero di sangue/succo di carne e *Nested* PCR su encefalo/miocardio) mentre il 25,9% (29/112) è risultato positivo a tutte le metodiche. Risulta dunque che tutte le aziende monitorate (100%; 14/14) sono risultate positive alla toxoplasmosi (Tabella 1).

Considerando come positivi gli ovini in cui è stato identificato il DNA del parassita attraverso la *Nested* PCR dell'encefalo e/o del miocardio, la prevalenza è risultata del 97,3% (109/112). Questo "nostro *Gold Standard*" è stato in seguito utilizzato per confrontare le positività ottenute mediante la metodica ELISA su tutte le matrici analizzate. I risultati ottenuti vengono riportati nella Tabella 2.

3.5. CONSIDERAZIONI

I risultati della presente ricerca, con il 97,3% (109/112) degli animali esaminati positivi in PCR a *T. gondii*, dimostrano come la toxoplasmosi sia una parassitosi largamente diffusa negli allevamenti ovini della Sardegna, dato di notevole importanza in quanto l'indagine, diversamente da altri studi condotti in precedenza nell'isola (Chessa G. *et al.*, 2014; Masala G. *et al.*, 2007) è stata effettuata su ovini regolarmente macellati le cui carni sono state destinate al consumo umano diretto.

Un terzo della popolazione mondiale è cronicamente infettato da questo parassita (Weiss L.M. & Dubey J.P. 2009) e anche se la toxoplasmosi nella maggior parte degli individui decorre in forma asintomatica, rimane una delle principali malattie legate alle ospedalizzazioni e decessi di origine alimentare (Dubey J.P., 2004).

Nonostante sia da tempo considerata esclusivamente un'infezione opportunistica pericolosa nei soggetti immunocompromessi o se acquisita per via congenita (Montoya J.G. & Liesenfeld O. 2004; Buffolano W., 2008), recenti studi hanno dimostrato il ruolo di *T. gondii* come responsabile di differenti stati morbosi anche in soggetti senza condizioni di immunosoppressione (Mac Allister M.M., 2005).

Negli ultimi anni l'attenzione verso la toxoplasmosi degli ovini è aumentata in virtù del loro ruolo nella trasmissione dell'infezione all'uomo sia attraverso il contatto diretto che il consumo di prodotti di origine animale (Cenci-Goga B.T. *et al.*, 2013). Tra gli animali da reddito destinati alla produzione di alimenti, gli ovini sono i più suscettibili alle infezioni da *T. gondii* che può causare aborti, elevati tassi di mortalità neonatale, riduzione della produzione di latte e del valore dell'allevamento, con conseguenti gravi perdite economiche (Marquardt W.C. *et al.*, 2000; Ortega-Mora L.M. *et al.*, 2007; Innes E.A. *et al.*, 2009).

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di confrontare diverse metodiche diagnostiche (ELISA e PCR) al fine di poter validare un protocollo che possa essere utilizzato su uno studio epidemiologico a più ampio spettro. Inoltre la ricerca degli anticorpi di *T. gondii* è stata effettuata oltre che sul siero, anche sul succo di carne, substrato facilmente reperibile all'atto delle macellazioni (o direttamente nella grande o piccola distribuzione) già utilizzato in indagini analoghe (Wingstrand A. *et al.*, 1997; Halos L. *et al.*, 2009) e per la ricerca di altri agenti patogeni quali

Trichinella spp. (Nöckler K. *et al.*, 2005; Frey C.F. *et al.*, 2009) e *Salmonella* spp. (Steinbach G. *et al.*, 2000; Alban L. *et al.*, 2002).

Le prevalenze da noi evidenziate attraverso la metodica ELISA sul siero, seppur parziali, sono in linea con quanto riportato nell'isola da Natale A. *et al.* (2007) che hanno rilevato in greggi ovini delle sieroprevalenze del 51,3%. Sieroprevalenze analoghe sono state riportate in Sicilia (49,9%) da Vesco G. *et al.* (2007). I valori ottenuti, alla luce dei risultati ottenuti sia sul succo di carne che soprattutto in PCR, mostrano come l'ELISA condotta sul siero sia una metodica con performances abbastanza discutibili.

I risultati da noi ottenuti con l'ELISA sul succo di carne sono comparabili con quanto riportato da Berger-Soch A.E. *et al.* (2011) in uno studio condotto in Svizzera su ovini adulti regolarmente macellati (80,7% di positività su succo di carne ottenuto dal muscolo diaframmatico).

I dati ottenuti nel nostro studio attraverso il test ELISA dimostrano come il succo di carne, indipendentemente dal fatto che venga ottenuto dal muscolo cardiaco o diaframmatico ($p=0,000$), rappresenta un'ottima matrice, da preferire a nostro avviso, al siero, rispetto al quale è in grado di rilevare delle prevalenze pressoché doppie (85,7% e 84,8% vs 42%; $\chi^2=67,79$; $p=0,0000$).

Attraverso l'indagine biomolecolare è stato possibile individuare *T. gondii* nel 77,7% dei campioni di encefalo e nell'82,1% dei campioni di muscolo cardiaco degli ovini esaminati. Il protocollo di PCR da noi utilizzato (Halovà D. *et al.*, 2013) ci ha consentito di evidenziare delle prevalenze nettamente superiori rispetto a quanto riportato dagli stessi autori (3,6%). Questo può essere attribuito alla quantità di tessuto di partenza da noi utilizzata (50 gr rispetto ai 10 gr indicati nel protocollo) e soprattutto al fatto che nella nostra isola i sistemi di allevamento ovini sono per la maggior parte di tipo estensivo con una conseguente maggior esposizione degli animali al parassita.

Il confronto delle prevalenze da noi riscontrate in PCR non ha mostrato differenze statisticamente significative, il che ci fa ipotizzare che entrambi i tessuti possano essere utilizzati indifferentemente e che, viste le maggiori difficoltà nel campionare il SNC, soggetto a normativa per il controllo delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSE) (*Regolamento CE 854/2004*), il cuore possa rappresentare l'organo d'elezione per la ricerca del parassita su studi anche di larga scala condotti in animali post-mortem.

La valutazione delle performances del test ELISA applicato alle diverse matrici, in confronto con il “nostro *Gold Standard*” (PCR+ encefalo e/o miocardio) ha consentito di rilevare una sensibilità dell’87,7% per cuore e diaframma confermando quindi la loro elevata capacità di rilevare l’infezione. Una concordanza moderata per l’ELISA è stata rilevata sul succo di carne ottenuto dal diaframma ($k= 0,057$).

CONCLUSIONI

Gli alti valori di prevalenza e sieroprevalenza ottenuti nel presente lavoro, sembrerebbero confermare quanto ipotizzato da Tola S. *et al.* (2002), ovvero che la toxoplasmosi in Sardegna potrebbe essere una delle principali cause di aborto negli ovini (12,5%). Questi dati verrebbero supportati anche da uno studio condotto da Scala A. *et al.* (2008) sulle sarcosporidiosi ovine, parassitosi sovrapponibili alla toxoplasmosi e per le quali sono state riportate delle prevalenze del 96,2% e del 100% rispettivamente per *S. ovifelis* e *S. medusiformis-like*, forme notoriamente trasmesse dal gatto. Secondo gli autori dunque la sarcosporidiosi potrebbe essere considerata una spia d'allarme della presenza di cisti terminali di *Toxoplasma* nella muscolatura degli ovini.

Tuttavia i nostri risultati non possono essere confrontati con altri lavori condotti nell'isola attraverso la PCR in quanto il nostro studio è stato effettuato su animali regolarmente macellati, a differenza di quelli precedenti effettuati su materiale patologico e feti abortiti, in cui sono state riportate, con la stessa metodica, prevalenze variabili dal 3,5% all'87% e 66,6% rispettivamente in placenti e tessuto cerebrale ed epatico fetali (Chessa G. *et al.*, 2014).

L'alta incidenza della toxoplasmosi rilevata in questo lavoro, nonostante si tratti di uno studio preliminare, evidenzia la forte pressione parassitaria esercitata da *T. gondii* sugli ovini dell'isola e pone il problema del rischio di trasmissione all'uomo attraverso l'ingestione e la manipolazione delle carni crude. A questo proposito appare opportuno uno studio epidemiologico a più ampio spettro al fine di avere un quadro più preciso della reale situazione nel nostro territorio.

Considerando che per una diagnosi accurata di toxoplasmosi, l'ideale sarebbe affiancare la sierologia e la biologia molecolare (Ghoneim N.H. *et al.*, 2010), e considerando i risultati da noi ottenuti, possiamo affermare che il miocardio potrebbe costituire una matrice idonea per la ricerca di *T. gondii* negli ovini.

In particolare, il nostro protocollo diagnostico prevede una diagnosi sierologica mediante test ELISA su succo di carne ottenuto dal muscolo cardiaco, seguita dalla diagnosi biomolecolare con la PCR dello stesso organo.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, Y.F.; Sokkar, S.M.; Desouky, H.M.; Soror, A.H. (2008). Abortion Due to Toxoplasmosis in Small Ruminants. *Global Veterinaria*, **2**(6): 337-342.
- Alban, L.; Stege, H.; Dahl, J. (2002). The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish *Salmonella* surveillance-and-control program. *Prev Vet Med*, **53**: 133-146.
- Alfonso, Y.; Fraga, J.; Jimenez, N.; Fonseca, C.; Dorta-Contreras, A.J.; Cox, R.; Ginorio, D. (2009). Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested PCR and rapid identification of type I allele at B1 gene by RFLP analysis. *Exp Parasitol*, **122**(3): 203-207.
- Aubert, D.; Maine, G.T.; Villena, I.; Hunt, J.C.; Howard, L.; Sheu, M.; Brojanac, S.; Chovan, L.E.; Nowlan, S.F.; Pinon, J.M. (2000). Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*, **38**: 1144-50.
- Bayarri, S.; Gracia, M.J.; Lázaro, R.; Pérez-Arquillué, C.; Herrera, A. (2012). *Toxoplasma gondii* in Meat and Food Safety Implications – A Review. *Zoonosis.intechopen.com*
- Berger-Schoch, A.E.; Bernet, D.; Doher, M.G.; Gottstein, B.; Frey, C.F. (2011). *Toxoplasma gondii* in Switzerland: a serosurvey based on meat juice analysis of slaughtered pigs, wild boar, sheep and cattle. *Zoonoses Public Health*, **58**: 472-478.
- Buffolano, W. (2008). Congenital Toxoplasmosis: *The state of the art*. *Parassitologia*, **50**: 37-43.
- Buxton, D. (1998). Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet Res*, **29**(3-4): 289-310.
- Cenci-Goga, B.T.; Ciampelli, A.; Sechi, P.; Veronesi, F.; Cambiotti, V.; Thompson, P.N.; Moretta, I. (2013). Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep in Grosseto district, Tuscany, Italy. *BMC Veterinary Research*, **9**: 25.
- Cenci-Goga, B.T.; Rossitto, P.V.; Sechi, P.; McCrindle, C.M.; Cullor, J.S. (2011). *Toxoplasma* in animals, food, and humans: an old parasite of new concern. *Foodborne Pathog Dis*, **8**(7): 751-762.
- Chessa, G.; Chisu, V.; Porcu, R.; Masala, G. (2014). Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* Type II in sheep abortion in Sardinia, Italy. *Parasite*, **21**: 6.
- Clementino, M.M.; Souza, M.F.; Andrade Neto, V.F. (2007). Seroprevalence and *Toxoplasma gondii*-IgG avidity in sheep from Lajes, Brazil. *Vet Parasitol*, **146**(3-4): 199-203.
- Da Silva, A.V. & Langoni, H. (2001). The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Veterinary Parasitology*, **97**: 191-198.
- De Moraes, E.P.B.X.; Da Costa, M.M.; Dantas, A.F.; Da Silva J.C.; Mota R.A. (2011). *Toxoplasma gondii* diagnosis in ovine aborted fetuses and stillborns in the State of Pernambuco, Brazil. *Vet Parasitol*, **183**(1-2): 152-155.
- Dubey, J.P. (2004). Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol*, **126**: 57-72.
- Dubey, J.P. (2009). Toxoplasmosis in sheep-the last 20 years. *Vet Parasitol*, **163**(1-2): 1-14.
- Dubey, J.P. (2010). Toxoplasmosis of animals and humans. 2nd edition. Boca Raton, Florida: CRC Press, p. 313.
- Dubey, J.P.; Darrington, C.; Tiao, N.; Ferreira, L.R.; Choudhary, S.; Molla, B.; Saville, W.J.A.; Tilahun, G.; Kwok, O.C.H.; Gebreyes, W.A. (2013). Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from tissues and feces of cats from Addis Ababa, Ethiopia. *J Parasitol*, **99**: 56-58.

EFSA, European Food Safety Authority (2007). Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from EFSA on surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, foods and animals. *EFSA Journal*, **5**(3): 1-64.

Elmore, S.A.; Jones, J.L.; Conrad, P.A.; Patton, S.; Lindsay, D.S.; Dubey, J.P. (2010). *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in Parasitology*, **26**(4): 190-196.

Frey, C.F.; Schuppers, M.E.; Nockler, K.; Marinculic, A.; Pozio, E.; Kihm, U.; Gottstein, B. (2009). *Trichinella spp.* antibodies in domestic pigs. *Parasitol Res*, **104**: 1269-1277.

Gangneux, F.R. & Dardé, M.L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Review*, **25**(2): 264-296.

Gangneux, R.F.; Commerce, V.; Tourte-Schaefer, C.; Dupouy-Camet, J. (1999). Performance of a Western blot assay to compare mother and newborn anti-*Toxoplasma* antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital Toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol*, **18**: 648-54.

García, J.L.; Gennari, S.M.; Machado, R.Z.; Navarro, I.T. (2006). *Toxoplasma gondii*: detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. *Experimental Parasitology*, **113**: 267-271.

Ghoneim, N.H.; Shalaby, S.I.; Hassanain, N.A.; Zeedan, G.S.G.; Soliman, Y.A.; Abdalhamed, A.M. (2010). Comparative Study Between Serological and Molecular Methods for Diagnosis of Toxoplasmosis in Women and Small Ruminants in Egypt. *Foodborne Pathogens and Disease*, **7**(1): 17-22.

Glor, S.B.; Edelhofer, R.; Grimm, F.; Deplazes, P.; Basso, W. (2013). Evaluation of a commercial ELISA kit for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in serum, plasma and meat juice from experimentally and naturally infected sheep. *Parasites & Vectors*, **6**: 85.

Gutierrez, J.; O'Donovan, J.; Williams, E.; Proctor, A.; Brady, C.; Marques, P.X.; Worrall, S.; Nally, J.E.; McElroy, M.; Bassett, H.; Sammin, D.; Buxton, D.; Maley, S.; Markey, B.K. (2010). Detection and quantification of *Toxoplasma gondii* in ovine maternal and foetal tissues from experimentally infected pregnant ewes using real-time PCR. *Vet Parasitol*, **172**(1-2): 8-15.

Halos, L.; Thébault, A.; Aubert, D.; Thomas, M.; Perret, C.; Geers, R.; Alliot, A.; Escotte-Binet, S.; Ajzenberg, D.; Dardé, M.L.; Durand, B.; Boireau, P.; Villena, I. (2010). An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France. *Int J Parasitol*, **40**(2): 193-200.

Halová, D.; Mulcahy, G.; Rafter, P.; Turceková, L.; Grant, T.; De Waal, T. (2013). *Toxoplasma gondii* in Ireland: seroprevalence and novel molecular detection method in sheep, pigs, deer and chickens. *Zoonoses and Public Health*, **60**: 168-173.

Hill, D.E.; Coss, C.; Dubey, J.P.; Wroblewski, K.; Sautter, M.; Hosten, T.; Muñoz-Zanzi, C.; Mui, E.; Withers, S.; Boyer, K.; Hermes, G.; Coyne, J.; Jagdis, F.; Burnett, A.; McLeod, P.; Morton, H.; Robinson, D.; McLeod, R. (2011). Identification of a sporozoite-specific antigen from *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*, **97**: 328-337.

Homan, W.L.; Vercammen, M.; De Braekeleer, J.; Verschueren, H. (2000). Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *International Journal for Parasitology*, **30**: 69-75.

Hurtado, A.; Aduriz, G.; Moreno, B.; Barandika J.; Garcia-Perez, A.L. (2001). Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Vet Parasitol*, **102**(1-2): 17-27.

Hutchison, W.M.; Pittilo, R.M.; Ball, S.J.; Siim, J.C. (1979). *Toxoplasma gondii*: scanning electron microscope studies on the small intestine of infected and uninfected cats. *Acta Pathol Microbiol Scand B*, **87**: 393-395.

Innes, E.A.; Bartley, P.M.; Buxton, D.; Katzer, F. (2009). Ovine Toxoplasmosis. *Parasitology*, **136**: 1887-94.

- Jauregui, L.H.; Higgins, J.; Zarlenga, D.; Dubey, J.P.; Lunney, J.K. (2001). Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Toxoplasma gondii* in Pig and Mouse Tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**(6): 2065-2071.
- Juránková, J.; Basso, W.; Neumayerová, H.; Baláz, V.; Jánová, E.; Sidler, X.; Deplazes, P.; Koudela, B. (2014). Brain is the predilection site of *Toxoplasma gondii* in experimentally inoculated pigs as revealed by magnetic capture and real-time PCR. *Food Microbiology*, **38**: 167-170.
- Juránková, J.; Basso, W.; Neumayerová, H.; Frencová, A.; Baláz, V.; Deplazes, P.; Koudela, B. (2015). Predilection sites for *Toxoplasma gondii* in sheep tissues revealed by magnetic capture and real-time PCR detection. *Food Microbiology*, **52**: 150-153.
- Juránková, J.; Opsteegh, M.; Neumayerová, H.; Kovařík, K.; Frencová, A.; Baláz, V.; Volf, J.; Koudela, B. (2013). Quantification of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of experimentally infected goats by magnetic capture and real-time PCR. *Vet Parasitol*, **193**: 95-99.
- Kijlstra, A.; Eissen, O.A.; Cornelissen, J.; Munniksma, K.; Eijck, I.; Kortbeek, T. (2004). *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **45**: 3165-3169.
- Kotresha, D. & Noordn, R. (2010). Recombinant proteins in the diagnosis of Toxoplasmosis. *APMIS*, **118**: 529-542.
- Lappin, M.R. (2010). Update on the diagnosis and management of *Toxoplasma gondii* Infection in cats. *Top Companion Anim Med*, **25**: 136-141.
- Lau, Y.L.; Fong, M.Y.; Idris, M.M.; Ching, X.T. (2012). Cloning and expression of *Toxoplasma gondii* dense granule antigen 2 (GRA2) gene by *Pichia pastoris*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **43**: 10-16.
- Li, S.; Galvan, G.; Araujo, F.G.; Suzuki, Y.; Remington, J.S.; Parmley, S. (2000). Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection using an enzyme-linked immunosorbent assay with a combination of recombinant antigens. *Clin Diagn Lab Immunol*, **7**(5): 781-787.
- Lin, M.; Chen, T.; Kuo, T.; Tseng, C. (2000). Real-Time PCR for Quantitative Detection of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**(11): 4121-4125.
- Liu, Q.; Wang, Z.D.; Huang, S.Y.; Zhu, X.Q. (2015). Diagnosis of Toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasit Vectors*, **8**: 292.
- Mac Allister, M.M. (2005). A decade of discoveries in veterinary protozoology changes our concept of “subclinical” Toxoplasmosis. *Veterinary Parasitology*, **132**: 241-247.
- Marquardt, W.C.; Demaree, R.S.; Grieve, R.B. (2000). Parasitology and Vector Biology, second ed. *Academic Press, London*, pp. 165-178.
- Masala, G.; Porcu, R.; Daga, C.; Denti, S.; Canu, G.; Patta, C.; Tola, S. (2007). Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *J Vet Diagn Invest*, **19**: 96-98.
- Montoya, J.G. & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet*, **363**: 1965-1976.
- Moreno, B.; Collantes-Fernandez, E.; Villa, A.; Navarro, A.; Regidor-Cerrillo J.; OrtegaMora, L.M. (2012). Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet Parasitol*, **187**(1-2): 312-318.
- Natale, A.; Porqueddu, M.; Capelli G.; Mocci G.; Marras M.A.; Sanna Coccone G.N.; Garippa G.; Scala A. (2006). Sero-epidemiological update on sheep Toxoplasmosis in Sardinia (Italy). *Atti Toxo & Food*, Palermo, Italy, 84-85.
- Nöckler, K.; Serrano, F.J.; Boireau, P.; Kapel, C.M.; Pozio, E. (2005). Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection on different diagnostic matrices. *Vet Parasitol*, **132**: 85-90.

OIE (2008). Toxoplasmosis. OIE Terrestrial Manual.

Opsteegh, M.; Langelaar, M.; Sprong, H.; Den Hartog, L.; De Craeye, S.; Bokken, G.; Ajzenberg, D.; Kijlstra, A.; Van der Giessen, J. (2010). Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *Int J Food Microbiol*, **139**(3): 193-201.

Opsteegh, M.; Teunis, P.; Mensink, M.; Zuchner, L.; Titilincu, A.; Langelaar, M.; Van der Giessen, J. (2010). Evaluation of ELISA test characteristics and estimation of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in Dutch sheep using mixture models. *Preventive Veterinary Medicine*, **96**(3-4): 232-240.

Ortega-Mora, L.M.; Gottstein, B.; Conraths, F.J.; Buxton, D. (2007). Protozoal Abortion in Farm Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control. *CAB International; Wallington, UK*.

Pereira-Bueno, J.; Quintanilla-Gozalo, A.; Perez-Perez, V.; Alvarez-García, G.; Collantes Fernandez E.; Ortega-Mora, L.M. (2004). Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Vet Parasitol*, **121**(1-2): 33-43.

Pfreppe, K.I.; Enders, G.; Gohl, M.; Krczal, D.; Hlobil, H.; Wassenberg, D.; Soutschek, E. (2005). Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in Toxoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, **12**: 977-82.

Pièrgili Fioretti, D. & Manfredi, M.T. (2014). Aggiornamenti sulle infezioni protozoarie causa di aborto negli ovicaprini in Italia. *Large Animal Review*, Supplemento 1 al N. 4 - Agosto 2014, ANNO 20.

Pièrgili Fioretti, D. (2004). Problems and limitations of conventional and innovative methods for the diagnosis of Toxoplasmosis in humans and animals. *Parassitologia*, **46**(1-2): 177-181.

Reiter-Owona, I.; Petersen, E.; Joynson, D.; Aspöck, H.; Dardé, M.L.; Disko R.; Dreazen, O.; Dumon, H.; Grillo, R.; Gross, U.; Hayde, M.; Holliman, R.; Ho-Yen, D.O.; Janitschke, K.; Jenum, P.A.; Naser, K.; Olszewski, M.; Thulliez, P.; Seitz, H.M. (1999). The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of Toxoplasmosis. *Bull World Health Organ*, **77**: 929-35.

Sabin, A.B. & Feldman, H.A. (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science*, **108**: 660-663.

Salant, H.; Spira, D.T.; Hamburger, J. (2010). A comparative analysis of coprologic diagnostic methods for detection of *Toxoplasma gondii* in cats. *Am J Trop Med Hyg*, **82**(5): 865-70.

Scala, A.; Giobbe, M.; Mula, P.P.; Pipia, A.P.; Sanna-Coccone, G.; Firinu, A.; Varcasia, A.; Marrosu, R.; Garippa, G. (2008). Toxoplasmosi dei suidi in Sardegna: indagine sieroepidemiologica. *Parassitologia*, **50**: 235.

Sims, T.A.; Hay, J.; Talbot, I.C. (1989). An electron microscope and immunohistochemical study of the intracellular location of *Toxoplasma* tissue cysts within the brains of mice with congenital Toxoplasmosis. *British J Exp Pathol*, **70**:317-25.

Steinbach, G.; Staak, C.; Bahn, P. (2000). Possibilities for standardization of ELISA for detection of *Salmonella* antibodies in sera and meat juices of pigs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **113**: 331-334.

Stroehle, A.; Schmid, K.; Heinzer, I.; Naguleswaran, A.; Hemphill, A. (2005). Performance of a Western immunoblot assay to detect specific anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in human saliva. *J Parasitol*, **91**: 561-563.

Su, C.; Zhang, X.; Dubey, J.P. (2006). Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasite. *International Journal for Parasitology*, **36**: 841-848.

Tola, S.; Porcu, R.; Macciocu, S.; Chessa, G.; Casu, L.M.; Sale, S.; Masala, G. (2002). Aborti ovini e caprini in Sardegna: analisi riferita a *Salmonella abortusovis*, *Toxoplasma gondii* e *Coxiella burnetii*. *ATTI XV Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C.*

Vesco, G.; Buffolano, W.; La Chiusa, S.; Mancuso, G.; Caracappa, S.; Chianca, A.; Villari, S.; Currò, V.; Liga, F.; Petersen, E. (2007). *Toxoplasma gondii* infections in sheep in Sicily, southern Italy. *Vet Parasitol*, **146**:3-8.

Villard, O.; Filisetti, D.; Roch-Deries, F.; Garweg, J.; Flament, J.; Candolfi, E. (2003). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, immunoblotting, and PCR for diagnosis of toxoplasmic chorioretinitis. *J Clin Microbiol*, **41**: 3537-3541.

Villena, I.; Durand, B.; Aubert, D.; Blaga, R.; Geers, R.; Thomas, M.; Perret, C.; Alliot, A.; Escotte-Binet, S.; Thébault, A.; Boireau, P.; Halos, L. (2012). New strategy for the survey of *Toxoplasma gondii* in meat for human consumption. *Vet Parasitol*, **183**: 203-208.

Wang, Z.; Ge, W.; Huang, S.Y.; Li, J.; Zhu, X.Q.; Liu, Q. (2014). Evaluation of recombinant granule antigens GRA1 and GRA7 for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in dogs. *BMC Vet Res*, **10**: 158.

Weiss, L.M. & Dubey, J.P. (2009). Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Int J Parasitol*, **39**: 895-901.

Wingstrand, A.; Lind, P.; Haugegaard, J.; Henriksen, S.A.; Bille-Hansen, V.; Sørensen, V. (1997). Clinical observations, pathology, bioassay in mice and serological response at slaughter in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol*, **72**: 129-140.

DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA

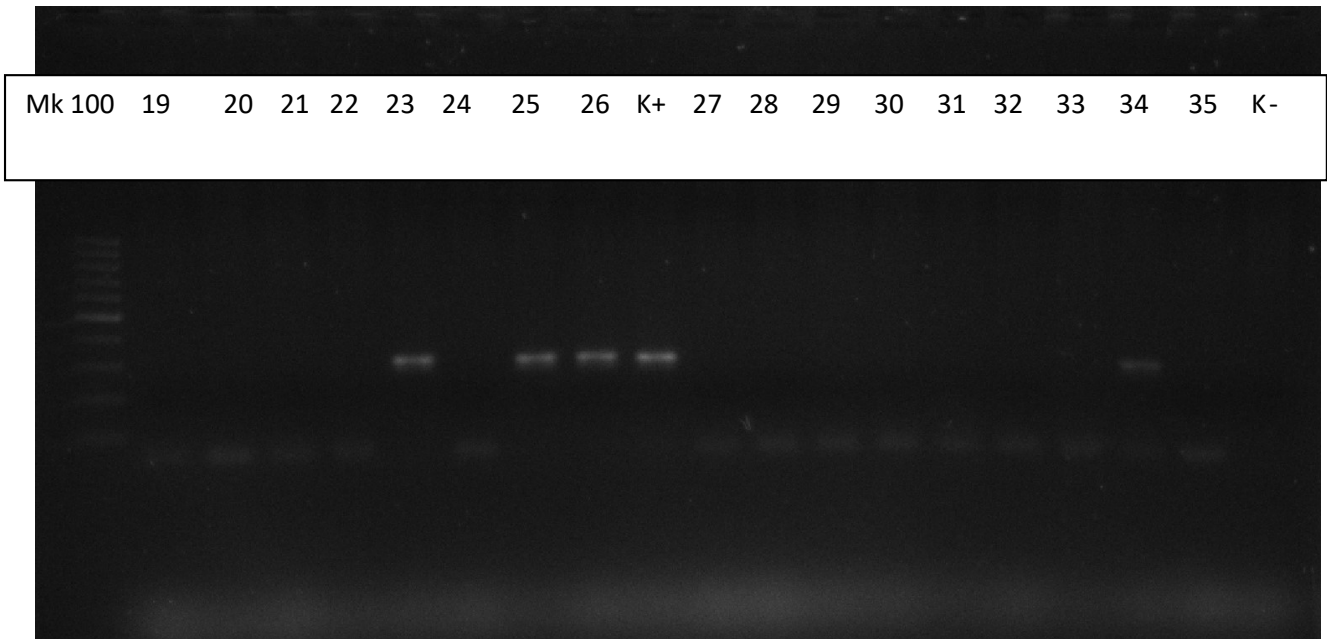


Figura 1. Campioni di miocardio ovino positivi a *T. gondii* analizzati mediante *Nested PCR*.

TABELLE E GRAFICI

Tabella 1. Prevalenze stratificate per azienda

Azienda	Capi esaminati	Prevalenze %				
		PCR Encefalo	PCR Miocardio	ELISA Siero	ELISA Miocardio	ELISA M. diaframmatico
Fonni – A	17	82	100	94,1	100	100
Fonni – B	9	100	77,8	77,8	100	89
Oschiri – A	6	100	83,3	33,3	100	100
Oschiri – B	1	100	0	100	100	100
Oschiri – C	2	0	100	0	100	100
Oschiri – D	9	78	66,7	33,3	88,9	89
Oschiri – E	12	50	75	50	91,7	67
Ozieri	9	78	77,8	0	55,6	67
Padria - Sa Pedra Longa	13	100	76,9	0	69,2	85
Padria - Su LaruMasciu	4	75	100	0	75	75
Samassi	5	80	80	20	80	80
Semestene	10	90	100	10	80	70
Serramanna	7	0	71,4	71,4	85,7	86
Villamassargia	7	100	71,4	71,4	85,7	100

Grafico 1. Stratificazione delle positività ottenute con l'ELISA in base alla Percentuale di Positività (PP) per il siero ed il succo di carne.

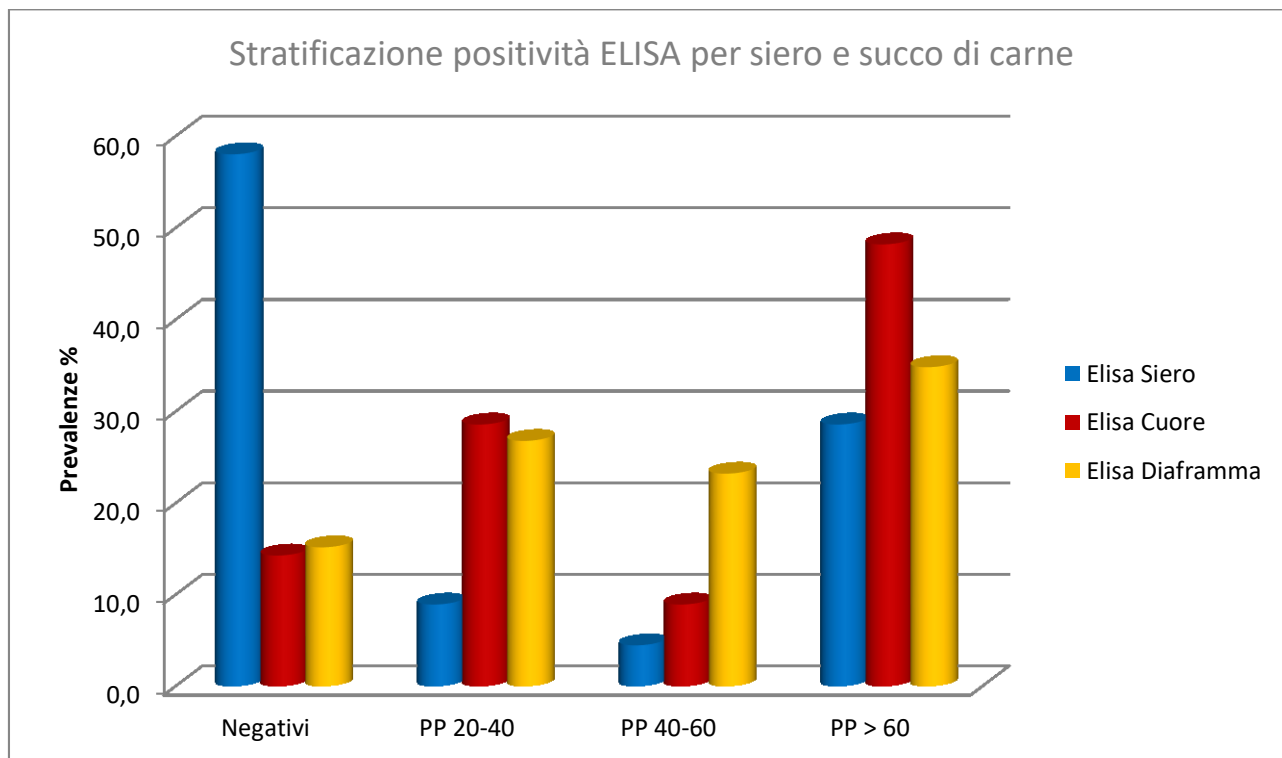


Grafico 2. Risultati ottenuti mediante ELISA e PCR su tutte le matrici analizzate.

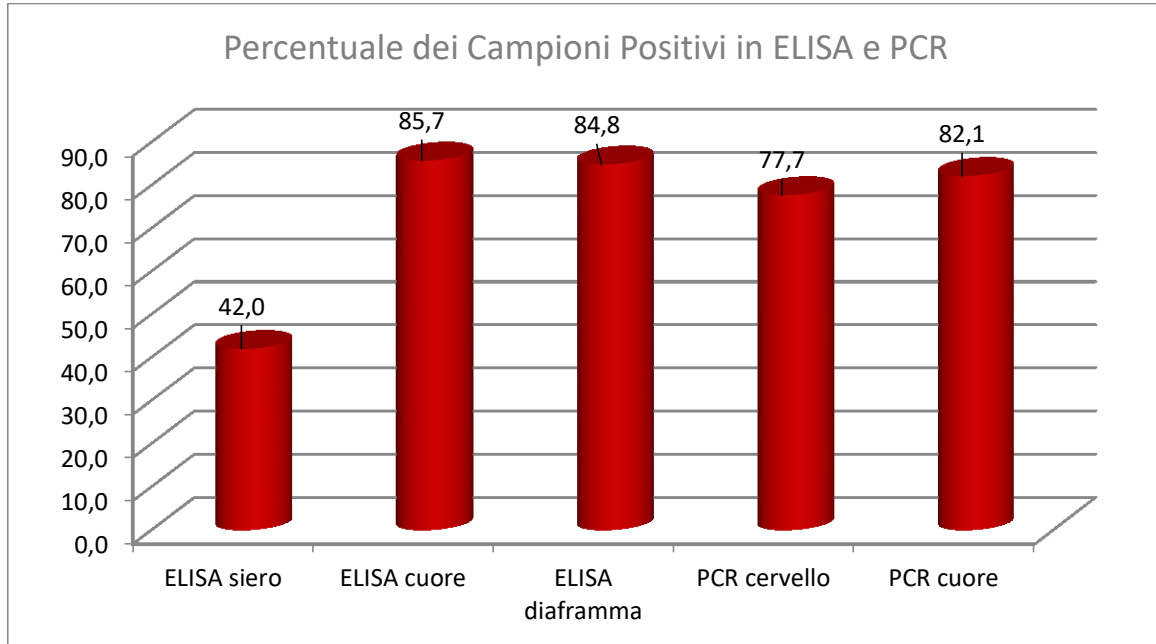


Tabella 2. Risultati ELISA vs “nostro Gold Standard”

	Prevalenza (%)	Chi-quadro	Concordanza	Sensibilità	Specificità
ELISA Siero	42,0	$\chi^2= 81,17;$ $p= 0,000$	k= 0,008	0,422	0,666
ELISA Miocardio	85,7	$\chi^2= 9,71;$ $p= 0,0018$	k= -0,047	0,877	0
ELISA M. Diaframmatico	84,8	$\chi^2= 10,76;$ $p= 0,0010$	k= 0,057	0,877	0,333

CAPITOLO IV

4. FASE SPERIMENTALE 2 – SIEROEPIDEMIOLOGIA NELLE PECORE E NELLE CAPRE CONVIVENTI E TREND STAGIONALE DELLA TOXOPLASMOSI IN SARDEGNA.

4.1. BACKGROUND

La toxoplasmosi, come è noto, rappresenta una delle principali cause di insufficienza riproduttiva in pecore e capre a livello globale (Buxton D. *et al.*, 2007; Dubey J.P., 2009a; Dubey J.P., 2009b; Da Silva A.F. *et al.*, 2013).

Tuttavia, ancora oggi è difficile stabilire se le pecore siano più o meno sensibili alla toxoplasmosi rispetto alle capre. La letteratura sull'argomento appare variegata al riguardo, in relazione al fatto che le varie indagini sono state condotte con metodi diagnostici diversi (es. IFI, ELISA, MAT, ecc.), su territori, razze, periodi dell'anno, nonché tipo di allevamento differenti. Per ovviare a questi inconvenienti sarebbe necessario per cui attuare delle indagini contemporaneamente su pecore e capre, applicando la stessa metodologia di indagine su tutti i capi allevati insieme e sottoposti alle stesse condizioni ambientali e di *management*.

In effetti l'esame della bibliografia sull'argomento appare non sempre uniforme. Atil A.B. *et al.* (2017) in pecore e capre del Sudan evidenziano dei tassi di sieroprevalenza per *T. gondii* significativamente maggiori nelle pecore rispetto alle capre (57,5% vs 46,5%). Anche, Tonouhewa A.B.N. *et al.* (2017), in un'indagine basata sulla meta-analisi di studi sieropidemiologici condotti in Africa, hanno stimato una prevalenza per *T. gondii* del 26,1% e del 22,9%, rispettivamente nella pecora e nella capra.

In Brasile, nel 40,5% delle capre e nel 48,7% delle pecore, allevate nella microregione Alto Médio Gurguéia, sono stati ritrovati anticorpi anti- *T. gondii*; stessa situazione nella microregione di Teresina, in cui l'infezione veniva rilevata sierologicamente nel 49,4% dei caprini e nel 67,5% (168/249) delle pecore (Rêgo W.M.F. *et al.*, 2016).

Anche in Italia indagini condotte in Sardegna da Masala G. *et al.* (2003) e in Lombardia da Gazzonis A.L. *et al.* (2015) evidenziano sieroprevalenze significativamente superiori nelle pecore rispetto alle capre.

Tali dati sembrerebbero confermati anche da Ahmad N. *et al.* (2015), che in Pakistan nella regione del Pothowar evidenziavano sieroprevalenze rispettivamente del 18,2% nelle pecore e del 14,3% nelle capre.

I risultati delle ricerche sopra descritte sembrerebbero confermare quanto riportato da Dubey J.P. (2009b) ossia che la toxoplasmosi è più comune nelle pecore, e l'ovino è la specie più sensibile all'infezione.

Tuttavia Ramzan M. *et al.* (2009) sempre in Pakistan, nella regione di Rahim Yar Khan (Punjab), rilevavano una situazione opposta, con sieroprevalenze per *T. gondii* rispettivamente del 25,4% nei caprini e del 11,2% negli ovini, in linea con quanto riportato anche da Ahmed N. *et al.* (2016), che evidenziavano una maggiore sieroprevalenza per *T. gondii* nei caprini (42,8%) rispetto alle pecore (26,2%) e da Wang C.R. *et al.* (2011) in Cina con sieroprevalenze del 3,8% e del 3% rispettivamente in capre e pecore. Nessuna differenza significativa dei tassi di prevalenza è stata riscontrata invece nell'indagine biomolecolare condotta da Amdouni Y. *et al.* (2017) su pecore e capre regolarmente macellate della Tunisia, così come Tegegne D. *et al.* (2016) che non riscontrarono differenze significative delle sieroprevalenze per *T. gondii* in pecore e capre dell'Etiopia.

Per certi versi controversa sembra anche la situazione inerente il *trend* stagionale delle sieroprevalenze nei piccoli ruminanti. In merito all'argomento Hejlíček K. & Literak I. (1994), riferirono, in indagini condotte in Bohemia (distretto di Strakonice) dal 1982 al 1989, nelle capre maggiori tassi di positività in estate e (*somewhat lower*) in autunno, mentre nelle pecore controllate al mattatoio i picchi più elevati di sieroprevalenze venivano riscontrati in primavera ed autunno, piuttosto che in estate e inverno. Al contrario, sempre questi stessi autori, nello stesso distretto non osservarono differenze significative di prevalenza nelle pecore di altri due greggi, tenute al pascolo, esaminate dal 1986 al 1990, anche se in questo caso in primavera e in estate furono segnalati tassi superiori.

4.2. OBIETTIVO

Alla luce di quanto sopra riportato con questa fase della ricerca si è cercato di apportare un contributo per chiarire gli aspetti legati all'eventuale presenza di una differente sensibilità all'infezione da *T. gondii* tra pecore e capre e per stabilire se effettivamente possano essere distinti *trend* stagionali in pecore e capre.

Per raggiungere lo scopo ci è sembrato importante eliminare eventuali influenze/interferenze legate a diversi fattori (ambientali, *management*, tipo di alimentazione ecc.) monitorando contemporaneamente pecore e capre allevate insieme nello stesso gregge e nelle medesime condizioni in modo da sottoporle allo stesso test consistente nel rilevamento dei tassi di sieroprevalenza per *T. gondii* con controlli stagionali.

4.3. MATERIALI E METODI

L'indagine è stata condotta in quattro allevamenti della Sardegna, in cui ovini di razza Sarda venivano allevati insieme a capre di razza Sarda e Saanen, sono stati effettuati dei prelievi di sangue dalla giugulare nelle diverse stagioni dell'anno.

I quattro allevamenti monitorati erano situati nella regione Sardegna, nei comuni di Sorradile (OR) (Latitudine: 40°06'22"N; Longitudine: 8°55'56"E; Altitudine sul livello del mare: 337 metri), Musei (SU) (Latitudine: 39°18'08"N; Longitudine: 8°39'58"E; Altitudine sul livello del mare: 117 metri), Villagrande Strisaili (NU) (Latitudine: 39°57'33"N; Longitudine: 9°30'33"E; Altitudine sul livello del mare: 648 metri) ed Esporlatu (SS) (Latitudine 40°23'8"16 N; Longitudine 08°59'26"88 E; Altitudine sul livello del mare: 474 metri).

Il numero di animali esaminati in ogni stagione per ogni allevamento sono riportati nella Tabella 1. In totale sono stati esaminati 626 sieri per le pecore e 560 sieri per le capre. Tutti i campioni di sangue, prelevati in provette *Vacutainer*® monouso prive di anticoagulante, venivano subito dopo il termine dei prelievi riposti in borsa frigo a 4 °C circa e recati in laboratorio dove venivano preparati per le analisi sierologiche.

4.3.1. Indagine sierologica

Il siero ottenuto per centrifugazione dei campioni di sangue venoso a 2000 rpm per 10 minuti (*Centrifuge 5804 R, Eppendorf*) è stato aliquotato in doppio in provette *Eppendorf* da 1,5 ml opportunamente siglate e successivamente stoccato a -20 °C fino all'esecuzione delle analisi.

I sieri sono stati testati in ELISA tramite l'uso del kit commerciale ELISA (*PrioCHEK® Toxoplasma Ab SR Prionics, Schlieren-Zurich, Switzerland*) per piccoli ruminanti già usato per le precedenti fasi della ricerca sperimentale.

Il kit include delle piastre ELISA trattate con colture cellulari derivate da antigeni di tachizoiti di *T. gondii*, una perossidasi marcata per anticorpi secondari anti- piccoli ruminanti, come substrato cromogeno il tetrametil-benzidina, sieri di controllo e soluzione *buffer*.

I campioni di siero sono stati esaminati alla diluizione finale di 1:100 con soluzione *buffer*. La Densità Ottica (DO) è stata misurata a 450 nm e i risultati del test interpretati calcolando per ogni campione la percentuale di positività (PP) secondo la seguente formula: $PP \text{ campione} = \frac{DO \text{ 450 nm del campione esaminato}}{DO \text{ 450 nm del controllo positivo}} \times 100$. Un valore \geq a 20 è stato a priori considerato positivo (così come suggerito dalla casa produttrice del kit); mentre valori di PP $<$ a 20 sono stati considerati negativi.

Il test ELISA utilizzato è accreditato di una sensibilità relativa compresa tra il 93,3 e il 100% e una specificità relativa tra il 96,9% e il 100% nei confronti rispettivamente all'Immunofluorescenza Indiretta (IFI) e all'Emoagglutinazione Indiretta (IHA) (Glor S.B. *et al.*, 2013).

4.3.2. Analisi dei dati

Tutti i dati ottenuti sono stati implementati in un foglio Excel ed elaborati statisticamente mediante i software *Epi-Info (version 7.0, CDC/WHO, Atlanta, GA, USA)* e *Minitab® 16.2 (Minitab Inc. 2012)*.

Gli animali testati, per l'elaborazione dei dati, sono stati stratificati anche in tre classi d'età: \leq 3 anni; $>$ 3 anni \leq 6 anni; $>$ 6 anni.

Per tutti i test statistici elaborati (χ^2 , χ^2 trend per il confronto dei tassi di sieroprevalenza, test ANOVA per il confronto delle medie di PP) i valori di $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi. Inoltre è stato effettuato anche il calcolo delle *Odds Ratio* (OR) per valutare le "probabilità a favore" di una determinata associazione tra la toxoplasmosi e i vari fattori presi in considerazione.

4.4. RISULTATI

I tassi di sieroprevalenza rilevati nell'arco di tutto l'anno nelle pecore sono risultati essere in totale pari al 44,9% (281/626), mentre quelli delle capre erano pari al 24,6% (138/560); tale differenza è risultata al test del χ^2 altamente significativa ($\chi^2= 55,74$; $p= 0,000$).

Confrontando invece i valori medi delle Percentuali di Positività (PP) di tutto l'anno tra pecore e capre si sono potute rilevare delle medie di PP di $24,85 \pm 40,82$ nelle pecore e di $24,51 \pm 40,51$ nelle capre; la differenza tra queste due medie non è risultata statisticamente significativa ($F= 0,02$; $p= 0,900$).

I tassi di sieroprevalenza stratificati per stagione nelle pecore e nelle capre sono riportati nella Tabella 2.

Il confronto dei tassi di sieroprevalenza tra pecore e capre nelle diverse stagioni dell'anno è risultato sempre significativamente superiore nelle pecore rispetto alle capre, soprattutto nella stagione primaverile (51,8% vs 16,9%; $p= 0,000$) e invernale (53,9% vs 27,1%; $p= 0,000$) (Tabella 2).

I valori di OR per ogni stagione calcolati nelle pecore e nelle capre, insieme ai livelli di significatività rilevati per le differenze di sieroprevalenza nelle singole specie al test del χ^2 *trend*, sono riportati nelle Tabella 3, da cui si evince come si siano evidenziate delle differenze statisticamente significative nelle pecore, ma non nelle capre. Tali valori stratificati per ogni allevamento monitorato hanno invece evidenziato un *trend* stagionale non significativo in tre dei quattro allevamenti sia per le pecore (Sorradile, Musei ed Esportatu), come anche per le capre (Musei, Villagrande Strisaili ed Esportatu) (Tabelle 4, 5, 6 e 7).

Sempre nell'ambito dei singoli allevamenti i tassi di sieroprevalenza si sono rilevati sempre significativamente superiori nelle pecore rispetto alle capre, tranne in quello di Musei, in cui non si sono riscontrate differenze significative, dove i valori più elevati in questo caso si sono riscontrati nelle capre (34,2% vs 30,9%; $p= 0,525$) (Tabelle 4, 5, 6 e 7).

Il confronto tra le sieroprevalenze nell'ambito dello stesso allevamento tra pecore e capre ha generalmente evidenziato delle differenze costantemente significative negli allevamenti di Villagrande Strisaili e in tre stagioni su quattro nell'allevamento di Eporlatu (tranne l'autunno),

mentre nessuna differenza stagionale è stata evidenziata per questi valori tra le pecore e le capre di Musei e di Sorradile (Tabelle 4, 5, 6 e 7).

Il confronto dei tassi di sieroprevalenza per *T. gondii* tra le pecore dei 4 diversi allevamenti monitorati ha evidenziato delle differenze statisticamente significative (χ^2 con tre gradi libertà= 45,22; $p= 0,000$), così come anche tra le capre (χ^2 con tre gradi libertà= 13,72; $p= 0,003$), con tassi di sieroprevalenza sempre significativamente superiori nelle pecore rispetto alle capre ($p < 0,05$), ad eccezione di quello sito nel comune di Musei (SU) (34,2% vs 30,9%) anche se tale differenza non è risultata significativa ($\chi^2= 0,40$; $p= 0,524$) (Tabella 8).

Il confronto tra le medie delle Percentuali di Positività (PP) attuato tramite il test ANOVA ad una via, ha evidenziato delle differenze significative tra le varie stagioni per le pecore, con medie di PP più elevate in inverno ($47,50 \pm 44,55$) e più contenute in estate ($28,22 \pm 36,85$) ($F= 6,92$; $p= 0,000$), mentre per le capre non si sono evidenziate delle differenze statisticamente significative ($F= 1,13$; $p= 0,337$) (Tabella 9). Il confronto fra le medie di PP di ogni stagione delle pecore e delle capre ha evidenziato delle differenze significative al Test T in tutte le stagioni tranne che in estate (Tabella 9).

Nell'ambito dei differenti allevamenti monitorati, i valori medi di PP sono risultati in ogni stagione sempre superiori nelle pecore rispetto alle capre a Esporlatu ($p < 0,05$) e a Sorradile (in quest'ultimo allevamento tuttavia i valori significativamente superiori si riscontravano solo in autunno ($T= 2,64$; $p= 0,014$); anche a Villagrande, ad eccezione della stagione estiva, le medie di PP erano sempre superiori nelle pecore (in modo significativo in inverno e primavera), mentre a Musei le medie di PP, seppur in modo non significativo, erano superiori nelle capre rispetto alle pecore (Tabella 10).

L'analisi dei dati ottenuti tramite la stratificazione degli animali esaminati in tre differenti classi di età (≤ 3 anni; > 3 anni ≤ 6 anni; > 6 anni), ha consentito di rilevare un incremento dei valori di sieroprevalenza significativo così come dei valori di OR in linea con l'aumento dell'età degli animali esaminati (Tabella 11).

Il confronto delle medie di PP tra pecore e capre della stessa classe d'età, ha evidenziato delle differenze significative nei capi con età \leq ai 3 anni ($F= 10,76$; $p= 0,001$) e in quelli di età compresa

tra i 3 e i 6 anni ($F= 6,78$; $p= 0,009$), mentre tali differenze non si riscontrano tra pecore e capre di età > ai 6 anni ($F= 0,82$; $p= 0,367$).

Il confronto delle medie di PP in ogni singola classe d'età nei piccoli ruminanti esaminati, con le stagioni dell'anno, tramite il test ANOVA ad una via, ha evidenziato per ogni classe d'età delle pecore delle differenze significative stagionali ($p < 0,05$), mentre tali differenze non sono state riscontrate nell'ambito delle tre classi d'età delle capre ($p > 0,05$) (Tabella 12).

4.5. CONSIDERAZIONI

Il tipo di protocollo applicato ha consentito sicuramente di eliminare tutti i fattori legati all'ambiente di allevamento, *management*, alimentazione, ecc., che avrebbero potuto interferire con la comparazione della risposta umorale (IgG) stimolata dall'infezione di *T. gondii* nella pecora e nella capra di razza Sarda. Tutto questo è stato possibile in virtù del fatto che gli animali, anche se appartenenti a diversa specie, sono stati allevati dallo stesso proprietario, nelle stesse strutture e in presenza delle medesime condizioni ambientali hanno usufruito degli stessi pascoli ed eventuali integrazioni alimentari e trattamenti farmacologici.

In questa situazione, non comunemente riportata in precedenti esperienze, si è potuto stabilire con certezza che, le pecore da noi esaminate, hanno risposto in modo "più attivo" con la produzione di maggiori quantità di IgG rispetto alle capre, considerando globalmente, cioè tutti i dati complessivi rilevati nei 4 allevamenti monitorati, i risultati inerenti i tassi di sieroprevalenza e i valori di PP evidenziati.

Alla luce di quanto rilevato i nostri risultati si allineano con quanto riportato, in modo più generale (le osservazioni si riferiscono ad allevamenti "separati" di pecore e capre benché dello stesso territorio/regioni) da altri A.A., come Atil A.B. *et al.* (2017) in Sudan, Tonouhewa A.B.N. *et al.* (2017) in Africa, Rêgo W.M.F. *et al.* (2016) in Brasile, Ahmad N. *et al.* (2015) in Pakistan, Tzanidakis N. *et al.* (2012) in Grecia e Gazzonis A.L. *et al.* (2015) in Italia settentrionale.

Tutto questo sembrerebbe per cui confermare quanto riportato da Dubey J.P. (2009), che indicava la pecora come la specie più sensibile all'infezione. Inoltre i tassi superiori di sieroprevalenza sono risultati costantemente e significativamente superiori nelle pecore rispetto alle capre, anche quando questi dati sono stati stratificati per stagione, soprattutto nelle stagioni primaverili ed invernali. Tale situazione si ripete anche quando si esaminano i dati relativi alle sieroprevalenze stratificate per stagione nei singoli allevamenti, ad eccezione del periodo autunno-invernale a Sorradile, anche se in modo non significativo ($p > 0,05$) e in primavera a Villagrande Strisaili ($p < 0,000$), allevamento quest'ultimo in cui in questa stagione si è rilevato un rischio 43 volte superiore di riscontrare l'infezione nella capre rispetto alla pecora (OR= 43,17).

Al momento attuale sembrerebbe quindi presente una risposta anticorpale (IgG) differente per entità tra pecore e capre all'infezione da *T. gondii*, ancora purtroppo difficilmente attribuibile a

fattori precisi. Nel nostro caso, in considerazione della mancata influenza di fattori manageriali quali l'alimentazione, le aree pascolative, l'integrazione alimentare, interventi farmacologici, ecc., in quanto le pecore e le capre esaminate erano allevate insieme, è possibile che tali differenze possano essere spiegate con motivazioni diverse. Gazzonis A.L. *et al.* (2015) ipotizzano che tale differenze possano essere analoghe a quelle rilevate per le risposte contro i nematodi gastrointestinali, le quali risultano meno efficienti nelle capre rispetto alle pecore, anche se gli studi specifici pubblicati sulle differenze nella suscettibilità alla toxoplasmosi di queste due specie animali non sono molti (Innes E.A. *et al.*, 1997). Il riferimento alla spiegazione di tale fenomeno chiamando in causa altri fattori esterni, come il differente comportamento di gestione delle aziende agricole o alimentari per queste due specie animali, così come riportato sempre da Gazzonis A.L. *et al.* (2015), perlomeno nel nostro caso non sembra attendibile. Inoltre, a complicare in parte questo quadro, nel nostro caso si è potuto rilevare come le medie di PP tra pecore e capre, nonostante i livelli significativamente differenti di sieroprevalenza, non differiscono significativamente tra queste due specie animali.

E' evidente che per comprendere la dinamica della risposta immunitaria anticorpale tra piccoli ruminanti siano necessari ulteriori studi.

La risposta anticorpale nei confronti di *T. gondii* non appare uniforme nel territorio dell'isola, in quanto i tassi di prevalenza risultano sia per le pecore che per le capre differire in modo significativo tra i 4 allevamenti monitorati, segno evidente che situazioni ambientali e manageriali influenzano in modo importante tali valori, in analogia a quanto rilevato anche da A.A. (Gazzonis A.L. *et al.*, 2015; Ahmed N. *et al.*, 2016).

Per quanto concerne invece l'analisi dei dati in relazione alle variazioni stagionali durante l'arco dell'anno in cui i tassi di sieroprevalenza sono risultati globalmente più elevati, si è potuto evidenziare un significativo incremento in Sardegna di tali valori nelle pecore nel periodo invernale (OR= 2,10) e primaverile (OR= 1,93) rispetto al periodo estivo di riferimento (OR= 1,00); il *trend* dei livelli medi di sieroprevalenza non hanno rilevato invece alcuna differenza significativa per le capre ($p= 0,191$), in cui il livello di rischio più elevato, rispetto all'estate, stagione di riferimento, si è registrato in autunno (OR= 1,24). Anche quest'ultimo dato, se mai ce ne fosse ancora bisogno, segna un'ulteriore differenza tra il comportamento immunitario della pecora rispetto a quello della capra.

Tuttavia il *trend* stagionale delle sieroprevalenze non appare costante nei diversi allevamenti: ad esempio nell'allevamento di Sorradile si riscontrano tassi di sieroprevalenza più elevati in estate, sia nelle pecore che nelle capre, mentre in quello di Musei non si rilevano differenze significative tra le varie stagioni. Tale *trend* si è registrato generalmente anche confrontando i livelli di PP nell'ambito dei singoli allevamenti tra pecore e capre.

Sembrerebbe che in Sardegna non si possa riscontrare un chiaro e costante *trend* stagionale della sieroepidemiologia della toxoplasmosi nei piccoli ruminanti. Tali differenze di sieroprevalenze per stagioni riscontrate, in relazione soprattutto al tipo di infezione monitorata, può essere di difficile spiegazione. Tuttavia sempre Hejlíček K. & Literak I. (1994), a riguardo ipotizzano che la maggior sieroprevalenza riscontrata in primavera sia legata alla presenza in questa stagione di nuove generazioni di felini, molto sensibili al *Toxoplasma*, che determinerebbero un elevato inquinamento ambientale con le oocisti liberate con le feci. Mentre l'elevata incidenza di anticorpi rilevata in autunno in mattatoio può essere legata al fatto che per lo più in questa stagione le pecore vecchie che hanno figliato e che sono più frequentemente infettate da *T. gondii*, vengono macellate in numero maggiore proprio in questa stagione. In conclusione le differenze riscontrate potrebbero essere legate, non tanto alle influenze climatico-ambientali esercitate direttamente sugli animali, quanto invece a situazioni diverse relative ad altri fattori presenti nelle aziende (come la presenza di gatti giovani) o ad altri legati all'età degli animali esaminati in quella determinata stagione (per esempio pecore più anziane che sono significativamente riscontrate in misura superiore sieropositive per *T. gondii*) (Dubey J.P. & Welcome F.L., 1988). Le ulteriori differenze dei tassi di sieroprevalenza riscontrati sempre da Hejlíček K. & Literak I. (1994) nelle diverse stagioni tra pecore e capre sembrerebbero siano legate alla frequenza dei pascoli inquinati da oocisti in diversi momenti dell'anno. Nessuna differenza significativa dei tassi di sieroprevalenza tra pecore monitorate in primavera o in estate è stata invece rilevata da Armand B. *et al.* (2016).

Un'ulteriore conferma "epidemiologica" per ciò che concerne la toxoplasmosi nei piccoli ruminanti deriva dal fatto che l'esame dei dati stratificati per gli animali suddivisi per classi d'età ha confermato quanto rilevato da altri A.A., relativamente all'incremento dei tassi di sieroprevalenza negli animali via via più anziani (Dubey J.P. & Welcome F.L., 1988; Spisak F. *et al.*, 2010; Gazzonis A.L. *et al.*, 2015; Ahmed N. *et al.*, 2016), anche se alcuni report, "stranamente" non rilevano

differenze significative tra animali giovani ed adulti (Wang C.R. *et al.*, 2011; Rêgo W.M.F. *et al.*, 2016; Armand B. *et al.*, 2016).

Anche i risultati di questa fase della ricerca hanno evidenziato infatti un incremento significativo delle sieroprevalenze nelle pecore e soprattutto nelle capre: nei capi di età \geq ai 6 anni si riscontravano infatti valori di OR di 2,31 e 3,43 rispettivamente nelle pecore e nelle capre, rispetto alla classe dei capi di età \leq 3 anni. E' evidente che, anche per la toxoplasmosi, si possa parlare nei nostri casi di infezione parassitaria ad "accumulo", in quanto con l'età aumenta la possibilità di ingestione di oocisti.

A riguardo si è potuto notare inoltre, quale ulteriore fattore di diversificazione tra pecora e capra, che le medie di PP stratificate per stagione nei soggetti di ogni classe d'età abbia rilevato delle significative differenze nelle pecore di tutte e tre le classi di età, mentre ciò non è avvenuto per nessuna delle tre classi di età nelle capre. Anche in questo caso, stante lo stesso tipo di allevamento riservato agli animali di queste due specie animali analizzate in questa fase della ricerca, possiamo tranquillamente affermare che il differente comportamento rilevato debba essere attribuito esclusivamente a risposte differenti adottate dalla specie animale di fronte agli stessi fattori.

In ogni caso anche questa fase della ricerca, purtroppo, conferma la non sottovalutabile diffusione della toxoplasmosi tra i piccoli ruminati allevati in Sardegna, soprattutto degli ovini, che possono così costituire un importante rischio zoonosico per l'uomo.

I dati rilevati in Sardegna sembrerebbero, almeno nelle pecore, abbastanza sovrapponibili con quanto riscontrato recentemente anche in Toscana, in cui viene riportata una sieroprevalenza variabile dal 25 al 43% (Mancianti F. *et al.*, 2013).

I tassi di sieroprevalenza da noi riscontrati, sia nei campioni di siero delle pecore (44,9%) come nelle capre (24,3%), sembrerebbero inoltre indicare un *trend* in aumento rispetto a quanto riscontrato in precedenza sempre in Sardegna da Masala G. *et al.* (2003), che riscontrano valori del 28,4% negli ovini e del 12,3% nelle capre. A riguardo si potrebbe ipotizzare, che tali incrementi delle sieroprevalenze possano essere attribuiti anche ai cambiamenti climatici, che così come affermato

da Patz J.A. *et al.* (2000), si sono resi responsabili di un aumento delle infezioni da *T. gondii* in diverse regioni del mondo a causa delle mutate condizioni ambientali (Patz J.A. *et al.*, 2000).

Da rilevare come la reale prevalenza per la toxoplasmosi ovina, in considerazione dei risultati ottenuti anche in questa ricerca tramite sempre il test ELISA condotto su siero di carne (Fase sperimentale 1 – Valutazione dell’efficacia dell’ELISA e PCR nei confronti di *T. gondii* nell’ovino), possano essere anche decisamente più elevati.

Purtroppo tuttavia gli interventi di profilassi, inerenti ad esempio l’informazione sanitaria, attuati per gli addetti ai lavori, appaiono al momento attuale del tutto insufficienti o talvolta inesistenti. E’ evidente quindi, che nonostante l’importanza universalmente ormai attribuita a tale zoonosi, le “attenzioni” nei suoi confronti appaiono nettamente insufficienti: si può forse parlare anche per la toxoplasmosi nei nostri territori di zoonosi negletta? A giudicare da quanto sino ad oggi si è attuato in termini di misure di controllo nei suoi confronti, sicuramente sì! Nonostante tutto, ad esempio proprio in Sardegna, la toxoplasmosi viene indicata come una delle principali cause di aborto negli ovini. La storia purtroppo ci insegna che, in analogia a quanto avviene ad esempio per l’Echinococcosi, malattie da sempre presenti nel territorio, con tassi di prevalenza molto elevati, così come anche i rischi zoonosici e i danni zootecnici, ma con una sintomatologia non evidente e, come la toxoplasmosi, non facile da diagnosticare di *routine* (vedi ad esempio gli aborti), non sembrerebbero destare grandi preoccupazioni tra gli addetti ai lavori e nella classe politica, spesso poco sensibile a queste patologie e più incline a controllare patologie più mediatiche come West Nile, TSE, ecc..

4.6. CONCLUSIONI

Le pecore da noi esaminate hanno risposto in modo “più attivo” con la produzione di quantità di IgG superiori rispetto alle capre, considerando globalmente, cioè tutti i dati complessivi rilevati nei 4 allevamenti monitorati, i risultati inerenti i tassi di sieroprevalenza e i valori delle Percentuali di Positività evidenziati.

Tuttavia, anche sulla base dei risultati ottenuti sembrerebbe essere presente una risposta anticorpale (IgG) differente per entità tra pecore e capre all’infezione da *T. gondii*, ancora purtroppo difficilmente attribuibile a specifici fattori, se non ad una caratteristica legata esclusivamente alla specie. Differenze che si sono peraltro manifestate anche in altre situazioni, quali ad esempio una maggior variabilità/sensibilità della risposta anticorpale al *trend* stagionale più evidente nella pecora, anche nell’ambito delle singole classi d’età.

Per quanto concerne invece alcuni altri aspetti epidemiologici, si è rilevato un maggior coinvolgimento dei soggetti più anziani nei confronti dell’infezione, nonché purtroppo confermato la preoccupante diffusione della toxoplasmosi tra i piccoli ruminanti della Sardegna, che rappresentano un importante fattore di rischio per l’insorgenza dell’infezione nell’uomo.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, N.; Iqbal, Z.; Mukhtar, M.; Mushtaq, M.; Khan, K.M.; Qayyum, M. (2015). Seroprevalence and associated risk factors of Toxoplasmosis in sheep and goats in Pothwar region, Northern Punjab, Pakistan. *Pak J Zool*, **1**: 161-167.
- Ahmed, H.; Malik, A.; Arshad, M.; Mustafa, I.; Khan, M.R.; Sohail Afzal, M.; Ali, S.; Mobeen, M.; Simsek, S. (2016). Seroprevalence and Spatial Distribution of Toxoplasmosis in Sheep and Goats in North-Eastern Region of Pakistan. *Korean J Parasitol*, **54**(4): 439-446.
- Amdouni, Y.; Rjeibi, M.R.; Rouatbi, M.; Amairia, S.; Awadi, S.; Gharbi, M. (2017). Molecular detection of *Toxoplasma gondii* infection in slaughtered ruminants (sheep, goats and cattle) in Northwest Tunisia. *Meat Science*, **133**: 180-184.
- Armand, B.; Solhjoo, K.; Shabani-Kordshooli, M.; Davami, M.H.; Sadeghi, M. (2016). *Toxoplasma* infection in sheep from south of Iran monitored by serological and molecular methods; risk assessment to meat consumers. *Veterinary World*, **9**(8): 850-855.
- Atail, A.B.; Ibrahaem, H.H.; Shuaib, Y.A.; Mohamed, A.K.; Suliman, S.E.; Idris, S.H.; Abdalla, M.A. (2017). Sero-prevalence of Toxoplasmosis in sheep and goats in El-Gadarif state. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, **4**(2): 207-213.
- Buxton, D.; Maley, S.W.; Wright, S.E.; Rodger, S.; Bartley, P.; Innes, E.A. (2007). *Toxoplasma gondii* and ovine Toxoplasmosis: New aspects of an old story. *Vet Parasitol*, **149**(1): 25-28.
- Da Silva, A.F.; Brandão, F.Z.; Oliveira, F.C.R.; Ferreira, A.M.R. (2013). *Toxoplasma gondii* in the sheep industry: A global overview and the situation in Brazil. *Rev Bras Ciên Vet*, **20**(4): 179-188.
- Dubey, J.P. & Welcome, F.L. (1988). *Toxoplasma gondii* induced abortion in sheep. *J Amer veter med Assoc*, **193**: 697-700.
- Dubey, J.P. (2009a). Toxoplasmosis in pigs: The last 20 years. *Vet Parasitol*, **164**: 89-103.
- Dubey, J.P. (2009b). Toxoplasmosis in sheeps: The last 20 years. *Vet Parasitol*, **152**: 25-80.
- Gazzonis, A.L.; Veronesi, F.; Di Cerbo, A.R.; Zanzani, S.A.; Molineri, G.; Moretta, I.; Moretti, A.; Piergili Fioretti, D.; Invernizzi, A.; Manfredi, M.T. (2015). *Toxoplasma gondii* in small ruminants in Northern Italy – prevalence and risk factors. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **22**(1): 62-68.
- Glor, S.B.; Edelhofer, R.; Grimm, F.; Deplazes, P.; Basso, W. (2013). Evaluation of a commercial ELISA kit for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in serum, plasma and meat juice from experimentally and naturally infected sheep. *Parasites and Vectors*, **6**: 85-96.
- Hejlíček, K. & Literak, I. (1994). Incidence and prevalence of Toxoplasmosis among sheep and goat in southern and western Bohemia. *Acta Vet Brno*, **63**: 151-159.
- Innes, E.A. (1997). Toxoplasmosis: Comparative species susceptibility and host immune response. *Comp Immunol Microb*, **20**(2): 131-138.
- Mancianti, F.; Nardoni, S.; D'Ascenzi, C.; Pedonese, F.; Mugnaini, L.; Franco, F.; Papini, R. (2013). Seroprevalence, detection of DNA in blood and milk, and genotyping of *Toxoplasma gondii* in a goat population in Italy. *BioMed Research International*, 905326.
- Masala, G.; Porcu, R.; Madau, L.; Tanda, A.; Ibba, B.; Satta, G.; Tola, S. (2003). Survey of ovine and caprine Toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. *Veterinary Parasitology*, **117**: 15-21.
- Patz, J.A.; Graczyk, T.K.; Geller, N.; Vittor, A.Y. (2000). Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int J Parasitol*, **30**(12): 1395-1405.

Ramzan, M.; Akhtar, M.; Muhammad, F.; Hussain, I.; Hiszczyńska Sawicka, E.; Haq, A.U.; Mahmood, M.S.; Hafeez, M.A. (2009). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in Rahim Yar Khan (Punjab), Pakistan. *J Trop Anim Health Prod*, **4**: 1225-1229.

Rêgo, W.M.F.; Paula, N.R.O.; Vitor, R.W.A.; Silva, R.A.B.; Diniz, B.L.M.; Sousa, M.M.; Coelho, W.A.C.; Porfirio, K.P.; Pinheiro R.R.; Alves, F.S.F.; Cavalcante A.C.R.; Cardoso, J.F.S. (2016). Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in goats and sheep raised in the State of Piauí in northeast Brazil. *Small ruminant research*, **141**: 17-23.

Spišák, F.; Turčeková, L.; Reiterová, K.; Špilovská, S.; Dubinský, P. (2010). Prevalence estimation and genotypization of *Toxoplasma gondii* in goats. *Biologia*, **65**(4): 670-674.

Tegegne, D.; Kelifa, A.; Abdurahaman, M.; Yohannes, M. (2016). Seroepidemiology and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in Southwestern Ethiopia. *Veterinary Research*, **12**: 280-285.

Tonouhewa, A.B.N.; Akpo, Y.; Sessou, P.; Adoligbe, C.; Yessinou, E.; Hounmanou, Y.G.; Assogba, M.N.; Youssao, I.; Farougou, S. (2017). *Toxoplasma gondii* infection in meat animals from Africa: Systematic review and meta-analysis of sero-epidemiological studies. *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916, Available at www.veterinaryworld.org/Vol.10/February-2017/10.pdf.

Tzanidakis, N.; Maksimov, P.; Conraths, F.J.; Kiossis, E.; Brozos, C.; Sotiraki, S.; Schares, G. (2012). *Toxoplasma gondii* in sheep and goats: Seroprevalence and potential risk factors under dairy husbandry practices. *Vet Parasitol*, **190**(3-4): 340-348.

Wang, C.R.; Qui, J.H.; Gao, J.F.; Liu, M.N.; Wang, C.; Liu, Q.; Yan, C.; Zhu, X.Q. (2011). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in sheep and goats in northeastern China. *Small Ruminants Research*, **97**: 130-133.

TABELLE E GRAFICI

Tabella 1. Numero di pecore e capre esaminate per stagione nei quattro allevamenti monitorati in Sardegna.

COMUNE	PECORE ESAMINATE				CAPRE ESAMINATE			
	Estate	Autunno	Inverno	Primavera	Estate	Autunno	Inverno	Primavera
<i>Sorradile</i>	29	25	19	17	40	36	29	21
<i>Musei</i>	50	46	46	39	40	40	39	36
<i>Villagrande</i>	50	44	43	43	40	35	28	25
<i>Esporlatu</i>	47	42	44	42	39	39	37	36
Totale esaminate	176	157	152	141	159	150	133	118

Tabella 2. Numero totale animali esaminati, tassi di sieroprevalenza, valori di *Odds Ratio* (OR) e valori di significatività al test del χ^2 per il confronto tra pecore e capre.

STAGIONI	PECORE			CAPRE			<i>Odds Ratio</i>	χ^2 test
	N°	Positive	Prevalenza (%)	N°	Positive	Prevalenza (%)		
<i>Estate</i>	176	63	35,8	159	39	24,5	1,72 (1,4<OR<2,84)	$\chi^2= 5,01$; $p= 0,025$
<i>Autunno</i>	157	63	40,1	150	43	28,7	1,67 (1,01<OR<2,76)	$\chi^2= 5,46$; $p= 0,034$
<i>Inverno</i>	152	82	53,9	133	36	27,1	3,16 (1,86<OR<5,36)	$\chi^2= 21,12$; $p= 0,000$
<i>Primavera</i>	141	73	51,8	118	20	16,9	5,26 (2,83<OR<9,85)	$\chi^2= 33,85$; $p= 0,000$
TOTALE	626	281	44,9	560	138	24,6	2,54 (1,97<OR<3,29)	$\chi^2= 55,74$; $p= 0,000$

Tabella 3. Valori di *Odds Ratio* per stagione nelle pecore e nelle capre e livelli di significatività al test del χ^2 trend.

SPECIE	ESTATE	AUTUNNO	INVERNO	PRIMAVERA	χ^2 trend
<i>Pecora</i>	1,00	1,20	2,10	1,93	χ^2 trend= 12,428; $p= 0,00042$
<i>Capra</i>	1,00	1,24	1,14	0,63	
Odds Ratio					χ^2 trend= 1,707; $p= 0,1914$

Tabella 4. Numero totale animali esaminati, tassi di sieroprevalenza, valori di *Odds Ratio* (OR) e valori di significatività al test del χ^2 per il confronto tra pecore e capre nel gregge del comune di Sorradile.

STAGIONI	PECORE			CAPRE			Odds Ratio	χ^2 test
	N°	Positive	Prevalenza (%)	N°	Positive	Prevalenza (%)		
<i>Estate</i>	29	13	44,8	40	14	35	1,51 (0,51<OR<4,51)	$\chi^2= 0,68$; $p= 0,409$
<i>Autunno</i>	25	4	16	36	2	5,6	3,24 (0,45<OR<28,30)	$\chi^2*= 0,83$; $p= 0,362$
<i>Inverno</i>	19	4	21,1	29	3	10,3	2,31 (0,36<OR<15,54)	$\chi^2*= 0,37$; $p= 0,542$
<i>Primavera</i>	17	5	29,4	21	1	4,8	8,33 (0,76<OR<213,06)	$\chi^2*= 2,24$; $p= 0,104$
TOTALE	90	26	28,9	126	20	15,9	2,15 (1,06<OR<4,39)	$\chi^2= 5,31$; $p= 0,021$

*= test del χ^2 del corretto secondo Yates.

Tabella 5. Numero totale di animali esaminati, tassi di sieroprevalenza, valori di *Odds Ratio* (OR) e valori di significatività al test del χ^2 per il confronto tra pecore e capre nel gregge del comune di Musei.

STAGIONI	PECORE			CAPRE			Odds Ratio	χ^2 test
	N°	Positive	Prevalenza (%)	N°	Positive	Prevalenza (%)		
<i>Estate</i>	50	16	32	40	11	27,5	1,24 (0,45<OR<3,42)	$\chi^2= 0,21$; $p= 0,643$
<i>Autunno</i>	46	15	32,6	40	16	40	0,73 (0,27<OR<1,92)	$\chi^2= 0,51$; $p= 0,476$
<i>Inverno</i>	46	18	39,1	39	20	51,3	0,61 (0,23<OR<1,58)	$\chi^2= 1,26$; $p= 0,261$
<i>Primavera</i>	39	7	17,9	36	6	16,7	1,09 (0,79<OR<4,23)	$\chi^2= 0,02$; $p= 0,883$
TOTALE	181	56	30,9	155	53	34,2	0,40 (0,53<OR<1,40)	$\chi^2= 0,40$; $p= 0,525$

Tabella 6. Numero totale animali esaminati, tassi di sieroprevalenza, valori di *Odds Ratio* (OR) e valori di significatività al test del χ^2 per il confronto tra pecore e capre nel gregge del comune di Villagrande Strisaili.

STAGIONI	PECORE			CAPRE			Odds Ratio	χ^2 test
	N°	Positive	Prevalenza (%)	N°	Positive	Prevalenza (%)		
Estate	50	10	20	40	8	20	1,00 (0,32<OR<3,19)	$\chi^2= 0,00$; $p= 1,00$
Autunno	44	23	52,2	35	6	17,1	5,29 (1,66<OR<17,67)	$\chi^2= 10,25$; $p= 0,001$
Inverno	43	38	88,4	28	6	21,4	36,73 (8,86<OR<169,91)	$\chi^2= 30,81$; $p= 0,000$
Primavera	43	39	17,9	25	7	28	43,17 (10,51<OR<241,11)	$\chi^2= 42,77$; $p= 0,000$
TOTALE	180	110	90,7	128	27	21,1	5,88 (3,39<OR<10,24)	$\chi^2= 48,51$; $p= 0,000$

Tabella 7. Numero totale animali esaminati, tassi di sieroprevalenza, valori di *Odds Ratio* (OR) e valori di significatività al test del χ^2 per il confronto tra pecore e capre nel gregge del comune di Esportatu.

STAGIONI	PECORE			CAPRE			Odds Ratio	χ^2 test
	N°	Positive	Prevalenza (%)	N°	Positive	Prevalenza (%)		
Estate	47	24	51,1	39	6	15,4	5,74 (1,84<OR<18,71)	$\chi^2= 11,94$; $p= 0,000$
Autunno	42	21	50	39	19	48,7	1,05 (0,40<OR<2,76)	$\chi^2= 0,01$; $p= 0,908$
Inverno	44	22	50	37	7	18,9	4,29 (1,11<OR<13,46)	$\chi^2= 8,45$; $p= 0,003$
Primavera	42	22	52,4	36	6	16,7	5,50 (1,71<OR<18,50)	$\chi^2= 10,74$; $p= 0,001$
TOTALE	175	89	50,9	151	38	25,2	3,08 (1,87<OR<5,08)	$\chi^2= 22,50$; $p= 0,000$

Tabella 8. Confronto dei tassi di sieroprevalenza per *T. gondii* tra le pecore e le capre dei 4 diversi allevamenti monitorati (test del χ^2).

LOCALITA'	PECORE			CAPRE			χ^2 P
	N°	Positive (N°)	%	N°	Positive (N°)	%	
Sorradile	90	26	28,9	126	20	15,9	$\chi^2= 5,31$; $p= 0,021$
Musei	181	56	30,9	155	53	34,2	$\chi^2= 0,40$; $p= 0,524$
Villagrande S.	180	110	61,1	128	27	21,1	$\chi^2= 48,51$; $p= 0,000$
Esporlatu	175	89	50,8	151	38	25,2	$\chi^2= 22,50$; $p= 0,000$
χ^2 con tre gradi di libertà		45,22		13,72			
p		0,000		0,003			

Tabella 9. Medie delle Percentuali di Positività (PP) in pecore e capre nelle diverse stagioni (Test ANOVA).

STAGIONE	PECORE	CAPRE	Test T
	MEDIA PP	MEDIA PP	
Estate	28,2±36,9	24,2	T= 0,95; $p= 0,34$
Autunno	34,7±39,4	24,2	T= 2,41; $p= 0,017$
Inverno	47,5±44,6	30,0	T= 3,27; $p= 0,001$
Primavera	39,6±36,0	20,8	T= 3,93; $p= 0,000$
ANOVA	6,92	1,13	
p	0,000	0,337	

Tabella 10. Media e deviazione standard (DS) dei valori di PP nelle varie stagioni in pecore e capre nei 4 allevamenti monitorati e livelli di significatività (P) delle loro differenze tra le due specie animali (Test ANOVA).

LOCALITÀ	STAGIONE	PECORE	CAPRE	Test T
		(PP) ± D.S.	(PP) ± D.S.	
Sorradile	Estate	44,27 ± 49,20	34,73 ± 44,04	T= 0,83; p= 0,41
	Autunno	21,0 ± 35,2	2,2 ± 5,98	T= 2,64; p= 0,014
	Inverno	19,0 ± 24,1	14,4 ± 28,2	T= 0,60; p= 0,55
	Primavera	32,1 ± 39,9	19,5 ± 36,3	T= 1,11; p= 0,28
Musei	Estate	23,9 ± 30,9	26,4 ± 40,2	T= 0,33; p= 0,75
	Autunno	29,3 ± 34,3	36,6 ± 44,3	T= -0,85; p= 0,40
	Inverno	34,3 ± 36,1	56,0 ± 54,3	T= 2,13; p= 0,037
	Primavera	16,4 ± 22,1	19,5 ± 36,3	T= 0,67; p= 0,67
Villagrande	Estate	9,1 ± 10,2	13,6 ± 26,6	T= 1,00; p= 0,32
	Autunno	33,1 ± 28,2	22,6 ± 42,4	T= 1,26; p= 0,21
	Inverno	79,6 ± 47,8	20,8 ± 34,8	T= 5,99; p= 0,000
	Primavera	68,9 ± 31,0	40,3 ± 56,2	T= 2,34; p= 0,026
Esportatu	Estate	43,2 ± 41,9	22,1 ± 45,3	T= 2,22; p= 0,029
	Autunno	50,6 ± 51,6	33,0 ± 33,6	T= 1,82; p= 0,072
	Inverno	42,3 ± 39,1	21,9 ± 43,2	T= 2,21; p= 0,030
	Primavera	34,3 ± 30,3	20,3 ± 38,0	T= 1,78; p= 0,08

Tabella 11. Confronto tra i tassi di sieroprevalenze riscontrate nelle pecore e capre di differenti classi d'età (test χ^2 trend) e rispettivi valori di Odds Ratio.

	N°	Positive (N°)	%	Odds Ratio (OR)
PECORE				
≤ 3 anni	42	124	33,9	1,00
> 3 anni ≤ 6 anni	251	104	41,4	1,38
> 6 anni	166	90	54,2	2,31
χ^2 trend	12,467; p= 0,000			
CAPRE				
≤ 3 anni	94	14	14,9	1,00
> 3 anni ≤ 6 anni	235	58	24,7	1,87
> 6 anni	88	33	37,5	3,43
χ^2 trend	12,467; p= 0,000			

Tabella 12. Confronto tra le Percentuali di Positività (PP) di ogni stagione negli animali di ogni classe di età (Test ANOVA).

		<i>≤ 3 ANNI</i>	<i>> 3 ANNI ≤ 6 ANNI</i>	<i>> 6 ANNI</i>
PECORE	ANOVA	F= 2,61; p= 0,055	F= 3,71; p= 0,012	F= 2,61; p= 0,055
	CAPRE	F= 1,64; p= 0,185	F= 0,87; p= 0,456	F= 1,65; p= 0,184

CAPITOLO V

5. FASE SPERIMENTALE 3 – SIEROPREVALENZA E DINAMICA DEGLI ANTICORPI NEI CONFRONTI DI *TOXOPLASMA GONDII* IN AGNELLI DI RAZZA SARDA NATI DA MADRI SIEROPOSITIVE E SIERONEGATIVE.

5.1. BACKGROUND

La mancanza di dati in letteratura scientifica sull'entità della trasmissione di anticorpi nei confronti di *T. gondii* dalle pecore ai loro agnelli e il perdurare di questa immunità passiva tramite l'ingestione del colostro ci ha indotto ad attuare il presente *step*. Per questo ovviamente è stata presa in considerazione questa via di trasmissione dell'immunità passiva nei ruminanti, in quanto è la sola che possa garantire uno stato di immunità al neonato sino all'instaurarsi del suo sistema immunitario (Brujeni G.N. *et al.*, 2010).

Il trasferimento delle immunoglobuline contenute nel colostro, negli agnelli avviene attraverso la barriera intestinale durante le prime 12 ore dopo la nascita ed è mediata da diversi meccanismi, quali la permeabilità e la pinocitosi degli enterociti. Tuttavia l'incremento delle secrezioni abomasali e l'attività proteolitica della mucosa intestinale (Kruse P.E., 1983; Bessi R.P. *et al.*, 2002), così come la ridotta abilità delle cellule intestinali del tenue ad assorbire le immunoglobuline, tende a bloccare l'assorbimento delle stesse entro poco tempo dalla nascita (Quigley J., 2001).

Negli agnelli neonatali, meccanismi mediati dal recettore FcRn (*Neonatal Fc receptor*) svolgono un ruolo importante nel metabolismo delle IgG (Tizard I.R., 2004). Per questa categoria di agnelli è importante avere un adeguato apporto di IgG nei primi giorni, così come il "mantenimento" delle IgG assorbite durante le prime ore di vita, che ovviamente garantirà un livello più elevato di protezione contro le malattie, soprattutto quelle neonatali.

Gilbert R.P. *et al.* (1988) hanno evidenziato che il contenuto di IgG nel siero degli agnelli neonati ha un *background* genetico, infatti è stata anche suggerita la selezione di razze con una concentrazione superiore di IgG nel colostro per assicurare un adeguato trasferimento dell'immunità passiva ai loro agnelli. In questo caso, ulteriori ricerche potrebbero concentrarsi sul

recettore neonatale Fc per chiarire alcuni aspetti legati alle differenti concentrazioni di IgG e alle variazioni del profilo delle IgG tra le diverse razze di ovini. Fino ad ora, l'associazione dei polimorfismi FcRn con trasferimento passivo di IgG sono stati rilevati esclusivamente per i bovini (Clawson M.L. *et al.*, 2004; Laegreid W.W. *et al.*, 2002).

Forse l'importanza del monitoraggio del trasferimento dell'immunità passiva per *T. gondii*, apparentemente potrebbe sembrare meno interessante rispetto a quella suscitata da altre patologie neonatali, tuttavia non si può escludere che questo tipo di immunità possa salvaguardare l'agnello dall'infezione, indotta dal protozoo, potenzialmente acquisibile nel primo periodo di vita.

5.2. OBIETTIVO

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare il passaggio degli anticorpi nei confronti di *Toxoplasma* dalla pecora all'agnello attraverso il colostro e il perdurare di questa immunità passiva tramite l'ingestione del colostro.

5.3. MATERIALI E METODI

Per valutare il passaggio degli anticorpi (IgG) nei confronti di *Toxoplasma* dalla pecora all'agnello tramite il colostro, nel corso del 2016 sono stati condotti dei campionamenti presso tre allevamenti di ovini di razza Sarda del nord Sardegna, siti nei comuni di Pozzomaggiore, Nulvi e Ploaghe localizzati nella provincia di Sassari. La nostra ricerca è stata articolata in due fasi.

La prima fase ha riguardato le pecore: 30-45 giorni prima del parto sono stati prelevati ed analizzati complessivamente i sieri di 47 pecore, di cui 27 sono risultate sieropositive nei confronti di *T. gondii*. Mentre la seconda fase, ha interessato gli agnelli nati dalle pecore sieropositive e sieronegative esaminate nella prima fase. Subito dopo il parto, sugli agnelli, sono stati effettuati una serie di prelievi di sangue avvenuti in tempi differenti: a 24 e 48 ore dopo l'assunzione del colostro, e successivamente a distanza di 30, 60, 75 e 90 giorni dalla nascita.

Da ciascun animale mediante l'utilizzo di una cannula sterile, sono stati prelevati dalla vena giugulare circa 10 ml di sangue in provette *Vacutainer*[®] monouso, refrigerate a 4 °C fino all'arrivo in laboratorio. Durante il monitoraggio, pecore e relativi agnelli hanno continuato a vivere e pascolare nelle stesse condizioni esistenti prima dell'indagine, anche se purtroppo 9 agnelli (4 nati da pecore sieropositive e 5 nati da pecore sieronegative), durante il periodo di monitoraggio sono deceduti per altre cause (attacco di cani randagi ed infezioni da enteropatogeni).

Si è ritenuto opportuno valutare la presenza di anticorpi IgG1 negli agnelli tra le 24 e 48 ore dalla nascita, in quanto in questo momento a livello enterico, dopo l'assunzione del colostro, si registra un livello più elevato di anticorpi (Stott G.H. *et al.*, 1979).

5.3.1. Indagine sierologica

Per le analisi sierologiche si è optato per l'utilizzo di un test ELISA, in quanto ritenuto, insieme al "*Radial Immunodiffusion Test*", tra i metodi più appropriati che consentono di misurare direttamente la concentrazione di IgG nella valutazione del "*Passive Transfer Status*" (PTS) (Weaver D.M. *et al.*, 2000).

Nel presente *step* dell'indagine si è quindi proceduto con l'uso del kit commerciale ELISA *PrioCHEK® Toxoplasma Ab SR* (Prionics, Schlieren-Zurich, Switzerland) per piccoli ruminanti.

Il kit include delle piastre ELISA trattate con colture cellulari derivate da antigeni di tachizoiti di *T. gondii*, una perossidasi marcata per anticorpi secondari anti- piccoli ruminanti, come substrato cromogeno il tetrametil-benzidina, *standards* e soluzione *buffer*. I campioni di sangue sono stati centrifugati con una centrifuga (*Centrifuge 5804 R, Eppendorf*) a 2000 rpm per 10 minuti. Dopo la centrifugazione con la quale è stata ottenuta la separazione del siero dalla parte corpuscolata, il siero è stato raccolto e trasferito in tubi *Eppendorf* da 1,5 ml. I campioni di siero sono stati prima congelati a -20 °C e successivamente conservati a -80 °C fino all'esecuzione delle analisi.

I campioni di siero successivamente sono stati esaminati alla diluizione finale di 1:100 con soluzione *buffer*. La Densità Ottica (DO) è stata misurata a 450 nm e i risultati del test interpretati calcolando per ogni campione la percentuale di positività (PP) secondo la seguente formula: $PP \text{ campione} = \frac{DO \text{ 450 nm del campione esaminato}}{DO \text{ 450 nm del controllo positivo}} \times 100$. Un valore ≥ 20 è stato, a priori, considerato positivo (così come suggerito nel manuale del kit); mentre valori di $PP < 20$ sono stati considerati negativi.

Il test ELISA utilizzato è accreditato di una sensibilità relativa compresa tra il 93,3 e il 100% e una specificità relativa tra il 96,9% e il 100% nei confronti rispettivamente all'Immunofluorescenza Indiretta (IFI) e all'Emoagglutinazione Indiretta (IHA) (Glor S.B. *et al.*, 2013).

5.3.2. Analisi dei dati

Tutti i dati ottenuti sono stati implementati in un foglio elettronico Excel ed elaborati statisticamente mediante i *software Epi-Info (version 7.0, CDC/WHO, Atlanta, GA, USA)* e *Minitab®16.2 (Minitab Inc. 2012)*.

La correlazione tra i livelli anticorpali delle madri e quelli dei rispettivi agnelli nelle varie fasi del monitoraggio è stata analizzata tramite il *coefficiente di correlazione di Pearson*. Valori di $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

5.4. RISULTATI

Tutti i dati relativi alle sieroprevalenze ottenute dalle pecore gravide sieropositive (N° 27) e dai loro agnelli dopo l'assunzione del colostro entro le prime 48 ore di vita, sono riportate nel Grafico 1, insieme ai corrispondenti valori di *Odds Ratio* (OR), mentre i valori relativi alle Percentuali di Positività (PP) sono riportati nel Grafico 2.

Dall'esame del Grafico 1, si evidenzia come gli anticorpi diretti contro *T. gondii*, siano visibili in oltre il 90% degli agnelli nati da pecore sieropositive già nelle prime 48 ore di vita, e in che modo tali valori di sieroprevalenza tendano a decrescere in modo regolare e significativo (χ^2 trend= 48,240; $p= 0,000$), per raggiungere i valori minimi (8,7%) alla fine del periodo del monitoraggio (90 giorni), quando raggiungono anche i valori minimi di OR (OR= 0,008), rispetto agli agnelli di massimo 48 ore di vita (OR= 1,00). Da rilevare che un decremento significativo dei tassi di sieroprevalenza si registrava già tra gli agnelli di 48 ore di vita e quelli di 15 giorni (92,6% vs 61,5% - χ^2 corretto= 5,267; $p= 0,017$). Stesso trend si rileva anche per i valori medi di PP, in cui negli agnelli di 48 ore di vita si rileva una media significativa di PP superiore alle madri (PP= 64,3 vs a PP= 50,3) (Test $T - T= -2,14$; $p= 0,042$) (Tabella 2). Livelli medi simili di PP si riscontrano invece tra le madri sieropositive e gli agnelli di 15 giorni (PP= 50,3 vs PP= 49,4).

Il confronto delle medie di PP tra le madri sieronegative e i loro agnelli ha evidenziato ugualmente dei valori significativamente maggiori negli agnelli di massimo 48 ore di vita (PP= 21,9 vs PP= 12,2) (Test $T - T= -5,12$; $p= 0,000$), mentre tale confronto tra le madri e i figli dai 15 giorni in su non ha più rilevato differenze significative ($p > 0,05$).

Tutti i dati relativi alle sieroprevalenze ottenute sulle pecore gravide sieronegative (N° 20) e ai loro agnelli, sono riportate nel Grafico 3, insieme ai corrispondenti valori di *Odds Ratio*, mentre i valori di PP sono riportati nel Grafico 4.

Negli agnelli nati dalle pecore sieronegative si rilevano valori di sieroprevalenza del 60% in quelli con 48 ore di vita e del 10% in quelli di 15 giorni, mentre già a 30 giorni e sino alla fine del periodo di monitoraggio tutti gli agnelli risultano sieronegativi (Grafico 3).

Anche in questo caso quindi è stato osservato un trend in diminuzione delle sieroprevalenze significativo (χ^2 trend= 60,25; $p = 0,000$).

Nelle Tabelle 1 e 2 sono riportati rispettivamente i valori delle correlazioni (*Coefficiente R* e livello di significatività *p*) ottenuti tra le PP delle madri sieropositive e sieronegative e i loro agnelli nei diversi momenti del monitoraggio.

Gli indici di correlazione delle Percentuali di Positività (PP) elaborati tra le madri sieropositive e i rispettivi agnelli hanno evidenziato dei valori positivi significativi alle 48 ore di vita degli agnelli, ma anche a 15 giorni, a 45 giorni e a 75 giorni dalla nascita (Tabella 1). Mentre le correlazioni tra madri sieronegative e i rispettivi agnelli non hanno mai rilevato correlazioni significative in nessun momento del monitoraggio; una tendenza alla significatività ($p= 0,51$) si evidenzia solo con gli agnelli a 30 giorni dalla loro nascita (Tabella 2).

Il confronto tra le medie di PP attuato tramite il test *ANOVA* a una via, ha sempre evidenziato delle differenze significative tra le madri sieropositive e sieronegative e nei rispettivi agnelli nei diversi momenti del monitoraggio (Tabella 3 e Tabella 4).

5.5. CONSIDERAZIONI

Questo *step* dell'indagine ha consentito di valutare l'entità del passaggio di anticorpi dal colostro agli agnelli e la loro persistenza.

La particolare struttura della placenta negli ovini, così come nei ruminanti in generale, è risaputo che non consente il passaggio di anticorpi dalla madre al feto durante il periodo della gravidanza. Infatti la placenta sindesmocoriale, tipica dei ruminanti, è caratterizzata da un sincizio tra l'endometrio materno e il trofoectoderma fetale, che separa il circolo fetale da quello materno, prevenendo quindi la trasmissione di immunoglobuline in utero (Arthur G.H., 1996). Di conseguenza gli agnelli nascono agammaglobulinici, rendendo quindi l'assunzione del colostro essenziale per l'instaurarsi dell'immunità passiva naturale.

Le immunoglobuline primarie nel colostro sono le IgG1 che derivano da quelle del siero materno. Il trasporto delle immunoglobuline dal siero alla ghiandola mammaria avviene nei ruminanti solitamente qualche settimana prima del parto e raggiunge il picco massimo 1-3 giorni prima del parto stesso (Sasaki M. *et al.*, 1976; Brandon M.R. *et al.*, 1971).

Una concentrazione di IgG1 nel colostro è facilitata dai recettori presenti nelle cellule epiteliali alveolari della mammella (Barrington G.M. *et al.*, 1997), tuttavia queste cellule cessano di esprimere questi recettori all'inizio della lattazione (Barrington G.M. *et al.*, 1997).

A questo punto, gli agnelli, con l'assunzione del colostro subito dopo la nascita, acquisiscono gli anticorpi, grazie alle particolari capacità degli enterociti di assorbire macromolecole. Infatti durante le prime 24-36 ore di vita del neonato, gli enterociti del piccolo intestino nei ruminanti possono in modo non selettivo assorbire per pinocitosi alcune macromolecole, tra cui gli anticorpi (Broughton C.W. & Lecce J.G., 1970). Gli anticorpi quindi accedono al sistema circolatorio attraverso il dotto toracico.

L'esatto meccanismo che determina la fine di questo passaggio di anticorpi non è ancora ben noto, tuttavia è probabile che sia dovuto ad un contemporaneo "esaurimento" della pinocitosi e una sostituzione dell'epitelio intestinale con una popolazione di cellule enteriche più mature e differenziate (Broughton C.W. & Lecce J.G., 1970; Smeaton T.C. & Simpson-Morgan M.W., 1985). Negli agnelli, varie tipologie di regime alimentare e la modalità di somministrazione del colostro,

possono influenzare la “chiusura” del passaggio degli anticorpi, che in ogni caso avviene intorno alle 32 ore dopo il parto (Patt J.A., 1977; Deutsch H.F. & Smith V.R., 1957).

Avvalorano la tesi del mancato passaggio di anticorpi dalla madre al feto durante la gravidanza nei piccoli ruminanti, anche i risultati ottenuti da Rahman M. *et al.* (2015) che hanno evidenziato l’assenza di anticorpi in capretti appena nati da capre risultate sieropositive a *T. gondii*, e che non avevano ancora succhiato il colostro (Rahman M. *et al.*, 2015).

La nostra indagine ha evidenziato come oltre il 90% degli agnelli, nati da pecore sieropositive a *T. gondii*, possano risultare sieropositivi a 48 ore di vita e come anche i valori medi di PP risultino addirittura maggiori di quelli riscontrati nelle madri. Tale *trend* si registra anche per quanto riguarda le medie di PP tra le madri sieronegative e le medie dei loro agnelli a 48 ore dalla nascita. Risulterebbe quindi evidente che la concentrazione di anticorpi nella mammella, in seguito all’azione degli appositi recettori esistenti nelle cellule alveolari della mammella stessa, possa causare un aumento della concentrazione e quindi un livello superiore medio di PP negli agnelli a 48 ore di vita rispetto alle madri. Un’ulteriore spiegazione a tale fenomeno potrebbe essere data dal fatto che, tale aumento di concentrazione di anticorpi nel latte, si possa incrementare nel sangue degli agnelli anche grazie alle diverse poppate che questi possono esercitare nell’arco delle loro prime 48 ore di vita, quando le cellule del loro intestino tenue, non pienamente differenziate, consentono ancora l’attuazione della pinocitosi e quindi l’assorbimento degli anticorpi.

Tale azione di “concentrazione” degli anticorpi nel colostro, potrebbe giustificare la presenza di diversi agnelli sieropositivi nati da madri sieronegative (12/20 pari al 60%), anche se non possiamo escludere con certezza che qualche agnello nato da madre sieronegativa non abbia potuto succhiare “furtivamente” del colostro da qualche madre sieropositiva. Tuttavia questi elevati valori di sieroprevalenza, così come per quelli di PP, tendono a diminuire prontamente nei primi 15 giorni di vita di questi agnelli, segno evidente che un’eventuale poppata “furtiva” attuata da un’altra pecora sieropositiva non garantisce livelli elevati e persistenti di anticorpi in questa categoria di agnelli.

Interessante sottolineare che 2 agnelli nati da pecore sieropositive non si siano mai rilevati sieropositivi per tutto il periodo del monitoraggio, segno evidente che purtroppo il passaggio di anticorpi anti-*T. gondii* non sempre avviene automaticamente, ma le cause di “*Failure of Passive*

Transfer” (FPT) si sono potute registrare nel caso specifico nel 7,4% dei casi. Da tenere in considerazione che il FPT, non viene considerata come una malattia, ma come una condizione che predispone il neonato allo sviluppo della malattia (Weaver D.M. *et al.*, 2000).

Un altro particolare interessante è dato dal fatto che i valori di PP sono risultati, soprattutto negli agnelli nati da madri sieronegative a partire dal 15° giorno di vita sino ai 90 giorni, non correlati con quelli delle madri, mentre quelli degli agnelli nati da pecore sieropositive evidenziano, seppure in modo debole, una correlazione positiva significativa con quelli delle loro madri, probabilmente a causa dei loro valori più elevati.

Il *trend* rilevato a carico degli anticorpi negli agnelli nati da madri sieropositive (tassi di sieroprevalenza, livelli medi di PP e periodo di persistenza), conferma inoltre come in effetti la trasmissione verticale dell’infezione da *T. gondii*, così come riportato da Dubey J.P. *et al.*, (2009) non sia particolarmente importante sotto l’aspetto epidemiologico nell’ovino (massimi livelli di trasmissione variabili dal 2 al 4%).

I risultati ottenuti hanno mostrato come l’efficacia dell’immunità passiva nei confronti di *T. gondii* nell’ovino si esaurisca entro i primi 90 giorni di vita degli agnelli, i quali, generalmente dopo tale periodo, andranno poi incontro all’infezione, tramite l’ingestione delle oocisti presenti nei pascoli e/o nelle acque di bevanda.

E’ evidente quindi che un’eventuale assunzione di oocisti entro i primi tre mesi di vita da parte degli agnelli che hanno acquisito una buona immunità passiva con il colostro nei confronti di *T. gondii*, magari tramite il lambimento delle mammelle durante l’allattamento o il lambimento di strutture e/o alimenti contaminati, possano non dare adito all’infezione.

5.6. CONCLUSIONI

Gli agnelli nati sia da madri sieropositive che sieronegative per anticorpi anti- *T. gondii*, hanno mostrato a 2 giorni di vita un livello medio di sieroprevalenza e di PP superiore rispetto alle madri, segno evidente della concentrazione degli anticorpi specifici nell'ambito del colostro e quindi del loro passaggio negli agnelli. Tuttavia negli agnelli nati da madri sieronegative i livelli medi di sieroprevalenza appaiono nulli già dal 30° giorno di vita degli agnelli, mentre quelli medi di PP, già a 15 giorni, risultano sempre inferiori rispetto al valore soglia di positività (PP= 20).

Negli agnelli nati invece da madri sieropositive per *T. gondii*, i livelli medi di sieropositività passano dal 92,6% a 48 ore di vita all'8,7% ai 90 giorni, mentre i valori medi di PP si mantengono superiori o intorno alla soglia di positività del 20% sino al 60° giorno di vita.

Correlazioni significative debolmente positive si sono riscontrate esclusivamente tra i valori di PP tra le madri sieropositive e i rispettivi agnelli.

Alla luce dei risultati conseguiti possiamo per cui concludere che per quanto riguarda il caso da noi monitorato l'immunità passiva attraverso l'assunzione del colostro trasmessa dalle pecore sarde sieropositive ai rispettivi agnelli possa "coprire" in modo efficace la prole per circa 2 mesi.

BIBLIOGRAFIA

- Arthur, G.H. (1996). The development of the conceptus. In: Arthur G.H., Nokes D.E., Pearson H., Parkinson T.J., eds. *Pregnancy and Parturition in Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 7th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, pp. 51-109.
- Barrington, G.M.; Besser, T.E.; Davis, W.C.; Gay, C.C.; Reeves, J.J.; McFadden, T.B. (1997). Expression of immunoglobulin G1 receptors in bovine mammary epithelial cells and mammary leukocytes. *J Dairy Sci*, **80**: 86-93.
- Barrington, G.M.; Besser, T.E.; Gay, C.C.; Davis, W.C.; Reeves, J.J.; McFadden, T.B. (1997). Effect of prolactin on *in vitro* expression of the bovine mammary immunoglobulin G1receptor. *J Dairy Sci*, **80**: 94-100.
- Bessi, R.; Pauletti, P.; D'Arce, R.D.; Neto, R.M. (2002). Absorbaciao de anticorpos do colostro em bezerros I. Estudo no intestino delgado proximal. *R Bras Zootec*, **31**: 2314-232.
- Brandon, M.R.; Watson, D.L.; Lascelles, A.K. (1971). The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. *Aust J Biol Med Sci*, **49**: 613-623.
- Broughton, C.W. & Lecce, J.G. (1970). Electron-microscopic studies of the jejunal epithelium from neonatal pigs fed different diets. *J Nutr*, **100**: 445-449.
- Brujeni, G.N.; Jani, S.S.; Alidadi, N.; Tabatabaei, S.; Sharifi, H.; Mohri, M. (2010). Passive immune transfer in fat-tailed sheep: Evaluation with different methods. *Small Ruminant Research*, **90**: 146-149.
- Clawson, M.L.; Heaton, M.P.; Chitko-McKown, C.G.; Fox, J.M.; Smith, T.P.; Snelling, W.M.; Keele, J.W.; Laegreid, W.W. (2004). Beta-2-microglobulin haplotypes in U.S. beef cattle and association with failure of passive transfer in newborn calves. *Mamm Genome*, **15**: 227-236.
- Deutsch, H.F. & Smith, V.R. (1957). Intestinal permeability to proteins in the newborn herbivore. *Am J Physiol*, **191**: 271.
- Dubey, J.P. (2009). Toxoplasmosis in sheep—The last 20 years. *Veterinary Parasitology*, **163**: 1-14.
- Gilbert, R.P.; Gaskins, C.T.; Hillers, J.K.; Parker, C.F.; McGuire, T.C. (1988). Genetic and environmental factors affecting immunoglobulin G1 concentrations in the ewe colostrum and lamb serum. *J Anim Sci*, **66**: 844-863.
- Glor, S.B.; Edelhofer, R.; Grimm, F.; Deplazes, P.; Basso, W. (2013). Evaluation of a commercial ELISA kit for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in serum, plasma and meat juice from experimentally and naturally infected sheep. *Parasites and Vectors*, **6**: 85-96.
- Kruse, P.E. (1983). The importance of colostral immunoglobulins and their absorption from the intestine of the newborn animals. *Ann Rech Vet*, **14**: 349-353.
- Laegreid, W.W.; Heaton, M.P.; Keen, J.E.; Grosse, W.M.; Chitko-McKown, C.G.; Smith, T.P.; Keele, J.W.; Bennett, G.L.; Besser, T.E. (2002). Association of bovine neonatal Fc receptor alpha-chain gene (FCGRT) haplotypes with serum IgG concentration in newborn calves. *Mamm Genome*, **13**: 704-710.
- Patt, J.A. (1977). Factors affecting the duration of intestinal permeability to macromolecules in newborn animals. *Biol Rev*, **54**: 411.
- Quigley, J. (2001). Colostrum Feeding—How much is enough? Accessed Jul. 10, 2011. <http://www.calfnotes.com>.
- Rahman, M.; Alauddin, M.; Hossain, K.M.; Islam, M.H.; Kitoh, K.; Nagamune, K.; Takashima, Y. (2015). Prevalence and dynamics of antibodies against *Toxoplasma gondii* in kids born from naturally infected goats. *Parasitology International*, **64**: 389-391.

Sasaki, M.; Davis, C.L.; Larson, B.L. (1976). Production and turnover of IgG1 and IgG2 immunoglobulins in the bovine around parturition. *J Dairy Sci*, **59**: 2046-2055.

Smeaton, T.C. & Simpson-Morgan, M.W. (1985). Epithelial cell renewal and antibody transfer in the intestine of the fetal and neonatal lamb. *Aust J Exp Biol Med Sci*, **63**: 41-51.

Stott, G.H.; Marx, D.B.; Menefee, B.E.; Nightengale, G.T. (1979). Colostral immunoglobulin transfer in calves 1. Period of absorption. *J Dairy Sci*, **62**: 1632-1638.

Tizard, I.R. (2004). *Veterinary Immunology, An introduction, Seventh Edition. Saunders Publication, Philadelphia*, pp. 228.

Weaver, D.M.; Tyler, J.W.; VanMetre, D.C.; Hostetler, D.E.; Barrington, G.M. (2000). Passive Transfer of Colostral Immunoglobulins in Calves. *Vet Intern Med*, **14**: 569-577.

TABELLE E GRAFICI

Grafico 1. Sieroprevalenze (%) in agnelli nati da pecore sieropositive e relativi valori di *Odds Ratio*.

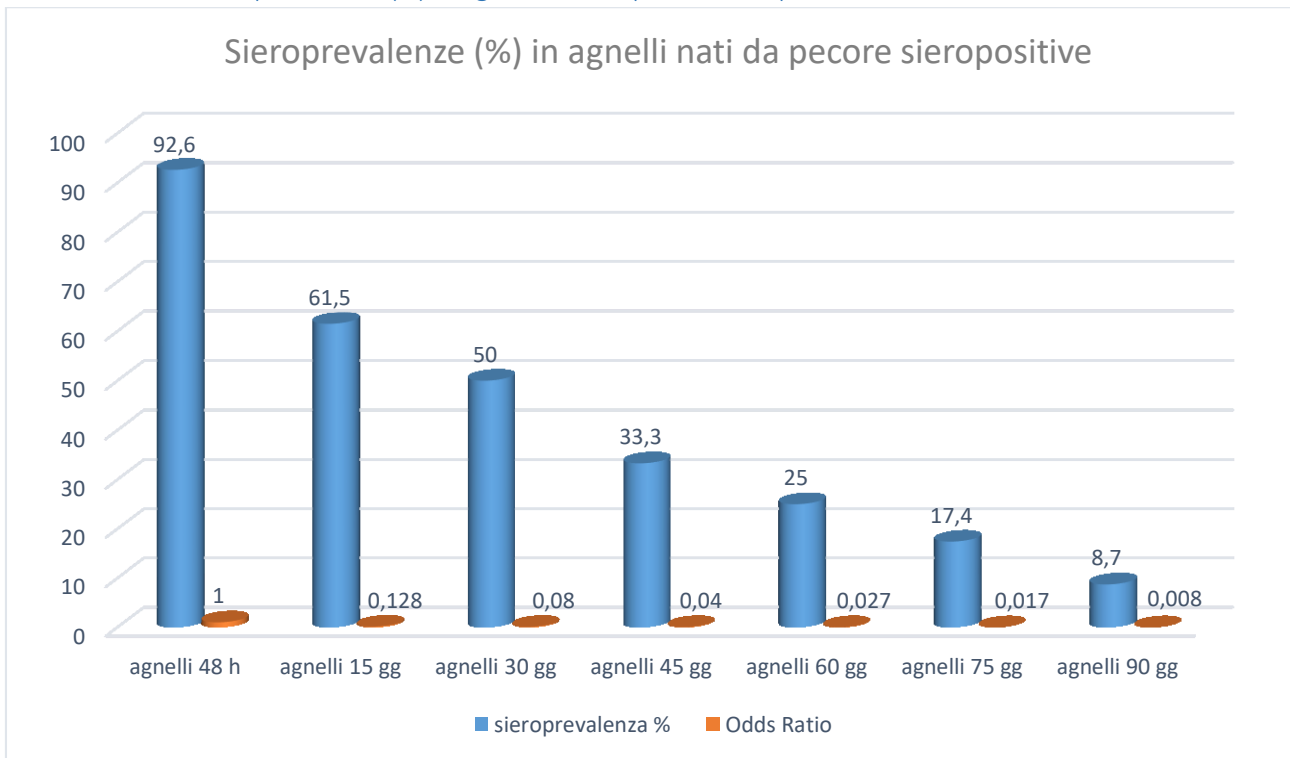


Grafico 2. Media delle Percentuali di Positività (PP) di IgG nei confronti di *T. gondii* in pecore sieropositive e rispettivi agnelli.

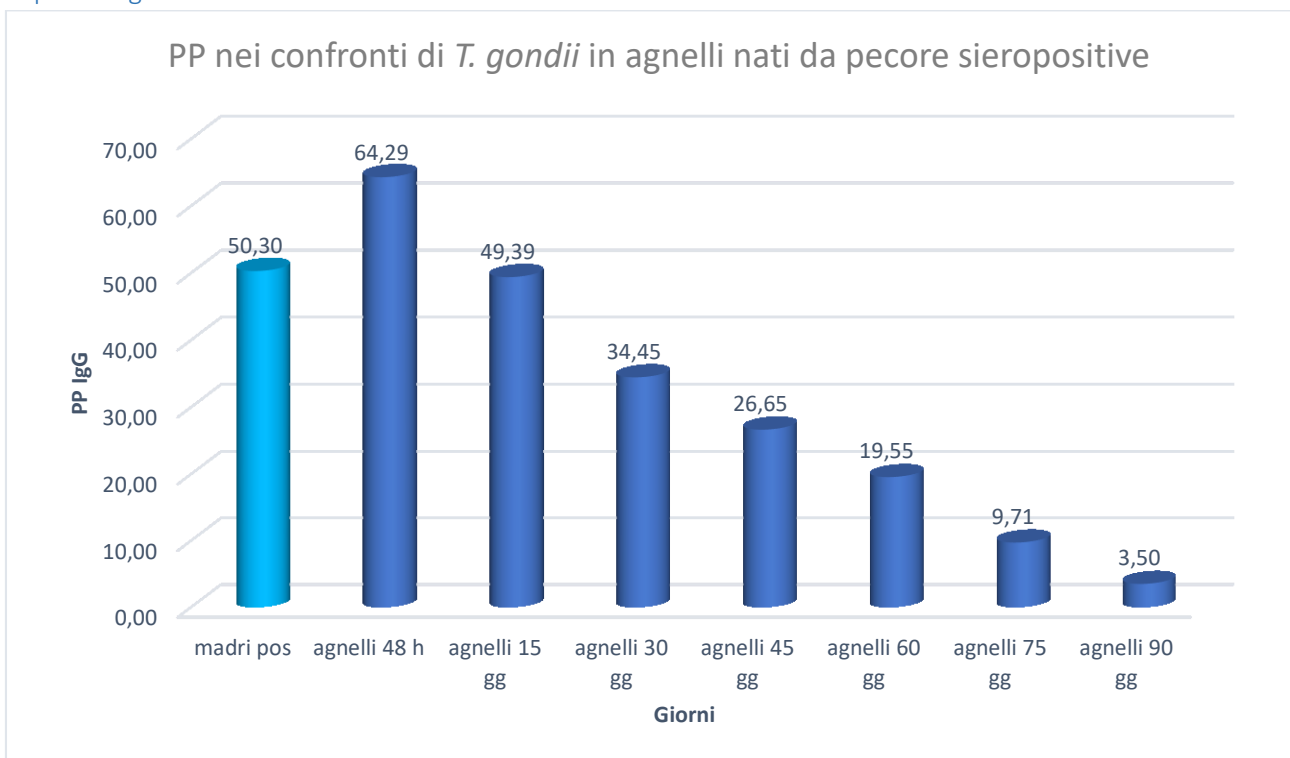


Grafico 3. Sieroprevalenze (%) in agnelli nati da pecore sieronegative e relativi valori di *Odds Ratio*.

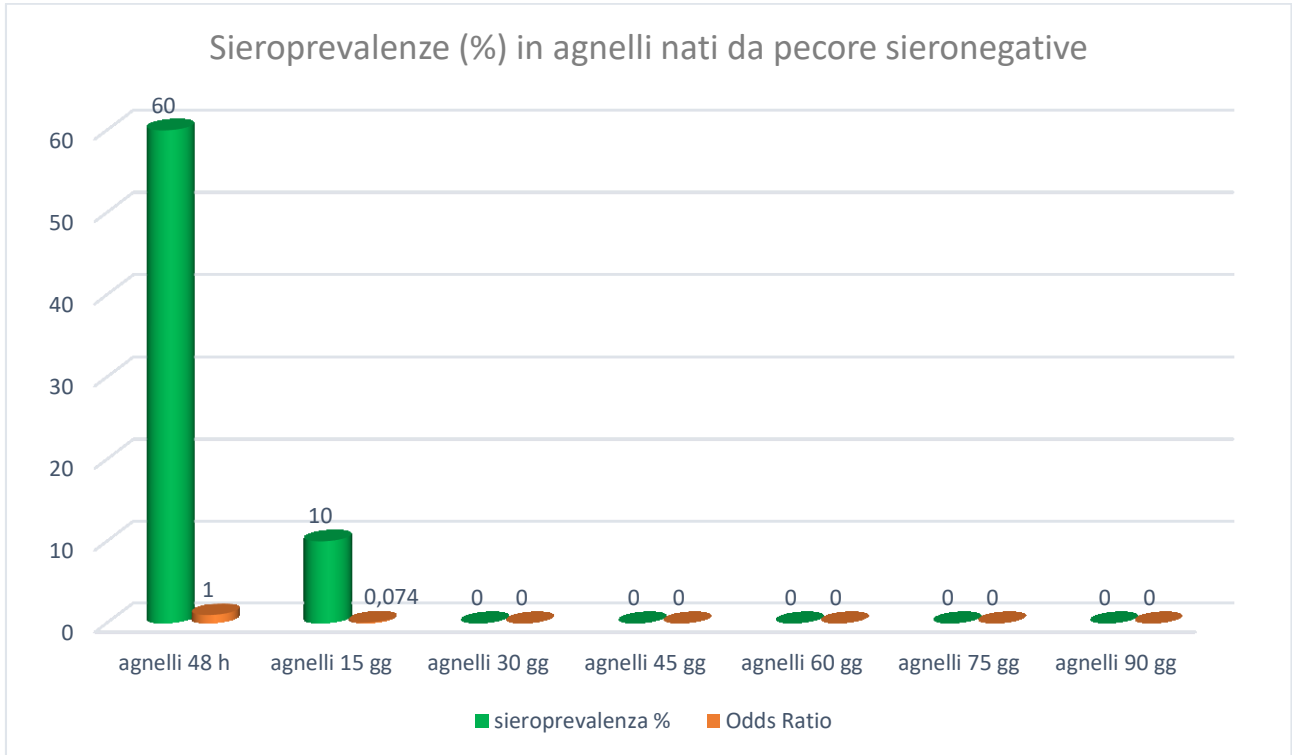


Grafico 4. Media delle Percentuali di Positività (PP) IgG nei confronti di *T. gondii* nelle madri sieronegative e nei rispettivi agnelli ai diversi tempi di monitoraggio.

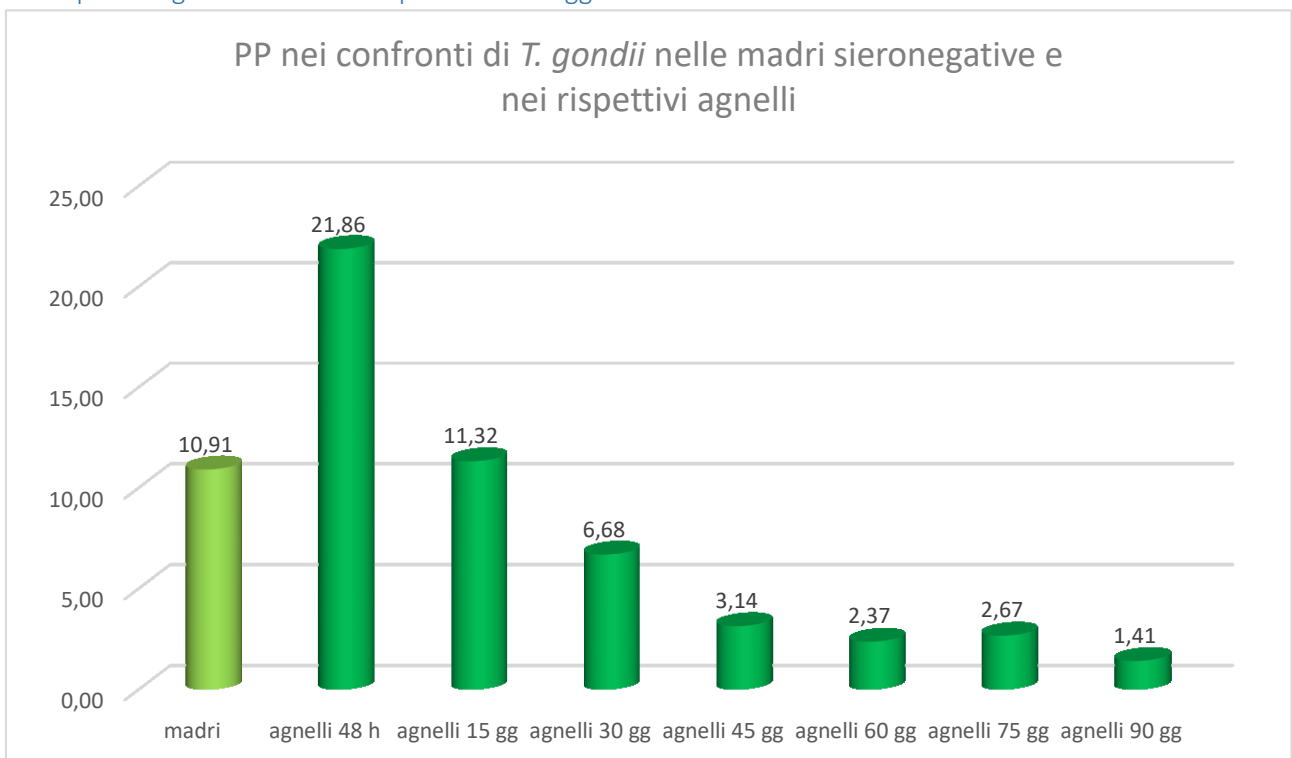


Tabella 1. Indici di correlazione tra pecore sieropositive e i rispettivi agnelli per i valori di PP (%)

Indice di correlazione tra pecore sieropositive e i relativi agnelli							
	<i>Madri agnelli 48h</i>	<i>Madri agnelli 15 gg</i>	<i>Madri agnelli 30 gg</i>	<i>Madri agnelli 45 gg</i>	<i>Madri agnelli 60 gg</i>	<i>Madri agnelli 75 gg</i>	<i>Madri agnelli 90 gg</i>
Coefficiente R	0,695	0,575	0,367	0,51	0,401	0,459	0,354
Significatività p	0,0001	0,002	0,077	0,011	0,058	0,028	0,098

Tabella 2. Indici di correlazione tra madri sieronegative e i rispettivi agnelli per i valori di PP (%).

Indici di correlazione tra pecore sieronegative e i relativi agnelli							
	<i>Madri agnelli 48h</i>	<i>Madri agnelli 15 gg</i>	<i>Madri agnelli 30 gg</i>	<i>Madri agnelli 45 gg</i>	<i>Madri agnelli 60 gg</i>	<i>Madri agnelli 75 gg</i>	<i>Madri agnelli 90 gg</i>
Coefficiente R	0,268	0,233	0,441	0,343	-0,005	0,002	0,131
Significatività p	0,253	0,322	0,051	0,139	0,985	0,996	0,655

CAPITOLO VI

6. FASE SPERIMENTALE 4 – INDAGINE PRELIMINARE SULLA TOXOPLASMOSI DEL SUINO IN SARDEGNA.

6.1. BACKGROUND

In questi ultimi anni l'attenzione verso i suini come serbatoio e fonte di infezione della toxoplasmosi umana è notevolmente aumentata in virtù della dimostrazione da parte della comunità scientifica, della notevole longevità delle cisti tissutali e del riscontro di queste in molti tagli commerciali di carne suina (Dubey J.P., 1998; Tenter *et al.*, 2000). La carne suina è infatti considerata tra le principali fonti di infezione umana (Cook A.J.C. *et al.*, 2000). Indagini sierologiche hanno riportato la presenza di *T. gondii* nei suini di tutto il mondo con prevalenze che variano notevolmente tra gli allevamenti esaminati, in relazione soprattutto ai sistemi di *management* (Dubey J.P., 2010). Negli ultimi dieci anni, l'allevamento suino in Europa e negli USA è cambiato radicalmente con l'emergere di sistemi di produzione intensivi che hanno sostituito, almeno in parte, le tecniche di allevamento tradizionali. Questo cambiamento, che ha portato all'adozione di misure di biosicurezza in azienda, è risultato efficace nel controllo della toxoplasmosi come dimostrato da un importante decremento della sieroprevalenza negli allevamenti suini degli Stati Uniti, Germania, Olanda, Canada e Austria (Veronesi F. *et al.*, 2011).

Attualmente, però in relazione ad una crescente attenzione per il benessere dei suini secondo la normativa europea (*Direttiva CE 2008/120*) ed in relazione alle richieste dei consumatori, sono sempre più diffuse le aziende "biologiche" che operano nel rispetto dei principi enunciati dal *Regolamento CE 2092/91* e gli allevamenti "*animal-friendly*" in cui gli animali hanno libero accesso all'esterno, rispetto agli allevamenti intensivi classici (Dubey J.P. *et al.*, 2002; Kijlstra A. *et al.*, 2004; Van der Giessen J. *et al.*, 2007; Hill D.E. *et al.*, 2010; Dubey J.P. *et al.*, 2012), esponendo i suini a un maggior contatto con le fonti di infezione (EFSA, 2007). Si ritiene che questa "nuova tendenza" comporti inoltre un aumento della prevalenza di *T. gondii* negli animali, anche se i livelli di infezione delle carni al dettaglio sono attualmente poco conosciuti (Juránková J. *et al.*, 2014). Le cisti vitali di *T. gondii* sono state isolate da tessuti di suino reperiti presso macelli o allevamenti, ma il successo dell'isolamento è in parte influenzato dalla sensibilità e specificità delle procedure diagnostiche

utilizzate (Dubey J.P. *et al.*, 2002, Dubey J.P., 2009). In uno studio in cui sono stati esaminati tagli di carne suina venduta al dettaglio provenienti da 28 aree geografiche degli Stati Uniti, la prevalenza di *T. gondii* è risultata molto bassa (0,3%) (Dubey J.P. *et al.*, 2005).

Nonostante l'obbligo previsto dalla *Direttiva CE 2003/99* per tutti gli Stati Membri di registrare informazioni su qualsiasi agente zoonotico, i dati sulla prevalenza di *T. gondii*, non solo negli animali ma anche nell'uomo, sono stati considerati inconsistenti (EFSA, 2007). Anche i riferimenti bibliografici relativi alla sieroprevalenza negli allevamenti suini in Italia sono scarsi o datati (Vesco G. & Villari S., 2006; Frescura T. *et al.*, 1972; Veronesi F. *et al.*, 2011; Villari S. *et al.*, 2009; Scala A. *et al.*, 2008). In particolare sono state rilevate prevalenze del 18,3% in allevamenti a conduzione familiare dell'Italia Centrale (Frescura T. *et al.*, 1972), del 16,1% in allevamenti intensivi dell'Umbria (Veronesi F. *et al.*, 2011) e del 16,3% in allevamenti misti situati in Sicilia (Villari S. *et al.*, 2009). Mentre gli unici dati sulla toxoplasmosi dei suini nella nostra isola provengono da uno studio sieroepidemiologico condotto, su suini di allevamenti di tipo intensivo e semi-intensivo della Sardegna, da Scala A. *et al.* (2008) nel quale sono state riportate delle sieroprevalenze per *T. gondii* pari al 15,2%.

6.2. OBIETTIVI

In considerazione di quanto detto precedentemente, durante la presente fase sperimentale, è stato ritenuto opportuno:

- Valutare la prevalenza di anticorpi anti- *T. gondii*, così come la presenza del DNA del protozoo rispettivamente in campioni di sangue e cervello di suini regolarmente allevati e macellati in Sardegna e confrontare le prevalenze tra le due tipologie di allevamento nell'isola a fronte dei risultati riportati anche in altri lavori;
- Riportare, per la prima volta in Sardegna per questa specie animale, i dati preliminari sulla genotipizzazione del parassita per cercare di capire meglio l'eventuale diversità genetica degli isolati di *T. gondii* nell'isola;
- Valutare il ruolo del suino come possibile fonte d'infezione per l'uomo.

6.3. MATERIALI E METODI

Da Maggio 2013 ad Aprile 2014, su 109 allevamenti suini a conduzione familiare, localizzati in due delle quattro province storiche della Sardegna (N° 70 a Sassari e N° 39 a Cagliari). Con la collaborazione dei Veterinari dell'Azienda Sanitaria Locale (ASL), è stato condotto uno studio epidemiologico, sierologico e biomolecolare, al fine di valutare la prevalenza di anticorpi anti- *T. gondii* e la presenza del DNA del protozoo rispettivamente in campioni di sangue e cervello di suini regolarmente allevati e macellati nell'isola.

Per l'indagine molecolare come tessuto di riferimento è stato scelto l'encefalo in quanto considerato una sede elettiva di localizzazione del parassita (Juránková J. *et al.*, 2014) ed inoltre una delle parti di cui l'allevatore si priva con minore resistenza.

La popolazione di studio è stata ottenuta utilizzando il *software Winepiscopo 2.0* (www.clive.ed.ac.uk/winepiscopo) considerando i seguenti parametri: livello di confidenza del 95%, un margine accettabile di errore del 5% ed una sieroprevalenza attesa del 50%.

In totale sono stati prelevati 414 campioni di sangue (valore minimo del campione = 384 animali), prelevati da 63 aziende a conduzione familiare distribuite nel territorio della provincia di Sassari e 107 aliquote costituite da 50 gr di encefalo, questi ultimi prelevati dai Veterinari Ispettori durante le visite *post-mortem* nelle macellazioni uso famiglia, da 62 aziende distribuite nelle province di Sassari (N° 23) e Cagliari (N° 39).

Su una apposita scheda anamnestica venivano registrati i dati sulla provenienza degli animali, sesso e categoria (scrofa, verro, magrone o grasso) (Tabella 1).

6.3.1. Indagine sierologica

I 414 campioni di sangue venoso una volta prelevati, opportunamente contrassegnati e conservati in borsa frigo, sono stati trasferiti presso il Laboratorio di Parassitologia dell'Ospedale Didattico Veterinario dell'Università degli Studi di Sassari. Dopo centrifugazione a 2000 rpm per 10 minuti (*Centrifuge 5804 R, Eppendorf*), i sieri ottenuti sono stati stoccati a -20 °C fino all'esecuzione del test sierologico.

Per l'analisi è stato utilizzato il kit commerciale *PrioCHECK® Toxoplasma Ab SR* (Prionics, Schlieren-Zurich, Switzerland) per la ricerca delle IgG anti- *T. gondii*. Il kit comprende piastre ELISA rivestite con antigene derivato da tachizoiti di *T. gondii*, un anticorpo secondario anti- suino marcato con perossidasi, tetrametil benzidina (TMB) come substrato cromogenico, sieri di controllo e soluzioni tampone. I sieri sono stati testati ad una diluizione finale di 1:100 con il tampone diluente. La densità ottica (DO) è stata misurata a 450 nm (filtro di riferimento 620 nm) mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro *BGM Labtech Omega*.

I risultati sono stati interpretati calcolando, per ciascun campione, una Percentuale di Positività (PP) relativa al valore della DO del controllo positivo [PP campione = (DO450 nm campione / DO450 nm controllo positivo) x 100]. Un valore PP \geq 15 è stato considerato positivo (come suggerito dal produttore), mentre i valori PP < 15 venivano considerati negativi.

6.3.2. Indagine biomolecolare

Per l'indagine biomolecolare, condotta sull'encefalo, sono stati omogenati 50 gr di campione, da cui sono stati aliquotati 0,05 gr di tessuto in provette *Eppendorf* sterili da 1,5 ml e stoccati a -20 °C fino alla successiva fase di estrazione del DNA per la quale è stato utilizzato un kit commerciale (*Pure Link Genomic Dna Mini Kit, Invitrogen*).

Sui campioni di DNA estratti si è proceduto alla rilevazione del DNA di *T. gondii* mediante una *Nested PCR* il cui *target* è un frammento di 302 paia di basi (bp) della regione *Internal Transcribed Spacers-1* (ITS1) dell'rRNA 18S-5,8S secondo il metodo descritto da Halová D. *et al.* (2013). Ciascuna reazione di PCR veniva condotta in un volume finale di 25 μ l contenente PCR *buffer* (1X), MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM di ognuno), *primer* FOR (0,2 μ M), *primer* REV (0,2 μ M), 1 U di Taq polimerasi (*invitrogen*), DNA, H₂O milliq. In ciascuna reazione di PCR sono stati inclusi un controllo positivo ed un controllo negativo per verificare la correttezza del procedimento.

Per l'amplificazione sono stati utilizzati due set di *primers*: una coppia di *primers* esterni per la prima reazione, NN1 (5'-CCT TTG AAT CCC AAG CAA AAC ATG AG-3') e NN2 (5'-GCG AGC CAA GAC ATC CAT TGC TGA-3'); ed una coppia di *primers* interni per la seconda reazione, ITSfw (5'-GAT TTG CAT TCA AGA AGC GTG ATA GTA T-3') e ITSrev (5'-AGT TTA GGA AGC AAT CTG AAA GCA CAT C-3').

Le amplificazioni sono state effettuate utilizzando il termociclatore *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems*, USA).

Le condizioni termiche per la prima reazione sono state le seguenti: 94 °C per 3'; 40 cicli dei tre *step* di denaturazione a 94 °C per 30", *annealing* a 65 °C per 45" e allungamento a 72 °C per 1'; seguiti da un'estensione finale a 72 °C per 5'.

La seconda reazione di PCR è stata preparata con 1 µl di amplificato ottenuto nella prima reazione e le condizioni termiche sono state le seguenti: 95 °C per 5'; 50 cicli di 94 °C per 40", 60 °C per 40" e 72 °C per 1' e un'estensione finale a 72 °C per 7'.

Al fine di valutarne specificità e resa, un'aliquota dell'amplimero è stata sottoposta ad elettroforesi in gel di agarosio all'1,5% in tampone TAE (Tris-Acetato 40 mM, Na₂EDTA 0,1 Mm, pH 8) e *Syber Safe DNA gel stain* (*Invitrogen*).

La visualizzazione dei risultati e l'acquisizione dell'immagine veniva effettuata mediante lo strumento *UVITEC* (*Cambridge*). La stima della lunghezza del frammento è stata effettuata mediante l'utilizzo dello *standard* di pesi molecolari *Thermo Scientific GeneRuler* (100 bp DNA ladder).

Una volta verificata la presenza di una banda specifica (302 bp), il restante prodotto di PCR è stato purificato mediante l'impiego del kit commerciale *ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit* (*Invitrogen*), un sistema basato sull'utilizzo di biglie magnetiche alle quali si lega il DNA e che permette di separarlo dai vari inquinanti presenti nella mix di reazione.

A questo punto i campioni purificati sono stati inviati presso un laboratorio esterno per il successivo sequenziamento mediante sequenziatore capillare (*Applied Bio-systems*).

Le sequenze ottenute, venivano appaiate ed analizzate mediante il *software Mega version 6* (Tamura K. *et al.*, 2013) e online mediante il *software BLAST 2 SEQUENCES* per confrontarle con le sequenze dell'NCBI depositate in rete.

6.3.3. Genotipizzazione

Nove campioni risultati positivi per *T. gondii*, sono stati indagati al fine di valutare il lignaggio clonale circolante per questa specie animale nell'isola.

Il genotipo di *T. gondii* è stato esaminato mediante una PCR-RFLP su quattro *marker* genetici (SAG2, SAG3, BTub, GRA6) come descritto da Su C. *et al.*, (2006).

Dapprima si eseguiva una pre-amplificazione con l'utilizzo di una mix di diversi *primers* esterni tutti inclusi in una unica reazione. Successivamente 1 µl di amplificato veniva sottoposto ad una *Nested* PCR con dei *primers* interni specifici per ciascun *marker* genetico. I prodotti della *Nested* PCR venivano infine digeriti con specifici enzimi di restrizione.

In ogni analisi PCR-RFLP venivano inclusi tre controlli positivi ed un controllo negativo.

Un'aliquota del digerito è stata sottoposta ad elettroforesi in gel di agarosio all'2,5% in tampone TAE (Tris-Acetato 40 mM, Na₂EDTA 0,1 Mm, pH 8) e *Syber Safe DNA gel stain (Invitrogen)* e la visualizzazione dei risultati e l'acquisizione dell'immagine veniva effettuata mediante lo strumento *UVITEC (Cambridge)*, al fine di rilevare il genotipo di *T. gondii*.

6.3.4. Analisi dei dati

Gli allevamenti venivano considerati positivi all'infezione da *T. gondii* se almeno uno suini campionati risultava positivo ad almeno una delle due tecniche diagnostiche utilizzate.

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando *Epi-Info (versione 7.0, CDC / WHO, Atlanta, GA, USA)*. Il test del *Chi*-quadro (χ^2) è stato utilizzato per determinare differenze significative tra le prevalenze. Le differenze sono state considerate con significatività statistica quando il valore *p* era < a 0,05.

Su 28 campioni testati in parallelo con entrambe le metodiche diagnostiche, è stata calcolata la concordanza tra test valutata attraverso il test di kappa (K), secondo quanto indicato da Bottarelli (Quaderno di Epidemiologia Veterinaria http://www.quadernodiepidemiologia.it/epi/screen/ind_con.htm).

6.4. RISULTATI

Nella presente indagine il 72,5% (79/109) degli allevamenti suini monitorati è risultato positivo all'infezione da *T. gondii* con almeno una delle due tecniche diagnostiche utilizzate. Di questi l'82,8% (58/70) erano localizzati nella provincia di Sassari, mentre il 53,8% (21/39) erano localizzati nella provincia di Cagliari.

La differenza tra le sieroprevalenze negli allevamenti delle due province esaminate è risultata statisticamente significativa ($\chi^2 = 10,57$; $p = 0,001$).

6.4.1. Indagine sierologica

Attraverso l'indagine sierologica è stato possibile identificare come positive (con almeno un suino positivo tra gli esaminati) l'85,7% (54/63) delle aziende suine a conduzione familiare esaminate.

Il test ELISA condotto sui campioni di siero individuali, ha consentito di rilevare una sieroprevalenza per *T. gondii* del 51,7% (214/414).

La stratificazione delle sieroprevalenze per classe di positività (PP), che andavano da ≥ 15 a ≥ 60 , viene riepilogata nel Grafico 1. La differenza delle sieroprevalenze per PP è risultata altamente statisticamente significativa ($\chi^2 = 67,782$; $p = 0,000$).

La stratificazione dei dati in base al sesso ha consentito di evidenziare delle sieroprevalenze del 56,1% (174/310) nelle femmine e del 38,5% (40/104) nei maschi; tale differenza è risultata statisticamente significativa ($\chi^2 = 9,73$; $p = 0,001$).

Le sieroprevalenze rilevate nelle 4 categorie di suini monitorati (grasso, magrone, scrofa, verro) vengono riportate nella Tabella 2.

Il confronto delle prevalenze in queste categorie, ha evidenziato delle differenze statisticamente significative (χ^2 con 3 gradi di libertà = 22,06; $p = 0,000$).

6.4.2. Indagine biomolecolare

Attraverso l'indagine biomolecolare sono risultate positive il 54,8% delle aziende monitorate (34/62).

L'indagine condotta mediante *Nested* PCR sui campioni di encefalo ha messo in evidenza una positività per *T. gondii* del 47,7% (51/107) degli animali esaminati (Figura 1).

I risultati ottenuti attraverso la *Nested* PCR sono stati confermati in seguito al sequenziamento di alcuni campioni. Le sequenze confrontate con quelle presenti in *GeneBank*, tramite il *software* *BLAST*, hanno mostrato un'omologia del 99% (260/263) con la sequenza omologa (ITS-1) di *T. gondii* (GB: JX456457.1) isolata in Cina da Jang *et al.*, 2012.

Su 28 suini, è stato possibile effettuare in parallelo l'indagine sierologica e biomolecolare; di questi animali, 24 sono risultati positivi ad almeno una delle due metodiche diagnostiche utilizzate (85,7%).

Le prevalenze ottenute con ciascuna metodica e l'analisi statistica dei dati vengono riportate nella Tabella 3.

L'analisi della concordanza tra i due test diagnostici è risultata nulla ($K = - 0,190$).

6.4.3. Genotipizzazione degli isolati di *T. gondii*

La parziale genotipizzazione di 9 isolati, positivi alla PCR, sembrerebbe evidenziare nei suini dell'isola la presenza del genotipo III di *T. gondii* (Figura 2).

6.5. CONSIDERAZIONI

La toxoplasmosi è una delle principali malattie legate alle ospedalizzazioni e decessi di origine alimentare (Dubey J.P., 2004). Un terzo della popolazione mondiale è cronicamente infetto da questo parassita (Weiss L.M. & Dubey J.P., 2009). Anche se l'infezione da *T. gondii* nella maggior parte delle persone decorre in forma asintomatica, in alcuni individui immunocompromessi può provocare malattie talvolta ad esito mortale (Montoya J.G. & Liesenfeld O., 2004). L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) in relazione all'alta incidenza di casi di toxoplasmosi umana ha indicato la necessità di dati rappresentativi sulla presenza e distribuzione della toxoplasmosi in Europa (EFSA, 2007).

Indagare sierologicamente la presenza di *T. gondii* nei suini è un'importante strumento per la sorveglianza di tale parassitosi a livello di allevamento (Zimmerman J.J. *et al.*, 1990; Weigel R.M. *et al.*, 1995; Dubey J.P., 2009), considerando la persistenza a lungo termine di anticorpi specifici e di parassiti rispettivamente nel sangue e nei tessuti e anche in relazione alla forte associazione tra sieropositività ed infettività della carne (Dubey J.P., 1988; Dubey J.P. *et al.*, 1995).

In tutto il mondo, i dati sulla sieroprevalenza nei suini hanno mostrato ampie variazioni comprese tra l'1 ed il 98%. Tra i suini di finissaggio in Europa, la prevalenza per *Toxoplasma* varia dall'assenza dell'infezione in alcune regioni tedesche o da prevalenze inferiori al 5% nella Repubblica Ceca, in Norvegia e in Finlandia fino a sieroprevalenze del 28,9% e 34% in Serbia e in Polonia, rispettivamente (Dubey J.P., 2009).

Il confronto della sieroprevalenza osservata nella presente indagine con i dati riportati in altri Paesi è oltremodo difficile e deve essere eseguito con cautela, a causa delle diversità geografiche tra le varie aree di studio, alle metodiche di campionamento, alla scarsa standardizzazione delle tecniche diagnostiche (sensibilità e specificità variabile) ed anche al diverso approccio epidemiologico utilizzato (Dubey J.P., 2009).

I risultati della presente ricerca, con il 72,5% (79/109) degli allevamenti positivi ad almeno una delle metodiche utilizzate, dimostrano come la toxoplasmosi sia una parassitosi ampiamente diffusa negli allevamenti suini ad uso famiglia in Sardegna, ovvero in animali allevati con tecniche tradizionali. Questo rappresenta un dato di notevole importanza, in quanto la presente indagine differisce dagli altri studi condotti in precedenza nell'isola (Scala A. *et al.*, 2008), in cui erano stati

indagati prevalentemente animali di allevamenti intensivi ed in cui si era evidenziata una positività pari al 15,2%.

Una differenza di sieroprevalenza è stata evidenziata tra le due province esaminate, con valori molto elevati nelle aziende localizzate nella Provincia di Sassari (82,8%). Probabilmente il tipo di allevamento praticato in Provincia di Sassari risulta più esposto a rischi d'infezione (maggiore contatto con i gatti o tipo di alimentazione dei suini meno controllata).

Le sieroprevalenze ottenute nella presente indagine (72,5%) risultano nettamente superiori rispetto a quelle riportate da Scala A. *et al.* (2008), in cui anticorpi anti- *T. gondii* venivano rilevati nel 52,6% (30/57) degli allevamenti monitorati ($\chi^2 = 6,54$; $p = 0,010$) con prevalenze del 54,3% (25/46) e del 40% (4/10) rispettivamente in allevamenti di tipo semi-intensivo ed intensivo. Solo uno degli allevamenti esaminati era di tipo familiare ed è risultato positivo.

Anche le sieroprevalenze ottenute sui singoli animali esaminati risultano essere nettamente superiori (51,7%) rispetto a quanto riportato nell'isola da Scala A. *et al.* (2008), in cui veniva riportata una sieroprevalenza del 15,2% (62/408); quest'ultimo dato risultava tuttavia essere in linea con quanto evidenziato in Umbria (Veronesi F. *et al.*, 2011) ed in Sicilia (Villari S. *et al.*, 2009).

I nostri dati differiscono notevolmente dai tassi di prevalenza (18,3%) ottenuti in un analogo studio condotto più di 40 anni fa (Frescura T. *et al.*, 1972) nel Centro Italia, in una popolazione di suini allevati con tecniche tradizionali in allevamenti familiari. In quest'ultimo lavoro tuttavia i sieri erano stati testati con la tecnica dell'IFI con un *cut-off* di 1/10, per cui la mancanza di uniformità delle tecniche utilizzate potrebbe rendere meno affidabile un confronto.

Una situazione completamente diversa da quanto finora descritto viene riportata da Esteves F. *et al.* (2014) in Portogallo, che evidenziano delle sieroprevalenze del 100% negli allevamenti suini di tipo intensivo a fronte di prevalenze del 33,3% negli allevamenti di tipo estensivo. Secondo gli AA, gli animali allevati con tecniche di tipo intensivo hanno un elevato rischio di esposizione all'infezione da *T. gondii*, in quanto l'alta concentrazione di animali allevati in spazi confinati, fa sì che, in caso di un difetto nel sistema di allevamento e l'eventuale ingresso in allevamento di una possibile fonte di contaminazione, aumenti il numero degli animali esposti e

dunque il numero degli animali sieropositivi (Hill D.E. & Dubey J.P., 2002; Van der Giessen J. *et al.*, 2007; Lopes A.P. *et al.*, 2013).

Gli elevati tassi di sieroprevalenza evidenziati negli allevamenti di tipo familiare dell'isola potrebbero essere attribuiti ad una elevata contaminazione ambientale, alla persistenza di un ciclo selvatico (cinghiali, volpi, roditori, uccelli selvatici), così come anche alla presenza di numerosi gatti che solitamente gravitano intorno a questo tipo di realtà.

Proprio la presenza dei gatti viene considerata uno dei più importanti fattori di rischio per la sieropositività nei suini (Dubey J.P., 2009), soprattutto per gli animali tenuti all'aperto, per i quali aumentano le possibilità di ingestione di oocisti eliminate dai gatti, considerando che poche oocisti sono sufficienti per produrre infezione nei maiali (Veronesi F. *et al.*, 2011).

Tutto questo spiegherebbe le differenze di sieroprevalenza riscontrate tra le diverse tipologie di allevamento, dimostrando come negli allevamenti di tipo intensivo e semi-intensivo, il tipo di confinamento "al chiuso" possa invece in qualche modo limitare o ridurre l'esposizione a possibili fattori di rischio (Dubey J.P., 2009).

I livelli anticorpali evidenziati nella presente indagine risultano essere elevati (PP > 60) nel 29,7% dei soggetti esaminati, diversamente da quanto rilevato da Veronesi F. *et al.* (2011), che nella loro indagine hanno evidenziato un livello di anticorpi specifici basso e variabile da maiale a maiale all'interno delle aziende esaminate, così come già riportato da AA (Dubey J.P., 2009). Questo tuttavia potrebbe essere correlato al momento dell'infezione, alla diversa reattività dell'animale, allo stadio biologico infettante ed alla virulenza del ceppo parassitario (Veronesi F. *et al.*, 2011). Allo stesso modo però, i dati riportati dagli AA si riferiscono a suini allevati con tecniche intensive, contrariamente al nostro studio basato invece su animali allevati prettamente con metodiche estensive e dunque più esposti al parassita.

Nella nostra indagine il parametro sesso sembra rappresentare un fattore di rischio, con elevate sieroprevalenze evidenziate nelle femmine (56,1%) rispetto ai maschi (38,5%). Questo dato differisce con quanto evidenziato in Portogallo da Esteves F. *et al.* (2014), ma concorda con quanto riportato nell'isola da Scala A. *et al.* (2008). Presumibilmente gli *stress* legati alla gravidanza e

all'allattamento della femmina comportano una maggiore sensibilità nei confronti dell'infezione da *T. gondii*.

Nella nostra indagine inoltre è stato possibile evidenziare una differenza nelle sieroprevalenze tra le 4 categorie di suini monitorati, da cui risulta come nelle scrofe e nei verri vi siano dei livelli di anticorpi anti- *T. gondii* molto più elevati, del 61,4% e del 42,8% rispettivamente, rispetto alle altre categorie monitorate (Tabella 2). Anche i valori di *Odds Ratio* evidenziano come le scrofe siano 5 volte più a rischio d'infezione rispetto alle altre categorie. Questo dato è in accordo con quanto riscontrato in Slovacchia da Turčeková L. *et al.* (2013).

Gli elevati tassi di prevalenza per questa categoria di soggetti può essere dovuto ad un più lungo contatto degli animali anziani con l'ambiente potenzialmente infetto (Villari S. *et al.*, 2009), sotto questo aspetto possiamo considerare la toxoplasmosi come un'infezione ad accumulo. Importante è come la carne di questi soggetti sia quella maggiormente utilizzata per la produzione delle salsicce (Dubey J.P., 2000), e quindi in Sardegna rappresenta una fonte di contagio elevata per l'uomo, in considerazione delle particolari abitudini culinarie presenti nell'isola in relazione al consumo di questo insaccato. A confermare questa ipotesi purtroppo ci sono i focolai di trichinellosi registrati nel nuorese derivanti dal consumo di salsicce fresche di scrofe allevate in pascoli comunali.

Le prevalenze ottenute in PCR pari al 54,8% delle aziende ed al 47,7% dei suini esaminati, dimostrano come l'encefalo possa essere considerato una buona matrice per la ricerca di *T. gondii* in questa specie, così come dimostrato in uno studio sperimentale condotto da Juránková J. *et al.* (2014), in cui il cervello, si è rivelato sito di predilezione di *T. gondii* nei suini seguito da polmoni, cuore e muscoli dorsali.

Su 28 suini in cui è stato possibile effettuare l'indagine in parallelo, sierologica e biomolecolare, sono state evidenziate delle sieroprevalenze elevate sia in ELISA (21,4%: 6/28) che in PCR (39,3%; 11/28).

Tuttavia il fatto che attraverso lo *screening* molecolare siano state evidenziate delle prevalenze leggermente inferiori rispetto all'indagine sierologica, dipende nel caso specifico dalla minore sensibilità della PCR rispetto alla sierologia (Wyss R. *et al.*, 2000; Hill D.E. *et al.*, 2006), a causa della distribuzione *random* delle cisti tissutali e alla piccola quantità di tessuto campionata su cui viene effettuata la PCR, rispetto alla taglia dell'ospite (Halová D. *et al.*, 2013).

Secondo quanto riportato da Ghoneim N.H. *et al.* (2010), così come attraverso i test sierologici è possibile evidenziare degli elevati tassi di positività per la toxoplasmosi rispetto alla PCR, il metodo sierologico in combinazione con la biologia molecolare potrebbero invece essere utilizzati per una più accurata diagnosi di malattia.

I risultati preliminari della tipizzazione di alcuni campioni positivi a *T. gondii* sembrerebbero dimostrare la presenza nei suini dell'isola del genotipo III. Risultati simili sono stati ottenuti anche in Portogallo dove Sousa S. *et al.* (2006) hanno rilevato la presenza dei genotipi II e III, mentre differisce con quanto rilevato da Turčeková L. *et al.* (2013), che nell'85,7% e nel 14,3% dei suini positivi evidenziavano i genotipi I e II rispettivamente.

La determinazione del genotipo per *T. gondii* è un dato di notevole rilevanza. I tipi clonali predominanti sono tre (I, II e III) (Dardé M.L., 2008). Il genotipo I è relativamente raro e comprende solo il 10% circa degli isolati sia in Europa che negli USA. Esso è considerato il genotipo più virulento, con una grande capacità di superare le barriere tissutali sia *in vivo* che *in vitro* (Turčeková L. *et al.*, 2013). In Europa e negli USA il lignaggio clonale più diffuso sembrerebbe essere il II, anche se alcuni autori discutono sulla possibile circolazione dei tipi clonali I, III o di clonaggi atipici (Berger-Soch A.E. *et al.*, 2011) (Tabella 4).

L'alta prevalenza riscontrata per *T. gondii* nel presente lavoro, rappresenta un risultato allarmante e suggerisce che i suini (per lo meno quelli allevati "uso famiglia" o estensivamente) debbano essere considerati un'importante fonte di infezione per la popolazione dell'isola, come recentemente riportato nei suini allevati in Portogallo (Esteves F. *et al.*, 2014).

In Europa e negli Stati Uniti, la carne di maiale viene considerata la maggior fonte di toxoplasmosi per l'uomo (Janitschke K. *et al.*, 1999; Dubey J.P., 1994; Dubey J.P., 2000; Shirley M.W., 1997). Questa ipotesi è basata sul fatto che le cisti tissutali sono state riscontrate in molti tagli commerciali di carni suine (Dubey J.P. *et al.*, 1984; Dubey J.P. *et al.*, 1986).

Visto che ancora oggi in Sardegna persiste la pratica della macellazione ad "uso famiglia" del suino (peraltro regolamentata), e dato che è pratica comune utilizzare queste carni per la preparazione di prodotti a base di carne cruda (insaccati, prosciutti etc.), il consumo di carni fresche di suino, o perché insufficientemente cotte o per assaggio e manipolazione di impasti di carne cruda

destinata alla produzione degli insaccati, così come il consumo degli stessi entro pochi giorni dalla preparazione (ad esempio secondi usi locali) potrebbe rappresentare un'importante fonte di infezione per l'uomo.

I bradizoiti di *T. gondii* sono più resistenti agli enzimi digestivi, (pepsina e tripsina) rispetto ai tachizoiti (Dubey J.P. *et al.*, 1998; Jacobs L. *et al.*, 1960). Pertanto, l'ingestione di cisti tissutali vitali da parte di un ospite non immune di solito si tradurrà in infezione da *T. gondii*. Anche se le cisti tissutali sono meno resistenti alle condizioni ambientali rispetto alle oocisti, esse sono relativamente resistenti alle variazioni di temperatura e rimangono infettive in carcasse refrigerate (1 ± 4 °C) o carne macinata per un massimo di tre settimane e a temperature di 4-6 °C per oltre due mesi (Dubey J.P. & Kirkbride C.A., 1989; Dubey J.P. *et al.*, 1990), vale a dire probabilmente finché la carne rimane adatta per il consumo umano (Dubey J.P., 2000).

È ormai certo che le cisti tissutali di *T. gondii* sono suscettibili a varie procedure fisiche che includono il trattamento termico (Dubey J.P. *et al.*, 1990; Dubey J.P., 2000), il congelamento (Kuticic V. & Wikerhauser T., 1996; Kotula A.W. *et al.*, 1991), l'acidità, i raggi gamma (0,4-1 kGy) e le alte pressioni (300 MPa) (Kijlstra A. & Jongert E., 2008; Aymerich T. *et al.*, 2008; Lindsay D.S. *et al.*, 2006; Bayarri S. *et al.*, 2012). In particolare le cisti tissutali sopravvivono a temperature comprese tra -1 e -8 °C per più di una settimana (Kotula A.W. *et al.*, 1991), mentre la maggior parte vengono disattivate a temperature di -12 °C o inferiori (Kotula A.W. *et al.*, 1991; Kuticic V. & Wikerhauser T., 1996), ma di tanto in tanto alcune cisti tissutali possono sopravvivere alla surgelazione (Dubey J.P., 2000). Questo ha suggerito che alcuni ceppi di *T. gondii* possano essere resistenti al congelamento (Kuticic V. & Wikerhauser T., 1996).

Anche se il congelamento sarebbe probabilmente l'opzione più pratica per il controllo e la gestione del pericolo biologico *T. gondii* nell'industria della carne, il trattamento termico si è rivelato il metodo più sicuro per inattivare il parassita ed evitare la trasmissione umana di *T. gondii* attraverso gli alimenti carnei (Kijlstra A. & Jongert E., 2008). Le cisti tissutali nella carne vengono uccise dal riscaldamento a 67 °C (Dubey J.P., 2000; Dubey J.P. *et al.*, 1990), per questo l'EFSA (EFSA, 2007) consiglia vivamente il raggiungimento di queste temperature nei processi di cottura degli alimenti, mentre la loro sopravvivenza a temperature più basse dipende dalla durata della cottura. Per esempio, in condizioni di laboratorio è stato dimostrato che le cisti rimangono vitali a 60 °C per circa 4 minuti e a 50 °C per circa 10 minuti (Dubey J.P. *et al.*, 1990). È importante dunque sottolineare

come in ambiente domestico sia necessaria la cottura per un periodo prolungato di tempo in modo da raggiungere le temperature necessarie per l'inattivazione delle eventuali cisti tissutali di *T. gondii* in tutte le parti della carne. Alcune cisti tissutali potrebbero inoltre rimanere infettanti se si utilizzano delle procedure di cottura in cui la carne viene riscaldata in modo non uniforme, ad esempio con la cottura a microonde (Lundén A. & Ugglia A., 1992) o al barbecue (Zhou J. & Tao L., 2015).

Il rischio di infezione attraverso il consumo dei prodotti di trasformazione delle carni suine, se adeguatamente preparati e stagionati è modesto, poiché si ritiene che l'affumicatura, la salatura, l'essiccamento e l'iniezione di soluzioni al cloruro di sodio, lattato di potassio e lattato di sodio, normalmente impiegati per la preparazione dei salumi rendano non vitali i bradizoiti, tuttavia queste procedure non sono state universalmente standardizzate (Dubey J.P., 2010; Pott S., 2013; Neumayerová H. *et al.*, 2014; Kotula A.W. *et al.*, 1991; Lundén A. & Ugglia A., 1992; Hill D.E. *et al.*, 2004; Kijlstra A. & Jongert E., 2008). È opportuno inoltre precisare che alcuni insaccati (es. salsicce) vengono a volte sottoposti a tempi di maturazione più brevi di quelli necessari per una stagionatura naturale. In questo caso è possibile che le cisti eventualmente presenti possano mantenere intatte le loro proprietà infettanti.

Il potere infettante delle cisti tissutali di *T. gondii* presenti nei prodotti a base di carne dipendono fortemente dalla sinergica interazione tra diversi fattori (Kijlstra A. & Jongert E., 2008), tra cui pH, tempo di maturazione, temperatura di stoccaggio e concentrazione salina utilizzata per il confezionamento, come evidenziato da uno studio effettuato da Pott S. *et al.* (2013). I dati dimostrano che le cisti tissutali di *T. gondii* hanno un'elevata capacità di adattamento e tolleranza delle variazioni di pH (sono infettanti nel muscolo per oltre 26 giorni a pH 5), ma sono molto sensibili al sale. Le cisti rimangono vitali nel muscolo ad una concentrazione di NaCl del 2,0% per non più di 8 giorni. Navarro I.T. *et al.* (1992), analizzando delle salsicce prodotte da suini inoculati sperimentalmente con *T. gondii*, hanno concluso che concentrazioni saline pari al 2,0% e al 2,5% sono in grado di inattivare il parassita in 48 ore dall'inizio del trattamento. Il processo di salatura però non necessariamente uccide la forma cistica del parassita nelle salsicce di maiale fatte in casa: cisti tissutali di *T. gondii* sono state inattivate ad una concentrazione di sale da cucina pari al 3% soltanto dopo tre-sette giorni, periodo di tempo spesso superiore rispetto a quello di produzione e consumo del prodotto (Jamra L.M. *et al.*, 1991; Navarro I.T. *et al.*, 1992; Tenter A.M., 2009). Questo

indicherebbe che il processo di salatura da solo non è sufficiente a prevenire la trasmissione dell'infezione mediante la forma cistica (EFSA, 2007). Pertanto, salsicce prodotte con basse concentrazioni di NaCl e sottoposte a brevi periodi di maturazione rappresentano un potenziale rischio per i consumatori (Pott S. *et al.*, 2013). A tal proposito Vitale M. *et al.* (2014) hanno descritto un caso di toxoplasmosi acuta associata al consumo di salsiccia cruda contaminata verificatosi in Italia. La presenza di parassiti vitali in salsicce di maiale fresche presenti in commercio è stata dimostrata anche da uno studio effettuato in Brasile, infatti l'elevata prevalenza della toxoplasmosi in alcune aree del mondo, è stata associata proprio al consumo di salsicce crude (Dias R.A.F. *et al.*, 2005). Tale fenomeno purtroppo è molto diffuso, come già ricordato per i casi di trichinellosi, anche in Sardegna.

In uno studio condotto da Bayarri S. *et al.* (2013), in cui veniva valutata l'influenza del processo di stagionatura sulla vitalità di *T. gondii* nei prosciutti, nessun parassita vitale è stato trovato nel prodotto finale (14 mesi di stagionatura) e pertanto il consumo di prosciutti stagionati è stato considerato un fattore di rischio insignificante per l'acquisizione della toxoplasmosi. Tuttavia, come nel caso degli insaccati è possibile che non rispettando gli adeguati tempi di stagionatura il parassita possa rimanere vitale in questi prodotti.

Prevenire le infezioni da *T. gondii* appare quindi un problema di non facile risoluzione, ma è possibile ridurre l'incidenza con una corretta informazione tesa soprattutto all'educazione igienico-sanitaria e alimentare della popolazione, con particolare riguardo delle categorie a rischio (donne gestanti, individui immunocompromessi), e soprattutto nell'isola, migliorare l'efficacia dell'anagrafe dei suini, che potrebbe limitare il fenomeno dell'allevamento e delle macellazioni clandestine.

Nonostante la grande importanza che la toxoplasmosi riveste quale zoonosi trasmessa da cibo e l'esistenza di una Direttiva Europea (*Direttiva CE 2003/99*) riguardo la sorveglianza epidemiologica del parassita, ad oggi non sono disponibili dati rappresentativi sulla sieroprevalenza da *Toxoplasma* nell'Unione Europea (EFSA, 2007). Tuttavia, dovrebbero essere sviluppati dei metodi analitici standardizzati per la rilevazione del parassita prima di poter introdurre un sistema di monitoraggio comparabile nell'UE.

A seguito di una richiesta da parte della Comunità Europea, il gruppo di esperti sui pericoli biologici dell'EFSA, ha fornito una serie di pareri scientifici da implementare nelle operazioni di ispezione della carne per le diverse specie animali. Nel primo parere espresso dall'EFSA, riguardante i suini, *Toxoplasma* è stato considerato nell'UE un pericolo di media rilevanza, ma riconosciuto tra i rischi biologici più rilevanti nell'ambito dell'ispezione delle carni di suini, al fianco di *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Trichinella* spp.

6.6. CONCLUSIONI

In conclusione, gli elevati tassi di prevalenza rilevati nei suini allevati con tecniche tradizionali nell'isola, che risultano essere tra i più alti riportati in questa specie animale (51,7%), suggeriscono come il consumo di carne suina poco cotta, così come di insaccati non adeguatamente stagionati, possa rappresentare un'importante fonte di infezione per l'uomo. Per lo stesso motivo anche in Sardegna le persone che entrano in contatto con le carni crude di questi animali, gli operatori degli impianti di macellazione, casalinghe, addetti alle aziende, etc., dovrebbero adottare adeguate prassi igieniche di prevenzione, più rigorose al fine di ridurre il rischio di infezione.

Tutti gli addetti dell'intera filiera suina in Sardegna, dovrebbero essere informati di tali rischi attraverso una attenta e capillare informazione sanitaria, in quanto purtroppo una pressione parassitaria così elevata può comportare importanti ripercussioni negative sulla salute del consumatore. A tal fine sarebbe auspicabile che la standardizzazione delle metodiche diagnostiche, così come richiesto dall'EFSA, (anche la sola sierologia potrebbe essere un buon primo approccio), ma non ancora ampiamente applicata sul campo, possa costituire anche in Sardegna, un buon volano per il controllo di questa infezione protozoaria.

BIBLIOGRAFIA

- Aymerich, T.; Picouet, P.A.; Monfort, J.M. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, **78**(1-2): 114-129.
- Bayarri, S.; Gracia, M.J.; Lázaro, R.; Pérez-Arquillué, C.; Barberán, M.; Herrera, A. (2013). Determination of the Viability of *Toxoplasma gondii* in Cured Ham Using Bioassay: Influence of Technological Processing and Food Safety Implications. *J Food Prot*, **73**(12): 2239-2243.
- Bayarri, S.; Gracia, M.J.; Lázaro, R.; Pérez-Arquillué, C.; Herrera, A. (2012). *Toxoplasma gondii* in Meat and Food Safety Implications – A Review. *Zoonosis intechopen.com*
- Berger-Schoch, A.E.; Bernet, D.; Doher, M.G.; Gottstein, B.; Frey, C.F. (2011). *Toxoplasma gondii* in Switzerland: a serosurvey based on meat juice analysis of slaughtered pigs, wild boar, sheep and cattle. *Zoonoses Public Health*, **58**: 472-478.
- 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 multicentre case-control study. *BMJ*, **321**: 142-147.
- Dardé, M.L. (2008). *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. *Parasite*, **15**: 366-371. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2008153366>.
- Dias, R.A.F.; Navarro, I.T.; Ruffolo, B.B.; Bugni, F.M.; Castro, M.V.; Freire, R.L. (2005). *Toxoplasma gondii* em lingüiça de carne suína tipo frescal, com investigação soropidemiológica em trabalhadores de estabelecimentos produtores. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **47**: 185-189.
- Direttiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003 sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la direttiva 92/117/CEE del Consiglio.
- Direttiva 2008/120/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 18 dicembre 2008 che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini.
- Dubey, J.P. (2004). Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol*, **126**: 57-72.
- Dubey, J.P. & Kirkbride, C.A. (1989). Economic and public health considerations of congenital Toxoplasmosis in lambs. *J Am Vet Med Assoc*, **195**: 1715-1716.
- Dubey, J.P. (1988). Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *Am J Vet Res*, **49**: 910-913.
- Dubey, J.P. (1994). Toxoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc*, **205**: 1593-1598.
- Dubey, J.P. (2000). The scientific basis for prevention of *Toxoplasma gondii* infection: studies on tissue cyst survival, risk factors and hygiene measures. In: Ambroise-Thomas P., Petersen E., editors. *Congenital Toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control*. Paris: Springer-Verlag, pp. 271-276.
- Dubey, J.P. (2009). Toxoplasmosis in pigs— The last 20 years. *Veterinary Parasitology*, **164**: 89-103.
- Dubey, J.P. (2010). Toxoplasmosis of animals and humans. 2nd edition. Boca Raton, Florida: CRC Press, p. 313.
- Dubey, J.P.; Edelhorf, R.; Marcet, R.; Vianna, M.C.B.; Kwok, O.C.H.; Lehmann, T. (2005). Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* infections in free-range chickens from Austria. *Vet Parasitol*, **133**: 299-306.

- Dubey, J.P.; Gamble, H.R.; Hill, D.E.; Sreekumar, C.; Romand, S.; Thulliez, P. (2002). High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. *J Parasitol*, **88**: 1234-1238.
- 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. *Journal of Parasitology*, **76**: 201-204
- Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Speer, C.A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*, **11**: 267-299.
- Dubey, J.P.; Murrell, K.D.; Fayer, R. (1984). Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs fed oocysts. *Am J Vet Res*, **45**: 1941-1943.
- Dubey, J.P.; Murrell, K.D.; Fayer, R. (1986). Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. *J Am Vet Med Assoc*, **188**: 1035-1037.
- Dubey, J.P.; Tiao, N.; Gebreyes, W.A.; Jones, J.L. (2012). A review of Toxoplasmosis in humans and animals in Ethiopia. *Epidemiol Infect*, **140**: 1935-1938.
- Dubey, J.P.; Weigel, R.M.; Siegel, A.M.; Thulliez, P.; Kitron, U.D.; Mitchell, M.A.; Mannelli, A.; Mateus-Pinilla, N.E.; Shen, S.K.; Kwok, O.C.H.; Todd, K.S. (1995). Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J Parasitol*, **81**: 723-729.
- EFSA, European Food Safety Authority (2007). Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from EFSA on surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, foods and animals. *EFSA Journal*; **583**: 1-64.
- Esteves, F.; Aguiar, D.; Rosado, J.; Costa, M.L.; De Sousa, B.; Antunes, F.; Matos, O. (2014). *Toxoplasma gondii* prevalence in cats from Lisbon and in pigs from centre and south of Portugal. *Veterinary Parasitology*, **200**: 8-12
- Frescura, T.; Ambrosi, M.; Polidori, G.A. (1972). Indagini sperimentali sulla diffusione della Toxoplasmosi nei suini. *Parassitologia*, **14**: 129-135.
- Ghoneim, N.H.; Shalaby, S.I.; Hassanain, N.A.; Zeedan, G.S.G.; Soliman, Y.A.; Abdalhamed, A. (2010). Comparative Study Between Serological and Molecular Methods for Diagnosis of Toxoplasmosis in Women and Small Ruminants in Egypt. *Foodborne Pathogens and Disease*, **7**(1): 17-22.
- Halová, D.; Mulcahy, G.; Rafter, P.; Turceková, L.; Grant, T.; De Waal, T. (2013). *Toxoplasma gondii* in Ireland: seroprevalence and novel molecular detection method in sheep, pigs, deer and chickens. *Zoonoses and Public Health*, **60**: 168-173.
- Hill, D.E. & Dubey, J.P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect*, **8**: 634-640.
- 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. *Journal of Food Protection*, **67**(10): 2230-2233.
- 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. *Vet. Parasitol*, **141**: 9-17.
- Hill, D.E.; Haley, C.; Wagner, B.; Gamble, H.R.; Dubey, J.P. (2010): Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the US swine herd using sera collected during the national animal health monitoring survey (Swine 2006). *Zoonoses Public Health*, **57**: 53-59.
- Jacobs, L.; Remington, J.S.; Melton, M.L. (1960). A survey of meat samples from swine, cattle, and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. *J Parasitol*, **46**: 23-28.

- Jamra, L.M.; Martins, M.C.; Vieira, M.D.L. (1991). Action of table salt on *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **33**: 359-363.
- Janitschke, K. (1999). Pränatale Übertragung der Toxoplasmen von der Mutter auf das Kind. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*, **42**: 548-552.
- Juránková, J.; Basso, W.; Neumayerová, H.; Balá, V.; Jánová, E.; Sidler, X.; Deplazes, P.; Koudela, B. (2014). Brain is the predilection site of *Toxoplasma gondii* in experimentally inoculated pigs as revealed by magnetic capture and real-time PCR. *Food Microbiology*, **38**: 167-170.
- Kijlstra, A. & Jongert, E. (2008). *Toxoplasma*-safe meat: close to reality? *Trend Parasitol*, **25**: 18-22.
- Kijlstra, A.; Eissen, O.A.; Cornelissen, J.; Munniksma, K.; Eijck, I.; Kortbeek, T. (2004). *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **45**: 3165-3169.
- Kotula, A.W.; Dubey, J.P.; Sharar, A.K.; Andrew, C.D.; Shen, S.K.; Lindsay, D.S. (1991). Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J Food Protect*, **54**: 687-690.
- Kuticic, V. & Wikerhauser, T. (1996). Studies of the effect of various treatments on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts and oocysts. *Curr Top Microbiol Immunol*, **219**: 261-265.
- Lindsay, D.S.; Collins, M.V.; Holliman, D.; Flick, G.J.; Dubey, J.P. (2006). Effects of highpressure processing on *Toxoplasma gondii* tissue cysts in ground pork. *J Parasitol*, **92**: 195-196.
- Lopes, A.P.; Dubey, J.P.; Neto, F.; Rodrigues, A.; Martins, T.; Rodrigues, M.; Cardoso, L. (2013). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, goats and pigs from the North of Portugal for human consumption. *Vet Parasitol*, **193**: 266-269.
- Lundén, A. & Uggla, A. (1992). Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *International Journal of Food Microbiology*, **15**: 357-363.
- Montoya, J.G. & Liesenfeld, O. (2004) Toxoplasmosis. *Lancet*, **363**: 1965-1976.
- Navarro, I.T.; Vidotto, O.; Giraldi, N.; Mitsuka, R. (1992). Resistência do *Toxoplasma gondii* ao cloreto de sódio e aos condimentos em linguica de suínos. *Bol. Oficina Sanit. Panam*, **112**: 138-143.
- Neumayerová, H.; Juránková, J.; Saláková, A.; Gallas, L.; Kovarcík, K.; Koudela, B. (2014). Survival of experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in vacuum packed goat meat and dry fermented goat meat sausages. *Food Microbiology*, **39**: 47-52.
- Pott, S.; Koethe, M.; Bangoura, B.; Zöllner, B.; Dausgries, A.; Straubinger, R.K.; Fehlhaber, K.; Ludewig, M. (2013). Effects of pH, sodium chloride, and curing salt on the infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J Food Prot*, **76**(6): 1056-61.
- Regolamento (CEE) n. 2092/91 del Consiglio, del 24 giugno 1991, relativo al metodo di produzione biologico di prodotti agricoli e alla indicazione di tale metodo sui prodotti agricoli e sulle derrate alimentari.
- Scala, A.; Giobbe, M.; Mula, P.P.; Pipia, A.P.; Sanna-Coccone, G.; Firinu, A.; Varcasia, A.; Marrosu, R.; Garippa, G. (2008). Toxoplasmosi dei suidi in Sardegna: indagine sieroepidemiologica. *Parassitologia*, **50**: 235.
- Shirley, M.W. (1997). COST 820 - Vaccines against animal coccidiosis. 5.4. Working group 4, sarcocystosis, Toxoplasmosis, neosporosis, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, pp. 28-52 ISBN, 92-827-8511-4.
- Sousa, S.; Ajzenberg, D.; Canada, N.; Freire, L.; da Costa, J.M.; Dardé, M.L.; Thulliez, P.; Dubey, J.P. (2006). Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. *Vet Parasitol*, **135**: 133-136.

- Su, C.; Zhang, X.; Dubey, J.P. (2006). Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasite. *International Journal for Parasitology*, **36**: 841-848.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725-2729.
- Tenter, A.M. (2009). *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **104**: 364-369.
- Tenter, A.M.; Heckeroth, A.R.; Weiss, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*, **30**: 1217-1258.
- Turčeková, L.; Antolová, D.; Reiterová, K.; Spišák, F. (2013). Occurrence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in naturally infected pigs. *Acta Parasitologica*, **58**(3): 361-366.
- Van der Giessen, J.; Fonville, M.; Bouwknecht, M.; Lanelaar, M.; Vollema, A. (2007). Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing system in the Netherlands. *Vet. Parasitol*, **148**: 371-374.
- Veronesi, F.; Ranucci, D.; Branciarri, R.; Miraglia, D.; Mammoli, R.; Fioretti, D.P. (2011). Seroprevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection on Finishing Swine Reared in the Umbria Region, Central Italy. *Zoonoses Public Health*, **58**: 178-184.
- Vesco, G. & Villari, S. (2006). Sieroprevalenza di *Toxoplasma gondii* in suini macellati in Sicilia. *Proc LXI S.I.S.Vet*, **207**: 111-112.
- Villari, S.; Vesco, G.; Petersen, E.; Crispo, A.; Buffolano, W. (2009). Risk factors for Toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. *Vet Parasitol*, **161**: 1-8.
- Vitale, M.; Tumino, G.; Partanna, S.; La Chiusa, S.; Mancuso, G.; La Giglia, M.; Lo Presti V.D.M. (2014). Impact of Traditional Practices on Food Safety: A Case of Acute Toxoplasmosis Related to the Consumption of Contaminated Raw Pork Sausage in Italy. *J Food Prot*, **77**: 643-646.
- Weigel, R.M.; Dubey, J.P.; Siegel, A.M.; Hoefling, D.; Reynolds, D.; Herr, L.; Kitron, U.D.; Shen, S.K.; Thulliez, P.; Fayer, R.; Todd, T.S. (1995). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Illinois swine in 1992. *J Am Vet Med Assoc*, **206**: 1747-1751.
- Weiss, L.M. & Dubey, J.P. (2009). Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Int J Parasitol*, **39**: 895-901.
- Wyss, R.; Sager, N.; Müller, F.; Inderbitzin, M.; König Audigé, L.; Gottstein, B. (2000). The occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* as regards meat hygiene. *Shewitz Arch Tierheilkd*, **142**: 95-108.
- Zhou, J. & Tao, L. (2015). Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in Wuxi region. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, **27**(6): 604-607.
- Zimmerman, J.J.; Dreesen, D.W.; Owen, W.J.; Beran, G.W. (1990). Prevalence of Toxoplasmosis in swine from Iowa. *J Am Vet Med Assoc*, **196**: 266-270.

DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA

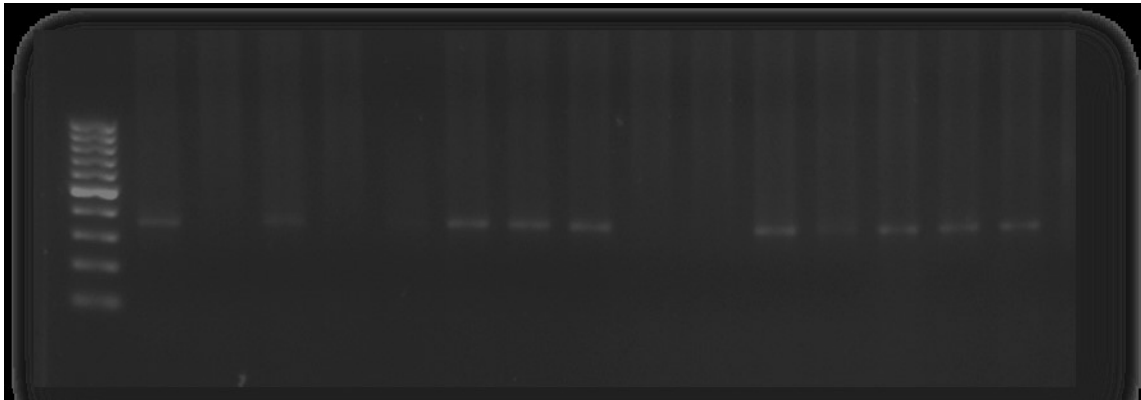


Figura 1. Campioni di encefalo di suino positivi a *T. gondii* mediante *Nested PCR*.

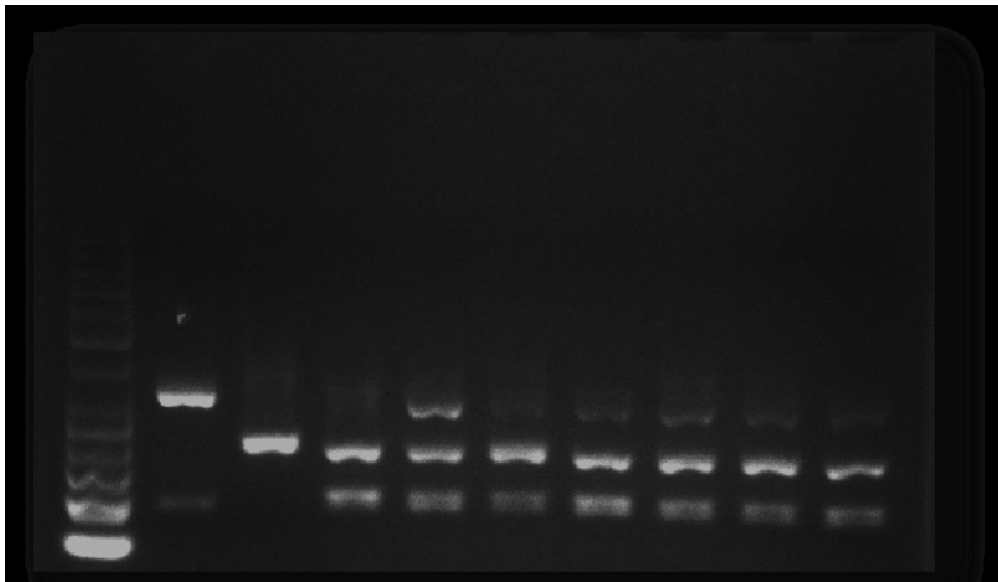


Figura 2. Genotipizzazione di campioni suini positivi a *T. gondii* mediante *PCR-RFLP*: digestione enzimatica con *MseI* per il marcatore genetico *GRA 6*.

TABELLE E GRAFICI

Tabella 1. Dati registrati per ciascuno dei suini oggetto dell'indagine.

AZIENDE PER PROVINCIA		NUMERO	
<i>Sassari</i>		70	
<i>Cagliari</i>		39	
<i>Totale</i>		109	
AZIENDE ESAMINATE		INDAGINE SIEROLOGICA	INDAGINE BIOMOLECOLARE
<i>Sassari</i>		63	23
<i>Cagliari</i>		0	39
SESSO			
<i>Femmine</i>		310	
<i>Maschi</i>		104	
<i>Totale</i>		414	
CATEGORIE			
<i>Magroni</i>		118	
<i>Grasso</i>		14	
<i>Scrofe</i>		233	
<i>Verri</i>		49	
<i>Totale</i>		414	

Tabella 2. Sieroprevalenze ed analisi statistica dei dati stratificate per categorie di suini esaminati.

CATEGORIA	TOTALE ESAMINATI	ELISA POSITIVI	PREVALENZA (%)	Odds Ratio	ANALISI STATISTICA
<i>Magrone</i>	118	47	39,8	2.43	<i>χ² con 3 gradi di libertà = 22,06; p = 0,000</i>
<i>Grasso</i>	14	3	21,4	1.00	
<i>Scrofe</i>	233	143	61,4	5.83	
<i>Verro</i>	49	21	42,8	2.75	
<i>Totale</i>	414	214	51,7		

Grafico 1. Stratificazione delle prevalenze per classi di PP.

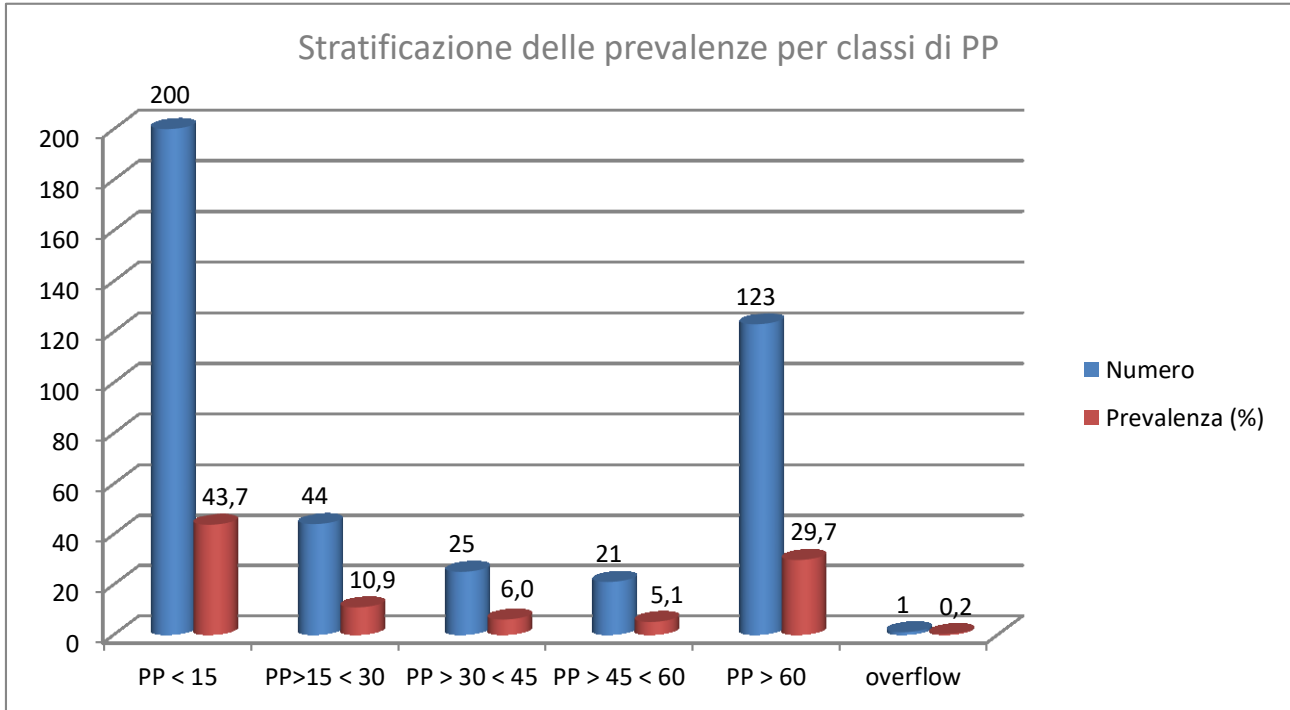


Tabella 3. Confronto tra le prevalenze ottenute nei 28 suini indagati in parallelo con le due metodiche diagnostiche utilizzate.

	<i>PCR Positivi / ELISA Negativi</i>	<i>PCR Negativi/ ELISA Positivi</i>	<i>PCR Negativi/ ELISA Negativi</i>	<i>Analisi Statistica Dei Dati</i>
Numero	11	6	5	
Prevalenza (P)	39,3%	21,4%	17,8%	$\chi^2 = 2,11;$ $p = 0,146$

Tabella 4. Genotipi identificati nei suini in Europa.

STATO	GENOTIPO	AUTORE
Slovacchia	I + II	Turčeková L. <i>et al.</i> , 2013
Portogallo	II + III	Sousa S. <i>et al.</i> , 2006
Svizzera	II	Berger-Soch A.E. <i>et al.</i> , 2011
UK	I + II	Aspinall T.V. <i>et al.</i> , 2002

CONCLUSIONI GENERALI

Oggetto di studio sono stati ovini, caprini e suini allevati nella regione Sardegna, in Italia, poiché riconosciute tra le specie ad alto rischio di trasmissione di *T. gondii* (EFSA, 2011; 2013).

Nel progetto sperimentale sono state seguite diverse linee di ricerca:

Nella **FASE 1** è stato messo a punto un protocollo diagnostico che fosse adatto per uno *screening* dell'infezione da *T. gondii* in un campione di ovini allevati e regolarmente macellati in Sardegna. Per lo scopo sono state utilizzate in parallelo una tecnica sierologica ed una biomolecolare (ELISA e PCR). Questa sperimentazione, è nata dall'esigenza di validare delle tecniche diagnostiche adatte ad un rapido e conveniente *screening* dell'infezione da *T. gondii* al macello.

I risultati ottenuti hanno evidenziato come in alternativa ai metodi sierologici classici, l'analisi mediante kit commerciale ELISA sul "succo di carne" ottenuto dal miocardio, affiancata dalla successiva analisi biomolecolare con PCR effettuata sul miocardio stesso (matrice facilmente reperibile in sede di macellazione) sia un valido strumento per stimare la presenza di capi infetti.

L'indagine, diversamente da altri studi condotti in precedenza nell'isola sarda (Chessa G. *et al.*, 2014; Masala G. *et al.*, 2007; Tola S. *et al.*, 2002), è stata effettuata su ovini regolarmente macellati, le cui carni sono state destinate al consumo umano diretto e ha consentito di rilevare purtroppo un'elevata prevalenza negli animali esaminati (97,3%), dimostrando così come la toxoplasmosi sia una parassitosi largamente diffusa negli allevamenti ovini della Sardegna.

Nella **FASE 2** della ricerca, è stata valutata, tramite monitoraggio della risposta anticorpale (IgG), l'eventuale presenza di una differente sensibilità all'infezione da *T. gondii* tra pecore e capre e di un *trend* stagionale nelle due specie.

Il tipo di protocollo applicato, rispetto a studi simili precedenti, ha consentito sicuramente di monitorare pecore e capre sarde nelle stesse identiche condizioni, eliminando tutti i fattori legati all'ambiente di allevamento che avrebbero potuto interferire con la comparazione della risposta umorale all'infezione da *T. gondii*. In questo modo, è stato possibile stabilire con certezza che le pecore da noi esaminate hanno risposto in modo "più attivo" con la produzione di un'entità

superiore di IgG rispetto alle capre. La differente risposta anticorpale tra le due specie è difficilmente attribuibile a specifici fattori, se non ad una caratteristica legata esclusivamente alla specie. Così come suggerito da Dubey J.P. (2009) sembrerebbe che la pecora sia la specie più sensibile alla toxoplasmosi.

Al contrario non è stato riscontrato un chiaro e costante *trend* stagionale della sieropidemiologia della toxoplasmosi nei piccoli ruminanti.

L'analisi dei dati di tutti gli allevamenti monitorati ha mostrato tassi di prevalenza variabili sia nelle pecore che nelle capre, segno evidente che situazioni ambientali e manageriali influenzano pesantemente le dinamiche della risposta anticorpale nei confronti di *T. gondii*.

La **FASE 3** ha invece valutato l'entità della trasmissione di anticorpi nei confronti di *Toxoplasma* dalle pecore ai loro agnelli e il perdurare di questa immunità passiva tramite l'ingestione del colostro.

La nostra ricerca ha evidenziato come oltre il 90% degli agnelli, nati da pecore sieropositive per *T. gondii*, possano risultare sieropositivi a 48 ore di vita e come anche i valori medi di PP risultino addirittura maggiori di quelli riscontrati nelle madri. Tale *trend* si registra anche per quanto riguarda le medie di PP tra le madri sieronegative e le medie dei loro agnelli a 48 ore dalla nascita.

I dati acquisiti hanno evidenziato come l'efficacia dell'immunità passiva nei confronti di *T. gondii* nell'ovino si esaurisca entro i primi 90 giorni di vita degli agnelli, i quali, generalmente dopo tale periodo, possono contrarre l'infezione, tramite l'ingestione delle oocisti presenti nei pascoli e/o nelle acque di bevanda.

Nella **FASE 4**, è stata indagata la toxoplasmosi in allevamenti suini ad uso famiglia in Sardegna, con l'obiettivo di confrontare le prevalenze ottenute con quelle provenienti da altri lavori condotti su allevamenti di tipo intensivo, semi-intensivo nell'isola.

I risultati della presente ricerca, con il 72,5% degli allevamenti positivi, e il 51,7% dei singoli animali esaminati dimostrano come la toxoplasmosi sia una parassitosi ampiamente diffusa in Sardegna, anche nei suini allevati e macellati esclusivamente per un uso familiare, ovvero in animali allevati con tecniche tradizionali.

Inoltre per la prima volta in Sardegna, i dati preliminari sulla genotipizzazione del DNA parassitario isolato dall'encefalo di suino, hanno mostrato la presenza del genotipo III in questa specie animale.

L'alta prevalenza della toxoplasmosi rilevata nelle diverse fasi sperimentali evidenzia la forte pressione parassitaria esercitata da *T. gondii* sugli animali ad interesse zootecnico dell'isola e pone il problema del rischio di trasmissione all'uomo attraverso l'ingestione e la manipolazione delle carni crude di queste specie animali.

