



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**  
**FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA**

Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie

TESI DI LAUREA

**INDAGINE SULLA PRESENZA DI  
TOXOPLASMOSSI  
IN MAMMIFERI MARINI  
SPIAGGIATI**

**Relatore:** Prof. Mario Pietrobelli

**Correlatore:** Dott.ssa Federica Marcer  
Dott. Sandro Mazzariol

**Laureanda:** Luana Salvador

---

ANNO ACCADEMICO 2008-2009

# INDICE

## Parte generale

Introduzione.....	5
<b>1. I CETACEI.....</b>	<b>7</b>
Evoluzione.....	8
Struttura anatomica esterna.....	9
Sistema scheletrico.....	10
Respirazione e fisiologia dell'immersione.....	11
Sistema nervoso.....	12
Apparato digerente.....	13
Apparato urinario.....	14
Apparato riproduttore.....	14
<b>2. I CETACEI NEL MEDITERRANEO.....</b>	<b>15</b>
Geografia.....	15
Caratteristiche oceanografiche.....	16
Il bacino Corso-Ligure-Provenzale.....	16
Il Santuario dei Cetacei.....	17
Cetacei regolarmente presenti nel Mediterraneo.....	19
2.1. BALENOTTERA COMUNE.....	20
2.2. CAPODOGLIO.....	23
2.3. ZIFIO.....	26
2.4. GRAMPO.....	28
2.5. TURSIOPE.....	31
<b>3. LA TOXOPLASMOSI.....</b>	<b>36</b>
3.1. I PROTOZOI.....	36
3.2. GENERALITÀ ED EZIOLOGIA.....	38
3.3. MORFOLOGIA.....	40
Sede extraintestinale.....	40
Sede intestinale.....	42

Contaminazione ambientale.....	42
3.4. CICLO BIOLOGICO.....	44
Ciclo intestinale.....	45
Ciclo extraintestinale.....	47
3.5. MODALITÀ DI TRASMISSIONE.....	48
Modalità di trasmissione in ambiente acquatico.....	50
3.6. EPIDEMIOLOGIA.....	51
3.6.1. Epidemiologia nel gatto.....	52
3.6.2. Epidemiologia nell'uomo.....	53
3.6.3. Epidemiologia in mammiferi marini.....	54
3.7. PATOGENESI E SINTOMATOLOGIA.....	57
3.7.1. Nell'uomo.....	58
3.7.2. Negli animali domestici.....	60
3.7.3. In mammiferi marini.....	62
3.8. Anatomia patologica.....	63
3.8.1. Nell'uomo.....	63
3.8.2. Negli animali domestici.....	65
3.8.3. Nei mammiferi marini.....	65
Diagnosi differenziale.....	66
3.9. DIAGNOSI.....	67
3.9.1. Diagnosi sierologica.....	68
Sabin-Feldman Dye Test (DT).....	69
Immunofluorescenza indiretta (IFI).....	70
Agglutinazione diretta (DAT).....	71
Emoagglutinazione passiva (EAP).....	71
Fissazione del Complemento.....	72
Tecniche immunoenzimatiche (ELISA).....	73
Toxo IgM ISAGA (Immunoabsorbent Agglutination Assay).....	74
Western blot.....	74
Avidity Test.....	74
3.9.2. Tecniche dirette.....	75
Esame coprologico.....	75

Impression smear.....	75
Isolamento <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	76
Istologia e Immunoistochimica.....	76
Polimerase Chain Reaction (PCR).....	79
3.10. TERAPIA.....	82
3.11. PROFILASSI.....	83

### Parte sperimentale

<b>4. OBIETTIVI DEL LAVORO.....</b>	<b>87</b>
<b>5. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>88</b>
5.1. ESAME NECROSCOPICO DEI CETACEI.....	91
Classificazione della carcassa.....	91
Esame esterno.....	92
Esame interno.....	93
5.2. INDAGINI PARASSITOLOGICHE.....	95
5.2.1. Ricerca macroparassiti.....	95
5.2.2. Ricerca <i>Toxoplasma gondii</i> .....	98
Analisi molecolari.....	98
Esame istologico.....	101
<b>6. RISULTATI.....</b>	<b>102</b>
Caso 1.....	103
Caso 2.....	107
<b>7. DISCUSSIONE.....</b>	<b>113</b>
<b>8. CONSIDERAZIONI.....</b>	<b>120</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>123</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>151</b>



# PARTE GENERALE

## INTRODUZIONE

La toxoplasmosi è un'importante zoonosi considerata da più Autori come riemergente. La diffusione di questa malattia è mondiale e rappresenta un rischio sanitario soprattutto per la donna gravida a causa dei rischi che corre il feto, ma è importante anche per i soggetti immunodepressi, in particolare gli ammalati di AIDS. Sin dalla sua scoperta nel 1908 è stata studiata molto, anche se molti aspetti rimangono da chiarire. Il ciclo biologico di questo parassita è molto complesso, tanto che lo ha portato ad adattarsi in numerosi organismi e a condizioni ambientali non favorevoli. Ulteriore prova della diffusione di *Toxoplasma gondii* è il ritrovamento di oocisti nelle acque e negli organismi che popolano i mari, Cetacei compresi. Ciò sottolinea l'importanza di monitorare la malattia e di valutare i fattori di rischio per l'uomo.

Il ritrovamento di numerosi animali marini spiaggiati risultati positivi per *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. Infatti la toxoplasmosi non colpisce solo i mammiferi (Pinnipedi e Cetacei) 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 da tutti gli Oceani che caratteristicamente vivono al largo e nelle profondità marine: come facciano essi ad infettarsi tuttora è oggetto di studio, le ipotesi sono numerose e molte domande restano ancora aperte.

Anche i Cetacei che abitano i mari italiani non sembrano essere esenti dall'infezione da parte di questo parassita, anche se non si conosce in che misura. La patologia si può manifestare in maniera eclatante con il coinvolgimento di molti organi e causare la morte; in particolare si pensa che le cisti cerebrali possano dare disturbi

nell'orientamento e causare il fenomeno dello spiaggiamento. E' comunque appurato che la maggior parte delle nostre acque nazionali non godano di ottima salute, in particolare l'Adriatico, nel quale poco a poco vengono distrutti gli habitat di molte specie animali. La tutela dell'ambiente marino e costiero è fondamentale per garantire la sopravvivenza della fauna acquatica, in particolare dei Cetacei, così grandi ma incapaci di difendersi.

# 1. I CETACEI

I **Cetacei** (Cetacea, Brisson 1762) sono un ordine di mammiferi euplacentati, completamente adattatisi alla vita acquatica. Il nome cetaceo deriva dal greco κῆτος (kētos), che significa “balena” o “mostro marino” e fu introdotto da Aristotele per designare gli animali dotati di respirazione polmonare.

Classificazione scientifica (Myers *et al.*, 2008)

Regno: Animalia

Phylum: Cordata

Subphylum: Vertebrata

Classe: Mammalia

Sottoclasse: Theria

Infraclasse: Eutheria

Superordine: Laurasiatheria

Ordine: Cetacea (Brisson, 1762)

Sottordini:

- Mysticeti
- Odontoceti
- Archaeoceti † (estinti)

I Cetacei viventi sono divisi in due sottordini:

- i **Mysticeti** (“Cetacei con i baffi”, dal greco mystax/mystakòs, ossia baffi) dotati di fanoni (Revelli, 2006). I fanoni sono delle strutture presenti nella mascella superiore che agiscono da setaccio e che sono costituiti da cheratina. Tale struttura permette di filtrare il plancton dall'acqua (Notarbartolo di Sciara, 2004).

Ai Mysticeti appartengono le seguenti famiglie (Myers *et al.*, 2008):



- Balaenidae
  - Balaenopteridae
  - Eschrichtiidae
  - Neobalaenidae
- gli **Odontoceti** “cetacei con i denti” (dal greco odous/odontòs che significa dente) (Revelli, 2003). Si nutrono principalmente di pesci e/o calamari. Questi Cetacei hanno un'abilità eccezionale nel percepire l'ambiente circostante mediante la ecolocalizzazione (Cagnolaro *et al.*, 1983).

Vi appartengono le seguenti famiglie:

- Delphinidae
- Monodontidae
- Phocoenidae
- Physeteridae
- Platanistidae
- Iniidae
- Ziphiidae

Esiste un terzo sottordine al quale appartengono le specie estinte che prendono il nome di Archaeoceti (Myers *et al.*, 2008).

## EVOLUZIONE

I Cetacei rappresentano uno degli ordini di Mammiferi più altamente specializzato, avendo acquisito l'adattamento più spinto per la vita acquatica, divenuta per essi esclusiva durante tutta l'esistenza, ancor più che per i Sirenidi; questi ultimi, infatti, possono talora recarsi sulla terraferma (per esempio le rive dei fiumi) ed hanno comunque adattamenti meno profondi per la vita nell'ambiente acquatico: ricordiamo infatti che gli aspetti fondamentali del loro ciclo riproduttivo quali il parto, lo svezzamento e l'educazione del cucciolo si svolgono ancora sulla terraferma. I Cetacei sono originati nel Paleocene, forse prima dei mammiferi terrestri; hanno subito nel corso della loro evoluzione delle profonde trasformazioni anatomiche, che

hanno reso il loro aspetto e la loro organizzazione che si discosta sensibilmente dal tipo del mammifero terrestre. Oltre alle differenze anatomo-morfologiche possiamo ritrovare importanti specializzazioni fisiologiche, in particolare per quanto riguarda la respirazione, la circolazione del sangue e la capacità di affrontare lunghe e profonde immersioni.

## STRUTTURA ANATOMICA ESTERNA

I Cetacei presentano un corpo fusiforme, simile a quello dei pesci e degli Ittiosauri, rappresentando uno dei più significativi fenomeni di convergenza evolutiva; questo aspetto assicura loro una maggiore idrodinamicità. La linea idrodinamica è più accentuata nelle specie che nuotano a maggior velocità quali la maggior parte dei Delfinidi e delle Balenottere.

Il capo si lega al tronco senza soluzione di continuità poiché non esiste una regione del collo morfologicamente individuabile. Il muso termina con un rostro o “becco” (es. Delfini), oppure con un profilo curvo senza un rostro esternamente individuabile (che però è presente nello scheletro). L’apertura buccale è molto ampia, con una lunga rima, ma non presenta labbra paragonabili a quelle degli altri Mammiferi.

La comunicazione con l’esterno delle cavità nasali è rappresentata dallo sfiatatoio, singolo negli Odontoceti e doppio nei Mysticeti; esso è situato alla sommità del capo, in posizione centrale “periscopica”, in modo da consentire il suo diretto contatto con l’aria alla minima emersione col corpo.

Gli occhi sono piccoli e vengono protetti dalla salsedine tramite delle secrezioni oleose della ghiandola di Harder.

L’orecchio è privo di padiglione auricolare. Il condotto uditivo è stretto e tappato da cellule epiteliali e cerume. Il senso dell’udito possiede un’acuità eccezionale però la ricezione dei suoni avviene per trasmissione delle onde sonore attraverso il tessuto osseo del capo. I Cetacei non hanno corde vocali: i suoni vengono prodotti dalla laringe, che viene fatta vibrare come una cassa armonica, a bocca chiusa.

Gli arti anteriori sono modificati in pinne, molto ridotte, ma ben distinte dal tronco ed hanno esclusivamente una funzione direzionale (pinne pettorali); gli arti posteriori

come tali sono assenti, ma sono presenti solo alcune ossa vestigiali (rudimenti pelvici), non collegate al bacino e nascoste dentro il corpo. Nella maggioranza delle specie esiste una ben distinta pinna dorsale, impiantata sulla linea dorsale del corpo in una posizione variabile. Posizione e forma di tale pinna sono uno dei segni di riconoscimento quando si ha avvistamento in mare, essendo uno dei caratteri più facilmente osservabili quando l'animale nuota in superficie; tale elemento è assente però nelle balene. La pinna caudale è disposta orizzontalmente ed è divisa in due lobi.

L'epidermide nei Cetacei è sottilissima, generalmente priva di peli, in quanto la pelliccia perde la sua funzione coibentante, e sono isolati termicamente da uno spesso strato di grasso; estremamente liscia e senza peli, contribuisce a ridurre la resistenza dell'acqua secernendo olio o muco. Infatti è dotata, all'interno, di speciali creste cutanee che contrastano la formazione di vortici, così come particolari secrezioni oleose eliminano la turbolenza dell'acqua e ne agevolano lo scivolamento sulla superficie. La livrea dei Cetacei raramente è di colore uniforme (grigiastra o nera), nella maggior parte dei casi risulta composta da una mescolanza di tonalità brune e nero ardesia con bianco.

## SISTEMA SCHELETRICO

Lo scheletro dei Cetacei è formato prevalentemente da ossa di tipo spugnoso, impregnate di grasso, in maniera particolare nei Mysticeti. Esso è assai debole dal momento che non hanno alcun bisogno di sostenere il loro corpo.

Il cranio ha una forma cosiddetta "telescopica" dovuta al fatto che lo splancnocranio ha subito un processo di allungamento, mentre il neurocranio appare accorciato; la scatola cranica è breve e prevalentemente sviluppata in larghezza ed in altezza mentre mascellari, premaxillari e vomere sono molto allungati. Questo permette agli Odontoceti di avere una maggiore superficie per l'impianto dei denti cosicchè possano afferrare più prede e ai Mysticeti di aumentare la superficie filtrante dei fanoni e di conseguenza trattenere più plancton.

Nella colonna vertebrale sono distinguibili 4 regioni e non 5 come nei mammiferi terrestri poiché mancano le vertebre sacrali, a seguito dell'atrofia del bacino. La regione cervicale è composta da 7 vertebre, corte e spesso fuse in modo da conferire una grande forza al collo, impedendogli di flettersi e quindi costituire un ostacolo per il nuoto. Anche la regione toracica è dotata di scarsa mobilità. La regione più importante è quella caudale, dotata di straordinaria mobilità: sulle vertebre trovano inserzione i potentissimi muscoli motori, sviluppati sui due lati dei processi spinosi. La clavicola è assente, la scapola ampiamente sviluppata e le articolazioni sono immobili. Il numero di coste è variabile e una minima parte collegata allo sterno in modo molto lasso per permettere una maggiore escursione nei movimenti della cassa toracica.

## RESPIRAZIONE E FISIOLOGIA DELL'IMMERSIONE

E' noto che i Cetacei sono capaci di raggiungere profondità rilevanti (fino a 3000 m) e periodi di immersione prolungati: ciò è dovuto all'alta specializzazione raggiunta in particolare dagli apparati respiratorio e circolatorio.

Nei Cetacei le vie alimentari e respiratorie sono separate: la laringe attraversa la faringe e prosegue direttamente in cavità nasale. L'unico sbocco all'esterno è rappresentato dallo sfiatatoio. Il ritmo respiratorio è molto variabile e dipende dall'attitudine dell'animale a compiere immersioni a piccola, media e grande profondità. Se nei mammiferi terrestri il ciclo respiratorio è regolarmente intervallato da inspirazioni ed espirazioni, nei Cetacei il ricambio d'aria nei polmoni avviene in tempi molto brevi, durante le emersioni in superficie, con rapidissime inspirazioni ed espirazioni, che vengono intervallate da lunghi periodi in apnea. La riserva di ossigeno che il cetaceo utilizza durante le fasi di immersione non viene immagazzinata nei polmoni poiché sarebbe in contrasto con le esigenze imposte dalle alte pressioni: il motivo va ricercato nell'alta capacità di fissare un'altissima percentuale (circa il 90%) dell'ossigeno inspirato nel tessuto muscolare e nel sangue. Il sangue rappresenta una parte molto consistente nel corpo dei Cetacei rispetto al volume totale, e inoltre essi sono dotati di una concentrazione di emoglobina di gran

lunga superiore a quella dei mammiferi terrestri e che presenta la proprietà di combinarsi con l'ossigeno con un'affinità più elevata. Il medesimo discorso può essere sostenuto per la mioglobina all'interno dei muscoli.

Il cuore non è dissimile da quello dei mammiferi terrestri ed è particolarmente dotato di fibre elastiche nelle pareti. La frequenza cardiaca è maggiore al diminuire delle dimensioni della specie considerata; la bradicardia è un fenomeno che fisiologicamente si instaura durante le immersioni. La pressione sanguigna, però, ha il potere di rimanere costante, grazie alla riduzione del flusso nelle parti periferiche del corpo. Altra importante struttura adattativa è quella delle reti mirabili le cui funzioni principali sono: il risparmio energetico e la riserva di ossigeno. Per molti tratti infatti i vasi venosi ed arteriosi rimangono a contatto ed attuano scambi termici in modo che il sangue arterioso, prima di arrivare alla periferia, cede calore al sangue venoso che torna verso il cuore, evitando la dispersione di calore e quindi di energia. Le reti mirabili e le lacune venose hanno funzione di serbatoio di sangue che all'occorrenza viene mobilitato e ridistribuito mediante complessi meccanismi di regolazione del calibro dei vasi sanguigni. Ciò garantisce un'irrorazione costante di cervello e cuore, gli organi più importanti, durante i periodi di immersione.

Tuttavia c'è anche da considerare il fatto che i Cetacei sono meno sensibili agli effetti dell'anidride carbonica e dell'acido lattico prodotti dal metabolismo anaerobio e dal lavoro muscolare e ben sopportano il superamento della soglia dei valori critici.

## SISTEMA NERVOSO

Il sistema nervoso dei Cetacei è alquanto complesso e tuttora oggetto di studi. La massa cerebrale è più sviluppata in senso trasversale che longitudinale a causa della riduzione dei centri olfattivi e della telescopica del cranio. Le aree corticali destinate alla ricezione degli stimoli sonori sono le più sviluppate. Il cervello è caratterizzato da circonvoluzioni ed il cervelletto è molto sviluppato (Cagnolaro *et al.*, 1983).

Recentemente sono stati fatti degli studi con la tecnica della PET (Positron Emission Tomography) e della SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) per osservare il metabolismo cerebrale e il flusso sanguigno. Sono state evidenziate la

capacità dei Cetacei di utilizzare anche un solo emisfero cerebrale alla volta mentre l'altro si riposa e l'abilità di diminuire il consumo di ossigeno e glucosio nella maggior parte del cervello che può essere un vantaggio per effettuare dei movimenti natatori ripetitivi e prolungati durante la caccia (Ridgway *et al.*, 2006).

Non c'è dubbio comunque che siano degli animali con un livello intellettuale elevato, data la capacità di apprendimento, inventiva, curiosità e propensione al gioco anche nell'età adulta (Cagnolaro, 1983).

## APPARATO DIGERENTE

L'apertura buccale è molto larga ed estesa. Gli Odontoceti sono dotati di denti, circa 200, indifferenziati senza alcuna specializzazione legata ad esigenze alimentari. La prima dentizione è anche quella definitiva, ossia non esistono denti da latte. Gli Odontoceti sono animali "ghermitori" dato che catturano una per una le loro prede (pesci, molluschi) che afferrano senza masticare. Inoltre è probabile che lo sviluppo del biosonar sia correlato alla diversa modalità di alimentazione rispetto ai Mysticeti. I Mysticeti da adulti sono completamente privi di denti: sono presenti solo come abbozzo embrionale, ma in realtà non erompono mai; al loro posto si sviluppano i fanoni, un adattamento alla loro attitudine di animali "filtratori"; sono dotati inoltre di vibrisse tattili che permettono loro di avvertire la presenza di plancton.

Generalmente i Cetacei sono dotati di **3 camere gastriche**:

1. stomaco anteriore, con pareti tappezzate da epitelio pavimentoso scarsamente cheratinizzato e aghiandolare; svolge una funzione meccanica di sminuzzamento del cibo poiché viene ingoiato intero, grazie allo spesso strato muscolare e il pietrisco e la sabbia al suo interno;
2. stomaco medio, caratterizzato da una mucosa sollevata in pieghe e ricchissima di ghiandole gastriche;
3. stomaco posteriore o pilorico, con scarse pieghe e dotato di ghiandole piloriche.

Nell'intestino manca il tratto del cieco. Il fegato è trilobato e sprovvisto di cistifellea e la milza è di forma variabile.

## APPARATO URINARIO

I reni sono polilobati, costituiti da tante unità funzionali indipendenti chiamate “reniculi”. Ciò consente ai Cetacei di produrre una grande quantità di urina che ha una concentrazione maggiore dell’acqua marina dalla quale quindi possono ricavare i liquidi necessari al loro metabolismo, essendo in grado di eliminare i sali in eccesso.

## APPARATO RIPRODUTTORE

Per distinguere il sesso dei Cetacei è necessario esaminare la porzione ventromediana, perineale, compresa tra la regione genitale e l’ano. Nel maschio la distanza dell’apertura genitale dall’ano è maggiore che nella femmina. Inoltre le femmine sono dotate di due vistose pieghe ai lati dell’apertura genitale, all’interno delle quali sono protetti i capezzoli. Nei maschi spiaggiati ha luogo la vistosa fuoriuscita del pene, rendendo il riconoscimento più agevole. I testicoli sono intraddominali ed anche il pene normalmente è represso in una tasca cutanea.

L’utero è bicorni e durante la gestazione si forma una placenta di tipo epiteliocoriale e diffusa; la vagina è chiusa da una sorta di sfintere che chiude l’ingresso all’acqua. Le mammelle sono due e posizionate poco cranialmente rispetto all’apertura genitale. I capezzoli sono poco visibili anche durante l’allattamento e tramite il dotto galattoforo comunicano con il seno galattoforo della mammella. E’ da notare che il cucciolo non può succhiare il latte dal capezzolo come gli altri mammiferi, poiché si trova sott’acqua e per la particolare conformazione delle labbra non adatte alla suzione. Per tale motivo, è la madre stessa a inoculare il latte nella bocca del cucciolo spruzzandolo mediante la contrazione di appositi muscoli. Il latte è ricchissimo di lipidi e consente così l’accrescimento rapido del cucciolo. Lo svezzamento dura svariati mesi a seconda della specie e comunque termina prima della nascita di un altro cucciolo, ogni 1-2 anni circa, alla luce di una gravidanza che dura circa 12 mesi. I Cetacei sono poliestruali con picchi ovulatori stagionali, di solito in primavera ed autunno (Cagnolaro *et al.*, 1983).

## 2. I CETACEI NEL MEDITERRANEO

### GEOGRAFIA

Il Mar Mediterraneo viene considerato un bacino semichiuso: lo Stretto di Gibilterra è l'unica apertura che lo mette in comunicazione con gli altri mari del mondo che, però, risulta essere molto piccolo con un'ampiezza di circa 10 km e una profondità di poco superiore ai 300 metri. Il Canale di Suez, lo Stretto dei Dardanelli e quello del Bosforo sono ancora più piccoli e, in pratica, influenzano molto poco la vita del Mediterraneo.

### CARATTERISTICHE OCEANOGRAFICHE

Per poter studiare e comprendere la vita che si ha in un determinato ambiente, bisogna conoscerne le caratteristiche chimico-fisiche ed oceanografiche.

Nel Mar Mediterraneo vi è una circolazione di acqua fredda e leggera che entra da Gibilterra e si distribuisce sulla superficie del mare. Essendo un bacino semichiuso, nelle acque del nostro mare si verifica un'elevatissima evaporazione causata dall'irraggiamento solare e per questo si ha una maggior salinità delle acque interne al bacino. La salinità del Mediterraneo è infatti molto alta, 37-38‰, ossia ha una concentrazione salina di molto superiore alla media globale. Questa acqua più salata risulta essere anche più pesante e, di conseguenza, cade sul fondo del mare e tracima successivamente, dopo aver fatto il giro di tutto il bacino, attraverso lo Stretto di Gibilterra. In questa zona si hanno quindi due correnti di acqua differenti: una leggera e superficiale in entrata, e un'altra pesante e sul fondo in uscita.

Un'altra particolare caratteristica oceanografica del Mare Nostrum è la temperatura delle sue acque. Negli altri mari del mondo, si osserva normalmente una diminuzione della temperatura dalla superficie al fondo del mare; in Mediterraneo, invece, si hanno fluttuazioni stagionali molto elevate con una conseguente escursione termica nelle acque superficiali fino a 14°C, valore nettamente alto. In aggiunta, in



profondità, la temperatura si mantiene sempre costante, sia d'estate che d'inverno, intorno ai 13°C.

Il Mediterraneo viene considerato un mare povero e poco produttivo (oligotrofo) per quanto riguarda la produttività primaria, ossia la quantità di biomassa prodotta dagli organismi vegetali attraverso la fotosintesi. Il ciclo biologico della materia prevede che tutta la sostanza organica presente in mare, sottoforma di animali e vegetali, una volta morti gli organismi, cada sul fondo del mare e venga trasformata in sostanza inorganica grazie all'opera di particolari batteri decompositori che vivono sul fondo marino.

Ciò avviene anche in Mediterraneo, ma a causa della scarsità delle correnti ascensionali profonde (upwellings), che portano in superficie le sostanze nutrienti, il fenomeno si verifica in maniera minore e non sufficiente. Ciò causa una riduzione del numero di specie animali e vegetali rispetto a ciò che si osserva negli altri mari più produttivi. Tuttavia, grazie ad un fenomeno oceanografico particolare, questa "povertà" non si ha in una zona del Mediterraneo, ossia nel Bacino corso-ligure-provenzale (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

## IL BACINO CORSO-LIGURE-PROVENZALE

E' delimitato dalla costa italo-francese tra Genova e Tolone, la Corsica occidentale e la Sardegna occidentale. Esso è caratterizzato da una profondità media di 2300 metri ed è direttamente collegato all'Oceano Atlantico grazie ad una corrente superficiale proveniente dallo Stretto di Gibilterra. Questa corrente si biforca all'altezza dell'Algeria: un ramo si dirige verso le coste occidentali della Sardegna e della Corsica, l'altro costeggia la costa tirrenica italiana. In prossimità di Genova le due correnti si ricongiungono e si mescolano alle acque di origine continentale portate dal fiume Rodano. Un vortice ciclonico antiorario è tipico del Bacino Corso-Ligure-Provenzale durante la stagione estiva; esso crea una risalita delle acque profonde ricche di nutrienti, fenomeno noto con il nome di upwelling. Durante il periodo autunnale questo fenomeno è dovuto all'attività di venti provenienti dal continente, (tramontana e maestrale); ed è proprio questo rimescolamento verticale, in

concomitanza con altri parametri chimico-fisici e oceanografici, quali l'intensa evaporazione e l'immissione di nutrienti dal Rodano, a determinare le condizioni per una elevata produttività primaria, non riscontrabile in nessuna altra zona del Mar Mediterraneo.

Il Bacino Corso-Ligure-Provenzale è infatti la regione mediterranea in cui la presenza dei Cetacei è più massiccia, sia per quanto riguarda il numero di esemplari sia come diversità di specie (Revelli, 2003).

## IL SANTUARIO DEI CETACEI

A seguito del monitoraggio delle specie di Cetacei e il rilevamento di una forte concentrazione in questa zona di mare e dopo pressioni di diverse associazioni a favore della protezione degli animali e dell'ambiente, il 22 marzo 1993 i rappresentanti dei Ministeri dell'Ambiente di Francia e Italia e il Ministro di Stato del Principato di Monaco firmarono a Bruxelles una dichiarazione relativa all'istituzione in questa zona di un Santuario mediterraneo per i mammiferi marini (Notarbartolo di Sciara *et al.*, 1997). Il santuario dei Cetacei si estende in un'area protetta di vaste dimensioni, ben 87.500 chilometri quadrati, quasi due volte la Svizzera, la maggior parte dei quali in acque internazionali ed è delimitato ad ovest da una linea che va dalla punta Escampobariou (punta ovest della penisola di Giens) con posizione 43°01'N e 006°05'E fino a Capo Falcone, situato sulla costa occidentale della Sardegna (40°58'N e 008°12'E); ad est, una linea che va da Capo Ferro, situato sulla costa nord della Sardegna (41°09'N e 009°31'E) fino a Fosso Chiarone, situato sulla costa occidentale italiana (42°21'N e 011°31'E) (Scovazzi, 1993).

L'accordo definitivo del 25 novembre 1999 ha finalmente sancito la nascita di questa grande area marina protetta che ha preso il nome di Santuario Pelagos. Nel 2001 è arrivata la ratifica dell'accordo da parte dell'Italia (Notarbartolo di Sciara *et al.*, 2007).



Figura 1: Il santuario dei Cetacei [it.wikipedia.org](http://it.wikipedia.org)

## CETACEI REGOLARMENTE PRESENTI NEL MEDITERRANEO

Fino agli inizi del secolo scorso in realtà tutto il Mediterraneo era abitato da una fauna molto popolosa che comprendeva anche un grande numero di Cetacei. Le specie che oggi si possono avvistare regolarmente, più o meno frequentemente, sono 8:

- Balenottera comune (*Balaenoptera physalus*)
- Capodoglio (*Physeter catodon*)
- Zifio (*Ziphius cavirostris*)
- Globicefalo (*Globicephala melas*)
- Grampo (*Grampus griseus*)
- Tursiope (*Tursiops truncatus*)
- Stenella striata (*Stenella coeruleoalba*)
- Delfino comune (*Delphinus delphis*)

Ciascuna di queste specie possiede specifiche caratteristiche ed esigenze ecologiche, le quali ne determinano la distribuzione geografica a seconda delle diverse zone ambientali offerte dal Mediterraneo. Negli ultimi decenni però i loro habitat si sono ristretti a causa del degrado ambientale dato dalle attività antropiche, con la conseguente scomparsa di Cetacei in alcune zone nelle quali essi tradizionalmente vivevano in condizioni ottimali.

Ricerche compiute sui Cetacei nei mari italiani hanno rivelato l'esistenza di differenze significative tra le profondità delle acque preferite da ciascuna specie (Notarbartolo di Sciara *et al.*, 1990): Balenottera comune, Zifio e Globicefalo sono prettamente pelagiche e si trovano al largo di acque profonde 2000 metri o più; Capodoglio, Stenella striata e Grampo sono più frequenti in corrispondenza delle zone della scarpata continentale; il Delfino comune si localizza nelle zone intermedie tra scarpata e piattaforma continentale; infine il Tursiope è una specie cosiddetta neritica, ossia si mantiene in prossimità delle coste, a profondità inferiori ai 100 metri.

Qui di seguito vengono descritte singolarmente soltanto le specie che saranno oggetto della parte sperimentale:

## 2.1. Balenottera comune

Ordine: Cetacea

Sottordine: Mysticeti

Famiglia: Balaenopteridae

Genere: *Balaenoptera*

Specie: *Balaenoptera physalus* (Linnaeus, 1758)

(Myers *et al.*, 2008)



### STRUTTURA

E' l'unica specie di Mysticeto regolarmente avvistata nel Mediterraneo ed è il secondo animale più grande mai esistito al mondo, superata solo dalla Balenottera azzurra (*Balaenoptera musculus*). La femmina è sempre leggermente più grande del maschio: raggiunge la lunghezza di 24 m per un peso tra le 45 e le 75 tonnellate. Alla nascita misura tra i 5,5 e i 6,5 m e pesa circa 2 tonnellate.

La testa è cuneiforme, con la porzione superiore appiattita e divisa in due da una cresta longitudinale mediana che termina a livello di sfiatatoio. Il corpo è affusolato nella porzione centrale. La pinna dorsale può essere alta fino a 60 cm ed è orientata all'indietro, con la base a livello di inizio del terzo posteriore. La coda è possente con un marcato seno interlobare mentre le pinne pettorali sono molto piccole.

Il dorso è color grigio ardesia ed il ventre bianco così come la superficie inferiore delle pinne pettorali e della coda. La colorazione delle mandibole è asimmetrica: bianca a destra e ardesia a sinistra. Le caratteristiche distintive che permettono di riconoscere un individuo dall'altro sono lo chevron e il blaze, rispettivamente delle sfumature chiare sulla nuca a forma di V e sfumature più scure dello sfondo a livello di occhio ed ascella.

Il soffio è unico, a forma di cono rovesciato e arriva fino a 6 m.

## HABITAT E DISTRIBUZIONE

La Balenottera comune è una specie pelagica, ossia vive in mare aperto, in acque profonde e lontane dalla costa. La sua distribuzione è cosmopolita poiché ne esistono popolazioni in tutti gli oceani (rara però nelle acque tropicali).

Nel Mediterraneo questi animali popolano abbondantemente i bacini occidentale e centrale, mentre quello orientale è meno frequentato. In modo particolare in Italia la si può trovare in estate nel Mar Ligure, nel Mar di Corsica e nel Mar di Sardegna settentrionale; meno frequente è l'avvistamento al largo del Mar Tirreno e dello Ionio e nel Canale di Sicilia.

Le ricerche fatte sul DNA mitocondriale delle balenottere comuni hanno dimostrato che queste sono geneticamente distinguibili dalle balenottere atlantiche: ciò vuol dire che sono isolate dal punto di vista riproduttivo e quindi verosimilmente una popolazione endemica del Mediterraneo, non il frutto di una semplice migrazione dal vicino Atlantico.

Nel Mediterraneo la Balenottera comune (*Balaenoptera physalus*) viene considerata come animale minacciato ma non ancora in pericolo di estinzione dalla IUCN Red List.

## ALIMENTAZIONE

La componente principale della dieta di una Balenottera comune è il krill, costituito da Crostacei planctonici (Eufausiacei), pesci e Cefalopodi. La varietà di questa dieta è data dalla zona in cui si alimenta: nei mari antartici è più abbondante il krill, mentre nell'emisfero boreale c'è una maggiore varietà di pesci; nel Mediterraneo la dieta è costituita principalmente dal krill.

La tecnica di caccia dei pesci è particolare: si avvicina a notevole velocità ad un branco di pesci per buttarsi nel punto in cui questo è più fitto. Quindi, distendendo la regione golare, che può anche raddoppiare il diametro della parte anteriore del corpo, ingoia acqua e pesci.

## ETOLOGIA ED ORGANIZZAZIONE SOCIALE

La struttura sociale dei Mysticeti non è complessa come quella degli Odontoceti: la balenottera comune si raggruppa in gruppi di 6-7 individui ma non stabilisce legami duraturi con nessun compagno in particolare. L'argomento tuttavia è poco conosciuto; si ipotizza anche che i diversi esemplari possano tenersi in contatto a distanza di molti chilometri tramite segnali acustici, costituendo una sorta di "branco" anomalo.

## RIPRODUZIONE

Il ciclo riproduttivo della Balenottera comune segue dei ritmi stagionali che sono fortemente correlati alle sue migrazioni per la ricerca del cibo: passa l'estate in acque fredde sub-polari dove si alimenta per accumulare scorte energetiche che le serviranno durante la gestazione, mentre il concepimento avviene in inverno nelle acque temperato-calde e tropicali, dove la Balenottera comune si accoppia e partorisce dopo 11-12 mesi.

Lo svezzamento avviene all'età di 6 mesi e la maturità sessuale viene raggiunta a 8-12 anni in entrambi i sessi (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

## 2.2. Capodoglio

Ordine: Cetacea

Sottordine: Odontoceti

Famiglia: Physeteridae

Genere: *Physeter*

Specie: *Physeter catodon* (Linnaeus, 1758)

(Myers *et al.*, 2008)



### STRUTTURA

Il Capodoglio (*Physeter catodon*) è l'Odontoceto più grande: il maschio misura 18,3 m per un peso di 57 t; la femmina invece ha delle dimensioni decisamente più ridotte, arriva infatti a 12,5 m e a 24 t. Alla nascita il piccolo di Capodoglio misura 4 m e pesa 500-800 Kg.

Caratteristica esterna più evidente è la forma del capo, dal profilo squadrato e compresso lateralmente. La posizione dello sfiatatoio è diversa da tutte le altre specie: è situato sul rostro ma spostato a sinistra, in corrispondenza di una protuberanza, infatti il suo soffio è inconfondibile perché diretto appunto a sinistra e obliquamente. Il capo è così grande da mascherare la mandibola quando la bocca è chiusa. I denti sono presenti solo sulla mandibola, mentre nella mascella sono assenti perché non erompono mai. La rima buccale può essere orlata di bianco.

Il tronco si presenta grigio scuro uniforme, a volte con tonalità brunastre, e la cute ha un particolare aspetto corrugato longitudinalmente lungo i fianchi. La pinna dorsale è bassa, triangolare e ad angolo ottuso seguita da bozzellature che diminuiscono di dimensioni verso la coda. Le pinne pettorali sono corte mentre la coda è molto larga, con un marcato seno interlobare e dal margine caudale rettilineo.

Merita un cenno particolare l'organo dello spermaceti, accolto all'interno del capo e che ne dà la caratteristica forma. Quest'organo è costituito da tessuto spugnoso imbevuto di spermaceti, la cui composizione è data da esteri cerosi e trigliceridi. Non si conoscono le funzioni dello spermaceti ma si sono fatte molte ipotesi, per esempio potrebbe servire a controllare la galleggiabilità del corpo, oppure, allo stesso modo



del grasso acustico contenuto nella mandibola dei delfini, fungere da lente acustica; infine sarebbe necessario ad evitare l' accumulo di azoto nel sistema circolatorio durante le apnee.

L'ambra grigia è una sostanza odorosa, dal profumo muschiato, molto usata in profumeria che si trova in un numero ristretto di Capodogli e si forma all'interno dell'intestino crasso; un tempo si pensava fosse un ritrovamento patologico, in realtà non se ne conosce ancora la funzione e sembra si formi a partire dai becchi dei calamari ingeriti (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

## HABITAT E DISTRIBUZIONE

L'habitat del Capodoglio è il mare aperto, più specificatamente in tutte le acque con una profondità superiore ai 1000 m non coperte dai ghiacci e nelle zone di scarpata continentale. Le femmine e i giovani si trovano a latitudini non superiori ai 40°-50° e in acque nelle quali la temperatura della superficie è maggiore di 15°C; i maschi tollerano temperature più basse e si spingono fino ad ambienti subpolari (Taylor *et al.*, 2008). Popola tutti i mari del mondo; nel Mediterraneo è diffuso nel bacino Occidentale e si è verificato un notevole aumento degli avvistamenti nel Mar Ligure Occidentale e nei mari a ovest di Corsica e Sardegna, mentre rimangono regolari gli avvistamenti nel Canale di Sicilia e in Calabria. E' stata rilevata una regolare presenza anche a sud-ovest di Creta, nei mari della Grecia (Frantzis *et al.*, 1999).

Gli studi sul numero effettivo dei Capodogli nel Mediterraneo e nel mondo non sono sicuri ma la specie non sembra in pericolo di estinzione, anche se resta fra le specie minacciate nella IUCN Red List (Taylor *et al.*, 2008). Alcuni ricercatori hanno effettuato delle biopsie cutanee nei Capodogli ed è risultato che i livelli di cromo nella pelle sono 28 volte superiori a quelli degli uomini che non hanno avuto delle esposizioni a questo metallo pesante in ambito lavorativo; questi valori sono invece simili a quelli trovati nei polmoni di lavoratori morti di cancro, e sono quindi un indice di una forte contaminazione ambientale marina (Wise *et al.*, 2009).

## ALIMENTAZIONE

Il Capodoglio si nutre prevalentemente di calamari, dai più piccoli a quelli enormi, per esempio il famoso *Architeuthis dux* con il quale ingaggia leggendarie e affascinanti lotte negli abissi (Revelli, 2003); oltre ad essi si nutre talvolta anche di pesci. I denti non sono necessari al Capodoglio per la cattura delle prede, ma utilizza il biosonar per stordirle. In realtà non è mai stato osservato direttamente un Capodoglio in caccia per cui si possono fare solo delle ipotesi.

## ETOLOGIA ED ORGANIZZAZIONE SOCIALE

L'organizzazione sociale del Capodoglio ruota attorno a due tipi di aggregazione: i gruppi familiari, composto da femmine adulte e i loro piccoli, di circa 20 esemplari, e i gruppi di maschi detti "scapoli", costituiti da individui sessualmente maturi e di dimensioni simili. Il numero di maschi che compone il gruppo (fino a 50) è inversamente proporzionale alla loro mole, fino ad arrivare agli individui solitari di notevoli dimensioni. I due gruppi si uniscono durante il periodo riproduttivo invernale ma solo per poche ore, poiché i maschi cercano sempre nuovi gruppi di femmine. Le relazioni all'interno dei gruppi familiari sono stabili e rappresentano un'importante forma di coesione creando le condizioni per instaurare varie forme di apprendimento. In estate maschi e femmine si dividono definitivamente distribuendosi rispettivamente in acque polari e in acque temperate.

## RIPRODUZIONE

La gestazione dura 14-15 mesi per cui i piccoli nascono in primavera-estate e vengono svezzati a due anni, anche se possono continuare ad assumere il latte fino a quando sopraggiunge la maturità sessuale nella femmina (7 anni) e fino a 13 anni nel maschio, che diventa pubere a 18-21 anni. L'estro compare in una femmina ogni 3-5 anni (Notarbartolo di Sciarra e Demma, 2004).

## 2.3. Zifio

Ordine: Cetacea

Sottordine: Odontoceti

Famiglia: Ziphiidae

Genere: *Ziphius*

Specie: *Ziphius cavirostris* (Cuvier, 1823)

(Myers, 2008)



### STRUTTURA

Gli Zifiidi sono Cetacei di media taglia non strettamente imparentati né con il Capodoglio né con i Delfini (Revelli, 2003).

Lo Zifio è il secondo grande Odontoceto mediterraneo: misura 6-7 metri di lunghezza e pesa 3 tonnellate; la lunghezza media nel neonato è di 2,7 m. Il capo è piccolo, compresso lateralmente e con una piccola convessità data dal melone. Le femmine e i giovani non hanno denti mentre i maschi adulti ne possiedono soltanto due disposti sulla mandibola e che fuoriescono dalla rima boccale. Lo sfiatatoio è spostato a sinistra ed il soffio è inconsistente. Il corpo è siluriforme e tozzo, con una pinna dorsale piccola e triangolare, all'inizio del terzo posteriore. Le pinne pettorali sono piccole mentre la coda è piuttosto grande con un lieve segno interlobare. Per quanto riguarda le dimensioni non c'è dimorfismo sessuale.

La colorazione del corpo però può variare tra femmine e maschi: le prime possono essere grigie scure, bruno-rossicce o caffelatte con qualche sfumatura più chiara sul capo; i maschi, invece, sono generalmente grigio ardesia e bianchi sulla testa e sulla regione del tronco subito adiacente. Il piccolo ha un mantello nero-bluastro, col ventre più chiaro. Sul corpo di questi animali si osservano molto spesso delle macchie bianche (forse lasciate da ectoparassiti come la lampreda), gialle (date dalle diatomee, piccole alghe incrostanti), e delle graffiature (probabile risultato di lotte tra maschi).

## HABITAT E DISTRIBUZIONE

Lo Zifio predilige le acque temperate e tropicali con una profondità superiore ai 1000 m, il che ne fa un Cetaceo prettamente pelagico. Si può trovare in tutti i mari e gli oceani del mondo. Nel Mediterraneo frequenta maggiormente il bacino Occidentale ed è uno dei pochi Cetacei che viene avvistato con frequenza anche nel bacino Orientale. In Italia si sono avuti spiaggiamenti in Liguria, Lazio, Sardegna Orientale e Salento: la valutazione della presenza o meno dello Zifio si basa principalmente sugli spiaggiamenti e ciò non può dare delle informazioni attendibili sulla popolazione totale e sull'effettiva distribuzione; gli avvistamenti sono sporadici dato anche il suo carattere timido.

## ALIMENTAZIONE

Lo Zifio pare essere un cacciatore opportunista, ovvero si ciba delle prede che sono a disposizione nelle acque in cui si trova, quali pesci (in profondità superiori ai 1000 m) o calamari (nel Mediterraneo).

## ETOLOGIA ED ORGANIZZAZIONE SOCIALE

Del comportamento dello Zifio poco si conosce data la scarsità degli avvistamenti; sembra che ci siano sia esemplari solitari, sia gruppi di pochi individui.

Nulla si sa su possibili rotte migratorie.

## RIPRODUZIONE

Anche in questo caso si hanno poche informazioni: sembra che non ci sia una stagionalità degli estri e la maturità sessuale avviene al raggiungimento di 5,5 m di lunghezza (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

## 2.5. Grampo

Ordine: Cetacea

Sottordine: Odontoceti

Famiglia: Delphinidae

Genere: *Grampus*

Specie: *Grampus griseus* (Cuvier, 1812)

(Myers *et al.*, 2008)



### STRUTTURA

Il Grampo o Risso's dolphin è un Odontoceto di taglia medio-piccola, che raggiunge una lunghezza di 3,5 m e un peso di 400 Kg. Il piccolo misura 1,5 m alla nascita.

Il capo è rotondeggiante a causa della prominenza del melone che scende direttamente sul muso senza presenza di rostro. Il melone è diviso in due lobi simmetrici da un solco longitudinale. La rima buccale è incurvata verso l'alto.

Il corpo è nel complesso slanciato. La pinna dorsale è alta e falcata, in posizione mediana; le pinne pettorali sono lunghe e appuntite (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

I cuccioli alla nascita hanno una colorazione grigia uniforme ma, con il passare del tempo, acquisiscono sempre più graffi fino a diventare, negli esemplari più vecchi, completamente bianchi. Non si conosce il motivo per cui queste cicatrici rimangano per tutta la vita; esse sono dovute molto probabilmente alle interazioni sociali tra individui quali morsi o combattimenti, ma questo fenomeno si verifica anche tra le altre specie di Cetacei. Solo nei grampi, però, queste ferite non vengono eliminate e si mantengono nel tempo (Revelli, 2003). Pare che almeno alcune di queste cicatrici siano causate anche dai morsi dei calamari (Taylor *et al.*, 2008).

## HABITAT E DISTRIBUZIONE

Il Grampo è ampiamente distribuito nelle acque tropicali e temperate di entrambi gli emisferi (Leatherwood, 1980); preferisce spingersi in acque profonde in corrispondenza della scarpata continentale, specialmente sui fondali più ripidi (Kruse *et al.*, 1999). Il suo areale di distribuzione comprende il Mare del Nord, il Mar Baltico, il Mar dei Caraibi, il Golfo del Messico, il Mar Rosso e il Mediterraneo nel quale si avvista più frequentemente nel bacino occidentale.

Anche nel Mediterraneo i Grampi mostrano una preferenza per le acque profonde in zone dove il fondale scende più scosceso e in corrispondenza di canyon sottomarini (Cañadas *et al.*, 2002). La sua distribuzione varia a seconda dell'abbondanza di cibo e si sposta sopra e sotto la scarpata continentale per continuare a trovare disponibilità di prede, in particolare le grandi biomasse di calamari (Baumgartner, 1997). Nei mari italiani si trova abitualmente nel bacino Corso-Ligure-Provenzale, nel Tirreno e tra Ustica e le Eolie. Alcuni spiaggiamenti sono stati rilevati nel nord Adriatico (Notarbatolo di Sciara e Demma, 2004).

Non ci sono stime sulla popolazione totale del Grampo, ma solo alcuni studi focalizzati in aree specifiche. Non è comunque considerata una specie minacciata.

## ALIMENTAZIONE

In base al contenuto degli stomaci di Grampi spiaggiati è stato dimostrato che essi si nutrono quasi esclusivamente di Cefalopodi di diverse specie, anche se occasionalmente possono predare anche pesce e tunicati (Cockroft *et al.*, 1993; Blanco *et al.*, 2006) E' stato inoltre osservato che vi è differenza fra le specie delle prede dei maschi e delle femmine e anche fra le diverse taglie di Grampi; questo dato fa supporre che le risorse alimentari vengano ripartite tra sottogruppi. In genere tuttavia si nutrono di calamari, talora di seppie e polpi (Cockroft *et al.*, 1993).

Nel Mediterraneo il Grampo preferisce alimentarsi lungo le profondità medie della scarpata continentale, fra i 600 e gli 800 m (Blanco *et al.*, 2006).

Nelle poche aree in cui sono stati effettuati degli studi, sembra che si nutrano principalmente di notte (Taylor *et al.*, 2008).

## ETOLOGIA ED ORGANIZZAZIONE SOCIALE

Poco si conosce sull'organizzazione sociale del Grampo. Gli ultimi studi fanno supporre l'esistenza di 3 diversi gruppi sociali, chiamati "scuole": un tipo di scuola è costituito dalle femmine con i loro cuccioli fino a 5 anni d'età, dopodiché alla pubertà sia maschi che femmine lasciano la scuola d'origine e si raggruppano in base all'età a formare le cosiddette scuole giovanili. Le scuole femminili sono di solito seguite da gruppi di soli maschi adulti (scuole maschili). Le femmine all'interno di una scuola hanno una condizione riproduttiva simile; infatti dal gruppo familiare costituito da madri e cuccioli si separano, ad un certo punto, tutte le femmine in estro (Amano e Miyazaki, 2004). Questi tipi di strutture sociali sono molto simili a quelle di altri delfini oceanici, ad esempio la *Stenella striata* (*Stenella coeruleoalba*). Tuttavia è possibile che esistano branchi di individui di tutte le età e di entrambi i sessi all'interno dei quali avverrebbe un'intensa interazione sociale e la formazione di legami piuttosto stabili (Gaspari, 2004); stagionalmente si fondono in "supergruppi", in particolar modo nel Mediterraneo, il che ricorderebbe da vicino l'organizzazione sociale dell'Orca (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004). Nel bacino occidentale del Mediterraneo solitamente sono avvistati in gruppi che variano da 1 a 18 individui, ma i maggiori avvistamenti sono di 2 individui per gruppo (Gomez de Segura, 2006).

## RIPRODUZIONE

Per quanto riguarda la riproduzione del Grampo i dati a disposizione sono pochi: la femmina raggiunge la maturità sessuale attorno agli 8-10 anni (Amano e Miyazaki, 2004); nel maschio questo dato non è noto.

Si stima che la gestazione duri 13-14 mesi (Perrin e Reilly, 1984) e che la maggior parte dei parti avvenga in estate (Mizue e Yoshida, 1962). Lo svezzamento dura 12-18 mesi e la femmina va in calore ogni 3 anni circa (Amano e Miyazaki, 2004).

## 2.6. Tursiope

Ordine: Cetacea

Sottordine: Odontoceti

Famiglia: Delphinidae

Genere: *Tursiops*

Specie: *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821)

(Myers *et al.*, 2008)



### STRUTTURA

Il Tursiope è un delfino di grande mole, dalla corporatura tozza ma capace di movimenti agilissimi e aggraziati che si manifestano spesso sottoforma di giochi acrobatici fuori dall'acqua. Raggiunge una lunghezza media di 2,5-3,5 m per un peso fra i 270 e i 350 Kg; il maschio è più grande della femmina. Il neonato è lungo 1 m (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

I Tursiopi appartenenti all'ecotipo costiero sono più piccoli e dotati di pinne più larghe per aumentare la dispersione di calore; l'ecotipo pelagico sembra essersi adattato ad acque più fredde e profonde, in particolare certe caratteristiche del sangue gli fanno meglio sostenere immersioni profonde (Hersh e Duffield, 1990).

Il capo è sovrastato dal melone, separato dal rostro corto da un solco ben marcato. La pinna dorsale è alta e falcata, le pinne pettorali sono corte e sottili. La livrea è di diverse sfumature di grigio a seconda dell'individuo ed i contorni sono sfumati nelle diverse aree del corpo: il dorso è di un grigio più scuro che va schiarendosi sui fianchi fino al ventre di colore biancastro o rosato; anche la mandibola è bianca. Ad una più attenta osservazione di riconoscono disegni e sfumature tipici delle diverse popolazioni, a seconda del mare in cui si trovano: nel Mediterraneo ad esempio



possono essere confusi con le Stenelle striate a causa di una fiamma chiara che spicca dalla gualdrappa verso il torace.

## HABITAT E DISTRIBUZIONE

Il Tursiope è distribuito in tutte le acque temperate, tropicali e subtropicali del mondo (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004), dove la temperatura superficiale dell'acqua non scende sotto i 16°C (Barco *et al.*, 1999). Alcune specie prediligono le acque salate, altre le acque dolci.

Il Tursiope è una specie che si adatta con successo ai diversi tipi di habitat: può vivere sia in mare aperto che in zone costiere, anche ad una profondità minore di 30 metri. L'ecotipo costiero preferisce le acque basse e calde e si adatta a diversi tipi di fondali, quali lagune limacciose, baie, estuari dei fiumi, stretti, insenature e altre acque interne fin lungo l'esterno della linea di costa. Tuttavia si possono trovare anche Tursiopi negli oceani, in acque profonde della piattaforma continentale e all'interno della scarpata continentale. Non c'è dubbio che l'ecotipo più diffuso sia quello costiero (Hersh e Duffield, 1990).

Essi sono presenti nella maggior parte dei mari chiusi o semichiusi, come il Mediterraneo, il Mare del Nord, il Mar Nero, il Mar dei Caraibi, il Golfo del Messico, il Mar del Giappone ed il golfo della California. Nel Mediterraneo il Tursiope è la specie più diffusa dopo la Stenella striata (*Stenella coeruleoalba*) tanto che si poteva scorgere facilmente, fino a poco tempo fa, in tutte le coste, mentre ora la sua densità sta diminuendo forse per cause naturali, forse per l'intensa attività umana che si svolge nel suo habitat che è un fattore di disturbo per sottrazione di risorse alimentari (overfishing) e inquinamento, nonché per morte accidentale. Sono molto diffusi nel Mare di Alboran e nelle Baleari (Forcada *et al.* 2004; Cañadas e Hammond 2006); in Italia è la specie più diffusa: si trova in abbondanza nel Mar Ligure, nell'Arcipelago Toscano, nei mari di Corsica e Sardegna ed è l'unica a spingersi fino all'Adriatico settentrionale (Arcangeli *et al.*, 1997; Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004; Bedocchi, 2007).

## ALIMENTAZIONE

L'alimentazione del Tursiope è composta principalmente dal pesce (merluzzi, salmoni, triglie, acciughe, aringhe, naselli, merlani e altri) ma varia dai calamari ed altri Cefalopodi sino ai crostacei, a seconda della disponibilità (Blanco *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2001). L'ecologia e il comportamento delle specie di pesce preferite da questi delfini indica che essi si nutrono su fondali rocciosi o morbidi per la presenza di alghe e vicino alla costa (Amir *et al.*, 2005).

## ETOLOGIA ED ORGANIZZAZIONE SOCIALE

Grazie alla loro curiosità e al carattere socievole, il comportamento dei Tursiopi costieri è stato studiato a lungo; si conosce meno l'ecotipo pelagico.

L'unità familiare è l'elemento fondamentale su cui si basa la struttura sociale ed è composta dalle femmine con i loro piccoli. Quando i piccoli diventano indipendenti dalla madre lasciano il gruppo d'origine per formare un gruppo misto di giovani: le femmine torneranno una volta raggiunta la maturità sessuale, i maschi si uniranno fra loro per poi aggregarsi a diversi gruppi di femmine durante il periodo riproduttivo (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004). La socialità della madre influenza molto il futuro carattere del cucciolo: le femmine saranno lo specchio della madre, mentre i maschi l'opposto, per cui da madri molto socievoli si avranno figlie socievoli e figli che evitano il contatto sociale, al contrario madri solitarie genereranno femmine solitarie e maschi socievoli (Gibson e Mann, 2008).

Gli ecotipi costieri, a seconda delle zone, possono migrare o essere stanziali e costantemente presenti. In alcune aree costiere infatti le migrazioni dei Tursiopi sono stagionali e sembra siano dovute a cambiamenti nella temperatura delle acque ed all'abbondanza e distribuzione delle prede. È stato osservato come talvolta le acque costiere vengano utilizzate come area di nursery (Felix, 1994; Barco *et al.*, 1999). La maggior parte dei Tursiopi costieri però è stanziale. Non si sa invece se l'ecotipo pelagico sia soggetto a migrazioni.

L'alimentazione fa parte di un comportamento sociale perché, sebbene siano in grado, quando il cibo è più abbondante, di alimentarsi da soli, solitamente formano colonie di 6-20 individui per organizzare vere e proprie battute di caccia. Ancora più numerosi sono i gruppi che formano i delfini che vivono in pieno oceano dove possono arrivare ad unirsi centinaia di individui. E' stato osservato che nei Tursiopi costieri del Mediterraneo le dimensioni dei branchi si mantengono sempre piuttosto ridotte, in media 7 individui (Forcada *et al.*, 2004), al confronto con quelle riportate per le popolazioni oceaniche; il motivo di ciò risiede probabilmente nella mancanza di predatori (come squali ed orche) e nelle strategie alimentari rivolte essenzialmente a pesci bentonici che non richiedono tecniche di caccia in larghi branchi (Arcangeli *et al.*, 1997).

Una particolare tecnica di caccia utilizzata da alcuni Tursiopi è la strand-feeding o beach hunting, una tattica simile a quella usata dalle orche: i Tursiopi radunano prima i pesci verso le coste sabbiose, nuotando paralleli ad esse, poi li spingono sulla sabbia e se ne nutrono spiaggiandosi parzialmente o completamente. Infine tornano al mare, con un movimento ad U del corpo disteso sul fianco. La strand-feeding è una tecnica piuttosto pericolosa, per questo viene praticata generalmente nei periodi di alta marea. Può essere praticata da individui solitari o da gruppi di delfini che collaborano per la cattura dei pesci. È un comportamento che si sviluppa solo nei tursiopi nati da altri beach-hunters, ma studi effettuati sul DNA mitocondriale hanno portato ad escludere una trasmissione genetica di questa tecnica di caccia, per cui si pensa che i giovani la imparino osservando le loro madri che, al contrario delle orche, non sembra la insegnino intenzionalmente al piccolo (Silber e Fertl, 1995; Sargeant *et al.*, 2005). Un altro tipo di apprendimento è dato dall'ispezione delle prede catturate dalla madre e dagli adulti da parte dei cuccioli e dei giovani in modo da poter riconoscere quali sono le specie edibili: si tratta di una forma di apprendimento obliquo (Mann *et al.*, 2007).

Altri Tursiopi adottano una tecnica di caccia di inseguimento e ammassamento delle prede, ed è stato osservato che c'è una distribuzione dei ruoli: il delfino "pilota" insegue le prede verso una barriera costituita da altri delfini che si dispongono ad anello attorno ad esse aspettando che saltino verso la superficie per uscirne, venendo quindi afferrate al volo (Gazda *et al.*, 2005).

I Tursiopi usano l'ecolocalizzazione per individuare le prede, ma è anche probabile che il sonar serva a stordire e disorientare le prede, rendendone così più semplice la cattura.

In ultima analisi bisogna sottolineare però che fra tutti i tipi di tecniche di caccia ogni popolazione di Tursiope ne usa solo una: sembra che i Tursiopi non adattino la loro tattica alimentare a seconda della compatibilità con l'habitat, ma piuttosto scelgano l'habitat più adatto al loro comportamento di caccia (Torres e Read, 2009).

## RIPRODUZIONE

Le femmine raggiungono la maturità sessuale fra i 9 e gli 11 anni d'età, 2-3 anni prima dei maschi. Gli accoppiamenti e le nascite sono distribuiti durante tutto l'anno, con un picco di nascite in estate (Cockroft e Ross, 1990; Urian *et al.*, 1996). La gestazione dura 12 mesi e lo svezzamento circa 18 mesi e si conclude comunque prima della nascita di un altro cucciolo; l'intervallo tra una nascita e l'altra è di 3-4 anni. Tra i Tursiopi si verifica il fenomeno del babysitting: una femmina accudisce i cuccioli delle altre mentre queste vanno a cacciare (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

## 3. LA TOXOPLASMOSI

### 3.1. I protozoi

I protozoi sono organismi unicellulari eucarioti, autotrofi o eterotrofi, mobili, che si nutrono soprattutto per fagocitosi, sebbene vi siano numerose eccezioni. Se ne conoscono oltre 35.000 specie.

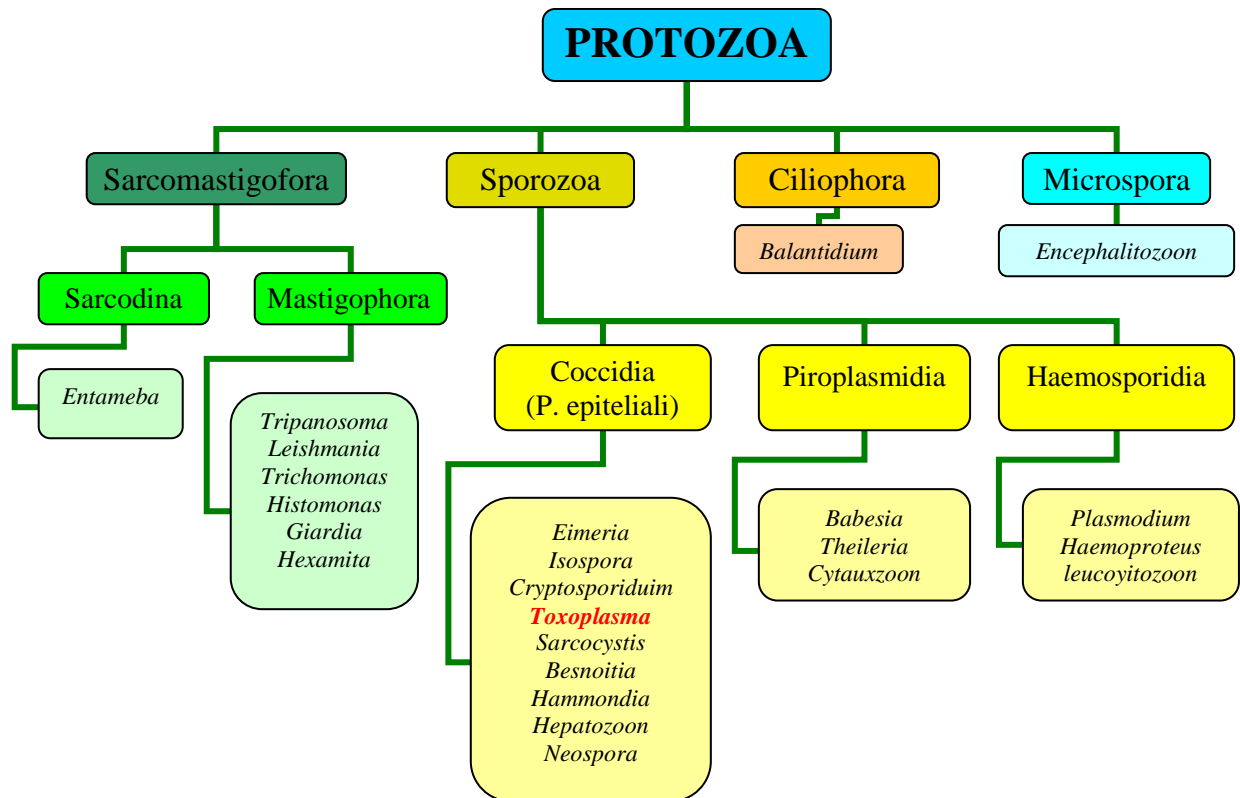
Popolano attualmente in numero sterminato mari, acque salmastre e dolci, e terreni umidi. Attecchiscono e si diffondono rapidamente ovunque, specialmente su materiali in decomposizione, sono sovente parassiti di altri organismi vegetali e animali e conducono spesso vita in simbiosi. Taluni bentonici presentano, a volte, modi di vita gregario o coloniale, sebbene la maggior parte di essi vivano come commensali o simbiotici. In mare costituiscono buona parte del plancton e del benthos.

I protozoi possiedono la struttura subcellulare tipica degli Eucarioti, ovvero un citoplasma, nel quale si ritrovano reticolo endoplasmatico, apparato di Golgi, lisosomi, e mitocondri (quest'ultima caratteristica tassonomicamente importante), e un nucleo che può essere unico (come appunto nel genere *Toxoplasma*), doppio o multiplo. Inoltre nel citoplasma si possono ritrovare cinetoplasti, corpi basali, da cui si dipartono i flagelli, assostile e un complesso apicale che consente di penetrare nelle cellule ospiti tramite azione enzimatica o meccanica.

In origine i protozoi sono stati considerati un sottoregno degli animali. Questa classificazione, proposta per la prima volta da Goldfuss nel 1818 divideva i protozoi in quattro classi: Flagellata, Ciliata, Sarcodina e Radiolaria, in riferimento a microorganismi capaci di muoversi.

Più recentemente, Cavalier-Smith (1993) ha proposto di creare un regno dei protozoi che comprendesse gli organismi eucariotici distinti da quelli che non hanno mitocondri (archezoi) e che non hanno i caratteri derivati comuni ad animali, funghi, piante, e cromisti.

In seguito viene riportata una classificazione dei protozoi di interesse parassitologico tratta da Urquhart, 1998:



Per quanto siano sovente dotati di movimenti autonomi, i loro spostamenti avvengono sostanzialmente per diffusione. Possono essere flagellati, come avviene nel Subphylum dei Sarcomastigofora, o provvisti di membrane ondulanti o ciglia.

In altri casi la locomozione viene garantita da movimenti ameboidi, grazie alla capacità del protozoo di formare dei prolungamenti detti pseudopodi, caratteristici della classe Sarcodina. Nel caso di *Toxoplasma* invece la locomozione avviene senza l'uso di ciglia, flagelli o pseudopodi, ma grazie alla contrazione di fibrille citoplasmatiche.

Molti protozoi si moltiplicano unicamente per via asessuata per mitosi, scissione binaria, gemmazione, o schizogonia, tuttavia, in ogni classe, esistono specie che presentano una riproduzione sessuale, ovvero la messa in comune di patrimoni ed informazioni genetiche fra cellule ed il successivo riassortimento delle informazioni: la gametogonia. In questo caso dai merozoiti si formano i gametociti che possono

essere simili o differenziati in gamete maschile (microgamete) o femminile (macrogamete). Dall'unione dei due gameti si forma lo zigote.

Con la sporogonia lo zigote si differenzia; al suo interno si formano delle sporocisti e all'interno di queste gli sporozoit.

Il riassortimento avviene attraverso un processo meiotico nucleare che può avvenire in tre fasi diverse del ciclo riproduttivo, e può precedere, seguire oppure essere intermedia alla riproduzione sessuale. Nel primo caso si ha un ciclo detto diplonte, dal momento che tutto il ciclo vitale è allo stadio diploide. Nel secondo caso tutto il ciclo vitale è aplonte e nel terzo caso il clone attraversa una fase diplonte a  $2n$  cromosomi a cui segue una fase aplonte ad  $n$  cromosomi che precede la formazione dei gameti per la riproduzione sessuale.

Alcuni protozoi attuano entrambe le fasi di riproduzione (sessuata e asessuata) in uno stesso ospite, altri attuano la fase asessuata nell'ospite vertebrato e la fase sessuata nel vettore che generalmente è un artropode.

## 3.2. Generalità ed eziologia

La toxoplasmosi è una malattia parassitaria, sostenuta dal protozoo *Toxoplasma gondii*, parassita intracellulare obbligato diffuso tra i mammiferi e gli uccelli, uomo compreso (Cancrini, 1996).

Il termine deriva dal greco *toxòn* che indica la forma ad arco del protozoo e *gondii* dal nome di un roditore nord-africano (*Ctenodactylus gondii*) da cui fu isolato per la prima volta il protozoo (Pietrobelli, 2003). Contemporaneamente in Brasile veniva isolato da un coniglio un altro parassita simile ma non considerato lo stesso: in tutti e due i casi si era pensato ad una relazione con la leishmaniosi (Ferguson, 2009).



Figura 2: *Ctenodactylus gondii* ([www.prodivesa.com/toxnov1.htm](http://www.prodivesa.com/toxnov1.htm))

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

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

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



Il gatto e in generale tutti i felini ne rappresentano gli ospiti definitivi, mentre i mammiferi in generale e i volatili rappresentano gli ospiti intermedi.

### 3.3. Morfologia

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

#### SEDE EXTRAINTESTINALE

Nelle **sedi extraintestinali** possiamo avere:

1. pseudocisti contenenti tachizoiti
2. cisti contenenti bradizoiti

Le **pseudocisti**, contenute nel citoplasma di diverse cellule (fibroblasti e macrofagi, ma anche epatociti e cellule miocardiche) sono delle formazioni rotondeggianti di 10-30  $\mu\text{m}$  e consistono in un vacuolo con all'interno alcune decine di **tachizoiti**, e rappresentano la fase proliferativa del parassita nelle forme acute e subacute di malattia.

I tachizoiti sono delle strutture a forma di semiluna con una delle due estremità appuntita e l'altra rotondeggiante di circa 6  $\mu\text{m}$  di lunghezza e 2-3  $\mu\text{m}$  di larghezza. All'interno della loro pellicola tristratificata si riscontra la presenza di un nucleo, l'apparato del Golgi, mitocondri, ribosomi, e altre strutture intracellulari.

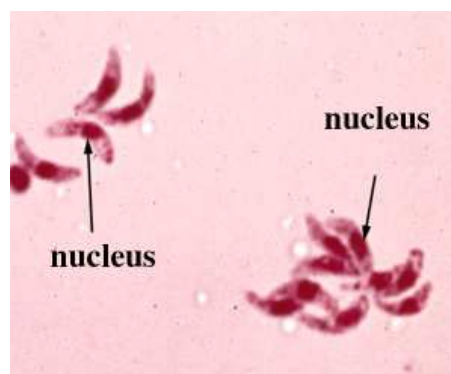


Figura 3: Tachizoiti di *T. gondii* ([www.umanitoba.ca](http://www.umanitoba.ca))

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

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

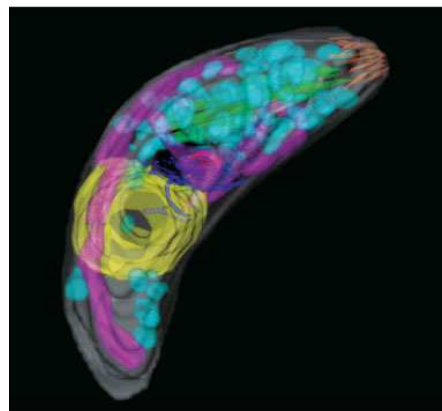


Figura 4: Modello tridimensionale di un tachizoite ricostruito da sezioni seriali, che mostra il singolo mitocondrio (magenta), il nucleo (giallo), i rhoptrii (verde), il complesso di Golgi (celeste), l'apicoplasto (rosso) e i granuli densi (blu) (Melo *et al.*, 2000)

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

Le cisti sono delle formazioni rotondeggianti a parete propria delle dimensioni variabili dai 7 ai 100  $\mu\text{m}$  . Queste invece che nei fibroblasti e macrofagi si possono ritrovare nei muscoli e nel tessuto nervoso: i bradizoiti al loro interno rappresentano la forma di resistenza del parassita durante la fase cronica della malattia. Le cisti si formano in pochi giorni e possono sopravvivere per anni, anche per tutta la vita dell'ospite. Queste non vengono aggredite dai meccanismi di difesa dell'immunità

sierica e cellulomediata dell'ospite, ed è questo il motivo della loro lunga permanenza all'interno dell'individuo. La parete di queste strutture si rompe in seguito all'attività di digestione liberando i bradizoiti in essa contenuti che una volta liberati restano vitali per due ore in acido peptico e per sei ore in tripsina, il che vuol dire che resistono alla digestione gastrica (Dubey, 1998b).

Le cisti nei tessuti di animali recettivi non sopravvivono alle temperature di cottura, sopravvivono abbastanza a lungo a temperature di refrigerazione (4 °C fino a 21 giorni), ma relativamente poco alle temperature di congelamento (a -15 °C per non più di 3 giorni).

### SEDE INTESTINALE

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

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

### CONTAMINAZIONE AMBIENTALE

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



Figura 5: Oocisti sporulata di *T.gondii* ([www.astrovet.blogspot.com](http://www.astrovet.blogspot.com))

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

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

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

Il calore secco uccide le oocisti che possono essere veicolate dal vento, dalla pioggia e da vettori come scarafaggi, mosche, vermi da un terreno all'altro (Dubey, 1988; Mullen *et al.*, 2002). E' stato dimostrato che anche i cani possono essere veicolo di oocisti ma esse non sporulano a causa delle condizioni sfavorevoli del microambiente (temperatura, umidità e ossigenazione) nel quale si trovano, ossia pelo e cute dell'animale (Lindsay *et al.*, 1997).

La durata del processo di sporulazione delle oocisti è influenzata dalle condizioni ambientali ed in particolare dalla temperatura: a 24°C avviene in 2-3 giorni mentre impiega 14-21 giorni a 11°C. La maturazione non avviene al di sotto di 4°C e al di sopra di 37°C (Pietrobelli, 2003). La maturazione vera e propria dura poco (anche meno di un giorno), tuttavia bisogna attendere alcuni giorni perché questa inizi.

Dopo la sporulazione nell'ambiente esterno l'oocisti risulta presentare al suo interno 2 sporocisti contenenti 4 sporozoiti ciascuna, per un totale di 8 sporozoiti.

Se confrontate con le oocisti non sporulate, quelle mature sono più resistenti alle condizioni ambientali: sopravvivono per un breve periodo al freddo e alla disidratazione ma in un terreno umido e sabbioso vivono più di 18 mesi (Frenkel, 2000).

Studi in laboratorio hanno evidenziato che le oocisti sporulate stoccate a 4°C vivono per più di 54 mesi e a -10°C per 106 giorni, invece non sopravvivono a 55-60°C (1-2 minuti di resistenza) (Dubey, 1998c). Le oocisti rimangono completamente infettanti a 25°C per 24 ore (temperatura ambiente), a 15°C per 5 giorni, a 11°C per 21 giorni (Dubey, 1970).



## Ciclo intestinale

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

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

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

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

maschile (Ferguson *et al.*, 1974; Dubey *et al.*, 1998a). Il macrogamete ha due importanti funzioni: per prima cosa esso deve sintetizzare e stoccare tutti gli elementi nutrizionali per consentire la sporulazione nell'ambiente esterno e sostenere la sopravvivenza degli sporozoit per lunghi periodi (al massimo un anno). In secondo luogo, deve sintetizzare i componenti specifici necessari per formare la parete dell'ocisti. Perciò, durante lo sviluppo, non c'è divisione cellulare ma, durante la fase di accrescimento del parassita, viene sintetizzata una grande quantità di granuli polisaccaridici che vengono stoccati nel citoplasma. Inoltre possono essere identificate altre strutture specifiche che saranno in seguito coinvolte nella formazione della parete dell'ocisti (Ferguson *et al.*, 1975; Dubey *et al.*, 1998a).

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

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

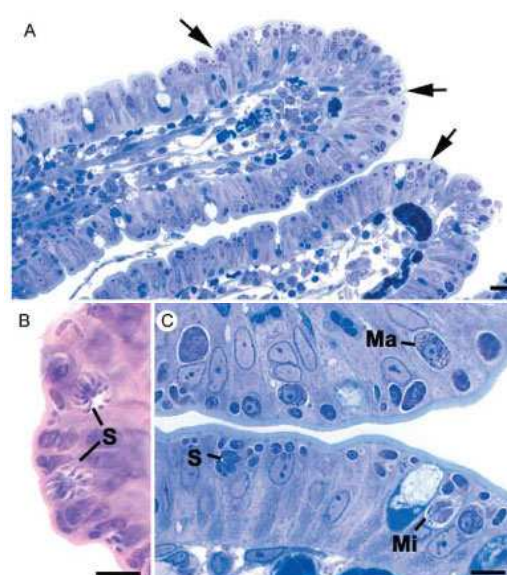


Figura 7: Intestino di gatto. Vari stadi (asessuali e sessuali) che si sviluppano all'interno degli enterociti. Ma: macrogametociti; Mi: microgametociti; S: schizonti (Ferguson *et al.*, 2009).

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

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

### Ciclo extraintestinale

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



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

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

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

### **3.5. Modalità di trasmissione**

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

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

svolgendo attività di giardinaggio con contatto col terreno che può essere potenzialmente infetto.

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

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

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

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

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

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

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

ad uno stadio precoce, che corrisponde alla fase di embriogenesi (Hohlfeld *et al.*, 1989; Dunn *et al.*, 1999; Montoya e Liesenfeld, 2004).

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

## MODALITA' DI TRASMISSIONE IN AMBIENTE ACQUATICO

Recentemente l'attenzione per *T. gondii* si è spostata sulla contaminazione da parte di oocisti nell'ambiente marino. Il ritrovamento di mammiferi marini sieropositivi o morti a causa di toxoplasmosi è stato il campanello d'allarme che ha spinto i ricercatori ad indagare come essi si possono infettare. Oggi la toxoplasmosi è considerata un importante patogeno nei mammiferi che vivono in zone costiere (Lindsay e Dubey, 2009).

L'infezione si può contrarre tramite l'ingestione di **acque contaminate contenenti oocisti mature**, in particolare giocano un ruolo importante le fognature e gli scarichi dei liquami il cui contenuto, fra cui la sabbia della lettiera dei gatti domestici, viene portato in ambiente marino attraverso le correnti fluviali (Feyer *et al.*, 2004); ed è proprio negli estuari che si concentra la maggiore possibilità di contrarre la malattia, come dimostra l'alto tasso di mortalità fra le lontre in California (USA) (Miller *et al.*, 2002). Anche l'opera di dilavamento del terreno contaminato con feci di felidi selvatici durante le piogge torrenziali viene considerato un fattore importante per la contaminazione delle acque con oocisti (Miller *et al.*, 2008b). E' stato dimostrato sperimentalmente che le oocisti sporulano dopo 3 giorni in acqua marina artificiale a concentrazioni di 15 ppt e 32 ppt di NaCl, a 24°C; esse rimangono infettanti per almeno 6 mesi a temperature di 22-24°C (Lindsay *et al.*, 2003), mentre resistono anche 24 mesi a 4°C (Lindsay e Dubey, 2009).

E' possibile che l'ingestione di acqua non trattata adeguatamente o l'accidentale assunzione di acque utilizzate a scopi ricreativi (fiumi, laghi o stagni) possa spiegare alcune infezioni di *T. gondii* che avvengono nell'uomo (Jones e Dubey, 2009).

Alla luce di queste evidenze però non è chiaro quanta acqua bisogna assumere per infettarsi, considerato che ad esempio i delfini, che pur sono stati trovati infetti, bevono pochissima acqua ed il resto dei liquidi viene assunto con la dieta, composta da Cefalopodi, pesci e altri animali a sangue freddo, che non sembrano essere ospiti di *T. gondii* (Dubey *et al.*, 2003; Jones e Dubey, 2009).

Un'altra fonte di mantenimento e propagazione dell'infezione è rappresentata dai **molluschi bivalvi** che possono fungere da ospiti paratenici: è stato possibile infettare sperimentalmente alcune specie di bivalvi quali cozze (*Mytilus galloprovincialis*) (Arkush *et al.*, 2003) e ostriche (*Crassostrea virginica*) (Lindsay *et al.*, 2001a) dimostrando che questi animali possono assumere le cisti di *T. gondii* dall'acqua marina, accumulandole all'interno del tratto digestivo dove si concentrano e non vengono inattivate dai processi biologici del bivalve, ma rimangono infettanti per alcuni mesi (Lindsay *et al.*, 2004). Le ipotesi e le prove sperimentali sono state confermate con il ritrovamento di una cozza (*Mytilus californianus*) in California nell'estuario della Baia di Monterey, positiva per il ceppo X di *T. gondii* (Miller *et al.*, 2008b), lo stesso che colpisce la maggior parte delle lontre in quella zona (Miller *et al.*, 2003; Conrad *et al.*, 2005). Si può quindi affermare che anche i molluschi bivalvi sono un pericolo per la salute non solo dei mammiferi marini, ma anche dell'uomo, che, a seconda delle abitudini si può cibare di bivalvi crudi (Feyer *et al.*, 2004).

### 3.6. Epidemiologia

La toxoplasmosi è una malattia parassitaria a diffusione cosmopolita. Come già detto colpisce tutti gli animali a sangue caldo e costituisce una zoonosi importantissima da non sottovalutare. La diffusione e la sieroprevalenza della malattia per quanto riguarda l'uomo varia da zona a zona del mondo e ciò è dovuto a numerosi fattori fra cui le abitudini alimentari, le condizioni igieniche in generale e le tradizioni culturali. Non c'è dubbio che il gatto giochi un ruolo fondamentale nella diffusione e mantenimento della malattia, ma poiché le vie di infezione sono diverse non bisogna

dimenticare il ruolo che svolgono le altre specie, in particolare gli animali da reddito, che con i prodotti da essi derivati possono provocare la malattia nell'uomo.

### 3.6.1. Epidemiologia nel gatto

I gatti ed i felini selvatici giocano un ruolo cruciale nell'epidemiologia della toxoplasmosi: nelle aree in cui non sono presenti la malattia sembra essere quasi del tutto assente.

Il numero di gatti che emette oocisti è però molto ridotto mentre la sieropositività risulta essere alta, soprattutto nei gatti randagi maschi adulti a causa del maggior carattere esplorativo e quindi del contatto con molti soggetti e ambienti e a una dieta non casalinga.

Gli studi condotti in Italia hanno evidenziato che i valori di sieropositività nei nostri gatti sono generalmente compresi fra il 26 e il 75% (Barbieri, 1994; Porqueddu *et al.*, 2003). In Veneto particolarmente, un lavoro di monitoraggio dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie svolto dal 1998 al 2003 ha evidenziato valori compresi fra il 21 e il 28% (Tonel, 2003); da un'indagine svolta fra il 2005 e il 2006 è emerso che la sieroprevalenza nei gatti delle province di Padova e Venezia è salita al 69% (Natale *et al.*, 2007). Il monitoraggio della toxoplasmosi nei gatti viene effettuato a livello mondiale e confrontando i diversi risultati delle rilevazioni si può avere un quadro generale della situazione epidemiologica globale: la sieroprevalenza risulta essere abbastanza alta (circa del 50%).

Il gatto si infetta tramite ingestione di carni di prede contenenti cisti e attraverso l'ingestione di oocisti mature presenti nel terreno. A seconda della modalità di infezione poi la prepatenza sarà lunga o breve; quindi, dopo un periodo variabile di 3-48 giorni, seguirà la fase intestinale con l'emissione di oocisti per 1-2 settimane. Generalmente un gatto emette una sola volta nella vita le oocisti anche se in seguito ad immunodepressione non è esclusa la possibilità di una seconda eliminazione. Anche la durata del periodo di eliminazione dipende dalla modalità di infezione: con le oocisti mature è di 28 giorni, con i tachizoiti è di 13 giorni e con i bradizoiti è di 3-

10 giorni (Dubey, 1998b). Le oocisti sono molto resistenti e permangono nell'ambiente per un tempo variabile, dipendente dalle condizioni ambientali.

### 3.6.2. Epidemiologia nell'uomo

Dal punto di vista clinico la toxoplasmosi può provocare gravi problemi anche nell'uomo. Sembra interessare circa un terzo della popolazione mondiale (Tenter *et al.*, 2000). Se però si porta l'attenzione sulla prevalenza nelle diverse regioni geografiche si possono fare diverse considerazioni: nelle zone in cui c'è maggiore consumo di carne cruda la trasmissione della malattia è più facile e alta (Kravetz, 2002). Ulteriore fattore da considerare è l'età: ovviamente più a lungo si vive, maggiori possibilità si hanno di venire a contatto col parassita; la sieropositività aumenta con l'età (Dubey, 2004). Rilevante per contrarre l'infezione risulta anche il settore professionale nel quale la persona lavora e la presenza di gatti in casa.

Un recente studio in Italia ha evidenziato che la sieropositività delle donne in età fertile è del 17,2%, in linea con il generale trend di riduzione della sieropositività riscontrato in altri Paesi, nonostante l'aumento dell'età media delle pazienti (Masini *et al.*, 2008). I test di screening infatti hanno dimostrato che in Norvegia la sieroprevalenza è del 10,9% (Jenum *et al.*, 1998b), in Arabia Saudita del 25% (Al-Qurashi *et al.*, 2001), in USA dell'11% (Jones *et al.*, 2007), in Messico del 8,2% (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2009), in Nigeria del 19,8% (Kamani *et al.*, 2009), in Cina del 10,6% (Liu *et al.*, 2009); essa rimane invece alta per esempio in Brasile con il 64,9% (Fernandes *et al.*, 2009), in Egitto con il 51,5% (Ibrahim *et al.*, 2009), in Venezuela con il 33% (Diaz-Suarez ed Estevez, 2009) ed in Albania con il 48,6% (Maggi *et al.*, 2009). Poiché la maggior parte delle donne sono sieronegative è ancora più importante il monitoraggio durante la gravidanza, per il rischio di trasmettere la parassitosi al feto.

### 3.6.3. Epidemiologia in mammiferi marini

Oltre che negli animali terrestri, *T. gondii* è stato evidenziato anche in molte specie di mammiferi marini. Oggetto di studio approfondito negli ultimi tempi sono le popolazioni di lontra di mare (*Enhydra lutris nereis*) in California, un piccolo mammifero marino a rischio di estinzione e protetto dal 1911, appartenente alla famiglia dei Mustelidi, nel quale *T. gondii* è responsabile del 16,2% della mortalità a causa di una grave encefalite. Si hanno inoltre problemi neurologici che rendono questi animali più vulnerabili agli attacchi degli squali e più suscettibili ad altre patologie per cui contribuisce ad un ulteriore 11,4% della mortalità. *T. gondii* è quindi da inserire tra le principali cause del lento ripopolamento di questa specie (Kreuder *et al.*, 2003). Dalle analisi effettuate risulta che i ceppi infettanti sono il tipo II (Cole *et al.*, 2000) ed un altro tipo, denominato X. La maggiore mortalità è data dal ceppo di tipo X, geneticamente distinto dai tipi I e III e molto simile al tipo II ma non classificabile come una sua mutazione né come un riassortimento genetico fra i tre diversi ceppi (Miller *et al.*, 2004); si aprono così nuovi interrogativi sull'evoluzione di questo parassita. Non si conoscono la diffusione e la patogenicità di questo ceppo insolito che fino ad ora è stato trovato solo in California e il cui ciclo viene mantenuto dalle specie selvatiche poiché sono stati trovati due puma, una lince ed una volpe positivi per il ceppo X in prossimità delle zone frequentate dalle lontre marine; la quadratura del cerchio si è completata con una cozza selvatica (*Mytilus californianus*) trovata positiva per il ceppo X. In nessun gatto domestico è stata sinora diagnosticata la sieropositività per questo nuovo ceppo (Miller *et al.*, 2008b). La sieropositività per *T. gondii* è stata riscontrata anche in Pinnipedi (Van Pelt e Dieterich, 1973; Migaki *et al.*, 1977; Lambourn *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2001; Measures *et al.*, 2004) e Sirenidi (Burgelt e Bonde, 1983; Dubey *et al.*, 2009a), sia allo stato selvatico che in cattività.

Il primo caso di infezione da *T. gondii* in un Cetaceo è stato diagnosticato in Florida nel 1990 in due Tursiopi spiaggiati, una madre col suo piccolo; tachizoiti e cisti tissutali sono stati trovati in numerosi tessuti di entrambi gli individui ma non è chiaro se siano stati anche la causa dello spiaggiamento (Inskeep *et al.*, 1990). Pochi mesi prima era stato soccorso invano, sempre in Florida, un altro Tursiope con delle

cisti tissutali in fegato e ghiandole surrenali compatibili con *T. gondii*, ma la diagnosi non era del tutto chiara a causa dello scarso dettaglio delle ultrastrutture all'interno delle cisti al microscopio elettronico (Cruickshank *et al.*, 1990). In seguito in altre specie di Cetacei di tutti i mari è stata testata la sieropositività e successivamente valutata l'eventuale presenza di cisti (Tabella 1):

<b>Specie</b>	<b>Luogo</b>	<b>Autore</b>
<b>Megattera</b> ( <i>Megaptera novaengliae</i> )	Gran Bretagna	Forman <i>et al.</i> , 2009
<b>Grampo</b> ( <i>Grampus griseus</i> )	Spagna	Resendes <i>et al.</i> , 2002
<b>Tursiope</b> ( <i>Tursiops truncatus</i> )	Spagna	Cabezòn <i>et al.</i> , 2004
	Sud Carolina (USA)	Dubey <i>et al.</i> , 2008a
	Canada (in cattività)	Dubey <i>et al.</i> , 2009a
<b>Tursiope Indo-Pacifico</b> ( <i>Tursiops aduncus</i> )	Australia	Jardine e Dubey, 2002
<b>Stenella striata</b> ( <i>Stenella coeruleoalba</i> )	Spagna	Cabezòn <i>et al.</i> , 2004
	Costa Rica	Dubey <i>et al.</i> , 2007
<b>Stenella dal becco lungo</b> ( <i>Stenella longirostris</i> )	Hawaii	Migaki <i>et al.</i> , 1990
<b>Delfino comune</b> ( <i>Delphinus delphis</i> )	Gran Bretagna	Forman <i>et al.</i> , 2009
<b>Susa indopacifica</b> ( <i>Sousa chinensis</i> )	Australia	Bowater <i>et al.</i> , 2003
<b>Orca</b> ( <i>Orcinus orca</i> )	Giappone	Murata <i>et al.</i> , 2004
		Omata <i>et al.</i> , 2006
<b>Beluga</b> ( <i>Delphinapterus leucas</i> )	Canada	Mikaelian <i>et al.</i> , 2000
<b>Focena comune</b> ( <i>Phocoena phocoena</i> )	Spagna	Cabezòn <i>et al.</i> , 2004
	Gran Bretagna	Forman <i>et al.</i> , 2009

Tabella 1: Specie indagate per *T. gondii* in tutti i mari del pianeta.



Non è possibile fare un confronto preciso sulla prevalenza di *T. gondii* nelle diverse aree marine poiché i test utilizzati sono diversi ed il numero di animali considerati non è sempre significativamente grande.

In Canada la sieroprevalenza per *T. gondii* in una popolazione di beluga è risultata del 27% (Mikaelian *et al.*, 2000). Nei mari della Gran Bretagna si stima che la sieroprevalenza nei Cetacei sia del 7,9% (Forman *et al.*, 2009).

In base ai dati raccolti dallo studio di Cabezòn *et al.* (2004) è possibile affermare che nel Mediterraneo occidentale l'infezione da *T. gondii* è frequente anche se non necessariamente si ha sintomatologia clinica o morte. Inoltre i titoli anticorpali sono più alti nelle specie costiere (prevalenza del 54,4%) piuttosto che in quelle pelagiche (prevalenza dell'8,8%); ciò suggerisce che l'habitat influenza la probabilità di infezione.

In Italia le prime indagini risalgono al decennio scorso (Di Guardo *et al.*, 1995a,b) nelle quali è stata confermata la positività per *T. gondii* in diverse specie distribuite sui litorali italiani:

<b>Specie</b>	<b>Luogo</b>	<b>Autore</b>
<i>Stenella coeruleoalba</i>	Toscana	Di Guardo <i>et al.</i> , 1995a,b
		Pretti <i>et al.</i> , 2008
<i>Tursiops truncatus</i>	Toscana	Di Guardo <i>et al.</i> , 1995a,b
		Pretti <i>et al.</i> , 2008
<i>Grampus griseus</i>	Toscana	Di Guardo <i>et al.</i> , 1995b

Tabella 2: Specie e luoghi nei quali è stato isolato *T. gondii*.

Sembra comunque appurato che il ceppo che sostiene la toxoplasmosi nei mammiferi marini, in particolar modo nei Cetacei, sia il tipo II che è diffuso in tutti i mari ed oceani (Dubey *et al.*, 2007; Dubey *et al.*, 2008a; Dubey *et al.*, 2009a).

## 3.7. Patogenesi e sintomatologia

L'eziopatogenesi è comune in tutti gli ospiti, mentre la sintomatologia dell'infezione toxoplasmica è complessa e multiforme poiché varia a seconda degli organi che possono essere compromessi, dal tipo del decorso, dall'esistenza di forme congenite e di forme acquisite. Alcune specie sono estremamente suscettibili all'infezione, altre tollerano meglio la malattia; inoltre l'aggressività e patogenicità dei ceppi è diversa a seconda delle specie che il parassita infetta.

### 3.7.1. Nell'uomo

Nell'uomo si possono distinguere 2 forme cliniche della malattia: toxoplasmosi acquisita e congenita.

#### Toxoplasmosi acquisita

E' una condizione clinica che si verifica a seguito di ingestione di oocisti o cisti tissutali. Si possono distinguere tre stadi:

- **Fase acuta:** il protozoo in questa fase prolifera in assenza di anticorpi specifici, invadendo tutti gli organi. La maggior parte delle volte prevale la forma asintomatica che viene rilevata a seguito di accertamenti sui livelli anticorpali ed interessa un'elevata percentuale di popolazione sana, a testimonianza di un'infezione pregressa decorsa in modo inapparente. A volte si può presentare in una forma linfoghiandolare o pseudo-mononucleosica o simil-citomegalica caratterizzata da lieve malessere, linfadenomegalia prevalentemente cervicale, mal di gola, febbre, affaticamento, dolore muscolare e cefalea. In genere interessa solo un linfonodo o una sola regione linfonodale. La forma pseudo-rickettiosa o esantematica è simile alla precedente con l'aggiunta di complicazioni quali esantema cutaneo papulare

o emorragico e forte innalzamento della temperatura; l'evoluzione della forma può essere fatale. Raramente si osservano forme viscerali che causano miocarditi e broncopolmoniti, e forme neurologiche che sviluppano meningite nella maggior parte dei casi, più raramente meningoencefalite. Il decorso di queste forme è sempre molto grave o addirittura letale. Sia nei casi asintomatici che in quelli sintomatici lievi l'ospite risponde con un'elevata produzione di anticorpi che pone fine alla fase acuta dell'infezione (Nardini e Fiorini, 1986). Durante la fase acuta i livelli di IgM sono molto elevati e scendono dopo alcuni mesi, mentre aumentano le IgG che raggiungono e superano valori di 1000UI/ml. La persistenza delle IgG è di 6-12 mesi poi iniziano a diminuire (Martín-Hernández e García Izquierdo, 2003).

- o **Fase subacuta:** nelle forme subacute, nonostante la presenza di anticorpi specifici, il parassita può continuare il suo ciclo evolutivo, ma solo in quelle sedi dove gli anticorpi arrivano con difficoltà, come il SNC e in particolar modo occhio e cervello. In questo caso si hanno per cui forme con corioretinite monolaterale, forme con coroidite ed iridociclite e forme con uveite granulomatosa (Nardini e Fiorini, 1986).
- o **Fase cronica:** il parassita è protetto dall'attacco anticorpale all'interno della cisti dove persiste per anni. Il tasso anticorpale resta elevato per qualche anno creando un equilibrio fra ospite e parassita che permette il decorso subclinico della malattia.

Nei malati con alterazioni immunitarie, la toxoplasmosi si può presentare come un'infezione disseminata. Nella maggior parte dei casi è possibile che sia la riattivazione di un'infezione latente, piuttosto che un'infezione primaria (Dubey, 2008b). La malattia è frequente in particolare nei pazienti con l'AIDS, ma si osserva anche occasionalmente in malati con disturbi ematici maligni (per esempio il linfoma di Hodgkin) o in seguito a trapianti di organo. La manifestazione più comune nei pazienti con l'AIDS è l'affezione del SNC con febbre, cefalea e confusione che progredisce fino al coma, segni neurologici focali e convulsioni (Martín-Hernández e García-Izquierdo, 2003). Questa situazione clinica è definita toxoplasmosi da riattivazione ed è

causata dai bradizoiti contenuti all'interno delle cisti che si differenziano in tachizoiti e proliferano in maniera incontrollata in assenza di immunità.

Negli USA la sieroprevalenza di *T. gondii* nei malati di HIV varia dal 10 al 45%; il 20-47% di essi sviluppa encefalite toxoplasmica (Wong e Remington, 1993). Come si può osservare dalla tabella, in Italia la toxoplasmosi è una delle prime patologie indicative di AIDS negli adulti, anche se in lieve calo.

	<1995	1995-96	1997-98	1999-00	2001-02	2003-04	2005-06
<b>Candidosi</b>	24,5	20,5	19,2	19,7	19,7	19,4	17,2
<b>Polmonite da</b>							
<i>Pneumocystis carinii</i>	22,3	18,2	18,2	19,9	19,7	19,3	20,8
<b>Toxoplasmosi</b>	8,6	7,8	7,2	6,3	6,6	6,3	6,3
<b>Micobatteriosi</b>	6,0	7,1	7,2	6,7	6,1	6,9	6,8
<b>Altre infezioni</b>	14,7	16,0	13,3	13,6	14,0	14,5	14,6

Tabella 3: Frequenza relativa (%) delle patologie indicative di AIDS in adulti per anno di diagnosi (dati ISS: Suligoi *et al.*, 2007).

### Toxoplasmosi congenita

L'infezione può essere trasmessa dalla madre al feto per dar luogo alla toxoplasmosi congenita che, contrariamente alla forma dell'adulto, quasi sempre asintomatica o paucisintomatica, acquista spesso carattere di vera gravità. La condizione indispensabile per la trasmissione del toxoplasma al feto è l'esistenza di una fase parassitemica che normalmente è presente solo durante la prima infezione, durante la quale i tachizoiti tramite il sangue passano attraverso la placenta. Non tutte le donne gravide affette da malattia acuta partoriscono figli malati poiché la parassitemia dura relativamente poco. Importante è il periodo gestazionale in cui viene contratta l'infezione: nel primo mese di gravidanza il rischio è praticamente nullo perché *Toxoplasma* non penetra nell'uovo; nei mesi successivi del primo trimestre il rischio

di infezione fetale è basso, ma si possono avere gravi danni nel nascituro e spesso anche la morte in utero; nel secondo trimestre il rischio di trasmissione dell'infezione della madre al feto è valutato intorno al 50%; nel terzo trimestre la possibilità di infezione fetale è molto elevata (intorno all'80%) ma l'eventuale malattia del nascituro è di ridotta gravità. La spiegazione della maggiore incidenza dell'infezione nel terzo trimestre di gravidanza rispetto ai trimestri precedenti risiede nel progressivo aumento della permeabilità funzionale placentare a *Toxoplasma*. Nel contempo la minore gravità della malattia si spiega con la maggiore maturità del feto e con l'aumento della permeabilità anticorpale dalla madre al nascituro cui consegue un effetto protettivo su quest'ultimo. Il quadro sintomatologico si manifesta con idrocefalo, lesioni oculari (corioretinite, cataratta, microftalmia), fenomeni neurologici e psichici (paralisi, convulsioni, oligofrenia) e calcificazioni endocraniche.

Riassumendo, a seguito di infezione da *T. gondii* in una donna gravida possono verificarsi diversi eventi quali morte embrionale o fetale, neonato con malattia in atto, neonato apparentemente sano, neonato sano. Ciò che determina il verificarsi di queste diverse evenienze sono la virulenza e la carica dell'agente patogeno, l'epoca di gravidanza in cui avviene l'infezione in utero, le difese naturali della madre e le cure che sono state eventualmente seguite. Le gravidanze successive a quella con l'infezione toxoplasmica sono esenti da rischio perché la madre ha sviluppato gli anticorpi anti-*Toxoplasma* (dogma di Sabin) (Nardini e Fiorini, 1986).

### 3.7.2. Negli animali domestici

Come già detto, *T. gondii* provoca una delle più comuni infezioni parassitarie e può causare una grave patologia in tutte le specie animali a sangue caldo.

L'infezione è una delle cause più importanti di aborto nei piccoli ruminanti (Tenter *et al.*, 2000): in Sardegna è stato stimato che l'11% degli aborti nelle pecore è dovuto a *T. gondii*, mentre in Italia sembra sia mediamente del 30% (Masala *et al.*, 2007). Le maggiori cause di infezione sono rappresentate dal pascolo e dall'acqua di abbeverata che proviene solitamente da ruscelli, laghi, pozzi e sorgenti sotterranee.

C'è una forte correlazione fra presenza di gatti nell'allevamento e sieroprevalenza per *T. gondii* poiché essi defecano nei prati adibiti al pascolo e le piogge di dilavamento trasportano il terreno contaminato inquinando le acque circostanti (Vesco *et al.*, 2007). L'infezione può causare anche nella pecora, come nella donna, morte embrionale e riassorbimento, morte fetale e mummificazione, aborto, natimortalità o morte neonatale, agnelli disvitali. La gravità dell'infezione è associata allo stadio di gravidanza nel quale si trova la fattrice in quel momento: la precocità dell'infezione è direttamente proporzionale alla gravità delle conseguenze sulla salute del feto (Dubey, 2009b). Gli agnelli si possono infettare anche con i tachizoiti nel latte (Vesco *et al.*, 2007).

I bovini al contrario sono dotati di un sistema immunitario che permette loro di resistere efficientemente all'infezione e gli aborti o casi di toxoplasmosi congenita sono molto rari.

Anche il cavallo è resistente all'infezione e sono stati trovati solo individui sieropositivi (Tassi, 2007).

I suini sono piuttosto suscettibili all'infezione di *T. gondii*, ma non mostrano solitamente segni clinici. Nell'adulto si possono avere febbre, diarrea, anoressia (Dubey *et al.*, 1991); la trasmissione per via transplacentare porta a morte fetale e mummificazione però non è detto che alcuni suinetti non possano nascere sani (Dubey *et al.*, 1990).

Cani, gatti e molti altri animali domestici possono morire a causa della polmonite, epatite ed encefalite dovuta a toxoplasmosi.

Generalmente il gatto sviluppa l'infezione a 2-6 mesi d'età, quando inizia a cacciare i topi, ed il decorso è asintomatico. Le forme conclamate si presentano con linfadenomegalia, vomito, diarrea, febbre, polmonite, dispnea, ittero, anemia. Si può osservare anche aborto o la nascita di gattini disvitali.

Nei cani la manifestazione clinica spesso è data dalla toxoplasmosi in associazione con il CDV (Canine Distemper Virus) ossia il virus del cimurro, che notoriamente dà una sintomatologia di tipo nervoso (d'Arc Moretti *et al.*, 2006). Solitamente vengono colpiti i soggetti giovani che manifestano febbre, vomito, diarrea, broncopolmonite. E' stato recentemente dimostrato che il cane può trasmettere la toxoplasmosi con il materiale seminale: dopo la fecondazione le femmine sviluppano

sieropositività, mentre gli embrioni vengono riassorbiti oppure nascono cuccioli con encefalite da cisti cerebrali (Arantes *et al.*, 2009).

### 3.7.3. In mammiferi marini

L'acqua degli estuari dei fiumi, nei quali vengono scaricati i reflui delle fogne e nei quali si riversano le acque di dilavamento del terreno da parte delle piogge torrenziali, è fonte di infezione da *T. gondii*, poiché è fortemente contaminata da oocisti, in grado di rimanere infettanti per alcuni mesi anche in acqua salata.

La toxoplasmosi nei mammiferi marini si può presentare in diverse forme: asintomatica, linfadenomegalia, debolezza, letargia, anoressia, splenomegalia, epatomegalia, miocardite, dispnea, disturbi neurologici con atassia ed incoordinazione del nuoto, opacità corneale (Inskeep *et al.*, 1990; Resendes *et al.*, 2002; Bowater *et al.*, 2003; Dubey *et al.*, 2003). È documentato il passaggio dell'infezione al feto per via transplacentare da madre in fase acuta ma asintomatica: il risultato è l'aborto o la morte neonatale (Resendes *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2008a). Nei Pinnipedi, che durante la gestazione sviluppano un placenta di tipo endotelio-coriale, l'infezione si contrae con il colostro o il latte, piuttosto che per via transplacentare (Measures *et al.*, 2004).

Nei Cetacei in particolare la toxoplasmosi è spesso associata ad un'infezione da morbillivirus o sospetta immunosoppressione (Inskeep *et al.*, 1990; Di Guardo *et al.*, 1995a,b). Inoltre la toxoplasmosi subclinica nervosa che è stata correlata a cambiamenti comportamentali nel ratto (Webster, 2007) e nell'uomo (Corruthers e Suzuki, 2007), potrebbe disturbare il biosonar e quindi disorientare gli animali che ne sono dotati, provocandone lo spiaggiamento (Omata *et al.*, 2006; Forman *et al.*, 2009).

## 3.8. Anatomia patologica

La morte cellulare e la necrosi focale provocate dai tachizoiti proliferanti induce un'intensa risposta infiammatoria in ogni tessuto e cellula infettati.

Le cisti contenenti bradizoiti, al contrario, inducono una risposta flogistica solo nelle prime fasi dello sviluppo. Dopo aver raggiunto la maturità infatti, il processo infiammatorio scompare e le cisti rimangono immunologicamente quiescenti nei diversi tessuti finché permane l'equilibrio fra ospite e parassita.

### 3.8.1. Nell'uomo

Nell'adulto immunocompetente l'infezione acuta si presenta con linfadenomegalia: la biopsia linfonodale evidenzia iperplasia follicolare e aggregati irregolari di macrofagi. I tachizoiti non sono osservabili, ma la loro presenza può essere accertata sia con inoculazione nei topi che con la PCR (Polimerasi Chain Reaction).

Nel feto o nell'immunocompromesso le lesioni osservate associano sempre necrosi con reazione cellulare importante. Gli organi più frequentemente coinvolti e sede delle lesioni sono:

- Sistema nervoso centrale: nella toxoplasmosi congenita si ha necrosi perivascolare secondaria a vasculite o trombosi. Le cellule bersaglio dei tachizoiti nel cervello sono la microglia, gli astrociti ed i neuroni e al loro interno si formano anche le cisti (Corruthers e Suzuki, 2007). Si determina in questa maniera un quadro di encefalite necrotica non suppurativa. Una stenosi dell'acquedotto di Silvio può portare ad idrocefalia (Grandi e Peyron, 2004).
- Retina: negli occhi infiltrati di monociti, linfociti e cellule plasmatiche possono provocare lesioni unifocali o multifocali. Lesioni granulomatose e retinocoroiditi possono essere osservate nella camera posteriore dell'occhio, a seguito della retinite acuta necrotizzante. Altre complicazioni delle infezioni



oculari sono rappresentate da iridociclite, cataratta e glaucoma (Martín-Hernández e García-Izquierdo, 2003).

- Linfonodi: è l'organo più frequentemente colpito, ma il parassita vi è raramente osservato. Esiste per contro una importante reazione istiocitaria che può provocare talora un linfoma di Hodgkin.
- Placenta: è sede di lesioni infiammatorie rilevanti. Specialmente nelle fasi precoci della gravidanza le lesioni placentari sono importanti e portano alla morte del feto (Grandi e Peyron, 2004).
- Cuore: nei pazienti affetti da AIDS la miocardite da *T. gondii* è potenzialmente fatale poiché causa aritmie e dilatazione del cuore sinistro o bicamerale. Si possono osservare lesioni necrotiche focali o estese con edema, infiltrato infiammatorio, microascessi, cisti e pseudocisti nelle cellule miocardiche (Hofman *et al.*, 1993). La pericardite può essere presente (Martín-Hernández e García-Izquierdo, 2003).
- Polmone: nel neonato e nel paziente immunocompromesso si può sviluppare una polmonite interstiziale o un diffuso danno alveolare con essudato fibrinoso che precede la polmonite necrotizzante, caratterizzata da ampie aree di necrosi del parenchima nelle quali proliferano i tachizoiti in sede intra- ed extracellulare (Nash *et al.*, 1994).
- Altri organi: muscolatura scheletrica, reni, stomaco, pancreas, testicoli (Hofman *et al.*, 1993) vengono coinvolti a seguito di infezione disseminata. Le alterazioni istopatologiche sono simili a quelle degli altri tessuti, ovvero necrosi ed infiltrazione di cellule infiammatorie.

### 3.8.2. Negli animali domestici

La pecora è un animale sensibile a *T. gondii* la cui infezione durante la gravidanza provoca delle importanti perdite economiche. La placenta dopo l'aborto è diffusamente pallida, edematosa, di color porpora o grigio, ed i cotiledoni sono friabili e di un marrone-rossiccio pallido, con una tessitura granulare come se ci fosse mineralizzazione. L'analisi microscopica della placenta rivela una placentite necrotica e la presenza di leucociti immersi nell'amnios. La necrosi lungo il corion ed i detriti granulari sono segni caratteristici di toxoplasmosi (Weissmann, 2003).

Nella placenta delle scrofe che hanno abortito da *T. gondii*, la lesione principale è la placentite necrotizzante; microscopicamente si osservano numerosi tachizoiti nelle cellule trofoblastiche che circondano le areole placentari. Nei suinetti si riscontrano encefalomielite non suppurativa e degenerazione, necrosi e mineralizzazione del miocardio (Dubey *et al.*, 1990).

La forma disseminata nel gatto provoca lesioni necrotiche a carico di cervello, polmone, fegato, pancreas, intestino, cuore, ghiandole surrenali, reni, milza e cute. Negli individui con oftalmite *T. gondii* invade retina, corioide, nervo ottico, iride e corpo ciliare (Dubey e Carpenter, 1993).

Nel cane i reperti anatomico-patologici sono simili a quelli precedentemente descritti, con lesioni necrotiche nei diversi organi e natimortalità o aborti di cuccioli con encefalite.

### 3.8.3. Nei mammiferi marini

Dal punto di vista anatomico-patologico il pattern delle lesioni nei mammiferi marini, Cetacei compresi, è sempre simile; i diversi gradi di gravità ed il coinvolgimento di più organi dipendono soprattutto dallo stato immunitario dell'animale.

Gli studi hanno evidenziato il particolare tropismo del parassita per il sistema nervoso centrale, in particolare l'encefalo con una meningoencefalite non suppurativa. All'istopatologia risulta un'inflammazione in cervello, tronco

encefalico, cervelletto e colonna vertebrale, caratterizzati da foci di gliosi e manicotti perivascolari di cellule mononucleate (soprattutto macrofagi); nelle aree di necrosi multifocale si trovano tachizoiti e cisti tissutali (Migaki *et al.*, 1990; Bowater *et al.*, 2002; Resendes *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2003; Kreuder *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2004; Dubey *et al.*, 2007, 2009a). Nei polmoni si ha polmonite interstiziale con edema alveolare ed essudazione fibrinosa; all'analisi microscopica si osservano tachizoiti in pneumociti, fibrociti e macrofagi settali (Inskeep *et al.*, 1990; Mikaelian *et al.*, 2000; Resendes *et al.*, 2002). Tachizoiti e cisti tissutali si trovano anche nel miocardio dove causano mionecrosi e degenerazione (Inskeep *et al.*, 1990; Bowater *et al.*, 2002; Resendes *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2003).

Altri organi bersaglio sono linfonodi, milza, fegato, stomaco, intestino, ghiandole surrenali, reni, timo (nei giovani) nei quali si instaura un quadro caratterizzato da necrosi multifocale. Nelle aree necrotiche sono presenti i tachizoiti, mentre le cisti si trovano nelle aree adiacenti. Linfonodi, milza e surrenali possono essere aumentati di volume.

### **Diagnosi differenziale**

Il quadro anatomo-patologico di encefalite non suppurativa non è patognomonico di toxoplasmosi nei mammiferi marini. Infatti bisogna tenere in considerazione per la diagnosi differenziale l'eventuale presenza di un altro protozoo, *Sarcocystis neurona*.

Il genere *Sarcocystis* è composto da più di 130 specie e solo della metà di queste si conosce con chiarezza il ciclo biologico. Le diverse specie si differenziano per grado di patogenicità, struttura e ciclo vitale (Cornejo, 2008).

Nell'ultima decade è stata scoperta una nuova specie, denominata *S. neurona* che ha uno spiccato tropismo per il tessuto nervoso e non si comporta come la maggior parte delle altre specie di *Sarcocystis*. Essa causa disturbi al SNC in diverse specie animali, che tuttavia vengono considerate ospiti "aberranti" poiché al loro interno è stato trovato, nel SNC, solo lo stadio di schizonte. E' stato dimostrato che anche i Pinnipedi sono sensibili all'infezione da *S. neurona* (Miller *et al.*, 2001).

Le analisi di laboratorio per distinguere *T. gondii* da *S. neurona* si basano sull'**immunoistochimica**: il tessuto cerebrale viene fatto reagire con antisieri specifici per i due parassiti, in seguito si osservano le sezioni istologiche dove sono presenti i due protozoi nei loro diversi stadi. Si distinguono così merozoiti e schizonti nel caso di *S. neurona* e cisti nel caso di *T. gondii*. Per ottenere una conferma diagnostica viene utilizzata la **PCR** (Polimerase Chain Reaction).

Un'altra specie di *Sarcocystis* che può complicare la diagnosi differenziale è *S. canis*, correlato a *S. neurona*, il cui ciclo biologico è ancora sconosciuto. È stato osservato solo lo stadio di schizonte, confinato principalmente nel fegato. Questo protozoo causa epatite fatale in diverse specie animali (cavallo, cane, orso grizzly), mammiferi marini inclusi (leone marino, foca monaca delle Hawaii e *Stenella striata*). Nel Mediterraneo è stato registrato il primo caso di infezione e morte da *S. canis* in una *Stenella striata*. In sede autoptica è stata evidenziata la presenza di ittero, emorragie sottocutanee e congestione epatica, mentre all'esame microscopico si sono osservate aree di necrosi epatocellulare con schizonti compatibili con *S. canis* (Lindsay *et al.*, 2001b).

Allo stato attuale non esistono test immunoistochimici per diagnosticare la presenza di *S. canis* (Dubey *et al.*, 2003).

### 3.9. Diagnosi

La diagnosi di toxoplasmosi si basa sulla correlazione tra reperto clinico o autoptico e dati di laboratorio e in particolare su:

- tecniche indirette, rappresentate dai test sierologici che evidenziano la risposta immunitaria dell'ospite (presenza di anticorpi specifici);
- tecniche dirette, il cui scopo è trovare il parassita nelle sue diverse forme tramite indagine microscopica (ricerca di oocisti nelle feci del gatto; evidenziazione cisti, tachizoiti e bradizoiti nei tessuti con esame istologico e immunoistochimica), isolamento *in vivo* (in animali da laboratorio) o *in vitro* (in terreni di coltura), tecniche molecolari (PCR).

### 3.9.1. Diagnosi sierologica

La diagnosi sierologica serve a definire la condizione immunitaria del soggetto: in base alla presenza di immunoglobuline nel siero si determina se il paziente ha avuto contatto con il parassita e in caso di positività quali tipi di anticorpi specifici anti-*Toxoplasma* sono presenti (IgM, IgG e IgA). Le immunoglobuline della classe IgM compaiono per prime e possono essere titolate in un arco di tempo di tre-sei mesi con una latenza media dall'infezione di una settimana. La massima risposta anticorpale, nella maggioranza dei casi, si ha verso la seconda-terza settimana di infezione. Poco dopo la comparsa delle IgM vengono prodotti gli anticorpi della classe IgG che raggiungono un massimo verso la fine del secondo mese, rimangono a titolo costante per un periodo di tempo variabile (sei mesi - due anni) e poi lentamente decrescono senza mai scomparire del tutto rappresentando l'espressione di immunità acquisita nei confronti dell'infezione. Le IgA vengono prodotte in maniera incostante, compaiono dopo le IgM ma prima delle IgG e scompaiono dopo 6-12 mesi.

Se la ricerca anticorpale dà esito negativo, vuol dire che l'infezione non è stata contratta o che è stata contratta molto tempo prima, cosicché il livello anticorpale relativo si è completamente azzerato. Nei soggetti immunocompromessi questo test non è attendibile poiché non si rileva nessuna reazione anticorpale anche in caso di infezione.

In caso di sieropositività il titolo anticorpale indica un'infezione che può essere recente, pregressa o tardiva; tuttavia resta comunque difficile stabilire il momento esatto dell'infezione. Possiamo distinguere 4 diverse situazioni anticorpali:

- IgM + e IgA +: Può essere un'infezione recente;
- IgM + e IgG -: Può essere un'infezione molto recente: ripetere il prelievo dopo 15 giorni per maggiore certezza;
- IgM + e IgG +: Può essere un'infezione recente o pregressa: si possono cercare le IgA nel siero per valutare se l'infezione è precedente ai 6 mesi;
- IgM - e IgG +: Infezione di vecchia data con protezione.

La diagnosi sierologica indiretta è un metodo impiegato routinariamente e si avvale di diverse tecniche:

- Sabin-Feldman Dye Test (DT)
- Immunofluorescenza indiretta (IFI)
- Agglutinazione diretta (DAT)
- Emoagglutinazione passiva (EAP)
- Fissazione del Complemento (FC)
- Tecniche immunoenzimatiche (ELISA)
- Toxo IgM ISAGA (Immunoabsorbent Agglutination Assay)
- Western blot
- Avidity test

### **Sabin-Feldman Dye Test (DT)**

Il test prende il nome dai due ricercatori, Sabin e Feldman, che lo sperimentarono nel 1949. Si basa sulla dimostrazione di alterazioni strutturali indotte nel parassita, mantenuto allo stato di virulenza, da parte di un siero inattivato contenente anticorpi anti-*Toxoplasma*, in presenza di complemento e a 37°C. Queste alterazioni consistono nella lisi della membrana del microrganismo con parziale fuoriuscita di citoplasma e conseguente perdita di tingibilità con blu di metilene in ambiente alcalino. I risultati vengono espressi come diluizione del siero alla quale si verifica ancora la lisi del 50% dei parassiti sui quali esso è stato fatto agire. Normalmente, nell'infezione recente, gli anticorpi sono ad alto titolo (1:1000 - 1:64000) mentre i titoli risultano bassi (1:16 - 1:64) nell'infezione pregressa e di vecchia data. Il test persiste positivo a basso titolo per tutta la vita. La soglia di sensibilità è molto bassa (2 UI/ml. circa 1:8) e la lettura facile. L'inconveniente di questa reazione è quello di usare, come antigeni, parassiti viventi e virulenti coltivati in peritoneo di topo. E' necessario inoltre disporre dell'attivatore e quindi di siero fresco umano o di cavallo negativi per la toxoplasmosi. A fronte di queste difficoltà il DT è stato sostituito con tecniche più agevoli.

Il DT è stato utilizzato per valutare la sieropositività di alcuni mammiferi marini in Gran Bretagna con titoli compresi fra 8 e 259 UI ml/l (Forman *et al.*, 2008).

### **Immunofluorescenza indiretta (IFI)**

L'immunofluorescenza è una tecnica di rilevazione degli anticorpi molto usata per le sue caratteristiche di sensibilità, specificità, riproducibilità e facilità di esecuzione.

Il principio di questa reazione consiste nel porre l'antigene (*Toxoplasma* inattivato) su un vetrino in presenza di opportune diluizioni del siero da esaminare e di far reagire gli anticorpi eventualmente presenti e fissati sull'antigene con un siero antiglobuline umane (anti-IgG) marcato con isotiocianato di fluoresceina. La lettura viene effettuata con microscopio a luce ultravioletta e si definisce positiva quando compare una brillante fluorescenza giallo-verde del microrganismo. La reazione viene letta come negativa quando *Toxoplasma* appare di colore rosso-arancione, ma bisogna fare attenzione ai falsi negativi, dovuti ad elevate diluizioni di partenza. Il titolo del siero è dato dalla più alta diluizione di esso che mostra ancora una fluorescenza periferica o globale netta dell'antigene. Il test, introdotto nel 1962 da Kelen, nei laboratori non attrezzati per l'esecuzione del DT, viene impiegato al posto di quest'ultimo avendone la stessa sensibilità (Nardini e Fiorini, 1986). È stato rilevato infatti che la sensibilità (Se) è dell'83,8%, mentre la specificità (Sp) è del 79,1%; il valore predittivo positivo e negativo rispettivamente dell'83,8% (VPP) e del 79,1% (VPN) (Uchôa *et al.*, 1999). Questa tecnica offre il vantaggio di una rapida individuazione degli anticorpi cercati e quindi la possibilità di essere impiegata in studi di massa con impegno limitato di tempo.

Remington nel 1969 modificò questo test per evidenziare le IgM. Il test così modificato è in grado di evidenziare quantità di IgM nell'ordine dei microgrammi, elemento essenziale nella diagnosi neonatale. Un titolo maggiore o uguale a 1:200 si può considerare diagnostico di infezione attiva mentre titoli inferiori possono generare falsi positivi (Nardini e Fiorini, 1986).

### **Agglutinazione diretta (DAT)**

Il test è tecnicamente semplice ma la reazione risente di molteplici variabili (pH, temperatura, cariche elettriche). Viene utilizzato per la ricerca delle IgG specifiche ed ha una soglia di sensibilità per diluizioni sieriche di 1:8 (Nardini e Fiorini, 1986).

Il MAT (Modified Agglutination Test) è tra i metodi più utilizzati per la ricerca di sieropositività a *T. gondii* in mammiferi marini e Cetacei, considerando significativi di infezione titoli maggiori o uguali a 1:25 (Mikaelian *et al.*, 2000; Lamburn *et al.*, 2001; Cabezòn *et al.*, 2004; Measures *et al.*, 2004; Dubey *et al.*, 2007-2008a-2009a).

E' stato dimostrato che i risultati del MAT su siero di delfino concordano con quelli del DAT, ed hanno una buona sovrapposibilità con i risultati di IFAT, DT ed ELISA; il Western blot conferma la presenza dell'antigene P30 nel siero di delfino solo quando il titolo anticorpale è estremamente elevato. Il test di Emoagglutinazione Indiretta (IHAT) viene considerato come poco sensibile e non affidabile (Dubey *et al.*, 2005). Esso infatti cross-reagisce con anticorpi contro altri protozoi, come per esempio *Sarcocystis* e quindi i risultati devono essere confermati da altri test come LAT o IFAT (Murata *et al.*, 2004).

### **Emoagglutinazione passiva (EAP)**

Si tratta di un'agglutinazione di globuli rossi sensibilizzati che avviene in presenza di anticorpi specifici eventualmente presenti nel siero in esame.

Dopo aver avuto molto successo per la sua semplicità ed economicità, è stata in gran parte sostituita dai corrispondenti test immunoenzimatici. Il principio della EAP prevede:

- a) la disponibilità dell'antigene in forma purificata,
- b) il legame dell'antigene mediante trattamento chimico (di solito acido tannico) ad emazie di montone,
- c) la diluizione progressiva dei campioni in esame in strip di micropozzetti a fondo a V in cui vengono aggiunti complessi emazie-antigene.



d) In un micropozzetto vengono invece aggiunte emazie non trattate allo scopo di rilevare eventuali anticorpi eterofili che possono disturbare il test.

Dopo alcune ore di incubazione a temperatura ambiente viene letto il risultato. Se il campione è negativo non si rilevano anticorpi specifici per l'antigene presente sulle emazie di montone, e queste scendono al fondo del micropozzetto formando un piccolo "bottoncino" rosso, come avviene nei pozzetti di controllo. Se il campione è positivo gli anticorpi presenti nel campione si legano all'antigene sulle emazie e formano un reticolo che impedisce alle emazie di scendere al fondo del pozzetto a V. Si forma invece una stratificazione a fascia (od anello) delle emazie sulle pareti del pozzetto fino a che la concentrazione dell'anticorpo permette il fenomeno. A diluizioni superiori al titolo anticorpale del campione positivo le emazie scendono al fondo del pozzetto formando il "bottoncino" rosso. Il test consente quindi di discriminare fra campioni negativi e positivi e di questi fornire subito il titolo anticorpale.

Questo test soffre l'insufficiente stabilità nelle fasi acute dell'infezione per cui non può essere impiegato come test isolato negli screening in gravidanza o per infezioni neonatali. Inoltre i risultati sono molto variabili e poco standardizzabili, il che rappresenta un altro svantaggio non indifferente (Nardini e Fiorini, 1986).

### **Fissazione del Complemento**

Il test sfrutta la proprietà del complemento di fissarsi ad un complesso antigene-anticorpo. Quando la reattività dell'anticorpo è inadeguata per una reazione di tipo precipitante o agglutinante, non è possibile evidenziare nessun fenomeno visivo; tuttavia per quanto non reattivo l'anticorpo lega sicuramente con un antigene e a questo complesso anche il complemento. La prova si compone di due fasi:

1. All'antigene conosciuto si aggiunge il siero in esame ed il complemento (incubazione a 37°C per 30').

2. Per vedere se si è formato il complesso specifico antigene-anticorpo, e quindi se il complemento si è fissato, si aggiungono eritrociti sensibilizzati per il relativo anticorpo (incubazione a 37°C per 30’).

Se non compare emolisi la reazione è positiva perché vuol dire che il complemento è stato “consumato” nella reazione della fase 1. Al contrario, in caso di emolisi la prova sarà negativa poiché il complemento, non essendosi fissato nella fase 1, ha reagito con gli eritrociti sensibilizzati. Non bisogna eccedere nell’aggiunta del complemento per il rischio di produrre falsi negativi; per lo stesso motivo bisogna eliminare il complemento naturalmente presente nei campioni in esame, sottoponendoli ad un trattamento termico di 60°C per 30’ (Poli *et al.*, 2004).

Gli anticorpi in gran parte evidenziati sono le IgG, pertanto il test non testimonia la fase acuta dell’infezione e la sua soglia di sensibilità è per diluizioni sieriche maggiori di 1:16 (Nardini e Fiorini, 2004).

### **Tecniche immunoenzimatiche (ELISA)**

Gli antigeni vengono adsorbiti su fase solida, e dopo lavaggio per togliere la quota che non si è fissata, messi a contatto con sieri da saggiare. Se nel siero sono presenti anticorpi specifici, essi si combinano con l’antigene; l’aggiunta di anti-gammaglobuline, marcate con l’enzima (perossidasi o fosfatasi alcalina), determina la formazione di complessi antigene-anticorpo-antigammaglobuline marcate. La quantificazione degli anticorpi specifici viene valutata con misurazione colorimetrica visiva o allo spettrofotometro: il rapporto tra anticorpi e intensità di colore è inversamente proporzionale (Poli *et al.*, 2004).

Questa tecnica è altamente specifica e sensibile (Se 96,7%; Sp 75%; PPV 83,3%; NPV 94,7%) (Uchôa *et al.*, 1999).

### **Toxo IgM ISAGA (Immunoabsorbent Agglutination Assay)**

Il test è utile per il rilevamento degli anticorpi della classe IgM e associa i vantaggi del test di agglutinazione diretta a quella del double sandwich IgM ELISA. Viene utilizzato per la diagnosi di toxoplasmosi acuta negli immunocompetenti e come test di screening nelle donne in gravidanza. Si è dimostrato più sensibile ma ugualmente specifico all'ELISA (Duffy *et al.*, 1989).

### **Western blot**

Il test viene utilizzato per la diagnosi di toxoplasmosi congenita nel siero del neonato, che viene messo a confronto con il siero della madre; è in grado di rintracciare IgG, IgM ed IgA. Tuttavia deve essere usato in combinazione con test come l'ELISA o l'ISAGA. Il Western blotting è utile per dimostrare la presenza di IgA o IgM specifiche per *T. gondii* sfuggite agli altri metodi convenzionali nel siero dei neonati, le cui madri sono fortemente sospettate di aver contratto l'infezione in gravidanza.

### **Avidity Test**

L'Avidity Test è stato sviluppato per discriminare tra infezione recente e cronica. I risultati si basano sulla misurazione dell'avidità (o affinità funzionale) delle IgG specifiche per *T. gondii*. Subito dopo l'attacco antigenico gli anticorpi possiedono una bassa affinità con l'antigene. Durante della risposta immunitaria avviene la maturazione dell'affinità degli anticorpi che aumenta progressivamente nel corso di settimane e mesi.

L'Avidity Test consiste nell'utilizzare due set di un normale test ELISA: un set dopo un periodo di incubazione, viene lavato con un buffer contenente urea, l'altro set viene lavato con un buffer privo di urea. Il contenuto di IgG specifiche del set col siero trattato viene diviso per il contenuto di IgG specifiche (cioè quelle totali) del set

col siero non trattati, ottenendo così l'indice di avidità. Se l'avidità è bassa l'infezione è recente (entro 4-5 mesi), se l'avidità è alta l'infezione è pregressa.

Il test è utilizzato nelle donne nei primi mesi di gravidanza che sono risultate IgG ed IgM positive con un altro test, ma può essere utilizzato anche come unico test di screening (Remington *et al.*, 2004).

Nelle pecore è stata sperimentata l'applicazione di questo test, partendo da una diluizione del siero di 1:25 e sfruttando l'avidità delle IgG per l'antigene P30. Il 35% di avidità viene considerato come valore cut-off, al di sopra del quale l'avidità viene considerata elevata e quindi diagnostica di un'infezione pregressa. La messa a punto di questo test è ancora però in fase sperimentale (Sager *et al.*, 2003).

### 3.9.2. Tecniche dirette

#### **Esame coprologico**

Nel gatto, ed in generale nei Felini, che sono i soli ospiti completi, si può effettuare la diagnosi tramite esame coprologico poiché nelle feci si possono trovare le oocisti. La loro ricerca non è facile per due motivi: 1. le oocisti vengono eliminate per un periodo molto breve, 2. tali elementi parassitari sono di dimensioni molto piccole (10-12  $\mu\text{m}$ ) e quindi molto difficilmente individuabili a microscopio ottico. Inoltre bisogna porre in diagnosi differenziale con *Hammondia heydorni* che è molto simile.

#### **Impression smear**

E' una procedura che trova il solo utilizzo negli immunocompromessi o nei malati di AIDS, che non sono in grado di produrre anticorpi in maniera sufficiente. Il tessuto si preleva per biopsia o alla necropsia; si esegue su un vetrino lo striscio del campione prelevato e dopo che si è asciugato lo si fissa con alcol metilico. Con la colorazione di Giemsa è possibile distinguere facilmente i microrganismi solo se ben

preservati e nelle lesioni al contrario sono principalmente degenerati; la parete delle cisti appare argentofila.

### **Isolamento *in vivo* e *in vitro***

L'isolamento *in vivo* del parassita avviene mediante inoculazione del materiale sospetto in animali di laboratorio (topi germ-free) per via endoperitoneale. I parassiti vengono cercati dopo 6-10 giorni post-infezione: se non vengono osservati, si aspettano 4-6 settimane per valutare il titolo antiserico per *T. gondii*.

La prova *in vitro* consiste nell'inoculazione della sospensione del materiale biologico in esame in colture cellulari di fibroblasti embrionali (MRC5): se dopo 48-72 ore compare la lisi cellulare il test è positivo. Questo metodo è sicuramente più rapido ma meno sensibile del precedente (Grandi e Peyron, 2004).

### **Istologia e Immunoistochimica**

L'esame istologico è utile per evidenziare la presenza di cisti e di lesioni nei vari tessuti riferibili a *T. gondii*: prevede l'utilizzo di tessuti fissati in formalina; questi vengono processati fino ad ottenere vetrini con sezioni di tessuto dello spessore di circa 5µm che vengono colorati con ematossilina-eosina (EE) o Giemsa. L'immunoistochimica è una tecnica ampiamente utilizzata per l'identificazione e la localizzazione istologica di antigeni e di costituenti cellulari e tissutali *in situ*. Essa ha rappresentato, negli ultimi anni, uno strumento fondamentale per la diagnosi di molte malattie ed ha avuto, con l'abbinamento a tecniche di biologia molecolare, un grande impulso ed un notevole sviluppo metodologico. Grazie a queste tecniche possiamo annoverare il miglioramento diagnostico delle malattie infettive del fegato, che hanno rappresentato a lungo un grave problema eziologico nell'uomo. Più recentemente, il suo uso ha interessato progressivamente campi sempre più vasti quali l'identificazione del fenotipo cellulare (ad es. la differenziazione negli infiltrati cellulari delle cellule T, delle cellule B e dei macrofagi), dei recettori cellulari,

L'identificazione della produzione di citochine, chemochine e fattori di crescita o ancora la dimostrazione di modificazioni funzionali delle cellule. Inoltre ha permesso la tipizzazione delle neoplasie e la loro valutazione prognostica, l'individuazione di nuovi antigeni tumorali, proteine oncofetali e codificate da oncogeni nonché l'individuazione di depositi patologici (ad es. amiloide).

L'immunoistochimica è una tecnica dotata di maggiore sensibilità e precisione rispetto alla immunofluorescenza il cui risultato non è stabile nel tempo e tende a decadere per effetto della luce.

Le procedure di immunoistochimica permettono la visualizzazione di componenti cellulari in una varietà di campioni biologici comprendenti sezioni di tessuto, strisci e citocentrifugati. I risultati della colorazione dipendono in gran parte dalla qualità del preparato.

I processi fondamentali della tecnica di immunoistochimica sono:

- a) Fissazione del tessuto: lo scopo principale della fissazione è quello di preservare la morfologia delle cellule e dei tessuti, evitando la distruzione dei determinanti antigenici, e mantenere le molecole antigeniche che devono essere individuate nella loro posizione originale e renderle disponibili all'anticorpo primario. Di solito viene utilizzata la formalina al 4-10%.
- b) Inclusione in paraffina, taglio con microtomo, sparaffinatura.
- c) Riesposizione degli antigeni celati: una iperfissazione dei campioni di tessuto in formalina può mascherare fortemente gli antigeni tissutali e può impedire la loro localizzazione da parte dell'anticorpo primario; per ovviare a questo problema si impiegano enzimi proteolitici volti a digerire i legami aldeidici, formati nel corso dei processi di fissazione, e riesporre i siti antigenici, oppure si utilizzano alte temperature.
- d) Blocco degli enzimi endogeni: gli enzimi endogeni presenti nel tessuto danno luogo ad una colorazione non specifica e non dovuta al legame Ag-Ac se come sistema di rivelazione viene usato un enzima identico (ad es. fosfatasi alcalina o perossidasi). Le tecniche per inibire questi enzimi prima della colorazione sono numerose, ad esempio nel caso della perossidasi si possono

pre-incubare le sezioni istologiche con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allo 0,03% in PBS o in metanolo.

- e) Blocco delle reazioni non specifiche: per ovviare a questo artefatto si blocca la biotina endogena tramite incubazione con avidina non marcata.
- f) Sistemi di rivelazione: il legame dell'anticorpo primario con l'antigene può essere rivelato da fluorocromi (fluoresceina o rodamina) o da enzimi coniugati (fosfatasi alcalina,  $\beta$ -galattosidasi, perossidasi). Se l'anticorpo diretto contro l'antigene da cercare è marcato con un fluorocromo, il sito di reazione si rende evidente per la fluorescenza legata all'anticorpo che ha reagito con l'antigene. Se il marcatore è costituito da un enzima, esso, in presenza di un opportuno substrato, produrrà un precipitato colorato nel sito di reazione.
- g) Vetrini di controllo: i controlli della procedura e dei reagenti per la colorazione sono necessari al fine di assicurare l'accuratezza dei risultati.

I campioni utilizzati sono di natura biotica o autoptica. A seconda del sospetto clinico o autoptico si prelevano i tessuti che si sospettano indicativi per la conferma diagnostica (Muzi e Bologna, 1999). Per la ricerca di *T. gondii* viene utilizzato un anticorpo policlonale diretto contro i parassiti. L'associazione dell'immunoistochimica associata alla PCR può dare potenzialmente una diagnosi definitiva considerato che nessuno dei due metodi da solo non può garantire una sensibilità del 100%.

Numerose specie di delfini sono stati trovati positivi per *T. gondii* all'immunoistochimica in diversi tessuti, con la visualizzazione di cisti, tachizoiti e bradizoiti quali prova di infezione in atto (Cruickshank *et al.*, 1990; Inskeep *et al.* 1990; Migaki *et al.*, 1990; Jardine e Dubey, 2002; Resendes *et al.*, 2002; Bowater *et al.*, 2003).

## Polimerase Chain Reaction (PCR)

La PCR, ideata nel 1983 da Mullis, è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (detta amplificazione) esponenziale *in vitro* di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscono le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. L'amplificazione del DNA consente di ottenere in maniera rapida la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni. Inoltre lo si può utilizzare per modificare la sequenza amplificata o aggiungere nuove informazioni. Per dare inizio alla reazione è necessario conoscere con precisione le estremità della sequenza da amplificare per sintetizzare degli oligonucleotidi che saranno ibridati ad esse, e disporre di una piccola quantità della sequenza. Poiché la PCR non è altro che la riproposizione *in vitro* di ciò che avviene nella cellula durante una fase della riproduzione cellulare, bisogna ricrearne le stesse condizioni e avere a disposizione gli stessi strumenti:

- una quantità, anche minima, del segmento di DNA che si intende riprodurre;
- nucleotidi liberi per la ricostruzione dei nuovi filamenti;
- i primer, ovvero degli inneschi per iniziare la reazione di copiatura del materiale, costituiti da brevi sequenze di DNA (oligonucleotidi) complementari alle estremità del segmento da riprodurre;
- una DNA-polimerasi;
- microelementi di supporto (ad es.  $Mg^{2+}$ ), per ricreare l'ambiente adatto alla reazione.

Il risultato della replicazione sarà una molecola discreta di DNA con estremità corrispondenti a quelle 5' degli oligonucleotidi utilizzati.

L'operatore sceglie le condizioni operative del ciclo (tempo e temperatura): è una scelta empirica e non canonica. Un ciclo di PCR può essere riassunto in 3 fasi:

- 1) **Denaturazione:** ogni ciclo inizia dalla dissociazione della doppia elica del DNA bersaglio, definita denaturazione, che si ottiene portando la soluzione in



cui esso è immerso tra i 94 e i 99°C. In questo modo si liberano i due filamenti.

- 2) **Annealing:** la temperatura viene abbassata a 30-55°C in modo da permettere ai primer di appaiarsi con una delle due eliche di DNA e, in virtù delle loro dimensioni ridotte, competono vantaggiosamente con la riassociazione dei due filamenti.
- 3) **Elongazione:** la temperatura viene nuovamente alzata a 65-72°C per massimizzare l'azione della polimerasi che procede con l'allungamento dei primer su entrambe le eliche in direzioni antiparallele. Il passaggio graduale tra temperatura di annealing e di elongazione è necessaria per iniziare l'allungamento senza che i primer si stacchino. Man mano che la polimerasi lavora la temperatura supera i 72°C e ricomincia la denaturazione per un altro ciclo (Innis *et al.*, 1990; Poli *et al.*, 2004).

I cicli di amplificazione si ripetono 20-50 volte e poiché ognuno dura solo qualche minuto, nel giro di poche ore si possono ottenere notevolissime quantità di DNA bersaglio, essendo l'amplificazione di tipo esponenziale. Si calcola infatti che dopo 20 cicli di reazione siano state prodotte  $10^{20}$  copie del frammento (Poli *et al.*, 2004). Dopo 50 cicli la reazione cessa per mancanza di nucleotidi e primer a disposizione. L'uso della PCR per la diagnosi di toxoplasmosi toglie i limiti imposti dalla diagnostica sierologica ed in medicina umana è utile in particolare alla diagnostica prenatale: è stato stimato che la PCR su liquido amniotico ha una sensibilità del 64%, una specificità del 100%, un PPV del 100% e una NPV dell'88% (Remington *et al.*, 2004). Tuttavia sensibilità e specificità dipendono dall'accuratezza dell'isolamento del materiale genetico del campione, dalle caratteristiche del DNA stesso e dai parametri con i quali è stata eseguita la tecnica.

I vantaggi possono essere sfruttati anche in veterinaria, data l'inesistenza di kit pronti e validati per ciascuna specie.

Per la ricerca di *T. gondii*, la sequenza più utilizzata è il gene B1, del quale esistono 35 copie nel genoma e la cui funzione è ancora sconosciuta, ma possiede un'alta

specificità. Nel corso di vari studi è stata identificata una sequenza di 529 bp, anch'essa specifica per *T. gondii*, che possiede più di 300 copie nel genoma. Il limite di rilevazione del DNA genomico di *T. gondii* è di 200 fg (femtogrammi; 1fg = 10<sup>-15</sup> g) per il gene B1, che sono una quantità enorme in confronto ai 20 fg per la sequenza di 529 bp. I risultati ottenuti con la ricerca della sequenza da 529 bp su campioni clinici, hanno dato una specificità adeguata per essere considerati attendibili.

I metodi per eseguire la PCR sono molti e ciò è dovuto al fatto che in gran parte i protocolli sono “home made” dai diversi laboratori; le grandi compagnie infatti non hanno dimostrato grande interesse per la commercializzazione di un kit standard, a disposizione di tutti, che sarebbe anche utile per dare la possibilità di un confronto omogeneo dei risultati nei diversi centri di ricerca. Inoltre l'assenza di un metodo standard accettato porta a far sì che sensibilità e specificità non possano essere confrontate con quelle dei metodi convenzionali (test sierologici, colture cellulari). E' possibile solo confrontare i diversi protocolli. Il futuro si proietta sullo sviluppo di test basati sulla real-time PCR, che fornisce un risultato quantitativo e grazie all'utilizzo di oligonucleotidi marcati a fluorescenza richiede meno passaggi (Switaj *et al.*, 2005).

Una volta identificato *T. gondii* si può procedere con la sua genotipizzazione, che si ottiene tramite la PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), la quale consente di distinguerne il tipo. Recentemente è stato messo a punto un set di nove markers “a tre vie” altamente specifici in grado di agire sul DNA amplificato con PCR e riconoscere i siti di restrizione in base allo specifico genotipo. Poiché i laboratori utilizzano markers diversi per la ricerca del genotipo, è difficile confrontare i risultati. Oggi con questo set di markers è possibile eseguire un test estremamente affidabile e facile da usare, in modo da facilitare gli studi epidemiologici (Su *et al.*, 2006).

In ambiente acquatico esiste un metodo per isolare ed identificare le oocisti di *T. gondii* in acqua in modo da poter valutare la salute delle zone marine a rischio e per tutelare la salute umana nel caso di acque di bevanda o prelevata da zone dove si svolge attività ricreativa. La metodica consiste in tre passaggi (Kourenti e Karanis, 2006):

- 1) concentrazione dei campioni di acqua tramite flocculazione con  $Al_2(SO_4)_3$ ;
- 2) purificazione con passaggi in diversi gradienti di saccarosio;
- 3) identificazione del parassita con PCR.

L'uso della PCR, dell'esame istologico e dell'immunoistochimica sono tra le tecniche più utilizzate per la diagnosi di toxoplasmosi anche nei Cetacei.

## **3.10. Terapia**

### Trattamento Prenatale

Il trattamento antiparassitario durante la gravidanza riduce significativamente il passaggio transplacentare del parassita riducendo così il tasso di toxoplasmosi congenita. Il trattamento materno con spiramicina somministrata continuativamente e alternata con cicli di pirimetamina-sulfonamide, nei casi di documentato passaggio transplacentare del parassita, riduce ulteriormente il rischio di toxoplasmosi congenita. Il trattamento prenatale limita inoltre i casi di manifestazione clinica della malattia congenita, aumentando così la quota di casi con infezione asintomatica.

La spiramicina è indicata per il trattamento profilattico perché è ben tollerata dalla madre, non ha effetto teratogeno sul feto ed ha una eccellente attività parassitaria. Previene il passaggio transplacentare del parassita, attraversa la placenta e si concentra in tutti i tessuti fetali ad eccezione del cervello (supera la barriera emato-encefalica in presenza di infiammazione). La sua emivita dopo la somministrazione orale è di poche ore e per ridurre significativamente la carica del parassita sono necessarie tre settimane di trattamento.

In presenza di infezione fetale, un trattamento antiparassitario più aggressivo viene raccomandato combinando alla spiramicina la pirimetamina-sulfadiazina. Entrambe queste sostanze attraversano liberamente la placenta e raggiungono nel sangue fetale concentrazioni simili a quelle del sangue materno. Il trattamento con pirimetamina-sulfadiazina è efficace nel feto dopo 10-13 giorni. A causa degli effetti collaterali

della pirimetamina-sulfonamide (depressione midollare) utilizzata in modo continuativo si alterna con la spiramicina ogni tre settimane.

#### Terapia dell'infezione acquisita

La terapia della malattia prevede l'impiego associato di un sulfamidico alla dose, per gli adulti, di 1 gr in somministrazione unica il primo giorno e poi 500 mg/die, e della pirimetamina alla dose, per gli adulti, di 75 mg/die per i primi tre giorni, poi 25 mg/die. La terapia si effettua per cicli di 20 gg separati da intervalli di 2-3 settimane. Il ciclo di cura si ripete per 3-4 volte. L'associazione di questi due farmaci sembra essere più efficace dell'uso singolo dei due. Al protocollo di cura verrà aggiunto acido folinico alla dose di 10-15 mg/die e viene previsto un periodico controllo della crasi ematica. Altri trattamenti possibili prevedono l'uso del trimetoprim associato a solfametossazolo, a dose piena per 3 mesi, o della clindamicina per 1 mese (Nardini e Fiorini 1986).

#### Terapia negli animali

Negli animali è valido il medesimo trattamento. La Clindamicina però è diventata l'antibiotico anti-*Toxoplasma* di prima scelta. Dosaggi: 5-12,5 mg/Kg a seconda della specie, ogni 12-24 ore per OS, SC o IM.

### **3.11. Profilassi**

La profilassi è uno degli aspetti più importanti nella lotta alla toxoplasmosi.

Le azioni da svolgere per limitare la diffusione di *T. gondii* sono atte alla riduzione delle contaminazioni ambientali da oocisti infettanti e alla limitazione della presenza di cisti tissutali nelle carni delle varie specie animali di interesse zootecnico, selvatiche e sinantropiche (ad es. piccione). Inoltre si può prevenire l'infezione

educando la popolazione umana riguardo ai principi igienico sanitari, oltreché informandola sui vantaggi di un corretto monitoraggio sierologico prima del concepimento.

L'intervento professionale del veterinario è comunque auspicabile anche in tutti i casi in cui è possibile svolgere un'opera di informazione riguardo ai possibili rischi derivanti dagli animali stessi o dal consumo di alimenti contaminati dal parassita.

Tra le misure necessarie per evitare che l'uomo, la donna in gravidanza e le persone immunocompromesse vengano infettate è necessario:

- 1) eliminare quotidianamente le feci del gatto, evitando la possibilità che le oocisti presenti al loro interno sporulino e diventino infettanti; nel caso di una donna in gravidanza è consigliabile l'uso di guanti monouso durante la pulizia della lettiera del gatto;
- 2) adottare sempre le basilari precauzioni igieniche (lavarsi le mani) dopo ogni contatto con il gatto e le sue feci;
- 3) evitare i contatti con gatti randagi;
- 4) lavare accuratamente frutta e verdura, soprattutto se coltivati in giardini dove i gatti hanno facile accesso;
- 5) effettuare il giardinaggio utilizzando sempre i guanti e evitando di mettere in bocca le mani sporche di terra;
- 6) in gravidanza evitare di mangiare carne cruda o poco cotta e frutti di mare crudi;
- 7) non bere latte non pastorizzato, o almeno sottoporlo a bollitura prima del consumo.

Per quanto riguarda la prevenzione nel gatto è necessario principalmente fare distinzione tra un gatto che vive costantemente in appartamento e uno che ha la possibilità di uscire da casa e vagare liberamente nell'ambiente esterno.

Nel primo caso è sufficiente non alimentarlo con carni o visceri (fegato e polmone) crudi o poco cotti che potrebbero contenere bradizoiti e proteggere gli alimenti dalle mosche che possono fungere da vettori.

Il gatto che conduce vita semilibera è più facilmente a rischio di infezione, a causa della possibilità di cacciare e nutrirsi autonomamente con animali (topi, piccioni)

infettati. In questo caso l'unica possibilità è il controllo mediante l'esecuzione di test sierologici almeno una volta all'anno in grado di segnalare l'avvenuto contatto con *T. gondii*.

Allo scopo di prevenire la diffusione delle oocisti emesse dal gatto è stato messo a punto un vaccino, utilizzato in vari Paesi ma non ancora registrato in Italia, il T-263, contenente bradizoiti vivi estratti da un ceppo mutante. Questo deve essere somministrato esclusivamente per via orale affinché il ciclo del parassita venga arrestato impedendo la produzione di oocisti (Freyre *et al.*, 1993). Poiché i bradizoiti contenuti nel vaccino sopravvivono solo poche ore a temperatura ambiente, la conservazione deve avvenire in frigorifero.

Anche per gli animali da allevamento si è pensato ad una vaccinazione con lo scopo di ridurre sia gli aborti nelle pecore e nelle capre, sia il rischio da parte dell'uomo di ingerire carne infetta.

Nella pecora è stato messo a punto un vaccino vivo che contiene tachizoiti vivi estratti dal ceppo S48 che garantisce un'immunità di 18 mesi, con un picco anticorpale dopo 6 settimane. Altri studi sono condotti anche per suini e altri ospiti intermedi, mentre per l'uomo ancora non è presente nessun vaccino specifico.

Sebbene i livelli di contaminazione spesso non siano noti, alcune misure possono prevenire l'infezione da *T. gondii* tramite l'acqua. Le persone dovrebbero fare attenzione a non bere le acque non trattate di ruscelli, fiumi, laghi durante attività ricreative. Se l'acqua non è trattata prima di berla è necessario filtrarla o bollirla. I viaggiatori dovrebbero fare attenzione in alcune aree del mondo dove l'acqua di rubinetto non viene filtrata. Limitare l'accesso di gatti presso le fonti d'acqua potabile. Nei Paesi sviluppati le feci del gatto non dovrebbero essere gettate nelle fogne ma nella spazzatura che poi viene depositata in discarica o nel terreno, tuttavia non è escluso che possa essere sperimentata e commercializzata una lettiera che inibisce direttamente le oocisti; inoltre i padroni potrebbero tenere il più a lungo possibile il gatto in casa di modo da evitare che esso cacci e contragga l'infezione, disperdendo le feci nell'ambiente (Jones e Dubey, 2009).



# **PARTE SPERIMENTALE**

## **4. OBIETTIVI DEL LAVORO**

Il monitoraggio della diffusione della toxoplasmosi nei mammiferi acquatici è oggetto di interesse crescente. Se nel resto del mondo si può contare su una cospicua letteratura sullo stato di presenza, diffusione e trasmissione della toxoplasmosi nelle diverse specie di Cetacei e Pinnipedi, nel Mediterraneo gli studi effettuati sono più limitati e riguardano prevalentemente il litorale tirrenico (Di Guardo *et al.*, 1995a,b; Pretti *et al.*, 2008).

Con questo lavoro si è cercato di contribuire alla conoscenza sull'areale di distribuzione di *Toxoplasma gondii* nei Cetacei che popolano i mari italiani, in particolare l'alto Adriatico. La ricerca di *T. gondii* da tessuti, sia di Odontoceti che Mysticeti, è stata condotta mediante l'utilizzo di tecniche molecolari ed istologiche.

Questo è stato possibile grazie all'attività della Banca per i Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo (Dipartimento di "Scienze Sperimentali Veterinarie" dell'Università degli Studi di Padova), che raccoglie tessuti provenienti principalmente da cetacei spiaggiati lungo le coste italiane, e alla costituzione dell'Unità di Intervento per la Necropsia di Grandi Cetacei (Progetto finanziato dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio – 2006), che dispone dell'attrezzatura necessaria per intervenire e lavorare direttamente sul campo.

Infatti, trattandosi di animali spiaggiati, se non si interviene prontamente e con strumentazioni appropriate non sempre è possibile ottenere campioni idonei ad analisi di laboratorio.



## 5. MATERIALI E METODI

Nel periodo marzo 2006 - luglio 2009 diciotto cetacei spiaggiati lungo i litorali italiani sono stati sottoposti alla ricerca di *Toxoplasma gondii* mediante analisi molecolari. I campioni risultati positivi a questa prima indagine sono stati poi sottoposti ad esame istologico.

Gli esemplari esaminati, sia Odontoceti che Mysticeti, appartenevano a 5 diverse specie, così suddivisi:

- 1) *Tursiops truncatus* – 13 soggetti;
- 2) *Balaenoptera physalus* – 2 soggetti;
- 3) *Ziphius cavirostris* – 1 soggetto;
- 4) *Grampus griseus* – 1 soggetto;
- 5) *Physeter catodon* – 1 soggetto.

La maggior parte degli animali esaminati provenivano dalle coste adriatiche (13 *T. truncatus* e 1 *G. griseus*), mentre gli altri dalle coste tirreniche (2 *B. physalus* e *P. catodon*) e messinesi (*Z. cavirostris*).

L'esame necroscopico di gran parte degli esemplari (15/18) è stato effettuato presso le strutture della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Padova. Per gli altri, a causa del difficoltoso recupero degli animali (eccessiva mole, aree poco accessibili, etc) l'autopsia è stata eseguita direttamente sul luogo dello spiaggiamento dall'Unità di Intervento per la Necroscopia di Grandi Cetacei.

Campioni tissutali provenienti da 2 *T. truncatus* e 1 *Z. cavirostris* e utilizzati in questa indagine sono invece stati prelevati da altri colleghi e successivamente inviati alla Banca per i Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo.

Per ogni animale esaminato è stata compilata una scheda contenente le caratteristiche morfometriche del soggetto (peso, lunghezza totale e di altre parti del corpo), data e luogo di spiaggiamento, stato di conservazione, sesso ed altri dati anamnestici. Tali schede sono conservate presso la Banca per i Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo.

Per ogni soggetto inoltre è stato svolto l'esame parassitologico completo per la ricerca di macroparassiti. Gli organi sono stati esaminati direttamente durante

l'esame autoptico o congelati separatamente a -20°C ed esaminati in tempi successivi.

Le analisi molecolari per la ricerca di *T. gondii* sono state effettuate preferibilmente su porzioni di tessuto cerebrale; quando ciò non era possibile le indagini sono state condotte su altri organi quali polmone, fegato, linfonodi. Nel caso di positività ad una prima analisi molecolare su porzioni di cervello, sono stati testati con la stessa metodica anche altri organi (fegato, muscolo e rene). In parallelo, su porzioni di organi dei soggetti positivi alle analisi molecolari, al fine di completare il quadro anatomo-patologico, sono stati anche effettuati esami istologici per verificare l'eventuale presenza di cisti e/o tachizoiti e di lesioni riferibili alla presenza del parassita..

Nella tabella sottostante (Tab. 4) vengono riportati i dati relativi agli animali esaminati nel corso dell'indagine.

N°	Specie	Data di spiaggiamento	Località di ritrovamento	Stato di conservazione	Sesso
1	<i>T. truncatus</i>	05/03/2006	Jesolo (VE)	2	F (gravida)
2	<i>T. truncatus</i>	24/04/2006	Cervia (RA)	3	M
3	<i>T. truncatus</i>	29/05/2006	Marina di Ravenna (RA)	3	M
4	<i>Z. cavirostris</i>	12/04/2006	Messina (ME)	3-4	NP
5	<i>B. physalus</i>	25/10/2006	Alassio (SV)	3	M
6	<i>T. truncatus</i>	14/11/2006	Porto Tolle (RO)	2	M
7	<i>T. truncatus</i>	16/06/2007	Pellestrina (VE)	5	M
8	<i>G. griseus</i>	30/06/2007	Cattolica (RN)	1	M
9	<i>B. physalus</i>	25/01/2008	Giannella (GR)	2	M
10	<i>P. catodon</i>	06/06/2008	Piombino (LI)	4	F
11	<i>T. truncatus</i>	21/06/2008	Jesolo (VE)	3	F
12	<i>T. truncatus</i>	08/07/2008	Jesolo (VE)	4	M
13	<i>T. truncatus</i>	08/07/2008	Rimini (RN)	4-5	M
14	<i>T. truncatus</i>	14/07/2009	Comacchio (FE)	2	M
15	<i>T. truncatus</i>	21/07/2009	Jesolo (VE)	4-5	M
16	<i>T. truncatus</i>	27/07/2009	Comacchio (FE)	4	M
17	<i>T. truncatus</i>	27/07/2009	Lido Adriano (RA)	2	M
18	<i>T. truncatus</i>	28/07/2009	Pellestrina (VE)	4	M

Tabella 4: dati relativi agli animali. NP: Non Pervenuto.

## 5.1 Esame necroscopico dei Cetacei

L'Unità di Intervento per la Necroscopia di Grandi Cetacei ha provveduto ad eseguire l'esame necroscopico di tutti i soggetti elencati nella tabella, rilevando sempre come primo dato utile le condizioni della carcassa. Per lo studio delle patologie nei mammiferi marini infatti è molto importante che l'esame post-mortem venga condotto il più presto possibile dopo la morte dell'animale, per evitare che le condizioni ambientali accelerino lo stato di decomposizione.

### CLASSIFICAZIONE DELLA CARCASSA

Ad ogni soggetto è stato attribuito un codice, in coerenza con questo tipo di classificazione, già adottato da altri Autori (Duignan, 2003; Pugliares *et al.*, 2007):

- Codice 1: Animale spiaggiato **vivo**; morto da pochissime ore.
- Codice 2: **Carcassa fresca**. Animale morto recentemente (< 24 ore), di aspetto normale, anche se ci possono essere dei danni dovuti agli animali spazzini; non emana odori sgradevoli; le mucose e gli occhi non sono secchi. La carcassa non presenta rigonfiamento addominale e nemmeno protrusione di lingua e pene.
- Codice 3: **Decomposizione moderata**. La carcassa è ancora intatta anche se la cute può presentarsi con crepe e desquamazioni; il blubber appare tinto di sangue ed oleoso. Le mucose sono secche e gli occhi possono essere incavati o addirittura assenti. Il rigonfiamento addominale è evidente, lingua e pene sono protrusi. Presenti segni di autolisi interna, ma gli organi sono ancora pressoché intatti.
- Codice 4: **Decomposizione avanzata**. La carcassa può essere intatta, ma collassata, con la cute fortemente danneggiata ed il derma di colore verde o nero. Il blubber e i muscoli si lacerano con facilità e perdono aderenza

sulle ossa. L'animale emana un forte odore di rancido. Gli organi interni sono quasi totalmente liquefatti.

- **Codice 5: Carcassa mummificata** o resti dello **scheletro**, spesso con pelle secca adesa alle ossa; completamente essiccato. L'uso delle carcasse con codice 4 e 5 è limitato allo studio della componente ossea, ma si possono ricavare anche alcuni dati anamnestici.

### ESAME ESTERNO

Si è proceduto con l'esame esterno, che si è svolto come indicato nei seguenti punti:

- identificazione della specie;
- valutazione dello stato di nutrizione dell'animale con l'osservazione della conformazione dei muscoli epiassiali lungo la colonna vertebrale;
- determinazione del sesso: lungo la linea mediana ventrale sia maschi che femmine possiedono una fessura genitale fra ombelico ed ano. Nelle femmine la distanza fra fessura genitale e fessura anale è inferiore ai 10 cm, mentre nei maschi è superiore. Inoltre la maggior parte delle femmine è dotata di due ulteriori fessure, poste parallelamente ai lati di quella genitale, all'interno dei quali sono alloggiati i capezzoli. La conferma finale del sesso si ha sempre con l'ausilio dell'esame interno;
- esame di cute, denti, occhi e mucose per rilevare eventuali lesioni.

Il primo passaggio da effettuare per poter esaminare la cavità interna dell'animale è la rimozione ed ispezione del blubber che si scolla molto facilmente dalla muscolatura scheletrica sottostante. Il blubber può essere rimosso solo dopo che è stata eseguita la valutazione di spessore, colore e tessitura e rilevata l'eventuale presenza di parassiti. Per la muscolatura scheletrica sono stati valutati gli stessi parametri del blubber.

## ESAME INTERNO

L'esame necroscopico prosegue con la valutazione degli organi all'interno della carcassa, che può essere fatta in situ o dopo asportazione. E' stato effettuato seguendo la procedura qui di seguito brevemente riassunta:

- taglio netto della pinna dorsale a livello della base;
- incisione del grande dorsale a tutto spessore;
- asportazione delle coste per la visualizzazione della cavità toracica nel suo insieme: sono stati osservati i rapporti topografici fra gli organi, le loro dimensioni, colore e presenza di eventuali lesioni o parassiti. Rilevamento della presenza di versamenti nelle cavità toracica e addominale;
- prima dell'asportazione del cuore è stato osservato e descritto il pericardio per valutare la presenza di versamenti. Per la rimozione del cuore si esegue un taglio su aorta e arteria polmonare, lasciando attaccato un tratto di entrambe della lunghezza di 6 cm. Esecuzione di tagli specifici per l'esame di miocardio, endocardio e valvole;
- esame del complesso trachea-bronchi-polmoni: in situ si controlla la posizione dei polmoni, in seguito dopo asportazione si valutano colore, tessitura, consistenza del parenchima e le condizioni della superficie pleurica.
- esame del fegato: si valutano posizione, volume, forma, colore. Cistifellea assente;
- esame della milza: forma e dimensioni variano a seconda della specie, una piccola percentuale di individui può presentare una o più milze accessorie. Si cerca l'organo in mezzo all'omento e dopo la rimozione si valutano dimensioni, forma, colore e tessitura del parenchima;
- esame del pancreas: è un organo che va incontro a rapida autolisi a causa degli enzimi che esso stesso produce. Se è ancora intatto viene rimosso, procedendo con l'analisi di dimensioni, forma, colore e tessitura del parenchima;
- esame del pacchetto meseraico: i linfonodi sono stati isolati valutandone dimensioni, forma e colore;

- esame dei reni: osservazione della capsula per rilevare la presenza di fluidi o emorragie e cercare di scollarla dal parenchima per verificare che non si siano aderenze. Rimozione dei reni con successiva valutazione di dimensioni, forma e colore;
- esame della vescica;
- esame dell'apparato riproduttore: nella femmina si esaminano utero e ovaie, nel maschio i testicoli ed il pene;
- rimozione del pacchetto gastro-intestinale: si effettua una doppia legatura a livello esofageo ed un'altra tra il tratto terminale del retto e l'ampolla rettale, quindi si pratica un taglio e si asporta completamente dalla carcassa;
- esame dell'esofago;
- esame dello stomaco: le concamerazioni gastriche vengono aperte per valutarne il contenuto, l'eventuale presenza di ulcere, di aree decolorate o altre anormalità;
- esame dell'intestino: si valutano pareti e diametro delle anse con il loro contenuto, quindi si esamina la mucosa per rilevare eventuali lesioni o parassiti;
- rimozione ed esame del cervello: la testa viene separata dal resto del corpo, praticando un taglio posteriormente allo sfiatatoio fino all'articolazione atlanto-occipitale; questa incisione viene completata ventralmente. Una volta isolata la testa, si procede con la dissezione dei tessuti molli dalla porzione caudale e dorsale del cranio. Con una sega oscillante (Ditta Hebu<sup>®</sup>) si pratica un taglio perpendicolare e al centro di ognuno dei due condili dell'occipitale, quindi si prosegue con l'incisione dei due lati e del dorso del cranio pochi centimetri posteriormente allo sfiatatoio, assicurandosi di aver tagliato le ossa a tutto spessore, ma senza lesionare il tessuto sottostante. A questo punto viene inserito un divisore per cranio (Ditta Rudolf) all'interno delle fessure praticate in modo da staccare definitivamente la calotta dal resto della testa e facendo leva in modo da staccarla ed aprire la volta cranica. Dopo aver separato le meningi dal cranio e resecato i nervi cranici, per far sì che il cervello scivoli dolcemente al di fuori della sua sede è utile capovolgere la testa e mantenerla un po' obliqua. Maneggiandolo con cura, si osservano

superficie e simmetria delle strutture (emisferi cerebrali, cervelletto e midollo allungato) con valutazione di colore, tessitura e presenza di eventuali lesioni.

## **5.2 Indagini parassitologiche**

### **5.2.1. Ricerca macroparassiti**

L'esame parassitologico per la ricerca dei macroparassiti si è basato sull'accurata analisi di tessuti ed organi di ciascuno degli esemplari esaminati.

Quando possibile, l'esame si è svolto di pari passo con l'autopsia: dopo le dovute considerazioni sulle loro condizioni anatomo-patologiche e una volta estratti, gli organi/tessuti sono stati analizzati.

#### **➤ Cute e blubber**

Durante l'esame esterno della carcassa sono state ispezionate cute e bocca, alla ricerca di ectoparassiti (principalmente crostacei della famiglia Pennellidae).

Il blubber delle regioni perianale e addominale è stato asportato e ispezionato con tagli ravvicinati (distanza 1-2 cm) a tutto spessore per la ricerca di larve merocercoididi di cestodi (Tetraphyllidea). È stata ispezionato anche il tessuto connettivo tra blubber e muscolatura per la ricerca di nematodi (Crassicaudidae).

#### **➤ Stomaco**

Una volta aperte le concamerazioni gastriche è stata osservata la mucosa e raccolto il contenuto che in seguito è stato filtrato ed esaminato per la ricerca di parassiti Anisakidae. Nello spessore della parete è stata valutata la presenza di noduli parassitari (Opisthorchioidea) che sono stati prelevati ed analizzati allo stereomicroscopio.



➤ **Intestino**

Una volta estratto e separato l'intestino dallo stomaco con opportune legature, ed esaminato il mesentere, sono state dipanate le anse intestinali. Dopo l'apertura la mucosa è stata ispezionata e gli eventuali parassiti visibili ad occhio nudo sono stati raccolti. Sul materiale fecale raccolto è stato effettuato l'esame parassitologico con le seguenti tecniche:

- Esame per sedimentazione: consiste nella filtrazione delle feci, con setacci con pori del diametro di 250-500 µm, in calici conici. Si aggiunge acqua di fonte e si lascia riposare per 30-40 minuti, dopodiché il surnatante viene eliminato. Il ciclo si ripete fino ad ottenere un surnatante limpido. Il sedimento risultante viene osservato allo stereomicroscopio per la ricerca di parassiti (trematodi digenei, cestodi, etc).
- Esame qualitativo: tecnica adatta per la ricerca di uova nelle feci. Questo metodo prevede l'utilizzo di feci prelevate dal retto, che vengono trasferite in un mortaio e diluite con acqua di fonte. Il risultato che si ottiene è una sospensione pressoché omogenea, idonea per essere filtrata. Il liquido così ottenuto viene messo in una provetta e centrifugato a 1500-2000 giri per circa 5 minuti. Estratta la provetta dalla centrifuga si elimina il surnatante e si aggiunge al sedimento una soluzione a peso specifico 1300; si agita la provetta e la si sottopone nuovamente a centrifugazione per 5 minuti a 2000 giri. Si aggiunge ancora la soluzione a densità 1300 fino a che non si forma un menisco positivo, si poggia delicatamente un vetrino coprioggetto e si attende qualche minuto affinché gli elementi parassitari eventualmente presenti nelle feci aderiscano alla faccia inferiore del vetrino coprioggetto che viene trasferito su di un vetrino portaoggetti al microscopio ottico.

➤ **Fegato**

L'organo è stato ispezionato esternamente e i vasi e dotti di calibro maggiore sono stati aperti con una forbice per rilevare la presenza di parassiti

all'interno del lume. Sono stati effettuati tagli seriali in modo da ottenere fette d'organo dello spessore di 1-2 cm ed ognuna di esse è stata sottoposta a lavaggio e spremitura delicata in un contenitore riempito con acqua di fonte, così da favorire l'uscita dei parassiti eventualmente presenti in dotti, vasi e parenchima epatico. Il liquido di lavaggio ottenuto è stato sottoposto ad esame del sedimento e valutato allo stereomicroscopio.

➤ **Reni**

I reni, dopo l'esame esterno sono stati tagliati longitudinalmente per visualizzare pelvi, vasi e parenchima interno ed ispezionati per la presenza di parassiti in parenchima e vasi. Nel caso in cui siano stati trovati parassiti (Crassicaudidae) infissi con l'estremità cefalica nel parenchima, questi sono stati asportati con il tessuto circostante per essere isolati poi con precisione allo stereomicroscopio.

➤ **Polmoni**

Il parenchima è stato ispezionato minuziosamente e l'organo è stato aperto seguendo il decorso dei bronchi alla ricerca di nematodi Pseudaliidae. Eventuali parassiti liberi all'interno dei bronchi e bronchioli sono stati delicatamente asportati, mentre quelli fortemente infissi con l'estremità cefalica nel parenchima polmonare sono stati asportati insieme al tessuto circostante.

➤ **Seni intracranici**

I seni intracranici sono stati aperti durante la necropsia quando le condizioni lo permettevano. All'interno dei seni è possibile rinvenire sia nematodi infissi con l'estremità cefalica nello spessore della mucosa (Crassicaudidae) che trematodi (Brachycladiidae) in base alla specie ospite. Se presenti, i parassiti infissi sono stati estratti con cautela servendosi di pinze e bisturi.

I parassiti così isolati sono stati raccolti, quantificati (quando possibile) e fissati in etanolo 70%. Gli elminti parassiti sono stati in parte chiarificati in lattofenolo di Amman e in parte sottoposti a colorazioni specifiche (colorazione di Moratel) ed analizzati al microscopio ottico, mentre gli artropodi parassiti sono stati studiati allo stereomicroscopio. Per la classificazione tassonomica sono state utilizzate le chiavi dicotomiche ed i dati presenti in letteratura; in particolare per l'identificazione degli elminti ci si è basati su quanto riportato da Delyamure (1955) e Bray *et al.* (2008), mentre per gli artropodi sono stati consultati diversi articoli specifici tra cui quelli pubblicati da Hogans (1987) e Abaunza *et al.* (2001).

## 5.2.2. Ricerca *Toxoplasma gondii*

### - ANALISI MOLECOLARI

I campioni tissutali da sottoporre alla ricerca *T. gondii*, prelevati durante le necropsie, sono stati congelati (-20°C) e conservati in contenitori singoli, fino al momento dell'analisi. I campioni sono stati processati secondo la metodica di seguito riportata.

Per l'**estrazione** degli acidi nucleici è stato usato il kit commerciale High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Il kit prevede l'utilizzo di una quantità variabile di campione, da 20 a 50 mg, che viene lisato con buffer di lisi e proteinasi K a 55°C per un'ora circa, tempo necessario per una completa disgregazione tissutale. Successivamente si aggiunge un Binding buffer perché si leghi al DNA lasciandolo ad incubare per 10 minuti ad una temperatura di 70°C. Dopo si effettua un'aggiunta di isopropanolo e si procede col fissaggio del DNA su colonnine con filtro di natura silicica. Per eliminare le impurità si ricorre a ripetuti lavaggi con un buffer apposito: si ottiene così un DNA purificato.

Tuttavia il gene utilizzato come target non è specifico per *T. gondii*, infatti esso fa parte di geni nucleari di piccole subunità ribosomiali (nss-rRNA) di *Neospora bovis* che differiscono da quelle *T. gondii* per sole quattro coppie di basi (Ho *et al.*, 1996).

L'amplificazione del DNA permette di ottenere segmenti di 300 bp; se il tracciato elettroforetico evidenzia una positività, è necessario ricorrere alla tipizzazione del

parassita tramite un'ulteriore digestione enzimatica e/o sequenziamento. Per ciascuna delle due tecniche che si sceglie di usare è necessario verificare la correttezza del procedimento con un controllo positivo: nel nostro caso è stato ritenuto rappresentativo come controllo positivo il DNA proveniente da oocisti di *T. gondii* isolate da feci di gatto e conservate in acido solforico al 2% presso il Laboratorio di Parassitologia e Malattie Parassitarie del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie (Università degli Studi di Padova).

Il protocollo di **amplificazione** utilizzato è il seguente:

- 1 PCR Buffer (senza Mg)
- 2 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,2 mM dNTPs
- 1 µM Primer API-F (5'-AAG TAT AAG CTT TAA TAC GGC-3') forward
- 1 µM Primer API-R (5'-CAC TGC CAC GGT AGT CCA ATA-3') reverse
- 2U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen)
- 1-3 µl DNA (quantità stabilita a seconda dei campioni)
- Portare a volume di 30 µl con H<sub>2</sub>O

La miscela ottenuta è stata sottoposta ad amplificazione rispettando i seguenti parametri:

	Temperatura	Δt	-Δt	Cicli
Attivazione Taq	95°C	5'		
Denaturazione	94°C	30''		12
Annealing	58°C	30''	-0,5°C	
Denaturazione	94°C	30''		23
Annealing	52°C	30''		
Estensione	72°C	30''		
Estensione	72°C	7'		
Conservazione DNA	4°C			

Sui campioni positivi ed il controllo positivo è stata effettuata la **restrizione enzimatica**, tramite l'utilizzo dell'enzima BseDI in grado di agire sulla sequenza:

5'-C\*CNNGG-3'

3'-GGNNC\*C-5'

Per la fase di digestione sono stati necessari:

10x 5 µl di Buffer Tango

0,5-1 µg/µl di DNA (la quantità è variabile)

0,5-2 µl di BseDI

Portare a volume di 30 µl con H<sub>2</sub>O.

Mescolare delicatamente e centrifugare per alcuni secondi.

Lasciare ad incubare a 55°C per 2 ore.

La positività per *T. gondii* è confermata quando si formano tre frammenti di DNA di 165, 95, 40bp. Invece nel caso di *Neospora* si ottengono frammenti di: 105, 92, 85 bp; per *Sarcocystis* di: 220 e 105bp.

Inoltre è stato effettuato il **sequenziamento** dei campioni positivi.

Dopo il processo di amplificazione, i prodotti della reazione sono stati posti in gel di acrilamide 7% a 180 mV per osservare la corsa elettroforetica. Il DNA è stato marcato con Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen) e visualizzato con Geldoc XR (Biorad). L'acquisizione dell'immagine è stata possibile con l'utilizzo del programma Quantity One. Con i geni markers MK5 e MK8 (Fermentas) si sono valutate le dimensioni dei prodotti amplificati.

Il sequenziamento dei campioni positivi è stato eseguito dalla ditta BMR Genomics, Padova (<http://www.bmr-genomics.it/>) che utilizza un sequenziatore ABI 3730XL 96 capillari. Quindi le sequenze ottenute sono state confrontate tramite il software nucleotide-nucleotide ChromasPro versione 1.42 (Technelysium Pty Ltd., Australia) nel quale sono contenute e riportate le sequenze di *T. gondii* depositate in GenBank™.

## - ESAME ISTOLOGICO

Tutti i tessuti prelevati dai soggetti esaminati sono stati fissati in formalina tamponata al 10%. Quindi sono stati depositati nella Banca per i Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo. Solamente i tessuti dei soggetti già positivi alla diagnosi con PCR per *T. gondii* sono stati prelevati dalla Banca, processati e osservati al microscopio per l'esame istopatologico.

L'allestimento dei vetrini istologici è stato effettuato presso il Laboratorio di Anatomia Patologica Veterinaria del Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria dell'Università di Padova.

La preparazione della sezione istologica dei campioni fissati prevede una prima fase detta "trimming" che consiste nel tagliare il campione in una sezione di 2-3 mm in modo da poterlo processare.

Il tessuto è stato sezionato e posto all'interno del processatore, un macchinario che esegue i processi di disidratazione in scala ascendente di alcoli per eliminare la parte acquosa, diafanizzazione nello xilolo per conferire un aspetto translucido e permettere l'impregnazione in paraffina. Una volta completato il lavoro del processatore, si è passati alla fase di inclusione durante la quale il campione è stato montato con la paraffina solidificata su una biocassetta, in modo da poterlo tagliare al microtomo.

Il microtomo consente di ricavare dal pezzo campionato delle fette sottilissime, aventi uno spessore di 4 µm. Le micro-sezioni sono state adagiate nell'acqua a temperatura ambiente, fatte aderire ad un vetrino, trasferite in acqua distillata a 50°C e fatte nuovamente aderire al vetrino.

Per eliminare la maggior parte della paraffina, la cui fusione avviene a 56-58°C, il vetrino è stato posto in stufa a circa 70°C per preparare la sezione alla colorazione.

Il processo di colorazione è svolto da un coloratore semiautomatico che si occupa di deparaffinare con xilolo, reidratare con scala discendente di alcoli, e lavare con acqua distillata il vetrino. E' stata quindi eseguita la prima colorazione con ematossilina, un colorante di natura acquosa e basico, che tinge il nucleo delle cellule di blu-violetto scuro. Poi il colore in eccesso è stato lavato ed il vetrino ricolorato con eosina, colorante acido, che tinge diversi elementi cellulari con gradazioni che

virano dal rosa al rosso. Questa tecnica permette di evidenziare in maniera chiara le cisti tissutali di *T. gondii* e meno dettagliatamente i tachizoiti.

## 6. RISULTATI

Dei 18 esemplari di cetacei esaminati per la ricerca di *T. gondii* mediante analisi molecolare, due sono risultati positivi. In particolare dei 27 campioni tissutali analizzati, 7 hanno evidenziato positività.

Nella tabella sottostante (Tab. 5) vengono riportati i risultati relativi agli animali/organismi esaminati e ai risultati ottenuti:

N°	Specie	Organi testati	Risultato PCR (+/-)
1	<i>T. truncatus</i>	Cervello, Placenta	- / -
2	<i>T. truncatus</i>	Cervello	-
3	<i>T. truncatus</i>	Cervello	-
4	<i>Z. cavirostris</i>	Polmone	-
5	<i>B. physalus</i>	Cervello / midollo / linfonodo	- / - / -
6	<i>T. truncatus</i>	Cervello	-
7	<i>T. truncatus</i>	Cervello	-
8	<i>G. griseus</i>	Cervello	-
9	<i>B. physalus</i>	Cervello, midollo	- / -
10	<i>P. catodon</i>	Fegato	-
<b>11</b>	<b><i>T. truncatus</i></b>	<b>Cervello, fegato, polmone</b>	<b>+ / + / +</b>
12	<i>T. truncatus</i>	Cervello	-
13	<i>T. truncatus</i>	Cervello	-
14	<i>T. truncatus</i>	Cervello	-
15	<i>T. truncatus</i>	Cervello	-
16	<i>T. truncatus</i>	Fegato	-
<b>17</b>	<b><i>T. truncatus</i></b>	<b>Cervello, fegato, muscolo, rene</b>	<b>+ / + / + / +</b>
18	<i>T. truncatus</i>	Cervello	-

Tabella 5: animali/organismi sottoposti ad analisi molecolare per ricerca *T. gondii* e risultati ottenuti.

Sui soggetti risultati positivi a questa prima analisi è stato eseguito anche l'esame istologico su porzioni di cervello e di altri organi per rilevare le cisti e le eventuali lesioni riferibili alla presenza del parassita.

Qui di seguito vengono presentati i risultati di tutte le indagini effettuate sui due animali positivi per *T. gondii*, in modo da poter dare un quadro complessivo delle loro condizioni clinico-patologiche, correlate o meno alla condizione di infezione. Per semplicità e migliore chiarezza verranno chiamati caso 1 (N° 11, Tab. 5) e caso 2 (N° 17, Tab. 5).

## **CASO 1**

Si trattava di un soggetto di femmina adulta (età stimata 35 anni circa) di *Tursiops truncatus*, spiaggiata al porto turistico di Jesolo (Venezia) nel giugno 2008. L'esame necroscopico è stato eseguito il giorno seguente lo spiaggiamento presso la sala necroscopica della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova. L'animale misurava 273 cm di lunghezza con un peso di 194 Kg; lo stato di nutrizione appariva piuttosto scadente.

### **Esame macroscopico**

- **Bocca/denti/esofago:** gengivite iperplastica cronica diffusa grave nel cavo orale con formazioni esofitiche filiformi disseminate su tutta la volta del palato, associato ad una retrazione della mucosa in corrispondenza dell'alveolo dei denti, evidenziandone il colletto. Questi ultimi, specialmente quelli in posizione rostrale, si presentavano estremamente consumati con ampie erosioni a livello degli alveoli dentari, specialmente in corrispondenza del palato. Si è osservata disepitelizzazione della lingua e alcune ulcere della mucosa faringea di colore nerastro al centro con margini rilevati e pigmentazione giallo-verdastra periferica.



- **Stomaco:** numerosi noduli parassitari nello spessore della parete della seconda concamerazione gastrica.
- **Linfonodi meseraici:** grave e diffusa linfadenomegalia con marcato aumento della consistenza dovuto a grave fibrosi del parenchima, evidente al taglio.
- **Polmoni:** fibrosi polmonare multifocale e polmonite cronica multifocale.
- **Milza:** si presentava di colore variegato con sfondo biancastro e ampie aree retratte al taglio di colore arancione.
- **SNC:** edema ed iperemia delle meningi e del tessuto encefalico.

Esame parassitologico: ricerca macroparassiti:

- A livello polmonare sono stati isolati 25 nematodi Pseudaliidae. Per la caratteristica di questi parassiti di avere l'estremità cefalica infissa nel parenchima polmonare e per le loro caratteristiche morfometriche, sono stati ascritti al genere *Halocercus*.
- Nella seconda e terza concamerazione gastrica sono stati isolati alcuni noduli parassitari, in parte calcificati. I noduli erano dotati di una piccola apertura attraverso la quale fuoriuscivano le uova. Ogni nodulo conteneva uno o più trematodi adulti identificati come *Pholeter gastrophilus* (Opisthorchioidea).
- Dal tratto iniziale dell'intestino tenue è stato ritrovato 1 esemplare di trematode digeneo appartenente al genere *Hadwenius* (Brachycladiidae); per il cattivo stato di conservazione del parassita non è stato possibile determinarne la specie. All'esame coprologico qualitativo sono state osservate numerose uova opercolate del parassita.

Esame parassitologico: ricerca *T. gondii*:

Come già riportato, l'esame alla PCR effettuata in prima istanza su tessuto cerebrale ha dato risultato positivo. Sono poi state testate anche porzioni di altri organi (fegato e polmone), per valutare il grado di diffusione dell'infezione all'interno

dell'organismo, che hanno confermato la positività. Il risultato del sequenziamento è stato di una identità pari al 99% con *T. gondii* (accession number: AY488165).

A seguito di tali riscontri è stato effettuato l'esame istopatologico, nonostante i tessuti presentassero processi autolitici e fermentativi che impedivano un'adeguata analisi microscopica. Negli organi risultati positivi alla ricerca con PCR di *Toxoplasma gondii*, si è potuto evidenziare:

- **SNC:** è stata diagnosticata una encefalite non-purulenta multifocale. A livello della **corteccia cerebrale** ottenuta dalle regioni frontale e parietale sono state osservate alcune **cisti** di *T. gondii* (Fig. 8). Attorno alle cisti è stata riscontrata una minima reazione infiammatoria mononucleata, prevalentemente macrofagica, associata a gliosi periferica (Fig. 9), spesso caratterizzata da astrogliosi marcata con ampie vacuolizzazioni del tessuto, oligodendrogliosi e minima necrosi. Oltre alla gliosi si è osservato un quadro di satellitosi e lipofuscinosi cerebrale. Presenti aree di congestione ed edema. Sono stati rilevati elementi compatibili con lo stadio di tachizoite.

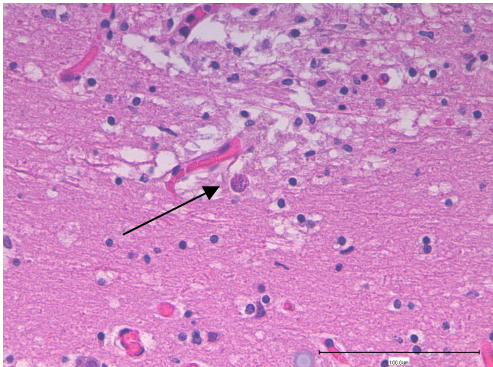


Figura 8: Ciste di *T. gondii* nel tessuto encefalico (40x, EE)

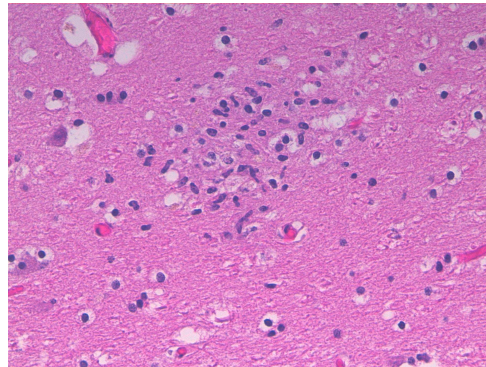


Figura 9: Focolaio di gliosi nel tessuto nervoso della corteccia (40x, EE)

- **Polmone:** assenza di reperti riferibili a *Toxoplasma* spp. E' stata osservata grave broncopolmonite piogranulomatosa multifocale con vasculite e trombosi micotiche (Fig. 10) e una diffusa fibrosi dei setti con attivazione macrofagica ed edema. Nel lume bronchiale si osservava flogosi macrofagica e linfocitaria nello spessore della mucosa con grave essudazione in alcuni

bronchioli di macrofagi attivi e neutrofili. La flogosi tendeva ad estendersi profondamente fino ad interessare i tessuti peri-bronchiali periferici ed appare associata a necrosi e ife fungine (Fig. 11). La medesima flogosi si osservava nello spessore delle strutture vascolari periferiche con edema e necrosi fibrinoide e associata a trombosi con ife fungine. Le ife rilevate apparivano essere occasionalmente settate, con diametro variabile e non omogeneo da 3 a 8  $\mu\text{m}$ , occasionali ramificazioni con inclinazione di  $90^\circ$  e gemmazioni occasionali (Fig. 12).

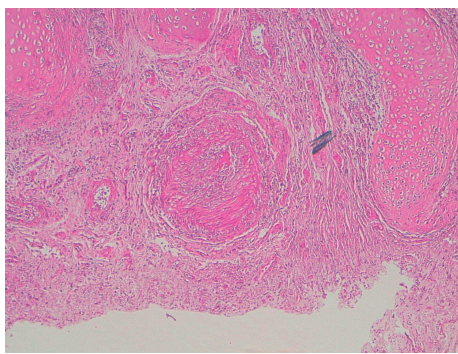


Figura 10: Trombo in un vaso polmonare (10x, EE).

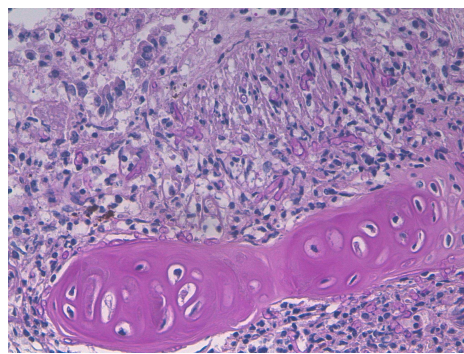


Figura 11: ife fungine nello sfintere muscolare bronchiale (40x, EE).

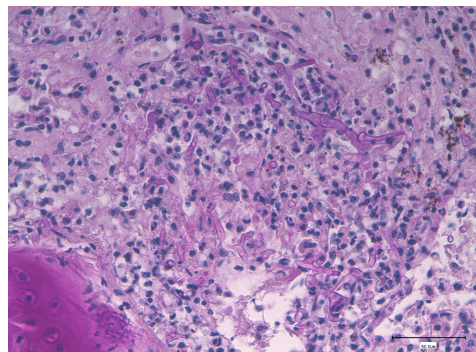


Figura 12: Particolare di ife fungine nel tessuto polmonare (40x, PAS)

- **Fegato:** assenza di reperti riferibili a *Toxoplasma* spp. Presente stasi biliare, lipidosi e flogosi macrofagica cronica localmente estesa in sede subcapsulare.

Al fine di svolgere un'indagine completa sono stati osservati anche gli altri organi:

- **Lingua e palato:** iperplasia epiteliale marcata diffusa con formazione di una rete epiteliale nel derma in associazione ad edema e ipercheratosi ortocheratosica con erosione e fessurazione dello strato superficiale, spongiosi ed edema occasionale e formazione di papille cornee.
- **Faringe:** faringite cronica con trombi micotici associati ad ulcerazione della mucosa.
- **Stomaco:** evidenziati noduli parassitari e uova di *Pholeter gastrophilus*. Necrosi fibrinoide associata a quadro di vasculite (trombi) dovuta a infezione fungina.
- **Aorta:** flogosi mediastinica periarteriosa.
- **Linfonodi:** fibrosclerosi linfonodale con deplezione linfocitaria ed aree di necrosi.
- **Cuore:** fibrosi interstiziale minima multifocale (residuo di danno pregresso).
- **Ovario:** mineralizzazione delle pareti vascolari ovariche. Ooforite cronica focale con fibrosi.
- **Ghiandola mammaria:** mastite cronica multifocale lieve.

## CASO 2

Il secondo caso era rappresentato da un soggetto maschio adulto (circa 35 anni) di *T. Truncatus* spiaggiato presso il Lido Adriano (Ravenna) nel mese di luglio 2009. In giornata l'esemplare è stato trasportato presso l'Aula Necroscopie della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova e l'autopsia è stata effettuata il giorno seguente. Lo stato di conservazione della carcassa è stato classificato con codice 2. L'animale misurava 280 cm di lunghezza totale per un peso di 195 Kg ed era in uno stato di nutrizione scadente.

## Esame macroscopico

- **Bocca/denti/esofago:** gengivite iperplastica cronica grave diffusa sul palato e sulla mucosa gengivale delle arcate dentarie mandibolari. Si osservavano ampie aree confluenti di proliferazioni filiformi dure e giallastre, che si estendevano nel derma sottostante, a carico della mucosa del palato duro e della faccia interna dei rami mandibolari. Anche numerosi alveoli dentari, occasionalmente senza denti, erano interessati da tali lesioni con retrazione della mucosa gengivale. Presenza di aree depresse ovalari da multifocali a confluenti a carico della mucosa esofagea.
- **Stomaco e prestomaci:** nella prima concamerazione presenza di un pesce e di alcuni becchi di calamari. Gastrite catarrale acuta diffusa moderata con noduli parassitari nella sottomucosa. Nella terza concamerazione e nell'ampolla duodenale, marcatamente ectasica, presenza di abbondante liquido acquoso grigiastro con materiale finemente granulare biancastro in sospensione.
- **Intestino tenue/colon/retto:** enterite sierio-catarrale diffusa grave.
- **Fegato:** congestione epatica diffusa con colorazione giallo-arancione e consistenza friabile del tessuto.
- **Reni:** nefrosi diffusa con occasionale ectasia delle pelvi.
- **Cuore:** marcata dilatazione delle camere ventricolari (soprattutto la sinistra).
- **Linfonodi meseraici:** sclerosi linfonodale meseraica diffusa grave. I linfonodi si presentavano biancastri, marcatamente aumentati di dimensioni, quasi a formare un cordone del diametro di circa 4 cm, ed estremamente duri alla palpazione ed al taglio. In sezione si osservava una spessa capsula esterna ed un tessuto bianco-verdastro diffuso con occasionali strutture follicolari alla periferia.
- **Bronchi/polmoni/linfonodi mediastinici:** presente edema polmonare marcato con iperemia della mucosa bronchiale. All'esame esterno si poteva notare un grave enfisema diffuso che interessava solo il polmone destro mentre nel sinistro si osservava iperemia passiva. Alla palpazione si percepivano occasionali noduli delle dimensioni di un pisello nel parenchima

polmonare corrispondenti a noduli parassitari, occasionalmente calcificati al centro, con parete fibrosa (grave polmonite parassitaria). Numerose ampie aree erano interessate da un quadro di ispessimento del tessuto interstiziale e colorazione giallastra diffusa frammista ad aree iperemico-emorragiche da cui, spremendo, fuoriusciva liquido siero-ematico e materiale catarrale. Iperplasia reattiva dei linfonodi mediastinici.

- **Milza:** aumentata di dimensioni ma priva di sangue al taglio. Capsula biancastra. Presenza di 4 milze accessorie nel mesentere.
- **Cute e tessuti sottocutanei:** ittero sottocutaneo diffuso lieve. Iperplasia reattiva acuta dei linfonodi prescapolari.
- **Seni nasali/faringe/laringe:** sono state riscontrate numerose lesioni ulcerative a carico della mucosa dai margini irregolari iperemici (sinusite). Presenza di faringite follicolare.
- **Tiroidi:** edematose ed emorragiche.
- **SNC:** edema cerebrale.

#### Esame parassitologico: ricerca macroparassiti

- A livello polmonare sono stati ritrovati 83 nematodi (65 femmine e 18 maschi) liberi nei bronchi; i parassiti erano Pseudaliidae, appartenenti alla specie *Stenurus ovatus*.
- Nel tratto iniziale dell'intestino sono stati isolati in totale 427 trematodi digenei adulti appartenenti alla specie *Hadwenius tursionis* (Brachycladiidae).

### Esame parassitologico: ricerca *T. gondii*

L'analisi molecolare effettuata su tessuto cerebrale ha dato esito positivo; anche in questo caso, per valutare il grado di disseminazione e coinvolgimento degli altri organi all'interno del corpo dell'animale, sono stati testati altri tessuti conservati a -20°C (fegato, muscolo, rene).

Il risultato del sequenziamento ha dato identità al 100% con *T. gondii* (accession number: AY488165).

Nella immagine sottostante sono visibili i prodotti di amplificazione dei campioni tissutali analizzati (Fig. 13).

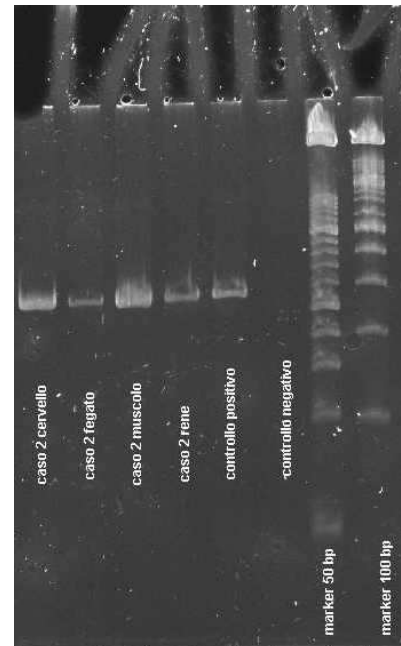


Figura 13: profilo elettroforetico dei campioni su gel di acrilamide.

Anche per questo individuo è stata compiuta l'indagine istopatologica a livello di diversi organi.

- **SNC:** meningo-encefalite non purulenta multifocale moderata nelle sezioni di **corteccia cerebrale** (frontale e parietale). Sono state osservate aree di gliosi (Fig. 14) con astrocitosi, vacuolizzazioni e minima necrosi con rari macrofagi e focolai di flogosi mononucleata perivascolare submeningea (Fig. 15). Emorragie cerebrali occasionali.



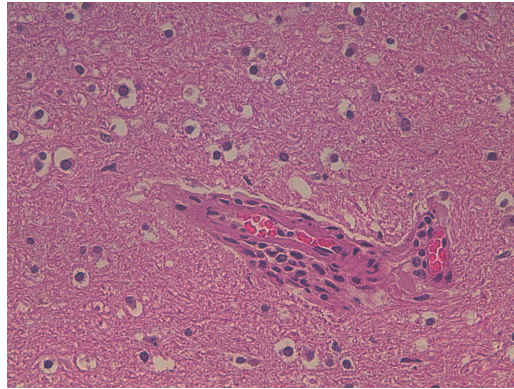


Figura 14: Gliosi perivascolare con rari macrofagi (40x, EE)

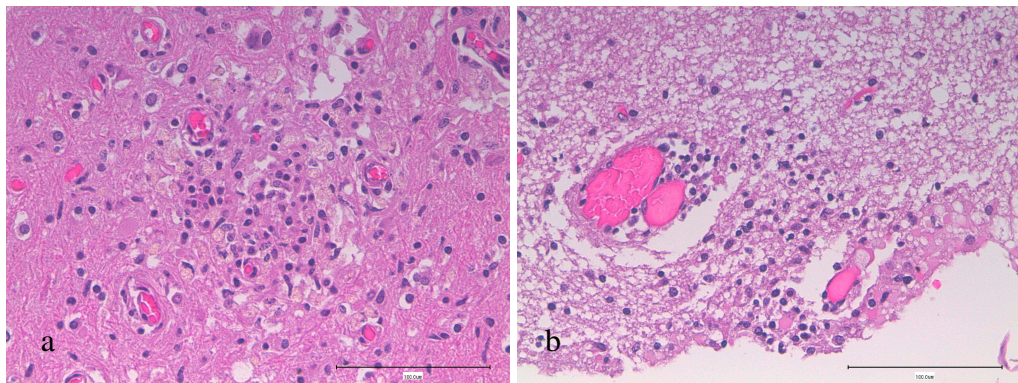


Figura 15 a: aggregato macrofagico nel tessuto encefalico; b) encefalite cronica in sede sub-meningea (40x, EE).

- **Fegato:** steatosi centrolobulare e midzonale associata a stasi biliare marcata. Si osservavano focolai di necrosi con infiltrato di cellule infiammatorie caratterizzando un'epatite cronica minima negli spazi portali. Presente fibrosi portale.
- **Muscolo:** rabdomiolisi con rari macrofagi che infiltrano le singole fibre (Fig. 16). Atrofia muscolare diffusa moderata.

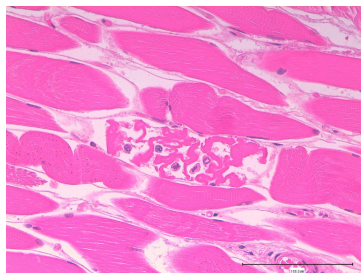


Figura 16: Rabdomiolisi con occasionali macrofagi (40x, EE)



- **Rene:** si sono evidenziate aree di glomerulosclerosi con minima nefrite cronica multifocale. Mineralizzazione intratubulare disseminata.

Negli altri organi l'esame istopatologico ha mostrato i seguenti quadri:

- **Esofago:** miosite profonda macrofagica perivascolare con necrosi del tessuto muscolare associata a depressione della mucosa. Si notano depressioni nella struttura della mucosa caratterizzata da ipercheratosi multifocale.
- **Stomaco e prestomaci:** a carico della seconda concamerazione gastrica presenza di miosite profonda e gastrite cronica caratterizzata da flogosi interstiziale mononucleata.
- **Cuore:** atrofia delle cellule muscolari associate ad edema interstiziale; miocardite cronica nello spessore del ventricolo destro (Fig. 17). Vasi ectasici.

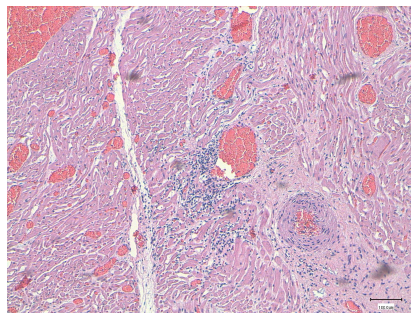


Figura 17: Miocardite cronica con componente linfo-plasmacellulare (10x, EE).

- **Linfonodi:** fibrosclerosi dei linfonodi con deposizione di tessuto connettivo maturo nei seni linfonodali. Residui follicolari con grave deplezione linfocitaria con necrosi e flogosi neutrofilica.

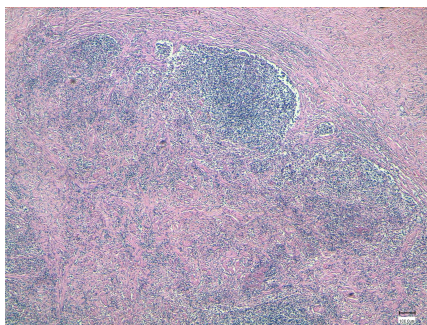


Figura 18: Fibrosclerosi dei linfonodi meseraici (5x, EE)

- **Polmoni:** mineralizzazioni e calcificazioni disseminate da nematodi nei tessuti molli. Si sono osservate fibrosi grave della parete bronchiale e fibrosi interstiziale, entrambe associate a infestazione parassitaria. Presenti infiltrato macrofagico ed edema diffuso. Ghiandole mucipare assenti. Diagnosi morfologica: broncopolmonite suppurativa multifocale moderata.
- **Milza:** accumulo di ematoidina che migra dall'esterno verso l'interno della parete dei vasi che si trasforma in cristalli che causano occlusione dei vasi ematici; ematoidina anche in sede subcapsulare. Presente ialinosi centrofollicolare. Elevate emocateresi ed emopoiesi extramidollare all'interno delle **milze accessorie**.
- **Tiroide:** atrofia follicolare con fibrosi interfollicolare.

## 7. DISCUSSIONE

Il presente lavoro, che è da considerarsi un'indagine preliminare, necessita di ulteriori ricerche e approfondimenti. I risultati hanno evidenziato la presenza di *T. gondii* in cetacei spiaggiati nel Mare Adriatico. Si tratta dei primi casi documentati della presenza di *T. gondii* in questo mare.

La bibliografia per quanto riguarda l'infezione da *T. gondii* in Cetacei allo stato selvatico è piuttosto ampia, infatti sono stati trovati positivi individui provenienti da

USA, Canada, Costa Rica, Australia, Hawaii, Giappone, Gran Bretagna, Spagna e Italia (Mar Tirreno) (vedi Tabella 1). In particolare, per quanto riguarda l'indagine su *T. truncatus* (al di fuori del Mediterraneo) sono state già evidenziate cisti tissutali nei tessuti di una madre con il suo cucciolo (Inskeep *et al.*, 1990) e in un altro individuo negli USA (Cruickshank *et al.*, 1990).

Nel Mar Mediterraneo non si conosce in maniera approfondita la diffusione di tale infezione. In Spagna (Cabezòn *et al.*, 2002) sono stati testati con il MAT 58 delfini spiaggiati vivi (codice 1) o morti da meno di 24 ore (codice 2) per effettuare un'indagine sierologica; tale lavoro è stato possibile poiché sono stati analizzati campioni di sangue provenienti solo da carcasse in buono stato di conservazione. Nel nostro caso la maggior parte dei soggetti esaminati erano in cattive condizioni di conservazione (codice 3-4) e quindi con un siero estremamente emolitico. Purtroppo infatti le condizioni non sono sempre ottimali, quando si lavora su animali spiaggiati, e ciò è dovuto al fatto che spesso l'animale muore al largo; a causa della cospicua quantità di grasso presente nel corpo dei Cetacei, la loro densità media non è molto differente da quella dell'acqua di mare, anzi, nella maggior parte delle specie è leggermente superiore, comportando la necessità del nuoto per il galleggiamento e, quindi, l'affondamento degli individui morti. Per questo quando la carcassa viene segnalata sul sito di spiaggiamento sono già passati molti giorni, ossia prima che le fermentazioni batteriche, producendo gas al suo interno, la riportino in superficie e le onde la dirigano sulle coste. Solo nel Capodoglio (*Physeter catodon*) e nella balena nera (*Balaena glacialis*) il peso specifico è un po' inferiore a quello dell'acqua di mare, per cui le carcasse di questi Cetacei galleggiano (Cagnolaro, 1983).

Di tutti i 18 soggetti testati, due sono risultati positivi (11%); se invece calcoliamo la percentuale di positivi (2) solo sul totale dei Tursiopi oggetto del campionamento (13), questa sale al 15%. In accordo con quanto hanno affermato Cabezòn *et al.* (2002) in un'indagine sierologica, *T. gondii* si ritrova più frequentemente nelle specie costiere rispetto a quelle pelagiche. Ciò vuol dire che alcuni Cetacei sono più a rischio di altri e che l'infezione è meno sporadica di quanto si pensi. Nell'Adriatico, soprattutto quando ci si riferisce all'alto Adriatico, la specie che predomina è appunto il Tursiopo, che notoriamente popola le zone costiere, arrivando anche fino a

poche centinaia di metri dalla costa. Ciò suggerisce delle ipotesi sulla modalità con la quale questi animali si infettano: molto probabilmente il fatto di avere come habitat zone in prossimità di estuari di fiumi espone i Tursiopi a fattori contaminanti che provengono dalle acque dei reflui e dagli scarichi fognari e vengono trasportati fino al mare (Feyer *et al.*, 2004). L'abitudine dei cittadini di rovesciare la lettiera del gatto domestico nel bagno di casa può essere un pericoloso fattore di contaminazione, poiché se il gatto è in fase di eliminazione delle oocisti, queste finiscono nel mare. A questo proposito è stato dimostrato sperimentalmente come le oocisti siano in grado di sporulare e rimanere vitali fino a 24 mesi in acqua marina artificiale (Lindsay *et al.*, 2003; Lindsay e Dubey, 2009). Un altro dubbio che si pone a questo punto è fino a che livelli di concentrazione possono arrivare le oocisti presso gli estuari e qual è la quantità di oocisti da ingerire da parte del delfino per contrarre l'infezione. E' noto che i delfini bevono pochissima acqua e che la fonte di liquidi a loro necessaria viene ricavata dalla dieta, che si compone principalmente di pesce azzurro, Cefalopodi (calamari e polpi) e crostacei (Blanco *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2001). E' quindi improbabile che l'infezione avvenga tramite l'assunzione di acqua, ma il maggiore sospetto rimane sulle prede. I pesci, cefalopodi e crostacei però sono animali a sangue freddo e quindi non possono essere ospiti intermedi di *T. gondii*. E' stata tentata l'infezione sperimentale in pesci rossi (*Carassius auratus*) che però ha dato esito negativo (Omata *et al.*, 2005). In ambiente marino i molluschi bivalvi sono in grado di assumere e concentrare al loro interno le oocisti e mantenerle vitali; in questo modo essi possono essere in grado di infettare gli animali che se ne cibano (Lindsay *et al.*, 2001a; Arkush *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2008b), ma normalmente non fanno parte della dieta del Tursiope. L'interrogativo rimane dunque aperto, anche se per ora l'ipotesi più accreditata è quella dell'ingestione di acqua marina contaminata.

Tranne i due Tursiopi positivi, tutti gli altri cetacei esaminati, appartenenti ad altre specie e provenienti da altri mari italiani, hanno dato esito negativo per *T. gondii* alla PCR. Finora gli unici Cetacei positivi trovati nei mari italiani provenivano dal Mar Tirreno e appartenevano alle specie *S. coeruleoalba*, *T. truncatus* e *G. griseus* (Di Guardo *et al.*, 1995a,b; Pretti *et al.*, 2008). Nel nostro lavoro i campioni di due soggetti provenivano dalle coste tirreniche, ma appartenevano a specie diverse da

quelle sopraccitate, *P. catodon* e *B. physalus*, che peraltro non sono mai stati trovati positivi neanche sierologicamente per *T. gondii*. L'unico Grampo testato in questa indagine ha dato esito negativo; segnalazioni di positività ci sono state in questa specie anche nel Mediterraneo (Di Guardo *et al.*, 1995b; Resendes *et al.*, 2002).

In entrambi i soggetti analizzati è emerso un quadro di encefalite non suppurativa, compatibile con l'infezione da *T. gondii*.

Nel soggetto del caso 1 è stata evidenziata la presenza di cisti nel tessuto della corteccia cerebrale (Inskip *et al.*, 1990; Cruickshank *et al.*, 1990; Di Guardo *et al.*, 1995a,b; Jardine e Dubey, 2002), accompagnata da foci di gliosi perivascolare con minimi infiltrato infiammatorio mononucleato (macrofagi) e necrosi (Migaki *et al.*, 1990; Bowater *et al.*, 2003; Dubey *et al.*, 2009a). All'interno della sezione di corteccia cerebrale sono stati rinvenuti degli elementi sospetti classificabili come tachizoiti, tuttavia sarebbe necessaria un approfondimento immunostochimico per confermare tale ipotesi e verificare che essi appartengano a *T. gondii*. Il fegato presentava un'infiammazione focalmente estesa in sede subcapsulare con infiltrato macrofagico ma non sono stati trovati elementi protozoari. E' stata osservata la presenza di trematodi adulto e relative uova di *Pholeter gastrophilus* in formazioni nodulari nella mucosa gastrica che è stata riconosciuta come la sua sede d'elezione (Delyamure, 1955; Inskip *et al.*, 1990; Aznar *et al.*, 2006). Sulla lingua erano presenti lesioni papillomatose caratterizzate da un quadro di iperplasia dell'epitelio ed erosione dello strato superficiale, la cui causa può essere imputata ad un'infezione da papillomavirus (Kennedy-Stoskopf, 2001) o herpesvirus di tipo  $\alpha$  o  $\gamma$  (Benson *et al.*, 2006) anche se la sua eziologia è tuttora in corso di accertamento: mancano infatti i classici reperti citopatici visibili nei mammiferi terrestri e non si esclude si tratti di un quadro compatibile con la vecchiaia. Tali lesioni possono aver provocato una condizione di inappetenza nell'animale, contribuendo al quadro di debilitazione e debolezza e predisponendolo all'infezione di agenti patogeni. La broncopolmonite che ha causato la morte dell'animale è stata provocata da un'infezione fungina compatibile con *Aspergillus* spp. (Reidarson *et al.*, 1998) o *Candida* spp. (Nollens *et al.*, 2007), i quali sono stati riconosciuti come patogeni specialmente in Cetacei in cattività, che vivendo in acqua clorata sono maggiormente esposti ad organismi resistenti come i lieviti (Buck, 1980; Dunn *et al.*, 1982). In realtà non si tratta di un

patogeno particolarmente aggressivo, ma è stato favorito dal particolare stato di immunodepressione precedentemente instauratosi per cause non note, forse dovuto alla vecchiaia associata alle lesioni papillomatose. Anche i reperti di fibrosclerosi linfonodale e deplezione linfocitaria dei linfonodi meseraici ha sicuramente determinato un abbassamento delle difese immunitarie del soggetto, soprattutto nei confronti di quei patogeni provenienti dal tratto gastro-enterico.

Nel soggetto del caso 2 non sono state evidenziate cisti nel tessuto nervoso né formazioni simili a tachizoiti, tuttavia era presente un quadro di encefalite non purulenta, caratterizzata da un infiltrato infiammatorio di cellule mononucleate con localizzazione perivascolare soprattutto in sede submeningea e focolai di gliosi con macrofagi e necrosi minima entrambi compatibili con un'infezione da *Toxoplasma*. I segni di miosite cronica profonda con necrosi del tessuto muscolare a livello di esofago e stomaco fanno pensare ad una compromissione della motilità intestinale (gastrite cronica); la componente linfoplasmacellulare fa sospettare un agente virale ma può avere contribuito a tale quadro anche *T. gondii*. L'esame del cuore ha evidenziato una miocardite cronica la cui caratterizzazione è fortemente associabile a *T. gondii* (Inskoop *et al.*, 1990; Bowater *et al.*, 2003). Il quadro osservato nel fegato, nonostante abbia dato esito negativo, è molto simile a quello trovato da Resendes *et al.* (2002) in un Grampo (*Grampus griseus*). Il rene non presentava lesioni particolari dalle quali si potesse risalire a *T. gondii*. Allo stesso modo del caso 1, nel caso 2 è stato osservato un quadro di iperplasia epiteliale orale e gengivale, che si estendeva fino alla faringe, e ha portato alla formazione di frequenti erosioni, ulcerazioni e fessurazioni dell'epitelio con predisposizione ad infezioni batteriche secondarie. Le considerazioni eziologiche e le evidenze dell'istopatologia sono le stesse del caso precedentemente descritto. Il quadro di grave debilitazione e dimagrimento è da imputare con buona probabilità alle lesioni orali ed esofagee che hanno indotto dolorabilità a livello del primo tratto del digerente e quindi inappetenza. Numerosi parassiti della specie *Hadwenius tursionis* sono stati reperiti nel primo tratto del piccolo intestino, ritenuta la loro sede naturale (Delyamure, 1955; Fernandez *et al.*, 1994). Il decesso del soggetto è stato causato dal grave stato di cachessia instauratosi a seguito della forte debilitazione favorita da lesioni buccali e dalla miosite gastro-intestinale che ha alterato la motilità dell'apparato digerente (imputabile ad infezione

virale), associato al quadro encefalico legato all'infezione da *T. gondii*. La causa finale di morte però è rappresentata da *Vibrio alginolyticus*, che ha provocato una grave broncopolmonite suppurativa, aggravando il quadro della già presente parassitosi polmonare massiva sostenuta da *Stenurus ovatus* (Baylis e Daubney, 1925; Delyamure, 1955; Kuwamura *et al.*, 2007). *Vibrio alginolyticus* è un batterio che viene frequentemente isolato dai campioni prelevati dallo sfiatatoio (53,5%) ed alberga quindi le prime vie respiratorie; esso può trasformarsi in patogeno a seguito della caduta delle difese immunitarie che permette al batterio di penetrare nelle vie respiratorie profonde (Buck *et al.*, 2006). L'infezione batterica ha complicato la parassitosi in maniera tale da risultare fatale per l'animale. Un altro patogeno la cui proliferazione è stata favorita dall'immunodepressione è *Shewanella putrefaciens*, un batterio che fa parte della normale flora intestinale dei Tursiopi ma che in mancanza di un drenaggio da parte dei linfonodi meseraici, ha possibilmente determinato un quadro di enterite acuta. E' stata diagnosticata infine una condizione di deplezione linfocitaria del tessuto linfoide del soggetto in questione, nel quale è stata osservata inoltre una sclerosi linfonodale meseraica diffusa grave: ciò significa una barriera immunitaria compromessa tra intestino e organismo ed i batteri hanno potuto proliferare in mancanza dell'equilibrio immunitario con l'ospite. Se da una parte si ha sclerosi linfonodale, dall'altra c'è un'attivazione continua del sistema immunitario con necrosi e flogosi neutrofilica che porta ad un'ulteriore stimolazione. Nemmeno in questo caso sono note le cause l'immunodepressione, anche se questo reperto sembra essere associato alla vecchiaia come nella situazione precedente. *T. gondii* non sembra quindi aver causato il decesso dei due esemplari esaminati. L'immunodepressione può aver favorito l'infezione che ha aggravato ulteriormente le condizioni di salute di entrambi tramite il quadro infiammatorio encefalico.

In nessuno dei due casi ci sono dati che riguardano i valori di inquinanti all'interno dell'organismo perciò non è possibile valutare l'eventuale correlazione fra agenti immunodepressanti (per es. PCB o metalli pesanti) e lesioni riscontrate, come per esempio la fibrosi interfollicolare della tiroide nel caso 2 (Beineke *et al.*, 2007).

L'utilizzo della PCR come tecnica diagnostica principale per la ricerca di *T. gondii* costituisce la particolarità della nostra indagine. Le indagini sierologiche rappresentano un utile strumento per valutare la circolazione del parassita in un

determinato ambiente e specie ospite, mentre l'esame istologico permette di verificare la presenza del parassita all'interno dei tessuti e le eventuali lesioni (Bowater *et al.*, 2003; Di Guardo *et al.*, 1995b). Il campione di tessuto viene prelevato preferibilmente in corrispondenza di lesioni macroscopiche e si osserva il quadro che emerge dall'istopatologia; in presenza di cisti o formazioni protozoarie sospettabili come tachizoiti, si effettua l'immunoistochimica per una migliore visualizzazione e confermare la diagnosi (Cruickshank *et al.*, 1990; Inskoop *et al.*, 1990; Migaki *et al.*, 1990; Mikaelian *et al.*, 2000; Jardine e Dubey, 2002; Di Guardo *et al.*, 1995a).

Nell'indagine svolta nel Tirreno, Pretti *et al.* (2008) avevano evidenziato una positività per *T. gondii* nel cervello di tre delfinidi mediante analisi molecolari. Si può quindi sfruttare l'alta sensibilità della PCR che individua anche quantità minime del parassita. Se però il numero delle cisti è limitato, con l'esigua quantità di tessuto (pochi mg) utilizzata nelle analisi molecolari, potrebbe essere difficile individuare la positività per *T. gondii*. Per individuare il DNA presente nel campione sarebbe utile "amplificarlo" in animali di laboratorio e a questo proposito sono state messe a punto due diverse metodiche (Dubey *et al.*, 2007):

1. inoculazione sottocutanea di omogenati di 37-50g di cervello, cuore e muscolo di delfino in topi da laboratorio. Ogni organo viene omogenato singolarmente e inoculato in topi diversi. Il campione viene considerato infetto da *T. gondii* se, dopo sacrificio a 43 giorni post-inoculazione, il topo presenta cisti e tachizoiti nei tessuti. Dagli organi degli animali da laboratorio infetti viene effettuata l'estrazione del DNA.
2. somministrazione per via orale di diversi tessuti di delfino (50-500g a seconda del tipo di tessuto) in gatti stabulati. Dopo 4-15 giorni si ricercano ed isolano le oocisti nelle feci dei gatti positivi e successivamente si somministrano ai topi con l'alimento. Si procede con la sacrificio dei topi ed estrazione del DNA come al punto 1.

Grazie all'utilizzo dei topi da laboratorio, oltre che ad ottenere l'amplificazione naturale del DNA, si riuscirebbe anche avere indicazioni sul genotipo di *T. gondii* in base alla sintomatologia che essi presentano dopo l'inoculazione: l'infezione col genotipo I porta a diffusione e disseminazione del parassita, con una rapida morte del



topo (bastano meno di 10 tachizoiti); al contrario, il topo sopravvive all'infezione col genotipo II poiché la disseminazione dei tachizoiti è limitata e si formano le cisti; il tipo III è più aggressivo del tipo II ma non causa morte nel topo (Dardè, 2004).

Per la genotipizzazione viene poi utilizzata la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), tecnica che però presenta dei problemi nella produzione e purificazione del DNA di *Toxoplasma*.

Inoltre, lavorando con animali spiaggiati, non è sempre possibile recuperare il cervello; a questo punto dovrebbe essere utilizzato il cuore come altro organo per la ricerca di *T. gondii* (Dubey *et al.*, 2008), ma l'analisi molecolare risulta più difficoltosa a causa della natura fibrosa dell'organo che non rende facile l'estrazione del DNA.

## 8. CONSIDERAZIONI

Pur essendo state raccolte molte informazioni sulla toxoplasmosi nei Cetacei, il campo della ricerca rimane ancora molto vasto e non molto conosciuto, soprattutto nel Mediterraneo. Il principale limite delle ricerche per gli animali in libertà è dato dall'ambiente naturale in cui essi vivono che rende difficile la cattura, il contenimento in sicurezza dell'animale, la misurazione dei diversi parametri ed il prelievo di campioni ematici (per esempio per un'indagine sierologica). Inoltre nel Mediterraneo è proibita la manipolazione di animali in libertà per qualsiasi scopo. Il principale limite invece per gli animali spiaggiati è il cattivo stato di conservazione che rende difficile la diagnosi anatomo-patologica ed il prelievo di campioni significativi. Per quanto riguarda le analisi per *T. gondii* l'ideale sarebbe recuperare cervelli freschi ed in buone condizioni. Oltretutto sarebbe interessante svolgere delle indagini per conoscere l'eventuale localizzazione d'elezione del parassita all'interno del SNC (corteccia cerebrale, cervelletto, midollo allungato) dei cetacei, in modo da poter prelevare in maniera mirata i campioni da analizzare e avere una maggiore probabilità di individuare il parassita con quantità limitate di tessuto e poche cisti, come già proposto da Wyss *et al.*, (2000) in animali da reddito al macello. Anche se

è solo un piccolo inizio, non è escluso che si potranno effettuare analisi in un maggior numero di animali e in più punti. Per quanto riguarda l'intensità di distribuzione delle cisti nei Cetacei potrebbe risultare d'aiuto iniziare a provare a prelevare campioni in corrispondenza delle aree più vascolarizzate del cervello poiché è proprio per via ematogena che il parassita si diffonde nell'organismo.

L'analisi immunoistochimica è un prezioso ausilio che permette di evidenziare e riconoscere in modo immediato la presenza di cisti e tachizoiti e potrebbe essere eseguita sulle sezioni istologiche dei due Tursiopi positivi per avere un'ulteriore conferma diagnostica.

Un altro tema da approfondire senza dubbio è la genotipizzazione di *T. gondii*. Non sono stati sinora svolti degli studi nel Mediterraneo per individuare quale ceppo di *T. gondii* infetti i Cetacei che lo popolano. L'uso della RFLP è uno strumento volto al proseguimento di questa indagine preliminare. Sia negli Oceani sia in cattività è stata riscontrata la presenza del genotipo II (Dubey *et al.*, 2007; Dubey *et al.*, 2008a; Dubey *et al.*, 2009a), ma non si esclude di poter trovarne altri, in particolare il genotipo X che per ora è localizzato nelle zone costiere della Florida (USA). Per questo, considerato che il Mar Mediterraneo è un mare chiuso caratterizzato dallo scarso ricambio di acque, non è sbagliato mettere in dubbio che sia sempre il genotipo II a colpire i mammiferi marini mediterranei. Ancora non si può sapere se la toxoplasmosi sia una malattia emergente per i mammiferi marini del Mediterraneo, ma essa è potenzialmente rischiosa nei soggetti immunodepressi e nelle femmine gravide, anche se in quest'ultimo caso non si sa quale sia la percentuale di aborto e se una sua diffusione potrebbe rappresentare un rischio per il futuro delle specie.

Dato lo stato di immunodepressione dei due Tursiopi positivi a *T. gondii* si potrebbe cercare la causa principale di tale condizione misurando i livelli di PCB e metalli pesanti nell'organismo dei Cetacei dell'Adriatico per valutare presenza e grado di contaminazione.

In ogni caso è nostro dovere monitorare lo stato di salute delle acque e tutelarle per preservare la salute e la continuità delle specie dei nostri mari che poco a poco si stanno ritirando dai loro habitat naturali e tendono a diminuire pericolosamente.



## BIBLIOGRAFIA

- 1) Abaunza P., Arroyo N.L., Preciado I. (2001). A contribution to the knowledge on the morphometry and the anatomical characters of *Pennella balaenopterae* (Copepoda, Siphonostomatoidea, Pennellidae), with special reference to the buccal complex. *Crustaceana*, **74** (2): 193-210.
- 2) Ajzenberg D., Banuls A.L., Tibayrenc M., Dardè M.L. (2002). Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* population shows a high polymorphism structured into two main clonal groups. *Int J Parasit*, **32**: 7-38.
- 3) Al-Qurashi A.R., Ghandour A.M., Obeid O.E., Al-Mulhim A.A., Makki S.M. (2001). Seroepidemiological study of *Toxoplasma gondii* infection in the human population in the Eastern Region. *Saudi Medical Journal*, **22**(1): 13-18.
- 4) Alvarado-Esquivel C, Torres-Castorena A, Liesenfeld O, García-López CR, Estrada-Martínez S, Sifuentes-Alvarez A, Marsal-Hernández JF, Esquivel-Cruz R, Sandoval-Herrera F, Castañeda JA, Dubey JP. (2009). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in rural Durango, Mexico. *J Parasitol.*, **95**(2): 271-4.
- 5) Amano M., Miyazaki N. (2004). Composition of a school of Risso's dolphin, *Grampus griseus*. *Marine Mammal Science* **20**(1): 152-160.
- 6) Amir O.A., Berggren P., Ndaró S.G.M., Jiddawi N.S. (2005). Feeding ecology of the Indo-Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*) incidentally caught in the gillnet fisheries off Zanzibar, Tanzania. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **63**(3):429-437.
- 7) Arantes T.P., Lopes W.D., Ferreira R.M., Pieroni J.S., Pinto V.M., Sakamoto C.A., Costa A.J. (2009). *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. *Exp. Parasitol.*, **123**(2): 190-194.

- 8) Arcangeli A., Marini L., Nannarelli S. (1997). "Progetto Tursiope": dati preliminari sulla presenza di *Tursiops truncatus* in Sardegna. Relazione presentata alla Conferenza del Centro Studi Cetacei, Napoli. Pubblicata su: *Società Italiana Scienze naturali Museo civico Storia Naturale Milano*, **90**(2): 11-19.
- 9) Arkush K.D., Miller M.A., Leutenegger C.M., Gardner I.A., Packham A.E., Heckerroth A.R., Tenter A.M., Barr B.C., Conrad P.A. (2003). Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int J Parasitol.* **33**(10): 1087-97.
- 10) Aznar F.J., Fognani P., Balbuena J.A., Petrobelli M., Raga J.A. (2006). Distribution of *Pholeter gastrophilus* (Digenea) within the stomach of four odonotocete species: the role of the diet and digestive physiology of host. *Parasitology*, **133**(3): 369-380.
- 11) Barbieri G. (1994). Studio epidemiologico in una popolazione felina: contributo sperimentale. Tesi di laurea. Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma.
- 12) Barco S.G., Swingle W.M., McLellan W.A., Harris R.N., Pabst D.A. (1999). Local abundance and distribution of Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) in the nearshore waters of Virginia Beach, Virginia. *Marine Mammal Science* **15**(2): 394-408.
- 13) Baumgartner M.F. (1997). The distribution of Risso's dolphin (*Grampus griseus*) with the respect of physiography of the Northern Gulf of Mexico. *Marine Mammal Science*, **13**(4): 614-638.
- 14) Baylis H.A., Daubney R. (1925). A revision of the lungworms of Cetacea. *Parasitology*, **17**: 201-216.

- 15) Bedocchi D. (2007). Distribution of cetacean species in the Tuscan Archipelago as revealed by Gis and photographic records with special regard to the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*, Montagu 1821) . 35th Annual Symposium of European Association for Aquatic Mammals.
- 16) Beineke A., Siebert U., Stott J., Müller G., Baumgärtner W. (2007). Phenotypical characterization of changes in thymus and spleen associated with lymphoid depletion in free-ranging harbor porpoises (*Phocoena phocoena*). *Vet Immunol Immunopathol.*, **117**(3-4):254-65.
- 17) Benson K.A.S., Manire C.A., Ewing R.Y., Saliki J.T., Townsend F.I., Ehlers B., Romero C.H. (2006). Identification of novel alpha- and gammaherpesviruses from cutaneous and mucosal lesions of dolphins and whales. *Journal of virological methods*, **136**: 261-266.
- 18) Bhopale G.M. (2003). Pathogenesis of toxoplasmosis. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, **26**: 213-222.
- 19) Blanco C., Salomón O., Raga J.A. (2001). Diet of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in the western Mediterranean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, **81**: 1053-1058.
- 20) Blanco C., Raduán M<sup>a</sup>.A., Raga J.A. (2006). Diet of Risso's dolphin (*Grampus griseus*) in the western Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, **70**(3).
- 21) Bossart G.D., Reindersen T.H., Dierauf L.A. and Duffield D.A. (2001). Clinical pathology. In: *The CRC handbook of marine mammal medicine*. 2<sup>nd</sup> Edition. L.A. Dierauf and F.M. Gulland (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 383-43.

- 22) Bowater R.O., Norton J., Johnson S., Hill B., O'Donoghue P., Prior H. (2003). Toxoplasmosis in Indo-Pacific humpbacked dolphins (*Sousa chinensis*), from Queensland. *Aust. Vet. J.*, **81**: 627-632.
- 23) Bray R. A., Gibson D. I., Jones A. (2008). Keys to the Trematoda, Vol. 1, 2, 3. Edited by Bray R. A., Gibson D. I., Jones A., *Natural History Museum*, London, UK.
- 24) Buck J.D. (1980). Occurrence of human-associated yeasts in the feces and pool waters of captive bottlenosed dolphins (*Tursiops truncatus*). *J Wildl Dis.*, **16**(1): 141-149.
- 25) Buck J.D., Wells R.S., Rhinehart H.L., Hansen L.J. (2006). Aerobic microorganisms associated with free-ranging bottlenose dolphins in coastal Gulf of Mexico and Atlantic Ocean waters. *J. Wildl. Dis.*, **42**(3): 536-544.
- 26) Buergelt C.D., Bonde R.K. (1983). Toxoplasmic meningoencephalitis in a West Indian Manatee. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **183**: 1294-1296.
- 27) Buxton D. (1990). Ovine toxoplasmosis: a review. *J. R. Soc Med*, **83**: 509-511.
- 28) Cabezòn O., Resendes A.R., Domingo M., Raga J.A., Agustí C., Alegre F., Mons J.L., Dubey J.P., Almería S. (2004). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild dolphins from the Spanish Mediterranean coast. *J Parasitol.*, **90**(3): 643-4.
- 29) Cagnolaro L., Di Natale A., Notarbartolo di Sciara G. (1983). Guide per il riconoscimento delle specie animale delle acque lagunari e costiere italiane. Consiglio Nazionale delle ricerche.

- 30) Calzada N., Aguilar A. (1995). Geographical variation of body size in Western Mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Zeitschrift für Säugetierkunde*, **60**(5): 257-264.
- 31) Cancrini G. (1996). *Parassitologia medica illustrata*. Editore Lombardo, 111-122.
- 32) Cañadas A., Sagarminada R., García-Tiscar S. (2002). Cetacean distribution related with depth and slope in the Mediterranean waters off southern Spain. *Deep Sea Research I* **49**(11): 2053-2073.
- 33) Cañadas A., Hammond P.S. (2006). Model-based abundance estimates for Bottlenose dolphins off southern Spain: implications for conservation and management. *Journal of Cetacean Research and Management*.
- 34) Cavalier-Smith, Thomas. (1993). Kingdom Protozoa and its 18 Phyla.
- 35) Cockcroft V.G., Ross G.J.B. (1990). Age, growth, and reproduction of bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* from the east coast of southern Africa. *Fishery Bulletin*, **88**(2): 289-302.
- 36) Cockcroft V.G., Haschick S.L., Klages N.T.W. (1993). The diet of Risso's dolphin, *Grampus griseus* (Cuvier, 1812), from the east coast of South Africa. *Z. Säugetierkunde*, **58**: 286-293.
- 37) Cole R.A., Lindsay D.S., Howe D.K., Roderick C.L., Dubey J.P., Thomas N.J., Baeten L.A. (2000). Biological and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *J. Parasitol*, **86**: 526-530.



- 38) Conrad P.A., Miller M.A., Kreuder C., James E.R., Mazet J., Dabritz H., Jessup D.A., Gulland F., Grigg M.E. (2005). Transmission of *Toxoplasma*: Clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *International Journal for Parasitology*, **35**: 1155-1168.
- 39) Cornejo R. (2008). Curso de Investigación II – Maestría en salud animal. La Sarcocystiosis. Sirivs. [www.unmsm.edu.pe](http://www.unmsm.edu.pe)
- 40) Corruthers V.B., Suzuki Y. (2007). Effects of *Toxoplasma gondii* Infection on the brain. *Schizophrenia Bulletin*, **33**(3): 745-751.
- 41) Cruickshank J.J., Haines D.M., Palmer N.C., St. Aubin D.J. (1990). Cysts of a *Toxoplasma*-like organism in an Atlantic bottlenose dolphin. *Can. Vet. J.*, **31**: 213-215.
- 42) d'Arc Moretti L., Da Silva A.V., Ribeiro M.G., Paes A.C., Langoni H. (2006). *Toxoplasma gondii* genotyping in a dog co-infected with distemper virus and ehrlichiosis rickettsia. *Rev. Inst Med. Trop. S. Paulo*, **48**(6): 359-363.
- 43) Dardè M.L. (2004). Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **40**(1): 57-63.
- 44) Delyamure S.L. (1955). Helminthofauna of Marine Mammals (ecology and Phylogeny), edited by Skrjabin K.I., Academy of Sciences of the USSR Laboratory of Helminthology, English translation, Jerusalem: Israel Program for Scientific Translatior.
- 45) Diaz-Suárez O., Estevez J. (2009). Seroepidemiology of toxoplasmosis in women of childbearing age from a marginal community of Maracaibo, Venezuela. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **51**(1):13-7.

- 46) Di Guardo G., Corradi A., Agrimi U., Zizzo M., Morelli L., Perillo A., Kramer L., Cabassi E., Kennedy S. (1995a). Neuropathological lesions in cetaceans found stranded from 1991 to 1993 on the coasts of Italy. *European Journal of Veterinary Pathology*, **2**(1): 47-51.
- 47) Di Guardo G., Agrimi U., Morelli L., Cardeti G., Terracciano G., Kennedy S. (1995b). Post mortem investigations on cetaceans found stranded on the coasts of Italy between 1990 and 1993. *Veterinary Record*, **136**: 539-442.
- 48) Dubey J.P., Miller N.L., Frenkel J.K. (1970). The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J. Exp. Med.* **132**: 636-662.
- 49) Dubey J.P., Sundberg J.P., Matiuck S.W. (1981). Toxoplasmosis associated with abortion in goats and sheep in Connecticut. *Am J Vet Res.*, **42**(9): 1624-6.
- 50) Dubey J.P. (1986). Toxoplasmosis in cats. *Feline Pract.*, **16**: 12-45.
- 51) Dubey J.P. (1988). Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press, Boca Raton, FL: 1-41.
- 52) Dubey J.P., Schlafer D.H., Urban J.F. Jr, Lindsay D.S. (1990). Lesions in fetal pigs with transplacentally-induced toxoplasmosis. *Vet. Pathol.*, **27**(6): 411-418.
- 53) Dubey J.P., Urban J.F. Jr, Davis S.W. (1991). Protective immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Vet. Res.*, **52**(8): 1316-1319.

- 54) Dubey J.P., Carpenter J.L. (1993). Histologically confirmed clinical toxoplasmosis in cats: 100 cases (1952-1990). *J Am Vet Med Assoc.*, **203**(11): 1556-66.
- 55) Dubey J.P. (1996a). Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *Int Journal of Parasitology*, **82**: 957-961.
- 56) Dubey J.P. (1996b). Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animal and humans. *Journal of Veterinary Parasitology*, **64**: 65-70.
- 57) Dubey J.P. (1997). Parasitic protozoa. In: Kreir J.P., editor(3) New York Academy Press 101-237.
- 58) Dubey J.P., Lindsay D.S., Speer C.A. (1998a). Structures of *Toxoplasma gondii* Tachizoites, Bradyzoites and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, **11**: 267-299.
- 59) Dubey J.P. (1998b). Advances in the life cycle of Toxoplasmosis. *Int J.Parasitol.* **28**(7): 1019-1024.
- 60) Dubey J.P. (1998c). *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *Journal of Parasitology*, **84**: 862-865.
- 61) Dubey J.P., Zarnke R., Thomas N.J., Wong S.K., Van Bonn W., Briggs M., Davis J.W., Ewing R., Mense M., Kwok O.C., Romand S., Thulliez P. (2003). *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Vet Parasitol.*, **116**(4): 275-96.
- 62) Dubey J.P. (2004). Toxoplasmosis: a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*, **126**: 57-72.

- 63) Dubey J.P., Fair P.A., Bossart G.D., Hill D., Fayer R., Sreekumar C., Kwok O.C.H., Thulliez P. (2005). A comparison of several serologic tests to detect antibodies to *Toxoplasma gondii* in naturally exposed bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. Parasitol.*, **91**(5): 1074-1081.
- 64) Dubey J.P., Morales J.A., Sundar N., Velmurugan G.V., González-Barrientos C.R., Hernández-Mora G., Su C. (2007). Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from Costa Rica. *The Journal of Parasitology*, **93**(3): 710-711.
- 65) Dubey J.P., Fair P.A., Sundar N., Velmurugan G., Kwok O.C., McFee W.E., Majumdar D., Su C. (2008a). Isolation of *Toxoplasma gondii* from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J Parasitol.*, **94**(4): 821-3.
- 66) Dubey J.P. (2008b). The History of *Toxoplasma gondii* – The First 100 Years. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **55**(6): 467-475.
- 67) Dubey J.P., Mergi J., Gehring E., Sundar N., Velmurugan G.V., Kwok O.C.H., Grigg M.E., Su C., Martineau D. (2009a). Toxoplasmosis in captive dolphins (*Tursiops truncatus*) and walrus (*Odobenus rosmarus*). *J. Parasitol.*, **95**(1): 82-85.
- 68) Dubey J.P. (2009b). Toxoplasmosis in sheep – the last 20 years. *Vet. Parasitol.*, **163**(1-2): 1-14.
- 69) Duffy K.T., Wharton P.J., Johnson J.D., New L., Holliman R.E. (1989). Assessment of immunoglobulin-M immunosorbent agglutination assay (ISAGA) for detecting toxoplasma specific IgM. *J Clin Pathol.*, **42**: 1291-1295.
- 70) Duignan P.J. (2003). Disease investigations in stranded marine mammals, 1999-2002. *DOC Science Internal Series*, **104**.

- 71) Dunn J.L., Buck J.D., Spotte S. (1982). Candidiasis in captive cetaceans. *J Am Vet Med Assoc.*, **181**(11): 1316-21.
- 72) Dunn D., Wallon M., Peyron F., Petersen E., Peckham C., Gilbert R. (1999). Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet*, **353**: 1829-183.
- 73) Esteban-Redondo I., Maley S.W., Thomson K., Nicoll S., Wright S., Buxton D., Innes E.A. (1999). Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. *Vet Parasitol.*, **86**(3): 155-71.
- 74) Felix F. (1994). Ecology of the coastal Bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* in the Gulf of Guayaquil, Ecuador. *Investigations on Cetacean* Ed. G. Pilleri, **25**: 235-256.
- 75) Ferguson D.J.P., Hutchison W.M., Dunachie J.F., Siim J.C. (1974). Ultrastructural study of early stages of asexual multiplication and microgametogony of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*, **82**: 167-181.
- 76) Ferguson D.J.P., Hutchison W.M., Siim J.C. (1975). The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*, **83**: 491-505.
- 77) Ferguson D.J.P. (2009). *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*, **104**(2).
- 78) Fernandes G.C., Azevedo R.S., Amaku M., Yu A.L., Massad E. (2009). Seroepidemiology of *Toxoplasma* infection in a metropolitan region of Brazil. *Epidemiol Infect.*, **27**:1-7.

- 79) Fernandez M., Balbuena J.A., Raga J.A. (1994). *Hadwenius tursionis* (Marchi, 1873) n. Comb. (Digenea, Campulidae) from the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) in the Western Mediterranean. *Syst. Parasitol.*, **28**(3): 223-228.
- 80) Feyer R., Dubey J.P., Lindsay D.S. (2004). Zoonotic protozoa: from land to sea. *TRENDS in Parasitology*, **20**(11): 531-536.
- 81) Forcada J., Gazo M., Aguilar A., Gonzalvo J., Fernandez-Contreras M. (2004). Bottlenose dolphin abundance in the NW Mediterranean: addressing heterogeneity in distribution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **275**: 275-87.
- 82) Forman D., West N., Francis J., Guy E. (2009). The sero-prevalence of *Toxoplasma gondii* in British marine mammals. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, **104**(2): 296-8.
- 83) Foulon W., Villena I., Stray-Pedersen B., Decoster A., Lappalainen M., Pinon J.M., Jenum P.A., Hedman K., Naessens A. (1999). Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol*, **180**: 410-415.
- 84) Frantzis A., Swift R., Gillespie D., Menhennett C., Gordon J., Gialinakis S. (1999). Sperm whale presence off south-west Crete, Greece, Eastern Mediterranean. *European Research on Cetaceans*, **13**.
- 85) Frenkel J.K., (2000). Biology of *Toxoplasma gondii*. In: Ambroise-Thomas P., Peterese E., editors. Congenital toxoplasmosis: scientific background clinical, management and control. Paris: Springer-Verlag, 9-25.

- 86) Freyre A., Choromanki L., Fishback J.L., Popiel I. (1993). Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites and tachyzoites of the T-263 strain of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, **79**: 716-719.
- 87) Gaspari S. (2004). Social and population structure of striped and Risso's dolphins in the Mediterranean Sea. Ph.D. dissertation. University of Durham, UK.
- 88) Gazda S.K., Connor R.C., Edgard R.K., Cox F. (2005). A division of labor with role specialization in group-hunting bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) off Cedar Key, Florida. *The Royal Society B.*, **272**: 135-140.
- 89) Giaccone V., Colavita G., Miotti Scapin R. (2000). *Toxoplasma gondii* e alimenti: come e perché di una malattia alimentare misconosciuta. *L'igiene moderna*, **113**(6): 439-452.
- 90) Gibson Q.A., Mann J. (2008). The size, composition and function of wild bottlenose dolphin (*Tursiops* sp.) mother-calf groups in Shark Bay, Australia. *Animal Behaviour*, **76**(2): 389-405.
- 91) Goldstein J.D., Reese E., Reif J.S., Varela R.A., McCulloch S.D., Defran R.H., Fair P.A., Bossart G.D. (2006). Hematologic, biochemical, and cytologic findings from apparently healthy atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) inhabiting the Indian River Lagoon, Florida, USA. *Journal of Wildlife Disease*. **42**(2): 447-454.
- 92) Gomez de Segura A., Crespo E.A., Pedraza S.N., Hammond P.S., Raga J.A. (2006). Abundance of small cetaceans in waters of the central Spanish Mediterranean. *Mar Biol*, **150**: 149-160.
- 93) Grandi G., Peyron F. (2004). La toxoplasmosi congenita. *Caleidoscopio*, **182**: 1-72.

- 94) Grigg M.E., Bonnefoy S., Hehl A.B., Suzuki Y., Boothroyd J.C. (2001). Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science*, **294**(5540): 161-5.
- 95) Hersh S., Duffield D. (1990). Distinction between northwest Atlantic offshore and coastal Bottlenose dolphins based on hemoglobin profile and morphometry. In: *The Bottlenose Dolphin*, San Diego, Academic Press, pp. 129-139.
- 96) Ho M.S.Y., Barr B.C., Marsh A.E., Anderson M.L., Rowe J.D., Tarantal A.F., Hendrickx A.G., Sverlow K., Dubey J. P., Conrad P.A. (1996). Identification of Bovine *Neospora* Parasites by PCR Amplification and Specific Small-Subunit rRNA Sequence Probe Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, **4**(5): 1203-1208.
- 97) Hofman P., Drici M.D., Gibelin P., Michiels J.F., Thyss A. (1993). Prevalence of toxoplasma myocarditis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Br. Heart.*, **70**: 376-381.
- 98) Hogans W.E. (1987). Morphological variation in *Pennella Balaenopterae* and *P. Filosa* (Copepoda: Pennellidae) with a review of the genus *Pennella*. Oken, 1916 parasitic on Cetacea. *Bull. Mar. Sci.*, **40**(3): 442-453.
- 99) Hohlfeld P., Daffos F., Thulliez P., Aufrant C., Couvreur J., MacAleese J., Descombey D., Forestier F. (1989). Fetal toxoplasmosis: outcome of pregnancy and infant follow-up after in utero treatment. *J Pediatr*, **115**: 765-769.
- 100) Howe D.K., Sibley L.D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.*, **172**: 1561-1566.



- 101) Ho-Yen D.O. (1992). Immunocompromised patients. In: Human toxoplasmosis. Ho-Yen DO, Joss A.W.L. editors, Oxford University Press, pp. 184-203.
- 102) Ibrahim H.M., Huang P., Salem T.A., Talaat R.M., Nasr M.I., Xuan X., Nishikawa Y. (2009). Short report: prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in northern Egypt. *Am J Trop Med Hyg.*, **80**(2): 263-7.
- 103) Innes E.A. (1997). Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **20**(2): 131-138.
- 104) Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (1990). PCR protocols: a guide to methods and applications. New York, Academic Press.
- 105) Inskeep W., Gardiner C.H., Harris R.K., Dubey J.P., Goldston R.T. (1990). Toxoplasmosis in Atlantic Bottle-Nosed Dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Wildlife Disease*, **26**(3): 377-382.
- 106) Jardine J.E., Dubey J.P. (2002). Congenital toxoplasmosis in an Indo-Pacific Bottlenose Dolphin (*Tursiops aduncus*). *J. Parasitol.*, **88**(1): 197-199.
- 107) Jenum P.A., Stray-Pedersen B., Melby K.K., Kapperud G., Whitelaw A., Eskild A., Eng J. (1998a). Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in 35,940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. *J Clin Microbiol*, **36**: 2900-2906.
- 108) Jenum P.A., Kapperud G., Stray-Pedersen B., Melby K.K., Eskild A., Eng J. (1998b). Prevalence of *Toxoplasma gondii* specific

immunoglobulin G antibodies among pregnant women in Norway. *Epidemiology and Infection*, **120**:87-92.

- 109) Jones J.L., Lopez A., Wilson M., Schulkin J., Gibbs R. (2001). Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv*, **56**: 296-305.
- 110) Jones J.L., Kruszon-Moran D., Sanders-Lewis K., Wilson M. (2007). *Toxoplasma gondii* infection in the United States 1999-2004, decline from the prior decade. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **77**(3): 405-410.
- 111) Jones J.L., Dubey J.P. (2009). Waterborne toxoplasmosis - Recent developments. *Exp Parasitol.* [Epub ahead of print], doi: 10.1016/j.exppara.2009.03.013
- 112) Kamani J., Mani A.U., Egwu G.O., Kumshe H.A. (2009). Seroprevalence of human infection with *Toxoplasma gondii* and the associated risk factors, in Maiduguri, Borno state, Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol.*, **103**(4): 317-21.
- 113) Kennedy-Stoskopf S. (2001). Infectious Diseases of Marine Mammals. In: The CRC Handbook of Marine Mammal Medicine, edited by L.A. Dierauf and F.D.M. Gulland, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 289-291.
- 114) Kourenti C., Karanis P. (2006). Evaluation and applicability of purification method coupled with nested PCR for the detection of *Toxoplasma* oocysts in water. *Applied Microbiology*, **43**: 475-481.
- 115) Kravetz J.D., Federman G.F. (2002). Cat associated zoonosis. *Archives of internal medicine*, **162**(17): 1945-1952.

- 116) Kreuder C., Miller M. A., Jessup D. A., Lowenstine L. J., Harris M. D., Ames J. A., Carpenter T.E., Conrad P.A., Mazet J. A. K. (2003). Patterns of mortality in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) from 1998–2001. *Journal of Wildlife Diseases*, **39**(3): 495–509.
- 117) Kuwamura M., Sawamoto O., Yamate J., Aoki M., Ohnishi Y., Kotani T. (2007) Pulmonary vascular proliferation and lungworm (*Stenurus ovatus*) in a Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). *J. Vet. Med. Sci.*, **69**(5): 531-533.
- 118) Lambourn D.M., Jeffries S.J., Dubey J.P. (2001). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Harbor Seals (*Phoca vitulina*) in Southern Puget Sound, Washington. *The Journal of Parasitology*, **87**(5).
- 119) Lappin M.R., Gasper P.W., Rose B.J. (1992). Effect of primary phase feline immunodeficiency virus infection on cats with chronic toxoplasmosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **35**: 121-131.
- 120) Lappin M.R., George J.W., Pedersen N.C. (1996). Primary and secondary *Toxoplasma gondii* infections in normal and feline immunodeficiency virus infected cats. *The Journal of parasitology*, **82**: 733-742.
- 121) Leatherwood S., Perrin W.F., Kirby V.L., Hubbs C.L., Dahlheim M. (1980). Distribution and movements of Risso's dolphin, *Grampus Griseus*, in the Eastern North Pacific. *Fishery Bulletin*, **77**(4).
- 122) Lindsay D.S., Dubey J.P. (1997). Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Veterinary Parasitology* **73**: 27-33.
- 123) Lindsay D.S., Blagburn B.L. (1997). Feline toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocyst. *Parasitology*, **19**(4): 448-461.

- 124) Lindsay D.S., Phelps K.K., Smith S.A., Flick G., Sumner S.S., Dubey J.P. (2001a). Removal of *Toxoplasma gondii* oocysts from sea water by eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J Eukaryot Microbiol.*, Suppl: 197S-198S.
- 125) Lindsay D.S., Thomas N.J., Rosypal A.C, Dubey J.P. (2001b). Dual *Sarcocystis neurona* and *Toxoplasma gondii* infection in a northern sea otter from Washington state, USA. *Vet. Paras.*, **97**: 319-327.
- 126) Lindsay D.S., Blagburn B.L., Dubey J.P. (2002). Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. *Veterinary Parasitology* **103**: 309-313.
- 127) Lindsay D.S., Collins M.V., Mitchell S.M., Cole R.A., Flick G.J., Wetch C.N., Lindquist A., Dubey J.P. (2003). Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. *J Eukaryot Microbiol.*, **50**: 687-8.
- 128) Lindsay D.S., Collins M.V., Mitchell S.M., Wetch C.N., Rosypal A.C., Flick G.J., Zajac A.M., Lindquist A., Dubey J.P. (2004). Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J Parasitol.*, **90**(5): 1054-7.
- 129) Lindsay D.S., Dubey J.P. (2009). Long term survival of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts in seawater. *J Parasitol.* [Epub ahead of print]
- 130) Liu Q., Wei F., Gao S., Jiang L., Lian H., Yuan B., Yuan Z., Xia Z., Liu B., Xu X., Zhu X.Q. (2009). *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, **103**(2): 162-6.

- 131) Maggi P., Volpe A., Carito V., Schinaia N., Bino S., Basho M., Dentico P. (2009). Surveillance of toxoplasmosis in pregnant women in Albania. *New Microbiol.*, **32**(1): 89-92.
- 132) Mann J., Sargeant B.L., Minor M. (2007). Calf inspections of fish catches in bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.): opportunities for oblique social learning? *Marine Mammal Science*, **23**(1): 197–202.
- 133) Martín-Hernández I., García-Izquierdo S.M. (2003). Toxoplasmosis en el hombre. *Bioquímica*, **28**(3): 19-21.
- 134) Masala G., Porcu R., Daga C., Denti S., Canu G., Patta C., Tola S. (2007). Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *J Vet Diagn Invest*, **19**: 96–98.
- 135) Masini L., Casarella L., Grillo R.L., Zannella M.P., Oliva G.C. (2008). Studio epidemiologico sulla prevalenza di anticorpi anti-*Toxoplasma gondii* in una popolazione ostetrica. *It J. Gynaecol. Obstet.*, **20**(3): 159-166.
- 136) Measures L.N., Dubey J.P., Labelle P., Martineau D. (2004). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Canadian Pinnipeds. *J. Wild. Dis.*, **40**(2): 294-300.
- 137) Melo E.J.L., Attiaz M., De Sousa W. (2000). The single mitochondrion of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Structural Biology*, **130**: 27-33
- 138) Migaki G., Allen J.F., Casey H.W. (1977). Toxoplasmosis in a California sea lion (*Zalophus californianus*). *Am. J. Vet. Res.*, **38**(1): 135-136.

- 139) Migaki G., Sawa T.R., Dubey J.P. (1990). Fatal disseminated toxoplasmosis in a spinner dolphin (*Stenella longirostris*). *Vet Pathol.*, **27**(6): 463-4.
- 140) Mikaelian I., Boisclair J., Dubey J.P., Kennedy S., Martineau D. (2000). Toxoplasmosis in Beluga Whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary: Two Case Reports and a Serological Survey. *J. Comp. Pathol.*, **122**: 73-76.
- 141) Milinkovitch , Michel C., Lambert O. (2006). Odontoceti. Toothed whales. Version 07 August 2006 (under construction). <http://tolweb.org/Odontoceti/16025/2006.08.07> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- 142) Miller M.A., Sverlow K., Crosbie P.R., Barr B.C., Lowenstine L.J., Gullam F.M., Packham A., Conrad P.A. (2001). Isolation and characterization of two parasitic protozoa from a pacific harbour seal (*Phoca vitulina richardsi*) with meningoencephalomyelitis. *J. Parasitol.*, **87**: 816-822.
- 143) Miller M.A., Gardner I.A., Kreuder C., Paradies D.M., Worcester K.R., Jessup D.A., Dodd E., Harris M.D., Ames J.A., Packham A.E., Conrad P.A. (2002). Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Int J Parasitol.*, **32**(8): 997-1006.
- 144) Miller M.A., Grigg M.E., Kreuder C., James E.R., Melli A.C., Crosbie P.R., Jessup D.A., Boothroyd J.C., Brownstein D., Conrad P.A. (2003). An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *International Journal for Parasitology*, **34**: 275-284.

- 145) Miller M.A., Grigg M.E., Kreuder C., James E.R., Melli A.C., Crosbie P.R., Jessup D.A., Boothroyd J.C., Brownstein D., Conrad P.A. (2004). An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *Int J Parasitol.*, **34**(3): 275-84.
- 146) Miller M., Conrad P., James E.R., Packham A., Toy-Choutka S., Murray M.J., Jessup D., Grigg M. (2008a). Transplacental toxoplasmosis in a wild southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). *Veterinary Parasitology*, **153**: 12-18.
- 147) Miller M.A., Miller W.A., Conrad P.A., James E.R., Melli A.C., Leutenegger C.M., Dabritz H.A., Packham A.E., Paradies D., Harris M., Ames J., Jessup D.A., Worcester K., Grigg M.E. (2008b). Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *Int J Parasitol.*, **38**(11): 1319-28.
- 148) Mizue K., Yoshida K. (1962). Studies on the little toothed whales in the west sea area of Kyusyu. VIII. Bulletin of the Faculty of Fisheries, Nagasaki University **12**: 45-52.
- 149) Montoya J.G., Liesenfeld O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet*, **363**: 1965-1976.
- 150) Mullen G., Durden L. (2002). Medical and Veterinary Entomology. Academy Press, 37-41.
- 151) Murata K., Mizuta K., Imazu K., Terasawa F., Taki M., Endoh T. (2004). The prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild and captive cetaceans from Japan. *J. Parasitol.*, **90**(4): 896-898.

- 152) Muzi P., Bologna M. (1999). Tecniche di immunostochimica. *Caleidoscopio*, **128**: 1-92.
- 153) Myers P., Espinosa R., Parr C.S., Jones T., Hammond G.S., and Dewey T.A. (2008). The Animal Diversity Web (online). Accessed July 27, 2009 at <http://animaldiversity.org>.
- 154) Nardini A., Fiorini I. (1986). Toxoplasmosi. Immunologia e clinica. *Caleidoscopio*, **20**: 1-34.
- 155) Nash G., Kerschmann R.L., Herndier B., Dubey J.P. (1994). The pathological manifestations of pulmonary toxoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Hum Pathol.*, **25**(7):652-8.
- 156) Natale A., Frangipane di Regalbono A., Zanellato G., Cavalletto M., Danesi P., Capelli G., Pietrobelli M. (2007). Parasitological survey on stray cat colonies from Veneto Region. *Veterinary Research Communications*, **31**(1): 241-244.
- 157) Nollens H.H., Wallehan J.F.X., Saliki J.T., Caseltine S.L., Jensen E.D., Van Bonn W., Venn-Watson S. (2007). Characterization of a parainfluenza virus isolated from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Veterinary Microbiology*, **128**(3-4): 231-242.
- 158) Notarbartolo di Sciara G., Bearzi G., Borzani J.F., Cavalloni B., Venturino M.C., Zanardelli M., Airoidi S., Cussino E., Jahoda M. (1990). Distribution and relative abundance of Cetaceans in the Central Mediterranean Sea. *European Research on Cetaceans*, **4**: 41-43.
- 159) Notarbartolo di Sciara G. (1997). Dalle Prime Ricerche alla Dichiarazione del Santuario: nascita di un'idea. Istituto Tethys, Milano



- 160) Notarbartolo di Sciara G., Demma M. (2004). Guida ai mammiferi marini del Mediterraneo. 3<sup>a</sup> edizione.
- 161) Notarbartolo di Sciara G., Agardy T., Hyrenbach D., Scovazzi T., Van Klaveren P. (2007). The Pelagos Sanctuary for Mediterranean marine mammals. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* **18**: 367–391. Published online 27 July 2007 in *Wiley InterScience*.
- 162) Omata Y., Umeshita Y., Murao T., Cano R., Kamiya H., Kudo A., Masukata Y., Kobayashi Y., Maeda R., Saito A., Murata K. (2005). *Toxoplasma gondii* does not persist in goldfish (*Carassius auratus*). *J. Parasitol.*, **91**(6): 1496-1499.
- 163) Omata Y., Umeshita Y., Watarai M., Tachibana M, Sasaki M., Murata K., Yamada T.K. (2006). Investigation for Presence of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Brucella*-Species Infection in Killer Whales (*Orcinus orca*) Mass-Stranded on the coast of Shiretoko, Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **68**(5): 523-526.
- 164) Perrin W.F., Reilly S.B. (1984). Reproductive parameters of dolphins and small whales of the family Delphinidae. Report of the International Whaling Commission (Special Issue) **6**: 97-133.
- 165) Pietrobelli M. (2003). Toxoplasmosi. In *Parassitologia urbana. Città, animali e salute pubblica*. Di Puccini V. e Tarsitano E., Ed. Il Sole 24 ore, Edagricole srl Bo, pp. 49-57.
- 166) Poli G., Cocilovo A., Berkivitz R., Bonizzi L, Caldora C., Carli S., Dall'Ara P., Martino P.A., Pierotti M., Ponti W., Riviera L., Rocchi M., Russo S., Simonič T. (2004). Microbiologia e immunologia veterinaria. UTET

- 167) Porqueddu M., Tilocca V., Scala A. (2003). Le principali endoparassitosi nel gatto in Sardegna. In Atti SISVET volume LVII, 207-208, Ischia 2527 novembre 2003.
- 168) Pretti C., Monni G., Di Bello D., Marsili L., Papini R., Nardoni S., Mancianti F. (2008). First isolation of *Toxoplasma gondii* in marine mammals from Italian Mediterranean coasts. *Parassitologia*, **50**(1-2): 27.
- 169) Pugliares K.R., Bogomolni A., Touhey K.M., Herzig S.M., Harry C.T., Moore M.J. (2007). Small Cetacean Necropsy Technique and Anatomy, in: Marine Mammal Necropsy: An introduction guide for stranding responders and field biologists. Woods Hole Oceanographic Institution, pp. 54-131.
- 170) Reidarson T.H., Harrel J.H., Rinaldi M.G., Mcbain J. (1998). Broncoscopic and serologic diagnosis of *Aspergillus fumigatus* pulmonary infection in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J. Zoo. Wildl. Med.*, **29**(4): 451-455.
- 171) Remington J.S., Thulliez P., Montoya J.G. (2004). Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *American Society for Microbiology*, **42**(3): 941-945.
- 172) Remington J.S., McLeod R., Thulliez P., Desmonts G. (2005). Toxoplasmosis. In J.S. Remington, J.O. Klein, Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant, WB Saunders, Philadelphia, pp. 947-1091.
- 173) Resendes A.R., Almeria S., Dubey J.P., Obòn E., Juan-Sallés C., Degollada E., Alegre F., Cabezòn O., Pont S., Domingo M. (2002). Disseminated toxoplasmosis in a Mediterranean Pregnant Risso's Dolphin (*Grampus griseus*) with Transplacental Fetal Infection. *J. Parasitol.*, **88**(5): 1029-1032.

- 174) Revelli E. (2003). Incontri Mediterranei. Mostra esposta presso il Dipartimento di Biologia dell'Università di Milano. <http://bibliotopia.altervista.org/zoologia/cetaceimed.htm>
- 175) Ridgway S., Houser D., Finneran J., Carder D., Keogh M., Van Bonn W., Smith C., Scadeng M., Dubowitz D., Mattrey R., Hoh C. (2006). Functional imaging of dolphin brain metabolism and blood flow. *Journal of Experimental Biology*, **209**: 2902-2910.
- 176) Sager H., Gloor M., Tenter A., Maley S., Hassig M., Gottstein B. (2003). Immunodiagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in sheep by the use of a P30 IgG avidity ELISA. *Parasitology Research*, **91**(2): 171-174.
- 177) Santos M.B., G.J. Pierce, R.J. Reid, I.A.P. Patterson, H.M. Ross, E. Mente (2001). Stomach contents of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in Scottish waters *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, **81**(5): 873-878.
- 178) Sargeant B.L., Mann J., Berggren P., Krützen M. (2005). Specialization and development of beach hunting, a rare foraging behavior, by wild bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.). *Can. J. Zool.* **83** (11): 1400-1410.
- 179) Scovazzi T. (1993). The Declaration of a Sanctuary for the Protection of Marine Mammals in the Mediterranean. *The International Journal of Marine and Coastal Law*, **8**(4): 510-514(5).
- 180) Silber G.K., Fertl D. (1995). Intentional beaching by bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Colorado River delta, Mexico. *Aquatic Mammals*, **21**(3): 183-186.

- 181) Su C., Zhang X., Dubey J.P. (2006). Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification parasites. *Int. J. Parasitol.*, **36**: 841-848.
- 182) Suligoi B., Boros S., Camoni L., Lepore D., Santoro A., Ferri M., Roazzi P. (2007). Aggiornamento dei casi di AIDS notificati in Italia e delle nuove diagnosi di infezione da HIV al 31 dicembre 2006. Supplemento del notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità, **20**(6), suppl. 1.
- 183) Svobodova V., Knotek Z., Svoboda M. (1998). Prevalence of IgG and IgM antibodies specific to *Toxoplasma gondii* in cats. *Veterinary parasitology*, **80**: 173-176.
- 184) Switaj K., Master A., Skrzypczak M., Zaborowski P. (2005). Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clin Microbiol Infect*, **11**: 170-176.
- 185) Tassi P. (2007). *Toxoplasma gondii* infection in horses. A review. *Parassitologia*, **49**(1-2): 7-15.
- 186) Taylor B.L., Baird R., Barlow J., Dawson S.M., Ford J., Mead J.G., Notarbartolo di Sciara G., Wade P., Pitman R.L. (2008). *Physeter macrocephalus*. In: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 02 August 2009.
- 187) Tenter A.M., Heckeroth A.R., Weiss L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal of Parasitology*, **30**: 1217-1258.
- 188) Tonel S. (2003). Toxoplasmosi: una zoonosi riemergente? Tesi di laurea. Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova.

- 189) Torres L.G., Read A.J. (2009). Where to catch a fish? The influence of foraging tactics on the ecology of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in Florida Bay, Florida. *Marine Mammal Science* (in press)
- 190) Uchôa C.M., Duarte R., Laurentino-Silva V., Alexandre G.M., Ferreira H., Amandoeira M.R. (1999). Padronização de ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e comparação com a técnica de imunofluorescência indireta. - Standardization of enzyme-linked immunosorbent assay ELISA to detect anti-*Toxoplasma gondii* IgM and IgG antibodies, and comparison with the indirect immunofluorescence technique. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **32**(6): 661-669.
- 191) Urian K.W., Duffield D.A., Read A.J., Wells R.S., Shell E.D. (1996). Seasonality of Reproduction in Bottlenose Dolphins, *Tursiops truncatus*. *Journal of Mammalogy*, **77**(2): 394-403.
- 192) Urquhart M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M., Jennings F.W. (1998). *Parassitologia Veterinaria*, UTET, Torino.
- 193) Van Pelt R.W., Dieterich R.A. (1973). Staphylococcal infection and toxoplasmosis in a young harbor seal. *Journal of Wildlife Diseases*, **9**: 258-261.
- 194) Vesco G., Buffolano W., La Chiusa S., Mancuso G., Caracappa S., Chianca A., Villari S., Currò V., Liga F., Petersen E. (2007). *Toxoplasma gondii* infections in sheep in Sicily, southern Italy. *Vet. Parasitol.*, **146**: 3-8.
- 195) Webster J.P. (2007). The effect of *Toxoplasma gondii* in animal behavior: playing cat and mouse. *Schizophrenia Bulletin*, **33**(3): 752-756.

- 196) Weissmann J. (2003). Presumptive *Toxoplasma gondii* abortion in a sheep. *Can Vet J*, **44**: 322-324.
- 197) Wise J.P. Sr., Payne R., Wise S.S., LaCerte C., Wise J., Gianios C. Jr., Thompson W.D., Perkins C., Zheng T., Zhu C., Benedict L., Kerr I. (2009). A global assessment of chromium pollution using sperm whales (*Physeter macrocephalus*) as an indicator species. *Chemosphere* **75**(11): 1461-7.
- 198) Wong S.Y., Remington J.S. (1993). Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS*, **7**: 299-316.
- 199) Würtz M., Marrale D. (1993). Food of striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*, in the Ligurian Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **73**:571-578.
- 200) Wyss R., Sager H., Müller N., Inderbitzin F., König M., Audige L., Gottstein B. (2000). Untersuchungen zum Vorkommen von *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum* unter fleischhygienischen Aspekten. **142**: 96-102.



## RINGRAZIAMENTI

- Ringrazio i miei genitori per aver sempre creduto in me sponsorizzando tutti questi anni di studio, e per avermi permesso di studiare anche un anno a Madrid.
- Ringrazio il professor Pietrobelli per la disponibilità e la simpatia, Federica per l'entusiasmo contagioso che mette nel suo lavoro per il quale non si ferma mai, Cinzia per la sua gentilezza e disponibilità e tutto lo staff dei parassitologi per la loro allegria. Ringrazio Sandro che ha contribuito con il suo lavoro a costruire questa tesi.
- Ringrazio i miei fratelli perché mi hanno sopportato durante i miei nervosi periodi di esami.
- Ringrazio i miei nonni che mi hanno offerto ospitalità e prezioso silenzio nelle mie ore di studio per aiutarmi a raggiungere questo traguardo.
- Ringrazio Massimiliano per donarmi serenità e sicurezza, per avere fiducia in me, per essere sempre presente anche quando è lontano e per volermi così tanto bene.
- Ringrazio Laura che mi sopporta da ben 22 anni, Tony, Silvia, Massimo, Christian, Carla, Enrico e tutti gli amici "autoctoni" con i quali ho passato numerosi momenti di allegria.
- Ringrazio Nicla e Sara per tutte le volte che hanno cucinato per me e per tutto quello che abbiamo condiviso in questi anni.
- Ringrazio Elena, Elisa, Martina, Juri, Roberto, Lalla, Betty, Nicola, Daniele, Terzy, Enri e tutti i miei compagni di corso, perché grazie a loro l'università è stata più leggera e perché mi ricordano di essere sempre la solita "stordita".
- Ringrazio Nala che non c'è più, Cuba e Luna per le quali non ho mai abbastanza tempo per prendermi cura di loro.