



Università di Pisa

Scuola di Specializzazione in

“Patologia e Clinica degli Animali d’Affezione”

Direttore Prof. Giovanni Cardini

Tesi di Specializzazione

Monitoraggio di Toxoplasma gondii in alcune colonie feline della Provincia di Firenze

Specializzando

Dott. Alessandro Guerrini

Relatore

Prof.ssa Grazia Guidi

Correlatore

Prof.ssa Francesca Mancianti

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

...BRAVI, BRAVISSIMI E BUGIARDI

(cit. prof. F. Morgantini)

Sommario

RIASSUNTO/ABSTRACT	4
INTRODUZIONE	5
MATERIALI E METODI	15
RISULTATI.....	22
DISCUSSIONE	26
BIBLIOGRAFIA	31

RIASSUNTO

Parole chiave: Monitoraggio Epidemiologico, *Toxoplasma gondii*, Colonie Feline, IFAT, nPCR

Sono stati esaminati, per *Toxoplasma gondii*, complessivamente 206 campioni di sangue e 40 campioni di feci provenienti da gatti appartenenti a colonie feline della provincia di Firenze.

Su questi campioni è stata effettuata la ricerca degli anticorpi specifici attraverso Immunofluorescenza indiretta (IFAT) e del DNA parassitario su sangue e feci con la metodica della PCR (polymerase chain reaction).

Cinquantasette sieri su 180 sono risultati positivi con titoli variabili da 1:40 – 1:640, con una siero prevalenza globale pari al 31,67 %.

Due campioni di feci su 40 sono risultati positivi alla nPCR con una prevalenza, riferita al gruppo esaminato, del 6,25 %

Tre campioni di sangue su 69, esaminati con nPCR, sono risultati positivi con una prevalenza del 4,92 %

E' interessante porre anche come dato di valutazione analitica anche i risultati combinati fra le varie metodiche che nello schema *ifat tox/pcr sangue/pcr feci* hanno dati i seguenti risultati: pos/neg/neg = 11 ; neg/neg/pos = 1 ; pos/pos/pos = 1; pos/pos/neg = 2 .

Sono state inoltre effettuate le medesime prove su un gruppo di gatti domestici, di provenienza geografica regionale ed extra regionale, dalle quali sono emerse solo positività al Test IFA nel numero di 8 campioni sul totale di 26 esaminati, con una prevalenza del 30,77%

INTRODUZIONE

Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii fu scoperto nel 1908 da Nicolle e Manceaux nello *Ctenodactylus gundi*, un roditore simile al criceto, che veniva utilizzato per ricerche sulla leishmaniosi. Il nome *T. gondii* deriva dalla morfologia e dall'ospite (Dubey 2008). Le forme parassitarie sono: il tachizoite, il bradizoite, l'oociste, gli schizonti e i gameti (Bowmann et al. 2002).

Il tachizoite è la forma che Nicolle e Manceaux ritrovarono nel roditore, viene anche chiamato trofozoite o forma proliferativa. Il bradizoite è la forma presente nei tessuti ed è infettante per i carnivori e gli onnivori (Dubey 2008).

T. gondii fa parte del phylum Apicomplexa, classe Sporozoa ed è uno dei più diffusi parassiti del mondo ad infettare vertebrati omeotermi. Il completamento della fase sessuale avviene solo nel tratto gastrointestinale del gatto e le oociste passano attraverso le feci nell'ambiente. Questo parassita essere trasmesso attraverso varie vie: *via fecale - orale, carnivorismo, via transplacentare, con l'allattamento, per trasfusione di fluidi o trapianto di organi* (Dubey et al. 2009).

La maggior parte dei gatti si infetta mangiando ospiti intermedi che hanno cisti tissutali. Le cisti, che possono raggiungere i 100 µm, contengono i bradizoiti, che vengono rilasciati nello stomaco e nell'intestino allorché la ciste tissutale viene a contatto con gli enzimi digestivi del gatto e la sua parete si dissolve.

I bradizoiti penetrano nelle cellule epiteliali del piccolo intestino e iniziano la formazione degli schizonti (Dubey et al. 2009) di 4-17 µm (Bowmann et al. 2002). Dopo un numero indefinito di generazioni i merozoiti rilasciati dagli schizonti formano i gameti maschili e femminili che si uniscono e formano un'oociste che passa non sporulata nelle feci del gatto (Dubey et al. 2009).

Le oociste, dopo 1-5 giorni di esposizione ad un'adeguata tensione di ossigeno, temperatura ambientale e umidità sporulano con modello *Isospora*, cioè ogni oociste contiene 2 sporocisti con all'interno 4 sporozoiti (Bowmann et al. 2002).

Se un ospite intermedio ingerisce un'oociste sporulata, gli sporozoiti fuoriescono nel lume del piccolo intestino e penetrano nelle cellule intestinali dell'ospite. Gli sporozoiti si dividono in due per endoduogenia, diventando così tachizoiti (Dubey et al. 2009; Bowmann et al. 2002), si moltiplicano nelle cellule e quando la cellula si rompe ne infettano di nuove, si moltiplicano dentro le cellule per un periodo indeterminato e poi si incistano (Dubey et al. 2009).

T. gondii può penetrare nella maggior parte delle cellule di vertebrati e può moltiplicarsi asessualmente all'interno delle cellule infette fino a quando la cellula viene distrutta. Se si verifica una risposta immunitaria adeguata, la moltiplicazione dei tachizoiti si attenua, lentamente si dividono in bradizoiti che si sviluppano all'interno di cisti, che persistono in tessuti extra-intestinali (Lappin 2010). La ciste è intratissutale e contiene i bradizoiti, che a differenza dei tachizoiti sopravvivono ai processi digestivi dell'ospite (Dubey et al. 2009). Le cisti tissutali si formano facilmente nel sistema nervoso centrale (SNC), nei muscoli e negli organi viscerali.

I bradizoiti vitali possono persistere nei tessuti per tutta la vita dell'ospite (Lappin 2010); durante la gravidanza la parassitemia può causare placentiti e trasmissione dei tachizoiti al feto (Dubey et al. 2009).

Il ciclo extraintestinale si ha negli ospiti intermedi, cioè nei vertebrati omeotermi (gatto compreso). Nel gatto si compie il ciclo completo enteroepiteliale dopo 3-10 giorni dall'ingestione delle cisti tissutali, mentre se ingerisce oociste sporulate dobbiamo aggiungere ai giorni del ciclo precedente 18 giorni. Solo nel 20% dei casi il gatto eliminerà oociste di *T. gondii* (Dubey et al. 2009).

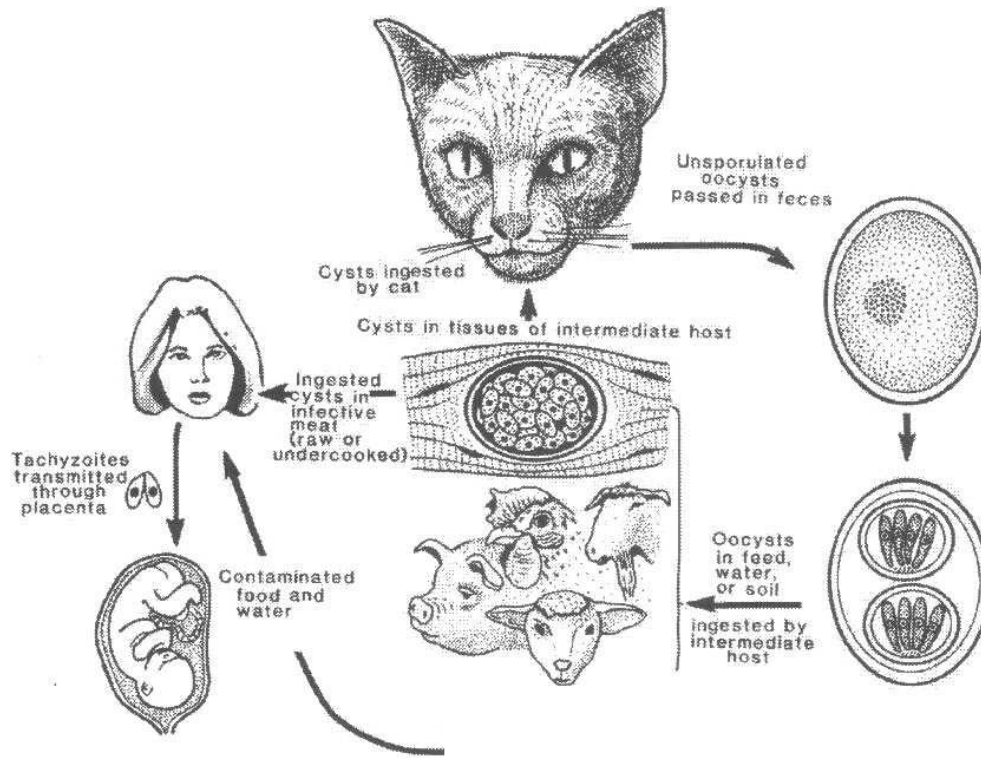


Fig. 1 Ciclo di *T. gondii* tratto da Dubey et al . 2004

Le oocisti sporulate possono sopravvivere nell'ambiente per mesi o anni e sono resistenti alla maggior parte dei disinfettanti. I risultati di recenti studi (Dubey 2006, Lappin 2010) confermano che il periodo prepatente di disseminazione delle oocisti è "fase" dipendente (l'ingestione dei bradizoiti ha un periodo prepatente più breve rispetto all'ingestione di sporozoiti) e non è dose dipendente. Inoltre la trasmissione di *T. gondii* è più efficiente quando i gatti consumano cisti tissutali (carnivorismo) e quando gli ospiti intermedi consumano oocisti sporulate. L'infezione da *T. gondii* nei roditori modifica il comportamento delle specie preda, rendendole meno avverse ai gatti, aumentando potenzialmente la probabilità che l'ospite definitivo (felide) diventi infetto e possa così avvenire la fase sessuata dell'organismo.

La possibilità che la toxoplasmosi si manifesti clinicamente dipende sia dall'ospite che dagli effetti dei parassiti. All'interno della specie *T. gondii* sono individuabili tre diversi genotipi, individuati dagli anni '90, diversi fra loro per virulenza e patogenicità, secondo modelli di infezione basati sui topi (Sibley e Boothroyd 1992, Howe e Sibley 1995) Gli isolati di *T. gondii* sono stati classificati secondo tre tipi genetici (I, II e III) in base al polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) (Howe e Sibley 1995). Mentre il tipo clonale I causava sempre un'infezione letale nei topi outbred, è stato

dimostrato che i tipi clonali II e III sono significativamente meno virulenti (Sibley e Boothroyd 1992). Alcuni ceppi di *T. gondii* sembrano essere più patogeni di altri, e alcuni ceppi hanno più affinità per i tessuti di altri. Per esempio, alcuni sono più probabilmente associabili a malattia oculare nei gatti (Powell e Lappin 2001, Lappin 2010). Se c'è una scarsa risposta immunitaria dopo l'infezione primaria, si avrà una travolgente moltiplicazione del tachizoiti con conseguente necrosi dei tessuti e ciò è la causa principale della malattia.

Questo meccanismo probabilmente si instaura anche in gatti con toxoplasmosi cronica che successivamente diventano immunosoppressi. Un esempio è l'attivazione dell'infezione da *T. gondii* nel gatto dopo la somministrazione di farmaci immunosoppressori come la ciclosporina. Altre malattie immunosoppressive come l'immunodeficienza felina (FIV) possono provocare l'attivazione di Toxoplasma. I meccanismi della toxoplasmosi cronica clinica non sono stati pienamente determinati (Lappin 2010).

E' probabile che la maggior parte dei gatti che si infettano con *T. gondii* rimangano sieropositivi per tutta la vita anche se eliminano le oocisti solo per un breve periodo di tempo. I tassi di sieroprevalenza variano a seconda dello stile di vita del gatto. In generale, la sieroprevalenza aumenta con l'aumentare dell'età dei gatti poiché aumenta la possibilità di esposizione nel tempo. I gatti domestici che hanno la possibilità di muoversi all'aperto rispetto ai gatti confinati tra le mura domestiche hanno più probabilità di contrarre l'infezione da ospiti intermedi. In un recente studio su gatti clinicamente malati, anticorpi per *T. gondii* sono stati rilevati nel 31,6% dei 12,628 gatti testati. In un altro studio su gatti selvatici in Florida, gli anticorpi per *T. gondii* sono stati rilevati nel 12,1% dei gatti. La sieroprevalenza stimata nel gatto domestico nel mondo per Toxoplasma è del 30-40% (Dubey e Beattie 1988).

In Toscana è stata rilevata una sieroprevalenza del 44% con un test dell'agglutinazione modificato ed una prevalenza del 16% con n-PCR su feci feline (Mancianti et al. 2010). Questi dati dimostrano che l'infezione è comune nei gatti, ma dato che il periodo di eliminazione delle oocisti è generalmente inferiore a 21 giorni, l'individuazione delle oocisti nelle feci di gatto è rara con prevalenza che si aggira sullo 0.2-0.4% (Schaes et al. 2008, Berger-Schoch et al. 2011). L'esame coproscopico, anche se poco

sensibile, se positivo, consente di determinare se un gatto sta attivamente disseminando oocisti in quel momento, ma non dà informazioni se e quando un gatto ha eliminato oocisti in passato. Non vi è alcun test sierologico che ci possa dire con precisione quando un gatto ha eliminato oocisti di *T. gondii* in passato e la maggior parte dei gatti che eliminano attivamente oocisti sono ancora sieronegativi per *T. gondii*, mentre la maggior parte dei gatti sieropositivi ha terminato il periodo di disseminazione delle oocisti ed è improbabile che lo ripeta (Lappin 2010).

La grande maggioranza dei gatti infetti non sviluppa rilevabili alterazioni cliniche. In generale, il ciclo enteroepiteliale 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 primaria orale di cisti tissutali di *T. gondii*, ciò si presume essere dovuto alla replicazione enteroepiteliale dell'organismo. Gli stadi enteroepiteliali sono stati trovati nei tessuti intestinali di 2 gatti con malattia infiammatoria intestinale che hanno avuto risposta positiva alla somministrazione di farmaci anti-Toxoplasma. Recentemente è stata descritta una gastrite fibrosante eosinofila in un gatto infetto.

La toxoplasmosi extraintestinale fatale può svilupparsi dalla schiacciante moltiplicazione intracellulare dei tachizoiti dopo l'infezione primaria; sono comunemente coinvolti in questa forma: tessuti epatici, polmonari, sistema nervoso centrale e pancreas. I gattini infetti tramite la via placentare o mammaria sviluppano i segni più gravi di toxoplasmosi extraintestinale e generalmente muoiono di malattie polmonari o epatiche. Comuni riscontri clinici nei gatti con la toxoplasmosi diffusa includono: depressione, anoressia e febbre seguita da ipotermia, versamento peritoneale, ittero e dispnea. Toxoplasmosi disseminata è stata documentata nei gatti infetti contemporaneamente anche con la leucemia felina, immunodeficienza felina o peritonite felina, così come dopo la somministrazione di ciclosporina per una malattia della pelle o dopo il trapianto renale (Lappin 2010).

La Toxoplasmosi cronica si verifica solo in alcuni gatti ma dovrebbe essere inclusa nella diagnosi differenziale per i gatti affetti da uveite anteriore o posteriore, lesioni cutanee, febbre, iperestesia muscolare, miocardite con aritmie, perdita di peso, anoressia, convulsioni, atassia, ittero, diarrea,

dispnea e pancreatite. La toxoplasmosi sembra essere una causa infettiva frequente di uveite nei gatti, l'uveite anteriore o posteriore la cui manifestazione può essere unilaterale o bilaterale. I gattini infettati per via transplacentare o transmammaria comunemente sviluppano problemi oculari.

I gatti con toxoplasmosi clinica hanno una varietà di alterazioni clinico patologiche, ma niente documenta la malattia. Questa parassitosi dovrebbe essere inclusa nella diagnosi differenziale in caso di anemia non rigenerativa, leucocitosi neutrofilica, linfocitosi, monocitosi, neutropenia, eosinofilia, proteinuria, bilirubinuria, aumento delle proteine seriche e della concentrazione della bilirubina. della creatinin-chinasi, alanina aminotrasferasi, fosfatasi alcalina e l'attività della lipasi.

La toxoplasmosi polmonare è una delle più comuni cause di pattern interstiziale o alveolare a livello polmonare; effusioni pleurali sono scarsamente documentate. Alla Risonanza Magnetica e alla TAC sono visibili a volte delle masse (mass lesions).

La concentrazione delle proteine e la conta delle cellule nel fluido cerebrospinale sono spesso più alte del norma e, spesso si riscontra neutrofilia nei gatti con patologie acute del SNC (Lappin 2010).

La diagnosi definitiva ante-mortem della toxoplasmosi felina può essere fatta se viene dimostrata la presenza dell'organismo, ma questo è raro, soprattutto in associazione con la malattia subletale. I bradizoiti e i tachizoiti sono rilevati nei tessuti, nei versamenti, nei liquidi di lavaggio broncoalveolare, nell'umore acqueo e nel liquido cerebrospinale. Le oocisti di *T. gondii*. grandi 10 x 12 micron, quando si trovano nelle feci di gatti con diarrea, suggeriscono la toxoplasmosi; tuttavia le infezioni da *Besnoitia* e *Hammondia* nel gatto producono oocisti morfologicamente simili (Lappin 2010).

Ci sono molte tecniche disponibili in commercio per la diagnosi di infezione da *T. gondii*: l'ELISA, l'immunofluorescenza, l'immuno-western blot e una grande varietà di test di agglutinazione (Lappin 2010).

La dimostrazione di un aumentato titolo IgG può documentare un'infezione recente o attiva, ma considerato il lasso di tempo che intercorre tra l'infezione e l'aumento del titolo anticorpale e considerato

lo scarso aumento in caso di soppressione immunitaria, i titoli anticorpali non possono essere utilizzati da soli per la diagnosi di toxoplasmosi (Lappin 2010).

Per effettuare una diagnosi di toxoplasmosi presuntiva ante-mortem si può utilizzare la seguente combinazione:

- dimostrazione di anticorpi nel siero, che suggeriscono l'infezione da *T.gondii*,
- dimostrazione di un titolo IgM maggiore di 1:64 o un aumento di 4 volte o più del titolo IgG , che suggerisce infezione recente o attiva,
- segni clinici di malattia riconducibile a toxoplasmosi,
- esclusione di altre cause più comuni per la sindrome clinica,
- risposta positiva ad un trattamento appropriato.

Recentemente la PCR è stata utilizzata per trovare il DNA di *T. gondii* nelle feci e per differenziarlo da quello di altri organismi. La PCR viene utilizzata più di frequente per essere certi che l'organismo osservato nel tessuto, nell'umor acqueo o nel CSF sia veramente Toxoplasma.

L'individuazione degli anticorpi specifici anti Toxoplasma o l'individuazione del DNA del parassita nell'umor acqueo e nel CSF sono i metodi migliori per diagnosticare una toxoplasmosi oculare o del SNC. Anche se le specifiche IgA, IgG per toxoplasma e il DNA del parassita possono essere rilevati nell'umore acqueo e CSF di gatti normali o clinicamente malati, IgM specifiche per *T. gondii* sono state rilevate solo nell'umore acqueo o nel liquido cerebrospinale dei gatti clinicamente malati e quindi possono essere il migliore indicatore della malattia clinica (Lappin 2010).

Il trattamento della toxoplasmosi clinica felina viene spesso effettuato con la clindamicina cloridrato e con trimetoprim-sulfonamide, la clindamicina è stata utilizzata per il trattamento di molti segni clinici come febbre, Miositi, uveiti e problemi al SNC (Dubey et al. 2009). La clindamicina viene utilizzata a 12,5-25 mg/kg PO o IM ogni 12 ore per 1-2 giorni mentre il trimetoprim a 15 mg/kg PO ogni 12 ore

per 4 settimane. La clindamicina ha degli effetti collaterali come irritazione intestinale e diarrea (Dubey et al. 2009).

Azitromicina (10,0 mg / kg, PO, ogni 24 ore) è stato usato con successo in un numero limitato di gatti, ma la durata ottimale della terapia è sconosciuta. La pirimetamina in combinazione con sulfamidici è efficace per il trattamento della toxoplasmosi umana, ma dà problemi di tossicità nei gatti. Il ponazuril è stata utilizzato sperimentalmente in roditori infetti e verrà studiato per il trattamento della toxoplasmosi felina. Attualmente, un regime di trattamento ottimale per l'uso di questo farmaco è sconosciuta (Lappin 2010).

I gatti con segni clinici sistemici di toxoplasmosi, come febbre o dolore muscolare con uveite, devono essere trattati con farmaci anti *Toxoplasma* in combinazione con corticosteroidi per via orale, topica o parenterale per evitare lussazioni secondarie delle lenti e glaucoma. I gatti sieropositivi affetti da uveite che non hanno ulteriore sintomatologia possono essere trattati con i glicocorticoidi topici da soli a meno che l'uveite sia ricorrente o persistente. In queste situazioni, la somministrazione di un farmaco con attività anti-*T. gondii* può essere utile (Dubey et al. 2009).

Non ci sono prove che suggeriscono che un farmaco possa eliminare completamente il parassita dall'ospite, quindi le recidive sono frequenti e i gatti infetti saranno sempre sieropositivi. La prognosi è infausta per i gatti affetti da problemi epatici, al CNS o con malattie polmonari causate dalla replica dei tachizoiti, soprattutto nei gatti che sono immuno-compromessi da farmaci antinfiammatori o con concomitanti infezioni da retrovirus. Lussazioni della lente o il glaucoma possono portare all'enucleazione. I gatti con segni clinici al sistema nervoso centrale possono non normalizzarsi completamente dopo la terapia (Dubey et al. 2009).

Per evitare l'esposizione a *T. gondii*, ai gatti non dovrebbe essere permesso di cacciare e non dovrebbero essere alimentati con carni poco cotte o crude, inoltre si dovrebbe prestare attenzione al controllo degli ospiti di trasporto come scarafaggi (Dubey et al 2009) .

Non permettere ai gatti di cacciare può rivelarsi abbastanza complicato, però si può ridurre il comportamento predatorio attuando alcune strategie: mettendo un campanellino al collare del gatto, non permettere al gatto di uscire di casa durante le ore notturne e includere carne cruda nella dieta, la carne deve essere precedentemente congelata a -12°C per almeno 2 giorni per uccidere le oocisti eventualmente presenti (Opsteegh et al, 2012).

L'uomo si infetta prevalentemente ingerendo oocisti sporulate o cisti tissutali, o per via transplacentare. Per prevenire la toxoplasmosi, bisogna evitare di mangiare carne poco cotta o cruda. In un recente studio su 6282 campioni di carne da 698 negozi di vendita al dettaglio, *T. gondii* non è stato rilevato in nessuno dei campioni di carne bovina o di pollo testate e solo in un piccolo numero di campioni di carne di maiale. Sebbene l'esposizione ai gatti sia epidemiologicamente associata all'acquisizione della toxoplasmosi in alcuni studi, accarezzare i gatti non è probabilmente un modo comune per acquisire la toxoplasmosi per i seguenti motivi: i gatti in genere emettono le oocisti (non sporulate) solo per giorni o settimane dopo l'inoculazione primaria. Il ripetersi dell'eliminazione delle oocisti è raro, anche nei gatti trattati con glucocorticoidi, ciclosporina, o in quelli infetti con FIV o con il virus della leucemia felina, i gatti infettati sperimentalmente con cisti tissutali 16 mesi dopo l'inoculazione primaria non hanno disseminato oocisti. I gatti sono molto esigenti e di solito non consentono alle feci di rimanere sulla loro pelle per periodi di tempo abbastanza lunghi da portare a sporulazione delle oocisti, l'organismo non è stato isolato dalla pelliccia di gatti che avevano disseminato milioni di oocisti 7 giorni prima (Lappin 2010).

Tuttavia, poiché in alcuni gatti può ripetersi eliminazione delle oocisti, le feci devono essere sempre maneggiate con cura. Se in un campione di feci di gatto si trovano oocisti che misurano $10 \times 12 \mu\text{m}$, si deve presumere che siano di *T. gondii*. Le feci devono essere raccolte tutti i giorni fino a quando il periodo di eliminazione delle oocisti è finito, la somministrazione di clindamicina (20 mg/kg, tutti i giorni) ha bloccato l'eliminazione delle oocisti nei gatti quando somministrata prima dell'infezione e può abbreviare il periodo di eliminazione delle oocisti se somministrata dopo l'infezione (Lappin 2010). La presenza di un cane può aumentare la probabilità di contagio, specialmente nei bambini, perché i cani si possono contaminare attraverso suolo o lettiera contaminati oppure possono mangiare feci di gatto

contenenti oocisti (Opsteegh et al 2012). L'infezione primaria da *T. gondii* in soggetti immunocompetenti risulta in febbre auto-limitante, malessere e linfadenopatia, questi sintomi possono non essere riconosciuti o mal diagnosticati.

L'infezione primaria da parte delle madri durante la gestazione può portare alla toxoplasmosi clinica nel feto con conseguenti nati morti, malattie del sistema nervoso e malattie oculari.(Lappin 2010), circa il 60% delle donne infettate da *T. gondii* durante la gravidanza lo trasmettono poi al feto (Bowmann et al 2002). Il periodo più rischioso per il feto è tra la decima e la ventiquattresima settimana di gestazione in questo caso c'è un rischio elevatissimo di contrarre una sintomatologia clinica seria.

Durante le prime 10 settimane il feto si infetta con gravi conseguenze; l'infezione in questo periodo è rara. Le conseguenze meno gravi per i neonati si hanno se l'infezione viene contratta tra la 26esima e la 40esima settimana (Bowmann et al 2002).

Se la madre contrae l'infezione prima della gravidanza non vi sono conseguenze per il feto, anche se sono descritti casi di donne già esposte a *T. gondii* che durante la gravidanza hanno comunque trasmesso l'infezione al feto (Elmore et al 2010, ElbezRubestein et al 2009).

Quando la conta delle cellule T-helper diminuisce, circa il 10% delle persone con AIDS sviluppa encefalite toxoplasmica dalla attivazione dei bradizoiti dalle cisti tissutali (Lappin 2010). Lo stress può aggravare i sintomi dell'infezione, mentre l'immunosoppressione o patologie concomitanti possono rendere l'ospite più suscettibile all'infezione (Dubey et al 2009).

I fattori di rischio per l'infezione umana derivano prevalentemente dall'ingestione di carne cruda o poco cotta, specialmente di maiale e agnello, ma la prevalenza dell'infezione da *T. gondii* in gruppi che non mangiano carne o che non mangiano carne cruda o poco cotta suggerisce che si può acquisire l'infezione attraverso l'acqua, vegetali crudi o suolo contaminato (Dabritz e Conrad, 2010).

Per ridurre le probabilità di contagio si possono indossare guanti durante le operazioni di giardinaggio e di pulizia della lettiera, inoltre è bene lavarsi accuratamente le mani dopo queste operazioni (Elmore et al 2010, .Tones et al 2009).

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del presente lavoro è la ricerca di *T. gondii* nei gatti di colonia della Provincia di Firenze, utilizzando la metodica IFAT e nested PCR (nested Polymerase Chain Reaction - nPCR), su campioni di sangue e feci.

La nested-PCR differisce dalla classica PCR per una seconda amplificazione con l'utilizzo di un'altra coppia di primer, interni al frammento sintetizzato nella prima amplificazione.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Sono stati raccolti 206 campioni di sangue di cui 180 riferibili a soggetti di colonie feline della Provincia di Firenze e 26 da gatti di proprietà provenienti da altre aree geografiche della Toscana e dalla zona di Genova. Dei soggetti delle colonie feline della Provincia di Firenze sono stati esaminati anche 40 campioni di feci.

I dati sono riportati in dettaglio in Tabella 1 e Tabella 2

Tabella 1. Elenco dei soggetti esaminati provenienti dalle colonie feline della Provincia di Firenze

ID	Colonia	Comune	feci
218	via della pieve	dicomano	x
219	via della pieve	dicomano	
220	via moravia	sesto f.no	
221	via della pieve	dicomano	
226	via della sala	firenze	
227	via della sala	firenze	
237	via s. morese	sesto f.no	
238	via piave	vicchio	
239	via s. cresci	borgo s. l.	x
244	via dalla chiesa	firenze	
247	via stibbert	firenze	
249		firenze	x
248	via stibbert	firenze	
269	via mariti	firenze	x
270	via mariti	firenze	x
271	via mariti	firenze	
275	via del sodo	firenze	
276	via tòrta	sesto f.no	
837	via bossoni	fiesole	

838	via bossoni	fiesole	
839	via corsica	fiesole	
840	via corsica	fiesole	
841	via delle cascine	firenze	
842	via delle cascine	firenze	
847	via casella	firenze	
848	via medici	San Piero a Sieve	
849	via medici	San Piero a Sieve	
850	via medici	San Piero a Sieve	
851	via medici	San Piero a Sieve	
859	via sala	firenze	
860	via piave	vicchio	
861	via medici	San Piero a Sieve	
862	via medici	San Piero a Sieve	
863	via medici	San Piero a Sieve	
864	via medici	San Piero a Sieve	
1	piazza stazione	calenzano	
2	via settignano	firenze	
3	via settignano	firenze	
4	via medici	San Piero a Sieve	
5	via medici	San Piero a Sieve	
14	via san donato	calenzano	
15	via san donato	calenzano	
16	via il prato	calenzano	
17	macelli	borgo san lorenzo	
18	macelli	borgo san lorenzo	
19	cascine	firenze	
20	cascine	firenze	
21	ponte a greve	firenze	
22	via cavallaccio	firenze	
23	via bini	firenze	
24	via sala	firenze	
25	cercina	sesto fiorentino	
26	cercina	sesto fiorentino	
27	cascine	firenze	
28	cascine	firenze	
33	via baldanzese	calenzano	
34	via cascine	firenze	
35	via cascine	firenze	
36	via soderello	sesto fiorentino	
37	via soderello	sesto fiorentino	
42	via pistoiese	campi bisenzio	
43	via pistoiese	campi bisenzio	
44	via pistoiese	campi bisenzio	
45	via pistoiese	campi bisenzio	
46	via belvedere	sesto fiorentino	
47	via visarno	firenze	
48	via visarno	firenze	
49	via luzzi	sesto fiorentino	
50	via prata	san godenzo	
51	via del confine	firenze	
52	via visarno	firenze	
53	via visarno	firenze	
54	via visarno	firenze	
60	v belvedere	sesto fiorentino	
61	via del confine	firenze	
62	cercina	sesto fiorentino	
63	cercina	sesto fiorentino	
64	via boito	firenze	
65	via visarno	firenze	
66	stradello di ago	scarperia	
67	stradello di ago	scarperia	x
78	castagno d'andrea	san godenzo	
79	carrefour	calenzano	

80	via delle idee	sesto fiorentino	x
81	via soderello	sesto fiorentino	
82	careggi	firenze	
83	careggi	firenze	
84	careggi	firenze	
85	careggi	firenze	x
86	via prata	san godenzo	x
87	via prata	san godenzo	
88	via prata	San Godenzo	
89	careggi	firenze	x
90	careggi	firenze	x
91	careggi	firenze	
110	via cantone	borgo san lorenzo	
112	via cantone	borgo san lorenzo	
113	via grosseto	firenze	
114	via boito	firenze	x
115	careggi	firenze	x
116	via di valle	fiesole	
117	via sant'angelese	campi bisenzio	
118	via sant'angelese	campi bisenzio	
119	via cercina	sesto fiorentino	
120	via cercina	sesto fiorentino	
121	via cercina	sesto fiorentino	
122	via cercina	sesto fiorentino	
123	viale kennedy	scarperia	
870	via liguria	firenze	
871	via medici	San Piero a Sieve	
872	via medici	San Piero a Sieve	
873	via medici	San Piero a Sieve	
874	via medici	San Piero a Sieve	
875	via repubblica	scarperia	
876	via repubblica	scarperia	
877	via adami	San Piero a Sieve	
880	via casanuova	firenzuola	x
881	via san pellegrino	firenzuola	
882	via san pellegrino	firenzuola	
124	viale kennedy	scarperia	
125	via grosseto	firenze	x
126	via grosseto	firenze	
127	via grosseto	firenze	
128	via Scopeti	vicchio	x
129	via Scopeti	vicchio	
136	via fanfani	firenze	
137	via fanfani	firenze	
138	via san marcellino	firenze	
139	via san marcellino	firenze	
140	via san marcellino	firenze	
141	via san marcellino	firenze	
142	via san francesco	fiesole	
143	via bosconi	fiesole	
144	via bosconi	fiesole	
149	cascine	firenze	
150	cascine	firenze	x
151	cascine	firenze	
152	via grosseto	firenze	
157	careggi	firenze	
158	careggi	firenze	x
159	careggi	firenze	x
160	via cavallaccio	firenze	
161	via barbacane	firenze	x
162	careggi	firenze	
163	via larga	calenzano	
171	viale michelangelo	firenze	
172	viale michelangelo	firenze	

173	via grosseto	firenze	
174	via grosseto	firenze	
175	via stibbert	firenze	
176	via stibbert	firenze	
177	via stibbert	firenze	
178	via macelli	borgo san lorenzo	
195		calenzano	
196		calenzano	
197	via forlivese	san piero a sieve	
198	via pastorella	firenze	
199	via stibbert	firenze	
200	via stibbert	firenze	
211	via stibbert	firenze	x
212	via stibbert	firenze	
215	via del prete	firenze	
216	via cavallaccio	firenze	
217	san salvi	firenze	
218	san salvi	firenze	
219	cascine	firenze	
220	cascine	firenze	x
221	cascine	firenze	
231	via grosseto	firenze	
232	loc. vitartali	scarperia	
234	via liguria	firenze	x
235	via liguria	firenze	x
257	via CASCINE	firenze	x
265	via chiantigiana	firenze	x
268	viale pieraccini	firenze	x
276	careggi	firenze	x
277	careggi	firenze	x
283	careggi	firenze	x
292	via san marcellino	firenze	x
328	via montegirone	fiesole	x

Riassumendo secondo la distribuzione geografica:

Tabella 1.a

	n. gatti
Dicomano	3
San Godenzo	5
Borgo San Lorenzo	6
Campi Bisenzio	6
Sesto Fiorentino	18
Firenze	3
Vicchio	4
Calenzano	9
San Piero a Sieve	16
Scarperia	7
Firenze	94
Fiesole	9
totale gatti	180

Si sono esaminati anche gatti di proprietà provenienti da altre aree che, ai fini del presente lavoro, vengono trattati come ulteriore termine di confronto

Tabella 2

ID	Comune
f 11a	empoli
f 12a	empoli
f 1a	san gimignano
f 6m	san gimignano
f 6m	san gimignano
f 7m	san gimignano
f 8m	san gimignano
m 14a	san gimignano
m 1a	san gimignano
m 2a	san gimignano
m 6m	san gimignano
fiesoli	firenze
giuliani	pisa
pranzetti	vicarello
reszczynska	pisa
stabile	peccioli
tavolari	lucca
veronica bizet	lucca
boccone fbn 124	genova
boccone fg 301	genova
boccone fg boxa	genova
boccone fn 118	genova
ciocchetti f bg 101	genova
coninia f 125	genova
f 6m	san gimignano
f 11a	genova

Le matrici biologiche esaminate sono state:

- 206 campioni di sangue di cui 180 di colonie feline e 26 di proprietà
- 40 campioni di feci di soggetti di colonia

Descrizione delle metodiche

Tecnica di immunofluorescenza indiretta, IFA –test

L'IFA-test è la tecnica di immunofluorescenza indiretta per la ricerca di IgG. Il saggio IFAT è stato realizzato secondo la procedura di Badaro et al.(1983) e Duxbury and Sadun (1964) con alcune modifiche. Per effettuare l'IFAT è stato impiegato l'antigene toxo-spot su vetrini da microscopio multispot (Bio-Merieux, Marcy L'Etoile, Francia). Il siero dei gatti è stato progressivamente diluito per raddoppio (da 1:20 fino alla titolazione) in tampone fosfato (PBS) a pH 7.2 e deposto sugli spot sui quali era fissato l'antigene. I vetrini sono stati incubati per 30 minuti a 37 °C. In ciascuna serie di campioni analizzati sono stati inseriti controlli positivi e negativi. L'anticorpo secondario era rappresentato da anti-IgG marcati con fluoresceina isotiocianato, diluiti 1:100 in PBS e 0,002% in blue di Evans. I vetrini sono stati osservati al microscopio a fluorescenza.

Sono considerati positivi i campioni di siero che danno una chiara colorazione giallo-verde fluorescente all'osservazione al microscopio; al contrario, i campioni non reattivi mostrano un colore rosso -marrone. Il test offre il vantaggio di una rapida individuazione degli anticorpi e quindi la possibilità di essere impiegato in studi di massa con impegno limitato di tempo. Il titolo, del siero è dato dalla più alta diluizione di esso che mostra ancora una fluorescenza periferica o globale netta del toxoplasma.

nPCR

PROCEDURA PCR PER IDENTIFICAZIONE DI *TOXOPLASMA GONDII*

- Estrazione del DNA
- L'estrazione è stata effettuata con Kit commerciali che permettono la purificazione di acidi nucleici usando una colonna silicica a scambio ionico: Nucleo Spin® Blood QuickPure o Nucleo Spin Tissue (MN®) seguendo il protocollo del Kit. Per le feci è stato usato il kit DNA stool® (Qiagen)
- Amplificazione del DNA

Sono stati utilizzati come primer oligonucleotidi specifici (Tox4 e Tox5, Homan et al.,2000) per l'amplificazione del tratto da identificare.

Preparazione dei primer

E' stato aggiunto al preparato liofilizzato un volume di H₂O deionizzata tale da raggiungere il volume per cento pmol/µl. Sono stati aggiunti poi 10 µl di primer diluito a 90 µl di H₂O DNA e RNA free,e successivamente aliquotati.

Preparazione della Master Mix

Per ogni campione sono stati utilizzati:

- 9,5 µl H₂O;

- 12,5 µl Master Mix;
- 1 µl Primer 1;
- 1 µl Primer 2;
- 1 µl DNA

E' stata inclusa in ogni prova un campione per il controllo positivo, costituita da DNA di *Toxoplasma*, e un controllo negativo, costituita da H₂O sterile e master mix.

Termociclature

I programmi utilizzati consistono in una fase di denaturazione iniziale e vari cicli che comprendono: denaturazione, annealing ed estensione.

Analisi dei prodotti ottenuti dall'amplificazione del DNA

Preparazione del gel al 2% di agarosio

Il gel è stato preparato aggiungendo 100ml di tampone di corsa TAE 10X (20ml TAE buffer + 80 ml H₂O deionizzata), in un becker, ad 2 g di agarosio. La soluzione è stata riscaldata, utilizzando forno a microonde, fino a sciogliere l'agarosio in una soluzione omogenea. Quindi sono stati aggiunti 15 µl di colorante gel red. Il gel è stato prontamente versato in un lettino elettroforetico con un pettine per la formazione dei pozzetti, evitando formazione di bolle d'aria e lasciato a temperatura ambiente per circa 15 minuti fino a completa gelificazione.

Elettroforesi orizzontale

Il gel, solidificato e raffreddato senza il pettine, è stato posizionato nella vasca per elettroforesi, completamente immerso nel tampone di corsa. Sono stati infine caricati in ogni pozzetto 25 µl di ciascuna mix.

Nel primo e nell'ultimo pozzetto si aggiunge il LADDER per valutare l'altezza dell'eventuale banda di DNA, utile come indicatore del peso molecolare.

E' stato applicato alla cella elettroforetica una differenza di potenziale di 100 V per 1 minuto e di 80 V per altri 30 minuti. Successivamente, il gel è stato esaminato al transilluminatore. La presenza di bande visibili alla luce ultravioletta con un numero di paia di basi (pb) pari a 96 testimonia la presenza di DNA parassitario.

RISULTATI

Cinquantasette sieri su 180 sono risultati positivi con titoli variabili da 1:40 – 1:640, con una siero prevalenza globale pari al 31,67 %.

Due campioni di feci su 40 sono risultati positivi alla nPCR con una prevalenza, riferita al gruppo esaminato, del 6,25 %

Tre campioni di sangue su 69, esaminati con nPCR, sono risultati positivi con una prevalenza del 4,92 %

E' interessante porre anche come dato di valutazione analitica anche i risultati combinati fra le varie metodiche che nello schema *ifat tox/pcr sangue/pcr feci* → pos/neg/neg = 11 ; neg/neg/pos = 1 ; pos/pos/pos = 1; pos/pos/neg = 2 .

Sono state inoltre effettuate le medesime prove su un gruppo di gatti domestici, di provenienza geografica regionale ed extra regionale, dalle quali sono emerse solo positività al Test IFA nel numero di 8 campioni sul totale di 26 esaminati, con una prevalenza del 30,77%

Tabella 3 . Risultati esami nei gatti di colonia

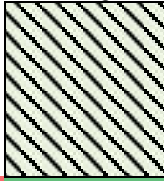
ID	COLONIA	COMUNE	ifat toxo	pcr sangue	pcr feci
218	via della pieve	dicomano	neg	neg	neg
219	via della pieve	dicomano	neg		
220	via moravia	sesto fiorentino	1/160	neg	
221	via della pieve	dicomano	1/160	neg	
226	via della sala	firenze	1/40	neg	
227	via della sala	firenze	1/320	neg	
237	via s. morese	sesto fiorentino	neg		
238	via piave	vicchio	1/80	neg	
239	via s. cresci	borgo san lorenzo	1/640	neg	neg
244	via dalla chiesa	firenze	1/640	neg	
247	via stibbert	firenze	1/160		
249		firenze	1/160	neg	neg
248	via stibbert	firenze	neg		
269	via mariti	firenze	1/80	neg	neg
270	via mariti	firenze	1/80	neg	neg
271	via mariti	firenze	1/160	neg	
275	via del sodo	firenze	neg		
276	via tórta	sesto fiorentino	1/320	neg	
837	via bossoni	fiesole	neg		
838	via bossoni	fiesole	neg		
839	via corsica	fiesole	neg		
840	via corsica	fiesole	neg		
841	via delle cascine	firenze	neg		
842	via delle cascine	firenze	1/80	neg	
847	via casella	firenze	1/160	neg	
848	via medici	San Piero a Sieve	neg		
849	via medici	San Piero a Sieve	neg		
850	via medici	San Piero a Sieve	1/160	neg	
851	via medici	San Piero a Sieve	1/320	neg	
859	via sala	firenze	neg		
860	via piave	vicchio	neg		
861	via medici	San Piero a Sieve	neg		
862	via medici	San Piero a Sieve	neg		
863	via medici	San Piero a Sieve	neg		
864	via medici	San Piero a Sieve	neg		
1	piazza stazione	calenzano	neg		
2	via settignano	firenze	neg		
3	via settignano	firenze	neg		
4	via medici	San Piero a Sieve	neg		
5	via medici	San Piero a Sieve	1/160	neg	
14	via san donato	calenzano	neg		
15	via san donato	calenzano	neg		

ID	COLONIA	COMUNE	ifat toxo	pcr sangue	pcr feci
16	via il prato	calenzano	neg		
17	macelli	borgo san lorenzo	1/160	neg	
18	macelli	borgo san lorenzo	1/80	neg	
19	cascine	firenze	neg		
20	cascine	firenze	neg		
21	ponte a greve	firenze	neg		
22	via cavallaccio	firenze	neg		
23	via bini	firenze	neg		
24	via sala	firenze	neg		
25	cercina	sesto fiorentino	1/40	neg	
26	cercina	sesto fiorentino	neg		
27	cascine	firenze	neg		
28	cascine	firenze	neg		
33	via baldanzese	calenzano	neg		
34	via cascine	firenze	neg		
35	via cascine	firenze	1/80	neg	
36	via soderello	sesto fiorentino	neg		
37	via soderello	sesto fiorentino	neg		
42	via pistoiese	campi bisenzio	neg		
43	via pistoiese	campi bisenzio	neg		
44	via pistoiese	campi bisenzio	neg		
45	via pistoiese	campi bisenzio	neg		
46	via belvedere	sesto fiorentino	1/160	neg	
47	via visarno	firenze	neg		
48	via visarno	firenze	neg		
49	via luzzi	sesto fiorentino	1/40	neg	
50	via prata	san godenzo	neg		
51	via del confine	firenze	neg		
52	via visarno	firenze	neg		
53	via visarno	firenze	neg		
54	via visarno	firenze	neg		
60	v belvedere	sesto fiorentino	neg		
61	via del confine	firenze	neg		
62	cercina	sesto fiorentino	neg		
63	cercina	sesto fiorentino	neg		
64	via boito	firenze	neg		
65	via visarno	firenze	neg		
66	stradello di ago	scarperia	1/40	neg	
67	stradello di ago	scarperia	1/80	neg	neg
78	castagno d'andrea	san godenzo	1/160	neg	
79	carrefour	calenzano	neg		
80	via delle idee	sesto fiorentino	neg	neg	pos
81	via soderello	sesto fiorentino	neg		
82	careggi	firenze	1/80	neg	
83	careggi	firenze	1/320	neg	
84	careggi	firenze	neg		
85	careggi	firenze	1/40	pos	pos
86	via prata	san godenzo	neg		neg
87	via prata	san godenzo	1/160	neg	
88	via prata	San Godenzo	neg		
89	careggi	firenze	1/160	neg	neg
90	careggi	firenze	neg		neg
91	careggi	firenze	neg		
110	via cantone	borgo san lorenzo	neg		
112	via cantone	borgo san lorenzo	1/40	neg	
113	via grosseto	firenze	neg		
114	via boito	firenze	neg		neg
115	careggi	firenze	1/40	neg	neg
116	via di valle	fiesole	1/40	neg	
117	via sant'angelese	campi bisenzio	neg		
118	via sant'angelese	campi bisenzio	neg		
119	via cercina	sesto fiorentino	neg		
120	via cercina	sesto fiorentino	neg		
121	via cercina	sesto fiorentino	neg		
122	via cercina	sesto fiorentino	neg		
123	viale kennedy	scarperia	neg		
870	via liguria	firenze	neg		
871	via medici	San Piero a Sieve	1/80	neg	
872	via medici	San Piero a Sieve	neg		
873	via medici	San Piero a Sieve	1/160	neg	

ID	COLONIA	COMUNE	ifat toxo	pcr sangue	pcr feci
874	via medici	San Piero a Sieve	1/160	neg	
875	via repubblica	scarperia	neg		
876	via repubblica	scarperia	1/160	neg	
877	via adami	San Piero a Sieve	1/320	neg	
880	via casanuova	firenze	1/80	neg	neg
881	via san pellegrino	firenze	1/160	neg	
882	via san pellegrino	firenze	neg		
124	viale kennedy	scarperia	neg		
125	via grosseto	firenze	1/80	neg	neg
126	via grosseto	firenze	1/640	neg	
127	via grosseto	firenze	1/160	neg	
128	via Scopeti	vicchio	neg		neg
129	via Scopeti	vicchio	neg		
136	via fanfani	firenze	neg		
137	via fanfani	firenze	1/40	neg	
138	via san marcellino	firenze	neg		
139	via san marcellino	firenze	neg		
140	via san marcellino	firenze	neg		
141	via san marcellino	firenze	neg		
142	via san francesco	fiesole	neg		
143	via bosconi	fiesole	neg	neg	
144	via bosconi	fiesole	neg		
149	cascine	firenze	neg		
150	cascine	firenze	neg		neg
151	cascine	firenze	neg		
152	via grosseto	firenze	neg		
157	careggi	firenze	neg		
158	careggi	firenze	neg		neg
159	careggi	firenze	neg		neg
160	via cavallaccio	firenze	neg		
161	via barbacane	firenze	neg		neg
162	careggi	firenze	1/640	neg	
163	via larga	calenzano	neg		
171	viale michelangelo	firenze	neg		
172	viale michelangelo	firenze	neg		
173	via grosseto	firenze	1/40	neg	
174	via grosseto	firenze	1/640	neg	
175	via stibbert	firenze	neg		
176	via stibbert	firenze	neg		
177	via stibbert	firenze	neg		
178	via macelli	borgo san lorenzo	neg	neg	
195		calenzano	neg		
196		calenzano	neg		
197	via forlivese	san piero a sieve	1/160	neg	
198	via pastorella	firenze	neg		
199	via stibbert	firenze	neg		
200	via stibbert	firenze	neg		
211	via stibbert	firenze	neg		neg
212	via stibbert	firenze	neg		
215	via del prete	firenze	neg		
216	via cavallaccio	firenze	1/80	neg	
217	san salvi	firenze	neg		
218	san salvi	firenze	neg		
219	cascine	firenze	1/80	neg	
220	cascine	firenze	neg		neg
221	cascine	firenze	neg		
231	via grosseto	firenze	1/640	neg	
232	loc. vitartali	scarperia	1/40	neg	
234	via liguria	firenze	neg		neg
235	via liguria	firenze	1/40	neg	neg
257	via CASCINE	firenze	1/80	neg	neg
265	via chiantigiana	firenze	1/80	pos	neg
268	viale pieraccini	firenze	1/160	pos	neg
276	careggi	firenze	neg		neg
277	careggi	firenze	neg		neg
283	careggi	firenze	neg		neg
292	via san marcellino	firenze	neg		neg
328	via montegirone	fiesole	neg		neg

Riassumendo in forma aggregata per tipologia di analisi effettuata abbiamo le seguenti risultanti:

IFATest

titolo	n.		totale campioni esaminati
	positivi	negativi	
1/40	12		180
1/80	15		
1/160	20		
1/320	4		
1/640	6		
totale	57		
Prevalenza	31,67%		

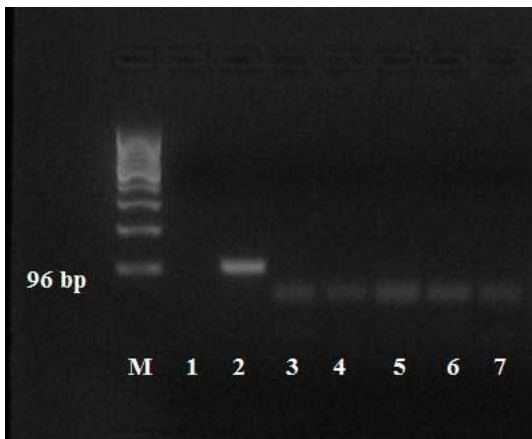
nPCR Feci

		totale campioni esaminati	
		n. positivi	n. negativi
Prevalenza		2	30
		6,25%	

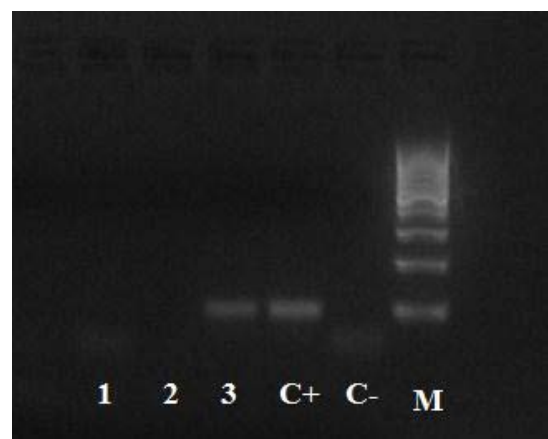
nPCR sangue

		totale campioni esaminati	
		n. positivi	n. negativi
Prevalenza		3	58
		4,92%	

PCR di toxoplasma



PCR per Toxoplasma eseguita su campioni di feci (M= marker; 2= campione positivo; 1, 2-7 = negativi)



PCR per Toxoplasma eseguita su campioni di sangue (M= marker; 3= campione positivo; 1= negativi; C+=controllo pos.; C- = controllo neg.)

Riassunto risultati complessivi per il gruppo dei gatti delle colonie feline della Provincia di Firenze

	ifat toxoplasma	pcr sangue	pcr feci
pos		3	2
neg	123	58	30
1/40	12		
1/80	15		
1/160	20		
1/320	4		
1/640	6		
	180		

Si segnalano i risultati delle tre prove combinate in quei soggetti nei quali il campione a disposizione ha permesso di poterle eseguire.

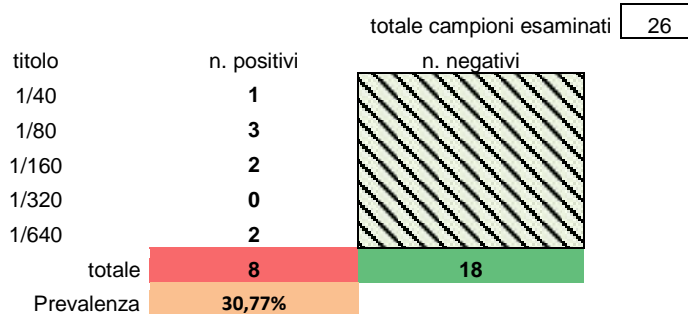
ifat	pcr sangue	pcr feci	n.
pos	neg	neg	11
neg	neg	pos	1
pos	pos	pos	1
pos	pos	neg	2

Risultati della ricerca di toxoplasma nei 26 campioni provenienti da gatti domestici di altre aree della Toscana e da Genova:

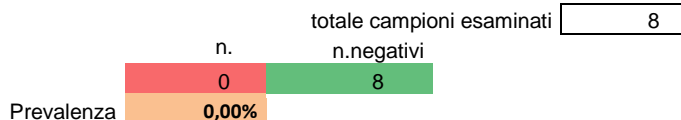
Tabella 4

ID	COMUNE	ifat toxo	pcr sangue	pcr feci
f 11a	empoli	1/80	neg	neg
f 12a	empoli	1/160	neg	neg
f 1a	san gimignano	neg		
f 6m	san gimignano	neg		
f 6m	san gimignano	1/40	neg	neg
f 7m	san gimignano	neg		
f 8m	san gimignano	neg		
m 14a	san gimignano	1/80	neg	neg
m 1a	san gimignano	neg		
m 2a	san gimignano	neg		
m 6m	san gimignano	neg		
fiesoli	firenze	neg		
giuliani	pisa	neg		
pranzetti	vicarello	neg		
reszczyńska	pisa	neg		
stabile	peccioli	neg		
tavolari	lucca	1/80	neg	
veronica bizet	lucca	1/640	neg	
boccone fbn 124	genova	1/160	neg	neg
boccone fg 301	genova	neg		neg
boccone fg boxa	genova	neg		
boccone fn 118	genova	neg		neg
ciocchetti f bg 101	genova	neg		neg
coninia f 125	genova	neg		
f 6m	san gimignano	neg		
f 11a	genova	1/640	neg	

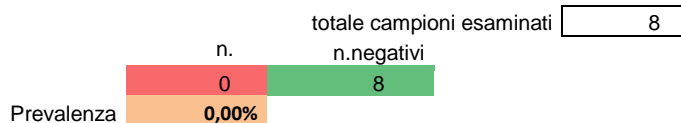
IFATest



nPCR Feci



nPCR



DISCUSSIONE

Risultati complessivi e prevalenze

In questa indagine si sono avuti risultati complessivi, riferiti al territorio della Provincia di Firenze, che individuano 50 soggetti positivi al test IFA su 180 campioni esaminati, con una prevalenza del 31,67% ; 2 campioni di feci su 32 esaminati con n-PCR sono risultati positivi con una prevalenza del 6,25%; 3 campioni di sangue su 62 esaminati con n-PCR sono risultati positivi con una prevalenza del 4,92%

Confronto delle prevalenze fra le varie aree individuate

I campioni raccolti provengono da vari Comuni della Provincia di Firenze e in particolare da tre zone ben individuabili.

Si è individuata un'area urbana determinata dal solo Comune di Firenze; un'area relativa ai Comuni contermini a Firenze cosiddetti "di cintura" che sono Calenzano, Campi Bisenzio, Fiesole e Sesto Fiorentino e un'area relativa alla zona del Mugello che comprende i Comuni di Borgo San Lorenzo, Dicomano, Firenzuola, San Godenzo, San Piero a Sieve, Scarperia e Vicchio.

Sono stati esaminati anche altri campioni da gatti domestici provenienti da altre aree toscane e dal Comune di Genova e che vengono usati in questo lavoro come termine di confronto.

Data l'esiguità dei campioni esaminati con nPCR per le singole aree, viene riportato il solo dato numerico.

CONFRONTO PREVALENZE POSITIVITA'

	ifat	pcr sangue	pcr feci
FIRENZE	31,91%	3	1
CINTURA	14,29%		1
MUGELLO	48,84%		
PROVINCIA	31,67%	4,92%	6,25%
ALTRE	30,77%		



L'unico dato veramente confrontabile è quello relativo alle prove IFAT perché è riferito a un numero di campioni esaminati più rappresentativo delle aree di provenienza.

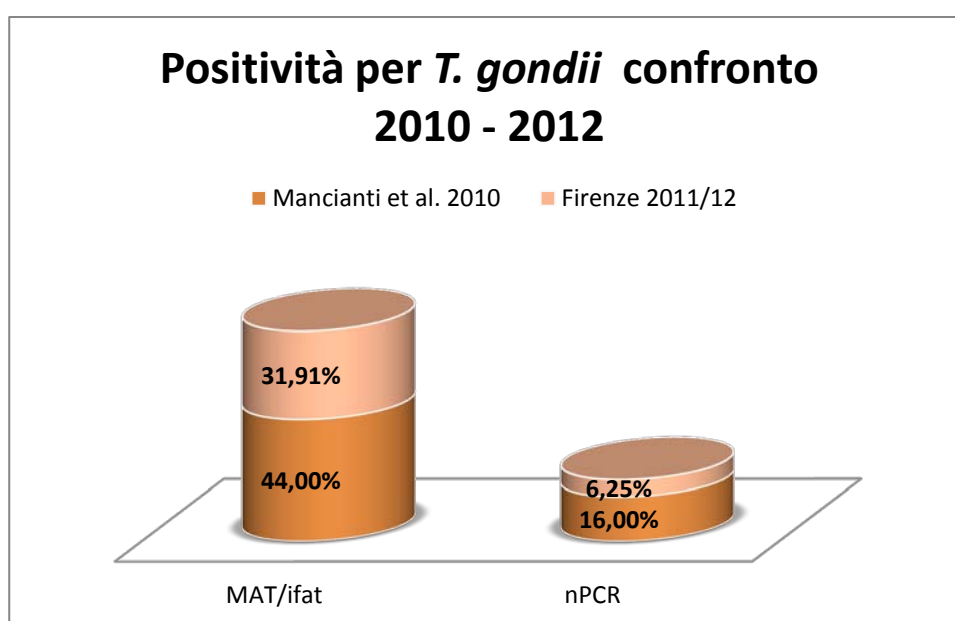
Da questo confronto si rileva una sostanziale uniformità di risultati fra il Comune di Firenze, le altre aree e il complessivo della Provincia.

Risultano essere sensibilmente maggiori i dati relativi al Mugello e sensibilmente minori i dati relativi ai Comuni di "cintura".

Un altro confronto che va fatto è con i dati rilevati da Mancianti et al. 2010 che hanno ricercato positività per *T. gondii* in sangue, tramite il test di agglutinazione modificato (MAT) e tramite n-PCR in feci, di una popolazione di 50 gatti delle colonie feline di Firenze.

Confrontando i dati emerge che il dato attuale, sia della ricerca di positività IFAT che della nPCR sulle feci, sono sensibilmente inferiori (10 % ca. per nPCR e 12% ca. per MAT/IFAT) a quanto rilevato da Mancianti et al. 2010 e sostanzialmente del medesimo ordine di prevalenza (10-12 %).

	MAT/ifat	nPCR
Mancianti et al. 2010	44,00%	16,00%
Firenze 2011/12	31,91%	6,25%



il confronto dei dati di positività alla ricerca degli anticorpi specifici viene effettuato anche se le due metodiche analitiche MAT e IFAT sono differenti.

La ricerca di *T. gondii* nelle feci invece è stata effettuata con la medesima metodica e, ai fini del confronto presente, vengono riportati i dati di positività complessiva della Provincia di Firenze con quelli del lavoro di Mancianti et al. 2010 che sono relativi al solo Comune di Firenze.

Tale scelta si è fatta a causa del basso numero di positività alla nPCR feci della nostra ricerca e anche per il fatto che l'unico risultato positivo al di fuori del Comune di Firenze è relativo ad un gatto proveniente dal Comune di Sesto Fiorentino che è, di fatto, strettamente contiguo all'area urbana del capoluogo.

Al di là della semplice valutazione e confronto dei numeri è degno di nota un dato rilevabile nel confronto combinato delle varie prove effettuate in parallelo.

Su alcuni campioni è stato possibile effettuare sia IFAT che nPCR su sangue e feci dai quali si rileva un dato importante che riferisce un potenziale miglioramento di affidabilità e di certezza diagnostica di *T. gondii* se si associa al test sierologico anche un esame di nPCR sulle feci.

Nel nostro campione infatti un 1 soggetto su 15, pur essendo negativo a IFAT e nPCR sangue, è risultato positivo alla nPCR sulle feci acquisendo una prevalenza, sul totale delle prove prese in esame, del 6,67% .

Da questo dato si rileva quindi che in una popolazione di gatti testati per *Toxoplasma gondii* l'esecuzione in parallelo anche del test della nPCR sulle feci ci permette di individuare un 6,67 % di positivi che sfuggirebbero al semplice test sierologico

ifat	pcr sangue	pcr feci	n.	%
pos	neg	neg	11	73,33%
neg	neg	pos	1	6,67%
pos	pos	pos	1	6,67%
pos	pos	neg	2	13,33%
totale soggetti			15	

Dalle risultanti e dalle riflessioni sulla presente ricerca emerge una sostanziale uniformità di dati relativi alla positività sierologica di *T. gondii* all'interno delle popolazioni analizzate che si attesta intorno al 30,00 – 32,00 %.

Importante risulta il rilievo analitico positivo di nPCR sulle feci in presenza di negatività delle prove effettuate sul sangue che , oltre a rappresentare l'indicazione per una migliore accuratezza diagnostica, ci spinge a continuare la ricerca per affinare statisticamente il dato specifico e quelli complessivi dell'indagine.

Una interessante linea di sviluppo di questa ricerca, inoltre, potrà essere l'allargamento sistematico del monitoraggio ai gatti domestici residenti nelle medesime aree delle colonie esaminate.

Altro importante sviluppo potrebbe essere l'inclusione nel monitoraggio di quelle specie animali (*es. Columba livia ed altri*) che possono essere vettori del *Toxoplasma* e che, data la condivisione stretta degli habitat fra le specie interessate, possono influenzare la presenza della malattia nei gatti domestici e nell'uomo.

BIBLIOGRAFIA

- Berger-Schoch A.E., Herrmann D.C., Schares G., Muller N., Bernet D., Ottstein B., Frey C.F. (2011) Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in feline faeces (oocysts) and meat from sheep, cattle and pigs in Switzerland. *Vet. Parasitol.* 177: 290-297.
- Bowman D.D, Hendrix C.M., Lindsay D.S., Barr S.C. (2002) *Feline clinical parasitology*. Iowa State University Press, Wiley-Blackwell.
- Brown R.R., Elstone T.H., Evans L., Glaser C., Gulleddgen M.L., Jarboe L., Lappin M.L., Marcus L.C., Breitschwerdt E.B, Greene C.F., Morley T.S., Rosychuk R., Schantz P., Wolf A.M. (2003) Report of feline zoonoses. *American Ass. of Feline Practitioners* 25: 936-965.
- Dabritz H.A, Conrad P.A. (2010) Cats and *Toxoplasma*: implications for public health Zoonoses Public Hlth. 57: 34-52.
- Dubey J.P. (2004) *Toxoplasmosis-a waterborn zoonosis* *Vet. Parasitol.* 126: 54-72.
- 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., Beattie C.P. (1988) *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 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.
- Elbez-Rubinstein A., Alzenberg D., Dardé M.L., Cohen R., Dumètre A., Yera H., Gondon E., Janaud J.C., Thulliez P. (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 JP. (2010) *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol.* 26:190-196.
- 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. Infect. Dis.* 49: 878-884.
- Jones C.D., Okhrovi N., Adamson P., Tasker S., Lightman S. (2000) Comparison of PCR detection methods for B1, P30 and 18S rDNA genes of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41: 634-644.
- Lappin M.R. (2010) Update on the diagnosis and management of *Toxoplasma gondii* Infection in cats. *Top Companion. Anim. Med.* 25: 136-141.
- Mancianti F, Nardoni S., Ariti G., Parlanti D., Giuliani G., Papini R.A. (2010) Cross-sectional survey of *Toxoplasma gondii* infection in colony cats from urban Florence (Italy). *J. Feline Med. Surg.* 12: 351-354.

Montoya A., Mirò C., Bianco M.A., Fuentes I. (2010) Comparison of nested PCR and real time PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in biological samples from naturally infected cats. *Vet. Science* 89: 212-213.

Opsteegh M., Haveman R., Swart A.N., Mensink-Beerepoot M.E., Hofhuis A., Langelaar M.F., van der Glessen J.W. (2012) Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats in The Netherlands. *Prev. Vet. Med.* 104: 317-326.

Powell C.C., Lappin M.R. (2001) Clinical ocular toxoplasmosis in neonatal kittens. *Vet Ophthalmol* 4: 87-92

Schares G., Vrhovec M.G., Pantchev N., Herrmann D.C., Conraths F.J. (2008) Occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* oocysts in the faeces of cats from Germany and other European countries. *Vet. Parasitol.* 152: 34-45.

Sibley L.D., Bootbroyd J.C. (1992) Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage *Nature* 359: 82-85.