



Università degli Studi di Catania

Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali

Dottorato di Ricerca in Scienze della Terra e dell'Ambiente - XXXVI Ciclo

Curriculum: Biologia ambientale e Biotecnologie

Coordinatore: Prof.ssa Agata Di Stefano

Dott.ssa Alessandra Aparo

Studio sulla presenza di forme infettanti di *Toxoplasma gondii* nelle acque dolci e marine della Sicilia Orientale

Tesi di Dottorato

Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa Bianca Maria Lombardo

Co-Tutor:

Dott.ssa Anna Maria Fausta Marino

2020/2023

INDICE

1.	INTRODUZIONE	
1.1	Toxoplasmosi: definizione, patogenesi e descrizione dell'infezione	4
1.1.1	Aplogruppi e distribuzione geografica	6
1.2	Ciclo vitale del parassita	9
1.2.1	Eziologia e ciclo biologico di <i>Toxoplasma gondii</i>	11
1.3	Modalità di infezione e trasmissione	13
1.3.1	Modalità di trasmissione delle oocisti	14
1.3.2	Inquinamento ambientale e trasmissione	15
1.4	Aspetti clinici nell'uomo	17
1.4.1	Patogenesi nel feto	19
1.4.2	Aspetti clinici negli animali	19
1.4.3	Quadri anatomopatologici	20
1.4.4	Meccanismi di risposta immunitaria	20
1.5	Misure di prevenzione della Toxoplasmosi umana	21
1.5.1	Decalogo per la prevenzione della Toxoplasmosi	21
1.6	Diagnosi dell'infezione	22
1.6.1	Metodi sierologici	24
1.6.2	Test tintoriale di Sabin-Feldman o dye test	24
1.6.3	Reazione di immunofluorescenza	24
1.6.4	Test di Remington	25
1.6.5	Fissazione del complemento	25
1.6.6	Reazione di agglutinazione diretta (Test di Fulton)	26
1.6.7	Reazione di emoagglutinazione condizionata	26

1.6.8	Metodo Immunoenzimatico	26
1.6.9	Metodo ELISA per la ricerca di anticorpi anti <i>Toxoplasma gondii</i> presenti nelle specie ovine, caprine e suine	27
1.6.10	Interpretazione delle indagini sierologiche	28
1.6.11	Metodo Immunoistochimico per la diagnosi di <i>Toxoplasma gondii</i> da organi e tessuti animali	29
1.6.12	Tecniche di biologia molecolare, Real-time PCR e Nested PCR	29
2	Scopo del progetto	32
3	Materiali e metodi	48
3.1	Estrazione del DNA da acqua	50
3.1.1.1	Fase della lettura della concentrazione del DNA mediante elettroforesi	51
3.1.2	Fase dell'esecuzione della RT PCR	52
3.1.2.2	Lettura e interpretazione dei risultati	55
3.1.3	Tipizzazione molecolare del DNA di <i>T. gondii</i> mediante i metodi RFLP ed MLST in NGS	55
3.1.4	Metodo RFLP	56
3.1.5	Metodo NGS	66
4	Risultati	70
5	Discussione e conclusioni	73
6	Bibliografia	76

1. INTRODUZIONE

1.1 Toxoplasmosi, definizione, patogenesi e descrizione dell'infezione.

La toxoplasmosi è una zoonosi diffusa in tutto il mondo, è causata da *Toxoplasma gondii*, un parassita intracellulare obbligato di tutti i Vertebrati endotermi, compreso l'uomo (Dubey, 2010). Si tratta di una malattia infettiva con diffusione ubiquitaria, che colpisce prevalentemente i mammiferi ma può comparire anche in altre specie quali uccelli, rettili, molluschi; essa è in grado di colpire animali da compagnia, da reddito, animali selvatici e mammiferi marini. Secondo alcuni studi emerge l'ipotesi che il parassita sia in grado di manipolare il comportamento dell'ospite-preda a vantaggio del parassita; l'ipotesi prevede che alcuni geni del parassita possano produrre nella preda cambiamenti comportamentali rendendo le prede (topi e ratti) attratti in maniera atipica e fatale dagli odori dei gatti, favorendo così la predazione e quindi la trasmissibilità del parassita (Joanne P. Webster 2001).

Secondo i *Centers for Disease Control and Prevention*, negli Stati Uniti circa il 22,5% della popolazione di età superiore ai 12 anni ha contratto la malattia, mentre in alcune parti del mondo, principalmente nelle aree a bassa altitudine con clima caldo umido, l'incidenza della patologia sarebbe addirittura intorno al 95%. Il *T. gondii* è un protozoo che svolge il suo ciclo sessuato nel gatto, suo ospite definitivo, mentre tutte le altre specie recettive all'infezione, uomo compreso, fungono da ospiti intermedi nei quali si svolge il solo ciclo asessuato. Nel vasto contesto delle zoonosi parassitarie la toxoplasmosi riveste un ruolo epidemiologicamente rilevante, conseguenza dell'ampia diffusione geografica e della mancanza di specificità d'ospite nella fase asessuata. La gravità dell'infezione, che di norma decorre in forma asintomatica nei soggetti sani (sia in patologia umana che animale), è legata all'evoluzione che può avere in alcune categorie a rischio: le femmine gravide e i soggetti immunocompromessi. In corso di infezione acuta contratta durante la gestazione, infatti, per attraversamento della barriera transplacentare, in alcune specie può verificarsi l'infezione fetale, che

culmina frequentemente nella perdita dello stesso prodotto del concepimento o nella nascita di soggetti con gravi malformazioni genetiche. I danni al feto dipendono dal momento della gestazione in cui si contrae la malattia, che si manifesta con gravi danni al sistema nervoso centrale, alla vista e all'udito (Gerber e Hohlfeld, 2003; Alyson 2011). L'infezione contratta dalla donna durante la gestazione può causare gravi alterazioni al feto, potendo il parassita attraversare la barriera placentare. Gli esseri umani di solito acquisiscono l'infezione attraverso la via alimentare e comunque attraverso l'ingestione di oocisti contaminanti l'ambiente, nonché di cisti tissutali presenti nella carne che ne diventa pericoloso veicolo, se consumata poco cotta (Stacey et al., 2010).

Inoltre, poiché l'infezione non si risolve con l'eliminazione del parassita, che permane nell'ospite allo stato quiescente con la formazione di cisti tissutali (infezione cronica asintomatica), è possibile che, in corso di serie compromissioni delle difese immunitarie dell'ospite, si verifichi una riattivazione con quadri clinici conclamati. Si stima che circa un terzo della popolazione mondiale sia stato infettato da questo patogeno (Tenter et al., 2000) ed è considerata, da più autori, una zoonosi emergente (Aguirre et al., 2019).

T. gondii (dal greco: tòxon, arco e plasma, forma) è un protozoo classificato nel phylum Apicomplexa, classe Sporozoa, sottoclasse Coccidia, ordine Eucoccidiorida, sottordine Eimeriinae, famiglia Sarcocystidae. Osservato per la prima volta nel 1908 da Alfonso Splendore in un coniglio e quindi nel 1909 nel roditore africano *Ctenodactylus gondii* da Nicolle e Manceau; questi ultimi hanno dato una descrizione completa dei merozoiti di *T. gondii* nella milza, nel fegato e nel sangue del piccolo roditore e successivamente, solo nel 1932, se ne comprese la natura zoonotica. L'ecologia di *T. gondii*, con il suo complesso ciclo di vita, è suscettibile ai cambiamenti ambientali principalmente per quanto concerne il tempo di sopravvivenza e l'infettività delle oocisti, nonché il comportamento e la densità di popolazione degli ospiti (Meerburger et Kijlstra., 2009). Tuttavia, i meccanismi con cui questi fattori influenzano la diffusione di *T. gondii* non sono stati completamente compresi (Yang et al., 2016). Le variazioni delle condizioni ambientali, causate dalla rapida urbanizzazione, dal riscaldamento globale e dalla

globalizzazione economica, stanno influenzando la distribuzione e la trasmissione di molte malattie parassitarie, inclusa la toxoplasmosi (Patz et al., 2000).

1.1.1. Aplogruppi e distribuzione geografica

Il ciclo biologico di questo parassita è molto complesso, con l'alternanza di fasi di riproduzione asessuata in ospiti di diverse specie e sessuata nell'intestino dei felini, nonché di diverse modalità di trasmissione, compresa quella alimentare, tanto che lo ha portato ad adattarsi in numerosi organismi e in condizioni ambientali non favorevoli. Ulteriore prova della diffusione di *T. gondii* è il ritrovamento di oocisti nelle acque e negli organismi che popolano i mari, Cetacei compresi (Alekseev et al., 2009; Van Bresseem et al., 2009; Obusan et al., 2019). Ciò sottolinea l'importanza di monitorare questa parassitosi e di valutare i fattori di rischio per l'uomo. Il ritrovamento di numerosi mammiferi marini spiaggiati risultati positivi a *T. gondii* con test sierologici o che riportano lesioni (fino all'encefalite mortale) dalle quali si può risalire a questo protozoo, ben dimostra il livello di contaminazione delle acque dell'intero pianeta (Alekseev et al., 2009). Infatti, la toxoplasmosi non colpisce solo i mammiferi che vivono nei pressi delle coste dove presumibilmente le acque sono inquinate e contaminate dagli scarichi delle fogne, ma sono stati trovati positivi anche cetacei provenienti dagli Oceani che caratteristicamente vivono al largo e nelle profondità marine: come facciano ad infettarsi tutt'ora è oggetto di studio, le ipotesi sono numerose e le domande restano aperte (Van Bresseem et al., 2009). La notevole resistenza della parete delle oocisti consente la diffusione di *T. gondii* attraverso bacini idrici ed ecosistemi e la persistenza a lungo termine in diversi alimenti come molluschi e prodotti freschi (Santoro et al., 2020).

La capacità di adattarsi è strettamente correlata ad un'ampia variabilità genetica del parassita, che ha comportato, inoltre, l'evoluzione di vari sierotipi, differenti tra loro per il grado di virulenza, i *patterns* epidemiologici di incidenza (Chen et al., 2012) e la distribuzione geografica. Mediante studio di polimorfismi genetici, fino ad oggi sono stati individuati 12 aplogruppi, alcuni dei quali non risultano omogenei e comprendono sottogruppi differenti per distribuzione geografica e fenotipo. Inoltre, fenomeni di ricombinazione sessuata tra linee clonali differenti

hanno comportato un'evoluzione del parassita e generato ceppi di *T. gondii* atipici, caratterizzati da polimorfismi genetici unici, che non possono essere ricondotti a nessuno dei 12 gruppi individuati. Essi sono maggiormente virulenti (Montoya et Liesenfeld, 2004), vengono isolati principalmente in Africa ed in Sud America, raramente in Europa, e in genere soltanto in seguito al consumo di alimenti importati (Pomares et al., 2011) o a periodi di residenza fuori dal territorio europeo. In Tabella 1 è riportata la distribuzione geografica degli aplogruppi principali ed il quadro sintomatico di infezione ad essi correlato riscontrabile nell'uomo.

Tabella 1: “Distribuzione geografica degli aplogruppi principali e quadro sintomatico di infezione riscontrabile nell’Uomo (Robert-Gangneux F., Dardé M.L., 2012)”.

Area geografica	Aplogruppo	Quadro sintomatico specifico
Europa	Tipo II (aplogruppo 2), predominante; Tipo III, maggiormente presente nel Sud Europa; Altri genotipi isolati sporadicamente.	Malattia asintomatica associata ai sierogruppi II e III in soggetti non immunocompromessi; Incidenza di retinocoroidite in soggetti immunocompetenti o affetti da toxoplasmosi congenita più bassa rispetto al Sud America.
Nord America	Tipo II (aplogruppo 2); aplogruppo 12; Tipo III (aplogruppo 3).	Malattia asintomatica associata ai sierogruppi II e III in soggetti non immunocompromessi; Dati insufficienti sugli altri aplogruppi.
Sud/Centro America	Elevata diversità genotipica; Presenza di alcuni aplogruppi presenti anche in Africa (aplogruppo 6); Tipo II isolato sporadicamente; Tipo I raro; Presenza di genotipi atipici nella Foresta Amazzonica.	Maggiore incidenza e severità dei casi di retinocoroidite in soggetti immunocompetenti ed affetti da toxoplasmosi congenita; Casi potenzialmente letali, frequenti, associati ai genotipi maggiormente atipici.
Africa	Tipo africano 1, 2, 3 (aplogruppo 6); Tipo III (aplogruppo 3); Tipo II (aplogruppo 2).	Incidenza di casi di retinocoroidite maggiore che in Europa.

Asia	Varietà genotipica inferiore che in Sud America; Tipo III (aplogruppo 3) comunemente diffuso in tutto il Continente.	
-------------	---	--

Circa il 90% dei ceppi di *T. gondii* riscontrati in Europa e nel Nord America possono essere distinti in 3 genotipi (ceppi di tipo I, tipo II e tipo III) che differiscono notevolmente per la loro patogenicità (Sibley et al., 2002).

La maggior parte dei ceppi isolati in Europa appartiene ai sierotipi II e III (Chen et al., 2012), con una predominanza del Tipo II, il più diffuso tra pazienti affetti da AIDS. Il genotipo III viene isolato meno frequentemente rispetto al II, soprattutto nel Sud Europa e principalmente da animali, mentre il genotipo I viene isolato raramente, principalmente in soggetti affetti da toxoplasmosi congenita. Inoltre, una quarta linea clonale è stata rilevata in Nord America (Khan et al., 2011) e l'utilizzo di nuovi marcatori per la caratterizzazione antigenica ha dimostrato la presenza di genotipi atipici, ormai rilevati frequentemente.

1.2 Ciclo vitale del parassita

Nel ciclo vitale di *Toxoplasma gondii* si distinguono due fasi: asessuata o schizogonica, sessuata o sporogonica. La prima può aver luogo in tutti i vertebrati a sangue caldo, la seconda invece si realizza solo nell'intestino del gatto domestico. *Toxoplasma* risulta quindi essere un parassita facoltativamente eteroxeno cioè può albergare in ospiti diversi, esso però riconosce solo nel gatto l'ospite definitivo perché solo in quest'ultimo animale può compiere il ciclo vitale completo. Gli altri vertebrati endotermi devono essere considerati ospiti intermedi perché in essi si realizza unicamente il ciclo asessuato.

- ✓ Ciclo sporogonio: nell'epitelio della mucosa intestinale del gatto ha luogo la maturazione delle forme sessuate (micro e macrogameti). L'accoppiamento dei due gameti porta alla formazione di uno zigote che poi si differenzia in oocisti con doppia parete che cade nel lume intestinale e viene eliminata con le feci. Appena emessa l'oocisti non è infettante né resistente. Acquista queste due proprietà dopo aver soggiornato per 48 ore nell'ambiente esterno ad una temperatura di circa 25°C. La maturazione avverrà in un periodo più lungo se la temperatura è inferiore ai 20°C, fino a che sotto i 4°C essa viene a mancare. L'oocisti matura è estremamente resistente, infatti rimane vitale per oltre un anno in un range di temperatura piuttosto ampio (4°C-35°C), inoltre rimane attiva dopo trattamenti con acidi, alcali e disinfettanti comuni. La maturazione dell'oocisti si compie attraverso un processo di sporulazione in seguito al quale all'interno dell'oocisti si differenziano due sporocisti contenenti ciascuna quattro sporozoiti. Le oocisti mature possono inquinare le acque superficiali, il terreno, la frutta e i vegetali. La presenza di insetti coprofagi può favorire la diffusione dell'oocisti nell'ambiente. L'uomo in genere si infetta per contaminazione delle mani o degli alimenti con le oocisti mature.
- ✓ Ciclo schizogonico: nell'intestino dell'ospite intermedio la parete dell'oocisti viene digerita, si liberano così gli sporozoiti che invadono l'organismo dando origine al ciclo di sviluppo asessuato. La fase iniziale, acuta, dell'infezione è caratterizzata dalla diffusione per via emolinfatica (fase parassitemica di breve durata) di elementi liberi o endocellulari (nelle cellule mononucleate del sangue) che si replicano attivamente e che perciò vengono indicati con il termine di tachizoiti. La sintesi di anticorpi specifici da parte dell'organismo infettato induce i parassiti ad incistarsi nelle cellule della muscolatura striata, del sistema nervoso centrale, della retina dove possono sopravvivere per anni ed anche per tutta la vita. I protozoi situati all'interno delle cisti

vengono indicati come bradizoiti in considerazione del fatto che la loro moltiplicazione avviene lentamente.

Le cisti che caratterizzano la fase cronica dell'infezione presentano una parete spessa di origine in parte cellulare e in parte parassitaria, all'interno della quale si trovano centinaia di elementi neoformati.

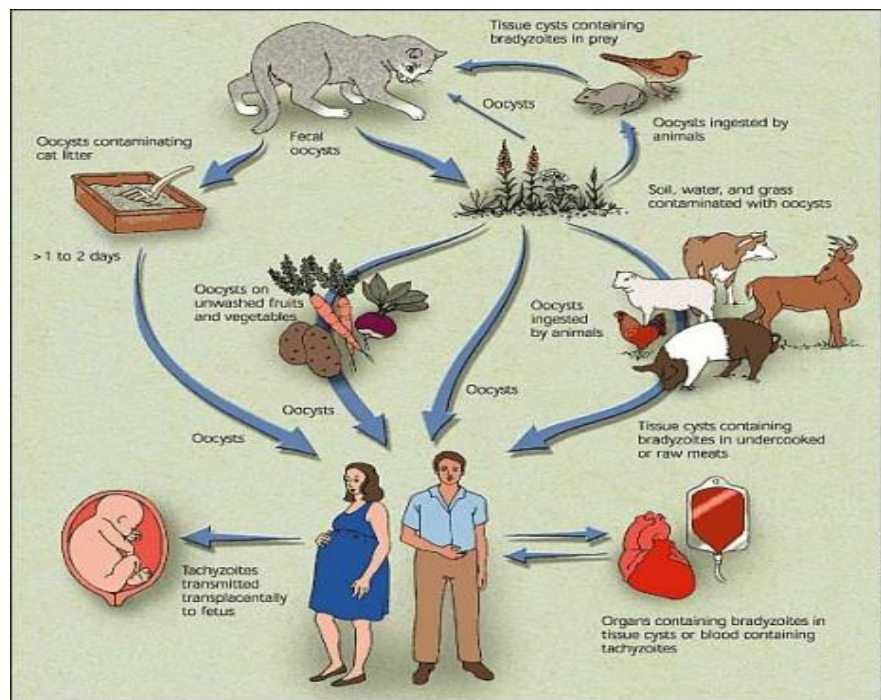
I tachizoiti e i bradizoiti sono forme poco resistenti, nell'ambiente esterno sopravvivono solo per pochissimi giorni, vengono rapidamente inattivati dai disinfettanti e dall'essiccamento, resistono invece all'azione della pepsina e della tripsina. L'uomo può infettarsi ingerendo carni crude o poco cotte provenienti da animali infetti. La parete delle cisti eventualmente presenti nel cibo viene digerita dalla tripsina e i parassiti che si liberano iniziano un nuovo ciclo schizogonico con formazione prima di tachizoiti e poi di bradizoiti.

Il *Toxoplasma* presenta tre stadi infettivi:

1. oocisti, rappresentano le vere forme di disseminazione;
2. bradizoiti, interessati solo nelle forme di trasmissione per ingestione di carni infette;
3. tachizoiti, responsabili della trasmissione verticale madre-feto che ha luogo per via transplacentare.

La trasmissione da specie a specie, oppure anche nell'ambito della stessa specie, avviene frequentemente in particolare tra i Vertebrati carnivori. L'unica possibilità di contagio interumano è invece quella che ha luogo per via materno-fetale (Fig.1).

Figura 1: Rappresentazione del ciclo infettivo del *Toxoplasma gondii*



1.2.1 Eziologia e ciclo biologico di *Toxoplasma gondii*

T. gondii (dal greco: tòxon = arco e plasma = forma) è un protozoo endocellulare obbligato, appartenente al *phylum* degli *Apicomplexa*, sottoclasse dei coccidi classificato nel Phylum Apicomplexa, classe Sporozoa, sottoclasse Coccidia, ordine Eucoccidiorida, sottordine Eimeriinae, famiglia Sarcocystidae. Gli ospiti in cui il protozoo si riproduce sessualmente (ciclo intestinale), ovvero gli ospiti definitivi, sono il gatto domestico e i felidi in generale. Essi sono definiti anche ospiti completi poiché, oltre agli stadi sessuali, albergano anche gli stadi asessuali (ciclo extraintestinale) del protozoo. Ospiti intermedi di *T. gondii* sono, invece, tutti gli altri vertebrati endotermi, in cui il protozoo si riproduce solo asessualmente (ciclo extraintestinale). Il ciclo di *T. gondii*, pertanto, consta di due fasi: una riproduzione asessuata che avviene in diversi tessuti degli ospiti, sia intermedi che definitivi, e una riproduzione sessuale che avviene solo ed esclusivamente nell'intestino degli ospiti definitivi. L'ospite intermedio si infetta ingerendo tachizoiti liberi, bradizoiti contenuti in cisti terminali oppure sporozoiti contenuti in oocisti infettanti. A prescindere dal contagio, gli elementi infettanti oltrepassano la barriera intestinale dando origine al ciclo di sviluppo asessuato.

La fase iniziale, acuta, dell'infezione è caratterizzata dalla diffusione per via emolinfatica dei tachizoiti che si replicano attivamente. Nella cellula ospite, il tachizoita, circondato da un vacuolo parassitoforo, avente funzione protettiva nei confronti dei meccanismi difensivi cellulari, si moltiplica attivamente portando a rottura la cellula. La riproduzione del singolo tachizoita avviene all'interno della cellula, mediante un particolare processo di divisione binaria, detto endoduogenia. Per successive divisioni si ritrovano, all'interno della cellula ospite, alcune decine di tachizoiti; l'insieme, contenuto nella parete della cellula, costituisce la pseudocisti. Con la rottura della parete, i tachizoiti neoformati, invadono altre cellule o vengono inglobati dai macrofagi, e si diffondono in tutto l'organismo, colonizzando prevalentemente il sistema linfatico. Dopo alcuni giorni, mentre il tasso degli anticorpi aumenta rapidamente, i tachizoiti tendono a scomparire e si ritrovano, in numero ridotto, prevalentemente nelle cellule del tessuto muscolare e nervoso. Qui, sempre per endoduogenia, si riproducono più lentamente, formando all'interno della cellula madre, elementi simili ai tachizoiti, ma di dimensioni più piccole, detti bradizoiti. Tali forme crescono e restano all'interno della cellula ospite. L'infezione passa così dalla fase acuta alla fase cronica e si instaura una condizione di resistenza che protegge il soggetto da ulteriori infezioni endogene ed esogene a condizione che i meccanismi di difesa restino efficienti. Nei felini (ospiti completi), *Toxoplasma gondii*, oltre a compiere il ciclo riproduttivo extraintestinale, si moltiplica anche sessualmente a livello intestinale. I protozoi, infatti, ingeriti sotto forma di bradizoiti, tachizoiti o sporozoiti, invadono le cellule epiteliali intestinali (principalmente a livello dell'ileo) degli ospiti completi, dove, dopo una fase di riproduzione asessuata, si sviluppano gli schizonti (contenenti da 4 a 32 merozoiti) che parassitano altre cellule epiteliali e, alcuni di essi, si trasformano in macrogametociti o in microgametociti. Ciascun macrogametocita dà origine ad un macrogamete femminile e ciascun microgametocita porta alla formazione di 12-32 microgameti maschili flagellati. La fecondazione porta alla formazione di uno zigote (riproduzione sessuata) che poi si differenzia in oocisti ellissoidale, a doppia parete, che si ritrova nel lume intestinale per poi essere eliminata con le feci dell'ospite definitivo. Appena emessa, l'oocisti non è infettante. La maturazione dell'oocisti si compie attraverso un processo di sporulazione esogena, in seguito al quale, all'interno di essa, si differenziano due sporocisti contenenti ciascuna quattro sporozoiti. L'oocisti

sporulata rimane vitale per oltre un anno in un range di temperatura abbastanza ampio (4-35°C).

1.3 Modalità di infezione e trasmissione

I felini si infestano con *T. gondii* dopo la nascita, ingerendo sia tessuti infetti di prede, sia oocisti sporulate nell'ambiente (Dubey, 2006). Il gatto svolge un ruolo centrale nella disseminazione di forme infettanti di *T. gondii* in natura, infatti, può eliminare fino a 100 milioni di oocisti nelle due settimane successive alla prima infezione e un numero inferiore in caso di reinfezione. L'infezione degli ospiti intermedi endotermi si verifica dopo l'ingestione di oocisti di *T. gondii*, disseminate nell'ambiente dall'ospite definitivo con la trasmissione oro fecale, il gatto a sua volta si infetta nutrendosi di roditori contenenti cisti nei loro tessuti. Le oocisti sporulate dopo l'eliminazione possono sopravvivere nell'ambiente per mesi o anni, data l'alta resistenza alle varie procedure di inattivazione, specialmente quelle che usano reagenti chimici (Dubey, 2004), le oocisti rimangono vitali in acqua anche dopo l'esposizione ad una soluzione acquosa di acido solforico al 2% per 18 mesi a 4°C; resistono anche a detergenti o soluzioni disinfettanti come l'ipoclorito di sodio. Gli impianti di trattamento dell'acqua potabile che utilizzano la clorazione come unico metodo di disinfezione potrebbe quindi fornire acqua contenente oocisti infettive. Le vie di trasmissione del parassita tra le diverse specie sono: orale, attraverso l'ingestione sia di oocisti sporulate che di cisti tissutali e verticale, dalla madre al feto. L'uomo può infettarsi ingerendo le cisti contenute nella carne cruda, consumando cibi o bevande contaminati con oocisti, oppure tramite l'ingestione accidentale di oocisti presenti nell'ambiente. Un'altra fonte di contaminazione per l'uomo è dovuto alla manipolazione di materiali contaminati da gatti infetti, quali lettiera o terreno sporco di feci, costituendo un potenziale pericolo di infezione per l'uomo, data l'elevata resistenza delle oocisti sporulate nell'ambiente esterno; esse conservano per oltre un anno il potere infettante e, date le ridotte dimensioni, vengono facilmente disperse dagli agenti atmosferici. Un altro mezzo di trasmissione dell'infezione all'uomo è ampiamente documentato dal consumo di carne poco cotta contenente cisti tissutali, o di acqua e vegetali contaminati con oocisti fecali. Tra le diverse specie animali, gli erbivori contraggono l'infezione come conseguenza della

contaminazione dei pascoli, acque di abbeverata o mangimi con oocisti eliminate da felini infetti. Per gli onnivori, ad esempio i suini, la trasmissione può conseguire non solo all'ingestione delle oocisti, ma anche di roditori infetti o di carni di altri ospiti.

1.3.1 Modalità di trasmissione delle oocisti

I fattori di rischio per l'infezione umana e animale comprendono il consumo di carne infetta cruda o poco cotta; ingestione di acqua contaminata, vegetali o qualsiasi cosa contaminata da oocisti sparse con le feci, compresa l'ingestione accidentale di terreno contaminato; trasfusioni di sangue o trapianti di organi prelevati a pazienti infetti e non controllati prima della donazione; trasmissione intrauterina o transplacentare; assunzione di latte non pastorizzato infetto (Aguirre et al., 2019).

In passato, le infezioni acquisite da oocisti sono state considerate meno importanti delle infezioni di origine alimentare, sebbene siano considerate clinicamente più gravi negli ospiti intermedi rispetto a quelle correlate all'ingestione di cisti tissutali (Hill & Dubey, 2002). Nonostante il consumo di carne cruda o poco cotta contaminata da cisti di *T. gondii* sia ancora considerata la fonte più probabile di infezione, negli ultimi 40 anni sono stati segnalati focolai di toxoplasmosi associati all'esposizione ad acqua contaminata da oocisti a Panama (Benenson et al., 1982), nella Columbia Britannica (Bowie et al., 1997), in Brasile (De Moura et al., 2006) e in India (Balasundaram et al., 2010); in quest'ultimo paese a seguito di due episodi derivanti dall'ingestione di acqua potabile. Inoltre, la maggior parte (78%) dei casi di toxoplasmosi congenita rilevata da quattro epidemie in Nord America, ha avuto origine dall'esposizione ad oocisti, sebbene solo il 49% di questi casi sia stato confermato da origine alimentare (Aguirre et al., 2019). I concreti miglioramenti delle misure di biosicurezza in zootecnia e l'applicazione delle buone pratiche di produzione industriale della carne hanno portato alla riduzione del rischio di trasmissione dell'infezione da ingestione di carni e spostato l'attenzione epidemiologica sul ruolo svolto dalle oocisti di *T. gondii* disperse nell'ambiente. L'esposizione ambientale alle oocisti di *T. gondii* (Conrad et al., 2005) è riconosciuta come una via importante per l'infezione umana, come dimostrato dal costante livello di prevalenza di toxoplasmosi nella popolazione umana negli Stati Uniti (Jones et al., 2003), nonostante la verifica costante dello stato di salute degli animali e

le misure di biosicurezza applicate negli allevamenti, con conseguente riduzione della prevalenza dell'infezione nei suini, considerati all'unanimità come la principale fonte di infezione di origine alimentare per l'uomo. Inoltre, studi osservazionali a lungo termine condotti sulla toxoplasmosi congenita trasmessa a donne in gravidanza infette, hanno mostrato che l'infezione non poteva sempre essere collegata a tipici fattori di rischio, come il consumo di carne contaminata da cisti, coinvolta nella toxoplasmosi e che doveva essere necessario ricercare anche altre fonti. Infine, lo sviluppo di metodi analitici più sensibili per il rilevamento di oocisti nei campioni di suolo e di acqua ha aggiunto ulteriori prove della diffusione di oocisti rilasciate nell'ambiente il cui ruolo non è più visto come secondario rispetto alla trasmissione basata su cisti tissutali.

1.3.2 Inquinamento ambientale e trasmissione

L'inquinamento ambientale da oocisti di *T. gondii* riguarda la contaminazione terrestre che può diffondersi, in determinate condizioni, anche alle acque dolci e marine. L'infezione da *T. gondii* viene frequentemente diagnosticata in diversi mammiferi marini (Fayer et al., 2004) che sono in cima alla catena alimentare acquatica. Studi di campo suggeriscono che ben otto diverse famiglie di mammiferi marini sono suscettibili all'infezione da *T. gondii* (Dabritz et al., 2007); tra questi anche la lontra del mare meridionale in pericolo di estinzione (*Enhydra lutris nereis*) e per la quale la toxoplasmosi è responsabile di alta mortalità e lenta velocità di recupero della popolazione (Conrad et al., 2005). L'inquinamento antropogenico della costa da fognature o a seguito del deflusso dalla superficie terrestre di oocisti contaminati di *T. gondii*, rilasciate dai gatti, a causa delle piogge ed inondazioni, sono i fattori chiave nell'epidemiologia della toxoplasmosi dell'ambiente acquatico, compreso quello marino. A seguito di infezione, un singolo gatto può liberare milioni di oocisti in una sola settimana. Anche il comportamento di defecazione dei gatti, come la sepoltura di feci in zone ombreggiate, allunga la sopravvivenza delle oocisti che possono persistere nell'ambiente oltre un anno. Gli eventi naturali legati alle alluvioni potrebbero anche favorire la trasmissione di agenti patogeni terrestri quale *T. gondii*, specie in prossimità di estuari. Deve essere preso ulteriormente in considerazione anche il contatto con acque reflue contaminate da oocisti scaricate dalle navi (Di Guardo et al., 2010). Recentemente sono state ipotizzate nuove vie di trasmissione delle oocisti dall'ambiente acquatico che

coinvolgono una complessa interazione di bioparticelle sospese, biofilm, piccoli invertebrati e gasteropodi, mentre i mammiferi possono anche infettarsi vicino alla costa prima di arenarsi o attraverso il consumo di pesci o cozze che veicolano il parassita. Nel 1979 è stato descritto il primo focolaio di *T. gondii* associato all'esposizione all'acqua nella giungla di Panama (Benenson et al., 1982). Nel 1995 è stato segnalato un consistente focolaio nella British Columbia, in Canada, con 100 casi di infezione acuta da toxoplasmosi umana (Bowie et al., 1997). In Canada nel 1995, un sistema idrico comunale che utilizzava le acque superficiali non filtrate e clorate è stato presumibilmente contaminato da feci di puma e/o feci di gatto domestico, causando l'infezione in ben cento soggetti umani (Aramini et al., 1999). Nel 1999, l'acqua potabile è stata anche segnalata quale veicolo di infezione tra individui Jains, una comunità dell'India di rigorosi vegetariani (Hall et al., 1999). La trasmissione della toxoplasmosi attraverso l'acqua è stata segnalata anche in Brasile, sia nei modelli di trasmissione epidemica che endemica. Infatti, il più grande focolaio, con 290 casi umani, è stato segnalato in Brasile e ha coinvolto un serbatoio d'acqua non filtrata (Keenihan et al., 2002). Nelle comunità brasiliane, dove è prevalente la toxoplasmosi endemica, è stata riscontrata un'alta prevalenza di *T. gondii* legata al consumo di acqua non filtrata (Bahia-Oliveira et al., 2003). Allo stesso modo, un focolaio di toxoplasmosi in Brasile nel 2001-2002 è stato associato al consumo di acqua contaminata da un serbatoio municipale, che era vulnerabile alle infiltrazioni a causa del suo stato di gestione precario. Si è pensato che questo focolaio fosse responsabile dell'infezione di 155 persone che utilizzavano un serbatoio sotterraneo che trasportava acqua non filtrata (de Moura et al., 2006). Mentre la maggior parte delle epidemie da *T. gondii* sono state descritte da Paesi a basso reddito, le indagini epidemiologiche hanno anche collegato l'acqua con l'esposizione a *T. gondii* nelle persone che vivono in Paesi ad alto reddito. Negli Stati Uniti, i dati del sondaggio *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) (1999–2004; 2009–2010) hanno dimostrato che tra i partecipanti nati negli Stati Uniti, le persone che bevono acqua di pozzo e acqua di rubinetto fornita da società pubbliche e private senza dispositivi di trattamento dell'acqua a casa, hanno significativamente più probabilità di essere sieropositivi per *T. gondii* rispetto ai partecipanti che hanno utilizzato dispositivi di trattamento domiciliare (Krueger et al., 2014).

Un altro studio effettuato nelle acque reflue e superficiali nell'altopiano del Qinghai-Tibet, in Cina, ha dimostrato la presenza di *T. gondii* in acque reflue e campioni di acqua ambientale raccolti dal territorio della Repubblica popolare cinese utilizzando strumenti molecolari sensibili. Questo studio suggerisce, tuttavia, un legame tra l'esposizione ambientale degli animali, gli impianti di lavorazione della carne e gli impianti di trattamento delle acque reflue (Lass et al., 2022).

1.4 Aspetti clinici nell'uomo

La toxoplasmosi è una malattia diffusa in tutto il mondo anche se con notevole variabilità d'incidenza dimostrata dalle diverse percentuali di sieropositività riportate in letteratura. Si distinguono due tipi di infezione toxoplasmica: acquisita, che viene contratta dopo la nascita, e congenita, che viene trasmessa dalla madre al prodotto del concepimento.

La toxoplasmosi acquisita decorre in una notevole percentuale dei casi in forma asintomatica, svelata solo dopo la positività delle indagini sierologiche. Le forme a sintomatologia lieve o inapparente sembra si debbano attribuire ad infezioni da sporozoit. Nei casi di toxoplasmosi sintomatologica, si distinguono varie forme con diversa evoluzione e gravità: linfo-ghiandolare, pseudo-rickettsiosica, oftalmica, cerebro-spinale.

Sono state descritte anche rare forme con interessamento cardiaco (miocardite, pericarditi), polmonare, con quadri simili alla polmonite atipica primaria, epatica, con epatiti, e muscolare, con polimiositi. La forma linfoghiandolare è la più frequente e può decorrere solo con una modesta linfadenopatia, che spesso simula la mononucleosi infettiva. L'evoluzione è benigna, anche se talvolta a lenta risoluzione; è probabile che questa forma sia dovuta ad infezioni da bradizoiti.

La forma pseudorickettsiosica è generalizzata, con interessamento poliviscerale ed esantema maculo-papuloso; fortunatamente è rarissima, tuttavia è sempre molto grave e spesso mortale. Nella forma oculare spesso i titoli anticorpali antitoxoplasma risultano bassi, nei limiti della norma, forse in conseguenza della particolare localizzazione del parassita.

La toxoplasmosi congenita è trasmessa dalla madre al feto per via transplacentare durante la fase parassitemica iniziale. L'infezione intrauterina da *Toxoplasma gondii* può causare morte fetale, fetopatia manifesta o tardiva ma anche nascita di un bambino sano. Nel caso che la fetopatia si manifesti alla nascita, si può avere sia una gravissima polivisceropatia incompatibile con la vita, sia forme caratterizzate da lesioni oculari (macroftalmia, corioretinite, cataratta), sintomi neurologici quali paralisi, convulsioni, idrocefalo, calcificazioni endocraniche. Le forme inapparenti alla nascita possono comparire a distanza di mesi o di anni, in genere con disturbi oculari o nervosi. Le probabilità che si verifichi un'infezione fetale aumentano con il progredire della gravidanza cioè sono minori nel primo trimestre, maggiori nel terzo. Per fortuna parallelamente diminuisce la gravità dell'infezione fetale, infatti nei bambini contagiati alla fine della gravidanza prevalgono le forme di infezione latente. Le madri che hanno già anticorpi anti-toxoplasma nel siero non corrono il rischio di infettare il feto perché, sia in corso di infezione primaria, sia in corso di reinfezione non è più possibile che esse abbiano una nuova fase parassitemica o almeno non di durata ed intensità tale da consentire la trasmissione diaplacentare dell'infezione. Le donne con toxoplasmosi anche recente ma comunque anteriore al concepimento non trasmettono l'infezione al figlio. Risultano pericolose solo le infezioni primarie contratte durante la gravidanza, inoltre, è dimostrato che una donna può al massimo generare un solo figlio affetto da toxoplasmosi congenita, cioè quello partorito al termine della gravidanza durante la quale ha contratto la malattia, mentre le successive gravidanze saranno, almeno da questo punto di vista, perfettamente normali (dogma di Sabin).

1.4.1 Patogenesi nel feto

La gravità delle lesioni fetali dipende principalmente dall'età del feto stesso. Nel 10% dei casi umani, la toxoplasmosi congenita si manifesta con aborto, natimortalità o lesioni al sistema nervoso centrale del bambino. L'incidenza di toxoplasmosi congenita è più elevata quando l'infezione è contratta nel primo trimestre di gravidanza. I neonati che sopravvivono possono essere affetti da retinocoroidite e necrosi cerebrale e possono, altresì, presentare epato-splenomegalia, insufficienza epatica, convulsioni e idrocefalo.

1.4.2 Aspetti clinici negli animali

Negli ovini e nei caprini, l'infezione contratta durante le fasi iniziali della gestazione è responsabile di morte e riassorbimento embrionale, mentre l'infezione di feti di 70-90 giorni provoca aborto o mummificazione. Alcuni feti sopravvivono all'infezione, ma muoiono nell'imminenza del parto o nell'immediato post-partum e nascono spesso prematuri, disvitali e deboli. Invece, l'infezione contratta negli ultimi 30 giorni di gravidanza generalmente si risolve in una infezione sub-clinica degli agnelli. La toxoplasmosi clinica è principalmente conseguente solo all'infezione transplacentare, mentre le madri non manifestano ulteriori sintomi di malattia. Tuttavia, occasionali segni clinici sono stati talora documentati in capre, maiali e polli adulti, benché questa evenienza sia molto rara. Casi di malattia conclamata sono stati altresì segnalati in cani, gatti e marsupiali australiani.

Al contrario non sono stati documentati casi di toxoplasmosi clinica nei bovini. In ogni caso, le infezioni concomitanti possono rendere l'ospite più sensibile alla toxoplasmosi. Nella specie canina, in particolare, la toxoplasmosi clinica è spesso associata al cimurro, all'ehrlichiosi ed al linfosarcoma. Infine, nonostante l'attiva moltiplicazione del parassita nell'intestino felino, nel gatto non sono mai stati registrati quadri enterici.

1.4.3 Quadri anatomopatologici

Le lesioni da *T. gondii* sono riconducibili alla migrazione del parassita attraverso gli organi e i tessuti. L'unica lesione predominante e aspecifica è la necrosi, che si riscontra in molti organi, soprattutto a livello di encefalo, polmoni, fegato e dei linfonodi mesenterici.

Negli aborti da toxoplasmosi, che interessano i piccoli ruminanti, si rinvengono foci necrotici grigio-biancastri, di 1-3 mm di diametro, a livello dei cotiledoni placentari. Negli animali infetti si possono, inoltre, osservare granulomi multipli nei polmoni e nel fegato, mentre milza e reni possono presentare aree di necrosi.

Sempre nei piccoli ruminanti si possono osservare idrotorace, ascite ed ulcere intestinali; il sistema nervoso centrale può essere interessato da emorragie, edema, dilatazione ventricolare e aree di flogosi.

1.4.4 Meccanismi di risposta immunitaria

L'infezione acuta induce, nei soggetti in buone condizioni di salute, una efficace risposta immunitaria sia umorale che cellulare. A livello intestinale i tachizoiti evocano la produzione di anticorpi di tipo IgA che modulano i processi di difesa locale. Se il parassita riesce ad eludere le difese della mucosa intestinale, compaiono rapidamente in circolo anticorpi di classe IgM e IgG, con attività parassitocida. I principali meccanismi di difesa sono però quelli dell'immunità cellulo-mediata, che si realizza con l'attivazione di macrofagi in grado di distruggere il parassita.

Entro sette giorni circa dall'infezione, le difese immunitarie annullano completamente la circolazione dei tachizoiti, mentre persistono in circolo gli anticorpi specifici anti-*T. gondii*. Tuttavia, negli ospiti immunocompromessi, in cui le difese immunitarie non hanno piena funzionalità, a distanza anche di anni o di decenni dall'infezione acuta, i bradizoiti incistati possono trasformarsi di nuovo in tachizoiti, invadere i tessuti, causare fenomeni necrotici locali (principalmente nell'encefalo, nel polmone e nel miocardio) e disseminarsi per via ematica.

Le riattivazioni dell'infezione sono più frequenti in particolare nei pazienti affetti da AIDS; un'altra popolazione a rischio è costituita dai pazienti trattati con farmaci

immunodepressivi per malattie linfoproliferative o perché sottoposti a trapianti d'organo. Se il paziente immunocompromesso è negativo per *T. gondii*, può anche verificarsi un'infezione primaria esogena, che non è rara come conseguenza di trasfusione sanguigna o di trapianto cardiaco (più raramente renale), qualora questo paziente sieronegativo venga trapiantato con un organo di un donatore sieropositivo contenente le cisti. Anche in questo caso, la compromissione della risposta immunitaria comporta che l'infezione non rimanga contenuta, ma abbia un'evoluzione grave con forme neurologiche o generalizzate.

Riguardo alla trasmissione materno-fetale, il rischio è quasi nullo se l'infezione è stata acquisita almeno 6 mesi prima del concepimento. All'opposto, quando l'infezione materna viene contratta in corso di gravidanza, circa un terzo dei neonati risultano infettati. Nel I trimestre il rischio è più basso (15% circa); nel III trimestre la prevalenza di trasmissione è maggiore (65%).

Non è stata documentata, invece l'infezione attraverso il latte materno, sebbene, dal punto di vista teorico, la comparsa di protozoi nel latte potrebbe verificarsi se l'infezione materna venisse contratta nell'ultima settimana di gestazione, ovvero in un periodo in cui il passaggio transplacentare dei toxoplasmi raggiunge quasi il 100%.

1.5 Misure di prevenzione della Toxoplasmosi umana

Il pericolo principale di contrarre la toxoplasmosi umana non è rappresentato dal contatto con i felini, bensì da errate abitudini alimentari ed insufficiente igiene casalinga. Tuttavia, esistono una serie di corrette abitudini alimentari e buone pratiche domestiche che, se messe in atto, riducono notevolmente il rischio di infezione.

1.5.1 Decalogo per la prevenzione della Toxoplasmosi

- 1) Cuocere molto bene la carne, in modo da raggiungere una temperatura interna di circa 70°C, oppure congelarla a -12°C prima del consumo. Evitare comunque di assaggiare la carne mentre si prepara.
- 2) Evitare il consumo in gravidanza di insaccati freschi poco stagionati (meno di un mese) e di prodotti carnei crudi o semicrudi come: carpaccio, carne secca, tartara etc.

- 3) Lavare bene le mani, gli attrezzi da cucina e le superfici che siano venute a contatto con carni crude.
- 4) Lavare accuratamente sotto acqua corrente le insalate e tutti gli ortaggi da consumare crudi, la frutta fresca e le verdure, comprese quelle confezionate prelavate.
- 5) Non utilizzare carne cruda nella dieta degli animali domestici, specialmente dei gatti, bensì mangimi preparati o prodotti cotti.
- 6) Lavarsi le mani dopo ogni contatto con gli animali.
- 7) Curare l'igiene della lettiera contenuta nella vaschetta del gatto, cambiandola giornalmente e toccandola solo con i guanti.
- 8) Indossare i guanti per toccare la terra di orti e giardini che potrebbero essere contaminata da feci di gatto.
- 9) Non bere latte crudo non pastorizzato specialmente di capra.
- 10) Non bere acqua di fonte non controllata.

1.6 Diagnosi dell'infezione

La diagnosi di *T. gondii* si avvale di tecniche sierologiche, biomolecolari, biologiche, istologiche e parassitologiche. Sono attualmente disponibili per la ricerca di anticorpi anti-*T. gondii*, diverse metodiche sierologiche, per tutte le specie interessate, al contrario, le prove dirette di isolamento in vivo rappresentano indagini complesse ed alla portata dei soli laboratori specializzati. In campo umano, la tecnica più attendibile appare ancora la classica reazione tintoriale di Sabin e Feldman (Dye test), cui da molti anni ormai sono stati affiancati metodi di esecuzione più agevole quali l'immunofluorescenza indiretta (IFI), il test immunoenzimatico (ELISA) e il test di immunoassorbimento-agglutinazione. Gli anticorpi rilevabili sono essenzialmente quelli IgG. Nella toxoplasmosi acuta, sia nelle forme sintomatiche (tipicamente nella linfadenite), sia in quelle asintomatiche, il titolo diviene positivo (>10) 2-3 settimane dopo l'infezione, raggiunge il livello massimo (> 1:100 fino a 1:16000 e più) in 6-8 settimane e quindi decresce progressivamente nello spazio di qualche mese, rimanendo

positivo a bassi livelli (in genere 1:50-1:250) per tutta la vita. Per una diagnosi certa di toxoplasmosi acuta e quindi recente, è necessario dimostrare l'avvenuto incremento del titolo anticorpale del paziente nel corso di successivi prelievi; una sola determinazione, se pur ad alto titolo, può fornire risultati di probabilità ma non di certezza. La diagnosi di infezione congenita del feto va perseguita quando le indagini sierologiche effettuate su una donna gravida documentano un'infezione recente. L'identificazione del DNA di *T. gondii* nel liquido amniotico mediante PCR può essere effettuata a partire dalla 18^o settimana di gestazione e viene preferita al prelievo di sangue fetale. In medicina veterinaria, i test di maggiore impiego sono l'IFI e l'ELISA. Anche in questo caso, la presenza di anticorpi anti-*T. gondii* in un singolo campione di siero rivela un'infezione, ma non lo stato di malattia; pertanto, è preferibile prelevare due campioni dallo stesso animale, a distanza di due-quattro settimane: l'avvenuta sierconversione o un incremento quadruplo del titolo anticorpale sono indicativi di infezione acuta. Tuttavia, in alcuni animali un titolo anticorpale elevato può persistere per alcuni mesi dopo l'infezione e, in ogni caso, non è necessariamente associato alla comparsa di manifestazioni cliniche. La presenza di anticorpi nei fluidi fetali è riconducibile ad infezione congenita, dal momento che gli anticorpi materni non sono in grado di attraversare la barriera placentare. *T. gondii* può essere isolato da: tessuti infetti, escreti e fluidi corporei, prelevati da animali in vita o *post-mortem* e inoculati in animali da laboratorio o in colture di tessuto. Questo approccio permette non soltanto l'isolamento del parassita, ma anche lo studio delle caratteristiche morfologiche e la caratterizzazione genetica del microorganismo attraverso l'impiego di tecniche biomolecolari.

1.6.1 Metodi sierologici

I metodi sierologici possono essere distinti in due gruppi. I metodi che evidenziano anticorpi diretti verso antigeni di membrana del parassita sono: Dye test o test tintoriale di Sabin-Feldman, agglutinazione diretta di Fulton, immunofluorescenza, fissazione del complemento, emoagglutinazione indiretta, metodi immunoenzimatici. I metodi che evidenziano anticorpi diretti verso antigeni interni del parassita sono: fissazione del complemento, emoagglutinazione indiretta, metodi immunoenzimatici.

1.6.2 Test tintoriale di Sabin-Feldman o dye test

Questo test è basato sulla capacità posseduta dagli anticorpi diretti verso la membrana parassitaria di inibire la colorazione con blu di metilene in soluzione alcalina dei parassiti vivi. I toxoplasmi incubati con siero contenente anticorpi specifici appaiono scolorati o nettamente fusiformi, viceversa i toxoplasmi che non hanno reagito con anticorpi e quindi ancora vitali appaiono colorati in blu e rotondeggianti. Le alterazioni della membrana parassitaria che portano alla perdita dell'affinità tintoriale per il blu di metilene si verificano solo in presenza di un fattore sierico termolabile, che è presente solo in alcuni sieri freschi. Non tutti i sieri sono adatti a questo scopo, alcuni infatti possono contenere anticorpi antitoxoplasma e quindi non possono essere impiegati nella reazione. Il dye test può essere eseguito dopo un mese dal contagio facendo rilevare valori elevati di anticorpi, quindi dopo una fase di *plateau*, se ne potrà osservare il lento decrescere negli anni, pur ottenendo sempre esiti positivi, sebbene con bassi titoli, per tutta la vita del paziente.

1.6.3 Reazione di immunofluorescenza

La reazione di immunofluorescenza viene eseguita con la metodica indiretta: gli eventuali anticorpi presenti nel siero in esame si legano alla superficie dei toxoplasmi fissati sul vetrino, la successiva aggiunta di un siero fluoresceinato anti-immunoglobuline umane consente di rilevare, osservando il preparato al microscopio a fluorescenza, i parassiti che hanno reagito con gli anticorpi specifici. Il test presenta una buona sensibilità e specificità tanto che viene considerato l'unico valido sostituto del dye test.

1.6.4 Test di Remington

Con la variante proposta da Remington è possibile stabilire la classe immunoglobulinica alla quale appartengono gli anticorpi anti-toxoplasma. Nel test di Remington vengono impiegate immunoglobuline fluoresceinate, così da evidenziare solo anticorpi della classe IgM, cioè correlati alla fase dell'infezione. La prova è utile negli stadi più precoci della malattia quando ancora gli altri test sierologici non evidenziano positività significative e nelle forme di toxoplasmosi congenita per distinguere gli anticorpi di origine materna (IgG) da quelli di sintesi fetale (IgM). Questo test presenta inconvenienti, sia nella difficoltà di reperire coniugati anti-IgM che nella lettura, perché la fluorescenza con questo tipo di coniugato risulta poco intensa. L'interpretazione del risultato deve essere fatta con cautela tenendo presente che il comportamento delle IgM nell'infezione toxoplasmica è estremamente variabile potendo queste mancare nella fase acuta oppure essere presenti, ma a titoli non significativi o mantenersi in circolo nella fase cronica. Si possono avere risultati falsamente positivi fino al 30% e falsamente negativi fino al 10%. Questo tipo di test non deve essere interpretato a priori come indice sicuro di malattia recente, qualora sia associata ad un dye test o a un test di immunofluorescenza positivo a titolo elevato, esso rappresenta un dato in più a favore del carattere recente dell'infezione, oppure se è associato ad un dye test o a ad un test di immunofluorescenza debolmente positivo, può indicare che la sintesi anticorpale è ancora nella fase iniziale e quindi che si possa essere in presenza di un'infezione acuta.

1.6.5 Fissazione del complemento

La reazione di fissazione del complemento può essere eseguita con due diversi tipi di antigeni e quindi può assumere un diverso significato diagnostico. L'antigene pesante o insolubile, costituito dal lisato totale del parassita, mette in evidenza anticorpi diretti verso antigeni di membrana. I risultati ottenuti impiegando antigene pesante sono paragonabili a quelli ottenuti con il dye test o con l'immunofluorescenza, ma a tutt'oggi questo tipo di reazione può essere utilizzato solo da laboratori che si preparano da sé il reattivo perché non è presente in commercio. L'antigene leggero o solubile, costituito da un lisato di toxoplasmi sottoposto a ultracentrifugazione, mette in evidenza anticorpi che compaiono più tardivamente e scompaiono prima di quelli evidenziati dal dye test

o dall'immunofluorescenza. L'impiego di questo antigene consente una differenziazione tra forme acute e forme croniche poiché in genere si negativizza entro un anno dal contagio. Le positività rilevabili con questo antigene sono sempre piuttosto basse, comunque inferiori a quelle ottenute con le altre metodiche. Quindi è opportuno controllare sempre la specificità dei risultati positivi saggiando il siero oltre che con l'antigene, anche con un estratto del substrato su cui il parassita è stato coltivato. Questo test, in relazione alla cinetica degli anticorpi evidenziati, non viene usato da solo nella routine di laboratorio, bensì accoppiato al dye test o all'immunofluorescenza, permettendo così anche una più facile interpretazione dei risultati ottenuti.

1.6.6 Reazione di agglutinazione diretta (Test di Fulton)

La reazione di agglutinazione diretta impiega come antigene una sospensione di toxoplasmi formolati che agglutina in presenza di anticorpi specifici.

Nonostante venga considerata particolarmente idonea a svelare anticorpi IgM, non sempre questa reazione risulta sufficientemente sensibile e specifica.

1.6.7 Reazione di emoagglutinazione condizionata

Nella reazione di emoagglutinazione condizionata l'antigene è costituito da una sospensione di emazie umane di gruppo O oppure di montone sensibilizzate con un lisato di toxoplasmi. In genere si ottengono risultati direttamente correlati con quelli del dye test o dell'immunofluorescenza. Tuttavia, poiché il test si positivizza più tardivamente del dye test (o immunofluorescenza) le discordanze vengono rilevate proprio nei casi più importanti cioè nella fase acuta della toxoplasmosi acquisita o nella toxoplasmosi connatale.

1.6.8 Metodo immunoenzimatico

Il metodo immunoenzimatico è stato applicato solo da poco tempo alla diagnostica sierologica della toxoplasmosi, ma già sembra riunire in sé molti dei vantaggi dei metodi illustrati precedentemente. I risultati sono comparabili a quelli dell'immunofluorescenza e del dye test pur trattandosi di un metodo semplice di esecuzione quasi pari dell'immunoagglutinazione.

1.6.9 Metodo ELISA per la ricerca di anticorpi anti-*Toxoplasma gondii* presenti nelle specie ovina, caprina e suina

La tecnica immunoenzimatica ELISA utilizza coniugati per poter visualizzare una determinata reazione antigene-anticorpo. Si basa sull'utilizzo di anticorpi marcati con un enzima (generalmente la perossidasi), in modo che i coniugati risultanti abbiano una attività sia immunologica sia enzimatica. Avendo uno dei componenti (antigene o anticorpo) adeso alla piastra, la reazione antigene-anticorpo è immobilizzata e pertanto potrà facilmente essere evidenziata con l'addizione di un substrato che, reagendo con l'enzima, produrrà una colorazione visibile o quantificabile con uno spettrofotometro. L'interpretazione corretta dell'esito del test può essere effettuata tenendo conto della cinetica della risposta anticorpale, come si evince dalla Figura 2.

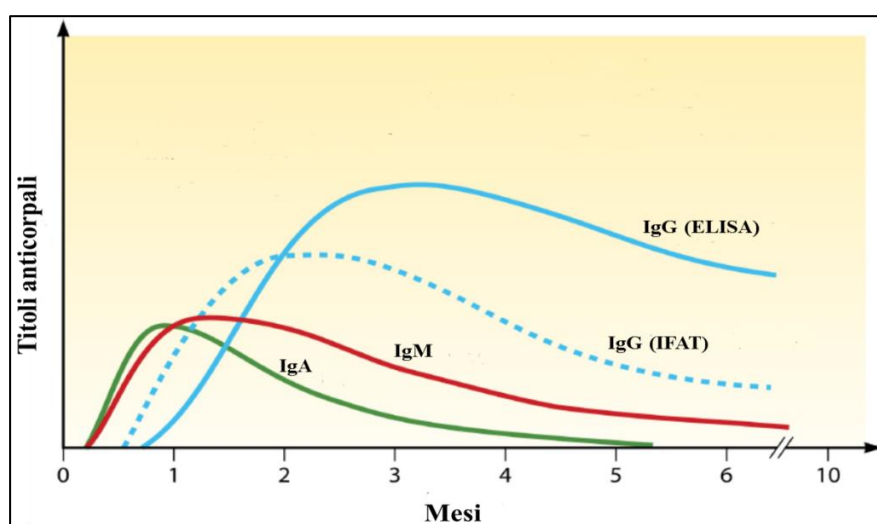


Figura 2: Schematizzazione della cinetica di risposta anticorpale (Robert-Gagneux *et al.*, 2012).

Nelle prime settimane dell'infezione vengono prodotte le IgA ed IgM, che raggiungono un plateau nel primo mese post-infezione, poi tendono a diminuire in maniera graduale, dai sette mesi post-infezione il titolo anticorpale nel 25% dei casi non è misurabile, e dopo 1 anno nel rimanente 75%. (Robert-Gagneux et al., 2012), mentre le IgG raggiungono un plateau entro 2-3 mesi post infezione e poi diminuiscono gradualmente, permanendo per tutta la vita a livelli variabili da soggetto a soggetto.

1.6.10 Interpretazione delle indagini sierologiche

Le reazioni sierologiche per la diagnosi di toxoplasmosi possono essere di difficile interpretazione. Un risultato positivo non ha valore diagnostico poiché anche nella popolazione sana si ritrovano anticorpi antitoxoplasma (40-80%), a titoli variabili e talvolta anche molto elevati. Non esiste un titolo critico che da solo possa far formulare una diagnosi quindi non è sufficiente eseguire un'unica titolazione sierologica ma è necessario ripetere i test per evidenziare un'eventuale siero conversione significativa. Spesso queste indagini vengono richieste quando la produzione di anticorpi ha raggiunto i livelli massimi pertanto nella pratica è difficile mettere in evidenza la fase ascendente della curva anticorpale, con più probabilità invece può essere evidenziata la parte discendente che però ha in genere un andamento molto lento nel tempo e quindi risulta scarsamente utilizzabile ai fini diagnostici. I titoli bassi e costanti nel tempo depongono per un'infezione pregressa. Per l'interpretazione dei titoli elevati può essere utile associare due o più metodiche che evidenziano anticorpi con diverso comportamento nel tempo: l'analisi combinata dei risultati potrà rivelarsi utile al clinico per formulare la diagnosi. Figura 3.

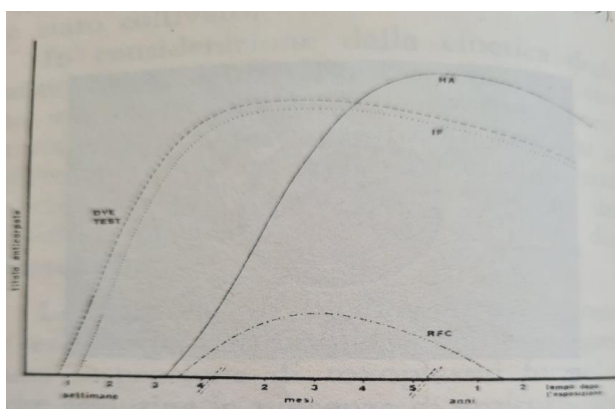


Figura 3: Andamento nel tempo delle varie reazioni sierologiche nell'infezione toxoplasmica

1.6.11 Metodo immunoistochimico per la diagnosi di *Toxoplasma gondii* da organi e tessuti animali

L'esame diagnostico immunoistochimico viene applicato su campioni tissutali di capi con sospetta infezione. Si basa sull'utilizzo di un anticorpo policlonale specifico per l'antigene oggetto di ricerca e quindi sull'eventuale rilevazione della formazione dell'immunocomplesso mediante un sistema di amplificazione del segnale basato sull'utilizzo di un polimero "etichettato" con HRP, a sua volta coniugato con un anticorpo secondario, e un sistema di rilevazione del segnale (reazione cromogena con DAB). Per eseguire la tecnica immunoistochimica si fa uso di vetrini silanizzati, ovvero vetrini opportunamente trattati con un collante polilisinato in grado di trattenere la sezione durante le varie tappe del protocollo.

1.6.12 Tecniche di biologia molecolare, *Real-time PCR* e *Nested PCR*

I metodi di biologia molecolare valutano la presenza di DNA specifico del parassita in matrici biologiche di interesse veterinario (es. encefalo, muscolo scheletrico, muscolo cardiaco, bulbo oculare, sangue intero, superficie cutanea, placenta, aborti, feci) o da campioni di alimenti vegetali, acqua, latte mammifero, specie vettori passive (rettili, gasteropodi terrestri, insetti, pesci, molluschi bivalvi) oppure da presunti ceppi di *T. gondii* isolati su colture cellulari, tramite l'utilizzo di *primer* specifici che permettano di amplificare regioni del DNA identificative di *T. gondii*. Le due metodiche

citare si basano su procedure differenti e presentano geni o regioni *target* differenti. Nel caso della *Nested PCR* la regione *target* è il gene B1, presente nel genoma di *T. gondii* in 35 copie. Si utilizza una prima coppia di *primer* che permette di amplificare una regione lunga 194 bp, mentre la seconda coppia di *primer*, più interna, viene utilizzata sul prodotto della prima amplificazione e genera frammenti lunghi 97 bp. L'avvenuta amplificazione viene verificata mediante corsa elettroforetica e identificazione delle bande corrispondenti alle dimensioni attese per il frammento di interesse. Nel caso della *Real Time PCR* si effettua un'unica reazione di amplificazione, diretta su una regione *target* ripetitiva di 529 bp, presente in circa 200-300 copie lungo il genoma di *T. gondii*. In questo caso l'amplificazione della regione di interesse viene verificata in tempo reale, grazie all'utilizzo di una sonda *Taqman*, un oligonucleotide complementare ad una regione interna della sequenza bersaglio e marcata ad una estremità con un fluorocromo ad alta energia o *Reporter* e all'altra estremità con il *Quencer* (BHQ), un fluorocromo a bassa energia che spegne la fluorescenza del *Reporter*. Se *Reporter* e *Quencer* si trovano vicini, il secondo "spegne" l'effetto del primo assorbendone i fotoni. Via via che il frammento di DNA *target* viene amplificato, la sonda si appaia alla regione specifica ed il suo *Quencer* viene rilasciato, rendendo visibile la fluorescenza emessa dal *Reporter*. All'aumentare del numero di copie di sequenza *target* aumenta l'intensità della fluorescenza emessa dal *Reporter*, che viene rilevata e rappresentata graficamente da una curva ad andamento semilogaritmico. Il graduale esaurimento dei reagenti contenuti nella miscela di amplificazione porta all'arresto della reazione stessa, rappresentato graficamente da una fase di plateau, raggiunta la quale il numero di copie della regione *target* non aumenta più. Il ciclo in corrispondenza del quale inizia la fase esponenziale della reazione dipende dalla quantità di DNA *target* presente nel campione saggiato. Maggiore è la quantità di gene *target*, minore sarà il numero di cicli di reazione necessari al superamento del segnale di soglia o ciclo di *threshold*, in corrispondenza del quale la fluorescenza emessa risulta rilevabile.

I metodi diagnostici di biologia molecolare indicano la presenza di DNA parassitario e quindi di parassiti nel tessuto saggiato. Un esito negativo del test di biologia molecolare, quindi, non indica necessariamente che l'animale non sia positivo alla toxoplasmosi ma che in quella sezione sottoposta ad analisi non erano presenti parassiti. In ragione di

quanto detto, laddove venisse riscontrata un'eventuale discordanza tra esito diagnostico positivo con metodo sierologico e negativo con applicazione di tecniche di biologia molecolare, la stessa non deve essere considerata anomala (WOAH, 2017).

2. Scopo del progetto

La toxoplasmosi è una parassitosi diffusa a livello globale e può essere considerata sia una *food-borne* che una *water-borne zoonosis*. Il parassita ha la capacità di infettare ed adattarsi a qualsiasi specie animale, tanto tra gli animali selvatici, compresi gli acquatici, quanto tra le specie domestiche, oltre che all'uomo. L'uomo, infatti, può contrarre l'infezione da *T. gondii* principalmente attraverso l'ingestione di carni crude o poco cotte contenenti le cisti oppure ingerendo alimenti o acqua contaminati dalle oocisti sporulate. La notevole resistenza della parete delle oocisti consente la diffusione di *T. gondii* attraverso bacini idrici ed ecosistemi e la persistenza a lungo termine in diversi alimenti come molluschi e prodotti freschi (Santoro et al., 2020). Le variazioni delle condizioni ambientali, causate dalla rapida urbanizzazione, dal riscaldamento globale e dalla globalizzazione economica, stanno influenzando la distribuzione e la trasmissione di molte malattie parassitarie, inclusa la toxoplasmosi (Patz et al., 2000). L'ecologia di *T. gondii*, con il suo complesso ciclo di vita, è suscettibile ai cambiamenti ambientali principalmente per quanto concerne il tempo di sopravvivenza e l'infettività delle oocisti, nonché il comportamento e la densità di popolazione degli ospiti (Meerburg et Kijlstra, 2009). Lo scopo di questo progetto è quello di approfondire le conoscenze relative alla contaminazione da forme infettanti di *T. gondii* delle acque dolci e marine della Sicilia Orientale, per comprendere se anche questo ambiente regionale è interessato dalla contaminazione del parassita. Inoltre, la determinazione dei genotipi dei DNA che sono stati isolati, ha consentito di verificare se nell'ambiente acquatico, sia di acqua dolce che marino, sono presenti i tipi maggiormente riscontrati anche nell'uomo con conseguenti considerazioni sul carattere zoonotico della malattia e sulla necessità della gestione *One-Health* (uomo-animale-ambiente) per la prevenzione della stessa. Lo studio sperimentale svolto è stato eseguito in vista dei seguenti obiettivi, tutti raggiunti:

- Obiettivo 1: Monitorare per due anni l'eventuale contaminazione da *T. gondii* in campioni di acque dolci prelevati da fiumi e laghi della Sicilia Orientale, mediante analisi biomolecolari.

- Obiettivo 2: Monitorare per due anni l'eventuale contaminazione da *T. gondii* in campioni di acque marine e costiere della Sicilia Orientale, mediante analisi biomolecolari.
- Obiettivo 3: Genotipizzare il DNA di *T. gondii* ottenuto dal monitoraggio di cui ai punti precedenti.

Le fasi progettuali effettuate durante la ricerca sono qui di seguito elencate:

- ricerca bibliografica;
- raccolta dei campioni d'acqua sul territorio siciliano ripetute nei due anni;
- rilevazione biomolecolare del DNA di *T. gondii*;
- determinazione dei genotipi;
- elaborazione dei dati;
- stesura della tesi.

Per la raccolta dei campioni di acque dolci/salate sono state selezionate le seguenti zone:

- **Biviere di Lentini o lago di Lentini**, è un lago della Sicilia orientale, si trova in provincia di Siracusa ai margini della provincia di Catania, e si estende nel territorio di Lentini. Coordinate 37°19'22.8"N 14°57'00"E / 37.323°N 14.95°E37.323 (Foto1).
- **Oasi Faunistica di Vendicari**, è un'area naturale protetta sita all'interno del libero consorzio comunale di Siracusa, precisamente tra Noto e Marzamemi, le coste si affacciano sul Mar Ionio. Particolarmente importante per la presenza di pantani che fungono da luogo di sosta nella migrazione degli uccelli. Coordinate: 36°47'26"N 15°05'27"E / 36.790556°N 15.090833°E36.790556 (Foto 2).
- **Lago Dirillo**, si trova nella Sicilia centrale nel territorio di Licodia Eubea in provincia di Catania ed una piccola parte all'estremità orientale ricade sul territorio del comune di Monterosso Almo in provincia di Ragusa. E' raggiungibile dalla S.S 194 con uscita nei pressi di Licodia Eubea o in località Torretta nel comune di Vizzini. Si tratta di un lago artificiale realizzato attraverso lo sbarramento del fiume Dirillo tramite la diga Ragoletto. Coordinate geografiche: 37°07'37.92" N - 14°41'46.86" E (Foto 3)

- **Lago di Gurrída**, è incastonato nel territorio del parco dell'Etna, in quel versante settentrionale che guarda i Nebrodi. Si tratta dell'unica zona umida del territorio etneo, nata nel 1936 in seguito allo sbarramento del corso del torrente Flascio, provocato da un'eruzione. Coordinate geografiche: 37° 51' 23.65" N, 14° 54' 00.4" E (Foto 4).
- **Laghetto di Naftia**, è un lago naturale di acqua sulfurea, in atto prosciugato; si trova in contrada Rocchicella nel territorio del comune di Mineo in provincia di Catania. È stato riconosciuto come la più grande sorgente naturale di anidride carbonica. Coordinate geografiche: 37°19'28.34"N 14°41'49.63"E / 37.32454°N (Foto 5).
- **Lago Pantano Gariffi**, era la più grande superficie lacustre naturale della provincia di Ragusa. Aveva una superficie di circa 300 Ha e conteneva acqua dolce contrariamente al pantano Longarini che ancora oggi contiene acqua salata. La zona è stata bonificata e le acque esistono solamente nella stagione invernale e sono dovute alle piogge che riempiono questa depressione naturale. Con il sopraggiungere della bella stagione evaporano lasciando il posto al letto secco coperto da vegetazione di macchia mediterranea. Coordinate geografiche: 36°44'00.6"N 14°56'19.32"E (Foto 6).
- **Lago Santa Rosalia**, è un bacino artificiale della Sicilia, è ubicato in una cava tra i monti Iblei in provincia di Ragusa; il lago è formato dalle acque del fiume Irminio ed è raggiungibile dalla strada statale 194, che da Ragusa conduce a Giarratana. Coordinate geografiche: 36°58'33.6"N 14°46'35.4"E (Foto 7).
- **Lago di Ganzirri**, è una formazione idrologica che appartiene, assieme al lago di Faro alla duna costiera di Capo Peloro, nell'area urbana di Messina. I laghi di Ganzirri sono un complesso di laghi che ricadono all'interno della Riserva Naturale Orientata Laguna di Capo Peloro. Queste formazioni lacustri, situate nella parte nord della città di Messina, comprendono diverse sezioni di acqua dolce, separate da canali e collegamenti con il mare. Il complesso lacustre comprende il lago di Ganzirri o Pantano grande, ed il lago di Torre Faro o Pantano piccolo, oltre a una serie di canali che si estendono tra di loro. Il lago di Ganzirri ha una dimensione di circa 400.000 metri quadrati, si estende da Nord a Sud con una lunghezza di 2 km e una larghezza di poco più di 200 m, con una

profondità di 8 m. Il lago di Torre Faro, che risulta di minori dimensioni, ha un diametro di 665 m, una superficie di 263.600 metri quadrati, ma un volume di quasi 2.600.000 metri cubi. Il maggior volume di acqua è dovuto alla profondità del lago stesso, ossia 28 m circa. Il lago di Ganzirri e il lago di Torre Faro sono in comunicazione tra loro e con il mare, grazie alla presenza di cinque canali: il canale Margi, che collega i due laghi, e i canali degli Inglesi, Faro, Due Torri, Catuso. Questi permettono il ricambio idrico con il mar Tirreno e Ionio. I laghi di Ganzirri sono un luogo di grande valore naturalistico, ecologico e culturale. Si caratterizzano per un paesaggio palustre e vegetazione costiera, con canneti, salicornie e altre piante tipiche delle zone umide. Coordinate geografiche: 38.261098°N 15.617194°E (Foto 8).

- **Località Gole dell'Alcantara**, dette anche Gole di Larderia, sono situate nella valle dell'Alcantara dove termina la catena montuosa dei Peloritani tra i comuni di Castiglione di Sicilia e di Motta Camastra. Il fiume Alcantara scorre tra pietra lavica che forma il suo alveo caratteristico. Sul territorio di Motta Camastra in località Fondaco Motta si trova la gola più importante e famosa dell'Alcantara, lunga più di 6 Km e percorribile in modo agevole per i primi 3 Km. Coordinate geografiche: 37°52'48.25"N 15°10'24.38"E / 37.88007°N 15.17344°E (Foto 9).
- **Fiume Dirillo**, chiamato anche Acate, è un fiume della Sicilia sud-orientale ed il suo corso si sviluppa per 54 Km. Nasce sui monti Iblei dall'unione dei torrenti Rio Amerillo e Rio Vizzini che nascono rispettivamente nei territori comunali di Monterosso Almo e Vizzini. Coordinate geografiche: 37°00'08.39"N 14°20'16.15"E / 37.00233°N 14.33782°E 37.00233. (Foto 10).
- **Fiume Irmínio**, è un fiume della Sicilia Sud-Orientale. Il fiume nasce dal Monte Lauro, principale cima dei monti Iblei. Il suo percorso, a carattere quasi torrentizio, si sviluppa lungo la provincia di Ragusa per 55 Km. Sfocia nel Mar Mediterraneo, in località Torre Giardinelli tra Marina di Ragusa e Donnalucata. Lungo il suo corso non attraversa nessun centro abitato costeggiando a fondo valle solo Giarratana e Ragusa Ibla. Coordinate geografiche: 36°46'44.04"N 14°35'42.36"E / 36.7789°N 14.5951°E 36.7789 (Foto 11).
- **Fiume Simeto**, l'intero corso del fiume è compreso nella provincia di Catania, mentre il suo bacino si estende anche nelle province di Messina e di Enna. Nel

suo percorso sfiora Centuripe, Bronte, Adrano, Biancavilla, Paternò e Ramacca. Il fiume Simeto attraversa la Piana di Catania, è un fiume a regime torrentizio, con piene nella stagione autunnale e invernale e con momenti di siccità nella stagione estiva. Coordinate geografiche: 37°24'02"N 15°05'19.56"E / 37.400557°N 15.088766° (Foto12).

Per la raccolta delle acque Marine e costiere della zona siculo-orientale, sono state selezionate le seguenti località:

- **Località Baia Arcile**, la spiaggia di Baia Arcile fa parte del Mar Ionio e fa parte del territorio di Augusta, località della provincia di Siracusa; l'insenatura, il cui asse centrale è orientato approssimativamente verso nord, si affaccia sul golfo di Catania. La spiaggia di Baia Arcile è formata da ciottoli più o meno grossi che, verso il limite ovest dell'insenatura, cedono gradualmente il posto a grosse formazioni rocciose. Una di queste rocce è completamente circondata dal mare, si trova a poche decine di metri di distanza dalla riva ed è chiamata "Scoglio della tartaruga" a causa del suo profilo che ricorda quello dell'omonimo animale marino. Coordinate geografiche: 37°17'19.56"N 15°09'48.33"E (Foto13).
- **Località Vaccarizzo**, è una frazione della città di Catania, comune italiano capoluogo dell'omonima provincia. Fa parte della VI circoscrizione (San Giorgio, San Giuseppe La Rena, Zia Lisa, villaggio Sant'Agata. Situata all'estrema parte meridionale del territorio del capoluogo etneo, confina a nord con la collina Primosole, ad ovest con San Giuseppe la Rena e ad est è bagnata dal Golfo di Catania. Confina inoltre con i comuni di Lentini, Carlentini, facenti parte della provincia di Siracusa, rispettivamente ad Est e a Sud. Il suo territorio comprende le contrade Vaccarizzo, Villaggio Delfino, Codavolpe e Primosole. Coordinate geografiche: 37°22'23.7"N 15°04'51.46"E / 37.37325°N 15.08096°E37.37325(Foto14).
- **Località Playa di Catania**, è il litorale costiero sabbioso che si estende per 18Km, nell'area compresa tra l'ultimo molo del porto di Catania e la località Agnone Bagni (frazione di Augusta in provincia di Siracusa), con una profondità dell'area sabbiosa che varia tra alcune centinaia di metri e qualche Km. Il quartiere della Playa è solo una minima parte del lungo litorale sabbioso, che

corrisponde alla parte litoranea del viale J.F. Kennedy, dove si trovano i vari lidi, più a Sud dei quali vi sono varie altre frazioni di Catania. Coordinate geografiche 37° 31' 0" N, 15° 4' 0" E (Foto15).

- **Località Marina di Noto**, il golfo di Noto è un'ampia insenatura che si ritrova nella costa sudorientale della Sicilia che si affaccia sul Mar Ionio. Compresa fra due isole quella della Maddalena ed il Capo Passero, il golfo bagna i territori della provincia di Siracusa. Coordinate geografiche 36°51'32"N 15°06'59"E (Foto16).
- **Località Fontane Bianche**, è una frazione di Siracusa, da cui dista 12 Km; la spiaggia è la più lunga del territorio Siracusano ed è delimitata a est e a ovest da due costoni rocciosi. Questa particolare morfologia del territorio, simile ad una baia, consente di godere di un mare quasi sempre calmo e piatto. Coordinate geografiche: 36° 57' 54.385" N 15° 12' 48.996" E (Foto 17).
- **Località Giardini Naxos**, il territorio è una striscia prevalentemente pianeggiante, di forma pressoché rettangolare, situata sul mar Ionio nella Sicilia Orientale. Confina a nord e a ovest con il comune di Taormina, a est con il mare Ionio e a Sud è separato dal fiume Alcantara con il comune di Calatabiano, in provincia di Catania. Coordinate geografiche: 37°50'N 15°16'E (Foto18).
- **Località Letojanni**, la cittadina balneare di Letojanni fa parte del comprensorio turistico di Taormina ed è situata al centro di una ampia baia compresa tra i promontori di S. Alessio (Forza d'Agrò) e S. Andrea (Taormina), a 5 metri sul livello del mare, nel versante jonico dei monti Peloritani, a 43 km a sud-ovest da Messina e 50 a nord-est da Catania. Coordinate geografiche: 37°53'N 15°18'E (Foto19).
- **Isola Bella (Taormina)**, è un'isola tidale sita nel mar Ionio, in Sicilia, presso Taormina, comune della città metropolitana di Messina. Coordinate geografiche: 37°51'01"N 15°18'03"E (Foto 20)
- **Località Gioiosa Marea**, è un comune della città metropolitana di Messina; Gioiosa Marea è una vivace località balneare collocata proprio davanti alle Isole Eolie e poco distante da località come Capo d'Orlando, Milazzo o Cefalù. La città è incastonata tra le splendide spiagge della costa e i Monti Nebrodi ed è famosa per il suo bellissimo litorale che non solo si trova circondato da natura

incontaminata ma anche da un mare davvero meraviglioso. Coordinate geografiche: 38°10'N 14°54'E (Foto 21).

- **Località Pozzallo**, è un territorio, in parte pianeggiante e in parte sub-collinare, dista 35 Km dalla Città di Ragusa, confina a nord con il comune di Modica e a nord-est con il comune di Ispica, la cittadina è bagnata dal Mar Mediterraneo. La spiaggia di Pozzallo, si trova lungo la costa sud est della Sicilia, in provincia di Ragusa che dal porto della cittadina arriva fino al Cozzo di Santa Maria del Focallo, proprio al confine con Ispica. Nel 2021 ha raggiunto quota 18 Bandiera Blu, il riconoscimento della FEE che premia le migliori località. Coordinate geografiche: 36°43'49.01"N 14°50'48.19"E (Foto 22).
- **Località Marina di Ragusa**, è una frazione del comune di Ragusa, capoluogo dell'omonimo libero consorzio comunale in Sicilia, situata sulle sponde settentrionali del canale di Malta. La località si trova a circa 25 Km da Ragusa, nel sud-est della Sicilia, ed è circondato dai centri abitati di Santa Croce Camerina, Donnalucata, Scicli e Punta Secca. È caratterizzata da una lunga spiaggia sabbiosa che si interrompe ad ovest al porto e ad est poco prima della riserva dell'Irminio. Coordinate geografiche: 36°47'08.7"N 14°33'17.06"E (Foto 23).

Lo studio effettuato è stato focalizzato sulla raccolta due volte l'anno dei campioni d'acqua sul territorio della Sicilia Orientale. I mesi di raccolta sono stati per il primo anno gennaio, giugno, dicembre, per il secondo anno i mesi di marzo, luglio, novembre. I campioni sono stati esaminati per la ricerca del DNA di *T. gondii* al fine di dimostrarne la presenza e di mettere in evidenza l'importanza di ricercare anche questo agente zoonotico, oltre tutti quelli già previsti nella legislazione vigente per verificare lo stato di contaminazione biologica delle acque. Sono stati applicati metodi di laboratorio biomolecolari, validati e accreditati presso i laboratori dell'Area Catania dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, che hanno fatto riferimento alle descrizioni contenute nel manuale WOA (2017).



Foto 1 Biviere di Lentini

Coordinate geografiche:37°19'22.8"N 14°57'00"E / 37.323°N 14.95°E



Foto 2 Oasi Faunistica di Vendicari.

Coordinate geografiche:36°47'26"N 15°05'27"E / 36.790556°N 15.090833°E



Foto 3 Lago Dirillo

Coordinate geografiche. Lago Dirillo 37°07'37.92" N - 14°41'46.86" E



Foto 4 Lago di Gurrida.

Coordinate geografiche: 37° 51' 23.65" N , 14° 54' 00.4" E



Foto 5 Laghetti di Naftia

Coordinate geografiche: 37°19'28.34"N 14°41'49.63"E / 37.32454°N 37.32454°, 14.69712°



Foto 6 Lago Pantano Gariffi.

Coordinate geografiche: 36°44'00.6"N 14°56'19.32"E 36.7335°, 14.9387°



Foto 7 Lago Santa Rosalia.

Coordinate geografiche: 36°58'33.6"N 14°46'35.4"E 36.976°, 14.7765°



Foto 8 Lago di Ganzirri

Coordinate geografiche: 38.261098°N 15.617194°E



Foto 9 Gole dell'Alcantara

Coordinate geografiche: 37°52'48.25"N 15°10'24.38"E / 37.88007°N 15.17344°



Foto 10 Fiume Dirillo

*Coordinate geografiche: 37°00'08.39"N 14°20'16.15"E / 37.00233°N 14.33782°E*37.00233



Foto 11 Fiume Irminio

*Coordinate geografiche: 36°46'44.04"N 14°35'42.36"E / 36.7789°N 14.5951°E*36.7789



Foto 12 Fiume Simeto

Coordinate geografiche: 37°24'02"N 15°05'19.56"E / 37.400557°N 15.088766°



Foto 13 Località Baia Arcile

Coordinate geografiche: 37°17'19.56"N 15°09'48.33"E



Foto 14 Località Vaccarizzo

Coordinate geografiche: 37°22'23.7"N 15°04'51.46"E / 37.37325°N 15.08096°E37.37325

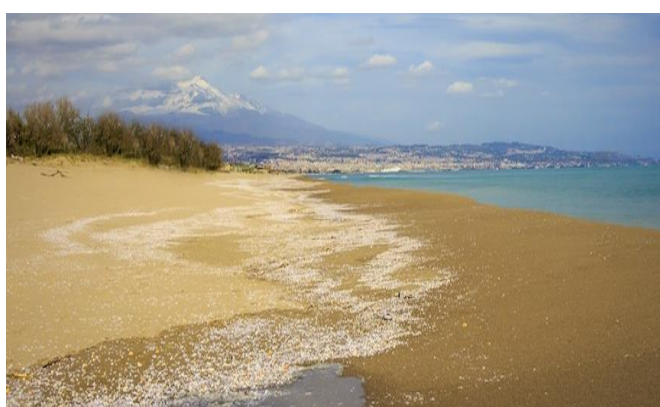


Foto 15 Località Mare della Playa

Coordinate geografiche: 37° 31' 0" N, 15° 4' 0" E



Foto 16 Località Marina di Noto Coordinate geografiche: 36°51'32"N 15°06'59"E



Foto17 Località Mare Fontane Bianche

Coordinate geografiche: 36° 57' 54.385" N 15° 12' 48.996" E



Foto 18 Giardini Naxos Messina

Coordinate geografiche: 37°50'N 15°16'E



Foto 19 Località Letojanni

Coordinate geografiche: 37°53'N 15°18'E



Foto 20 Località Isola Bella Taormina

Coordinate geografiche: 37°51'01"N 15°18'03"E

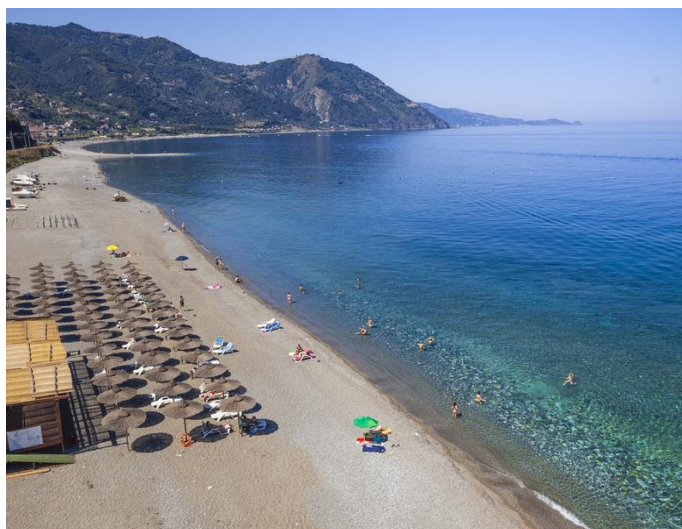


Foto 21 Località Gioiosa Marea Messina

Coordinate geografiche: 38°10'N 14°54'E



Foto 22 Località Mare di Pozzallo

Coordinate geografiche: 36°43'49.01"N 14°50'48.19"E



Foto 23 Località Mare di Marina di Ragusa

Coordinate geografiche: 36°47'08.7"N 14°33'17.06"E

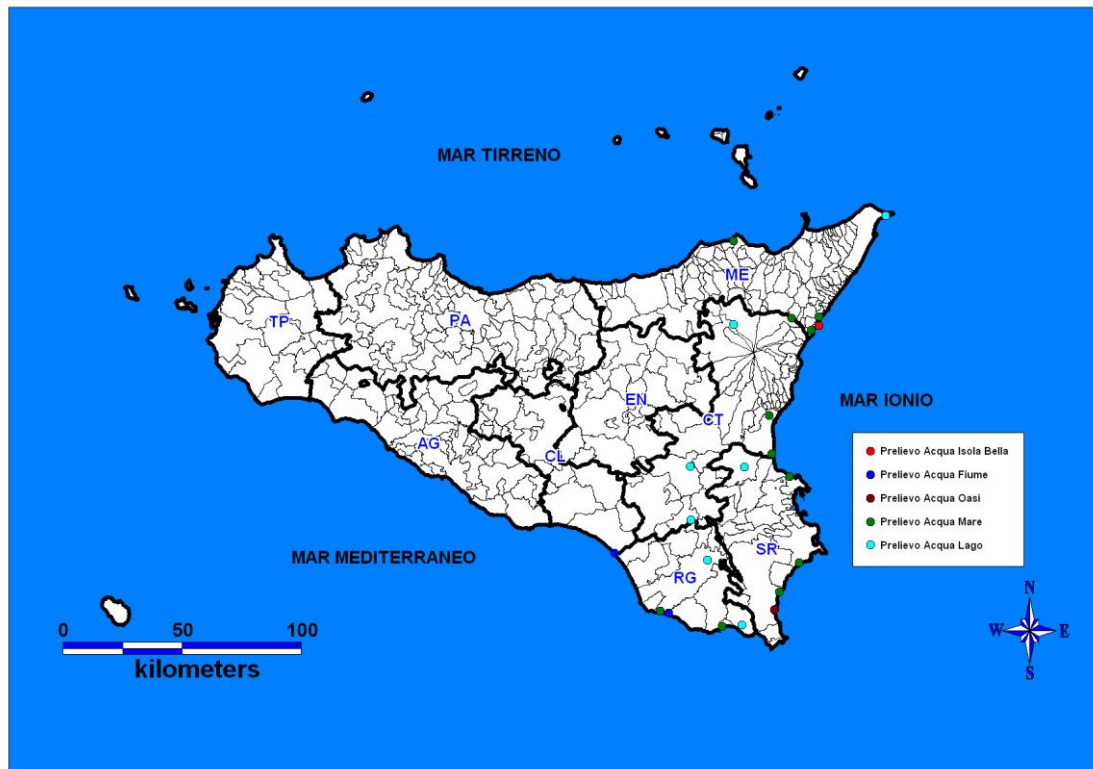


Figura 4: Georeferenziazione punti di prelievo della Sicilia Orientale

3. Materiali e metodi

I campionamenti sono stati eseguiti nell'arco temporale di 24 mesi, nell'anno 2021 i mesi di raccolta sono stati Gennaio, Giugno, Dicembre, nell'anno 2022 i mesi di raccolta sono stati Marzo, Luglio, Novembre, la selezione è stata effettuata tenendo in considerazione le quattro stagioni (primavera, estate, autunno, inverno), al fine di valutare in quale mese dell'anno era più probabile riscontrare la presenza di DNA di *Toxoplasma gondii*, in entrambi i periodi sono stati raccolti 10 litri di acqua per ogni sito di campionamento, per un totale di 132 prelievi, non è stata prelevata l'acqua del laghetto di Naftia, perché si presentava prosciugato e quindi non esaminabile per gli scopi della ricerca.

I campioni durante il trasporto sono stati mantenuti ad una temperatura di 4°C, conservati a 4°C, se lavorati entro le 24 h o congelati se non sottoposti a lavorazione immediata. Si è proceduto all'esecuzione delle attività analitiche previste presso il Laboratorio di Parassitologia dell'Area Catania ed in parte presso l'Area di Biologia Molecolare di Palermo, afferenti all'I.Z.S della Sicilia.

Le oocisti di *T. gondii* contenute nei campioni di acqua sono state concentrate per filtrazione, mediante l'utilizzo di membrane filtranti sterili di nitro di cellulosa, a porosità 0,8 µm. Da ogni campione di acqua sono stati ottenuti tre filtrati per un totale di 396 DNA estratti.

Le oocisti ottenute sono state trattate mediante l'applicazione del metodo di estrazione specifico (Kit DNeasy PowerWater Kit della ditta QIAGEN). Le aliquote ottenute dall'estrazione sono state analizzate mediante PCR Real-time qualitativa. La genotipizzazione dei DNA isolati è stata effettuata mediante Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) che consiste nell'analisi dei polimorfismi di lunghezza di frammenti del DNA ottenuti per digestione con enzimi di restrizione. I frammenti così ottenuti sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio e confrontati con un marcatore di pesi molecolari e con ceppi ATCC di *T. gondii*, permettendo di determinare la lunghezza dei frammenti stessi. Comparando i profili elettroforetici dei campioni con quelli dei ceppi di riferimento noti di *T. gondii*, è stato identificato il ceppo di appartenenza dei campioni. Il DNA estratto è stato amplificato mediante Multiplex PCR, utilizzando coppie di primer esterni che permettono di amplificare regioni

specifiche dei seguenti marcatori di *T. gondii*: Sag1, Sag2, Sag3, Btub, Gra6, C22-8, C29-2, L358, Pk1, Apico (**Tabella 2**).

I prodotti ottenuti dalla Multiplex PCR vengono sottoposti a Nested PCR, utilizzando primer interni, che permettono di amplificare regioni più piccole dei marcatori precedentemente citati; il prodotto di Nested PCR è stato digerito con enzimi di Restrizione, il prodotto di digestione è stato caricato su gel d'agarosio al 2,5% con ladder 25 bp (solamente per il marcatore Apico è stato utilizzato un gel al 3%).

Mediante comparazione dei profili elettroforetici dei campioni con quelli dei ceppi di riferimento noti di *T. gondii* è stato identificato il ceppo di appartenenza dei campioni. La lunghezza dei frammenti di restrizione dei DNA di riferimento sono riportati in **Tabella 3**.

Tabella 2 – “Primer First PCR - Primer Nested PCR - Enzimi di restrizione - T °/bp”

Genetic marker	Restriction enzymes	T °/bp	NEB Buffer	Primers
SAG1	Sau96I	37°C/390	Neb4 green	F: GTTCTAACCACGCACCCTGAG/ R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC/ R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG
	HaeII			
5 'SAG2	MboI	37°C/242	Neb4	F: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC/R: GCAAGAGCGAACTTGAACAC
3' SAG2	HhaI	37°C/222	Neb4	F: TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC/R: TCAAAGCGTGCATTATCGC F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC/R: AACGTTTCACGAAGGCACAC
Alt Sag2*	Hinfi	*37°C/546	Neb3 red	F: GGAACGCGAACAATGAGTTT/R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT F: ACCCATCTGCGAAGAAAACG/R: ATTTCCGACCAGCGGGAGCAC
SAG3	NciI	37°C/225	Neb4	F: CAACTCTCACCATTCACCC/ R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA F: TCTTGTCGGGTGTTCACTCA/ R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA
GRA6	MseI	65/344*	Neb2 blu	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT/ R: GCACCTTCGCTTGTGGTT F: TTTCCGAGCAGGTGACCT/ R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG
L358	HaeIII	37°C/418	Neb4	F: TCTCTCGACTTCGCTTCTC/ R: GCAATTTCTCTCGAAGACAGG F: AGGAGGCGTAGCGCAAGT/ R: CCCTCTGGCTGCAAGTCT
	NlaIII			
PK1	RsaI	37°C/903	Neb4	F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA/ R: AGAAAGCTCCGTGCAAGTAT F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT/ R: TCATCGCTGAATCTCATTGC
	AvaI			
C29-2	RsaI	37°C/446	Neb4	F: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA/ R: AGGGTCTCTTGCGCATAACAT F: AGTTCTGCAGAGTGTGCG/ R:TGTTCTAGGAAAGAGGCGC
	HpyCH4IV			
BTUB**	BsEI	**60°C/411	Neb4	F: TCCAAAATGAGAGAAATCGT/R: AAATTGAAATGACGGAAGAA F: GAGGTCATCTCGGACGAACA/R: TTGTAGGAACACCCGGACGC
	TaqI			
C22-8***	BsmA1	***37°C/521	Neb2	F: TGATGCATCCATGCGTTTAT/ R: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA F: TCTCTACGTGGACGCC/ R:AGGTGCTTGGATATTGCG
	MboII			
APICO	AfiII	37°C/640	Neb2	F:TGGTTTTAAACCCTAGATTGTGG/ R:AAACGGAATTAATGAGATTGAA F: GCAAATCTTGAATTCTCAGTT/ R: GGGATTTCGAACCCTTGATA
	DdeI			

Tabella 3 - Lunghezza dei frammenti di restrizione dei DNA di riferimento

MARKERS	Sier1 (GT1) F3	Type 2 (PTG)PGT PLK	Type 3 (CTG)	Type 1-2-3 TgCgCa1	Type 1 – 3 MAS	Type 1 -3 TgCatBr5	TType 1 RH88
SAG1	350bp	250-300	250-300	350bp	250	350	
5'SAG2	250,3bp	250-300	150-200	250-300bp		200	
3'SAG2	200-250,32bp 280	150-350 200-250	150 200-250 280	150-200 200-250bp	200-250bp 280bp	200-250bp 280bp	
Alt Sag2*	Due bande 180bp 350 bp	Due bande 130-350	Due bande 250-300 (180)	Due bande 130	Due bande 130	Due bande 180	
SAG3	74bp 100bp	250-300	150-200	150-200	150-200	150-200	
BTUB**	75-150-250-300b	200-250 140-150 90-100	75bp 90-100bp 125bp	90-100bp 125bp 200bp	75bp 90-100bp 125bp	75bp 90-100bp 125bp	
GRA6	300-350	350 200	205 270 350	350	205 270 350	205 270 350	350
C22-8***	150bp	120 bp 170 230	120 170 240	120 170 220	75 120 170 190	60 120 170 190	
C29-2	300-350bp	150bp-200bp	350bp	320bp	320bp	320bp	
L358	300-320	200-220	180	300	300	300	
PK1	350 250-300 120	120bp 150bp	350bp 120	350bp 120	350bp 120	350bp 120 bp	
Apico	320-350 110 bp	110bp 150-200bp	110bp 320-350	110 320-350	110 320-350	110 320-350	

(*Alt Sag2 30'a 37°C e 65°C per 30') (**BTUB 60°C per 1') (***)C22-8 37°C per 30' e 55°C per 30')

Per le prove biomolecolari sono stati utilizzati i seguenti materiali di riferimento certificati:

- Ceppo di *T. gondii* ATCC 50853
- Ceppo di *T. gondii* ATCC 50841
- Ceppo di *T. gondii* ATCC 50842
- Ceppo di *T. gondii* ATCC 50842
- Ceppo di *T. gondii* ATCC PRA 356
- Ceppo di *T. gondii* ATCC 50870
- Ceppo di *T. gondii* ATCC PRA 342
- Ceppo di *T. gondii* ATCC 50838
- DNA di *T. gondii* ATCC 50174

Inoltre, per la determinazione dei genotipi oltre all'RFLP è stato utilizzato il metodo MLST in NGS. I frammenti polimorfici sono stati previamente analizzati su gel di

agarosio e poi sono stati marcati alle due estremità, con gli appositi adattatori Illumina e indexati per consentirne la determinazione (**Tabella 4**).

Tabella 4: SEQUENZE DEGLI OLIGONUCLEOTIDI ADATTATORI INSERITI ALLE ESTREMITÀ DEI PRIMERS FORWARD UTILIZZATI

Primer	Sequenza adattatore
Forward	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3'
Reverse	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

I materiali di riferimento utilizzati sono stati:

- ✓ DNA ATCC 50174D (Tipo I)
- ✓ DNA estratto dai ceppi ATCC 50841 (Tipo II)
- ✓ ATCC 50842 (Tipo III)
- ✓ ATCC PRA-342 (Atipico)

Anche questo metodo NGS ha permesso di identificare il ceppo di appartenenza dei campioni.

3.1.1 Estrazione del DNA da acqua

Il protocollo utilizzato è stato quello di seguito descritto, come previsto dal produttore del Kit DNeasy PowerWater Kit della ditta QIAGEN:

1. Filtrare i campioni di acqua utilizzando un imbuto filtrante collegato a una sorgente di vuoto;
2. Utilizzando due set di pinze sterili, raccogliere dall'imbuto la membrana filtrante bianca ai bordi opposti e arrotolare il filtro in un cilindro con il lato superiore rivolto verso l'interno;
3. Inserire il filtro in una provetta per microsfere di DNA PowerWater da 5 ml;
4. Aggiungere 1 ml di soluzione PW1 alla provetta per perline DNA PowerWater;
5. Vortexare alla massima velocità per 5 min;
6. Centrifugare le provette a 4000 x g per 1 min;
7. Trasferire il supernatante in una provetta di raccolta pulita da 2 ml;
8. Centrifugare a 13.000 x g per 1 min;

9. Trasferire il surnatante in una provetta di raccolta pulita da 2 ml;
10. Aggiungere 200 μ l di Solution IRS e vortexare;
11. Incubare a 2–8°C per 5 min.
12. Centrifugare le provette a 13.000 x g per 1 min;
13. Trasferire il surnatante in una provetta di raccolta pulita da 2 ml;
14. Aggiungere 650 μ l di Soluzione PW3 e vortexare;
15. Caricare 650 μ l di supernatante su una colonna MB Spin.
16. Centrifugare a 13.000 x g per 1 min;
17. Ripetere fino a quando tutto il supernatante è stato trattato ai precedenti due punti;
18. Collocare il filtro MB Spin Column in una provetta di raccolta pulita da 2 ml;
19. Aggiungere 650 μ l di Soluzione PW4;
20. Centrifugare a 13.000 x g per 1min;
21. Eliminare il surnatante e aggiungere 650 μ l di etanolo e centrifugare a 13.000 x g per 1 min;
22. Eliminare il surnatante e centrifugare di nuovo a 13.000 x g per 2 min;
23. Collocare la MB Spin Column in una provetta di raccolta pulita da 2 ml;
24. Aggiungere 100 μ l di Soluzione EB al centro della membrana filtrante bianca;
25. Centrifugare a 13.000 x g per 1 min;
26. Scartare la colonna di rotazione MB.

Il DNA è ora pronto per le applicazioni biomolecolari.

3.1.1.1 Fase della lettura della concentrazione del DNA mediante elettroforesi

La concentrazione di DNA ottenuta dal campione è stata verificata tramite elettroforesi su gel di agarosio all'1% e la successiva lettura del gel è stata effettuata mediante acquisitore di immagini. Le soluzioni sono eventualmente conservate in freezer e scongelate appena prima dell'esecuzione della prova. La concentrazione viene misurata su gel per confronto con 500 ng di marcatore di pesi molecolari λ Hind III, cioè il DNA digerito Hind III del fago λ .

Caricare 5 μ l di λ Hind III, che corrispondono a 500ng di DNA.

La determinazione della concentrazione consiste nel confronto visivo tra l'intensità e l'altezza della banda del DNA del campione e l'intensità delle bande del marcatore (λ Hind III).

Questa fase è stata eseguita per alcuni campioni anche mediante l'utilizzo dell'apparecchio Agilent Technologies 4200 TapeStation e specifici kit.

3.1.2 Fase dell'esecuzione della RT PCR

La procedura applicata è stata la POS-PAR CT 02 "PCR Real-Time per la diagnosi di Toxoplasmosi", metodo interno accreditato in precedenza dal Ce.Tox e descritto nella seguente pubblicazione scientifica:

Marino, A.M.F., Percipalle, M., Giunta, R.P., Salvaggio A., Caracappa, G., Alfonzetti T., Aparo A., Reale S. Development and validation of a real-time PCR assay for the detection of *Toxoplasma gondii* DNA in animal and meat samples. *J Vet Diagn Invest.* 2017 Mar;29(2):203-207.

e con riferimenti anche all'OIE Terrestrial Manual 2017, Part 3, Chapter 3.9.9 Toxoplasmosis, B. Diagnostic Techniques, 1.2.: Nucleic acid recognition methods.

Questo metodo fonda il principio diagnostico sulla rilevazione della regione 529-bp di *T. gondii* e prevede l'utilizzo dei seguenti specifici primers e sonda Taqman:

Primer AF1: 5'- **CACAGAAGGGACAGAAGT** -3'

Primer AF2: 3'- **TCGCCTTCATCTACAGTC** -5'

Sonda 5'- **FAM-5CTCTCCTCCAAGACGGCTGG-BHQ** -3'

Il dettaglio di questa PCR Real-time prevede le seguenti 3 fasi.

1° Fase - Preparazione e distribuzione della master mix

- Si è messo in una vaschetta con ghiaccio una provetta eppendorf per la preparazione della master mix, dispensando i reagenti secondo i volumi indicati nella tabella 5, tenendo conto del numero dei campioni in esame, del controllo positivo, del controllo negativo e di un campione in eccesso ogni 10 test.

- Dopo aver preparato la master mix, si è proceduto a miscelarla con delicatezza, mediante pipettamento, evitando la formazione di bolle. Dopo di che la Master Mix è stata mantenuta in ghiaccio.
- Si è proceduto a dispensare la master mix (18 µl per pozzetto) nella micropiastra come indicato in Tabella.5.

2° Fase - Trasferimento del DNA nella micropiastra per la PCR Real-time Qualitativa

- È stato aggiunto nei rispettivi pozzetti della micropiastra 2 µl di DNA di ciascun campione.
- È stato aggiunto negli appositi pozzetti della micropiastra 2 µl di DNA di controllo positivo.
- È stato aggiunto nell'apposito pozzetto della micropiastra 2 µl di acqua nucleas free come controllo negativo.

3° Fase-PCR Real – time Qualitativa

- È stata inserita la micropiastra nell'alloggiamento dello strumento per PCR Real-Time e sono stati impostati dal PC i seguenti parametri: fluorocromo della sonda specifica, fluorocromo del controllo endogeno (IPC) (Tabella 6), fase di lettura del segnale, posizione dei campioni e dei controlli, programma di amplificazione “Programma Toxoplasma” (Tabella 7).
- È stato avviato il programma selezionando “START RUN”.

Tabella 5. "Reagenti per Real Time PCR"

MASTER MIX	1 campione	1 campione in duplicato	N. Campioni
Universal Master Mix	10 ul	20 ul	UI
Primers 20pmol/ul	0.5+0.5 ul	1+1 ul	UI
Sonda 10pmol/ul	0.5 ul	1 ul	UI
10X Exo IPC Mix	2 ul	4 ul	UI
50X Exo IPC DNA	0.5 ul	1 ul	UI
DNA	2 ul	4 ul	UI
H2O	4 ul	8 ul	UI

Tabella 6. "Marcature dei Primers e Sonda per PCR Real-time"

FLUOROFORO	COLORE	SONDA
FAM	GREEN	TOXO Specifica
VIC	YELLOW	IPC controllo endogeno

Tabella 7. "Programma Toxoplasma"

STEP	FASE	TEMPO	TEMPERATURA	N° CICLI
1	Hold UNG	2 min	50°C	1
2	Hold di Denaturazione	10 min	95°C	1
3	Denaturazione	15 sec	95°C	40
4	Annealing/polimerizzazione	60 sec	60°C	

3.1.2.2 Lettura e interpretazione dei risultati

Al termine dell'amplificazione si è proceduto all'analisi del dato grezzo. I risultati di prova sono stati elaborati dal software dello strumento.

In fase di analisi, si è proceduto come di seguito descritto:

1. La linea di base è stata impostata nella posizione di default come indicato dallo strumento.
2. La linea di soglia è stata lasciata sulla linea di default (threshold = 0.20). Successivamente si è passati alla modalità lineare per verificare che la linea di soglia, precedentemente impostata, si trovi all'inizio della fase esponenziale dei controlli positivi.
3. È stato verificato che il controllo negativo non presentasse segnale d'amplificazione.
4. Si sono letti i risultati confrontando i valori di Ct con la qualità delle relative curve di amplificazione. A fine lettura è stato stampato il report di analisi.

La prova è stata considerata valida perché:

- il controllo positivo ha dato una curva sigmoide con un valore di Ct apprezzabile in un range tra 20 e 40 cicli;
- il controllo negativo non presentava nessuna curva sigmoide (nessun valore di Ct).

Il risultato è stato espresso come:

positivo perché è stata rilevata una curva di amplificazione il cui Ct ha avuto un valore inferiore a 40;

negativo perché non è stata rilevata alcuna curva di amplificazione.

3.1.3 Tipizzazione molecolare del DNA di *T. gondii* mediante i metodi RFLP ed MLST in NGS

Entrambi i metodi sono stati sviluppati e validati dal laboratorio ed hanno fatto riferimento alla seguente pubblicazione scientifica:

Su, C., Shwab, E.K., Zhou, P., Zhu, X.Q., Dubey, J.P. *Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of Toxoplasma gondii*. Parasitology. 2010 Jan;137(1):1-11.

3.1.4 METODO RFLP

Le attività di genotipizzazione RFLP sono state condotte con riferimento al metodo interno che ha previsto che venissero utilizzati i seguenti materiali di riferimento per le attività di validazione e di interpretazione dei risultati:

- 1 DNA ATCC 50174D (Tipo I)
- 2 DNA estratto dai ceppi ATCC 50841 (Tipo II), ATCC 50951 (Tipo III), ATCC 50870, (MAS), ATCC PRA-342 (Atipico TgCatBr5) e ATCC PRA 356 (Atipico TgCgCa1).

Secondo tale approccio il DNA estratto è stato amplificato con un pannello di primers specifici. I frammenti sono stati verificati su gel di agarosio e poi digeriti con enzimi di restrizione che hanno come target proprio le regioni polimorfiche amplificate. A seconda della sequenza si possono formare o meno dei prodotti di digestione i cui pesi molecolari danno un profilo di restrizione specifico su gel di agarosio. La combinazione dei profili per markers differenti fornisce un motivo di tipizzazione e identificazione dei ceppi.

Il Dna estratto è stato amplificato con i seguenti primers (First e Nested) per 11 marcatori del *T. gondii* (Sag1, Sag2, Sag3, Btub, Gra6, C22-8, C29-2, L358, Pk1, Apico) (**Tabella 2**).

Dai prodotti finali di amplificazione, 5 µl sono stati digeriti con le coppie di enzimi di restrizione, con un volume finale di 20µl. Come controlli positivi di *T. gondii* sono stati utilizzati ceppi e DNA genomico ATCC, le cui bande caratteristiche di restrizione sono indicate in **Tabella 3**.

Il dettaglio di questa RFLP prevede le seguenti 5 fasi.

Fase 1 Allestimento Multiplex PCR

La preparazione della Multiplex PCR è stata eseguita utilizzando il Kit “Illustra pure Taq Ready to go PCR Beads”, che prevede di aggiungere in ciascuna provetta pronta all’uso i seguenti reagenti:

- 1 µl di Forward Primer (25 pmol/µl),
- 1 µl di Reverse Primer (25 pmol/µl),
- 5 µl di DNA,
- 18 µl di H₂O.

Per l’amplificazione della Multiplex PCR sono state utilizzate le condizioni illustrate in Tabella 8

Tabella. 8 ‘PROGRAMMA DI AMPLIFICAZIONE MULTIPLEX PCR’

STEP	FASE	TEMPO	TEMPERATURA	N° CICLI
1	DENATURAZIONE INIZIALE	4’	95°C	1
2		30’’	94°C	30
		1’	55°C	
		2’	72°C	

Fase 2 Diluizione prodotto di Amplificazione

Dopo la fase di amplificazione, il prodotto ottenuto è stato diluito nel rapporto 1:1, aggiungendo 25 µl di acqua sterile per biologia molecolare, e sottoposto a Nested PCR.

Fase 3 Nested PCR:

È stata eseguita utilizzando il Kit “Illustra pure Taq Ready to go PCR Beads”, che prevede di aggiungere in ciascuna provetta, pronta all’uso, i reagenti con le relative quantità come di seguito indicati:

1 µl di Forward Primer (25 pmol/µl),

1 µl di Reverse Primer (25 pmol/µl),

1 µl di prodotto della Multiplex PCR precedentemente diluito, 22 µl di H₂O.

Prima di inserire le provette nell’amplificatore è stato aggiunto 1 µl di olio per PCR per evitare l’evaporazione della miscela di reazione. Per la Nested PCR di tutti i Markers (Sag1, Sag2, Sag3, Btub, Gra6, C22-8,C29-2, L358, Pk1) sono stati utilizzati le

condizioni di amplificazione illustrate in **tabella 9**. Per la Nested PCR del Marker Apico sono state utilizzate le condizioni illustrate in **Tabella 10**.

Tabella. 9 ‘PROGRAMMA DI AMPLIFICAZIONE NESTED PCR ‘

STEP	FASE	TEMPO	TEMPERATURA	N° CICLI
1	DENATURAZIONE INIZIALE	4'	95°C	1
2		30''	94°C	35
		1'	60°C	
		3'	72°C	

**Tabella. 10 ‘PROGRAMMA DI AMPLIFICAZIONE NESTED PCR’
(MARKER Apico)**

STEP	FASE	TEMPO	TEMPERATURA	N° CICLI
1	DENATURAZIONE INIZIALE	4'	95°C	1
2		30''	94°C	35
		1'	58°C	
		3'	72°C	

Fase 4 Digestione enzimatica

Dopo Nested PCR si è proceduto alla digestione enzimatica utilizzando gli enzimi di restrizione indicati in tabella2

Dopo Nested PCR sono stati prelevati 5 µl del prodotto di reazione e sono stati digeriti mediante gli enzimi di restrizione (Tabella 2) aggiunti nelle seguenti quantità:

- 2,5 µl di buffer
- 3U di enzima

Ottenendo un volume finale di 20 µl.

Per la temperatura di digestione enzimatica sono state utilizzate le condizioni illustrate in Tabella 11.

Tabella. 11 ‘PROGRAMMA DI DIGESTIONE ENZIMATICA’

STEP	FASE	TEMPO	TEMPERATURA	N° CICLI
1	DENATURAZIONE INIZIALE	4'	95°C	1
2		30''	94°C	35

4.1 Temperature di Digestione enzimatica

Per la digestione enzimatica occorre portare a 37° per 1 h tutti i marcatori genetici, tranne, per Alt Sag2, BTUB, C22-8 che seguono altre temperature di digestione enzimatica (**Tabella 2**).

(*Alt Sag2 30'a 37°C e 65°C per 30')

(**BTUB 60°C per 1')

(***C22-8 37°C per 30' e 55°C per 30')

Fase 5° Corsa elettroforetica

Dopo la digestione enzimatica sono stati prelevati 15 µl di ciascun prodotto e sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di Agarosio al 2,5%. Oltre ai prodotti di digestione è stato caricato sul gel di Agarosio al 2,5% sia il marcatore di pesi molecolare noto Ladder 25bp che i ceppi ATCC di *Toxoplasma gondii* (solamente per il marcatore Apico è stato utilizzato un gel di Agarosio al 3%). Dopo la corsa elettroforetica sono stati comparati i profili elettroforetici dei campioni con quelli dei ceppi di riferimento noti di *Toxoplasma gondii* e con il marcatore di pesi molecolare noto Ladder 25bp, ottenendo l'identificazione del ceppo di appartenenza dei campioni. La lunghezza dei frammenti di restrizione dei DNA di riferimento sono stati riportati in **Tabella 3**.

Ceppi ATCC di *Toxoplasma gondii*

- ❖ ATCC 50853 (GT1-F3) Type 1
- ❖ ATCC 50841 (PTG (PLK)) Type 2
- ❖ ATCC 50842 (CTG) type 3
- ❖ ATCC PRA 356 (TgCgCa1) con caratteristiche miste Type 1- Type 2- Type 3
- ❖ ATCC 50870 (MAS) Type 1 - Type 3
- ❖ ATCC PRA 342 (TgCatBr5) che ha caratteristiche sia Type 1 che Type 3
- ❖ ATCC 50838 (RH88) TYPe 1
- ❖ ATCC 50174 D (RH) Type 1-Dna genomico

Profili elettroforetici delle bande di Restrizione dei controlli positivi di *Toxoplasma gondii*

Tipo I: ATCC 50174 DNA; Tipo II (1) ATCC 50841; Tipo III ATCC 50951; MAS (3) ATCC 50870; TgCatBr5 (7); Pra-342

Figura 5: Marker Apico

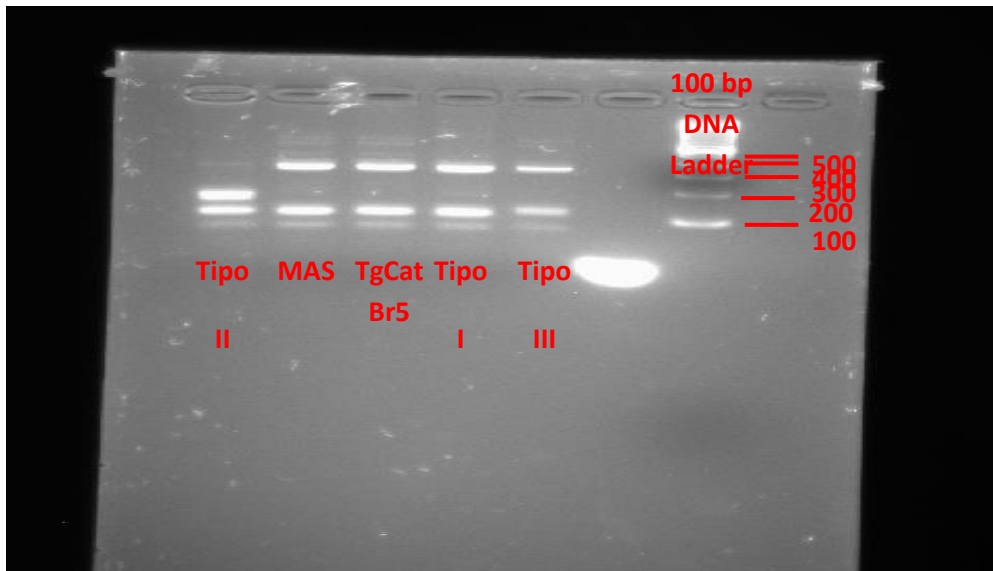


Figura 6: Marker 3' SAG2 ; 5' SAG2, alt.SAG2

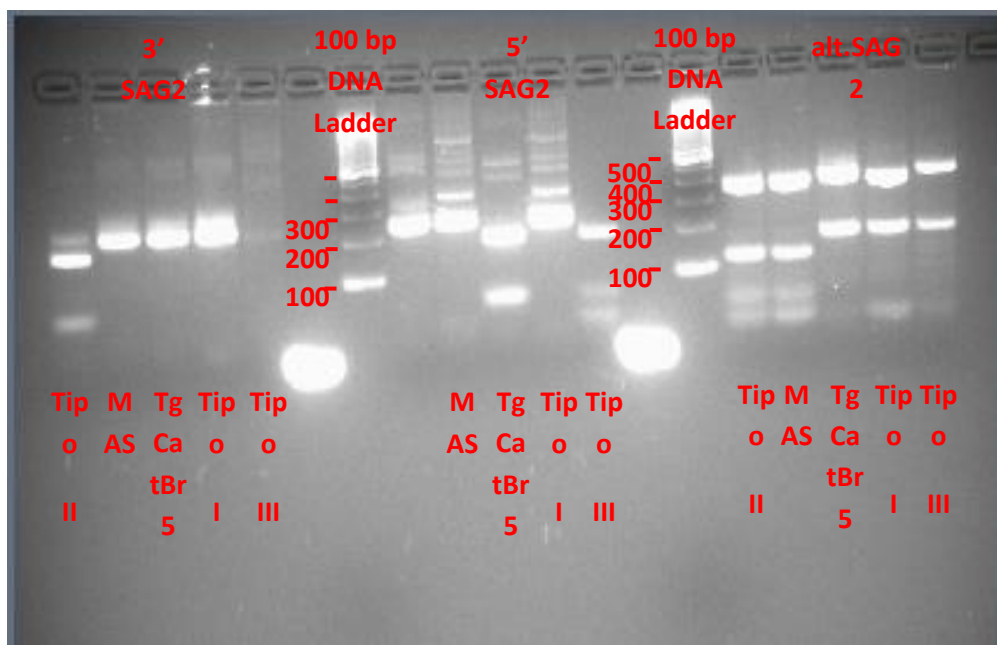


Figura 7: Marker SAG1; c22-8

Tipo I: ATCC 50174 DNA; Tipo II (1) ATCC 50841; Tipo III ATCC 50951; MAS (3) ATCC 50870; TgCatBr5 (7); Pra-342

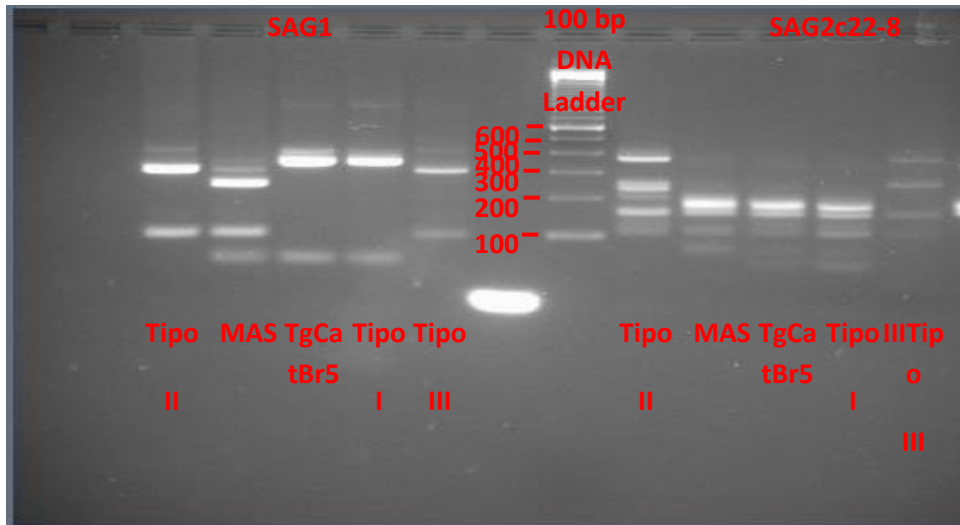


Figura 8: Marker C29-2

Tipo I: ATCC 50174 DNA; Tipo II (1) ATCC 50841; Tipo III ATCC 50951; MAS (3) ATCC 50870; TgCatBr5 (7); Pra-342

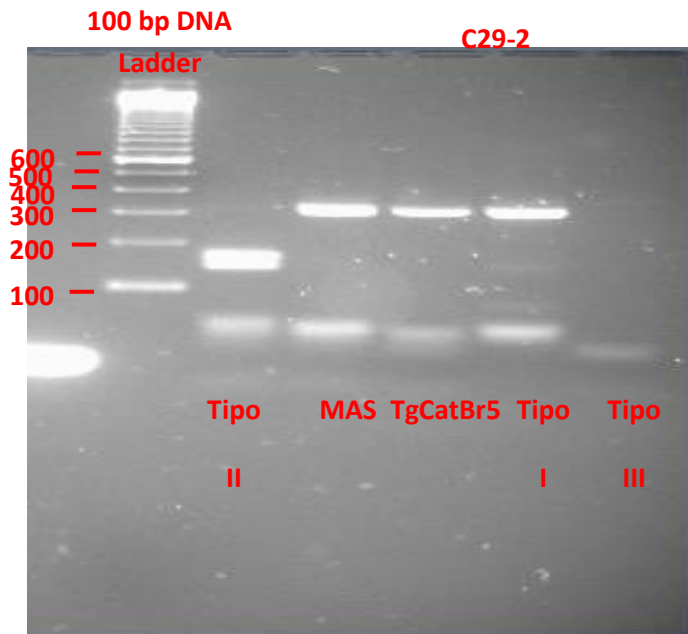
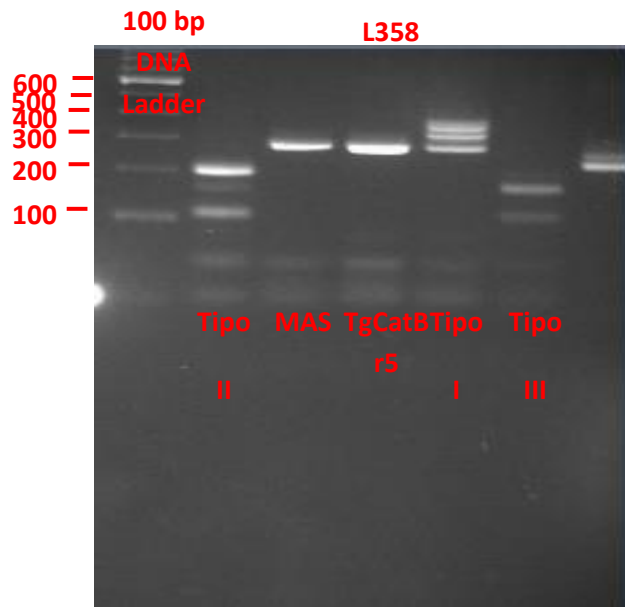
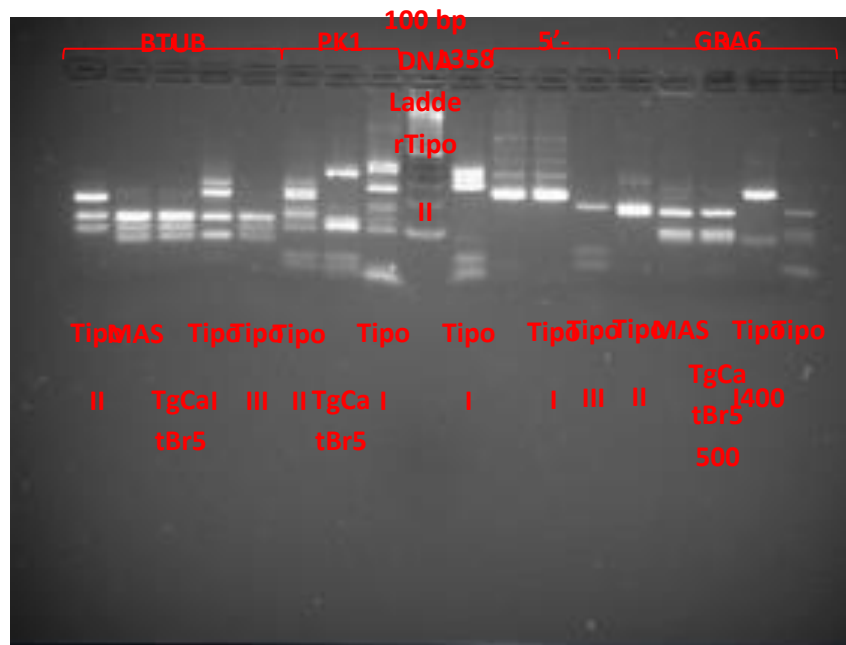


Figura 9: Marker L358



Tipo I: ATCC 50174 DNA; Tipo II (1) ATCC 50841; Tipo III ATCC 50951; MAS (3) ATCC 50870; TgCatBr5 (7): Pra-342

Figura 10: Marker BTUB; PK1; 5'-SAG2;GRA6



Tipo I: ATCC 50174 DNA; Tipo II (1) ATCC 50841; Tipo III ATCC 50951; MAS (3) ATCC 50870; TgCatBr5 (7): Pra-342

Figura 11: Marker SAG3



Tipo I: ATCC 50174 DNA; Tipo II (1) ATCC 50841; Tipo III ATCC 50951; MAS (3) ATCC 50870;

3.1.5 METODO NGS

Per le attività di genotipizzazione NGS i frammenti polimorfici sono stati previamente analizzati su gel di Agarosio e poi sono stati marcati alle due estremità con gli appositi adattatori Illumina e indexati per consentirne la determinazione.

Per questa tecnologia sono stati utilizzati i seguenti materiali di riferimento per le attività di validazione:

- 1 DNA ATCC 50174D (Tipo I)
- 2 DNA estratto dai ceppi ATCC 50841 (Tipo II), ATCC 50842 (Tipo III) e ATCC PRA-342 (Atipico).

Le fasi operative previste dal metodo, sono state quelle di seguito schematizzate:

1. Generazione dei marcatori del pannello MLST
2. Analisi delle sequenze MLST
3. Analisi dei dati per la definizione dei gruppi.

1. Generazione dei marcatori del pannello MLST

I DNA dei campioni da analizzare sono stati amplificati per la generazione dei marcatori MLST mediante PCR in modalità Nested, impiegando il pannello di primers riportato nella **Tabella 12**. Invece per l'amplificazione sono state utilizzate le temperature indicate in tabella **13**.

Tabella 12 'PRIMERS IMPIEGATI PER LA GENERAZIONE DEL PANNELLO MLST'

ID Ampliconi	Sequenze Primers PCR First (5'-3')	Sequenze Primers PCR Nested (5'-3')
SAG3	F: CAACTCTCACCATTCCACCC R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	F: TCTTGTCGGGTGTTCACTCA R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA
SAG2	F: TCTGTTCTCCGAAGTACTCC R: TCAAAGCGTGATTATCGC	F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC R: AACGTTTCACGAAGGCACAC
SAG1	F: GTTCTAACCACGCACCCTGAG R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG
GRA6	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R: GCACCTTC GCTTGTGGTT	F: TTTCCGAGCAGGTGACCT R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG
c29-2	F: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA	F: AGTTCTGCAGAGTGTCCG

	R: AGGGTCTCTTGCGCATACAT	R: TGTCTAGGAAAGAGGCGC
BTUB	F: TCCAAAATGAGAGAGAAATCGT R: AAATTGAAATGACGGAAGAA	F: GAGGTCATCTCGGACGAACA R: TTGTAGGAACACCCGGACGC
L358	F: TCTCTCCGACTTCGCCTCTTC R: GCAATTCCTCGAAGACAGG	F: AGGAGGCGTAGCGCAAGT R: CCCTCTGGCTGCAGTGCT

Tabella 13 ‘Programma di amplificazione della reazione di PCR First Multiplex’

STEP	FASE	TEMPO	TEMPERATURA	N° CICLI
1	DENATURAZIONE INIZIALE	4’	95°C	1
2	Ripetizioni di PCR	30’’	94°C	30
		1’	55°C	
		2’	72°C	

I prodotti di amplificazione First ottenuti sono stati diluiti in rapporto 1:1(v/v) con acqua sterile per biologia molecolare, quindi da ciascun prodotto diluito è stato prelevato 1µl e processato mediante PCR Nested utilizzando dei primers opportunamente modificati alle estremità 5’, con adattatori utili alle successive fasi analitiche previste per la creazione del pannello MLST (Manuale Illumina- *16S Metagenomic library preparation, Part 15044223 Rev.B*). Per il processo di amplificazione sono stati utilizzati i parametri indicati in Tabella 14.

Tabella 14 ‘Programma di amplificazione della reazione di PCR Nested’

STEP	FASE	TEMPO	TEMPERATURA	N° CICLI
1	DENATURAZIONE INIZIALE	4’	95°C	1
2	Ripetizioni cicli di PCR	30’’	94°C	35
		1’	60°C	
		3’	72°C	

L’effettiva presenza del prodotto di amplificazione Nested è stata verificata mediante la corsa elettroforetica su gel di Agarosio 1,5% (p/v) in TBE Buffer 0,5%. I prodotti di

amplificazione Nested sono stati purificati mediante un kit su colonnina e processati mediante una reazione di amplificazione, al fine di inserire alle estremità di ciascun amplicone una coppia di index differenti. Per la reazione di amplificazione PCR-INDEXT sono stati utilizzati parametri indicati nella Tabella 15.

In Tabella 15 “Programma di amplificazione PCR-INDEXT”

STEP	TEMPO	TEMPERATURA	N° CICLI
1	3’	95°C	1
2	30’’	95°C	8
	30’’	55°C	
	30’’	72°C	
3	5’	72°C	1

Gli ampliconi marcati sono stati purificati, opportunamente diluiti fino ad una concentrazione finale di 4nM e raggruppati in base alle loro dimensioni, secondo lo schema riportato in Tabella 16.

Tabella 16 “Schema Raggruppamento degli ampliconi”

ID Gruppo	ID Ampliconi	Dimensioni Ampliconi
A	SAG3	225 bp
	SAG2	222 bp
B	SAG1	390 bp
	GRA6	344 bp
C	c29-2	446 bp
	BTUB	411 bp
	L358	418 bp

In particolare, si è proseguito per diluizioni e valutazioni spettrofotometriche successive fino ad ottenere un’uniformità delle concentrazioni. Quindi sono stati raggruppati

volumi uguali di ciascuno dei prodotti al fine di ottenere una mix finale alla concentrazione 4nM. I gruppi di ampliconi ottenuti sono stati caricati nel sequenziatore ed i dati di sequenza ottenuti sono stati interpretati mediante tools bioinformatici.

2. Analisi delle sequenze MLST

L'evidenza della buona riuscita del test è stata affidata al classico gel di Agarosio che ha permesso di visualizzare le bande di amplificazione di peso molecolare atteso per ciascun marcatore.

3. Analisi dei dati per la definizione dei gruppi

L'analisi dei dati ottenuti è stata svolta mediante applicazione di software quali:

- Trimming
- Filtraggio di qualità
- Mappatura su reference
- Creazione consensus
- Analisi su IGV per la visualizzazione dei polimorfismi
- Esportazione consensus
- Allineamenti
- locali
- Analisi BLAST
- Elaborazione albero filogenetico: meto Maximum Likelihood

4. Risultati

L'analisi biomolecolare per la ricerca di *T. gondii* è stata effettuata su n. 132 campioni di acqua, prelevati da fiumi, laghi e mare della Sicilia Orientale, secondo la distribuzione riportata nella Tabella 17 che contiene anche la sintesi degli esiti degli esami di laboratorio.

Mediante i metodi molecolari descritti nel precedente paragrafo “Materiali e metodi” è stato possibile rilevare l'eventuale presenza di *T. gondii*.

I risultati delle analisi di laboratorio del primo anno di attività hanno permesso di rilevare i seguenti 3/66 campioni di acqua esaminati quali positivi:

n. 1 campione del Lago di Ganzirri, n. 1 campione del Lago Dirillo, n. 1 del Fiume Dirillo, prelevati nel corso di sopralluoghi effettuati nei mesi di gennaio e dicembre 2021

e dai seguenti 3/66 campioni di acqua esaminati quali positivi, durante il secondo anno di attività:

n. 1 campione del Lago di Ganzirri, n. 1 campione del Lago Dirillo, n. 1 del Fiume Dirillo, prelevati nel corso di sopralluoghi effettuati nei mesi di marzo e novembre 2022.

Il totale dei campioni risultati positivi ottenuti è stato quindi di 6/132 (4,54%). Tutti i campioni di acqua prelevati dal mare sono risultati negativi.

E' interessante notare come la presenza del DNA di *Toxoplasma gondii* sia stata rilevata soltanto nei mesi invernali e non nei mesi estivi. Questo risultato è riconducibile alle precipitazioni del periodo invernale che determinano il dilavamento superficiale del terreno e l'accumulo delle oocisti di *T. gondii* nelle acque interne.

Le successive analisi di genotipizzazione multilocus completa di sei campioni di DNA di *T. gondii*, complesse ed indagative, hanno permesso di evidenziare che le forme infettanti del parassita erano riconducibili ai genotipi Gruppo II ed Atipico. In particolare, dal Lago Dirillo sono stati identificati due campioni di DNA (campionamenti del 2021 e del 2022) riconducibili al Gruppo II; dal Fiume Dirillo sono

stati identificati due campioni di DNA (campionamenti del 2021 e del 2022) anch'essi riconducibili al Gruppo II; dal Lago di Ganzirri sono stati identificati due campioni di DNA riconducibili rispettivamente per quello di cui al campionamento 2021 al Gruppo II e per quello di cui al campionamento 2022 all'Atipico. È stato pertanto confermato quanto già descritto in letteratura relativamente all'elevata presenza in Europa di ceppi del parassita appartenenti al Gruppo II ed alla rilevazione, sempre più frequente nell'ambiente, degli Atipici.

Tabella 17 “Campioni di acqua esaminati e risultati ottenuti”

Acqua	N. campioni 1° Anno (2021) (Gen/Giu/Dic)	N. campioni 2° Anno (2022) (Mar/Lug/Nov)	Totale campioni 2021- 22	Campioni Positivi PCR- Qualitativa	Esito RFLP/NGS
Biviere di Lentini o Lago di Lentini	3	3	6	0	0
Oasi Faunistica di Vendicari	3	3	6	0	0
Lago Dirillo	3	3	6	n.1: Gen-2021 n.1: Nov-2022	Genotipo II Genotipo II
Lago di Gurrida	3	3	6	0	0
Laghetto di Naftia)	0	0	0	0	0
Lago Pantano Gariffi	3	3	6	0	0
Lago Santa Rosalia	3	3	6	0	0
Lago di Ganzirri	3	3	6	n.1: Gen-2021 n.1: Nov-2022	Genotipo II Atipico
Località Gole dell'Alcantara	3	3	6	0	0
Fiume Dirillo	3	3	6	n.1: Dic-2021 n. 1: Nov-2022	Genotipo II Genotipo II
Fiume Irminio	3	3	6	0	0
Fiume Simeto	3	3	6	0	0
Mare Baia Arcile	3	3	6	0	0
Mare Vaccarizzo	3	3	6	0	0
Mare Playa di Catania	3	3	6	0	0
Mare Marina di Noto	3	3	6	0	0
Mare Fontane Bianche	3	3	6	0	0
Mare Giardini Naxos	3	3	6	0	0
Mare Letojanni	3	3	6	0	0
Mare Isola Bella (Taormina)	3	3	6	0	0
Mare Gioiosa Marea	3	3	6	0	0
Mare Pozzallo	3	3	6	0	0
Mare Marina di Ragusa	3	3	6	0	0
			132		

*) Laghetto prosciugato

5. Discussione e conclusioni

L'idea di estendere alle acque il monitoraggio della contaminazione ambientale da *Toxoplasma gondii* nasce dal frequente riscontro di casi di infezione nei mammiferi acquatici. La diagnosi di infezione in organismi marini che, per loro natura, non rientrano nel ciclo di trasmissione classico del parassita, rappresenta un vero rompicapo da tempo ormai all'attenzione dei ricercatori. Partendo dal presupposto che, per le peculiarità del ciclo biologico del parassita, le oocisti non possono che provenire dall'ambiente terrestre, è l'inquinamento antropogenico delle aree marine e costiere causato dalle acque reflue di derivazione industriale o urbane contaminate da oocisti di *T. gondii* l'elemento chiave nell'epidemiologia della toxoplasmosi negli habitat acquatici. Cionondimeno, l'estrema diluizione delle acque reflue e dei patogeni ivi veicolati pone la questione su come tali microrganismi siano propagati nell'ambiente marino fino a infettare i mammiferi.

Ricerche effettuate su lontre marine hanno evidenziato che quelle popolazioni che si nutrono di gasteropodi hanno una maggiore probabilità di essere infettate da *T. gondii*. Questo suggerisce che i gasteropodi possono trasportare il parassita nelle acque costiere, rappresentando una tappa iniziale nella trasmissione del parassita ai livelli trofici più elevati. Un ruolo non secondario nel rendere disponibili e persistenti i patogeni nell'ambiente marino, ivi compresi i sedimenti, potrebbe essere svolto dalle sostanze polimeriche extracellulari della flora microbica formate da polisaccaridi, aminoacidi e altri costituenti organici. Questi composti sarebbero in grado di favorire il trasporto acquatico di patogeni compresi i parassiti protozoi come *T. gondii* e la loro successiva incorporazione nelle reti trofiche, mediandone l'adesione ai macroaggregati marini alla deriva (c.d. neve marina) o direttamente ai biofilm delle strutture bentoniche comprese le alghe (Shapiro et al., 2014). Il passaggio dei parassiti lungo le biocenosi marine avverrebbe per il tramite di diverse specie di invertebrati o di pesci che alimentandosi per filtrazione sarebbero esposti ai macroaggregati ed ai patogeni in essi conglobati. Questo passaggio è già stato dimostrato per alcune specie di pesci filtratori, come le alici e le sardine, e di molluschi (ostriche e molluschi bivalvi) che possono ingerire e

trattenere oocisti di *T. gondii* agendo così da potenziali fonti di infezione per i predatori appartenenti ai livelli trofici superiori (Arkush et al., 2003; Massie et al., 2010).

I risultati ottenuti da questo studio hanno confermato la diffusione delle forme infettanti di *T. gondii* anche nell'ambiente acquatico della Sicilia orientale esaminata nella sua componente di acque lagustri, fluviali e marine.

I campionamenti eseguiti sono stati condotti in differenti stagioni dell'anno, al fine di porre in evidenza se la ricerca condotta potesse essere influenzata dalle differenti condizioni atmosferiche. I risultati ottenuti hanno dimostrato che durante i mesi delle stagioni autunnale ed invernale, caratterizzate da piogge maggiormente frequenti, è stato possibile rilevare la presenza di *T. gondii* nelle acque esaminate, mai rilevata invece durante i mesi estivi. La presumibile spiegazione di tali rilevamenti è da ricondurre al fatto che nei siti acquatici ambientali, durante le giornate piovose, sono defluite le acque dilavanti l'ambiente urbano, veicolando quanto era presente e insudiciava e contaminava strade, cortili, aziende zootecniche, discariche, ecc.

La rilevazione di DNA di *T. gondii* nei campioni di acqua prelevati in alcuni bacini quali lago e il fiume Dirillo e i laghi di Ganzirri è probabilmente da ricondurre alla diffusione del parassita in aree geografiche caratterizzate da una forte connotazione agricola e zootecnica (aree del lago e del fiume Dirillo) e da un'intensa urbanizzazione (area dei laghi di Ganzirri) rispetto ai siti di campionamento localizzati nel contesto di oasi faunistiche e riserve naturali (riserve naturali di Vendicari, delle Gole dell'Alcantara) nei quali non sono state rilevate tracce del parassita.

Per quanto riguarda la ricerca di *T. gondii* nei campioni di acqua marina, i risultati negativi dell'indagine non possono non aver risentito delle difficoltà oggettive legate alle caratteristiche dell'ambiente marino che condizionano in modo decisivo la trama di diffusione del parassita. L'assenza di contaminazione con DNA parassitario nei campioni prelevati è con tutta probabilità il risultato dell'estrema diluizione delle acque reflue potenzialmente contaminate anche quando il campionamento è effettuato sotto costa in prossimità di sbocchi di corpi d'acqua dolce come i torrenti. In tal senso, sarebbe auspicabile individuare un potenziale ospite paratenico acquatico (invertebrato, gasteropode, etc) da utilizzare come sentinella della presenza di oocisti di *Toxoplasma gondii* (Conrad et al., 2005) da utilizzare quando si opera in un contesto di

campionamento tecnicamente complesso come quello degli ecosistemi acquatici (Jones e Dubey, 2010).

In generale, la percentuale di campioni positivi rilevati, tra tutti quelli esaminati, è fine a se stessa e non vuole essere dimostrativa della entità della diffusione delle forme infettanti di *T. gondii* nell'ambiente acquatico, sia perché tale ambiente di riferimento è molto esteso e non era possibile preparare dei campioni rappresentativi della loro intera estensione, sia perché, per quanto sopra riportato, il livello di inquinamento dipende da alcuni fattori non stabili nel tempo. Tuttavia i risultati ottenuti, al pari di quelli di altri studi condotti in altri Paesi, che hanno dimostrato la contaminazione del suolo e dei prodotti vegetali ivi coltivati e conseguentemente anche quella delle acque ambientali limitrofe e indirettamente dei mitili e pesci edibili che ne erano ospitati e che, come è noto, non entrano nel ciclo vitale del parassita, hanno potuto confermare, anche per la Sicilia, la presenza del pericolo zoonotico espresso da *T. gondii* e la necessità di valutarne l'effettivo rischio per i bagnanti ed i consumatori, ad oggi assolutamente trascurato, anche dalla legislazione di riferimento.

Per tutto quanto su esposto e concludendo, ottenuta la dimostrazione sopra descritta, si ritiene necessario uno screening delle acque ambientali per la presenza di *T. gondii*, in associazione al monitoraggio che le Autorità competenti già compiono per altri agenti microbiologici.

Si ritiene inoltre fondamentale il dovere definire sempre quali genotipi di *T. gondii* vengono rilevati nell'ambiente e il dover condividere tali riscontri con l'ambito medico e veterinario, auspicando che avvenga anche l'analoga condivisione da parte di medici e veterinari con i biologi che si occupano della salvaguardia dell'ambiente.

I risultati ottenuti dimostrano la stretta correlazione tra i genotipi presenti nell'ambiente e quelli isolati in corso di infezione umana, rendendo sempre più necessaria e imprescindibile per questa patologia la valutazione del rischio ambientale per l'uomo e le altre specie recettive, mettendo in pratica l'applicazione dell'approccio *One Health* che richiama i professionisti dell'ambiente e della salute ad una stretta collaborazione finalizzata alla salvaguardia del pianeta e di tutti gli esseri viventi.

6. Bibliografia

- ✓ Aguirre A., Longcore T., Barbieri M., Dabritz H., Hill D., Klein P.N., Lepczyk C., Lilly E.L., McLeod R., Milcarsky J., Murphy C.E., Su C., VanWormer E., Yolken R., Sizemore G.C. The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies. *Ecohealth*. 2019; 16(2): 378–390.
- ✓ Alekseev A.Y., Reguzova A.Y., Rozanova E.I., Abramov A.V., Tumanov Y.V., Kuvshinova I.N., Shestopalov A.M. Detection of specific antibodies to morbilliviruses, Brucella and Toxoplasma in the Black Sea dolphin *Tursiops truncatus ponticus* and the beluga whale *Delphinapterus leucas* from the Sea of Okhotsk in 2002-2007. *Russian Journal of Marine Biology*, 2009; 35:494–497.
- ✓ Aramini J.J., Stephen C., Dubey J.P., Engelstoft C., Schwantje H., Ribble C.S. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiology & Infection* 1999; 122(2): 305-15.
- ✓ Arkush, K. D., Miller, M. A., Leutenegger, C. M., Gardner, I. A., Packham, A. E., Heckerroth, A. R., ... & Conrad, P. A. Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *International Journal for Parasitology* 2003; 33(10): 1087-1097.
- ✓ Bahia-Oliveira L.M., Jones J.L., Azevedo-Silva J., Alves C.C., Oréface F., Addiss D.G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2003; 9(1): 55-62.
- ✓ Benenson MW, Takafuji ET, Lemon SM, Greenup RL, Sulzer AJ. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *The New England Journal of Medicine*. 1982; 307(11): 666-9.
- ✓ Bowie W.R., King A.S., Werker,D.H., Isaac-Renton J.L., Bell A., Eng S.B., Marion S.A. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team. *Lancet*. 1997; 350(9072): 173-7.

- ✓ Chen J., Li Z.Y., Zhou D.H., Liu G.H., Zhu X.Q. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* strains from different hosts and geographical regions revealed by sequence analysis of GRA5 gene. *Parasites & Vectors*. 2012, 5: 279.
- ✓ Conrad P.A., Miller M.A., Kreuder C., James E.R., Mazet J., Dabritz H., Jessup D.A., Gulland F., Grigg M.E. Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *International Journal for Parasitology*. 2005; 35(11-12): 1155-68.
- ✓ Dabritz H.A., Miller M.A., Atwill E.R., Gardner I.A., Leutenegger C.M., Melli A.C., Conrad P.A. Detection of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2007; 231(11): 1676-84.
- ✓ de Moura L., Bahia-Oliveira L.M., Wada M.Y., Jones J.L., Tuboi S.H., Carmo, E.H., Ramalho W.M., Camargo N.J., Trevisan R., Graça R.M., da Silva A.J., Moura I., Dubey J.P., Garrett D.O. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerging Infectious Diseases*. 2006; 12(2): 326-9.
- ✓ Dubey J.P. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Veterinary Parasitology*. 2006; 140(1-2): 69-75.
- ✓ Dubey J.P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*. 2004;126(1-2): 57-72.
- ✓ Dubey J.P. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, USA; 2010.
- ✓ Dubey J.P., Lindsay D.S., Hill D., Romand S., Thulliez P., Kwok O.C., Silva J.C., Oliveira-Camargo M.C., Gennari S.M. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* in sera of domestic cats from Brazil. *Brazilian Journal of Parasitology*. 2002; 88(6): 1251-2.
- ✓ Elmore S.A., Jones J.L., Conrad P.A., Patton S., Lindsay D.S., Dubey J.P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitology*. 2010; 26(4): 190-6.
- ✓ Fayer R., Dubey J.P., Lindsay D.S. Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitology*. 2004; 20(11): 531-6.

- ✓ Gerber S., Hohlfeld P. Screening for infectious diseases. *Childs Nerv Syst.* 2003;19(7-8): 429-32.
- ✓ Hall S.M., Pandit A., Golwilkar A., Williams T.S. How do Jains get toxoplasma infection? *Lancet.* 1999; 354(9177): 486-7.
- ✓ Hill D., Dubey J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection.* 2002; 8(10): 634-40.
- ✓ Jones, J. L., & Dubey, J. P. Waterborne toxoplasmosis—recent developments. *Experimental parasitology.* 2010; 124(1): 10-25.
- ✓ Jones J.L., Kruszon-Moran D., Wilson M., McQuillan G., Navin T., McAuley J.B. *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. *American Journal of Epidemiology.* 2001; 154(4): 357-65.
- ✓ Kaye A. Toxoplasmosis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. *Journal of Pediatric Health Care.* 2011;25(6): 355-64.
- ✓ Keenihan S.H., Schettters T., Taverne J. Toxoplasma in Brasil. *Trends Parasitology.* 2002; 18: 203-204.
- ✓ Khan A., Dubey J.P., Su C., Ajioka W., Rosenthal B.M., Sibley L.D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *International Journal for Parasitology.* 2011; 41(6): 645-655.
- ✓ Krueger W.S., Hilborn E.D., Converse R.R., Wade T.J. Drinking water source and human *Toxoplasma gondii* infection in the United States: a cross-sectional analysis of NHANES data. *BMC Public Health.* 2014;14: 711.
- ✓ Lass A., Investigation of *Toxoplasma gondii* in wastewater and surface water in the Qinghai-Tibet Plateau, China using real-time PCR and multilocus genotyping. 2022
- ✓ Marino A.M.F., Giunta R.P., Salvaggio A., Castello A., Alfonzetti T., Barbagallo A., Aparo A., Scalzo F., Reale S., Buffolano W., Percipalle M. *Toxoplasma gondii* in edible fishes captured in the Mediterranean basin *Zoonoses and Public Health.* *Zoonoses Public Health.* 2019; 00: 1-9.
- ✓ Marino A.M.F., Percipalle M., Giunta R.P., Salvaggio A., Caracappa G., Alfonzetti T., Aparo A., Reale S. Development and validation of a real-time PCR assay for the detection of *Toxoplasma gondii* DNA in animal and meat samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 2017; 29(2): 203-207.

- ✓ Massie, G. N., Ware, M. W., Villegas, E. N., & Black, M. W. Uptake and transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by migratory, filter-feeding fish. *Veterinary Parasitology*. 2010 169(3-4): 296-303.
- ✓ Meerburg B.G., Kijlstra A. Changing climate-changing pathogens: *Toxoplasma gondii* in North-Western Europe. *Parasitology Research*. 2009; 105: 17-24.
- ✓ Montoya J.G., Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004; 363(9425): 1965-76.
- ✓ Obusan M.C.M., Villanueva R.M.D., Siringan M.A.T., Rivera W.L., Aragonés L.V. *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* in stranded representatives of wild cetaceans in the Philippines. *BMC Veterinary Research*. 2019; 15: 372.
- ✓ Patz J.A., Graczyk T.K., Geller N., Vittor A.Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *International Journal for Parasitology*. 2000; 30: 1395–405.
- ✓ Pomares C., Ajzenberg D., Bornard L., Bernardin G., Hasseine L., Darde M.L., Marty P. Toxoplasmosis and horse meat, France. *Emerging Infectious Diseases*. 2011, 17(7):1327-8.
- ✓ Robert-Gangneux F., Dardé M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012; 25(2): 264-96.
- ✓ Santoro M., Viscardi M., Boccia F., Borriello G., Lucibelli M.G., Auriemma C., Anastasio A., Veneziano V., Galiero G., Baldi L., Fusco G. Parasite Load and STRs Genotyping of *Toxoplasma gondii* Isolates From Mediterranean Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Southern Italy. *Frontiers in Microbiology*. 2020; 5: 11:355.
- ✓ Shapiro, K., Krusor, C., Mazzillo, F. F., Conrad, P. A., Largier, J. L., Mazet, J. A., & Silver, M. W. Aquatic polymers can drive pathogen transmission in coastal ecosystems. *Proceedings Biological Sciences*. 2014; 281(1795).
- ✓ Sibley L.D., Mordue D.G., Su C., Robben P.M., Howe D.K. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philosophical Transaction of the Royal Society B*. 2002; 357 (1417): 81-88.
- ✓ Su C., Shwab E.K., Zhou P., Zhu X.Q., Dubey J.P. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 2010; 137(1): 1-11.

- ✓ Sun H., Zhuo X., Zhao X., Yang Y., Chen X., Yao C., Du A. The heat shock protein 90 of *Toxoplasma gondii* is essential for invasion of host cells and tachyzoite growth. *Parasite*. 2017; 24: 22.
- ✓ Tenter A.M., Heckeroth A.R., Weiss L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*. 2000; 30: 1217–58.
- ✓ Van Bresselem M.F., Raga J.A., Di Guardo G., Jepson P.D., Duignan P.J., Siebert U., Barrett T., Santos M.C., Moreno I.B., Siciliano S., Aguilar A., Van Waerebeek K. Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2009; 86: 143-157.
- ✓ Webster J.P. Rats, cats, people and parasites: the impact of latent toxoplasmosis on behavior. *Microbes and Infection*. 2001; 3(12): 1037-45.
- ✓ Weiss L.M., Ma Y.F., Takvorian P.M., Tanoiwitz H.B., Wittner M. Bradyzoite Development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 Stress Response. *Infection and Immunity*. 1998; 66(7): 3295-3302.
- ✓ WOAHA Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2017. Chapter 3.10.8, Section 3.10.
- ✓ Yan C., Liang L.J., Zheng K.J., Zhu X.Q. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors*. 2016; 9: 137.