



Università degli studi di Pisa
Dipartimento di Scienze Veterinarie

Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria

Tesi di laurea

**Infezione da *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* in specie aviarie viventi allo stato libero
in Toscana**

Candidata:
Ilaria Varvaro

Relatore:
Prof.ssa Francesca Mancianti

Correlatore:
Dott. Guido Rocchigiani

Anno accademico: 2016-2017

*Ai miei sostenitori pelosi:
Arturo, Zuccherò, Leone, Zoe, Polpetta,
Carota, Chimney e Pollo*

SOMMARIO

SOMMARIO	3
CAPITOLO 1: <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	5
1.1 GENERALITÀ ED EZIOLOGIA DELLA TOXOPLASMOSI	5
1.2 MORFOLOGIA DI <i>T.GONDII</i>	7
1.3 TACHIZOITI	8
1.4 BRADIZOITI E CISTI TISSUTALI	11
1.5 CONTAMINAZIONE AMBIENTALE	12
1.6 CICLO BIOLOGICO	12
Ciclo intestinale: fase sessuata, sporogonia e gametogonia	12
Ciclo extraintestinale (fase asessuata e schizogonia)	16
CAPITOLO 2: <i>NEOSPORA CANINUM</i>	17
2.1 INTRODUZIONE:	17
2.2 CARATTERISTICHE GENERALI DI <i>NEOSPORA CANINUM</i>	18
2.3 STADI MORFOLOGICI.....	18
2.4 CICLO BIOLOGICO DI <i>NEOSPORA CANINUM</i>	21
CAPITOLO 3: SCOPO DELLA TESI	23
CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI.....	24
4.1 ANIMALI:	24
4.2 CAMPIONAMENTO:.....	24
4.3 DESCRIZIONE DELLE METODICHE:	26
4.3.1 Estrazione del DNA:.....	26
4.3.2 Polymerase chain reaction (PCR)	27
4.3.2 Elettroforesi su gel d'agarosio:.....	30
4.3.2 Immunofluorescenza indiretta (IFAT):.....	31
CAPITOLO 4: RISULTATI.....	32

CAPITOLO 5: DISCUSSIONE.....	35
BIBLIOGRAFIA	42
RINGRAZIAMENTI.....	53

CAPITOLO 1: *TOXOPLASMA GONDII*

1.1 GENERALITÀ ED EZIOLOGIA DELLA TOXOPLASMOSI

La Toxoplasmosi è una malattia parassitaria, sostenuta dal protozoo *Toxoplasma gondii*, un protozoo intracellulare obbligato a riproduzione sessuata, appartenente al Phylum *Apicomplexa*, in quanto dotato di un complesso apicale che consente di penetrare nelle cellule ospiti tramite l'azione di molecole contenute in strutture particolari quali rhoptri e micronemi.

Il parassita è diffuso tra i mammiferi, uomo compreso e negli uccelli (Cancrini, 1996).

Il termine *Toxoplasma* deriva dal greco *toxòn* che indica la forma ad arco del protozoo e *gondii* dal nome di un roditore nord-africano (*Ctenodactylus gondii*) (fig.1) da cui nel 1908 Nicolle e Maceaux lo isolarono per la prima volta (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 1: Ctenodactylus gondii
(www.zooborns.com)

Nel mondo, oggi, sono diffusi almeno tre genotipi del parassita: il tipo I, II e III (Howe e Sibley, 1995).

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 siano altro che il risultato di una 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 genotipi 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 suscettibili e gravi malformazioni.

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 in individui trapiantati, immunocompromessi e nella donna durante la gravidanza.

È infatti documentato che oltre mezzo miliardo di persone nel mondo presentano nel siero anticorpi anti-*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, all'interno dei quali avviene la fase sessuata del parassita, mentre i mammiferi, in generale, e i volatili, rappresentano gli ospiti intermedi, all'interno dei quali avviene la fase asessuata del parassita.

Inizialmente il protozoo veniva considerato come un parassita del gatto con un ciclo oro-fecale; con l'addomesticamento si è poi evoluto con trasmissioni per carnivorismo e per via transplacentare, oltre all'oro fecale.

Toxoplasma gondii (dal greco, toxosòn = arco) è un protozoo che appartiene al Phylum *Apicomplexa*, Classe *Telosporea*, Sottoclasse *Coccidia*, Ordine *Eucoccidiida*, Sottordine *Eimeriina*, Famiglia *Sarcocystidae*, genere *Toxoplasma*, Specie *gondii*.

Gli *Apicomplexa* costituiscono un Phylum di protozoi che include alcune migliaia di specie, caratterizzate dall'assenza di organi di movimento (ciglia o flagelli). Il ciclo di riproduzione di questi parassiti è costituito dall'alternanza di una fase asessuata (schizogonia) e una fase sessuata (gametogonia) che porta alla formazione di forme infettanti dette sporozoiti.

Sono aploidi durante tutto il ciclo vitale, salvo che nella fase di zigote, che comunque è di brevissima durata.

1.2 MORFOLOGIA DI *T.GONDII*

T.gondii è lungo da 5 a 8 micron e largo 2-5 micron, presenta forma semilunare, arcuata, con estremità affilata; ha citoplasma basofilo e nucleo granuloso, sferico, con cariosoma voluminoso; si presenta in diversi stati morfologici a seconda della sua localizzazione.

Comprende stadi asessuati presenti nei tessuti extraintestinali di ospiti definitivi ed intermedi, e stadi sessuati presenti esclusivamente nell'intestino degli ospiti definitivi.

- Gli stadi extraintestinali di *T.gondii* sono i tachizoiti contenuti nelle pseudocisti ed i bradizoiti all'interno della cisti.
- Gli stadi intestinali di *T.gondii* sono gli schizonti, i gameti e le oocisti

T.gondii si presenta sotto due forme: la forma vegetativa (trofozoitica) e la forma cistica. La forma vegetativa si riscontra nelle cellule endoteliali, monociti e istiociti in cui si riproduce. Si colora male con i coloranti consueti.

Esistono anche forme libere che possono essere facilmente identificate, ma la loro vita al di fuori della cellula ospite è breve. La cisti è di dimensione variabile: il suo diametro oscilla fra 15-20 micron e può raggiungere anche valori fra i 50-100 micron. Contiene un numero di parassiti compreso fra alcune dozzine e alcune migliaia. Gli elementi incistati presentano un voluminoso granulo, di natura probabilmente glicogenica ed ha attività metabolica molto lenta pur potendo moltiplicarsi e consentire alla cisti di aumentare di volume, acquisendo la forma arrotondata. La membrana della cisti non consente la diffusione di materiale antigenico all'esterno e, se non subentrano rotture della membrana, le cisti si accrescono di volume senza suscitare alcuna reazione infiammatoria periferica.

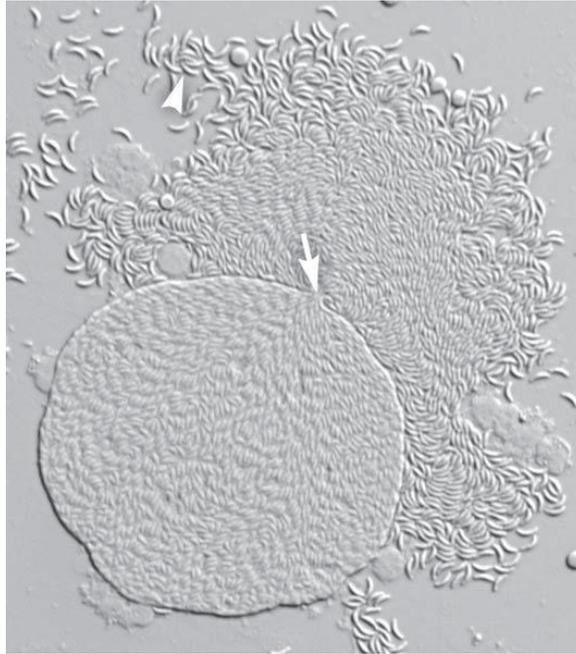


Figura 2: Una cisti tissutale si rompe meccanicamente per rilasciare centinaia di bradizoiti attraverso un buco nella parete della cisti. (Toxoplasmosis of animal and humans, Dubey JP)

1.3I TACHIZOITI

Ci sono tre stadi dell'infezione da *Toxoplasma gondii*: la fase dei tachizoiti, dei bradizoiti e dell'ocisti (sporozoiti) . Queste fasi, sono collegate tra loro in un ciclo piuttosto complesso. La fase dei Tachizoiti, (*tachos* = veloce, in greco) è la fase di moltiplicazione rapida, I tachizoiti (figura 3) sono delle cellule a forma di semiluna con una delle due estremità appuntita e l'altra rotondeggiante di circa 4-8 μm di lunghezza e 2-4 μm di larghezza.

All'estremità anteriore presentano il cosiddetto complesso apicale, una struttura altamente differenziata che permette loro la penetrazione attiva in tutte le cellule nucleate dell'ospite, come nei macrofagi, nelle cellule gliali, nelle cellule muscolari ecc; i tachizoiti sono costituiti da vari organi interni e da corpi inclusi, come una pellicola (copertura esterna), un citoscheletro microtubulare (complesso della membrana interna, microtubuli sub-pellicolari, anelli apicali, anelli polari e un conoide), organi secretori (micronemi, rhoptries, e granuli densi), micropori, mitocondri, reticolo endoplasmatico,

complesso di Golgi, ribosomi, un reticolo endoplasmatico liscio (ER), un nucleo, granuli di amilopectina, ed un complesso apicale (*Apicomplexa*). La pellicola è composta da tre membrane, un plasmalemma e due membrane strettamente unite che vanno a formare il cosiddetto “complesso di membrana interna” (IMC).

I tachizoiti presentano anche due anelli apicali e due polari (esterni e interni), gli anelli apicali sono situati sul margine inferiore mentre gli anelli polari sono situati sul margine superiore. Il conoide (0,3-0,4 μm) è un cono cavo troncato, e si compone di strutture tubulari avvolte come molle compresse, ventidue microtubuli sub pellicolari originano dall’anello polare interno e corrono longitudinalmente lungo quasi tutta la lunghezza della cellula, e si fermano appena sotto il complesso della membrana interna, sono distanziati in modo uniforme, e le loro estremità distali non sono ricoperte. Inoltre, ci sono due microtubuli intraconoidali di 400 μm strettamente legati, i microtubuli sub pellicolari sono come una gabbia toracica e sono disposti in una spirale anti-oraria.

Tra il margine inferiore e il nucleo sono presenti fino a 10 organi, chiamati rhoptries.

Il nucleo dei tachizoiti è situato nella parte centrale, è costituito da una membrana nucleare con pori, dei grumi di cromatina e un nucleolo centrale. Sebbene i tachizoiti possano muoversi scivolando, flettendosi, ondeggiando e ruotando, non hanno dei mezzi visibili di locomozione come ciglia, flagelli o pseudopodi, ma bensì la loro motilità è alimentata dal complesso actina-miosina ancorato al complesso della membrana interna.

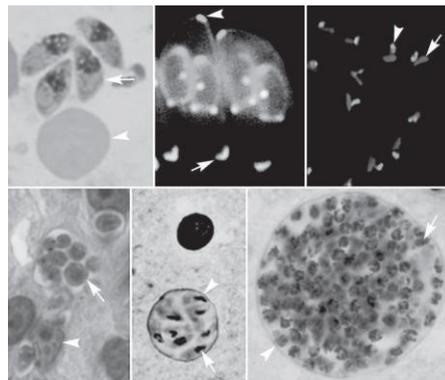


Figura 3: Tachizoiti e cisti tissutali
(*Toxoplasmosis of animals and humans, J.P Dubey*)

La funzione dei conoidi, dei rhoptries, dei micronemi e dei micropori non è ancora molto chiara ma si crede possa essere legata alla penetrazione della cellula ospite, creando poi successivamente un ambiente intracellulare adatto per la sopravvivenza e la crescita del parassita. Il conoide infatti si estende, si flette e si retrae come fosse la sonda del parassita che analizza il plasmalemma della cellula ospite prima di penetrarla. I rhoptries invece hanno una funzione secretoria associata alla penetrazione della cellula ospite. Il microporo invece è una struttura simile al citosoma formato dall'invaginazione della membrana esterna.

Il tachizoite è la forma invasiva, proliferante, ed ha la capacità di penetrare attivamente nella cellula ospite dove si moltiplica asessualmente, fino a riempirla completamente. Inoltre, i tachizoiti tramite la rottura della pseudocisti, possono essere rinvenuti liberi in essudati o nel sangue, negli ospiti recettivi tendono a diffondere per via linfoematogena dall'area di infezione primaria (focolaio enterico) ai diversi tessuti dell'organismo invaso, e qui moltiplicarsi attivamente. All'interno degli organi 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 se tenuti a temperatura di refrigerazione: a 4 °C resistono per 25 giorni circa.

T.gondii può penetrare il plasmalemma della cellula ospite in 26 secondi.

Una volta penetrato nella cellula ospite, il tachizoita si deforma e si scioglie attraverso il plasmalemma dell'ospite e viene rapidamente circondato da questo; questa membrana è destinata a diventare il vacuolo Parassitoforo (PV), e una serie di proteine parassitarie associate ad essa, comprese le proteine dei rhoptries, ROP2, -3, -4 e -7.

I tachizoiti si moltiplicano all'interno della cellula ospite attraverso endoduogenie ripetute, una speciale forma di riproduzione in cui due cellule figlie si differenziano all'interno della cellula madre (Nishi *et al.*, 2008). Raramente, i tachizoiti di alcuni ceppi, possono dividersi per fissione binaria.

La cellula ospite, si romperà quando non sarà più in grado di sostenere la crescita dei tachizoiti e l'uscita dalla cellula ospite è mediata da una proteina (tgPLP1) secreta dal parassita (Kafsack *et al.*, 2009).

Il tasso di invasione e di crescita variano a seconda del ceppo di *T.gondii* e delle cellule ospite. Una volta che il parassita penetra nella cellula ospite, c'è un lasso di tempo

variabile prima che questo cominci a replicarsi, e la durata di questo ritardo dipende dal parassita.

1.4 BRADIZOITI E CISTI TISSUTALI

Il bradizoita anche chiamato cistozoita rappresenta lo stadio cistico del parassita nei tessuti. La cisti tissutale resta intracellulare e i bradizoiti si dividono per endoduogenia. Le cisti tissutali variano di dimensioni; le giovani cisti tissutali possono misurare 5 μm di diametro e contenere solo due bradizoiti, mentre quelle più vecchie possono contenere migliaia di organismi. Un numero dispari di bradizoiti nelle giovani cisti tissutali indica una divisione asincrona.

Nelle sezioni istologiche, le cisti tissutali nel cervello sono spesso sferoidali e raramente raggiungono un diametro di 70 μm , mentre le cisti tissutali intramuscolari sono allungate e possono arrivare a misurare fino a 100 μm .

Anche se le cisti tissutali possono svilupparsi negli organi viscerali come i polmoni, i reni e il fegato, queste sono più prevalenti nei tessuti nervosi e muscolari, compresi il cervello, gli occhi, i muscoli scheletrici e cardiaci.

La parete della cisti è elastica e di uno spessore $<0,5 \mu\text{m}$, e racchiude centinaia di bradizoiti a forma di semiluna delle dimensioni di 5-8,5x 1,3 μm .

La cisti tissutale si sviluppa all'interno del PV, nel citoplasma della cellula ospite (il PV è difficilmente visibile nelle cisti tissutali vecchie). La parete della cisti tissutale appare ruvida e di spessore irregolare, la membrana esterna probabilmente deriva sia dalla cellula ospite che dal parassita ed è foderata con materiale granulare (GL), ed i bradizoiti sono giustapposti contro il GL.

Nelle cisti tissutali più giovani, spesso i bradizoiti sono più grandi e con una quantità minore di organelli rispetto alle cisti più vecchie. I bradizoiti, strutturalmente parlando, differiscono molto poco dai tachizoiti, infatti i bradizoiti hanno il nucleo localizzato più sul versante posteriore, rispetto ai tachizoiti, nei quali si trova più centrale. I bradizoiti sono anche molto più sottili rispetto ai tachizoiti, e presentano una quantità maggiore di micronemi, localizzati nella parte posteriore del nucleo.

I bradizoiti contengono molti granuli di amilopectina, che diventano rossi col PAS.

Le cisti tissutali sono parte integrante del ciclo di *T.gondii*, e queste, si formano già dopo 3 giorni dall'inoculazione (Dubey *et al.*1976).

La distribuzione delle cisti tissutali dipende dall'ospite (Dubey *et al.*1997), ed è stato visto che sono maggiormente distribuite nei tessuti muscolari piuttosto che nel cervello, questo tipo di osservazione è stata fatta grazie agli animali infettati naturalmente, anche se nei topi è stato visto che le cisti tissutali sono localizzate maggiormente nel cervello, rispetto a tutti gli altri organi.

I fattori che determinano la rottura della cisti tissutali sono ancora sconosciuti.

1.1 CONTAMINAZIONE AMBIENTALE

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

Derivano dalla fusione all'interno dell'enterocita tra macrogamete e microgamete e costituiscono il prodotto del ciclo sessuato entero-epiteliale che si compie nel felino, e vengono eliminate e disseminate nell'ambiente attraverso le feci.

Appena vengono liberate nell'ambiente non sono ancora sporulate, quindi non ancora infettanti.

1.7 CICLO BIOLOGICO

Ciclo intestinale: fase sessuata, sporogonia e gametogonia

I gatti, non solo quelli domestici (*Felis domesticus*), ma tutte le specie di felidi, possono diffondere le oocisti di *T.gondii*.

Le oocisti vengono diffuse dopo l'ingestione di uno dei tre stadi infettanti di *T. gondii*: i tachizoiti (pseudociste), i bradizoiti (cisti) o le oocisti, e la frequenza di spargimento delle oocisti, varia in base allo stadio di *T.gondii* ingerito.

Nel gatto, sembra 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, 1996).

I parassiti contenuti nelle oocisti sporulate, nelle pseudocisti o nelle cisti, 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 microgameti e macrogameti secondo un meccanismo ancora sconosciuto. 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 due flagelli. A causa della similarità con una cellula spermatica, sembra appropriato il termine di gamete maschile (Ferguson *et al.*, 1974; Dubey *et al.*, 1998).

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

I macrogameti, che rappresentano la parte femminile, rimangono all'interno della cellula infettata, mentre i microgameti che rappresentano la parte maschile, distruggono l'enterocita parassitato dal macrogamete; ed è qui che si forma lo zigote dalla fusione di gamete maschile e gamete femminile (figura 4).

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

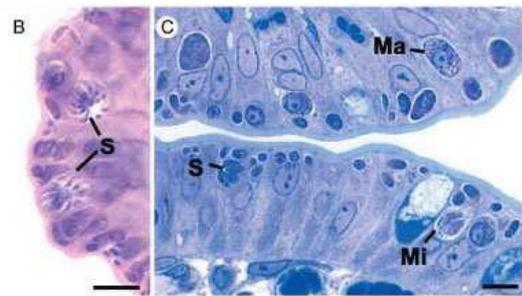


Fig. 3A-C: light micrographs through the small intestine of the cat showing the appearance of the various coccidian stages (both asexual and sexual) developing in the enterocytes (arrows). Ma: macrogametocyte; Mi: microgametocyte; S: schizont. Bars = 10 μ m.

Figura 4: Intestino di gatto.

Vari stadi (asessuali e sessuali) che si sviluppano all'interno degli enterociti.

Ma: macrogametociti; Mi: microgametociti; S: schizonti (Ferguson, 2009).

Il periodo di prepatenza ha durata variabile a seconda della modalità d'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 elimina 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 e per lunghi periodi di tempo), si può avere una ripresa dell'eliminazione delle oocisti (Lindsay, 1997); ciò non sembra accadere in caso di malattie immunosoppressive causate da malattie infettive (es: FIV, FeLV) (Lappin *et al*, 1992; Lappin *et al* 1996; Svobodova *et al* 1998)

T.gondii si è biologicamente adattato per essere trasmesso dai gatti attraverso il carnivorismo, invece, la trasmissione attraverso le oocisti è più efficiente attraverso gli ospiti intermedi (mammiferi ed uccelli). È stato visto attraverso degli esperimenti, che i bradizoiti sono più infettanti per i gatti e le oocisti sono più infettanti per i topi (Dubey *et.al* 1996), i gatti possono essere infettati anche con un solo bradizoite, cosa che non è possibile con i topi. I gatti si infettano anche con una piccola quantità di bradizoiti, per poi diffondere milioni di oocisti.

L'ooocisti non è infettante prima della sporulazione, le oocisti non sporulate sono semisferiche o sferiche e hanno una dimensione di 10-12 µm di diametro.

L'ooocisti sporulata è invece elissoidale e sono del diametro di 11-13 µm, ogni oocisti ha due sporocisti che misurano 6-8 µm. Ogni sporociste contiene quattro sporozoiti. Nella fase esogena, l'ooocisti non sporulata viene liberata all'esterno dove sopravvive all'interno delle feci anche per mesi, in suolo umido.

La sporulazione dell'ooocisti avviene dopo 2-21 giorni, in base alla temperatura presente, l'ooocisti sporulata presenta 2 sporocisti con 4 sporozoiti in ogni sporocisti.

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 *et al* 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%).

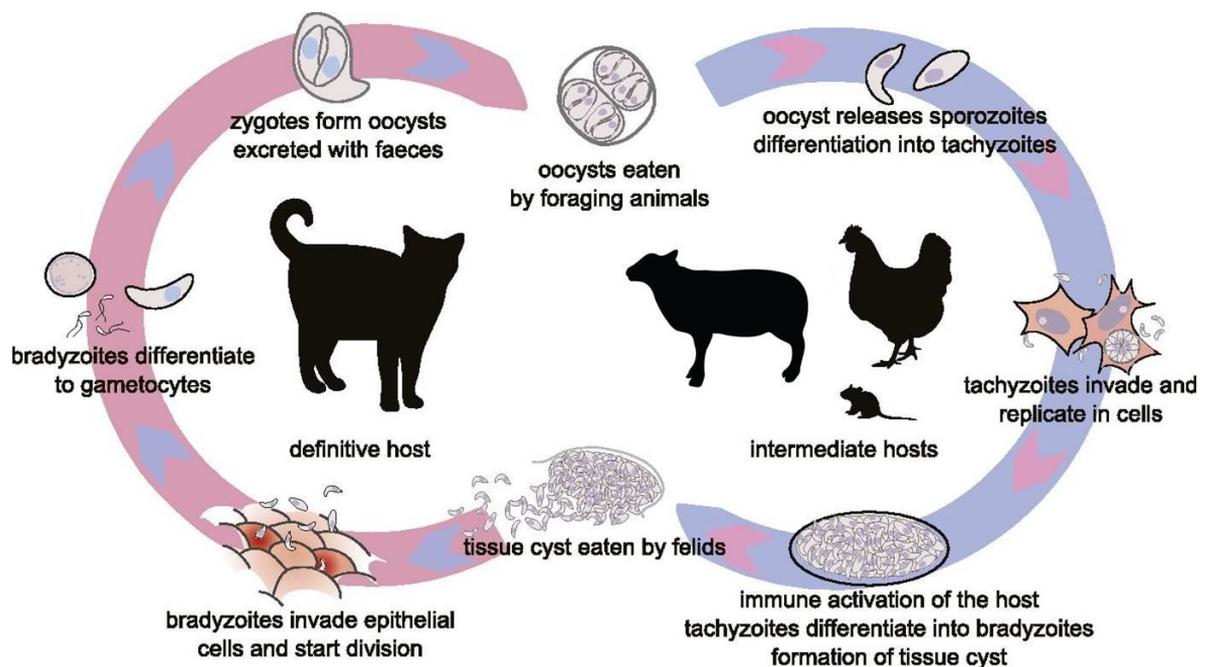


Figura 5: Ciclo Biologico di *Toxoplasma gondii*.

(www.farmhealthonline.com)

Ciclo extraintestinale (fase asessuata e schizogonia)

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.

Questi ospiti intermedi, possono infettarsi ingerendo oocisti mature presenti nelle feci o in seguito al consumo di carne di animali parassitati; dopo essere stata ingerita, precisamente a livello dell'intestino tenue, si liberano gli sporozoitii dall'oocisti e penetrano all'interno dei macrofagi (SRE) e quindi circolano nel sangue; nel macrofago si formano i tachizoiti, cistozoiti o endozoiti all'interno di una ciste che si forma come reazione alla risposta immune dell'ospite, preferibilmente all'interno della muscolatura, del SNC o anche all'interno dell'occhio, anche se può comunque localizzarsi ovunque. All'interno delle cellule dei tessuti invasi, si formano i vacuoli parassitofori nei quali *T.gondii* nella forma di tachizoite si moltiplica in una serie di divisioni binarie (circa 30-40) finché la cellula infetta non scoppia disseminando i tachizoiti per via ematica e linfatica in tutto l'organismo con conseguente invasione delle cellule di numerosi organi e tessuti (Dubey *et al.*, 1998).

La fase acuta, che nei soggetti immunocompetenti dura 1-2 settimane, induce una forte risposta immunitaria, sia umorale che cellulo-mediata che elimina le manifestazioni cliniche della malattia e induce il parassita ad incistarsi in alcuni tessuti e a differenziarsi in una forma riproduttiva lenta, detta bradizoita.

La formazione delle cisti e quindi dei bradizoiti determina la cronicizzazione della malattia, tali stadi del parassita permangono all'interno dell'ospite anche per tutta la vita. I bradizoiti hanno una scarsa capacità di replicazione e restano quiescenti all'interno della cisti tissutale; si possono localizzare in qualunque 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 della cisti è dovuta all'equilibrio che si instaura tra il sistema immunitario dell'ospite e il parassita; 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 (riattivazione) 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.

È importante sottolineare come i felini siano gli unici ad emettere oocisti.

CAPITOLO 2: *NEOSPORA CANINUM*

2.1 INTRODUZIONE:

Neospora caninum, è un protozoo parassita strettamente correlato con *Toxoplasma gondii*, responsabile di aborto nella bovina e di patologie nervose nei vitelli.

È stato isolato per la prima volta nel 1984 in Norvegia in cani colpiti da encefalite e miosite (Bjerkås *et al.*, 1984); successivamente, nel 1988, questa ed altre segnalazioni vennero identificate come causate da un unico agente eziologico, denominato appunto come *Neospora caninum* (Thilsted *et al.*, 1989; Dubey *et al.*, 1988).

Da alcuni studi epidemiologici si ritiene che *N.caninum*, in alcune zone come ad esempio la California, l'Australia, la Nuova Zelanda, l'Olanda, il Regno Unito, rappresenta dal 20% al 43% di tutte le cause di aborto (Pfeiffer *et al.*, 1997; Dubey., 1999); l'infezione potrebbe coinvolgere oltre il 20% degli allevamenti. È stata descritta come importante causa di aborto anche nelle regioni della Scandinavia (Petersen *et al.*,1999).

I danni economici sono legati sostanzialmente all'aborto che avviene generalmente tra il IV ed il VII mese di gestazione con la conseguente perdita del vitello e mancata produzione lattea, nonché i conseguenti costi veterinari; è stata osservata anche una diminuzione del 5% della produzione di latte durante la prima lattazione nelle bovine infette che non hanno abortito (French *et al.*,1999) Inoltre si hanno sicuramente costi legati alla diagnosi, al ripristino della riproduttività degli animali, che comprende inseminazione artificiale, l'acquisto di animali per la rimonta, se necessario, e, infine, il costo per l'eventuale eliminazione di bovini sieropositivi e per l'acquisto di animali sieronegativi (Dubey .,2003).

2.2 CARATTERISTICHE GENERALI DI *NEOSPORA CANINUM*

La Neosporosi è una patologia a carattere abortigeno sostenuta da *N.caninum*; è emersa in tutto il mondo come un'importante causa di patologia riproduttiva che colpisce sia bovine da latte, da carne e ovini (Dubey *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 2000, Filho *et al* 2017). *N.caninum* è un parassita intracellulare obbligato a prevalente localizzazione intracitoplasmatica, correlato morfologicamente e antigenicamente con *Toxoplasma gondii*.

Neospora caninum fa parte del Phylum *Apicomplexa*, classe *Sporozoa*, sottoclasse *Coccidia*, ordine *Eucoccidiorida*, sottordine: *Eimeriorina*, famiglia: *Sarcocystiidae*, genere: *Neospora*, specie: *caninum*.

La prima descrizione di *N.caninum* risale al 1984, in Norvegia, dove Bjerkås *et al.* (1991) isolarono un parassita strutturalmente assimilabile a *Toxoplasma gondii*, dal cervello e dal tessuto muscolare di cani affetti da una forma clinica di encefalopatia, senza però che gli animali avessero anticorpi contro *T.gondii*.

Nel 1988, in USA, si isolò un parassita di caratteristiche simili in 10 cani che soffrivano di alterazioni neurologiche, dimostrando, con l'utilizzo di tecniche sierologiche e immunoistochimiche, che si trattava di un parassita differente da *Toxoplasma gondii*, e per questo venne dato il nome di *Neospora caninum* (Dubey *et al.*, 1988).

2.3 STADI MORFOLOGICI

Anche *N.caninum* si presenta in numerosi stadi evolutivi:

- Stadio di tachizoita
- Stadio di bradizoita
- Stadio di oocisti

I tachizoiti di *N.caninum* sono stati rinvenuti in molte cellule tra le quali: neuroni, macrofagi, miociti, epatociti, fibroblasti, fibrocellule muscolari, nelle cellule degli endoteli vasali e nell'epitelio tubulare renale (Dubey e Lindsay, 1996); inoltre hanno la

capacità di attraversare la barriera placentare ed essere così un'importante causa di infezione del prodotto del concepimento.

Il parassita può essere libero nel citoplasma o all'interno di vacuoli parassitofori che possono essere anche più di uno in una cellula (Dubey e Lindsay, 1996) . Una cellula può contenere anche fino a 100 tachizoiti e la penetrazione del tachizoita nella cellula avviene in tempi molto ristretti (Dubey *et al.*, 1996).

Nel processo di invasione della cellula ospite, svolge un ruolo fondamentale il complesso apicale, un insieme di strutture citoscheletriche e vescicolari presente in tutti gli stadi invasivi degli *Apicomplexa*.

La componente citoscheletrica è costituita dal conoide, che è in grado di estroflettersi durante l'invasione, mentre la componente vescicolare è costituita dai micronemi e dai rhoptries, organelli che secernono il proprio contenuto apicalmente.

I rhoptries sono strutture elettrondense quindi particolarmente visibili, anche per le loro dimensioni decisamente superiori a quelle di altre strutture interne del tachizoita (Dubey *et al.*, 2002)

Il processo di invasione richiede 15-20 secondi, culminando nella formazione di un vacuolo parassitoforo all'interno del quale il parassita si moltiplica.

I micronemi contengono un corredo di proteine adesive le quali, esposte sulla superficie del tachizoita (SAG1, MIC1, MIC4), contribuiscono alla formazione della cosiddetta "giunzione mobile". Questa struttura, che crea un contatto tra la membrana di *N.caninum* e quella della cellula ospite, dipende dall'interazione specifica tra domini adesivi delle proteine dei micronemi e ligandi espressi sulla membrana della cellula bersaglio. La secrezione del contenuto dei micronemi è un processo stimolato dalla mobilitazione delle riserve di Ca⁺⁺ intracellulare del parassita, con conseguente aumento della concentrazione intracellulare di questo ione. Successivamente ai micronemi, sono i rhoptries a rilasciare il proprio contenuto di proteine (ROP2), per lo più coinvolte nella modificazione del vacuolo parassitoforo.

Il bradizoita è la forma latente del parassita e ne permette la notevole e durevole resistenza nell'ospite intermedio.

Si localizzano all'interno di cisti tissutali, le quali si rinvergono soprattutto a livello di sistema nervoso centrale (cervello, midollo spinale, nervi periferici) e retina (Dubey *et al.*, 1988). Più recentemente, cisti contenenti bradizoiti sono state osservate anche a livello di muscolo in alcuni bovini (Peters *et al.*, 2001).

Le cisti tissutali di *N.caninum* possono raggiungere un diametro di 107 μm e possono essere di forma ovale o rotonda (Dubey e Lindsay, 1996) e contenere dai 20 ai 100 bradizoiti (Speer *et al.*, 1999); lo spessore della parete può variare dai 0,5 ai 4 μm : lo spessore varia in base all'età della cisti stessa (Speer *et al.*, 1999).

L'ocisti, è lo stadio in cui il parassita, potenzialmente infettante, viene eliminato dall'ospite definitivo.

Il cane, infatti, elimina con le feci le oocisti nella forma non sporulata, altamente resistenti nell'ambiente esterno (McAllister *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 1999). Solo all'esterno dell'ospite definitivo e dalle 24 alle 72 ore dalla loro espulsione, le oocisti di *Neospora* sporulano (Figura 6), diventando appunto oocisti sporulate, forma infettante, che possono così venir ingerite dall'ospite definitivo od intermedio (Lindsay, 1998). Ogni oocisti contiene due sporocisti, che a loro volta contengono quattro sporozoiti (Dubey, 1999).

Le oocisti hanno forma ovoidale o sferica, sono costituite da una doppia parete e le dimensioni variano da 11,3 a 11,7 μm (McAllister *et al.*, 1998; Dubey, 2002). Le sporocisti contenute all'interno dell'ocisti sporulata, sono di forma ellissoidale e possiedono un nucleo posizionato centralmente o nella parte posteriore (Lindsay *et al.*, 1999).

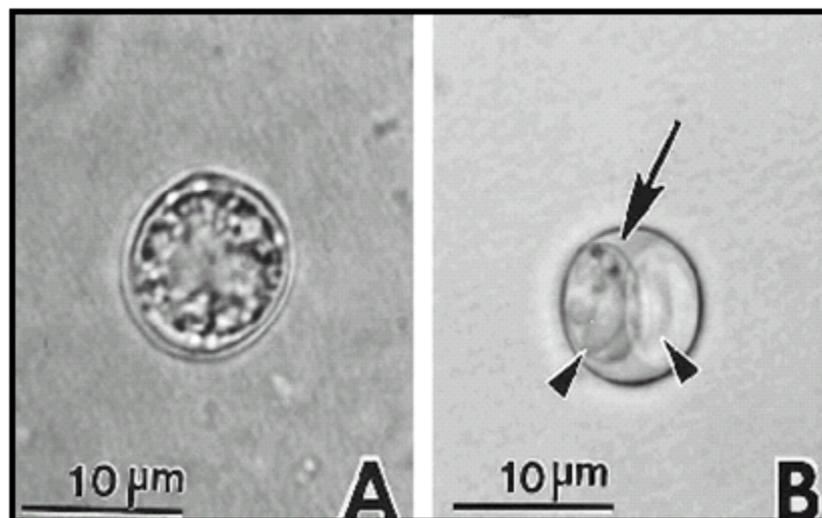


Fig.6:A: oocisti di N.caninum non sporulata B: oocisti di N.caninum sporulata (www.monografias.com)

2.4 CICLO BIOLOGICO DI *NEOSPORA CANINUM*

Il ciclo dixeno di *N.caninum* richiede la presenza di due ospiti:

- ospite intermedio;
- ospite definitivo.

Il ciclo (Figura 7) ha inizio con l'ingestione, da parte di un animale (ospite intermedio o definitivo), delle oocisti sporulate (contenenti 8 sporozoit) emesse nell'ambiente esterno dall'ospite definitivo (cane, coyote...) (Dubey *et al* 2007) . Nell'ospite definitivo, gli sporozoit, arrivati a livello intestinale, ad esempio, con l'alimento contaminato, penetrano ciascuno in una cellula della mucosa intestinale, utilizzando il complesso apicale, nella cellula si trasformano in trofozoiti che si nutrono della cellula stessa, aumentando di dimensioni.

A questo punto prende il via la fase di riproduzione asessuata (schizogonia) caratterizzata dalla moltiplicazione del nucleo dei trofozoiti, senza la contemporanea suddivisione citoplasmatica.

Da questo processo deriva una forma multinucleata, denominata schizonte.

Successivamente segue la divisione cellulare con la formazione di numerosi merozoiti, che escono dalla cellula ospite ormai distrutta e penetrano in altre cellule intestinali vicine per ripetere tutto il processo di schizogonia .

Il numero di fasi di schizogonia non è conosciuto, molto probabilmente è variabile ed in funzione dell'attivazione più o meno immediata della risposta immunitaria dell'animale stesso.

A questo punto i merozoiti prodotti nell'ultimo ciclo di schizogonia, penetrano ulteriormente in un enterocita dando inizio alla fase di riproduzione sessuata di *N.caninum*.

Una parte dei merozoiti dà origine a gameti "femminili", singoli, mononucleati ed ancora endocellulari (macrogameti) ; un'altra parte dà invece origine ai gameti "maschili", mobili ed extracellulari (microgameti) , che individuano le cellule contenenti il gamete "femminile", vi penetrano fondendosi col macrogamete e dando origine all'unica fase diploide (zigote) del parassita . Lo zigote quindi comincia a ricoprirsi di una parete di protezione ed abbandona la cellula della mucosa intestinale, cadendo nel lume intestinale e raggiungendo l'ambiente esterno con le feci (oocisti non sporulata).

All'esterno avviene la fase di sporulazione dell'ocisti, la quale, dopo circa 24-72 ore, si trasforma in una oocisti sporulata costituita al suo interno da due sporocisti contenenti ognuno 4 sporozoiti.

L'ospite definitivo, può inoltre infettarsi attraverso l'ingestione di tessuti contenenti cisti parassitarie di *N.caninum*. I bradizoiti, presenti nelle cisti, similmente agli sporozoiti, si liberano nel lume intestinale e si trasformano in tachizoiti i quali danno inizio alla fase di moltiplicazione asessuata, per terminare con la formazione dello zigote e quindi dell'ocisti non sporulata.

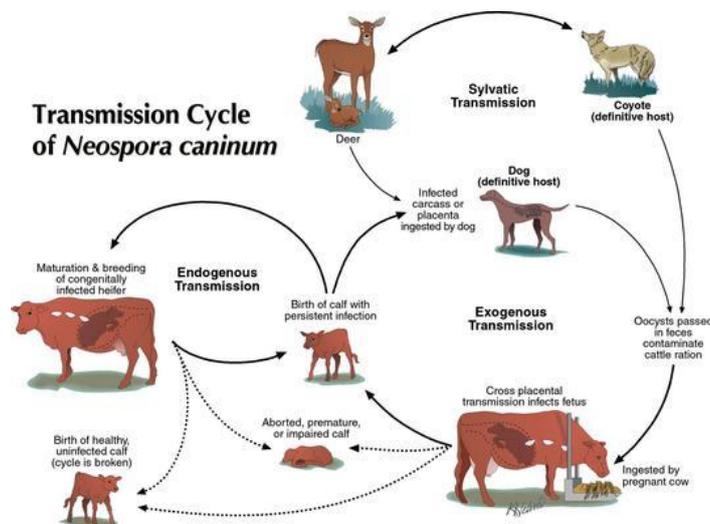


Figura 7: Ciclo biologico di *Neospora caninum*. (www.lookfordiagnosis.com)

Quando invece le oocisti sporulate sono ingerite dall'ospite intermedio (bovino, cavallo, ovi-caprini...), i trofozoiti, dopo essersi liberati della parete cistica, vengono rilasciati nel lume intestinale e divengono tachizoiti.

I tachizoiti si dividono rapidamente e diffondono in tutto l'organismo, invadendo le cellule di numerosi organi (fegato, reni, cuore, polmoni, muscoli, derma e SNC) nelle quali avviene la moltiplicazione asessuata (scissione binaria): lo stadio di tachizoite è associato ad infiammazione e necrosi nel sito d'invasione (Dubey e Lindsay, 1999).

Nelle bovine gravide, i tachizoiti possono nel giro di poco tempo, invadere il feto passando attraverso la placenta, ed essere così causa di aborto.

A seguito della risposta immunitaria dell'animale, i tachizoiti si "rifugiano" all'interno di una cisti, trasformandosi in bradizoiti.

Le cisti tissutali sono circondate da una parete cistica molto spessa e resistente, e sono reperibili principalmente nei tessuti neuronali (cervello, midollo spinale) (Dubey *et al*

1988). I tessuti cistici inducono una reazione infiammatoria minima e possono persistere nel bovino per lunghi periodi di tempo senza manifestazioni cliniche.

Si presume che, in corso di una gravidanza, i bradizoiti latenti in queste cisti vengano attivati, e si differenzino nello stadio di tachizoite, infettivo e mobile, che raggiunge, attraverso i tessuti, il sangue e/o sistema linfatico, la placenta e il feto ed essere così causa di aborto. Come risultato di questa "riattivazione" dei parassiti, ripetute infezioni fetali possono verificarsi nella stessa madre infetta, nelle gravidanze successive.

In conclusione a questa prima parte possiamo quindi affermare che *T.gondii* è un protozoo intracellulare obbligato delle cellule nucleate, con stadi intestinale ed extra-intestinali, ha un ruolo molto importante come zoonosi cosmopolita, e per la sanità pubblica in genere.

N.caninum è anche questo un protozoo intracellulare obbligato, strettamente correlato con *T.gondii*, è considerata una delle più importanti cause di aborto nei bovini e negli ovini, ed ha quindi un significativo impatto economico nel comparto zootecnico.

Il gatto e il cane sono rispettivamente gli ospiti definitivi di *T.gondii* e *N.caninum*, mentre nelle altre specie animali si svolge il ciclo tissutale con formazione di cisti terminali (contenenti bradizoiti) negli organi target (SNC, tessuto muscolare striato e cardiaco).

Gli ospiti intermedi sono rappresentati da tutti i vertebrati omeotermi (mammiferi e uccelli), all'interno dei quali si formano le cisti tissutali, prevalentemente nel SNC, muscoli scheletrici e cardiaci dove restano latenti a meno che l'animale non diventi gravido.

CAPITOLO 3: SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della tesi, è stata un'indagine epidemiologica volta a rilevare la presenza di DNA di *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* e di anticorpi specifici nella popolazione degli uccelli selvatici prevalentemente nella provincia di Pisa e Livorno.

Difatti, mentre la presenza di toxoplasma in specie aviarie è nota da tempo, anche se i dati epidemiologici in Italia sono piuttosto scarsi, *Neospora caninum* è stata osservata soltanto di recente in alcuni uccelli selvatici.

Dato l'impatto di questi parassiti sulla sanità pubblica e su quella animale abbiamo ritenuto utile valutarne la presenza in uccelli selvatici, che potrebbero fungere da ospiti intermedi e di conseguenza rivestire un ruolo nella diffusione di tali parassiti, considerando anche che molti uccelli sono migratori.

CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI

4.1 ANIMALI:

Lo studio che abbiamo eseguito è stato condotto su uccelli selvatici di specie diverse, che ci ha gentilmente ceduto la LIPU, si trattava di esemplari ricoverati nella struttura deceduti per varie cause, inoltre abbiamo analizzato anche diverse specie di anatidi provenienti da normale attività venatoria nella provincia di Pisa.

4.2 CAMPIONAMENTO:

Gli esemplari utilizzati per questo studio sono stati 217 volatili di specie diverse, di questi, 64 maschi, 106 femmine e 47 non identificati (Tabella 1).

È stata effettuata in sede necroscopica, la raccolta del cuore, del cervello e del sangue, da coagulo intracardiaco (dove possibile) da cui è stato ottenuto il siero per il test di immunofluorescenza indiretta.

I campioni dei tessuti sono stati mantenuti a -20°C fino all'esecuzione dei test.

Ordine/specie	Numero di animali	Sesso M/F
Anseriformes:		
Alzavola (<i>Anas crecca</i>)	73	23/50
Codone (<i>Anas acuta</i>)	5	0/5
Germano (<i>Anas platyrhynchos</i>)	28	15/13
Fischione (<i>Anas penelope</i>)	23	10/13
Canapiglia (<i>Anas strepera</i>)	3	0/2
Moriglione (<i>Aythya ferina</i>)	3	2/1
Volpoca (<i>Tadorna tadorna</i>)	3	1/2
Marzaiola (<i>Anas querquedula</i>)	1	0/1

Moretta (<i>Aythya fuligula</i>)	1	0/1
Mestolone comune (<i>Anas clypeata</i>)	8	2/6
Oca italiana (<i>Anser anser</i>)	1	X
Passeriformes:		
Storno (<i>Sturnus vulgaris</i>)	2	1/0
Corvo (<i>Corvus frugilegus</i>)	2	1/0
Occhiocotto (<i>Sylvia melanocephala</i>)	1	X
Ghiandaia (<i>Garrus glandarius</i>)	1	1/0
Lucherino (<i>Spinus spinus</i>)	1	X
Cinciallegra (<i>Parus major</i>)	1	X
Lui piccolo (<i>Phylloscopus collybita</i>)	1	X
Capinera (<i>Sylvia atricapilla</i>)	1	X
Columbiformes:		
Piccione (<i>Columba livia</i>)	3	0/1
Colombaccio (<i>Columba palumbus</i>)	8	4/1
Falconiformes		
Gheppio comune (<i>Falco tinnunculus</i>)	6	X
Falco pellegrino (<i>Falco peregrinus</i>)	1	X
Galliformes:		
Fagiano comune (<i>Phasianus colchicus</i>)	3	2/1
Charadriiformes:		
Beccaccino (<i>Gallinago gallinago</i>)	6	X
Pavoncella (<i>Vanellus vanellus</i>)	2	X
Gabbiano reale (<i>Larus michahellis</i>)	18	1/7
Accipitridae:		
Poiana comune (<i>Buteo buteo</i>)	4	X
Strigidae:		
Gufo comune (<i>Asio otus</i>)	1	X
Gruiformes:		
Folaga comune (<i>Fulica atra</i>)	2	0/1
Strigiformes:		
Civetta (<i>Athene noctua</i>)	3	0/1
Pelecaniformes:		
Airone cenerino (<i>Ardea cinerea</i>)	1	1/0

Tabella 1: Esemplari utilizzati per il nostro studio.

4.3 DESCRIZIONE DELLE METODICHE:

4.3.1 Estrazione del DNA:

Per l'estrazione del DNA è stato utilizzato un kit, il DNeasy[®] Blood & Tissue (QIagen, Milano IT).

Dopo essere stati scongelati, circa 200 mg di cervello e cuore sono stati inseriti in singole eppendorf, cui sono stati aggiunti circa 200 µl di tripsina , e dopo aver agitato i campioni per alcuni secondi, sono stati incubati a 37C° per almeno un'ora e mezza, per far si che il campione venga digerito adeguatamente e venga omogeneizzato il più possibile.

Dopo di che, 25 mg del campione, sono stati addizionati a 180 µl di buffer ATL e 20 µl di proteinasi K, per completarne la digestione a 56 C° per circa tre ore.

Passato il tempo necessario, si prosegue con l'estrazione, aggiungendo alle eppendorf 200µl di buffer AL e 200 µ di etanolo, ponendo subito sul vortex dopo l'aggiunta di ciascun composto, per omogeneizzare il contenuto.

Si preleva poi tutto il contenuto della mia eppendorf, cioè 620 µl, e si trasferisce in una DNeasy Mini spin column in un collection tube per poi centrifugare, per 1 minuto a 8000 g. Dopo aver eliminato il collection tube con il filtrato, si mette poi la DNeasy Mini spin column in un nuovo collection tube. A questo punto si aggiungerà 500 µl di Buffer AW1 nel mini spin column e si centrifuga nuovamente per 1 minuto a 8000 g, al termine della centrifuga , dopo aver eliminato il collection tube ed il contenuto, si mette nuovamente la DNeasy Mini spin column in un nuovo collection tube e si aggiunge 500 µl di Buffer AW2 (nel passaggio precedente) e questa volta si centrifuga per 3 minuti a 14000 g.

Al termine della centrifugazione si elimina il liquido presente nel collection tube, ma non sostituendo il collection tube e si mette nuovamente a fare una centrifuga per essere sicuri che la membrana della DNeasy Mini spin column sia totalmente secca. Terminata la centrifuga si elimina il collection tube e si inserisce la mini colonna nell'eppendorf che conterrà il DNA estratto, ed aggiungiamo 100 µl di Buffer AE cercando di centrare la membrana della mini colonna, si tiene poi in posizione eretta per tre minuti, per poi effettuare una centrifuga di 1 minuto a 8000 g

Ripeto nuovamente il passaggio, aggiungendo 100 µl di Buffer AE e tenendo in posizione eretta per tre minuti per centrifugare nuovamente per 1 minuto a 8000 g.

Terminata la centrifuga si può eliminare la mini colonna e chiudere l'eppendorf con all'interno il DNA appena estratto, e riporla a 4°C finché non verrà utilizzato per effettuare la PCR.

4.3.2 Polymerase chain reaction (PCR)

La PCR, ideata nel 1983 da Kary B. 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.

Per quanto riguarda la diagnostica di *T.gondii* utilizzeremo un tipo di PCR diverso da *N. caninum*, cioè la Nested-PCR.

La nested PCR è una variante della tecnica di PCR, utilizzata per aumentare la specificità dell'amplificazione, che prevede due distinte e successive reazioni di amplificazione:

1. Nella prima amplificazione (prima PCR) si utilizza una coppia di primers (detti esterni) che amplificano un frammento di DNA.
2. Nella seconda amplificazione (seconda PCR) si utilizza una coppia di primers diversi che amplificano un frammento di DNA interno a quello amplificato nella prima reazione. In pratica, il prodotto amplificato nella prima PCR viene trasferito in una seconda provetta contenente una nuova miscela di reazione, uguale alla precedente per tutti i componenti ad eccezione dei primers. Il target dell'amplificazione è presente in condizioni completamente diverse nelle due reazioni di PCR, infatti, nella prima ci sono poche copie della sequenza bersaglio in un "background" di altro DNA (come quello dell'ospite) mentre nella seconda PCR il numero di sequenze bersaglio è maggiore e il "background" è significativamente ridotto.

Si tratta, quindi, di una modifica della PCR tradizionale destinata a ridurre eventuali prodotti aspecifici non desiderati in seguito all'amplificazione di siti di legame di primer inaspettati (primers che possono legarsi a regioni di DNA non corrette). In questo modo, si viene ad aumentare la resa e la specificità di PCR particolarmente difficili.

La PCR è il passo successivo all'estrazione del DNA.

Gli elementi necessari per eseguire la PCR sono i seguenti. La TAQ polimerasi, 2 primer, un buffer di reazione (una miscela di una serie di reagenti fondamentali per la stabilità della reazione, insieme ai nucleotidi) e acqua, priva di nucleasi. Tutti i reagenti indicati, tranne l'acqua, erano presenti nel kit WonderTaq® (Euroclone, Milano, Italia). Dovendo eseguire la PCR sia per *T.gondii* che per *N.caninum* , il protocollo sarà diverso.

Per la reazione di PCR è stato impiegato il protocollo descritto da Jones *et al.*, (2000) che amplifica il gene B1 (Tabella 2).

Il protocollo per la PCR per *T.gondii* prevede i seguenti reagenti:

1 STEP:

- H₂O = 24 µl
- Buffer = 8 µl
- TAQ = 0,25 µl
- Primer (B₁ out F) = 1µl
- Primer (B₁ out R) = 1µl

Primer Oligonucleotidico	Sequenza	Lunghezza amplificato
Primer forward (filamento senso)	5'-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3'	193pb
Primer forward (filamento antisenso)	5'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3'	193pb
Primer reverse (filamento senso)	5'-TGCATAGGTTGCAGTCACTG-3'	96pb
Primer reverse (filamento antisenso)	5'-GGCGACCAATCTGCGAATACACC-3'	96pb

Tabella 2 : sequenza dei primer oligonucleotidici per l'amplificazione del DNA di *T.gondii*.

Vengono allestiti dei PCR-tube, dove inseriremo i nostri reagenti nelle quantità indicate. Oltre al numero di PCR-tube corrispondenti al numero dei campioni in esame, è necessario aggiungere anche un controllo positivo ed uno negativo, necessari a verificare la corretta esecuzione del procedimento e l'assenza o meno di contaminazioni. Una volta che i reagenti sono stati allestiti, inseriremo il DNA (6 µl) nei rispettivi PCR tube e poi potremo inserire i PCR-tube nel termociclatore per il tempo necessario all'amplificazione del DNA.

Essendo una PCR- nested, dovrò preparare il secondo step per la seconda amplificazione, la quale prevede.

2° STEP

- H₂O = 27 µl
- Buffer = 8 µl
- Taq = 0,25 µl
- dNTP = 0,25 µl
- Primer (B₁ in F) = 1 µl
- Primer (B₁ in R) = 1 µl

Come nel primo step, allestiremo delle PCR-tube dove inseriremo i nostri reagenti nelle quantità indicate, dopo di che inseriremo 3 µl del prodotto di PCR del primo step, inseriremo le PCR-tube nel termociclatore per la seconda amplificazione.

Per quanto riguarda la PCR per *N.caninum* è stato utilizzato il protocollo descritto da Müller *et al* (1996), che amplifica la sequenza targhet Nc5, ed è il seguente (Figura 3):

PROTOCOLLO:

- H₂O = 24 µl
- Buffer = 8 µl
- Primer (NP6+) = 1 µl
- Primer (NP21+) = 1 µl
- Taq = 0,25 µl
- dNTP = 0,25 µl
- DNA = 6 µl

Primer	Sequenza	Lunghezza amplificato
Np21plus	5'CCCAGTGCGTCCAATCCTGTAAC3'	Entrambi amplificano un frammento di 337 pb
Np6plus	5'CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT3'	

Tabella 3: Sequenza dei Primer per l'amplificazione del DNA di *N.caninum*.

4.3.2 Elettroforesi su gel d'agarosio:

La fase successiva che servirà per verificare l'esito della PCR, è l'elettroforesi su gel d'agarosio.

La prima fase prevede la preparazione del gel di agarosio..

Per sintetizzare un gel al 2% di agarosio, è stato aggiunto 1 gr di agarosio in polvere da biologia molecolare, in 50 ml di TAE- buffer, all'interno di una beuta che va inserita in microonde per 2,15 minuti a 650 watt, in modo che si omogeneizzi il tutto.

Dopo di che ci si trasferisce sotto cappa per aggiungere 2,5 µl di un colorante per acidi nucleici Euro-safe® (Euroclone, Milano, Italia) all'interno della beuta e si fa raffreddare qualche minuto prima di versare il gel, ancora allo stato liquido in un supporto di plastica, opportunamente preparato perché accolga il gel; inoltre, adagiato sul supporto, è presente un "pettine" i cui "denti, una volta che il gel si sarà solidificato, lasceranno lo spazio dove inserire i campioni.

Passato il tempo necessario si toglie il pettine, e si mette il lettino nella cella elettroforetica sommergendolo nel TAE buffer presente all'interno.

A questo punto, prelevati i PCR-tube dal termociclatore, si inserisce il loro contenuto nei pozzetti del gel, ma l'inserimento prevede un ordine ben preciso (Figura 8).

Nel primo pozzetto inseriremo il Ladder *Ready to load plus*, (Euroclone, Milano, Italia), che ci serve per verificare la lunghezza dei prodotti di amplificazione visualizzati, nel secondo pozzetto metteremo il campione positivo e successivamente metteremo tutti i campioni in esame, lasciando l'ultimo pozzetto per il campione negativo.

Inseriti tutti i pozzetti, si chiude la cella elettroforetica e si collega all'alimentatore di corrente, applicando un voltaggio di 100V per 30 minuti.

Trascorso questo intervallo di tempo si toglie il gel dalla cella elettroforetica e si pone sotto il transilluminatore che tramite la luce ultravioletta permette di visionare la presenza di bande di DNA.

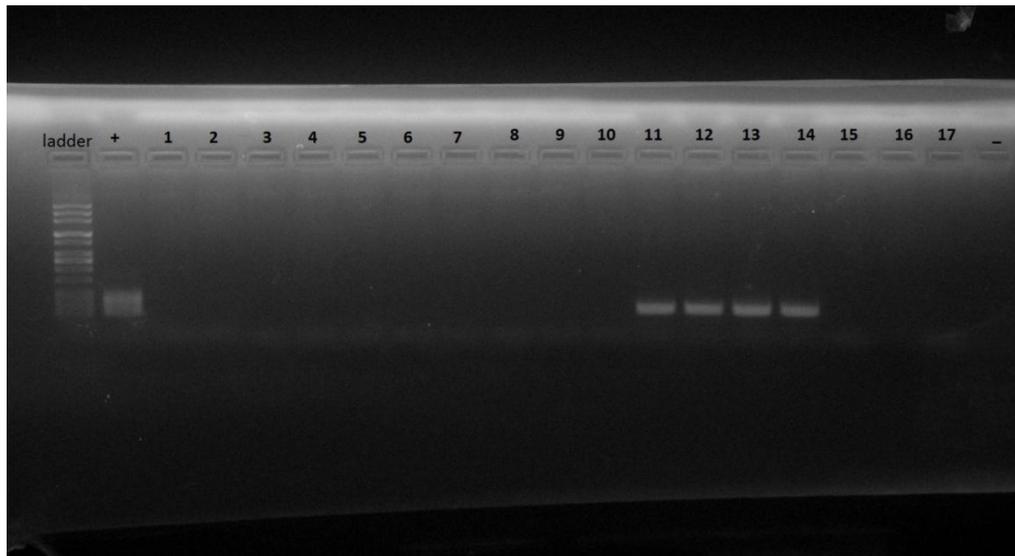


Fig 8: Elettroforesi su gel d'agarosio con 4 positivi per *T.gondii*, i numeri 11,12,13 e 14.
(Foto personale).

Di questi , 201/217 sono stati analizzati per la ricerca di *T.gondii* tramite PCR su cuori e cervelli estratti, 210/217 sono stati analizzati per la ricerca di *N.caninum* tramite PCR su cuori e cervelli estratti.

4.3.2 Immunofluorescenza indiretta (IFAT):

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

L'esecuzione dell'immunofluorescenza indiretta (IFAT) per la ricerca di anticorpi anti *T.gondii* è stata eseguita sui campioni di siero (ricavato da coaguli intracardiaci) , utilizzando Toxospot ® (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) come antigene e un anticorpo anti-pollo-IgG FITC (Sigma-Aldrich; con diluizione PBS 1:32).

Tutti i campioni di siero sono stati sottoposti a screening con una soglia di diluizione 1:10 e quelli positivi sono stati titolati con diluizioni per raddoppio.

Gli anticorpi contro *N.caninum* sono stati determinati utilizzando vetrini da 12 pozzetti (Fullerton Lab, Fullerton California). I campioni di siero sono stati sottoposti a screening con una diluizione soglia di 1:10 e i sieri positivi sono stati quindi titolati alla

fine con una diluizione per raddoppio (Costa *et al.*, 2008). I sieri diluiti (in PBS pH 7,2) su vetrini sono stati incubati a 37 ° C per 30 minuti, quindi lavati in PBS e incubati di nuovo usando un IgG anti-pollo coniugato con FITC (Sigma, Milano, Italia) diluito 1/30 come anticorpi secondari. Su ciascun vetrino sono stati inclusi sieri per il controllo positivo e negativo.

Cinquantacinque campioni di siero sono stati analizzati con l'IFAT per la ricerca di anticorpi contro *T.gondii* e *N.caninum*.

CAPITOLO 4: RISULTATI

Diciannove animali su 201(9,45%) sono risultati positivi per *T.gondii*, 19/210 (9,04%) animali positivi per *N.caninum*.

Gli animali hanno presentato titoli anticorpali compresi tra 1:10 e 1:160.

Otto campioni sono risultati positivi per *T.gondii* (14,5%) e 14 per *N.caninum* (25,45%), 5 animali sono risultati positivi a entrambi i parassiti.

Nel nostro lavoro abbiamo ottenuto una prevalenza di infezione del (Grafico 1):

- 9,45% per *T.gondii* tramite PCR
- 9,04% per *N.caninum* tramite PCR
- 14,54% per *T.gondii* tramite IFAT
- 25,45% per *N.caninum* tramite IFAT

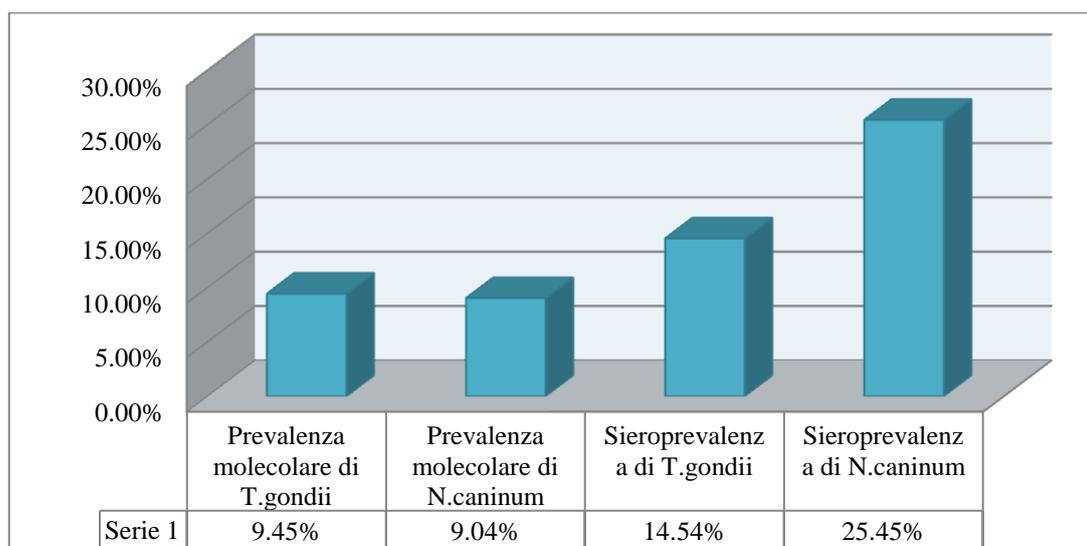


Grafico 1: prevalenza molecolare e sieroprevalenza di *T.gondii* e *N.caninum*.

In dettaglio, dei 19 animali positivi a *T.gondii*, il DNA di *T.gondii* è stato trovato in 15 cuori e 8 cervelli; inoltre 4/19 animali presentavano la presenza del DNA di *T.gondii* sia nel cuore che nel cervello.

Per quanto riguarda *N.caninum*, nei 19 positivi, il DNA di *N.caninum* è stato trovato in 11 cuori e 11 cervelli, e anche in questo caso 3 degli animali risultati positivi presentavano DNA sia nel cuore che nel cervello.

Dei campioni analizzati, 3 sono risultati positivi al DNA di entrambi i parassiti, presentando quindi una coinfezione, di cui dell'ordine degli *Anseriformes*, 2 esemplari della specie *Anas crecca* e dell'ordine dei *Columbiformes* un esemplare di *Columba palumbus*.

I risultati sono riportati in dettaglio in tabella 4.

Specie	Sesso	Titolo anticorpale T.gondii	Titolo anticorpale N.caninum	PCR T.gondii cuore/cervello	PCR N.caninum cuore/cervello
<i>Anas acuta</i>	F	X	X	Negativo	Positivo (cervello)
<i>Anas crecca</i>	M	X	X	Positivo (cervello)	Positivo (cuore/cervello)
<i>Anas crecca</i>	F	X	X	Negativo	Positivo (cuore/cervello)
<i>Anas crecca</i>	F	X	X	Positivo (cuore)	Negativo
<i>Anas crecca</i>	F	X	X	Negativo	Positivo (cervello)
<i>Anas crecca</i>	F	X	X	Negativo	Positivo (cuore)
<i>Anas crecca</i>	F	Negativo	Positivo 1:10	Negativo	Negativo
<i>Anas crecca</i>	F	Positivo 1:10	Positivo 1:20	Negativo	Negativo
<i>Anas crecca</i>	F	Negativo	Positivo 1:20	Positivo (cuore)	Negativo
<i>Anas crecca</i>	F	Negativo	Positivo 1:10	Negativo	Negativo
<i>Anas crecca</i>	F	X	X	Negativo	Positivo (cuore)
<i>Anas crecca</i>	M	Negativo	Positivo 1:10	Negativo	Negativo
<i>Anas crecca</i>	F	Negativo	Positivo 1:40	Positivo (cuore)	Negativo
<i>Anas crecca</i>	F	Positivo 1:10	Negativo	Negativo	Negativo

<i>Anas crecca</i>	F	Positivo 1:10	Negativo	Negativo	Negativo
<i>Anas crecca</i>	F	X	X	Negativo	Positivo (cervello)
<i>Anas crecca</i>	F	X	X	Positivo (cervello)	Positivo (cuore)
<i>Anas penelope</i>	F	X	X	Negativo	Positivo (cervello)
<i>Anas penelope</i>	F	X	X	Negativo	Positivo (cervello)
<i>Anas penelope</i>	F	X	X	Positivo (cuore)	Negativo
<i>Anas penelope</i>	F	Negativo	Positivo 1:10	Positivo (cuore/cervello)	Negativo
<i>Anas penelope</i>	M	X	X	Negativo	Positivo (cuore)
<i>Anas penelope</i>	F	X	X	Negativo	Positivo (cervello)
<i>Anas penelope</i>	M	X	X	Negativo	Positivo (cuore/cervello)
<i>Anas platyrhynchos</i>	F	X	X	Negativo	Positivo (cuore)
<i>Anas platyrhynchos</i>	M	X	X	Positivo (cuore)	Negativo
<i>Anas platyrhynchos</i>	F	Negativo	Positivo 1:20	Negativo	Negativo
<i>Anas platyrhynchos</i>	M	Negativo	Positivo 1:20	Negativo	Negativo
<i>Anas platyrhynchos</i>	M	X	X	Negativo	Positivo (cervello)
<i>Anas platyrhynchos</i>	F	Positivo 1:10	Positivo 1:20	Negativo	Negativo
<i>Anas platyrhynchos</i>	M	X	X	Positivo (cervello)	Negativo
<i>Anas platyrhynchos</i>	M	X	X	Negativo	Positivo(cuore)
<i>Buteo buteo</i>	n.d	X	X	Negativo	Positivo (cuore)
<i>Buteo buteo</i>	n.d	Positivo 1:160	Positivo 1:40	Negativo	Negativo
<i>Columba palumbus</i>	F	X	X	Positivo (cuore/cervello)	Positivo (cuore)
<i>Corvus frugilegus</i>	n.d	Negativo	Positivo 1:40	Negativo	Negativo
<i>Falco tinnunculus</i>	n.d	Positivo 1:160	Negativo	Negativo	Negativo

<i>Falco tinnunculus</i>	n.d	X	X	Positivo (cuore/cervello)	Negativo
<i>Falco tinnunculus</i>	n.d	X	X	Positivo (cuore/cervello)	Negativo
<i>Gallinago gallinago</i>	n.d	Positivo 1:10	Positivo 1:10	Negativo	Negativo
<i>Larus michahellis</i>	n.d	X	X	Positivo (cuore)	Negativo
<i>Larus michahellis</i>	F	X	X	Positivo (cervello)	Negativo
<i>Larus michahellis</i>	F	X	X	Positivo (cuore)	Negativo
<i>Larus michahellis</i>	n.d	Positivo 1:160	Positivo 1:40	Positivo (cuore)	Negativo
<i>Phasianus colchicus</i>	M	X	X	Positivo (cuore)	Negativo
<i>Sturnus vulgaris</i>	M	X	X	Positivo (cuore)	Negativo
<i>Vanellus vanellus</i>	n.d	X	X	Positivo (cuore)	Negativo
<i>Vanellus vanellus</i>	n.d	X	X	Negativo	Positivo (cervello)

Tabella 4: Risultati ottenuti per la ricerca di *T.gondii* e *N.caninum* con PCR e IFAT.

CAPITOLO 5: DISCUSSIONE

Nel presente lavoro, è stata eseguita un'indagine finalizzata a valutare la presenza di *T.gondii* e *N.caninum* in alcuni uccelli viventi allo stato libero in Toscana, prevalentemente nelle provincie di Pisa e Livorno.

I risultati ottenuti ritengo siano stati soddisfacenti, considerando le poche ricerche e studi effettuati in Italia per valutare la presenza di questi parassiti.

T.gondii può infettare una grande varietà di animali omeoterme ed è stato segnalato come endemico in molti Paesi del mondo (Ajzenberg *et al.*, 2004; Dubey 2004), causa di gravi lesioni e malformazioni fetali (Tenter *et al.*, 2000). Conoscere la prevalenza di infezioni parassitarie delle specie selvatiche può essere di grande importanza, anche per le strategie di protezione ambientale (Artois, 1993).

La fauna selvatica difatti è un ottimo indicatore di rischio di trasmissione all'uomo e agli animali di interesse zootecnico (Gennari *et al* 2004).

N.caninum è un importante agente di aborto nella specie bovina e ovina con calo della produzione lattea nelle bovine infette che non hanno abortito (French *et al.*, 1999; Shaapan 2016).

Animali viventi allo stato libero, come uccelli e mammiferi selvatici possono essere utilizzati come sentinelle per *T.gondii* e *N.caninum* (Tenter *et al.*, 2000).

Per quanto riguarda il riscontro di *T. gondii* in specie aviarie, a parte le prime segnalazioni risalenti alla prima metà del secolo scorso, per le quali è impossibile risalire con certezza all'agente eziologico le segnalazioni di infezione da toxoplasma sono numerose.

Nel susseguirsi degli anni, l'infezione è stata segnalata in numerose specie aviarie, soprattutto quelle viventi nelle aree urbane come i piccioni, i passeri, i polli ruspani e varie specie di cornacchie (Du *et al* 2015; Abdoli *et al* 2015; Feng *et al* 2016; Salant *et al* 2015).

Gli uccelli migratori nel corso dei loro spostamenti possono più facilmente infettarsi ingerendo oocisti e/o diffondere l'infezione. I volatili carnivori, quali cornacchie, corvi, e rapaci, potrebbero rivestire un ruolo importante nell'epidemiologia del parassita, viste le loro abitudini alimentari, che prevedono la predazione, il cannibalismo, la necrofagia e il consumo di vegetali e artropodi. Tali specie possono essere coinvolte nel ciclo di questi protozoi e rappresentare una fonte di infezione per altri animali, e possono per questo essere considerati degli animali sentinella (Waap *et al.*, 2012).

Nelle cornacchie grigie sono riportate elevate prevalenze, in particolare nelle cornacchie grigie (*Corvus cornix*) in Spagna è segnalata un'elevata sieroprevalenza (80,53%), che ha suggerito, un importante ruolo di questa specie animale nell'epidemiologia del parassita (Molina-López *et al.*,2011).

In Israele le cornacchie (*Corvus cornix*,*Corvus monedula* e *Corvus splendens*) e i grifoni (*Gyps fulvus*) hanno presentato rispettivamente, valori di sieroprevalenza del 42,6% e del 39,6% (Salant *et al.*,2012).

Nella presente indagine solo una piccola percentuale di volatili era carnivora (su 18 esemplari carnivori, 3 sono risultati positivi all'IFAT e 2 alla nested-PCR, per un totale di 5 animali).

Per quanto riguarda i polli, sono riferite prevalenze in PCR del 16% in Cina (Feng *et al.*, 2016), e del 79% in Kenia (Mose *et al* 2016). Le sieroprevalenze riportate sono del 18.86% in Cina (Feng *et al.*, 2016) del 64% in Ghana, del 24,4% in Indonesia, del 12,5% in Italia, del 30% in Polonia e del 24,2% in Vietnam (Dubey *et al.*, 2008).

A proposito di animali viventi in aree urbane, in Cina, da uno studio condotto sul piccione risulta una prevalenza molecolare del 30% (Du *et al.*, 2015), dal Brasile invece uno studio sui passeri ha dato una prevalenza molecolare del 20%, dai cuori estratti e una prevalenza molecolare del 10%, dai cervelli estratti (Gondim *et al.*, 2010).

Uno studio condotto in Italia su Anseriformi, ha mostrato una sieroprevalenza dell'8,7 % (Mancianti *et al.*, 2012), la sieroprevalenza ottenuta risulta più bassa rispetto al nostro studio (negli Anseriformi da noi analizzati la siero prevalenza risulta del 13,8 %), ma va considerato anche il minor numero di animali analizzati, e per quanto riguarda la prevalenza molecolare, sono stati analizzati soltanto gli animali positivi all'esame sierologico e quindi non risulta ottimale fare un paragone.

I dati comunque sono congruenti con i risultati riportati in Cina su 11 specie diverse di uccelli acquatici migratori la cui prevalenza è stata del 7,2% (Zhang *et al.*, 2015) ed in Canada sulle anatre canadesi (*Branta canadensis*) pari al 7,10% (Verma *et al* 2016).

È presente però nel nostro studio una prima segnalazione di infezione nella pavoncella (*Vanellus vanellus*).

I risultati da noi conseguiti sono confrontati con quelli presenti in letteratura in Tabella 5. I dati confrontati riferiti al gabbiano ed agli anseriformi sono in accordo, ad eccezione di quanto riportato in *A. penelope* che ha presentato valori più bassi (8.7%) rispetto a quanto riferito da Murao *et al.*, 2008.

Specie	Stato	Numero di animali	Prevalenza	Animali positivi nostro studio	Prevalenza nostro studio
Anseriformes					
<i>Anas crecca</i>	Italia (Mancianti <i>et al</i> 2012)	41	7,30%	8/73	11,00%
<i>Anas penelope</i>	Giappone (Murao <i>et al</i> 2008)	16	18,75%	2/23	8,70%
<i>Anas platyrhynchos</i>	Repubblica ceca (Literàk <i>et al</i> 1992)	184	12%	3/28	10,80%
	Italia (Mancianti <i>et al</i> 2012)	17	11,8%		
Passeriformes					

<i>Sturnus vulgaris</i>	Repubblica ceca (Literàk et al 1992)	69	1,40%	1/2	
	Kazakistan (Pak 1976)	430	0,50%		
	U.S.A (Haslett and Schneider 1978)	563	4,80%		
<i>Columbiformes</i>					
<i>Columba palumbus</i>	Repubblica ceca (Literàk et al 1992)	12	8,30%	1/8	
<i>Falconiformes</i>					
<i>Falco tinnunculus</i>	Repubblica ceca (Literàk et al 1992)	1	100%	3/6	
<i>Galliformes</i>					
<i>Phasianus colchicus</i>	Repubblica ceca (Literàk et al 1992)	590	2,40%	1/3	
<i>Accipitridae</i>					
<i>Buteo buteo</i>	Kazakistan (Pak 1976)	12	8,30%	1/4	
	Repubblica ceca (Literàk et al 1992)	123	8,10%		
<i>Charadriiformes</i>					
<i>Vanellus vanellus</i>	Italia		n.d	1/2	
<i>Larus michahellis</i>	Repubblica ceca (Literàk et al 1992)	61	16,40%	4/18	22,22%
<i>Gallinago gallinago</i>	Italia (Mancianti et al 2012)	8	25%	1/6	

Tabella 5: Confronto delle prevalenze del nostro studio con altri studi (per campioni inferiori a 10 non è riportato il valore di prevalenza)

N. caninum condivide molte caratteristiche morfologiche e biologiche con *T. gondii* (Dubey *et al.*, 2002, 2007; Dubey and Schares, 2011). Prima del suo riconoscimento nei cani norvegesi nel 1984 (Bjerkas *et al.*, 1984) e la conseguente classificazione come specie distinta nel 1988 (Dubey *et al.*, 1988), molte infezioni da *N. caninum* sono state erroneamente diagnosticate come toxoplasmosi (Dubey *et al.*, 2002; Dubey and Schares, 2011).

A seguito di riscontri in merito alla correlazione tra presenza di uccelli negli allevamenti bovini e aumento della siero prevalenza e degli aborti, è stato ipotizzato il ruolo degli uccelli, nella trasmissione del parassita, sia come vettori meccanici che come ospiti intermedi (Bartels *et al.*, 1999; Ould-Amrouche *et al.*, 1999; Otranto *et al.*, 2003). Recentemente il pollo domestico (*Gallus domesticus*) è stato identificato come ospite intermedio del parassita (Costa *et al.*, 2008), più recentemente sono riportati anticorpi anti *N. caninum* e/o DNA, in passeri (*Passer domesticus*) (Gondim *et al.*, 2010), corvi imperiali (*Corvus corax*) e gazze (*Pica pica*) (Molina-Lopez *et al.*, 2012),.

Feng *et al.*, (2016) hanno riportato una sieroprevalenza del 23,14% nel pollo in Cina. Sempre in Cina nel piccione, la prevalenza molecolare è risultata del 30% (Duet *et al.*, 2015) e nel passero in Iran è stata riferita una prevalenza molecolare del 3,68% (Abdoli *et al.* 2015). Studi effettuati su alcune specie di cornacchie in Israele, evidenziano una sieroprevalenza del 16,4% (Salant *et al.*, 2015), mentre nella cornacchia grigia in Spagna, l'immunofluorescenza indiretta ha dato una sieroprevalenza del 35,8% (Molina-López *et al.* 2011) inoltre il DNA di *N. caninum* è stato riscontrato nel 6,1% di 33 gazze (*Pica pica*) e nel 5,9% di poiane (*Buteo buteo*) (Darwich *et al.*, 2011).

La sieroprevalenza nella tortora orecchiuta (*Zenaida auriculata*) è risultata del 31,72% mentre non è stato trovato il DNA in nessun campione (de Barros *et al.*, 2017).

Per quanto riguarda gli uccelli migratori, in Toscana è riportata una sieroprevalenza 34,3% (*Anas crecca*, *Anas platyrhynchos*, *Anas penelope*, *Anas acuta*) ed una presenza di DNA nel 28,6% dei soggetti esaminati (*Anas crecca*, *Anas platyrhynchos*, *Anas penelope*, *Anas acuta* e *Vanellus vanellus*) (Rocchigiani *et al.*, 2017), questo dato sembrerebbe suggerire un ruolo significativo di questi uccelli nel ciclo del parassita (Tabella 6). Nel presente studio la sieroprevalenza ottenuta dagli uccelli acquatici è stata del 6,7%, mentre la prevalenza molecolare è stata del 10,73%.

Dal momento che i dati inerenti la neosporosi nelle specie aviarie sono relativamente scarsi abbiamo ritenuto opportuno effettuare un'indagine volta a verificare la presenza del parassita in alcune specie selvatiche delle nostre zone.

I risultati ottenuti hanno permesso di individuare per la prima volta la presenza del parassita in *Columba palumbus*, in *Corvus frugilegus*, in *Gallinago gallinago* ed in *Larus michahellis*. Gli ultimi tre esemplari sono risultati anche sierologicamente positivi.

Gli studi sulla diffusione di *N.caninum* non sono molti, ma i risultati che si ricavano evidenziano che come per *T.gondii*, anche per *N.caninum* gli uccelli hanno un ruolo nell'epidemiologia del parassita, e sarebbe certamente interessante, effettuare altri studi di questo tipo in altre regioni di tutta Italia, soprattutto su volatili presenti in aree urbane e rurali, che vivono a stretto contatto con le persone e con gli ospiti definitivi.

Specie	Stato	Numero di animali positivi	Prevalenza	Numero animali positivi nostro studio	Prevalenza a nostro studio
Anseriformes					
<i>Anas acuta</i>	Italia (Rocchigiani et al 2017)	1/2		1/5	
<i>Anas crecca</i>	Italia (Rocchigiani et al 2017)	8/17	47,00%	14/73	19,17%
<i>Anas penelope</i>	Italia (Rocchigiani et al 2017)	3/4		6/23	27%
<i>Anas platyrhynchos</i>	Italia (Rocchigiani et al 2017)	4/8		6/28	21,42%
Passeriformes					
<i>Corvus frugilegus</i>	-	n.d	n.d	1/2	
Columbiformes					
<i>Columba palumbus</i>	-	n.d	n.d	1/8	
Accipitridae					
<i>Buteo buteo</i>	Spagna (Darwich et al 2012)	1/17	6%	2/4	
Charadriiformes					
<i>Vanellus vanellus</i>	Italia (Rocchigiani et al 2017)	1/2		1/2	

<i>Larus michahellis</i>	-	n.d	n.d	1/18	5,55%
<i>Gallinago gallinago</i>	-	n.d	n.d	1/6	16,60%

Tabella 6: Confronto delle prevalenze del nostro studio con altri studi (per campioni inferiori a 10 non è riportato il valore di prevalenza)

BIBLIOGRAFIA

- Adie J.R., 1908. «Note on a parasite in the sparrow.» *Indian Med. Gaz.* 43, 176–180.
- Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP.,2001. «*Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy.» *Expert Rev Mol Med.* 1:1-19.
- 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.
- Amir Abdoli, Mohsen Arbabi, Abdolhossein Dalimi, and Majid Pirestani.,2015. «Molecular detection of *Neospora caninum* in house sparrows (*Passer domesticus*) in Iran.» *Avian Pathology.* Vol.44, No.4,319-322.
- Anderson ML, Andianarivo AG, Conrad PA., 2000. «Neosporosis in cattle.» *Animali Reproduction Science* 60-61: 417-413.
- Aragão, H.B., 1911. «Observações sobre algumas hemogregarinas das aves. »*Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 3, 54–64.
- Artois M., 1993. «Epidemiology of contagious diseases, ecology of mammals, health, management and conservation biology: concluding remarks.,» *Rev Sci Tech* 12(1):203-34.
- Bartels, C.J., Wouda, W., Schukken, Y.H., 1999. «Risk factors for *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997).» *Theriogenology* 52, 247-257.
- Bhopale GM., 2003. «Pathogenesis of Toxoplasmosis.» *Comparative immunology,microbiology and infectius diseases* 2 (4):213-22.

Bjerkås I, Dubey JP., 1991. «Evidence that *Neospora caninum* is identical to the Toxoplasma-like parasite of Norwegian dogs.» *Acta Vet Scand* 32:407-410.

Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J.,1984. «Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs.» *Z Parasitenkd* 70(2):271-4.

Cancrini G.,1996. «Parassitologia medica illustrata.» 111-122. Editore Lombardo.

Carini, A., 1911. « Infection spontanée du pigeon et du chien due au *Toxoplasma cuniculi*. » Bull. Soc. Pathol. Exot.
4, 518–519.

Costa KS, Santos SL, Uzêda RS, Pinheiro AM, Almeida MA, Araújo FR, McAllister MM, Gondim LF.,2008. «Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*.» *Int J Parasitol* 38(2):157-9.

D.J.P..2009, Ferguson. «*Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore.» *Mem.Inst.Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 104: 133-48.

Dardè M.L., 2004. «Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*.» *Ann. Ist. Super. Sanità* 40: 57-63.

Darwich L, Cabezón O, Echeverria I, Pabón M, Marco I, Molina-López R, Alarcia-Alejos O, López-Gatius F, Lavín S, Almería S.,2011. «Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds.» *Vet Parasitol* 183(3-4):377-81.

de Barros LD, Taroda A, Martins TA, Miura AC, de Seixas M, Sammi AS, Sasse JP, Minutti AF, da Cunha IAL, Vidotto O, Garcia JL.,2017. «Survey of *Neospora caninum* in eared doves (*Zenaida auriculata*) in Southern Brazil.» *Acta Trop* 174:132-135.

Du L, Yang D, Zhai T, Gong P, Zhang X, Li J.,2015. «Detection of *Neospora caninum*-DNA in brain tissues from pigeons in Changchun, Jilin (China).» *Vet Parasitol* 214(1-2):171-3.

Dubey J.P., 1988. «Toxoplasmosis of animals and man.» *CRC Press, Boca Raton. FL:* 1-41.

Dubey J.P., 1998c. «*Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures.» *J. of Parasitol* 84, pp 862-65.

Dubey J.P., 2002 « A review of toxoplasmosis in wild birds» *Veterinary Parasitology* 106:121-153.

Dubey J.P., Lindsay D.S., Speer C.A., 1998. «structure of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites and Sporozoites and Biology and Development of tissue Cysts.» *Clinical Microbiology reviews.* 11: 267-299.

Dubey J.P., Miller N.L., Frenkel J.K., 1970. «The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces.» *J. Exp. Med.*, 1970: 132: 636-662.

Dubey J.P., 1996b. «Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats.» *Int Journal of Parasitol*, 82:957-961.

Dubey J.P., 1997. «Parasitic protozoa. In Kreir J.P.,» *Academy press New York* 101-237.

Dubey J.P., 1998b. «Advances in the life cycle of Toxoplasmosis.» *Int J Parasitol.* 2: 1019-24.

Dubey JP, Barr BC, Barta JR, Bjerkås I, Björkman C, Blagburn BL, Bowman DD, Buxton D, Ellis JT, Gottstein B, Hemphill A, Hill DE, Howe DK, Jenkins MC, Kobayashi Y, Koudela B, Marsh AE, Mattsson JG, McAllister MM, Modry D, Omata Y, Sibley LD, Speer CA, Trees AJ, Uggla A, e Williams DJ, Lindsay DS., 2002 Upton SJ. «Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia.» *Int J Parasitol* 32: 929-946.

Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A.,1988. «Newly recognized fatal protozoan disease of dogs.» *J Am Vet Med Assoc* 192: 1296-1285.

Dubey JP, Frenkel JK., 1976. «Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts.» *J Protozool* 23(4):537-46.

Dubey, J.P., Schares, G., 2011. «Neosporosis in animals-the last five years.» *Vet. Parasitol.* 180, 90-108.

Dubey JP, G. Schares, L.M Ortega-Mora., 2007. «Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*.» *Clin Microbiol Rev* 20(2):323-367.

Dubey JP, Huong LT, Lawson BW, Subekti DT, Tassi P, Cabaj W, Sundar N, Velmurugan GV, Kwok OC, Su C., 2008. «Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens in Ghana, Indonesia, Italy, Poland and Vietnam.» *J Parasitol* 94(1):68-71.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA.,1998. «Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts.» *Clinical microbiology reviews* 11(2):267-99.

Dubey JP, Lindsay DS., 1996. «A review of *Neospora caninum* and Neosporosis.» *Vet Parasitol* 67: 1-59.

Dubey JP. *Toxoplasmosis of animal and humans*. CRC Press Taylor & Francis Group, 2009.

Dubey JP., 1999. «Neosporosis in cattle: biology and economic impact.» *J Am Vet Med Assoc.* 214:1160-1163.

Dubey JP., 2003. «Review of *Neospora caninum* and Neosporosis in animals.» *Korea J Parasitol* 41 1-16.

Dubey JP., 2004. «Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis.» *Vet Parasitol* 126(1-2):57-72.

Feldman, H.A., Sabin, A.B., 1949. «Skin reactions to toxoplasmic antigen in people of different ages without known history of infection.» *Pediatrics* 4, 798–804.

Feng Y, Lu Y, Wang Y, Liu J, Zhang L, Yang Y.,2016. «*Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Free-Range Chickens in Henan Province of China.,2016.» *Biomed Res Int* 2016:8290536.

Ferguson DJ, Hutchison WM, Dunachie JF, Siim JC., 1974. «Ultra structural study of early stages of asexual multiplication and microgametogony of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat.» *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. SectionB:Microbiology and immunology* 82(2):167-81.

Ferguson DJ., 2009. «*Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore.» *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(2):133-48.

Filho PCGA, Oliveira JMB, Andrade MR, Silva JG, Kim PCP, Almeida JC, Porto WJN, Mota RA.,2017. «Incidence and vertical transmission rate of *Neospora caninum* in sheep.» *Comp. Immunol Microbiol Infect Dis* 52:19-22.

French NP, Clancy HC, Davison HC, Trees AJ.,1999. «Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control.» *Int.J for Parasitology* 29. 1671-1704.

Frenkel J.K., 2000. «Biology of *Toxoplasma gondii*. In Congenital toxoplasmosis scientific background, clinical management and control.» 9-25. Paris: In Ambroise-Thomas,Pierre, Petersen , Eds.

Gennari SM, Canòn-Franco WA, Yai LE, de Souza SL, Santos LC, Fariás NA, Ruas J, Rossi FW, Gomes AA.,2004. «Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies from wild canids from Brazil.» *Vet Parasitol.* 121(3-4):337-40.

Gennari SM, Niemeyer C, Soares HS, Musso CM, Siqueira GC, Catão-Dias JL, Dias RA, Dubey JP.,2016. «Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in seabirds from Abrolhos Arcipelago, Brazil.» *Vet Parasitol* 226:50-2.

Gondim LS, Abe-Sandes K, Uzêda RS, Silva MS, Santos SL, Mota RA, Viela SM, Gondim LF.,2010. «*Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil.» *Vet Parasitol* 168 (1-2):121-4.

Gondim LS, Abe-Sandes K, Uzêda RS, Silva MS, Santos SL, Mota RA, Vilela SM, Gondim LF.,2010. «*Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil.» *Vet Parasitol* 168(1-2):121-4.

Grigg M.E, Bonnefoy S.,Hehl A.B., Suzuky Y.,Boothroyd J.C., 2001. «Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries.» *Science* 294: 161-5.

Haslett, T.M., Schneider, W.J., 1978. «Occurrence and attempted transmission of *Toxoplasma gondii* in European starlings (*Sturnus vulgaris*). »*J. Wildl. Dis.* 14, 173–175.

Howe D.K., Sibley L.D.,1995. «*Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease .» *J.infect. Dis* 172: 1561-66.

J.P, Dubey. «Strategy to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animal and humans.» *Journal of vet.parasitology* 64:65-70.

Jones CD, Okhravi N, Adamson P,Tasker S and Lightman S. «Comparison of PCR Detection Methods for B1, P30, and 18s rDNA Genes of *T.gondii* in Aqueous Humor.» *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, March 2000: Vol 1, No3.

Ju-Chi Chen, Yu-Jen Tsai, Ying-Ling Wu.,2015. «Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild birds in Taiwan.» *Research in Veterinary Science* 102: 184-188.

Kafsack BF, PenaJD, Coppens I, Ravindran S, Boothroyd JC, Carruthers VB., 2009. «Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells.» *Science* 23;323 (5913):530-3.

Lappin MR, Gasper PW, Rose BJ, Powell CC.,1992. «Effect of primary phase feline immunodeficiency virus infection on cats with chronic toxoplasmosis.» *Vet immunology and immunopathology* 35(1-2):121-31.

Lappin MR, George JW, Pedersen NC, Barlough JE, Murphy CJ, Morse LS.,1996. «Primary and secondary *Toxoplasma gondii* infection in normal and feline immunodeficiency virus-infected cats.» *The Journal of Parasitology* 82(5):733-42.

Laveran, A., 1900. «Au sujet de l'hémtozoaire endoglobulaire de *Padda oryzivora*.» *Comp. Rend. Soc. Biol. Paris* 52, 19–20.

Lindsay D.S., Blagburn B.L., Dubey J.P.,2002. «Survival of non sporulated *Toxoplasma gondii* oocyst under refrigerator conditions.» *Vet Parasitol* 103: 309-13.

Lindsay D.S., Blagburn B.L.,1997. «Feline toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocyst.» *Parasitology* 19:448-61.

Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB., 1999. «Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*.» *Vet parasitol* 82: 327-333.

Lindsay DS, Lenz SD, Dykstra CC, Blagburn BL, Dubey JP.,1998. «Vaccination of mice with *Neospora caninum*: response to oral challenge with *Toxoplasma gondii* oocysts.» *J Parasitol.* 84: 311-315.

Literák, I., Hejlíček, K., Nezval, J., Folk, C., 1992.« Incidence of *Toxoplasma gondii* in populations of wild birds in the Czech Republic.» *Avian Pathol.* 21, 659–665.

Literák, I., Pinowski, J., Anger, M., Juřicová, Z., Kyu-Hwang, H., Romanowski, J., 1997.

«*Toxoplasma gondii* antibodies in house sparrows (*Passer domesticus*) and tree sparrows (*P. montanus*). » *Avian Pathol.* 26, 823–827.

Literák, I., Sedlák, K., Juřicová, Z., Pavlásek, I., 1999. «Experimental toxoplasmosis in house sparrows (*Passer domesticus*).» *Avian Pathol.* 28, 363–368.

Mancianti F, Nardoni S, Mugnaini L, Poli A.,2013 «*Toxoplasma gondii* in waterfowl: the first detection of this parasite in *Anas crecca* and *Anas clypeata* from Italy.» *J Parasitol* 99 (3): 561-3.

McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM.,1998. «Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*.» *Int J. Parasitol.* 28:1473-1478.

Molina-López R1, Cabezón O, Pabón M, Darwich L, Obón E, Lopez-Gatius F, Dubey JP, Almería S.,2012. «High seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in the Common raven (*Corvus corax*) in the Northeast of Spain.» *Research in veterinary science.* 93(1):300-2.

Mose JM, Kaqira KM, Karanja SM, Ngotho M, Kamau DM, Njuguna AN, Maina NW.,2016. «Detection of Natural *Toxoplasma gondii* infection in Chicken in Thika Region of Kenya Using Nested Polymerase Chain Reaction.» *Biomed Res* 2016:7589278.

Muller N, Zimmermann V, Hentrich B and Gottstein B., 1996. «Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* Infection by PCR and DNA Hybridization Immunoassay.» *Journal of Clinical Microbiology* 2850-2852.

Niederehe, H., 1964. «Toxoplasma-Infektion bei verwilderten Tauben. Tierärztl.» *Umschau.* 19, 256–257.

Nishi M, Hu K, Murray JM, Roos DS., 2008. «Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*.» *Journal of cell science* 1;121 (Pt9):1559-68.

Nóbrega, P., Reis, J., 1942. «Identidade dos toxoplasmos de aves e de mamíferos.» Arq. Insti. Biol. (São Paulo) 13, 21–28.

Otranto, D., Llazari, A., Testini, G., Traversa, D., Frangipane di Regalbono, A., Badan, M., et al., 2003. «Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy.» Vet. Parasitol. 118, 7-18.

Ould-Amrouche, A., Klein, F., Osdoit, C., Mohammed, H.O., Touratier, A., Sanaa, M., et al., 1999. «Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France.» Vet. Res. 30, 531-538.

Pak, S.M., 1976. «Toxoplasmosis of birds in Kazakhstan (in Russian). »Nauka Publishing, Alma-Ata, 115 pp.

Peters M, Lütkefels E, Heckerroth A.R, Schares G., 2001. «Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle.» *International Journal for Parasitology, volume 31 issue 10* 1144-1148.

Petersen E, Lebech M, Jensen L, Lind P, Rask M, Bagger P, Bjorkman C, Ugglå A., 1999. «*Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans.» *Emerging infection disease* 5:278-280.

Pfeiffer DU, Williamson NB, Thornton RN., 1997. «A simple spreadsheet simulation model of the economic effects of *Neospora caninum* abortions in dairy cattle in New Zealand.» *Epidémiologie et santé animale* 31-32.

Pietrobelli M., 2003. «Toxoplasmosi. In parassitologia urbana. Città, animali e salute pubblica. Di Puccini V.e Tarsitano E., ed. Il Sole 24 ore.» *Ed agricol srl* 49-57.

Reis, J., Nóbrega, P., 1936. «Toxoplasmoses. Tratado de doenças das aves, Proc.»Ed. Inst. Biológico (São Paulo),

pp. 302–306.

Rocchigiani G, Poli A, Nardoni S, Papini R, Mancianti F., 2017 «*Neospora caninum* in Wild Waterfowl: occurrence of Parasite DNA and Low Antibody Titers.» *J Parasitol* 103(1):142-145.

Salant H, Hamburger J, King R, Baneth G.,2012. «*Toxoplasma gondii* prevalence in Israeli crows and Griffon vultures.» *Vet Parasitol* 191(1-2):23-8.

Salant H, Mazuz ML, Savitsky I, Nasereddin A, Blinder E, Baneth G.,2015. «*Neospora caninum* in crows from Israel.» *Vet Parasitol* 212(3-4):375-8.

Shaapan R.M ., 2016. «The common zoonotic protozoal diseases causing abortion.» *J Parasit Dis.* 40(4): 1116-1129.

Shannon L. Donahoe, Scott A. Lindsay, Mark Krockenberger, David Phalen, Jan Šlapeta « A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. » *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 4 (2015) 216–238

Speer CA, Dubey JP,McAllister MM, Blixt JA.,1999. «Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*.» *Int J Parasitol* 29(10):1509-19.

Svobodova V, Knotek Z,Svoboda M.,1998. «Prevalence of IgG and IgM antibodies specific to *Toxoplasma gondii* in cats.» *Vet Parasitol* 80:173-76.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM., 2000. «*Toxoplasma gondii*: from animals to humans.» *Int J Parasitol* 30(12-13):1217-58.

Thilsted JP, Dubey JP., 1989. «Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle.» *J Vet Diag Invest* 1: 205-209.

Verma SK, Calero-Bernal R, Cerqueira-Cézar CK, Dudley M, Jianq T, Su C, Hill D, Dubey JP.,2016. «Toxoplasmosis in geese and detection of two new atypical *Toxoplasma gondii* strains from naturally infected Canada geese (*Branta canadensis*).» *Parasitol Res.* 115(5):1767-72.

Waap H, Cardoso R, Leitão A, Nunes T, Vilares A, Gargaté MJ, Meireles J, Cortes H, Ângelo H.,2012. «In vitro isolation and seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in stray cats and pigeons in Lisbon, Portugal.» *Vet Parasitol* 187(3-4):542-7.

Zhang FK, Wang HJ, Qin Sy, Wang ZD, Lou ZL, Zhu XQ, Liu Q.,2015. «Molecular detection and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in wild waterfowls in Jilin Province, Northeastern China.» *Parasitol Int* 64(6):576-8.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ricordare tutti coloro che mi hanno aiutato nella stesura , con suggerimenti ed osservazioni: a loro va la mia gratitudine.

Ringrazio innanzitutto la Professoressa Francesca Mancianti, per la pazienza di avermi guidato nella stesura della tesi, per la disponibilità e precisione dimostratemi durante tutto il periodo di stesura. Senza di lei questo lavoro non avrebbe preso vita.

Un grazie speciale va anche al dottor Guido Rocchigiani, il miglior correlatore che potessi desiderare, sempre paziente e disponibile e che mi ha permesso di imparare molte cose, tra le tante, la mitica PCR!

Vorrei anche ringraziare delle persone a me molto care, i miei amici, Mary che mi ha accompagnato in questo lungo, tortuoso, faticoso e stressante percorso universitario, a Serena e Claudio, compagni di avventure e a Sara, la mia carissima e speciale amica 5 luglio, che in quest'ultimo periodo mi ha aiutato a superare ansie e paure.....anche grazie ai suoi dolcetti favolosi!!

Un grazie speciale va ai genitori di Mirko, Ivano e Fiorella, che sono sempre stati gentili e mi hanno a modo loro supportato in questo ultimo percorso universitario, e non posso certo scordarmi della mitica 600 di Fiorella.

Un grazie immenso va a Mirko, che oltre ad essere per me un fidanzato, sei anche un amico speciale che mi sopporta (non so come fai!!!) e mi sostieni col tuo amore, la tua "simpaticità" e il tuo ottimismo.

Un grazie alla mia mamma che mi sopporta da 30 anni e che mi ha permesso di intraprendere questo lungo percorso universitario, ti voglio bene!!!

E ovviamente i miei pelosetti a cui dedico questa tesi, i miei 4 bassotti speciali, Leone, Zoe, Arturo e Zucchero, che mi hanno rallegrato le giornate e riempito il cuore di amore puro e incondizionato, siete indispensabili per la mia felicità, alla Polpetta, la piccola levriera rumena che non sta mai ferma un secondo e che piano piano ha raggiunto il mio cuore, come i mie 3 miciotti, Carota , Chimney e Pollo , i miei piccoli esserini speciali.