



UNIVERSITÀ DI PISA
Scuola di Specializzazione in
SANITÀ ANIMALE, ALLEVAMENTO E PRODUZIONI ZOOTECNICHE

***Toxoplasma gondii negli ungulati selvatici
viventi in Toscana:
indagini sierologica e molecolare***

Candidato: Dott. Brombin Martina

Relatori: Prof. Mancianti Francesca
Dott. Nardoni Simona

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

INDICE

Abstract	p. 3
<u>PARTE GENERALE</u>	
Generalità ed eziologia	p. 4
Morfologia	p. 4
Ciclo biologico	p. 7
Modalità di trasmissione	p. 11
ANIMALI	
Cervo	p. 13
Capriolo	p. 14
Daino	p. 15
<u>PARTE SPECIALE</u>	
Scopo	p. 16
MATERIALE E METODI	p. 16
Territorio	p. 16
Esami diagnostici	p. 18
RISULTATI	p. 20
DISCUSSIONE	p. 24
BIBLIOGRAFIA	p. 28
RINGRAZIAMENTI	p. 30

ABSTRACT

Nel presente lavoro sono riportati i risultati di un'indagine siero epidemiologica volta a rilevare la presenza di anticorpi anti- *Toxoplasma gondii* in campioni di sangue di 103 ungulati selvatici abbattuti durante tre sessioni di caccia di selezione svoltasi nella provincia di Pistoia nei mesi di febbraio e marzo del 2012. Il campione comprendeva 86 cervi, 8 caprioli e 9 daini di entrambi i sessi e diversa età. La sieroprevalenza è stata valutata tramite test di immunofluorescenza indiretta. Otto animali (7 cervi e un capriolo) sono risultati sieropositivi a basso titolo. La prevalenza riscontrata nei cervi risulta inferiore a quanto riportato in letteratura per i Paesi europei, mentre per il capriolo è difficile fare considerazioni di ordine generale, visto l'esiguo numero dei campioni che è stato possibile ottenere. Si può concludere che gli animali esaminati ricoprono un ruolo secondario nel mantenimento del ciclo di *T. gondii* nell'ambiente. Pertanto rispetto agli studi condotti in altri Paesi dell'Europa il rischio di contrarre la toxoplasmosi da parte di coloro che manipolano i visceri di questi animali sembra essere inferiore.

Generalità ed eziologia

La toxoplasmosi è una malattia parassitaria, sostenuta dal protozoo *Toxoplasma gondii*, parassita intracellulare obbligato diffuso tra i mammiferi, uomo compreso, e gli uccelli. Il termine deriva dal greco *toxòn* che indica la forma ad arco del protozoo e *gondii* dal nome di un roditore nord-africano (*Ctenodactylus gondii*) da cui fu isolato per la prima volta il protozoo (Dubey 2008). Il gatto e in generale tutti i felini ne rappresentano gli ospiti definitivi, mentre i mammiferi in generale e i volatili rappresentano gli ospiti intermedi.

Morfologia

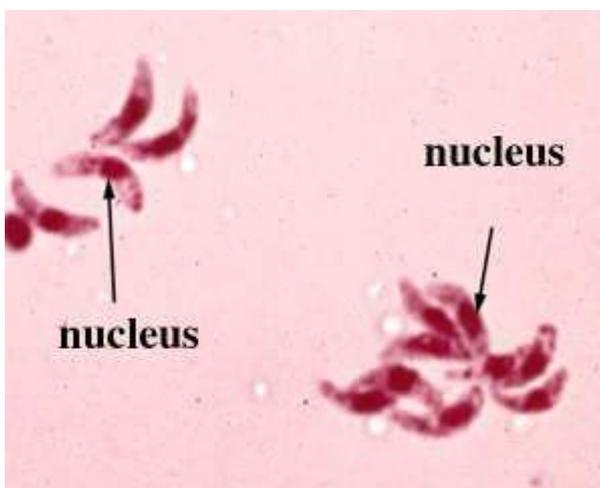
Toxoplasma gondii si presenta in diversi stadi morfologici, a seconda che la sua localizzazione sia extraintestinale o intestinale.

SEDE EXTRAINTESTINALE

Nelle **sedi extraintestinali** possiamo avere:

1. pseudocisti contenenti tachizoiti
2. cisti contenenti bradizoiti

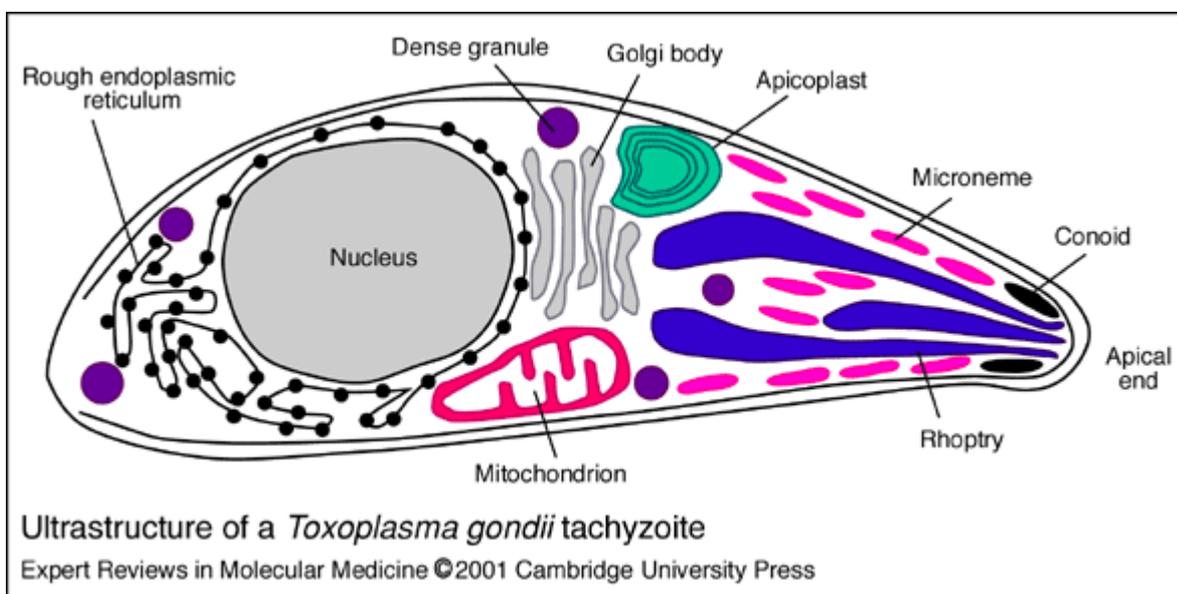
Le **pseudocisti**, contenute nel citoplasma di diverse cellule (fibroblasti e macrofagi, ma anche epatociti e cellule miocardiche) sono delle formazioni rotondeggianti di 10-30 μm e consistono in un vacuolo con all'interno alcune decine di **tachizoiti**, e rappresentano la fase proliferativa del parassita nelle forme acute e subacute di malattia. I tachizoiti sono delle strutture a forma di semiluna con una delle due estremità appuntita e l'altra rotondeggianti di circa 6 μm di lunghezza e 2-3 μm di larghezza. All'interno della loro pellicola tristratificata si riscontra la presenza di un nucleo, l'apparato del Golgi, mitocondri, ribosomi, e altre strutture intracellulari.



Tachizoiti di *T. gondii* (www.umanitoba.ca)

Il tachizoite ha la capacità di penetrare attivamente nella cellula ospite ove si moltiplica asessualmente fino a riempirla completamente. Inoltre, i tachizoiti tramite la rottura della pseudocisti, possono essere rinvenuti liberi in essudati o nel sangue. Quindi, negli ospiti recettivi tende a diffondere per via linfematogena dall'area di infezione primitiva (focolaio enterico) ai diversi tessuti dell'organismo invaso e ivi moltiplicarsi attivamente. All'interno degli organi essi si incistano dando vita alle cisti tissutali extracellulari. In caso di gravidanza possono superare la barriera placentare con gravi conseguenze per il feto (Bhopale, 2003).

La loro resistenza è scarsa, infatti rimangono vivi a temperatura ambiente solo per poche ore e vengono rapidamente uccisi dai più comuni disinfettanti e dall'acidità gastrica (Dubey *et al.*, 1998a). Diverso è il loro comportamento invece se tenuti a temperatura di refrigerazione: a 4 °C resistono per 25 giorni circa.



Tachizoite

Sempre in sede extraintestinale, possiamo trovare delle vere e proprie **cisti**, contenenti fino a 50.000 **bradizoiti** (Tenter *et al.*, 2002).

Le cisti sono delle formazioni rotondeggianti a parete propria delle dimensioni variabili dai 7 ai 100 µm . Queste invece che nei fibroblasti e macrofagi si possono ritrovare nei muscoli e nel tessuto nervoso: i bradizoiti al loro interno rappresentano la forma di resistenza del parassita durante la fase cronica della malattia. Le cisti si formano in pochi giorni e possono sopravvivere per anni, anche per tutta la vita dell'ospite. Queste non vengono aggredite dai meccanismi di difesa dell'immunità sierica e cellulomediata dell'ospite, ed è questo il motivo della loro lunga permanenza all'interno dell'individuo. La parete di queste strutture si rompe in seguito all'attività di digestione liberando i

bradizoiti in essa contenuti che una volta liberati restano vitali per due ore in acido peptico e per sei ore in tripsina, il che vuol dire che resistono alla digestione gastrica (Dubey, 1998b).

SEDE INTESTINALE

Nella sede intestinale, invece possiamo avere gli **schizonti** e i **gameti**.

I primi localizzati principalmente nel digiuno e nell'ileo, contengono fino a 32 **merozoiti** mentre i secondi si trovano solo nell'ileo.

CONTAMINAZIONE AMBIENTALE

Le **oocisti** rappresentano invece la forma di resistenza del parassita nell'ambiente.



Oocisti sporulata di *T.gondii* (www.astrovet.blogspot.com)

Hanno forma rotondeggiante, parete sottile e misurano 12x10 μm di diametro. Originano dalla fusione all'interno dell'enterocita tra macrogamete e microgamete. Appena vengono eliminate con le feci da un gatto parassitato non sono ancora

infettanti. Rimangono vitali a 4°C per mesi e sporulano se riportate in condizioni ideali; a 37°C sopravvivono per 24 ore e vengono uccise a 50°C per 10 minuti (Dubey, 1970). Inoltre perdono la capacità di sporulare se tenute a 4°C per 11 settimane (Lindsay et al, 2002).

Le oocisti non sporulano se messe a contatto con formalina (0,3 %) soluzione di idrossido di ammonio (1%), soluzione di etanolo (20%) più iodio (1%); ma possono sporulare in acido solforico (5%), etanolo (20%), etanolo (10%) più etere (10%), acido cloridrico (1%) e in acqua di rubinetto (Dubey, 1970).

Il calore secco uccide le oocisti che possono essere veicolate dal vento, dalla pioggia e da vettori come scarafaggi, mosche, vermi da un terreno all'altro (Dubey, 1988; Mullen et al., 2002). E' stato dimostrato che anche i cani possono essere veicolo di oocisti ma esse non sporulano a causa delle

CICLO INTESTINALE

Nei felini *T. gondii* si comporta come un classico coccidio. L'infezione viene contratta ingerendo carne contenente cisti (bradizoiti) o pseudocisti (tachizoiti) del parassita (specialmente colpiti sono le carni di ovino, suino, coniglio, bovino) oppure ingerendo oocisti mature emesse con le feci e disperse nell'ambiente. Il potere infettante delle oocisti però è inferiore rispetto alle altre due forme parassitarie: infatti l'ingestione di bradizoiti maturi contenuti nelle cisti rappresenta la via di trasmissione più importante e causa la produzione e un rilascio di un numero di oocisti più elevato rispetto all'infezione che si realizza con gli altri stadi infettanti (Urquhart *et al.*, 1998). Nel gatto pare che l'ingestione di oocisti sporulate o di tachizoiti dia origine ad un'infezione con emissione ulteriore di oocisti nell'ambiente esterno solo nel 16 - 20% dei casi, mentre nel caso dell'ingestione di cisti tissutali contenenti bradizoiti questo si realizza nel 97% dei casi (Dubey, 1996a).

Frequente è anche la trasmissione congenita che può verificarsi quando l'infezione avviene nella femmina durante la gravidanza.

Nella capra è stato inoltre dimostrato il passaggio di tachizoiti nel latte con possibile infezione di capretti. Probabile è quindi che avvenga lo stesso con bovino e ovino.

I parassiti contenuti nelle oocisti sporulate o nelle cisti e nelle pseudocisti, una volta ingeriti, vengono liberati dalle strutture che li contengono grazie all'azione dei succhi gastrici e invadono quindi le cellule dell'epitelio intestinale. All'interno degli enterociti avviene una fase di accrescimento che porta i parassiti a diventare trofozoiti. Quindi si prosegue con la fase schizogonica tramite moltiplicazione asessuata fino ad ottenere lo stadio di schizonte. All'interno dello schizonte si ha la formazione di numerosi merozoiti (da 4 a 32). Lo schizonte si accresce sempre di più fino a far esplodere la cellula intestinale che lo ospita. I merozoiti che si liberano vanno ad invadere altri enterociti dove iniziano nuovi cicli schizogonici asessuati che si ripetono fino a che alcuni merozoiti si differenziano in macrogameti e microgameti secondo un meccanismo non ancora del tutto conosciuto. Il microgamete maturo si stacca dal citoplasma residuo e appare come una struttura allungata con un nucleo anteriore nel quale ci sono anche il mitocondrio e i corpi basali dei 2 flagelli. A causa della similarità con una cellula spermatica sembra appropriato il termine di gamete maschile (Ferguson *et al.*, 1974; Dubey *et al.*, 1998a).

Il macrogamete ha due importanti funzioni: per prima cosa esso deve sintetizzare e stoccare tutti gli elementi nutrizionali per consentire la sporulazione nell'ambiente esterno e sostenere la sopravvivenza degli sporozoiti per lunghi periodi (al massimo un anno). In secondo luogo, deve sintetizzare i componenti specifici necessari per formare la parete dell'ocisti. Perciò, durante lo sviluppo, non c'è divisione cellulare ma, durante la fase di accrescimento del parassita, viene sintetizzata una grande quantità di granuli polisaccaridici che vengono stoccati nel citoplasma.

Inoltre possono essere identificate altre strutture specifiche che saranno in seguito coinvolte nella formazione della parete dell'oocisti (Ferguson *et al.*, 1975; Dubey *et al.*, 1998a).

I macrogameti, che costituiscono la parte femminile, rimangono all'interno della cellula infettata, mentre i microgameti, che costituiscono la parte maschile, distruggono l'enterocita in cui si trovano ed entrano nell'enterocita parassitato dal macrogamete; ed è qui che si forma lo zigote, che nasce dalla fusione di gamete maschile e femminile.

Lo zigote si trova sempre all'interno della cellula intestinale e si circonda di una parete cistica dando vita alle oocisti che vengono rilasciate nel lume intestinale ed eliminate in seguito con le feci.

Il periodo di prepatenza ha durata diversa a seconda della modalità di infezione: si parla di periodo di prepatenza breve quando l'animale ingerisce cisti tissutali, ed ha una durata di 3–10 giorni; si parla di periodo di prepatenza lungo quando l'animale assume oocisti sporulate ed ha una durata da 18 a 49 giorni. Comunque sia le oocisti non vengono eliminate per un periodo superiore ai 15 giorni (Dubey, 1996b). Durante questo breve periodo di patenza la quantità di oocisti che viene emessa con le feci può raggiungere la cifra di 100 milioni. Il gatto difficilmente emette oocisti dopo una seconda infezione e ciò è dovuto alla risposta immunitaria; quando questa viene a mancare, ad esempio in caso di trattamenti immunosoppressori (corticosteroidi ad alto dosaggio o per tempi prolungati), si può avere una ripresa dell'emissione di oocisti (Lindsay, 1997); ciò non sembra accadere invece in caso di immunosoppressione causata da malattie infettive (FIV e FeLV) (Lappin *et al.*, 1992; Lappin *et al.*, 1996; Svobodova *et al.*, 1998).

Una volta nell'ambiente esterno l'oocisti non è subito infettante ma deve avvenire il processo di sporulazione che richiede 1-5 giorni in media. Perché una oocisti sia considerata matura e quindi potenzialmente infettante deve avere al proprio interno 2 sporocisti contenente ciascuna 4 sporozoit.

CICLO EXTRAINTESTINALE

La fase extraintestinale, nella quale il parassita si riproduce solo in maniera asessuata può aver luogo in ogni animale a sangue caldo, mammiferi (incluso lo stesso gatto) o uccelli. Anche questi ospiti intermedi si possono infettare da oocisti mature presenti nelle feci o dal consumo di carne di animali parassitati; dopo essere stato ingerito, il parassita passa la barriera intestinale e, presumibilmente veicolato da macrofagi e da altre cellule della serie bianca, invade per via ematogena cellule di svariati tessuti. Ciò costituisce la fase acuta della malattia con formazione dei tachizoiti. All'interno delle cellule dei tessuti invasi si formano una serie cosiddetta di vacuoli parassitofori nei quali *T. gondii* nella forma di tachizoite si moltiplica in una serie di divisioni binarie (circa 3 o 4) finché la cellula infetta non scoppia. La fase acuta nei soggetti immunocompetenti dura 1-2 settimane, perlopiù senza una sintomatologia rilevante o

importante. Di norma dopo questa prima fase l'ospite acquisisce una certa immunità e questo determina la comparsa di una forma riproduttiva lenta, detta bradizoita perché gli anticorpi prodotti limitano l'invasività dei tachizoiti. La formazione delle cisti e quindi dei bradizoiti rappresenta la cronicizzazione della malattia: tali strutture permangono all'interno dell'ospite anche per tutta la vita. I bradizoiti hanno una bassa capacità di replicazione e restano quiescenti all'interno delle cisti tissutali; tali strutture si possono localizzare in qualsiasi parte dell'organismo ma con una particolare predilezione per la muscolatura scheletrica e cardiaca, l'occhio, il sistema nervoso centrale, il polmone ed il fegato. La formazione delle cisti è dovuta all'equilibrio che si instaura tra parassita e sistema immunitario dell'ospite: una volta che questo è raggiunto l'infezione decorre senza ricomparsa di sintomi clinici, almeno fino a quando non si hanno condizioni di caduta delle difese immunitarie, in seguito alle quali si possono riattivare le forme quiescenti che si trasformano nuovamente in tachizoiti (riacutizzazione) che portano alla formazione di altre pseudocisti.

In seguito all'ingestione dei tessuti, nel quale il parassita si è incistato, da parte di un altro animale, le cisti liberano il proprio contenuto di bradizoiti, i quali invadono l'intestino per poi differenziarsi in tachizoiti e provocare la fase acuta in un nuovo ospite.

E' importante sottolineare come i felini siano gli unici ad emettere le oocisti ma non ad eliminare i tachizoiti con gli escreti e i secreti, cosa che avviene per tutti gli altri ospiti.

Nel mondo, oggi, sono, diffusi tre ceppi del parassita che prendono il nome di tipo I, II e III (Howe e Sibley, 1995). Tuttavia ci sono Autori che sostengono che i tipi sono solo due e che il tipo III sia il sottotipo del tipo II (Ajzenberg *et al.*, 2002). Grigg (2001) partendo dall'osservazione che alcuni loci esibivano solo due alleli, ha ipotizzato che in origine la popolazione di *T. gondii* possedeva due progenitori distinti e che i tre tipi non sono altro che il risultato della riuscita ricombinazione genetica casuale fra i due parassiti ancestrali. L'incrocio avrebbe dato origine, secondo i ricercatori, a una grande varietà di organismi con caratteristiche diverse. I tre, dotati di una maggior capacità di adattamento all'ambiente, avrebbero soppiantato gli altri ceppi, provocando la loro estinzione.

Tutti e tre sono patogeni per l'uomo, ma solo uno, il tipo I, può provocare serie conseguenze per la salute dei pazienti più deboli e gravi malformazioni fetali, se viene contratto da una donna durante la gravidanza; inoltre è in grado di provocare l'aumento delle cisti nei tessuti. Il tipo II è invece il ceppo più isolato nei campioni umani. Il tipo III e i genotipi ricombinanti sono più frequentemente riscontrabili in animali selvatici, aree remote e in associazione a malattie umane rare (Dardè, 2004).

Le nuove ricerche e soprattutto le più sofisticate metodiche di laboratorio hanno portato ad isolare 11 ceppi di *Toxoplasma gondii* e questo grazie alla frammentazione in molti più loci del genoma di questo protozoo (Grigg and Sundar,2009).

La toxoplasmosi è una delle più importanti zoonosi e rappresenta ancora oggi un problema di sanità pubblica, in particolare nella donna gravida. È infatti documentato che oltre mezzo miliardo di persone nel mondo presentano nel siero anticorpi di *T. gondii* (Dubey, 1997). Il protozoo è stato studiato accuratamente, sebbene molti aspetti del ciclo biologico e dell'epidemiologia rimangano ancora poco conosciuti.

Modalità di trasmissione

Nell'uomo e in generale in tutti gli altri animali, l'infezione da *T. gondii* segue principalmente 4 vie di trasmissione:

1) **ingestione di oocisti sporulate** che può avvenire in seguito alla manipolazione delle feci di gatto senza l'osservanza delle più normali norme igieniche, per contatto con la lettiera del gatto, ingerendo verdure crude e frutta mal lavata contaminate dalle feci presenti nel terreno di raccolta o acqua inquinata dalle oocisti, ma anche svolgendo attività di giardinaggio con contatto col terreno che può essere potenzialmente infetto.

Anche il gatto si infetta ingerendo oocisti mature eliminate da un altro gatto, mentre gli animali d'allevamento possono infettarsi tramite l'assunzione di paglia, fieno e grano contaminati (Buxton, 1990);

2) **ingestione di bradizoiti** tramite il consumo di carne cruda o poco cotta. E' la principale modalità di infezione nell'uomo, ma anche i gatti ed i felidi possono infettarsi in caso di ingestione di carni di prede contenenti cisti tissutali. Le cisti si sviluppano 6-7 giorni dopo l'infezione e persistono nell'ospite per tutta la vita (Dubey, 1998b). Le carni a rischio sono considerate soprattutto quelle di pecora, capra, suino, piccione, lepre, cinghiale, cervi, canguro, mentre per la carne di bovino è stato dimostrato che, grazie al loro particolare sistema immunitario, le cisti spariscono per cui il pericolo di contrarre la malattia è ridotto (Innes, 1997; Esteban- Redondo, 1999).

3) **assunzione di tachizoiti** tramite secreti (latte) ed escreti (saliva, urine). Essi rappresentano una modalità di trasmissione poco frequente poiché difficilmente superano la barriera gastrica e sono assenti nel latte pastorizzato (Giaccone *et al.*, 2000).

I tachizoiti sono stati isolati nel latte prodotto dai diversi ospiti intermedi come pecore, capre, bovini e cammelli.

E' stato dimostrato che la malattia si può contrarre con organi trapiantati, quali cuore, fegato, reni e midollo osseo (Dubey, 1988; Ho-Yen, 1992) e trasfusioni di sangue; si tratta però di evenienze molto rare.

4) **trasmissione transplacentare** dalla madre, priva di anticorpi anti-Toxoplasma, al feto; questo tipo di trasmissione è stato dimostrato principalmente nell'uomo, nella pecora e nella capra (Dubey *et al.*, 1981; Masala *et al.*, 2007).

E' stato stimato che il 20-50% delle donne infette da *T. gondii* trasmetterà l'infezione al feto (Jones *et al.*, 2001). Molti studi riferiscono che il rischio della trasmissione dalla madre al feto aumenta col progredire della gravidanza (Hohlfeld *et al.*, 1989; Jenum *et al.*, 1998a; Dunn *et al.*, 1999; Foulon *et al.*, 1999; Remington *et al.*, 2005), mentre altri studi sottolineano come i danni siano più gravi quanto più la gestazione è ad uno stadio precoce, che corrisponde alla fase di embriogenesi (Hohlfeld *et al.*, 1989; Dunn *et al.*, 1999; Montoya e Liesenfeld, 2004).

Nei Cetacei si è visto che è possibile la trasmissione transplacentare ed anche in questi animali si può avere aborto o natimortalità (Jardine e Dubey, 2002; Resendes *et al.*, 2002).

ANIMALI

CERVO

Grosso ed elegante, il cervo ha, nel maschio, palchi imponenti e ramificate che ogni anno cadono per ricrescere nel periodo da marzo a giugno. Le dimensioni del nuovo palco sono in genere maggiori delle vecchie, ma dipendono dallo stato di salute dell'animale e dalle condizioni ambientali e di alimentazione. Essendo infatti un carattere secondario, la loro formazione e sviluppo sono strettamente legate oltre che al patrimonio genetico, per quanto riguarda la forma, alle disponibilità trofiche per quanto riguarda la massa.

Abita normalmente i boschi maturi; in primavera ed in autunno si spinge a volte molto in basso, anche nei pressi dei centri abitati; d'estate, invece, risale talvolta sopra il limite arboreo. I branchi sono composti da femmine e piccoli, mentre i maschi fanno vita solitaria, riunendosi al branco in autunno, al momento della riproduzione.



CLASSE	Mammiferi
ORDINE	Artiodattili
FAMIGLIA	Cervidi
NOME SCIENTIFICO	Cervus elaphus
LUNGHEZZA	165-215 cm.
ALTEZZA AL GARRESE	110-135 cm
PESO	70-275 kg
COLORE	Bruno-fulvo in estate, grigiastro in inverno.
QUANTO VIVE	circa 20 anni.in natura difficilmente supera i 15 anni
DI COSA SI NUTRE	Erbe comuni e medicinali, bacche, germogli, cortecce.
HABITAT	Boschi e pascoli

CAPRIOLO

Della stessa famiglia del cervo, è molto più piccolo ed anche il palco (presente solo nel maschio) sono piccole e con al massimo tre punte per stanga. E' estremamente timido e vive in genere solitario, ad eccezione del periodo degli amori (agosto e, a volte, dicembre), in cui maschio e femmina convivono per qualche tempo rincorrendosi a lungo prima dell'accoppiamento. E' un animale definito di "ecotono", cioè delle aree marginali di transizione tra le aree boscate e le aree aperte, caratterizzate dalla presenza abbondante di cespugli. Può adattarsi seppur con densità diverse a vari tipi di ambiente, dal livello del mare fino oltre i 2000 mslm. Vive di preferenza nei fondovalle, spesso tra le macchie di ontani lungo i fiumi. Tra maggio e giugno nascono i piccoli, spesso gemelli. Il capriolo risente dell'"invadenza" del cervo: in realtà la diminuzione del capriolo in presenza del cervo non è così scontata, spesso il calo del primo a favore del secondo dipende dalle modifiche dell'ambiente, in quanto, pur condividendo gli stessi spazi occupano nicchie ecologiche sostanzialmente diverse.



CLASSE	Mammiferi
ORDINE	Artiodattili
FAMIGLIA	Cervidi
NOME SCIENTIFICO	Capreolus capreolus
LUNGHEZZA	95-135 cm.
ALTEZZA AL GARRESE	circa 70 cm.
PESO	18-27 kg.
COLORE	Rosso-bruno in estate, grigio-bruno in inverno, con chiazza posteriore (specchio) bianca.
QUANTO VIVE	Circa 12 anni in natura
DI COSA SI NUTRE	Erbe ecotonali ricche di cespugli.
HABITAT	Boschi e pascoli, normalmente verso i fondovalle.

DAINO



Ungulato di medie dimensioni (Lunghezza del corpo: 130-170 cm, altezza 100-130 cm. peso 40-80 Kg)

Riconoscibile per le sue larghe e lunghe stanghe palmate, con il mantello rossiccio o marrone giallastro, con macchie bianche su dorso e sui fianchi. Coda breve e nera che continua con una striscia nera sul dorso e con due brevi tratti che contornano lo specchio anale bianco. Le mandrie sono formate da femmine adulte e giovani e dai giovani maschi.

Si ciba di erbe, foglie verdi e germogli di conifere e latifoglie, frutta e bacche selvatiche.

SCOPO

Tenuto conto del fatto che la toxoplasmosi è una zoonosi sempre più diffusa si è pensato di fare una indagine in un campione di ungulati selvatici per valutare la sieroprevalenza in queste specie animali, e di conseguenza la possibilità che questi possano rappresentare un rischio per il cacciatore e per coloro che mangiano carne cruda.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto utilizzando il sangue degli ungulati selvatici abbattuti durante tre sessioni di caccia di selezione svoltesi nella provincia di Pistoia nei mesi di febbraio e marzo del 2012.

Nello studio sono stati sottoposti ad esame sierologico per *T. gondii* 103 animali suddivisi in :

- 86 cervi
- 8 caprioli
- 9 daini

Per ciascun animale sono stati registrati sesso ed età.

TERRITORIO

L'area geografica in cui si è svolta la caccia di selezione si trova nella provincia di Pistoia; il territorio nel complesso presenta caratteristiche orografiche variabili dalle aree collinari pedemontane fino alla montagna pistoiese, con tutta la diversificazione possibile. In questa area geografica la densità stimata del cervo va dalle 800 alle 1000 unità, mentre per il capriolo la densità varia tra 1 e 15-25 capi per km quadrato per cui la popolazione stimata per la superficie totale è di circa 3000 capi.

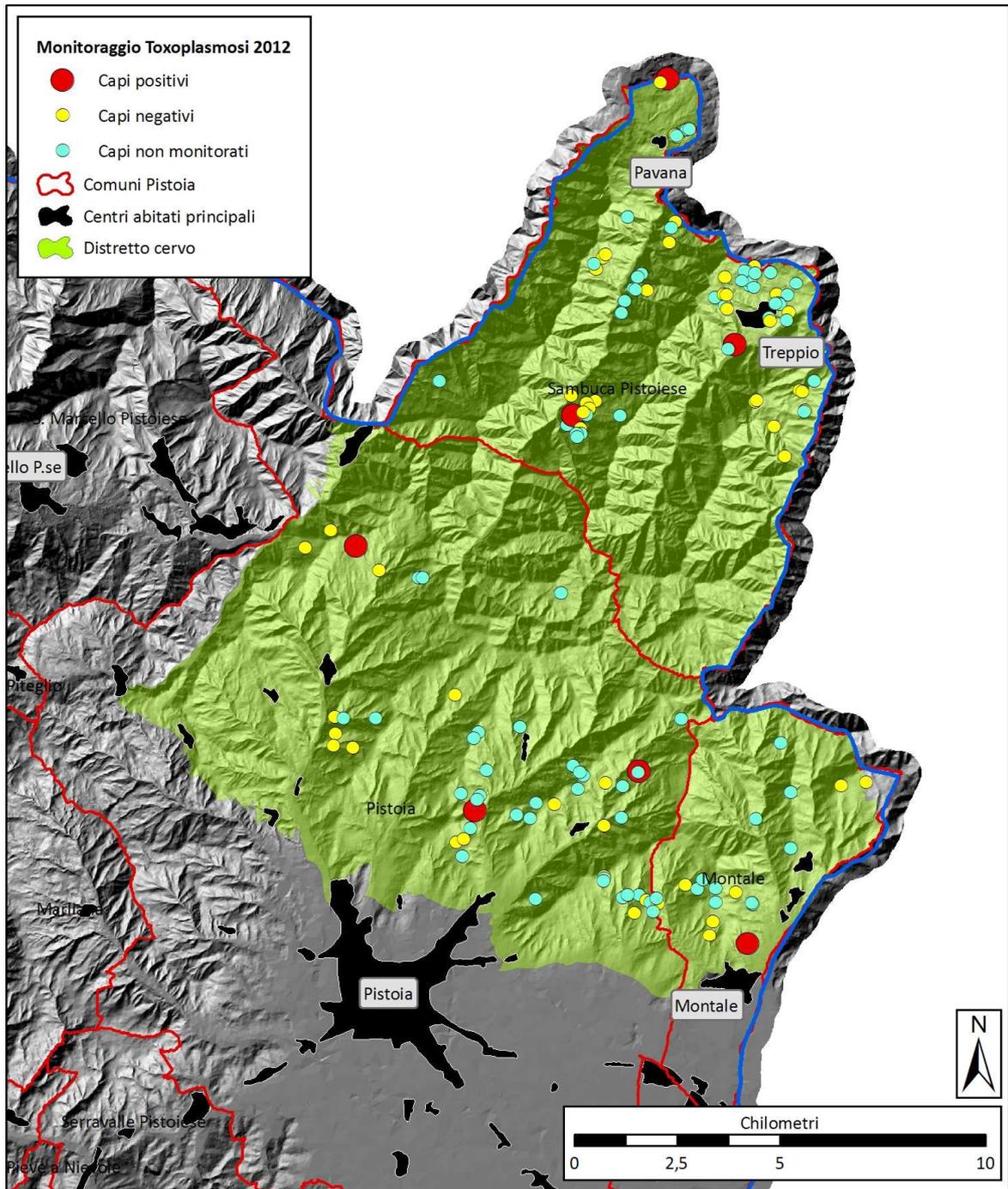


Tavola 1: distribuzione animali abbattuti nella caccia di selezione

Per quanto riguarda il livello di “confidenza” nei confronti dell’uomo non ci sono sostanziali differenze tra cervo e capriolo. Entrambe le specie si abituano ai rumori e alla presenza costante dell’uomo e quindi frequentano tranquillamente pertinenze domestiche a scopo alimentare.

Per quanto riguarda l’alimentazione il cervo ed il capriolo sono sostanzialmente diversi.

Il primo viene classificato come “pascolatore intermedio” (capacità di digerire la fibra grezza), mentre il secondo è un “brucatore selettivo” (predilige alimenti ad elevata concentrazione proteica: germogli, apici, foglie di alberi ed arbusti).

Il cervo quindi ha una discreta capacità di digerire fibra grezza, mentre nel capriolo tale caratteristica è minima; per contrasto la capacità di digerire i tannini è opposta, e questo risulta logico in quanto il capriolo mangia prevalentemente apici vegetativi dove tali sostanze sono particolarmente concentrate. Dal punto di vista anatomico le due specie presentano rapporti tra comparti gastrici e massa corporea sostanzialmente diversi, con il capriolo che presenta ruminare e reticolo proporzionalmente più piccoli; la ghiandola salivare è proporzionalmente più sviluppata nel capriolo.

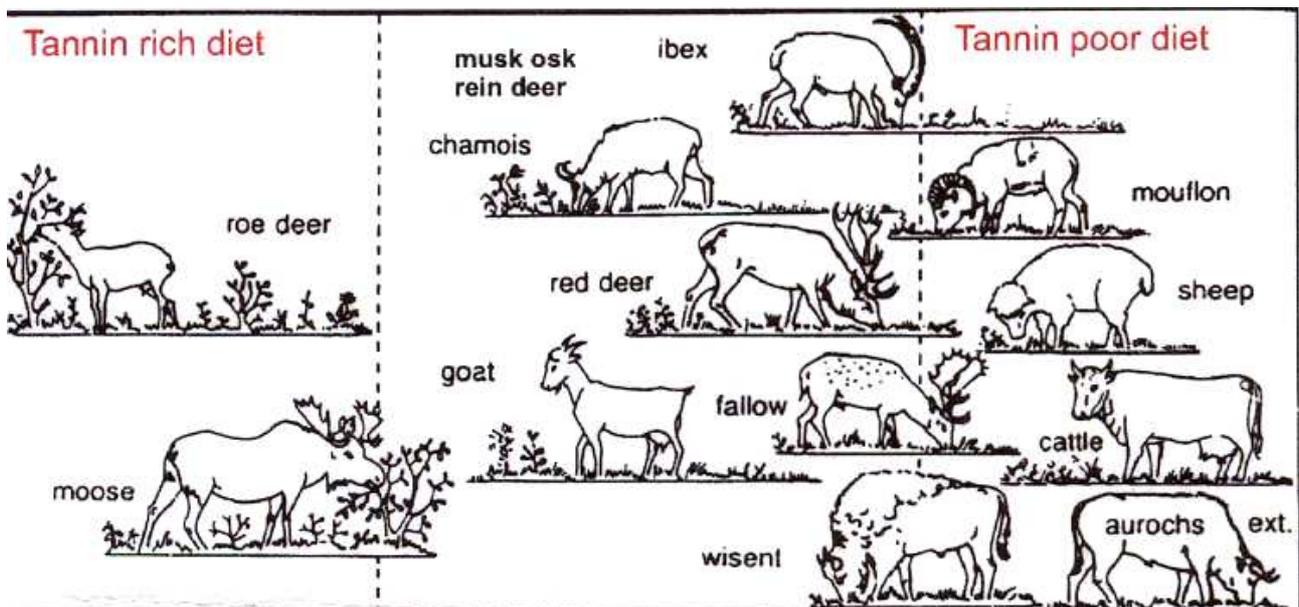


Tavola di Hofmann: divisione dei ruminanti, brucatori selettivi a sx e pascolatori intermedi al centro, pascolatori a dx

ESAMI DIAGNOSTICI SVOLTI

Il campione da analizzare è stato prelevato dalla camera cardiaca di ciascun soggetto subito dopo l'abbattimento ed è stato conservato in provette con EDTA a temperatura di refrigerazione fino all'arrivo al laboratorio di sierologia parassitaria del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Pisa.

I campioni sono stati sottoposti a test di immunofluorescenza indiretta, (IFAT) per la ricerca di anticorpi specifici contro *T. gondii*.

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 *toxospot* su vetrini multi spot (Bio-Merieux, Marcy L'Etoile, France). Il siero degli ungulati selvatici è stato diluito per raddoppio partendo dalla diluizione 1:10 in tampone fosfato (PBS) a pH 7.2 e deposto sugli spot sui quali era fissato l'antigene. I vetrini sono stati incubati a 37 gradi centigradi per 30 minuti. L'anticorpo secondario era rappresentato da anti-IgG marcate con fluoresceina isotiocianato, diluite 1:30 in PBS. I vetrini sono stati incubati in termostato secondo le condizioni sopra descritte, successivamente sono stati montati ed osservati al microscopio a fluorescenza. Sono considerati positivi i campioni di siero che danno una chiara colorazione giallo-verde fluorescente all'osservazione microscopica; al contrario, i tachizoiti non reattivi mostrano un colore rosso-marrone.

I campioni risultati positivi a basso titolo sono stati sottoposti ad analogo tecnica per rilevare la presenza di anticorpi anti *Neospora caninum*, in modo tale da evidenziare una eventuale cross-reattività nei confronti di questo parassita

RISULTATI

I risultati ottenuti per quanto riguarda la sierologia sono riassunti nella tabella

<i>n°</i>	<i>Data</i>	<i>Animale</i>	<i>Specie</i>	<i>Età Sex</i>	<i>TOXO</i>	<i>NEOSPORA</i>
1	22/02/12	1258	cervo	M subadulto	neg	
2	22/02/12	1542	cervo	M piccolo	neg	
3	22/02/12	1535	cervo	F sottile	neg	
4	22/02/12	1481	cervo	F piccolo	neg	
5	22/02/12	1482	cervo	M piccolo	neg	
6	22/02/12	1420	cervo	M giovane	neg	
7	22/02/12	1513	cervo	F adulta	neg	
8	22/02/12	1553	cervo	F piccolo	neg	
9	22/02/12	1437	cervo	F adulta	neg	
10	22/02/12	1565	cervo	F adulta	neg	
11	22/02/12	1364	cervo	M subadulto	neg	
12	22/02/12	1494	cervo	F piccolo	neg	
13	22/02/12	1440	cervo	F adulta	neg	
14	22/02/12	1366	cervo	M subadulto	neg	
15	22/02/12	1555	cervo	M giovane	neg	
16	22/02/12	1533	cervo	F adulta	neg	
17	22/02/12	1531	cervo	F sottile	neg	
18	22/02/12	1526	cervo	F adulta	1/20	neg
19	22/02/12	996	cervo	M adulto	neg	
20	22/02/12	1540	cervo	M adulto	neg	
21	22/02/12	1462	cervo	F sottile	neg	
22	22/02/12	1519	cervo	F adulta	neg	
23	22/02/12	1446	cervo	F adulta	1/10	neg
24	22/02/12	1475	cervo	M piccolo	1/10	neg
25	08/03/12	1460	cervo	M subadulto	neg	
26	08/03/12	1443	cervo	F adulta	neg	
27	08/03/12	1996	daino	F adulta	neg	
28	08/03/12	1910	daino	piccolo	neg	
29	08/03/12	1907	daino	F adulta	neg	
30	08/03/12	1521	cervo	F adulta	neg	
31	08/03/12	1441	cervo	F adulta	neg	
32	08/03/12	1555	cervo	M giovane	neg	
33	08/03/12	1511	cervo	F piccolo	neg	
34	08/03/12	1329	capriolo	F adulta	neg	
35	08/03/12	1339	cervo	M subadulto	1/10	neg
36	08/03/12	1614	capriolo	F adulta	1/10	neg
37	08/03/12	1488	cervo	F adulta	neg	
38	08/03/12	1444	cervo	M giovane	neg	

39	08/03/12	1571	cervo	F adulta	neg	
40	08/03/12	1505	cervo	M giovane	neg	
41	08/03/12	1927	capriolo		neg	
42	08/03/12	1528	cervo	F adulta	neg	
43	08/03/12	1562	cervo	F adulta	neg	
44	08/03/12	1563	cervo	F giovane	neg	
45	08/03/12	1473	cervo	M piccolo	neg	
46	08/03/12	1484	cervo	M piccolo	neg	
47	08/03/12	1569	cervo	M giovane	neg	
48	08/03/12	1504	cervo	F giovane	neg	
49	08/03/12	1442	cervo	F adulta	neg	
50	08/03/12	1556	cervo	M giovane	neg	
51	08/03/12	1463	cervo	F adulta	neg	
52	08/03/12	1911	daino			
53	08/03/12	1529	cervo	F adulta	neg	
54	08/03/12	1566	cervo	F piccolo	neg	
55	08/03/12	1415	cervo	M adulto	neg	
56	08/03/12	1501	cervo	M piccolo	neg	
57	08/03/12	1414	cervo	M subadulto	neg	
58	08/03/12	1564	cervo	F adulta	neg	
59	08/03/12	1541	cervo	F adulta	neg	
60	08/03/12	1510	cervo	F adulta	neg	
61	08/03/12	1468	cervo	F giovane	neg	
62	08/03/12	1527	cervo		neg	
63	08/03/12	1454	cervo	M giovane	neg	
64	08/03/12	1514	cervo	F adulta	neg	
65	08/03/12	1425	cervo	M giovane	neg	
66	08/03/12	1393	cervo		neg	
67	08/03/12	1395	cervo		neg	
68	08/03/12	1977	capriolo		neg	
69	08/03/12	1978	capriolo		neg	
70	08/03/12	1927	daino		neg	
71		0327	daino	F adulta		
72	30/03/12	1386	cervo		neg	
73	30/03/12	1365	cervo	M subadulto	neg	
74	30/03/12	1496	cervo	F piccolo	neg	
75	30/03/12	1384	cervo		neg	
76	30/03/12	1476	cervo	F adulta	neg	
77	30/03/12	1453	cervo	F adulta	neg	
78	30/03/12	1568	cervo	F piccolo	neg	
79	30/03/12	1973	daino	piccolo	neg	
80	30/03/12	1368	cervo	M giovane	1/10	neg
81	30/03/12	1558	cervo	F adulta	neg	

82	30/03/12	1502	cervo	M piccolo	neg	
83	30/03/12	1487	cervo	M piccolo	neg	
84	30/03/12	1523	cervo	F adulta	neg	
85	30/03/12	1972	capriolo	piccolo	neg	
86	30/03/12	1474	cervo	F piccolo	1/10	neg
87	30/03/12	1508	cervo	F piccolo	neg	
88	30/03/12	1567	cervo	M piccolo	neg	
89	30/03/12	1530	cervo	F adulta	neg	
90	30/03/12	1273	cervo	M subadulto	neg	
91	30/03/12	1421	cervo	F adulta	1/10	neg
92	30/03/12	1522	cervo	F adulta	neg	
93	30/03/12	1480	cervo	M piccolo	neg	
94	30/03/12	1986	daino		neg	
95	30/03/12	1362	cervo	M subadulto	neg	
96	30/03/12	1518	cervo	M giovane	neg	
97	30/03/12	1372	cervo	F piccolo	neg	
98	30/03/12	1668	capriolo		neg	
99	30/03/12	1447	cervo	F adulta	neg	
100	30/03/12	1536	cervo	F piccolo	neg	
101	30/03/12	1933	daino		neg	
102	30/03/12	1948	capriolo	F adulta	neg	
103	30/03/12	1512	cervo	M giovane	neg	

Tabella 1. Risultati

CERVO

M/F piccolo = fino a 12 mesi

M giovane (yearling)= 12-24 mesi

M subadulto = 24-48 mesi

M adulto = 5 anni compiuti

F giovane/sottile = 12-24 mesi

F adulta = 2 anni compiuti

CAPRIOLO

M/F piccolo = fino a 12 mesi

M giovane (yearling) = 12-24 mesi

M adulto = 2 anni compiuti

F giovane/sottile = 12-24 mesi

F adulta = 2 anni compiuti

DAINO

M/F piccolo = fino a 10-11 mesi

M giovane (yearling) = 12-24 mesi

M subadulto (balestrone) = 24-48 mesi

M adulto (palancone) = 5 anni compiuti

F giovane/sottile = 12-24 mesi

F adulta = 2 anni compiuti

I campioni positivi per *T. gondii* sono stati analizzati anche per *N. caninum* in quanto a causa delle somiglianze genetiche tra i due parassiti è possibile una cross-reattività (de Craeye et al 2010); nel

nostro studio tutti gli otto positivi per *T. gondii* sono risultati essere negativi nei confronti di *N. caninum*.

La localizzazione degli animali abbattuti risultati positivi a IFAT per *T.gondii* è rappresentata dalla cartina geografica sottostante:

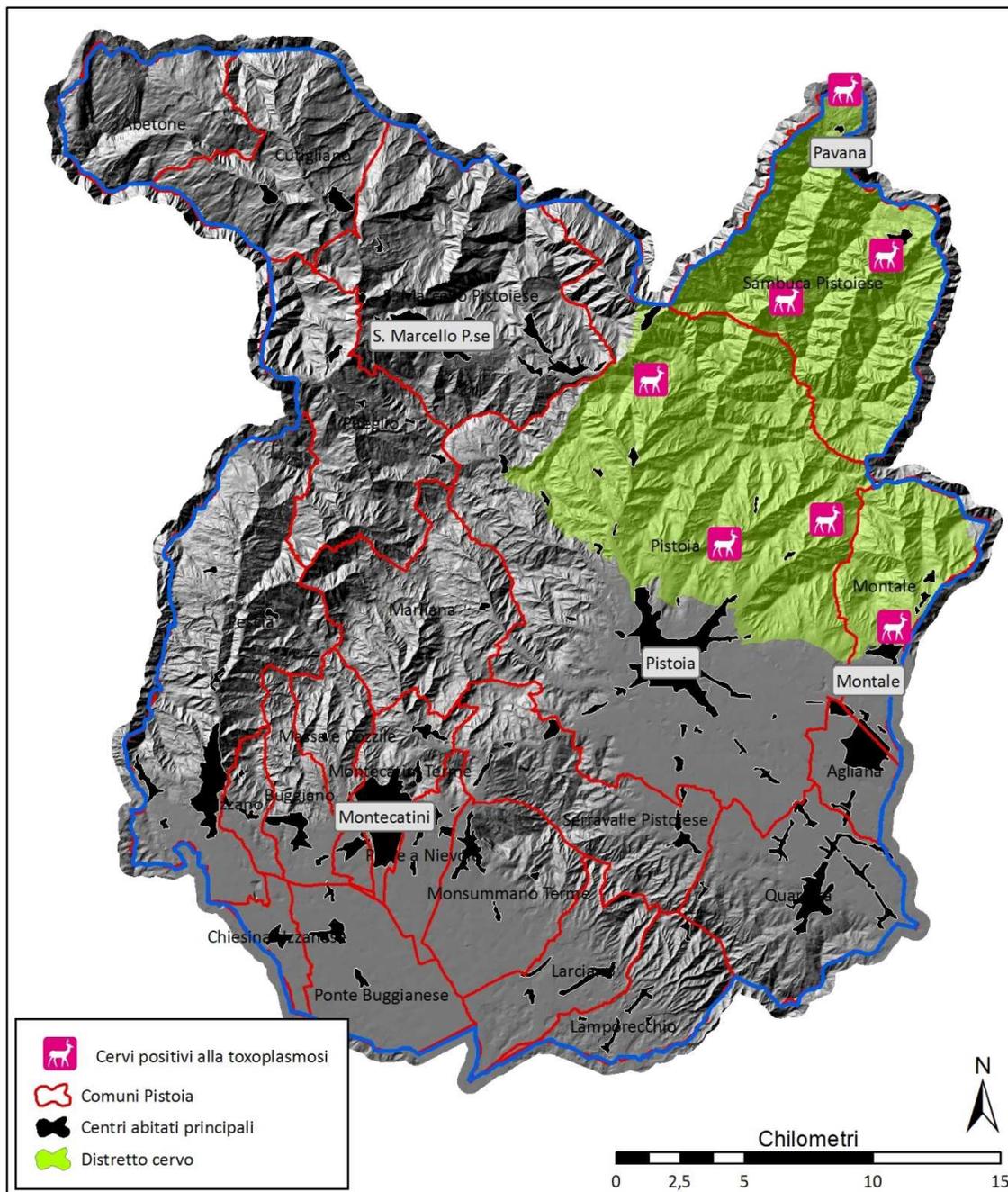


Tavola 2: localizzazione degli abbattimenti dei cervi risultati positivi alla toxoplasmosi, in rosso i confini comunali e in verde il distretto di caccia entro cui sono stati prelevati i cervi durante la stagione venatoria 2011-2012

Alcuni degli animali, come si può osservare dalla tavola, sono stati abbattuti nelle immediate vicinanze di centri abitati; dalla cartina si può inoltre osservare come i cervi sieropositivi presentino una distribuzione omogenea nel territorio di caccia.

DISCUSSIONE

Il contatto e l'interazione fra fauna selvatica, animali domestici e gli esseri umani può portare ad un aumento del rischio di circolazione di patogeni zoonotici (Artois, 1993). *T. gondii* può infettare una grande varietà di animali omeotermi ed è stato segnalato come endemico in molti Paesi del mondo (Ajzenberg et al., 2004; Dubey 2004). I gatti e gli altri felini selvatici sono riconosciuti come ospiti definitivi del parassita, mentre una grande varietà di animali domestici e selvatici omeotermi possono essere ospiti intermedi (Davidson 2000). I mammiferi selvatici e gli uccelli sono esposti a *T. gondii* attraverso l'ingestione di cibo e/o acque contaminate con oocisti sporulate localizzate in feci di felidi (Dubey e Jones 2008). Conoscere la prevalenza di infezioni parassitarie delle specie selvatiche può essere di grande importanza per le strategie di protezione ambientale (Artois, 1993); la fauna selvatica può essere un marker di tutela ambientale per la contaminazione con *T. gondii*, nonchè un indicatore di rischio di trasmissione all'uomo e per gli animali di interesse zootecnico (Dubey e Beattie 1998; Gennari et al 2004). La toxoplasmosi acuta è stata riportata in cacciatori che hanno consumato carne cruda di cervidi (Sacchi et al 1983; Ross 2001) e cinghiali (Schoi et al 1997). Gli esseri umani possono infettarsi durante la manipolazione e l'eviscerazione degli animali cacciati (Dubey 1994). Tessuti e visceri lasciati sul campo possono inoltre rappresentare fonte di infezione per carnivori tra cui gatti e altri felidi (Dubey et al 2008). Hejlicek et al (1997) hanno suggerito come i carnivori possano avere una maggiore prevalenza di anticorpi anti-*T. gondii* a causa di ingestioni cumulative di animali infetti e come le sieroprevalenze decrescano rispettivamente in animali onnivori, erbivori e insettivori. Animali viventi allo stato libero come uccelli e mammiferi selvatici possono essere utilizzati come sentinelle ambientali di diffusione di *T. gondii* (Tenter et al 2000).

Nel mondo sono stati eseguiti diversi studi per valutare la sieroprevalenza della toxoplasmosi negli ungulati selvatici:

- Spagna: cervo rosso 42,2%, daini (24%), caprioli 21,8% (Candela et al 2008)
- Alpi: capriolo 13% (Gaffuri et al 2006)
- Norvegia: caprioli 34% (Vikoren et al 2004)
- Spagna: caprioli dal 14 al 39% (Gamorra et al 2008)
- Francia: caprioli 36,4%, cervi rosso 17% (Aubert et al 2009)
- Repubblica ceca: cervi 15%, caprioli 14% (Aubert et al 2009)
- Stati Uniti: cervo dal 32,2% al 53,2% (Dubey et al 2008)
- Belgio: caprioli 52% (S. de Craeye et al 2010)
- Finlandia: cervo 26,7%, 17,6% capriolo (Pikka Jokelainen et al 2010)

- Svezia: caprioli 34% (Malmsten et al 2010)

Analizzando la percentuale di sieroprevalenza dei caprioli del nostro studio (12,5%) possiamo dire che siamo in linea con le percentuali registrate nei precedenti lavori di Gaffuri et al. (2006) e da Ana Patrícia Lopes et al. (2010) svolti rispettivamente in Italia centrale e nelle Alpi; la percentuale di positività per *T. gondii* nei caprioli in Italia non si discosta dalle medie europee pur attestandosi con i valori di positività più bassi. In questo studio però è stato abbattuto un piccolo numero di caprioli in quanto la caccia di selezione eseguita in quel periodo era incentrata prevalentemente sull'abbattimento dei cervi perciò non possiamo dire con sicurezza se la media dei caprioli infettati da *T. gondii* sia realmente in quella percentuale.

La percentuale di sieroprevalenza dei cervi nel nostro studio è stata del 8,1%; questo valore si discosta dai valori di Spagna (42,2%), Francia (17%), Repubblica ceca (15%) e Finlandia (26,7%), forse per un diverso ambiente e una diversa densità.

Studi epidemiologici su animali selvatici di solito prendono in considerazione le caratteristiche degli agenti patogeni ma anche i tratti ambientali e le caratteristiche di specie-ospiti come: sesso, età, densità di popolazione così come fattori ambientali abiotici e fattori climatici (Candela et al 2008)

Dagli studi condotti in Europa da parte di Gauss et al. (2006), Gamarra et al. (2008), Dubey (2005) e Gamarra (2006) in Spagna, Vikoren et al. (2003 e 2004) in Norvegia, e di Malmsten et al. (2010) in Svezia è stato possibile arrivare alla conclusione che non ci sono associazioni tra animali sieropositivi e sesso per il capriolo ed il cervo. Lo stesso risultato lo possiamo confermare anche per il nostro studio visto che abbiamo avuto 8,5% di femmine positive e 8,8% di maschi positivi nel cervo e una femmina positiva nel capriolo. La nostra percentuale si avvicina di più alla situazione reale nel cervo visto che sono stati abbattuti 86 capi contro gli 8 del capriolo.

Per quanto concerne l'età degli animali positivi a *T.gondii* esaminati nel nostro caso potremmo dire che non ci sono differenze sostanziali tra animali giovani ed adulti. Questo risultato si allinea allo studio eseguito da Gamarra et al. (2007) in Spagna mentre si discosta dai lavori condotti da Ana Patrícia Lopes et al. (2010) in Portogallo, J. Malmsten et al. (2010) in Svezia e Vikoren et al. (2003) in Norvegia in cui è stato visto che c'è un effetto cumulativo dato dall'aumentare dell'età sulle infezioni di molti animali selvatici (Tenter et al., 2000).

A differenza di alcuni studi condotti in Spagna (Gauss et al.; Dubey 2005), nel nostro studio è impossibile affermare che l'incidenza della toxoplasmosi dipenda dai fattori climatici (aree con ombra ed umidità elevate danno una maggiore prevalenza dell'infezione perché permettono una resistenza maggiore dell'oocisti sporulata rispetto ad un clima secco) in quanto nella zona in cui

sono stati abbattuti i soggetti per questo lavoro si va dalle aree collinari pedemontane fino alla alta montagna pistoiese con conseguente ampia diversificazione climatica.

Anche nel nostro studio sono state riscontrate delle differenze di specie nei confronti della sieroprevalenza per *T. gondii*: il capriolo ha dato una percentuale maggiore di prevalenza di infezione rispetto al cervo, in questo modo possiamo confermare quanto descritto nel lavoro eseguito da Vikoren et al. (2004) in cui è stato osservato che i caprioli hanno una sieroprevalenza superiore rispetto ai cervi. Il lavoro condotto da Williamson et al. (1980), che ha effettuato uno studio sperimentale di inoculazione di *T. gondii* nel cervo rosso, ci rivela la possibilità che ha il cervo di eliminare l'infezione nell'età adulta. Sembra pertanto che la diversità di sieroprevalenza tra capriolo e cervo possa quindi dipendere da fattori intrinseci di specie.

Cervo e capriolo si stanno abituando alla presenza dell'uomo e entrambi frequentano pertinenze domestiche: questo loro comportamento può aver facilitato l'infezione da parte di *T. gondii*, visto che di solito laddove è presente l'uomo si trova anche la presenza di felidi; questa ipotesi è giustificata anche dal fatto che parte dei nostri campioni risultati positivi proviene da ungulati selvatici abbattuti nelle vicinanze di centri urbani.

Il graduale aumento dei boschi che è stato registrato negli ultimi 50 anni sta determinando così una progressiva diminuzione dell'alimentazione disponibile per cervo e capriolo, per cui queste due specie si stanno spingendo sempre più vicino alle zone urbane: per questo motivo sarebbe interessante valutare di nuovo la sieroprevalenza nel prossimo futuro, per vedere se la percentuale di animali infetti a *T. gondii* varierà o meno.

Nel nostro studio sono stati riscontrati titoli anticorpali molto bassi per *T. gondii* (1:10), pertanto non si è proceduto all'esecuzione di indagini di tipo molecolare (PCR), che in presenza di tali valori di siero prevalenza avrebbero con tutta probabilità dato esito negativo.

Rispetto ad alcuni Paesi dell'Europa (Spagna, Francia, Belgio, Norvegia, Svezia) l'Italia registra valori di sieroprevalenza nei cervi e nei caprioli nei confronti di *T. gondii* più bassi (forse per il territorio che comunque nel suo insieme rimane ancora lontano dai grossi centri abitati), questo ci permette di ipotizzare che i cacciatori che eviscerano questi animali abbattuti avranno un rischio minore di contrarre l'infezione rispetto a coloro che praticano questa operazione negli Stati europei citati sopra; questo rischio diminuisce anche per alcuni aspetti culturali legati alla cucina: in Nord Europa è più usuale trovare pietanze con carne di ungulati selvatici cruda, pratica che invece non è usuale in Italia.

Questi risultati sottolineano che sebbene le specie selvatiche possano rappresentare un importante serbatoio per la trasmissione di *T. gondii*, come ampiamente riportato in letteratura (Aubert et al, 2009), negli animali esaminati nel nostro caso, questo rischio sembra essere piuttosto limitato vista

anche la bassa sieroprevalenza nel cervo; ad ogni modo è sempre consigliabile attenersi alle normali prassi igienico-sanitarie quando si maneggiano i visceri degli ungulati selvatici, in particolare è importante utilizzare guanti monouso, non lasciare i visceri “in campo” in quanto possono rappresentare fonte di infezione per i carnivori (soprattutto per i felidi visto che sono considerati ospiti definitivi), non alimentarsi con carni crude o poco cotte (questo diventa fondamentale per le donne in gravidanza) a causa della possibile ingestione di bradizoiti (cisti tissutali) presenti in essa.

BIBLIOGRAFIA

- J.P. Dubey: History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*, 2008
- M. G. Candela & E. Serrano & C. Martínez-Carrasco & P. Martín-Atance & M. J. Cubero & F. Alonso & L. Leon: Coinfection is an important factor in epidemiological studies: the first serosurvey of the aoudad (*Ammotragus lervia*), 2008
- Ana Patrícia Lopes & Roberto Sargo & Manuela Rodrigues & Luís Cardoso: High seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild animals from Portugal, 2010
- D. Aubert, D. Ajzenberg, C. Richomme, E. Gilot-Fromont, M.E. Terrier, C. de Gevigney, Y. Game, D. Maillard, P. Gibert, M.L. Dardé, I. Villena: Molecular and biological characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in France, 2009
- Jonas Malmsten, Eva-Britt Jakubek, Camilla Björkman: Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in moose (*Alces alces*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) in Sweden, 2010
- J.A. Gamarra, O. Cabezo'n, M. Pabón, M.C. Arnal, D.F. Luco, J.P. Dubey, C. Gorta'zar, S. Almeria: Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in roe deer from Spain, 2007
- García-Bocanegra, O. Cabezón, M. Pabón, F. Gómez-Guillamón, A. Arenas, E. Alcaide, R. Salas-Vega, J.P. Dubey, S. Almería: Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*), 2010
- C.B.L. Gauss, J.P. Dubey, D. Vidal, O. Cabezo'n, F. Ruiz-Fons, J. Vicente, I. Marco, S. Lavin, C. Gortazar, S. Almería: Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in red deer (*Cervus elaphus*) and other wild ruminants from Spain, 2005
- Turid Vikøren, Jorun Tharaldsen, Bente Fredriksen, Kjell Handeland: Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild red deer, roe deer, moose, and reindeer from Norway, 2003
- J.P. Dubey, M.C. Jenkins, O.C.H. Kwok, R.L. Zink, M.L. Michalski, V. Ulrich, J. Gill, M. Carstensen, P. Thulliez: Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from Iowa and Minnesota using four serologic tests, 2008
- R. Panadero, A. Paineira, C. López, L. Vázquez, A. Paz, P. Díaz, V. Dacal, S. Cienfuegos, G. Fernández, N. Lago, P. Díez-Baños, P. Morrondo: Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain), 2009

- Alessandra Gaffuri, Marco Giacometti, Vito Massimo Tranquillo, Simone Magnino, Paolo Cordioli, and Paolo Lanfranchi: Serosurvey of Roe Deer, Chamois and Domestic Sheep in the Central Italian Alps, 2006
- S. De Craeye, N. Speybroeck, D. Ajzenberg, M.L. Dardé, F. Collinet, P. Tavernier, S. Van Gucht, P. Dorny, K. Dierick: *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wildlife: Common parasites in Belgian foxes and Cervidae?, 2010
- Pikka Jokelainen, Anu Näreaho, Suvi Knaapi, Antti Oksanen, Ulla Rikula, Antti Sukura: *Toxoplasma gondii* in wild cervids and sheep in Finland: North-south gradient in seroprevalence, 2010
- Jered M. Wendte, Amanda K. Gibson, Michael E. Grigg: Population genetics of *Toxoplasma gondii*: New perspectives from parasite genotypes in wildlife, 2011

RINGRAZIAMENTI

un grazie speciale va alla Dott.ssa Nardoni Simona che come sempre si è contraddistinta per la sua esperienza, pazienza e generosità: anche per quest'avventura sei stata fondamentale per la riuscita di questo lavoro!

...un grazie speciale va alla Prof.ssa Mancianti che con la sua semplicità ha permesso la realizzazione di questo lavoro

...un grazie a Linda Mugnai che si è resa disponibile ad eseguire le pratiche di laboratorio e a fornirmi gran parte della letteratura

...un enorme grazie al Tecnico Faunistico Sandro Nicoloso che si è dimostrato indispensabile per le informazioni inerenti agli ungulati selvatici e per la sua precisione nel fornirci le cartine geografiche, grazie davvero di tutto, soprattutto per la tua gentilezza.

...un grazie al Dott. Federico Picciolli che con meticolosità ci ha inviato i campioni su cui si è basato il nostro lavoro

...un grazie speciale va al mio collega Dott. Alberto Sbrana ...sembrava ieri quando abbiamo iniziato quest'avventura ..e invece sono riuscita a sopportarti come compagno di banco per ben tre anni...accidenti come è volato il tempo ma... in fondo... ci siamo divertiti... grazie davvero di tutto cuore!

...un grazie infinito a tutti voi colleghi nonché compagni di scuola... abbiamo passato tre anni fantastici...soprattutto direi che ci siamo divertiti un sacco..in particolare negli ultimi due anni anche grazie alla presenza del Prof Giuliano Baccelli!

...un ultimo importantissimo grazie di tutto cuore a quel santo ragazzo di Luca che è riuscito a sopportarmi in questi anni tra lavoro e scuola..e soprattutto in questo ultimo mese che mi ha aiutato nella traduzione degli articoli scientifici e nella stesura della tesi vista la mia ignoranza in materia..sei speciale!