



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

**L' ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA:
principali risultati e loro trasferibilità operativa
Roma, 19 giugno**

“Caratterizzazione molecolare di
Toxoplasma gondii in Italia Centrale:
nuove acquisizioni relative al rischio da
consumo di carne cruda.”

Relatore: Dott. Pietro Calderini – Sezione di Rieti





Introduzione/1

- La toxoplasmosi è un'infezione zoonotica cosmopolita di animali a sangue caldo, uomo incluso. L'agente eziologico (*Toxoplasma gondii*) vive nei tessuti di prede erbivori e dei predatori carnivori ospiti intermedi, completa il suo ciclo vitale nell'ospite definitivo rappresentato da un felide nel quale si ha la riproduzione sessuale intestinale.
- Come ospite intermedio l'uomo può acquisire l'infezione o per ingestione accidentale di oocisti eliminate tramite feci di felini e presenti sul terreno, verdura, acqua o con l'ingestione di carni crude (prodotte da animali zootecnici) che contengono bradizoiti o per la trasmissione verticale da tachizoiti.
- Se una donna si infetta per la prima volta durante la gravidanza, *T. gondii* è trasmesso al feto in circa il 30% dei casi. Ciò può provocare aborto o anomalie al sistema nervoso centrale o corioretinite (Simanek AM, et al 2015).
- La carne cruda sembra essere una delle principali fonti di infezioni da *T. gondii* in Europa e, come riscontrato in uno studio europeo, il 30-63% delle infezioni nelle donne in gravidanza è stato attribuito alla carne mentre dal 6 al 17% sembrerebbero originare dalla contaminazione del terreno (Cook et al., 2000).



Introduzione/2

- Per ottenere un quadro più chiaro circa il ruolo della carne come fonte di infezione umana con *T. gondii* è importante avere una indicazione precisa sulla presenza di cisti tissutali infettive nelle specie animali allevate per la produzione di carne. Questo è generalmente studiato mediante dosaggi sierologici, la sieroprevalenza di infezione *T. gondii* nel bestiame allevato all'aperto (ad esempio, pecore e bovini) risulta generalmente più alta, mentre la sieroprevalenza in bestiame allevato al chiuso (ad esempio, i suini allevati al chiuso) è più bassa (Kijlstra e Jongert, 2008). Tuttavia l'individuazione di anticorpi anti *T. gondii* in animali non fornisce necessariamente una buona indicazione della presenza di cisti tissutali infettive e il rischio di infezione umana anche se, almeno in teoria, dovrebbe esserci una forte correlazione in quanto entrambi gli anticorpi e le cisti tissutali si presume persistano a lungo in ovini e suini (Dubey, 2009).
- Le metodiche biomolecolari dovrebbero essere considerate come metodiche di riferimento, nel caso della toxoplasmosi hanno però lo svantaggio di essere poco sensibili perché le cisti tissutali potrebbero essere rare, addirittura al di sotto di una cisti per 50 gr di tessuto, e quindi fornire esiti falsamente negativi. Per ovviare a questo problema si ricorre ad una metodica di immunocentratura delle cisti di *T. gondii* descritta da Opsteegh M et al, (2010) che sembrerebbe maggiormente sensibile rispetto a quello che si registra utilizzando topi da laboratorio.



Obiettivi/1

- La mancanza di dati sui genotipi di *T. gondii* che circolano in Italia centrale tra animali allevati ed esseri umani, sulla loro patogenicità e sulla persistenza di tachizoiti nel sangue periferico hanno stimolato il nostro interesse al fine di colmare alcune di queste lacune conoscitive relative al rischio da consumo di carne cruda.
- In questo studio sono stati presi in considerazione gli animali produttori di alimenti edibili, tutti ospiti intermedi della toxoplasmosi, e non sono stati presi in considerazione gatti e felidi ospiti definitivi del protozoo.
- Per la popolazione umana, al fine di valutare il rischio da consumo di carne cruda, sono stati presi in considerazione un gruppo di persone con infezione da HIV afferenti al Policlinico di Roma "Umberto I" e soggetti sani appaiati per sesso ed età.





Obiettivi/2

- Scopo della ricerca è stato quello di studiare presenza e prevalenza di *T. gondii* negli animali domestici allevati, in maniera non intensiva, per la produzione di carne in aree selezionate della Regione Lazio.
- Valutazione dell'importanza di ciascuna delle specie animali considerate come fonte di infezione per gli esseri umani, studio delle variazioni di geni target tra *T. gondii* isolati da animali domestici commestibili e gli esseri umani al fine di valutare il rischio di infezione ed identificazione dei genotipi circolanti nella Regione.
- L'eventuale identificazione dei ceppi potrà dare un contributo per chiarire il ruolo rivestito dal protozoo, in ordine a patogenicità e infettività per l'uomo, e quindi decidere ed eventualmente attivare strategie di controllo atte ad assicurare la sicurezza degli alimenti.





Materiali e metodi

- Sono stati analizzati i tessuti muscolari di 92 equidi regolarmente macellati nei mattatoi della Provincia di Rieti per la ricerca sierologica e biomolecolare.
- Sono stati inoltre analizzati 268 campioni di siero ovino, in un gregge con anamnesi di aborti da toxoplasma, per la ricerca degli anticorpi contro *T. gondii* con la metodica ELISA; dopo l'esecuzione dell'esame sierologico i coaguli residui sono stati subito congelati per la ricerca biomolecolare dei tachizoiti.
- Su 72 animali appartenenti a specie produttrici di carne, inviati per la determinazione della causa di morte, sono stati prelevati campioni di organi (encefalo, cuore e polmone) per la ricerca istologica di cisti di *T. gondii*.
- Per la popolazione umana sono stati considerati 97 pazienti con infezione da HIV, afferenti al Policlinico di Roma "Umberto I", e 98 soggetti sani appaiati per sesso ed età che hanno effettuato donazione volontaria di sangue nel periodo di osservazione. I due gruppi sono stati sottoposti ad indagini sierologiche e biomolecolari.



Risultati/1

- I risultati ottenuti per la ricerca degli anticorpi specifici di *T. gondii* con ELISA indiretto in estratti di carne da 92 cavalli, macellati in provincia di Rieti, sono riportati nella successiva tabella.

	n. campioni	prevalenza
Positivi	7	7,6%
Dubbi	3	3,2%
Negativi	82	89,1



Risultati/2

- Per quanto riguarda gli esiti ottenuti dai sieri di un gregge ovino, della quale sono stati analizzati 268 campioni, hanno dato gli esiti riportati nella successiva tabella.

	n. campioni	prevalenza
Positivi	51	19%
Dubbi	18	6,7%
Negativi	199	74,2%

I campioni esaminati sono stati prelevati da ovini adulti di razza meticcica allevati per la produzione del latte. Dei 268 campioni 266 erano di sesso femminile e 2 maschi. Dei 2 maschi sottoposti ad analisi uno è risultato dubbio.

- L'esame istologico ha dato esito negativo nei 3 organi considerati dei 72 soggetti analizzati.
- Tutti i campioni animali risultati positivi o dubbi alle indagini sierologiche sono stati amplificati mediante PCR convenzionale e Real-Time PCR e sono risultati negativi.



Risultati/3

Risultati popolazione umana

- I 97 pazienti con infezione da HIV hanno evidenziato: 63 (64,95%) pazienti con sierologia negativa, 2 (2,06%) pazienti con positività alla PCR; 32 (32,99%) pazienti con positività sierologica per le IgG di questi 1 (3,12%) risultava positivo anche alla PCR.

La sieroprevalenza per IgG anti-Toxoplasma è quindi del 32,99%.

- Le analisi su siero dei 98 soggetti sani hanno evidenziato: 79 (80,61%) soggetti con sierologia negativa e PCR negativa e assenza di storia clinica per infezione da toxoplasma; 19 soggetti con positività sierologica per le IgG e PCR negativa.

La sieroprevalenza per IgG anti-Toxoplasma è quindi del 19.39%





Impatto e trasferibilità operativa/1

- I risultati ottenuti con la presente ricerca consentono di migliorare la valutazione complessiva del rischio di toxoplasmosi per l'uomo associato al consumo di carne.
- Il mancato isolamento di *T. gondii* dalle matrici animali non ha permesso di definire quali sono gli animali, in relazione al genotipo isolato, a maggior rischio per l'uomo e quali genotipi di toxoplasma sono presenti nelle infezioni più virulente.
- Questo progetto, che ha visto la collaborazione di specialisti in parassitologia e in malattie infettive umane e animali, rappresenta un'occasione unica di trasferimento e di messa in comune di saperi e competenze che spesso restano specialisticamente ed esclusivamente riferiti ai soggetti che se ne occupano.





Impatto e trasferibilità operativa/2

- E' evidente, inoltre, la ricaduta pratica e formativa contenuta nell'azione di formazione/aggiornamento dei ricercatori che operano nel settore.
- La promozione dei risultati avverrà con il coinvolgimento dei destinatari diretti ed indiretti del presente progetto e tutti i dati ottenuti costituiranno materiale di divulgazione per la quale saranno utilizzati i canali di comunicazione scientifica.
- Le metodiche sierologiche e molecolari utilizzate in questo studio saranno divulgate a medici e veterinari attraverso l'organizzazione o la presentazione dei risultati ottenuti mediante corsi ECM.
- Infine le nuove conoscenze ottenute in materia di epidemiologia della toxoplasmosi, le sue vie di trasmissione agli esseri umani e gli aspetti delle interazioni ospite-parassita saranno discussi nel corso della didattica svolta presso il Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive dell'Università "La Sapienza" di Roma.



Conclusioni/1

- Gli studi, riportati in letteratura, sulla sieroprevalenza di *T. gondii* sono molto abbondanti ma è stato riscontrato che questi test mancano di sensibilità, specificità e accordo tra di loro, soprattutto mostrano scarsa correlazione con la presenza del DNA di *T. gondii* nella carne sollevando preoccupazioni circa l'affidabilità dei dati sulla sieroprevalenza di *T. gondii* nei cavalli estrapolata dalla letteratura. Questo problema era già stato sollevato da Dubey JP nel (1999), quando mise in evidenza una scarsa correlazione tra esiti degli esami sierologici e presenza di *T. gondii* nei muscoli di cavalli macellati.
- Complessivamente con gli esiti da noi ottenuti, tutti in linea con quanto riferito in letteratura, si conferma comunque il rischio di toxoplasmosi, in seguito a consumo di carne cruda o poco cotta, per il riscontro di positività sierologiche osservate sia dalla carne cruda di cavallo che dai sieri ovini con anamnesi di aborti da toxoplasmosi.



Conclusioni/2

- In considerazione della negatività riscontrata, per la presenza di DNA di *T. gondii*, in tutte le matrici animali considerate, già risultate positive alla prova sierologica, si conferma la necessità di ricorrere alla metodica descritta da Opsteegh M et al. (2010), la Magnetic-capture polymerase chain reaction (MC-PCR), ad oggi considerata la tecnica di riferimento per la corretta individuazione delle cisti di *T. gondii* nei tessuti.
- Il mancato riscontro di positività nelle matrici animali non ha permesso di eseguire un confronto con i genotipi circolanti nella popolazione umana e, parallelamente, fornire una nostra indicazione circa la correlazione fra le prove ELISA, su siero e succo di muscolo, le prove istologiche e le prove biomolecolari.

