

UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE “AMEDEO AVOGADRO”

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica - *Curriculum* Nutrizione e Ambiente



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA

ELABORATO FINALE

SIEROEPIDEMIOLOGIA DI TOXOCARIASI UMANA IN UNA POPOLAZIONE  
SELEZIONATA NEL PIEMONTE ORIENTALE

RELATORE

Prof.ssa Elisa Bona

CANDIDATO

Maria Chiara Bianchi  
Matricola N°20035160

CORRELATORE

Dott. Paolo Ravanini

Anno Accademico 2024/2025



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE “AMEDEO AVOGADRO”

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica  
*Curriculum* Nutrizione e Ambiente



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA

SIEROEPIDEMIOLOGIA DI TOXOCARIASI UMANA  
IN UNA POPOLAZIONE SELEZIONATA NEL PIEMONTE ORIENTALE

CANDIDATO: Maria Chiara Bianchi

RELATORE: Prof.ssa Elisa Bona



Firmato digitalmente da Elisa Bona  
Data: 05.03.2026 15:30:44 CET  
Organizzazione: UNIVERSITA' DEGLI  
STUDI DEL PIEMONTE  
ORIENTALE/01943490027

CORRELATORE: Dott. Paolo Ravanini

Stage svolto presso il “Laboratorio di Microbiologia e Virologia  
dell’Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità” di  
Novara

Anno Accademico 2024/2025



# INDICE

INTRODUZIONE.....	6
1. NEMATODI.....	6
1.1 CICLO VITALE e INFEZIONE.....	8
2. TOXOCARA CANIS e TOXOCARA CATI.....	12
2.1 CICLO BIOLOGICO e PATOGENESI.....	13
2.2 SINTOMATOLOGIA e MANIFESTAZIONI CLINICHE.....	15
2.3 PREVENZIONE.....	17
2.4 TRATTAMENTO.....	18
2.5 DIAGNOSTICA.....	19
2.6 EPIDEMIOLOGIA.....	20
3. STRONGYLOIDES STERCORALIS.....	23
3.1 CICLO BIOLOGICO e PATOGENESI.....	25
3.2 SINTOMATOLOGIA e MANIFESTAZIONI CLINICHE.....	27
3.3 PREVENZIONE.....	30
3.4 TRATTAMENTO.....	30
3.5 DIAGNOSTICA.....	31
3.6 EPIDEMIOLOGIA.....	33
SCOPO DEL PROGETTO.....	36
MATERIALI E METODI.....	37
4. CAMPIONAMENTO DEI PAZIENTI COINVOLTI NELLO STUDIO.....	37
4.1 ANALISI DI LABORATORIO.....	38
4.2 IMMUNOBLOTTING PER LA RICERCA DI ANTICORPI IgG ANTI- <i>TOXOCARA CANIS</i> .....	39
4.3 SAGGIO IMMUNOENZIMATICO ELISA INDIRETTO PER LA RICERCA DI ANTICORPI IgG ANTI- <i>STRONGYLOIDES STERCORALIS</i> .....	44
RISULTATI.....	51
5. INTRODUZIONE AI RISULTATI SPERIMENTALI.....	51
5.1 RISULTATI SPERIMENTALI.....	51
5.2 ANALISI STATISTICA.....	53
CONCLUSIONI.....	54
RINGRAZIAMENTI.....	57
BIBLIOGRAFIA.....	60



# INTRODUZIONE

## 1. NEMATODI

I Nematodi sono un vasto e diversificato gruppo, comunemente noti come vermi tondi o vermi cilindrici, e costituiscono un esteso e distinto *phylum* di invertebrati vermiformi.

Il nome scientifico Nematoda deriva dal greco antico, in relazione alla loro caratteristica morfologica, e definendoli come organismi dalla forma di filo:

- νήμα (*nema*): che significa "filo" o "filamento";
- εἶδος (*eidōs*): che significa "forma" o "somiglianza".

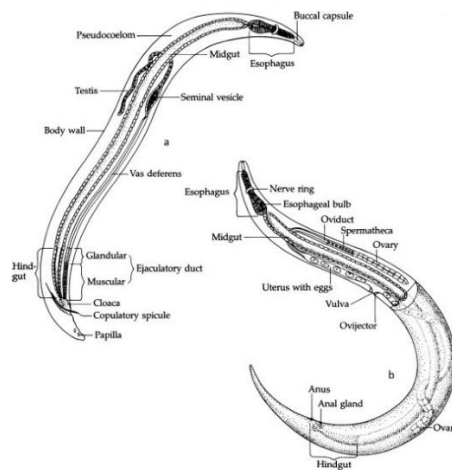


Figura 1. Morfologia generale del maschio (a) e della femmina (b) del *phylum* Nematoda – *Human Parasitology 4th Edition p.271*

Al *phylum* Nematoda appartengono oltre 20.000 specie, in grado di adottare forme a vita libera in ambienti terrestri o acquatici, oppure forme parassitarie in piante e animali.

Alcuni Nematodi sono responsabili di importanti parassitosi negli animali (strongilosi, ascaridiosi) e nell'uomo (trichinellosi, filariosi); rivestono un ruolo di fondamentale importanza nell'ambito della parassitologia veterinaria e umana, rappresentando i principali agenti di Zoonosi [1].

Hanno grande rilievo in medicina, in veterinaria e in agraria, per i danni che arrecano all'uomo, alle produzioni zootecniche e alle colture.

Nell'uomo tali parassiti possono infettare l'apparato intestinale, il fegato, i reni, gli occhi, il sistema circolatorio e i tessuti sottocutanei, provocando parassitosi diffuse prevalentemente nei paesi tropicali e subtropicali [2].

I Nematodi sono organismi caratterizzati da simmetria bilaterale e assenza di segmentazione metamerica, un corpo molto allungato, sottile e di sezione rotonda, possiedono una cavità corporea nota come pseudoceloma riempita di fluido, all'interno della quale risiedono gli organi interni e un rivestimento corporeo, il tegumento, costituito da una robusta e flessibile cuticola acellulare esterna e da un ipoderma o epidermide strettamente connesso a cellule muscolari longitudinali.

La lunghezza degli individui adulti è estremamente variabile, spaziando da pochi millimetri a diversi centimetri, con alcune specie che possono raggiungere lunghezze prossime al metro [3].

L'apparato digerente dei Nematodi è caratterizzato da una faringe muscolosa (esofago) che connette l'apertura boccale all'intestino. La funzione primaria di questa struttura è quella di generare una forza di aspirazione che permette il pompaggio dell'alimento direttamente nella cavità intestinale.

Nei Nematodi, i cicli di vita presentano delle fasi libere (non parassitarie) e delle fasi parassitarie, in cui l'esofago può mostrare un dimorfismo morfologico associato allo stadio di sviluppo:

- Stadio di Sviluppo Rabditoide: è caratteristico degli stadi larvali a vita libera (o pre-parassitari), in particolare le larve L1 e L2;
- Stadio di Sviluppo Strongiloide: è caratterizzato da una morfologia filiforme, tipico degli stadi larvali parassitari L3 e L4 [4].

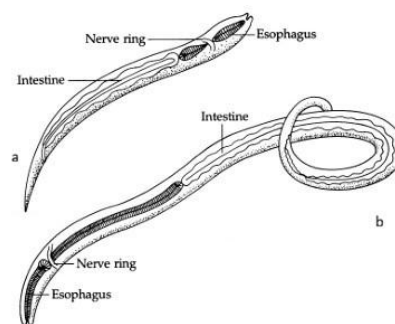


Figura 2. Differenze morfologiche tra Larva Rabditoide (a) e Larva Strongiloide (b) – Human Parasitology 4th Edition p.284

Il *phylum* Nematoda, che racchiude tutte le specie di vermi cilindrici, è tradizionalmente diviso in due classi principali, basate principalmente sulla

morfologia del sistema escretore, dell'esofago e sulla presenza/assenza di strutture sensoriali chiamate "Fasmidi":

- Classe *Enoplea* (o *Adenophorea*): sono caratterizzati dall'assenza di fasmidi e dalla presenza di un esofago generalmente di forma tubolare semplice (ordine Trichurida: *Trichuris*, *Trichinella*);
- Classe *Chromadorea* (o *Secernentea*): sono caratterizzati dalla presenza di Fasmidi (le strutture chemiorecettive nella coda) e da un esofago muscolare più complesso. La maggior parte dei Nematodi parassiti degli animali domestici e dell'uomo appartiene a questa classe (ordine Ascaridida: *Toxocara* e *Ascaris*, Strongylida: *Ancilostomi*, Oxyurida: *Enterobius*, Rhabditida: *Strongyloides*, Spirurida: Filarie) [5].

## 1.1 CICLO VITALE e INFEZIONE

I Nematodi sono vermi a sessi distinti (gonocorici) o ermafroditi (spesso proterandri: in cui i gameti maschili maturi sono emessi prima di quelli femminili), presentano gonade impari, simili nei due sessi in quanto a struttura, e talvolta aventi delle complesse specializzazioni finalizzate all'accoppiamento. Le femmine producono uova (ovipare) che presentano una segmentazione totale, oppure embrioni/larve che schiudono da uova maturate in uteri (ovovivipare).

Lo sviluppo è solitamente indiretto, comprendendo tre stadi larvali, l'ultimo dei quali, in presenza di parassitismo rappresenta la forma infestante [2].

Tutti i Nematodi condividono un modello di sviluppo post-embrionale basato sull'alternanza di stadi larvali e di mute. L'individuo che si sviluppa dall'uovo attraversa quattro stadi larvali consecutivi, designati come L1, L2, L3 e L4. Ogni stadio larvale è separato da una muta, definita Ecdisi, ovvero il processo che porta la vecchia cuticola ad essere sostituita per consentirne la crescita. Lo stadio L3 è quasi sempre lo stadio infestante per l'ospite definitivo (nel caso dei parassiti), poiché rappresenta la forma più resistente e migratoria.

L'organismo raggiunge la maturità sessuale nello stadio successivo, diventando adulto (a volte designato come L5).

I cicli vitali dei Nematodi parassiti sono estremamente vari, ma possono essere raggruppati in due modelli principali:

1. Ciclo Monoxeno (o diretto): in cui lo sviluppo si completa in un solo ospite (definitivo), ma è cruciale l'ambiente esterno per poter stimolare l'embriogenesi dell'uovo fino allo stadio infettante;
2. Ciclo Eteroxeno (o indiretto): dove richiede la presenza di uno o più ospiti intermedi (es. artropodi) o ospiti paratenici (di trasporto, come piccoli mammiferi) per completare il ciclo o raggiungere l'ospite definitivo [3].

L'uomo può essere l'ospite definitivo o accidentale di diversi Nematodi e l'infezione avviene attraverso specifiche vie di penetrazione, che dipendono dallo stadio infettante e dal tipo di ciclo vitale:

- Ingestione di uova embrionate (ciclo oro-fecale): è la via più comune, dove l'uomo ingerisce casualmente le uova infettanti contenenti la larva allo stadio L2 o L3 dall'ambiente esterno. Questo si verifica per la contaminazione di acqua, cibo o mani (ad es: *Ascaris lumbricoides*, *Toxocara canis* come ospite accidentale);
- Ingestione di larve nei tessuti: l'uomo ingerisce la carne cruda o poco cotta di un ospite intermedio o paratenico che contiene le larve infettanti, generalmente L3, incistate (ad es: *Trichinella spiralis* in carne di maiale o cinghiale);
- Penetrazione attiva della cute: le larve infettanti (spesso L3 filariformi) che si sono sviluppate nell'ambiente umido, penetrano attivamente la pelle intatta, in genere a livello dei piedi (ad es: *Ancylostoma duodenale* e *Strongyloides stercoralis*);
- Trasmissione vettoriale: attraverso la puntura di artropodi, le larve L3 vengono inoculate direttamente nel flusso sanguigno o nei tessuti sottocutanei dall'attività trofica di un insetto ematofago che funge da vettore (ad esempio: Filarie) [6].

Dopo l'infezione di un ospite, molte specie di Nematodi parassiti intraprendono delle migrazioni complesse attraverso i vari organi per raggiungere la loro localizzazione definitiva.

Tipicamente gli stadi di sviluppo dei Nematodi sono rappresentati dall'uovo, da 4 stadi larvali, da uno stadio "pre-adulto" o 5° stadio larvale e dall'adulto, quando viene raggiunta la maturità sessuale.

Lo sviluppo prevede 4 mute e, in ognuna di esse, il passaggio allo stadio successivo è accompagnato dalla formazione di nuovi strati cuticolari dell'ipoderma e simultaneamente la vecchia cuticola si separa per azione enzimatica e viene eliminata infine come "Exuvia" [1].

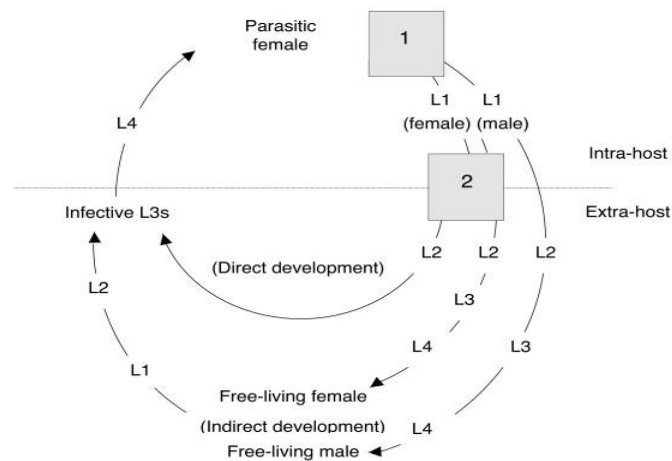


Figura 3\_Stadi di sviluppo larvale in forma libera e in forma parassitaria del phylum dei Nematodi

I Nematodi possono essere classificati anche in base al loro ambiente di riferimento, poiché è essenziale in epidemiologia parassitaria distinguere le differenze fondamentali dei cicli biologici, delle vie di trasmissione e della localizzazione finale:

- Nematodi definiti come Geelminti: è un raggruppamento a valenza esclusivamente epidemiologica e non tassonomica, utilizzato per identificare quei Nematodi parassiti dell'intestino le cui uova, una volta espulse dall'ospite, necessitano di un periodo di maturazione nel terreno prima di diventare infettanti per un nuovo ospite. Le uova embrionate emesse con le feci non sono immediatamente infestanti, ma è richiesto un periodo in un suolo caldo e umido per lo

sviluppo della larva all'interno dell'uovo. La trasmissione avviene per via oro-fecale indiretta, principalmente tramite l'ingestione di acqua o cibo contaminati dal terreno contenente le uova mature. Questi tipi di parassiti sono universalmente riconosciuti come malattie della povertà e del sottosviluppo, essendo prevalenti in aree caratterizzate da scarse condizioni igienico-sanitarie e dalla contaminazione fecale ambientale.

Le principali specie classificate come Geelminti includono: *Ascaris lumbricoides* (Ascaride o verme rotondo), *Trichuris trichiura* (Tricocefalo o verme a frusta), *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* (Anchilostomi o vermi ad uncino);

- Nematodi definiti come Tissutali: sono una categoria che raggruppa i Nematodi parassiti il cui habitat definitivo non è limitato al lume intestinale, ma coinvolge organi, tessuti, e vasi sanguigni dell'ospite. Le loro vie di infezione e i cicli biologici sono tipicamente più complessi e non richiedono necessariamente la fase di maturazione dell'uovo nel suolo.

I parassiti, o i loro stadi larvali, migrano e si localizzano in organi al di fuori del tratto gastrointestinale, come muscoli scheletrici, tessuti sottocutanei, sistema linfatico o circolatorio. Le vie di infezione nell'uomo (ospite definitivo o accidentale) per questo gruppo sono diversificate in: trasmissione vettoriale con inoculazione delle larve L3 da parte di un insetto ematofago (vettore) direttamente nel flusso sanguigno; oppure l'ingestione di carne cruda o poco cotta che causa migrazione larvale nei tessuti dell'ospite intermedio/paratenico, con successivo incistamento.

Le principali specie di Nematodi tissutali includono: *Trichinella spiralis*, Filarie, *Wuchereria bancrofti* e *Brugia malayi* (Elefantiasi tropicale) [4].

## 2. TOXOCARA CANIS e TOXOCARA CATI

Il genere *Toxocara* comprende Nematodi di rilevanza medica e veterinaria a livello globale, e sono noti per essere gli agenti eziologici di una delle più diffuse Zoonosi parassitarie: la Toxocariasi. Tali organismi appartengono al *phylum* Nematoda e sono comunemente classificati come segue:

- Phylum Nematoda
- Classe Chromadorea
- Ordine Ascaridida
- Superfamiglia Ascaridoidea
- Genere *Toxocara*
- Specie *Toxocara canis*

Le due specie di maggiore interesse per la salute pubblica sono *Toxocara canis* (parassita cosmopolita dei canidi, inclusi il cane domestico, il coyote, le volpi e i lupi) e *Toxocara cati* (parassita dei felidi) [7].

La Toxocariasi è classificata tra le Neglected Tropical Disease (NTD) con una distribuzione mondiale che incide significativamente su milioni di individui umani, animali domestici e randagi.

L'infezione nell'ospite umano è primariamente indotta dal contatto con le larve di *Toxocara canis* e *Toxocara cati*, Nematodi intestinali Ascaridi.

I vermi adulti di *Toxocara* vivono nell'intestino tenue degli ospiti definitivi selvatici o domestici. I principali veicoli di infezione per l'uomo includono i vegetali crudi non adeguatamente lavati, il suolo contaminato (frequente nelle aree comuni di giardini, sabbiere e parchi giochi), la carne cruda o poco cotta derivante da ospiti paratenici [8].

L'esposizione al genere *Toxocara* è una condizione frequente, e si manifesta con una particolare intensità nei soggetti pediatrici residenti nelle regioni tropicali/subtropicali del mondo, caratterizzate da un basso livello socioeconomico [9].

La Toxocariasi umana è associata a diverse sindromi cliniche, si osservano:

- Larva Migrans Viscerale (VLM)
- Larva Migrans Oculare (OLM)

- Neurotoxocariasi (NT)
- Toxocariasi Criptica o Comune (CT)

La Toxocariasi può inoltre agire come fattore precipitante per alcuni disturbi neurologici, per patologie cardiache e per disordini cutanei allergici e/o problematiche asmatiche [8].

## 2.1 CICLO BIOLOGICO e PATOGENESI

I vermi adulti di *Toxocara canis* vivono nell'intestino tenue del loro ospite, producendo un numero cospicuo di uova che verranno espulse con le feci, rimanendo infettive per molti mesi o persino per anni.

Le uova sono brunastre quasi sferiche, con fossette superficiali e anembrionate quando vengono deposte. Lo sviluppo delle larve infettive di terzo stadio L3, richiede dai cinque ai sei giorni in condizioni ottimali.

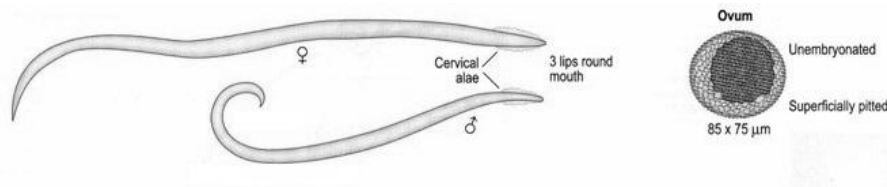


Figura 4\_ Dismorfismo sessuale e uova del genere *Toxocara* - Medical Helminthology

Se l'ospite fosse un cane adulto, le larve non completano la migrazione polmonare ma vagano attraverso il corpo, entrando infine in un arresto dello sviluppo per un lungo periodo, definito come "Ipobiosi".

Se un cane femmina rimanesse incinta, le larve quiescenti vengono apparentemente attivate dagli ormoni delle fasi avanzate della gravidanza, e ritornano nel sistema circolatorio della madre, dove vengono trasportate attraverso la placenta al feto (infezione transplacentare).

Qui, penetrano nel flusso sanguigno fetale, dove completano la migrazione polmonare per arrivare all'intestino. Perciò un cucciolo può nascere con un'infezione da *Toxocara canis*, anche se la madre non ha mostrato alcun segno di infezione certa. Il cucciolo può anche essere infettato per via transmammaria assumendo il latte materno.

Altra opzione nel ciclo vitale di *T. canis* si presenta quando le uova infettive vengono ingerite da ospiti paratenici inclusi roditori (topi e ratti), lagomorfi

(conigli), ruminanti (bovini), suidi (suini) o uccelli (polli), che subiscono un destino simile, in cui le larve infettive L3 migrano e divengono quiescenti arrestando il loro sviluppo in Ipobiosi. Se i tessuti infetti dalle larve L3 provenienti dagli ospiti paratenici sono fonti di cibo per l'uomo, allora la loro ingestione porterà all'infezione.

L'uomo può inoltre infettarsi ingerendo accidentalmente le uova contenenti le larve infettive di terzo stadio L3 attraverso l'acqua in zone contaminate [9]. Nell'intestino tenue umano le larve si schiudono, penetrano la parete intestinale e viaggiano attraverso il sistema circolatorio verso vari organi tra cui il fegato, i polmoni, il sistema nervoso centrale e/o la muscolatura. L'infezione tissutale evoca una risposta immunitaria infiammatoria del corpo che può portare ai sintomi della malattia, solitamente aspecifici come febbre, mal di testa, tosse persistente e dolori sistemici.

I roditori sono ospiti paratenici. Questa adattabilità di *Toxocara canis* favorisce la sua sopravvivenza, ma è un serio problema per gli ospiti accidentali, inclusi gli esseri umani [10].

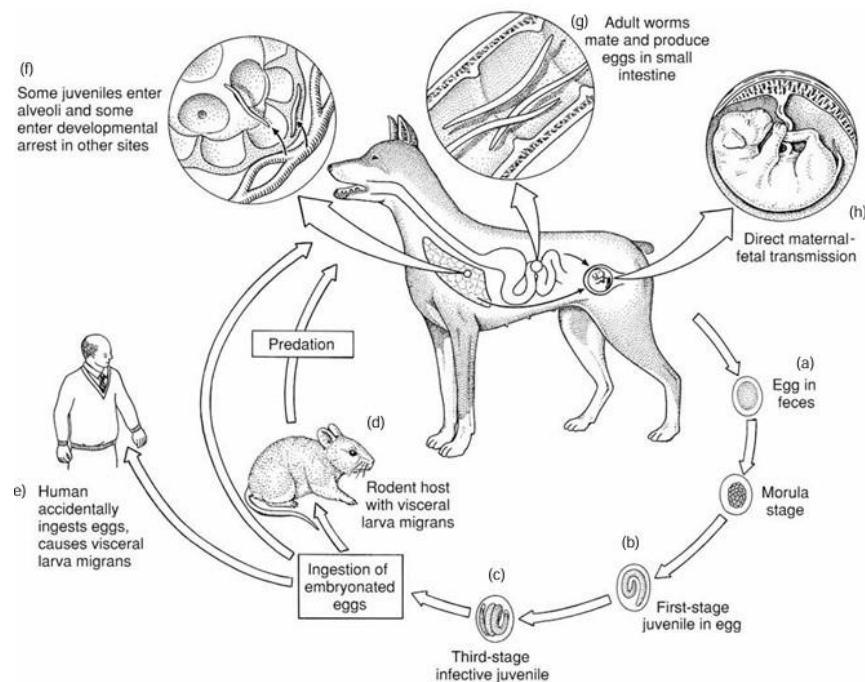


Figura 5\_Ciclo biologico di *Toxocara canis* - Parassitologia Uni Sassari

Tra i Nematodi dei felidi, *Toxocara cati* è l'Ascaride più comune del gatto domestico. È un parassita cosmopolita, con una prevalenza che varia a

seconda dell'area geografica e dello stile di vita dei gatti (più alta nei randagi e nei cuccioli). Le uova sono sferiche, brunastre e con superficie foveolata a fossette, molto simili a quelle di *T. canis* e anembrionate quando vengono espulse.

I gatti ingeriscono le uova embrionate infettive contenenti larve in stadio L3 dall'ambiente o attraverso l'ingestione di ospiti paratenici (roditori, uccelli ecc...). Questa modalità è la via di infezione più comune per i gatti adulti predatori. *Toxocara cati* è riconosciuto come agente eziologico della Larva Migrans Viscerale (VLM) e Oculare (OLM) negli esseri umani, proprio come *T. canis* [11].

## 2.2 SINTOMATOLOGIA e MANIFESTAZIONI CLINICHE

Le sindromi cliniche della Toxocariasi umana includono la Larva Migrans Viscerale, la Larva Migrans Oculare, la Neurotoxocariasi e la Toxocariasi Criptica o Comune.

Nonostante la significativa rilevanza clinica e di salute pubblica, in particolare nelle regioni tropicali e subtropicali del mondo e in comunità svantaggiate nelle zone a clima temperato, sussistono notevoli lacune di conoscenza nell'epidemiologia di questa malattia.

In alcune comunità, la prevalenza degli anticorpi sierici anti-*Toxocara* può rimanere elevata anche a fronte di un trattamento e ad una riduzione di canidi e di felidi per mitigare la contaminazione ambientale delle uova infettive.

Delle quattro forme cliniche principali di Toxocariasi, sebbene sia relativamente non comune, la Larva Migrans Viscerale (VLM) è la forma più avanzata della Toxocariasi umana; colpisce principalmente i bambini, spesso con storie di geofagia o di contatto con cani e suolo contaminato, ed è associata a sintomi come febbre persistente, respiro sibilante, stanchezza e perdita di appetito, mialgia e/o anomalie cutanee (ad esempio eczema, prurito, eruzioni cutanee e/o vasculite).

Inoltre, si sospettano anche effetti a lungo termine, come lo sviluppo dell'asma e la promozione della fibrosi polmonare.

Sono comuni l'eosinofilia e l'aumento dei livelli di IgE.

Le larve giovanili provocano una reazione di ipersensibilità ritardata negli ospiti paratenici; nelle sedi diverse dal cervello, vengono incapsulate da una reazione granulomatosa. L'estensione del danno è solitamente correlata al numero di larve presenti e alla loro sede finale [11].

Con la manifestazione clinica della Larva Migrans Oculare (OLM), può verificarsi una compromissione visiva uni-oculare, accompagnata da endoftalmite/retinite cronica e/o granulomi posteriori/periferici.

L'entità della compromissione della vista è legata alla migrazione delle larve vive o dalla loro morte localizzata a livello oculare con conseguente reattività immunitaria contro di esse e infiammazione cronica.

La cecità può derivare dal distacco retinico tradizionale, vitrite e/o edema maculare cistoide. Le lesioni da OLM consistono principalmente in reazioni infiammatorie granulomatose verso le larve, la vista può essere compromessa e persa. La Larva Migrans Oculare può essere spesso confusa con un retinoblastoma o un altro tumore intraoculare [12].

La Neurotoxocariasi (NT) è diagnosticata principalmente nelle persone di mezza età; i segni clinici sono correlati alla migrazione larvale nel sistema nervoso centrale e alla conseguente cerebrita, meningite, encefalite, vasculite cerebrale e/o mielite, includendo mal di testa e febbre.

La Toxocariasi Criptica (CT) rappresenta la Toxocariasi "comune" negli adulti e la Toxocariasi "criptica" nei bambini, ed è difficile da diagnosticare clinicamente a causa dei sintomi non specifici.

Negli adulti si possono osservare febbre alta, anoressia, respiro sibilante, nausea, dolore addominale, debolezza, prurito, eruzioni cutanee, disfunzione/insufficienza polmonare; mentre nei bambini si osservano sonnolenza, epatomegalia, sintomi polmonari e dolore agli arti [9].

## 2.3 PREVENZIONE

La diagnosi di infezione da *Toxocara canis* può non venire considerata in un contesto clinico patologico; i pazienti che presentano un'insufficienza polmonare, sintomi simili all'asma e/o deficit cognitivi spesso non vengono sottoposti a test per la possibilità di un'infezione parassitaria.

Poiché l'infezione umana è accidentale e legata dalla contaminazione ambientale, la prevenzione è l'arma più importante.

Attraverso un'igiene rigorosa come il lavaggio delle mani, specialmente per i più piccoli; la sverminazione dei cani con un protocollo regolare dei cuccioli a partire da poche settimane di vita e dei cani adulti per ridurre la dispersione di uova nell'ambiente; e la pulizia ambientale attraverso la rimozione delle feci dei cani dai parchi, dai giardini, dalle aree pubbliche. Sono azioni fondamentali per prevenire la Toxocariasi soprattutto nei Paesi endemici. I professionisti veterinari e medici hanno la responsabilità di educare i proprietari degli animali domestici canini e felini sull'importanza della Toxocariasi e su come ridurre al minimo i rischi di trasmissione zoonotica. La riduzione dell'infezione da *Toxocara* nelle popolazioni di ospiti definitivi deve essere una priorità per diminuire in modo significativo il numero di uova nei luoghi pubblici.

In contesti endemici, come le comunità tropicali svantaggiate con scarse condizioni igienico-sanitarie situate in aree con elevata densità di cani e di gatti randagi, l'intervento deve essere basato su una solida comprensione dell'epidemiologia della malattia, in particolare nei cittadini con maggior rischio di infezione, lo stato socioeconomico e il contesto rurale [9].

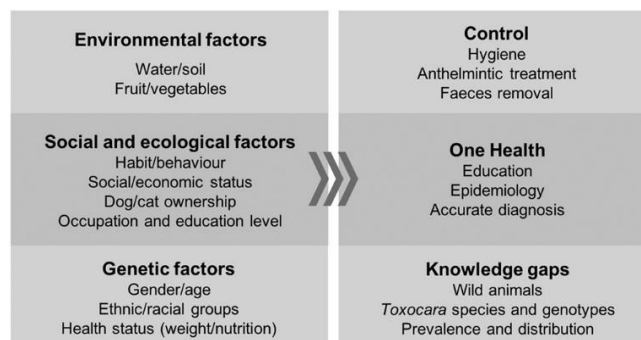


Figura 6\_Fattori di rischio epidemiologici della Toxocariasi Umana – Human Toxocariasis - a look at a neglected disease through an epidemiological 'prism' (2019) p.6

## 2.4 TRATTAMENTO

Il protocollo terapeutico per la Toxocariasi umana prevede l'utilizzo primario di farmaci antielmintici, utilizzati soprattutto nelle forme di VLM e OLM, quando la risposta infiammatoria dell'organismo reagisce ai movimenti delle larve. È fondamentale distinguere i diversi quadri clinici: i pazienti asintomatici e con sintomi lievi, generalmente non richiedono la terapia antielmintica poiché l'infezione è tipicamente autolimitante. In questi casi, gli antistaminici possono essere sufficienti per alleviare la sintomatologia come prurito e rash cutaneo.

Per i soggetti con manifestazioni da moderate a gravi, è indicato l'utilizzo di Albendazolo, Tiabendazolo e Mebendazolo. I Corticosteroidi sono prescritti in pazienti con sintomi gravi per esercitare un'azione antinfiammatoria sistemica alleviando le gravi risposte allergiche.

La gestione della Larva Migrans Oculare è particolarmente complessa e richiede l'intervento della competenza oftalmologica. In questo contesto, i Corticosteroidi somministrati per via topica o orale, sono essenziali per minimizzare la flogosi all'interno del bulbo oculare. Purtroppo, quasi la totalità dei pazienti affetti da OLM subisce deficit visivi; le opzioni terapeutiche invasive includono la fotocoagulazione laser per l'eliminazione delle larve retiniche e in specifiche situazioni, la criochirurgia o la vitrectomia chirurgica [12].

Il trattamento di cani e gatti è gestito tramite la somministrazione di una vasta gamma di antielmintici disponibili in commercio, tra cui Milbemicina, Nitroscanato, Piperazina e Pirantel; questi composti agiscono uccidendo o paralizzando le larve adulte. Per prevenire la trasmissione verticale madre-feto, le femmine gravide e/o in allattamento possono essere trattate con Fenbendazolo, Moxidectin e Avermectine. Per i cuccioli, il protocollo terapeutico raccomandato prevede il trattamento alle 2,4,6 e 8 settimane di età; successivamente la profilassi deve proseguire con trattamenti annuali, biennali o triennali, la cui frequenza deve essere modulata in base all'esposizione individuale dell'animale ai fattori di rischio [13].

## 2.5 DIAGNOSTICA

La diagnosi di infezione da *Toxocara canis* o della Toxocariosi umana si basa principalmente sull'analisi sierologica, talvolta integrata da tecniche di imaging per l'identificazione di granulomi contenenti le larve incapsulate nei tessuti.

I test ELISA "*Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*" utilizzano gli antigeni escretori/secretori TES di *Toxocara canis*, e sono ampiamente utilizzati negli studi di sieroprevalenza per valutare l'esposizione e l'infezione umana. Per mitigare il rischio di risultati falso-positivi dovuti a cross-reazioni con altri parassiti o background aspecifici, è preferibile validare i risultati mediante la tecnica Western Blot.

Le attuali metodologie sierologiche e immunologiche non permettono una distinzione inequivocabile tra un'infezione attiva e un'esposizione pregressa al parassita. Inoltre, tali tecniche non sono in grado di discriminare con chiarezza le infezioni sostenute da *T. canis* da quelle di *T. cati*, rendendo importante lo sviluppo di strumenti diagnostici ottimizzati specie-specifici.

La sensibilità e la specificità dei saggi sierodiagnostici dipendono da diversi parametri, come la natura degli antigeni impiegati (es. prodotti somatici larvali, antigeni TES nativi o ricombinanti, glicani o TES deglicosilati) e l'isotipo anticorpale rilevato, tra cui IgG totali, sottoclassi di IgG, o di IgM.

Per una valutazione aggiuntiva, possono essere misurati i livelli di avidità delle IgG anticorpali e l'aumento degli eosinofili che riflettono una risposta immunitaria dell'organismo contro il parassita, per poter distinguere una infezione in atto da una pregressa.

Si possono effettuare diagnosi per localizzazione: per la ricerca della Larva Migrans Oculare (OLM), ci si avvale della ricerca di anticorpi anti-*Toxocara* specifici nel siero e nell'umor vitreo, in quanto la presenza degli anticorpi e dei referti oftalmologici sono utili per differenziare la OLM dal retinoblastoma.

Per il sospetto di Neurotoxocariosi (NT), si rende necessaria la valutazione degli anticorpi specifici nel siero, e della ricerca di eosinofili nel liquido

cerebrospinale. Le tecniche per imaging forniscono un supporto diagnostico essenziale e possono essere impiegate la tomografia computerizzata (TC), la risonanza magnetica (MR) e l'ecografia a livello addominale e oculare per visualizzare le lesioni correlate alla patologia [9].

Per la diagnosi della Larva Migrans Viscerale (VLM) si raccomanda il test immunoenzimatico ELISA per rilevare gli anticorpi anti-*Toxocara*, l'utilizzo di TC e risonanza magnetica utili per mostrare lesioni ovali multiple sparse nel fegato (e in altri organi) e noduli subpleurici nel torace.

Inoltre, sono frequenti nel siero del paziente ipergammaglobulinemia, leucocitosi e marcata eosinofilia [12].

La diagnosi della Toxocariasi umana risulta particolarmente complessa, soprattutto in contesti geografici tropicali e subtropicali caratterizzati da un elevato poliparassitismo. L'iter diagnostico si basa sull'anamnesi del paziente e sui risultati dei test sierologici per la ricerca anticorpale.

La conferma dei campioni biologici dei pazienti viene eseguita tramite Western Blot con l'impiego degli antigeni TES nativi derivati dalle larve di *Toxocara canis* per aumentarne la specificità. La reattività a bande di basso peso molecolare, tipicamente in coppia a 24 e a 32 kDa, è considerata un marcatore specifico per l'infezione da *T. canis* [13].

## 2.6 EPIDEMIOLOGIA

La Toxocariasi umana rappresenta una delle infezioni neglette associate ad un basso livello socio-economico. A livello globale, si stima che circa 1,4 miliardi di persone siano state esposte o infette dalla specie *Toxocara canis*, con una sieroprevalenza che si aggira attorno al 19% della popolazione mondiale.

Si stima che la popolazione europea presenti un titolo anticorpale positivo per *Toxocara canis* in una percentuale che varia dal 3% all'8% attraverso l'ingestione accidentale di uova. In Italia la prevalenza di esposizione rientra in questo range, sebbene i dati di prevalenza su larga scala siano variabili in

base alla contaminazione ambientale, fattore chiave per la trasmissione [14].

La Toxocariasi, per quanto non classificata tra le malattie a notifica obbligatoria, rappresenta una problematica significativa di sanità pubblica a livello globale. *Toxocara canis*, è riconosciuto come il parassita ubiquitario caratterizzato dalla maggiore prevalenza zoonosica.

Indagini sierologiche hanno riportato che la popolazione pediatrica, a causa di comportamenti come la geofagia, presenta una maggiore probabilità di incorrere in infezioni da *Toxocara* con marcate differenze tra i Paesi industrializzati e quelli in via di sviluppo.

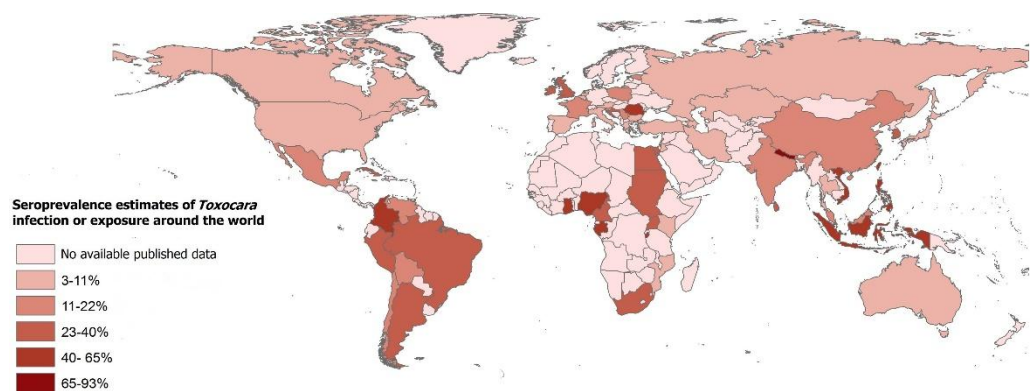


Figura 7\_ Sieroprevalenza stimata dell'infezione di *Toxocara canis* a livello mondiale – Human Toxocariasis - a look at a neglected disease through an epidemiological 'prism' (2019) p.5

Tra i Paesi industrializzati si riscontrano basse prevalenze, come in Nuova Zelanda 0,7%, in Giappone 1,6% e in Danimarca 2,4%, mentre prevalenze intermedie/alte si confrontano in Paesi come Australia 7,5%, USA 14% e Polonia 15%.

Per quanto riguarda i Paesi in via di sviluppo, le sieroprevalenze raggiungono valori notevolmente superiori, suggerendo una maggiore esposizione in Messico 12%, Cuba 38,8%, Ghana 53,5% e picchi estremamente elevati in Nepal 81% [15].

La sieroprevalenza media più elevata è stata riscontrata in Africa (media: 37,7%), mentre il tasso più basso è stato registrato nella regione del Mediterraneo Orientale (media: 8,2%).

Il quadro epidemiologico della Toxocariasi in Italia è stato delineato dagli studi condotti da Genchi et al. (1990); i quali hanno indagato la

sieroprevalenza del parassita in diverse coorti di popolazione del Nord Italia. Si mostrava che l'esposizione al parassita interessava circa il 4% della popolazione sana, evidenziando un tasso di sieroprevalenza anche in soggetti asintomatici [16].

Secondo lo studio di Beraldo et al. (2014), pubblicato vent'anni più tardi sulla contaminazione fecale urbana, l'8,7% dei soggetti sintomatici analizzati tra il 2009 e il 2012 ha mostrato titoli anticorpali significativi contro *Toxocara canis* [17].

Le analisi sierologiche ed epidemiologiche hanno evidenziato una correlazione significativa tra le sieroprevalenze di anticorpi anti-*Toxocara* nell'uomo e le variabili ambientali/socio-economiche.

In particolare è stata riscontrata una maggior prevalenza anticorpale in aree a basso Indice di Sviluppo Umano (ISU) caratterizzate da reddito limitato, bassa latitudine (regioni più vicine all'equatore), da elevata temperatura ambientale ricca di precipitazioni.

Sono stati inoltre identificati e validati diversi fattori di rischio epidemiologici che incrementano la suscettibilità all'infezione da *Toxocara canis*. Tali fattori includono la residenza in contesti rurali e/o con elevata contaminazione geo-ambientale, l'età pediatrica (infanzia), lo stretto contatto ed esposizione a ospiti definitivi (cani e gatti), l'ingestione di carne cruda o insufficientemente cotta e acqua potabile non depurata [9].

Nonostante il riconoscimento clinico delle sindromi correlate alla Toxocariasi umana, l'incidenza reale della patologia è ritenuta ampiamente sottostimata a livello globale soprattutto in contesti tropicali e subtropicali dove esistono ancora importanti lacune nella prevenzione. È necessario implementare strategie di controllo, di trattamento e di sorveglianza [10].

### 3. STRONGYLOIDES STERCORALIS

*Strongyloides stercoralis* è un nematode parassita che si trasmette attraverso il contatto con il suolo contaminato, la cui distribuzione è di tipo cosmopolita.

La ripartizione tassonomica si struttura con la seguente Sistematica:

- Phylum Nematoda
- Classe Chromadorea
- Ordine Rhabditida
- Superfamiglia Rhabdiasoidea
- Genere *Strongyloides*
- Specie *Strongyloides stercoralis* [18].

*Strongyloides stercoralis* è particolarmente noto per il suo ciclo vitale complesso che gli permette di passare da una fase di vita libera nel suolo a una fase parassitaria all'interno degli ospiti, risiedendo principalmente nell'intestino tenue umano. La sua distribuzione è prevalentemente limitata ad aree tropicali e subtropicali.

Numerosi casi clinici si presentano in forma asintomatica, e data la carenza di metodologie sensibili, l'infezione risulta frequentemente sottostimata e sottodiagnosticata [21].

La vera estensione epidemiologica rimane sconosciuta. Storicamente le stime indicavano che un'incidenza di infezione da *S. stercoralis* poteva raggiungere approssimativamente i 100 milioni di casi a livello mondiale, posizionando la Strongiloidiasi tra le infezioni parassitarie più diffuse.

Tuttavia, studi epidemiologici e stime attuali più accreditate pubblicate dall'OMS, indicano che a livello globale oltre 600 milioni di individui siano stati infettati da *Strongyloides stercoralis*. Questa cifra rappresenta circa l'8% della popolazione mondiale [22].

È considerata tra le Neglected Tropical Disease (NTD), come *Toxocara canis*, di significativa rilevanza clinica ed epidemiologica. La caratteristica distintiva di *Strongyloides* è la sua notevole plasticità del ciclo biologico.

La generazione a vita libera nel suolo è in grado di produrre una progenie di larve di terzo stadio L3 che permettono al parassita di perpetuarsi

attivamente attraverso cicli parassitari e riproduttivi liberi nell'ambiente esterno. Tale flessibilità contribuisce alla sua persistenza e alla sua ampia distribuzione geografica [20].

Le Elmintiasi Trasmesse dal Suolo (STH) rappresentano alcune delle infezioni parassitarie più diffuse a livello mondiale, con una stima complessiva di circa 1,5 miliardi di individui infettati, equivalenti al 24% della popolazione globale.

Le infezioni sono endemiche e colpiscono le comunità più povere e svantaggiate delle aree tropicali/subtropicali, dove l'accesso all'acqua potabile e ai servizi igienico-sanitari adeguati è gravemente carente. La trasmissione di queste parassitosi avviene attraverso le uova embrionate espulse con le feci umane, le quali contaminano il suolo [22].

L'endemicità della Strongiloidiasi è prevalente nelle regioni tropicali e subtropicali, ma si estende anche nelle aree rurali dei Paesi industrializzati. L'acquisizione dell'infezione avviene attraverso l'esposizione cutanea alle larve infettive in suoli contaminati da deiezioni.

La notevole capacità di *Strongyloides stercoralis* di compiere l'intero ciclo biologico sia a vita libera che all'interno dell'ospite umano è cruciale per poter evolvere allo stadio adulto, riprodursi attivamente e cronicizzare [23].

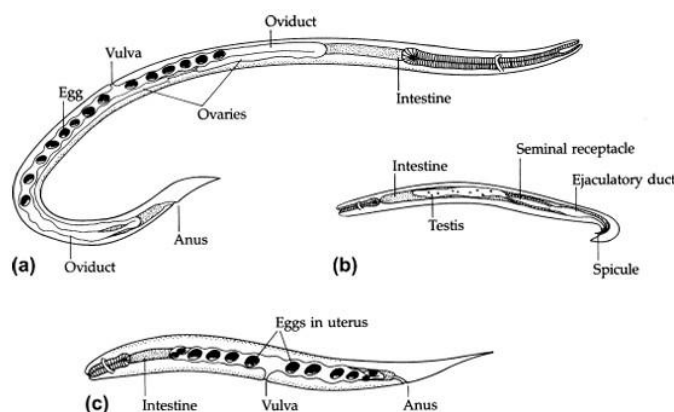


Figura 8\_Morfologia di *Strongyloides stercoralis*. Larva femminile filariforme parassitaria (a). Larva a vita libera maschile (b). Larva a vita libera femminile (c) - Human Parasitology 4th Edition (2013) p.302

### 3.1 CICLO BIOLOGICO e PATOGENESI

Il genere *Strongyloides* mostra una notevole plasticità nel suo ciclo biologico, presentando la capacità di alternare, o mantenere in modo facoltativo, sia cicli di vita omogonici definiti parassitari, sia cicli di vita eterogonici a generazione libera, che possono ripetersi per un periodo indefinito [24].

Il ciclo vitale di *Strongyloides stercoralis* è complesso e si articola in tre fasi distinte:

1. A vita libera
2. Parassitaria
3. Autoinfettiva

In condizioni ambientali favorevoli (con terreno umido e climi caldi) gli adulti a vita libera si accoppiano nel suolo; le uova dopo l'ovodeposizione si schiudono e rilasciano le larve rabditoidi di primo stadio che si nutrono attivamente. Le larve L1 subiscono quattro mute successive per potersi sviluppare in adulti sessualmente maturi. Il ciclo eterogonico procede per un periodo indefinito.

Tuttavia, se l'ambiente diventasse sfavorevole, le larve L1 subirebbero due mute per trasformarsi in larve di terzo stadio L3. Le larve L3 filariformi rappresentano la forma infettante per l'ospite umano.

La fase parassitaria inizia con l'infezione dell'ospite (umano o altro idoneo) dove le larve penetrano attivamente la cute intatta e vengono trasportate dal sistema emo-linfatico fino ai polmoni.

Nei polmoni le larve subiscono una terza muta, dopodiché fuoriescono dai capillari polmonari e penetrano negli alveoli. Dagli alveoli, migrano verso l'alto lungo l'albero respiratorio e attraverso l'atto del tossire e la conseguente deglutizione, raggiungono l'intestino tenue [25].

La forma parassitaria adulta risiede nella mucosa dell'intestino dell'ospite; in particolare il nematode femmina si annida e si sviluppa nello strato di enterociti localizzandosi nella regione del duodeno e del digiuno. Questa posizione intramucosa offre protezione e accesso diretto alle sostanze nutritive.

La riproduzione nella fase parassitaria è rigorosamente partenogenetica, un meccanismo asessuale che non richiede fecondazione.

Le uova deposte dalle femmine partenogenetiche all'interno della mucosa intestinale si schiudono rapidamente nello stadio di larva L1 rhabditoide; le larve emergono nel lume intestinale e migrano verso il colon, dove possono essere espulse attraverso le feci [20].

Le uova vengono raramente riscontrate nelle deiezioni; le larve espulse possono continuare il ciclo a vita libera nel suolo solo in condizioni favorevoli, oppure trasformarsi in larve filariformi infettive L3.

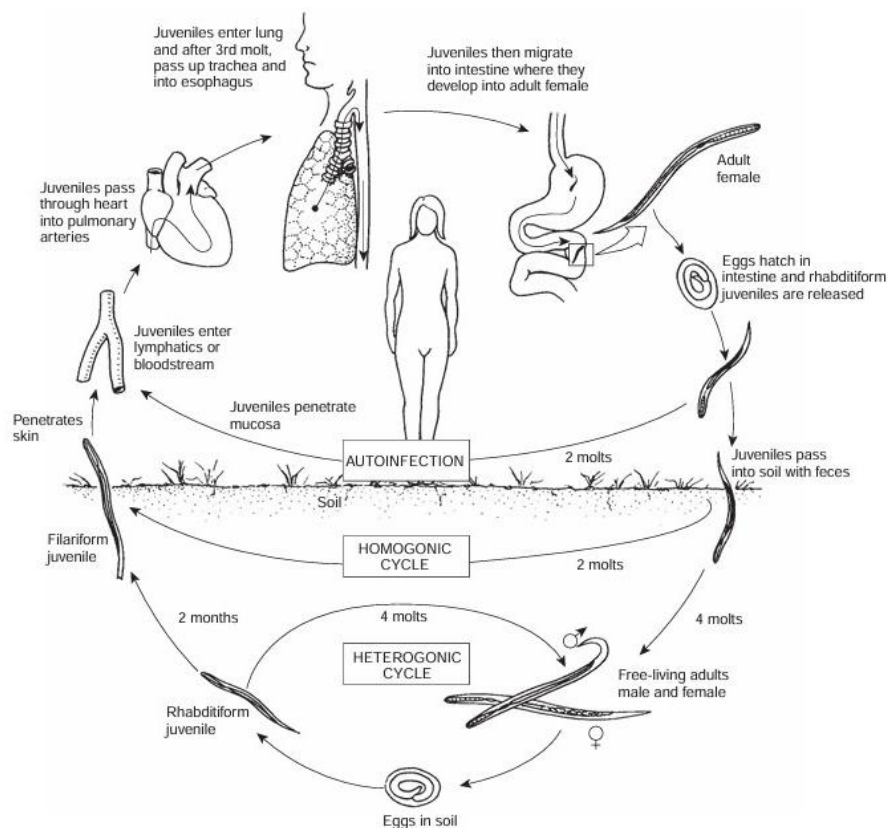


Figura 9\_Ciclo biologico di *Strongyloides stercoralis* - *Foundation of Parasitology 8th Edition (2009) p.416*

La fase autoinfettiva consente al parassita di mantenere l'infezione all'interno dell'ospite per periodi prolungati, portando potenzialmente all'iperinfezione. Questo percorso endogeno è definito come Autoinfezione, ed è il meccanismo principale per la persistenza infettiva e la cronicizzazione [25].

Se le larve giovanili L1 presenti nel lume intestinale completano due mute prima di essere espulse, acquisiscono la capacità di penetrare attivamente



Le manifestazioni specifiche sono correlate al percorso di migrazione larvale all'interno dell'organismo ospite e coinvolgono il derma, il parenchima polmonare e il tratto gastrointestinale [21].

I vermi adulti di sesso femminile risiedono nell'intestino, dove depongono le uova e rilasciano il primo stadio larvale L1 innescando un'inflammatione locale. La sintomatologia gastrointestinale, che insorge in circa due settimane, può comprendere diarrea, stipsi, anoressia, nausea, vomito, dolore addominale, febbre, anemia e malessere generale. La migrazione delle larve filariformi nel tratto polmonare provoca piccole ulcere emorragiche e l'infiltrazione delle cellule dell'immunità, manifestandosi clinicamente con tosse, dispnea e sibili respiratori [19].

L'ingresso delle larve avviene attraverso la cute con sintomi che comprendono prurito e irritazione, e tendono a comparire precocemente nel decorso della malattia [21].

La Strongiloidiasi acuta può esordire clinicamente con un'eruzione cutanea eritematosa localizzata nel sito di penetrazione delle larve. La successiva migrazione attraverso il parenchima polmonare può indurre lo sviluppo di tosse protratta.

La Strongiloidiasi cronica può persistere per anni, ed è un fenomeno attribuibile al processo di Autoinfezione; può essere asintomatica per oltre il 50% dei pazienti oppure può manifestarsi con sintomi gastrointestinali, polmonari e dermatologici.

I sintomi a carico del tratto gastrointestinale includono dolore addominale, diarrea intermittente e stipsi. Tali manifestazioni possono ricordare clinicamente una colite ulcerosa, un malassorbimento cronico o, in rari casi, un'ostruzione duodenale.

Segno raro ma patognomonico della Strongiloidiasi è la *Larva Currens*, definita come "dermatite serpiginosa".

Questa condizione cronica rappresenta una variante specifica di larva migrans ed è l'esito diretto del meccanismo di Autoinfezione caratteristico del parassita. È poco descritta a causa della sua comparsa imprevedibile e fugace. La sintomatologia della *Larva Currens* è accompagnata da prurito

intenso tipico nella regione perianale e si presenta come una lesione cutanea sinusoidale con proprietà eritematose e rapida migrazione.

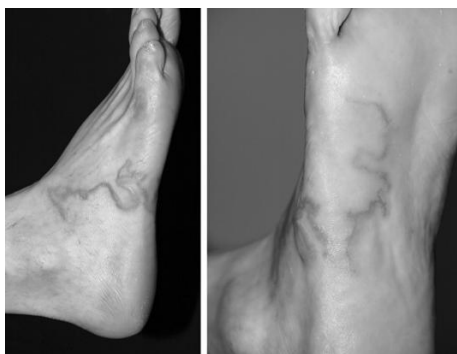


Figura 11\_Larva Currens - eruzione cutanea dovuta alla migrazione di *Strongyloides stercoralis* - Dermatology Image Library Online

Possono anche comparire eruzioni maculopapulose non specifiche o orticaria generalizzata. Le manifestazioni polmonari sono rare, tuttavia, le infestazioni massive possono causare tosse, respiro sibilante ed alta eosinofilia nel momento in cui le larve autoinfettanti attraversano i polmoni. L'eosinofilia è comune nei pazienti affetti da Strongiloidiasi e potrebbe conferire una certa protezione soprattutto nelle fasi iniziali dell'infezione. Tali sintomi possono simulare un'asma allergica o una broncopneumopatia ostruttiva.

La compromissione del sistema nervoso centrale è rara, ma potrebbe manifestarsi con meningite parassitaria, formazione di ascessi cerebrali e invasione diffusa del tessuto cerebrale [23].

*Strongyloides stercoralis* in situazioni di ridotta immunità dell'ospite, può scatenare la Sindrome da Iperinfezione e Disseminazione, la quale risulta fatale se non trattata tempestivamente e in modo appropriato [22].

L'Autoinfezione causa l'iperinfezione, determinando la moltiplicazione e la migrazione delle larve infettive nei pazienti immunocompromessi. Il segno distintivo è la rilevazione delle larve in regioni extraintestinali, in particolare nei polmoni e nell'espettorato.

La Sindrome da Iperinfezione include sintomi come enterite ulcerativa e sanguinamento, polmonite, emorragia polmonare e meningite che possono aggravare la complessità della patologia [19].

### 3.3 PREVENZIONE

Per la prevenzione dell'infezione da *Strongyloides stercoralis* sono di primaria importanza diverse strategie come lo smaltimento appropriato e sicuro delle deiezioni e l'utilizzo di protezioni individuali (copertura dei piedi per evitare il contatto cutaneo con il suolo contaminato) [28].

Attualmente non esiste una strategia a livello globale univoca mirata al contenimento dell'infezione da *Strongyloides* nelle regioni endemiche.

La prevenzione della Strongiloidiasi si concentra, in assenza di un programma internazionale, su diversi interventi come la riduzione dei fattori di rischio ambientali (miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie e gestione dei reflui urbani), l'educazione sanitaria nelle popolazioni a rischio e la programmazione di trattamenti antiparassitari di massa [21].

### 3.4 TRATTAMENTO

I farmaci anti-elmintici maggiormente impiegati nel trattamento della Strongiloidiasi umana includono i Benzimidazolici, come l'Albendazolo, il Tiabendazolo e l'Ivermectina.

Il farmaco attualmente raccomandato per la Strongiloidiasi è l'Ivermectina, un antiparassitario ad ampio spettro dotato di elevata potenza.

Il meccanismo d'azione del medicinale consiste nell'induzione di un flusso di ioni che attraversano la membrana del parassita; questa alterazione determina l'iperpolarizzazione delle cellule nervose e muscolari, con la conseguente paralisi irreversibile.

La somministrazione di Ivermectina per via orale è associata a tassi di guarigione superiori rispetto ad altri anti-elmintici [21]. Rappresenta un significativo miglioramento terapeutico, dimostrando minori effetti collaterali e una maggiore efficacia rispetto al Tiabendazolo nel trattamento della malattia.

L'Albendazolo, storicamente utilizzato nel trattamento delle parassitosi intestinali, è considerato una valida terapia alternativa. Per potenziare

l'efficacia dei programmi di somministrazione di massa dei farmaci mirati a *S. stercoralis* viene suggerita un tipo di terapia combinata che includa Albendazolo e Ivermectina.

Un ulteriore farmaco, la Moxidectina, appartenente alla stessa famiglia dell'Ivermectina, esplica il suo meccanismo d'azione legandosi ai canali GABA. Questa interazione induce un incremento della permeabilità ionica transmembrana, che si traduce in un'alterazione del potenziale d'azione portando alla paralisi muscolare dell'intero parassita [21].

Nei pazienti con compromissione del sistema immunitario o affetti dalla Sindrome da Iperinfezione, potrebbero essere necessarie dosi aggiuntive o combinazioni farmacologiche più aggressive. Nel caso della Strongiloidiasi Disseminata, la somministrazione di Ivermectina dovrebbe essere protratta fino a quando i campioni biologici risultano negativi per un periodo di tempo di almeno due settimane [19].

In pazienti con grave Iperinfezione, poiché non in grado di assumere antielmintici per via enterale, sono state impiegate formulazioni di Ivermectina sottocutanea o rettale [26].

### 3.5 DIAGNOSTICA

L'infezione da *Strongyloides stercoralis* dovrebbe essere presa in considerazione per ogni paziente che mostra disturbi gastrointestinali incerti senza cause apparenti, con o senza eosinofilia, a condizione che vi sia una storia clinica di esposizione (ad esempio viaggi in zone endemiche o provenienza da esse) [20]. I metodi più diffusi per diagnosticare l'infezione da *Strongyloides stercoralis* sono la sierologia e la ricerca delle larve nelle feci. L'identificazione delle larve del parassita nei campioni fecali è considerata il metodo diagnostico di riferimento. Per il rilevamento si impiegano diverse metodiche come l'esame microscopico diretto, le tecniche di concentrazione Baermann, i metodi colturali (carte da filtro di Harada-Mori e piastra agar di Koga), i test diagnostici specifici come il TF-Test e il Coproplus.

Un limite dell'esame microscopico diretto è la sua scarsa sensibilità, specialmente nelle infezioni a bassa carica parassitaria. La carenza diagnostica è probabilmente la causa di sottostima dell'infezione da *Strongyloides*.

Studi scientifici hanno dimostrato che le biopsie duodenali possono rilevare la presenza di uova, larve e vermi adulti del parassita. Tuttavia, questa procedura invasiva richiede tempo e viene generalmente consigliata solo a pazienti immunocompromessi o con infezioni gravi.

In pazienti affetti da Iperinfezione o Infezione Disseminata, l'identificazione delle larve di *Strongyloides* può essere incrementata cercandole nell'aspirato duodenale. Le larve di *S. stercoralis* possono essere ricercate anche in campioni respiratori, come espettorato, liquido di lavaggio broncoalveolare, lavaggi e spazzolamenti bronchiali e biopsie polmonari.

Per supportare la diagnosi vengono utilizzate tecniche di *imaging* come la radiografia del torace, la Tomografia Computerizzata (TC) e la Risonanza Magnetica (MR).

I saggi di immunoenzimatica rappresentano una metodica fondamentale per l'identificazione dell'infezione, tra questi il gold standard è l'analisi in immunofluorescenza indiretta [19].

In particolare, la sierologia basata sul test ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ha dimostrato un'elevata performance diagnostica con una sensibilità dell'85%, una specificità del 97% e un Valore Predittivo Negativo (VPN) del 100%. Le percentuali dimostrano che i metodi sierodiagnostici sono da considerarsi superiori ai test fecali, in quanto li rendono più affidabili per una stima epidemiologica all'interno di una popolazione esposta a maggior rischio d'infezione [21].

Nonostante l'efficacia di rilevazione degli anticorpi di classe IgG, il test ELISA è caratterizzato da una limitazione sull'interpretazione clinica: i saggi anticorpali non riescono a distinguere in modo affidabile un'infezione attiva/in corso da una risolta/pregressa. La persistenza degli anticorpi specifici rimane rilevabile per anni dopo che il paziente è stato trattato [19].

Per un approccio accurato si agisce in sinergia, attraverso l'esecuzione del test ELISA per anticorpi IgG e la conferma parassitologica mediante i metodi colturali (su piastra agar o metodo Baermann) per dimostrare la presenza delle larve vive. La combinazione è cruciale, sebbene l'immunoenzimatica indichi solamente l'esposizione pregressa al parassita.

### 3.6 EPIDEMIOLOGIA

L'infezione da *Strongyloides stercoralis* mostra un'elevata prevalenza nelle popolazioni provenienti da zone caratterizzate da elevata umidità, inadeguatezza delle risorse idriche, carenze negli standard igienico-sanitari e residenza in contesti rurali. La trasmissione di questo nematode è predominante nelle regioni tropicali e subtropicali, ma anche in Paesi a clima temperato.

La Strongiloidiasi non è circoscritta esclusivamente nei Paesi a medio/basso reddito, ma rappresenta una problematica sanitaria anche nelle Nazioni ad alto reddito [19]. La modalità di trasmissione principale di *Strongyloides* è rappresentata dal contatto cutaneo con il terreno infetto dalle larve. L'aumento del rischio di infezione è strettamente legato a tutte quelle pratiche che espongono maggiormente a un terreno potenzialmente contaminato, quali il camminare a piedi nudi, la vicinanza con liquami reflui, e le occupazioni lavorative che implicano un contatto diretto con il terreno (le attività agricole sono frequentemente correlate all'incidenza di questa parassitosi) [21].

Le percentuali di infezione più significative sono concentrate in due *hotspot* epidemiologici principali: l'America Meridionale, con il Brasile come nazione più colpita, e l'Asia Sud-Orientale in particolare in Paesi come la Thailandia e il Laos; queste aree geografiche fungono da serbatoi di infezione.

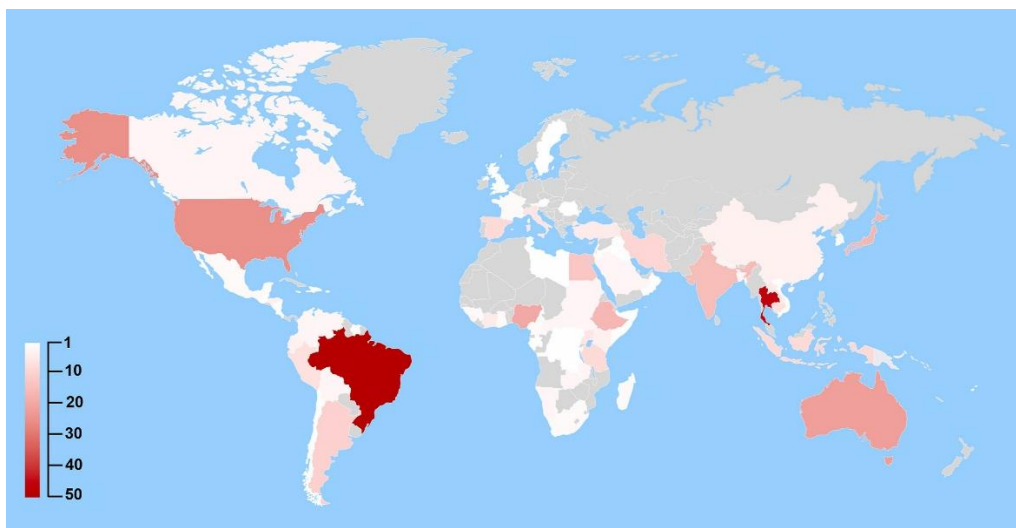


Figura 12\_Sieroprevalenza stimata dell'infezione da *Strongyloides stercoralis* a livello mondiale - Human *Strongyloides stercoralis* infection (2024) p.165

È fondamentale sottolineare che la distribuzione della Strongiloidiasi non si limita esclusivamente alle regioni tropicali e l'infezione mantiene una presenza significativa sia endemica che importata in diverse Nazioni ad alto reddito come gli Stati Uniti, l'Australia e in molti Paesi d'Europa [19].

Questo dato evidenzia come la Strongiloidiasi costituisca una patologia cosmopolita, con focolai spesso associati a fenomeni migratori.

Dall'analisi della distribuzione globale, definite secondo la suddivisione dell'OMS, emerge che tre specifiche macro-aree geografiche contribuiscono in maniera significativa alla determinazione del carico infettivo totale da *Strongyloides*.

In particolare, la Regione del Sud-Est Asiatico, la Regione Africana e la Regione delle Americhe sono responsabili di circa il 76% della popolazione mondiale infetta.

In termini di prevalenza regionale, le stime indicano valori del 12,1% nella Regione del Sud-Est Asiatico, del 10,3% nella Regione Africana e del 6,9% nella Regione delle Americhe [27].

Nonostante *Strongyloides stercoralis* sia considerato un parassita confinato nelle aree tropicali e subtropicali, l'Italia settentrionale storicamente ha rappresentato un focolaio endemico del continente europeo. Recenti indagini condotte tra il 2013 e il 2014 in tre regioni nel Nord Italia

(Lombardia, Veneto e Friuli-Venezia Giulia) hanno permesso di mappare la diffusione della Strongiloidiasi, rilevandone tassi di positività compresi tra l'8 e il 17% (Bisoffi Z. et al. 2016). Tale prevalenza è stata riscontrata in pazienti di nazionalità italiana nati nella valle del Po negli anni '40 del secolo scorso.

A livello geografico, i dati suggeriscono un legame epidemiologico con le zone rurali e le attività agricole che caratterizzavano la Pianura Padana nella prima metà del Novecento, dove il contatto con il suolo contaminato facilitava l'infezione.

Attualmente l'andamento risulta in calo, a dimostrazione del fatto che il progressivo miglioramento degli standard igienico-sanitari stia agendo come condizione sfavorevole alla trasmissione del parassita [29].

## SCOPO DEL PROGETTO

Lo scopo principale del progetto di tesi è stimare la sieroprevalenza di anticorpi di classe IgG diretti contro i nematodi zoonosici *Toxocara canis* e *Strongyloides stercoralis* all'interno di una popolazione selezionata nel territorio del Piemonte Orientale.

La ricerca si focalizza su un gruppo di soggetti definiti in base a criteri di specifica vulnerabilità e suscettibilità con l'obiettivo di rivalutare l'incidenza e l'epidemiologia delle due parassitosi in contesti non tropicali.

Il monitoraggio sierologico è stato effettuato determinando la frequenza di esposizione ai parassiti attraverso l'impiego di due tecniche diagnostiche specifiche. In particolare, per *Strongyloides stercoralis* è stata adottata la metodica immunoenzimatica ELISA ad alta sensibilità per la rilevazione delle IgG specifiche.

Per *Toxocara canis* è stata impiegata la tecnica dell'Immunoblotting (Western Blot), considerata il gold standard per la ricerca degli anticorpi anti-*Toxocara* poiché permette di identificare le bande caratteristiche.

Parallelamente, l'indagine si è focalizzata sull'analisi dei fattori di rischio professionali e comportamentali, indagando la correlazione tra la positività sierologica e le variabili epidemiologiche, quali il contatto prolungato con il suolo, il possesso di animali domestici o da allevamento e la provenienza da aree endemiche.

La particolare attenzione è stata rivolta ai lavoratori agricoli, in quanto questa categoria viene considerata ad alto rischio a causa della potenziale esposizione a feci di animali e al suolo contaminato.

L'attività di ricerca ha previsto un confronto statistico tra il gruppo dei soggetti vulnerabili e il gruppo di controllo, caratterizzato da differente probabilità d'infezione, al fine di determinare se l'attività professionale e/o il contesto abitativo rappresentino fattori di rischio significativi.

In conclusione, lo studio intende fornire un quadro epidemiologico aggiornato circa la circolazione delle due infezioni parassitarie neglette nel territorio del Piemonte Orientale.

## MATERIALI E METODI

### 4. CAMPIONAMENTO DEI PAZIENTI COINVOLTI NELLO STUDIO

L'individuazione dei soggetti e il loro relativo campionamento sono stati selezionati da uno studio precedente, che prendeva in esame un'indagine epidemiologica degli *Hantavirus* eseguita sul territorio piemontese.

La gestione dei campioni biologici è stata condotta in conformità con le normative di privacy e protezione dei dati personali. Ogni partecipante ha fornito il proprio consenso informato, assicurando il trattamento in forma anonima con l'assegnazione di codici alfanumerici per ogni campione.

Il progetto è stato approvato sotto il CUP F43C22000330001. È stato inoltre approvato dal Comitato Etico dell'Istituto Spallanzani ed in seguito anche dal nostro comitato etico sovrazonale di Novara (9-2023 17/07/2023) ed è stato svolto in stretta conformità con la dichiarazione di Helsinki.

Per questo studio sono stati selezionati 66 soggetti, di cui 44 maschi e 22 femmine, con un'età media di 47,7 anni (da un minimo di 22 ad un massimo di 87 anni), residenti tra le province di Novara, Biella, Vercelli, Pavia e Torino. La selezione si è concentrata in particolare nelle zone in cui la risicoltura rappresenta la principale attività agricola. I campioni sono stati suddivisi in modo paritario: 33 nel gruppo sperimentale e 33 nel gruppo di controllo. L'analisi dei gruppi ha considerato le variabili di età e sesso.

La popolazione è stata suddivisa in due gruppi distinti sulla base dell'attività lavorativa e della potenziale esposizione all'ambiente rurale.

Il gruppo sperimentale comprende soggetti appartenenti alla classe degli agricoltori e allevatori, identificati come categoria ad alto rischio a causa del contatto frequente con il suolo. Per comparazione, è stato selezionato il gruppo di controllo costituito da individui il cui lavoro non prevede il contatto con l'ambiente agricolo e zootecnico. Per ogni soggetto è stato prelevato un campione di sangue venoso in provette da 9 ml. I campioni sono stati sottoposti a centrifugazione e il siero ottenuto è stato aliquotato e conservato a -20°C fino al momento dei test di laboratorio. La raccolta è stata eseguita nel periodo tra luglio 2023 ed aprile 2025.

#### 4.1 ANALISI DI LABORATORIO

In questa sezione le due procedure immunologiche descritte, sono state utilizzate per l'identificazione degli anticorpi specifici verso i parassiti, oggetto di studio. La diagnosi sierologica è stata condotta impiegando metodiche ad elevata sensibilità e specificità, mirate alla rilevazione della risposta immunitaria dei campioni selezionati nei confronti di *Toxocara canis* e *Strongyloides stercoralis*. La valutazione della reattività anticorpale è stata effettuata mediante la ricerca di anticorpi specifici di classe IgG.

Per il dosaggio immunoenzimatico di anticorpi IgG anti-*Toxocara canis* è stato impiegato il test qualitativo della Western Blot (WB) con tecnica Immunoblot. Parallelamente, per la determinazione delle IgG specifiche verso *Strongyloides stercoralis* sono stati eseguiti i Saggi Immunoenzimatici Indiretti ELISA. Le analisi sono state condotte presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità di Novara.

## 4.2 IMMUNOBLOTTING PER LA RICERCA DI ANTICORPI IgG ANTI-*TOXOCARA CANIS*

Il kit "TOXOCARA Western Blot IgG" è un test qualitativo per la diagnosi delle IgG sieriche (attraverso l'analisi in Immunoblot) prodotto dalla casa farmaceutica LDBIO Diagnostics (Lione, Francia).

L'azienda specializzata nei test di conferma in parassitologia e in micologia, utilizza la tecnica della Western Blot (Immunoblot) con un approccio basato su strisce di nitrocellulosa pre-sensibilizzate pronte all'uso. Secondo i protocolli, il test della LDBIO si differenzia dai metodi classici per l'ottimizzazione della diagnostica clinica di laboratorio.

I kit forniscono strisce numerate e munite degli antigeni specifici di *Toxocara canis* separati per peso molecolare.

Ogni striscia rappresenta un test monouso per un singolo campione biologico. Il kit utilizzato comprende 24 test *in vitro*. Ai fini della valutazione diagnostica, la procedura è stata condotta in modalità semiautomatica.

### PRINCIPIO DEL TEST

La metodica prevede l'utilizzo delle strisce di nitrocellulosa pronte all'uso su cui sono stati immobilizzati gli antigeni escreti/secreti (ES) di *Toxocara canis*, e dei campioni di siero dei soggetti selezionati per lo studio.

L'isolamento degli antigeni ES del parassita è stato condotto con la tecnica dell'Elettroforesi, in particolare l'Elettroblot (LDBIO Diagnostics) e trasferiti sulla membrana di nitrocellulosa.

Successivamente è stata suddivisa in 24 strisce numerate dall'1 al 24.

Il protocollo prevede l'incubazione di ogni campione di siero con la propria striscia di nitrocellulosa favorendo la formazione degli immunocomplessi selettivi. L'eventuale presenza di IgG specifiche anti-*Toxocara canis* nel siero del campione porta alla formazione del complesso antigene-anticorpo.

Le IgG legate con gli antigeni ES vengono rivelate mediante l'aggiunta di un anticorpo secondario, costituito da anticorpi anti-IgG umane coniugate all'enzima fosfatasi alcalina. La reazione enzimatica avviene attraverso l'aggiunta del substrato che permette di evidenziare il legame specifico con

la comparsa di bande trasversali violacee. La presenza simultanea di due bande trasversali tra i 24 e i 35 kDa è indicativa della presenza di anticorpi specifici anti-*Toxocara*.



Figura 13\_Kit TOXOCARA WB IgG: metodica, card con 24 strisce pronte all'uso, reagenti e controllo positivo – LDBIO Diagnostics – Sezione Immunoblot – TOXOCARA WESTERN BLOT IgG

## STRUMENTO UTILIZZATO PER LA DIAGNOSTICA

Lo strumento utilizzato per condurre la valutazione diagnostica di *Toxocara canis*, in modalità semiautomatica, è il Dynablot Plus (Neuried, Germania) della Mikrogen Diagnostik, sviluppato da Dynex.

Progettato per l'elaborazione di test su striscia, come gli Immunoblot e i Western Blot, permette di automatizzare le fasi di incubazione e lavaggio, riducendo l'intervento manuale e aumentando la precisione dei risultati.

La sua funzionalità principale è l'automazione "Walk-Away" dove, una volta caricati i campioni e i reagenti sullo strumento, si avvierà il protocollo automatico. L'erogazione avviene tramite 7 capillari di precisione che assicurano un'alta riproducibilità, limitando l'errore sistematico per valori inferiori al 10% e il rischio di contaminazione.

Ha una capacità di elaborazione fino a 44 strisce contemporaneamente per singolo ciclo. La stazione di lavoro è composta da una piattaforma basculante definita *rocking shaker* [31].



Figura 14\_ Dynablot Plus strumento utilizzato per la diagnostica in Immunoblot con modalità semiautomatica – Product & Automation - MIKROGEN Diagnostik

## ESECUZIONE DEL TEST

L'iter analitico della Western Blot per la rilevazione degli anticorpi IgG specifici anti-*Toxocara canis*, è stato condotto attraverso i seguenti passaggi:

- I. Tutti i componenti del kit "TOXOCARA Western Blot IgG" sono stati portati a temperatura ambiente, successivamente la Soluzione di Lavaggio Concentrata è stata diluita 1/10 con acqua distillata.
- II. Le strisce pronte all'uso sono state rimosse dal supporto cardato, tagliandole in modo preciso e prelevate con pinzette sterili. Le pinzette tengono ben salde le strisce dal lato numerato, in modo tale da evitare il danneggiamento della membrana di nitrocellulosa dove sono adesi gli antigeni del parassita.
- III. Si posiziona il vassoio di incubazione sulla piattaforma oscillante dello strumento Dynablot Plus (Mikrogen Diagnostik). Si distribuisce 1 mL di Buffer di Diluizione Sieri in ciascun canale. Le strisce si dispongono sul vassoio di incubazione, una per ogni pozzetto, posizionandole con un orientamento tale da avere il numero visibile in alto. Successivamente si indica al macchinario un'agitazione delicata del vassoio di circa 2 minuti per far reidrattare e immergere le strisce completamente nel Buffer.
- IV. I campioni e il controllo positivo si pipettano nei rispettivi pozzetti dove sono presenti le strisce, con un volume di 10  $\mu$ L.

- V. Si avvia lo strumento Dynablot Plus, seguendo le indicazioni sul display. Si posiziona ogni capillare del macchinario all'interno delle fiale presenti nel kit: la Soluzione di Lavaggio precedentemente diluita, il Buffer Diluente Sieri, il Coniugato Anti-IgG, e il Substrato. Si imposta lo strumento sul programma predefinito per la metodica dell'Immunoblot.
- VI. Il programma impostato sullo strumento Dynablot Plus esegue in automatico le fasi di un test Immunoenzimatico e preleva i volumi corretti di ogni reagente attraverso i capillari all'interno delle fiale.
- VII. Con le pinzette si prelevano le strisce sul lato numerato e si adagiano su un foglio per farle asciugare all'aria. Il colore delle strisce si schiarisce naturalmente durante l'asciugatura.
- VIII. Si interpretano i risultati dopo la completa asciugatura delle strisce. Si allineano le strisce ordinate in sequenza, e distanziate tra loro per poter effettuare il confronto con il risultato del controllo positivo.

N°	DESCRIZIONE	VOLUME e TEMPO
1	prima incubazione delle strisce con il buffer, il siero dei campioni e il controllo positivo	1 mL di buffer, 10 µL di siero e di controllo positivo, tempo: 90 minuti
2	prima fase di lavaggio eliminando il contenuto dei canali	2/3 mL di soluzione di lavaggio
3	aggiunta del coniugato anti-IgG	1 ml di coniugato
4	seconda incubazione delle strisce con il coniugato	tempo: 60 minuti
5	seconda fase di lavaggio eliminando il contenuto dei canali	2/3 mL di soluzione di lavaggio
6	aggiunta del substrato NBT/BCIP	1 mL di substrato
7	terza incubazione delle strisce con il substrato	tempo: 60 minuti
8	aspirazione del substrato e aggiunta di acqua distillata per bloccaggio della reazione	2 mL di acqua distillata

[30]

## ANALISI DEI DATI E CRITERI DI VALIDAZIONE

Al fine di validare l'efficacia del test e permettere una corretta lettura della posizione delle bande trasversali specifiche sulle strisce, è stato incluso il siero di controllo positivo che funge da riferimento per il corretto avvenimento delle reazioni enzimatiche e per l'identificazione delle bande specifiche nei campioni selezionati.

L'interpretazione dei risultati si è basata sulla comparsa delle bande violacee corrispondenti a specifici pesi molecolari, espressi in kilodalton (kDa). La valutazione è stata condotta confrontando il profilo di ciascuna striscia dei soggetti selezionati con quella del controllo positivo, prestando particolare attenzione alla posizione e all'intensità delle bande.

La positività dei campioni è stata determinata dalla presenza simultanea delle due bande comprese tra 24 e 35 kDa.

La co-presenza di entrambe rappresenta l'elevata specificità diagnostica per l'infezione da *Toxocara canis*.

È possibile osservare ulteriori bande reattive negli intervalli tra 70-90 kDa e tra 100-200 kDa, tuttavia non sono considerate specifiche per la diagnosi di Toxocariasi, poiché potrebbero derivare da reazioni crociate con altre elmintiasi [30].

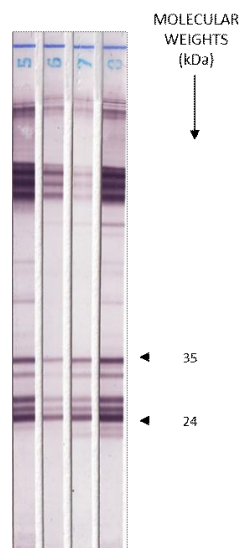


Figura 15\_Bande identificative per la positività di anticorpi anti-*Toxocara canis* nell'intervallo di peso molecolare 24 e 35 kDa – [www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com)

#### 4.3 SAGGIO IMMUNOENZIMATICO ELISA INDIRETTO PER LA RICERCA DI ANTICORPI IgG ANTI-*STRONGYLOIDES STERCORALIS*

Per la diagnosi sierologica della Strongiloidiasi umana, è stato impiegato il test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) indiretto, utilizzando il kit commerciale "*Strongyloides ratti* IgG ELISA" della Bordier Affinity Products S.A. (Crissier, Svizzera).

Il test si basa sulla rilevazione quantitativa degli anticorpi anti-*Strongyloides stercoralis* di classe IgG. Il test ELISA di Bordier utilizza le somiglianze strutturali degli antigeni di *Strongyloides ratti* e *Strongyloides stercoralis*.

I kit ELISA forniscono 96 pozzetti sensibilizzati con gli antigeni somatici da larve di *Strongyloides ratti*. Ogni strip è composta da 8 pozzetti separabili, formato utile per laboratori con un carico di lavoro ridotto.

I kit sono stati mantenuti ad una temperatura tra i 2 e gli 8°C, conforme alle indicazioni del produttore.

Per la valutazione diagnostica è stato utilizzato lo Spettrofotometro per micropiastre, tarato alla lunghezza d'onda di 405 nm.

L'interpretazione dei risultati è stata effettuata calcolando il rapporto definito indice (*index*), tra la densità ottica (OD) di ogni campione e il valore soglia, per determinare la positività o la negatività dei campioni.

#### PRINCIPIO DEL TEST

Il kit "*Strongyloides ratti* IgG ELISA" contiene tutto il materiale necessario per effettuare fino a 96 test immunoenzimatici su pozzetti frangibili pre-sensibilizzati con antigeni somatici di *Strongyloides ratti*.

Il principio della metodica si basa sul legame tra gli anticorpi IgG presenti nel siero dei campioni e gli antigeni immobilizzati sul fondo di ogni pozzetto. L'incubazione permette la formazione dei complessi antigene-anticorpo.

La metodica è definita indiretta poiché sfrutta l'affinità del coniugato proteina-A che agisce come anticorpo secondario. L'aggiunta successiva del substrato cromogeno permette di indurre il viraggio di colore dal blu al giallo. La reazione viene arrestata con l'aggiunta della soluzione di stop costituita da fosfato di potassio. L'intensità della colorazione è direttamente

proporzionale alla concentrazione di anticorpi IgG anti-*Strongyloides* nei campioni e viene misurata allo Spettrofotometro.

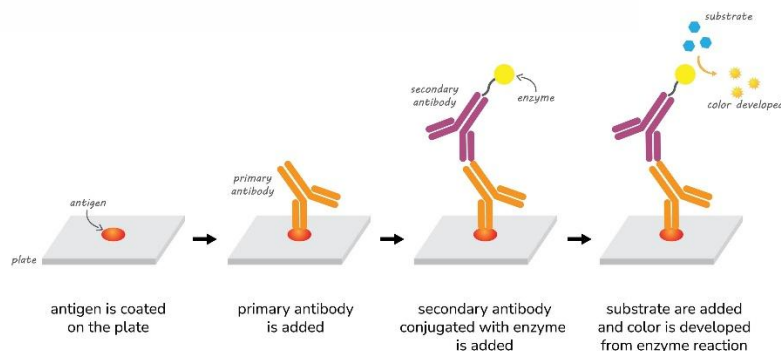


Figura 16\_Schema delle fasi principali del saggio ELISA Indiretto utilizzato nello studio

## PREPARAZIONE DEI REAGENTI PRIMA DELL'USO

- **TAMPONE di DILUIZIONE:** si diluisce il tampone di diluizione concentrato 10X, in un rapporto 1/10. In laboratorio si è utilizzato un volume totale di soluzione, all'interno di una provetta Falcon, di 20 mL. 2 mL appartengono al tampone di diluizione concentrato e 18 mL all'acqua distillata.
- **SOLUZIONE di LAVAGGIO (Wash):** si diluisce la soluzione di lavaggio concentrata 10X, in un rapporto 1/10. All'interno di una provetta Falcon, il volume totale di soluzione è di 30 mL: 3 mL di soluzione di lavaggio concentrata e 27 mL di acqua distillata.
- **SIERI di CONTROLLO:** si diluiscono 10  $\mu$ L di sieri di controllo (negativo, cut-off e positivo) in 190  $\mu$ L di soluzione di diluizione con un rapporto di 1/20. 200  $\mu$ L è il volume finale della soluzione.
- **CONIUGATO PROTEINA-A:** si diluisce il coniugato concentrato 20X in un rapporto 1/50 stabilendo un volume finale di 1 mL. 20  $\mu$ L di coniugato sono stati disciolti in 980  $\mu$ L di tampone di diluizione.
- **SOLUZIONE di SUBSTRATO:** si è sciolta una compressa di substrato liofilizzato nel tampone enzimatico, con un volume di 2,5 mL.

- **CAMPIONI di SIERO:** ogni campione di siero si diluisce utilizzando il rapporto 1/201. La soluzione finale di 2010  $\mu$ L è composta da 10  $\mu$ L di siero e 2 mL di tampone di diluizione.

Le fiale con le soluzioni sono state chiuse ermeticamente con i tappi a vite dopo ogni preparazione per evitare contaminazione. Per ottenere delle soluzioni omogenee, le fiale sono state agitate per qualche secondo sul Vortex.



Figura 17\_Kit Strongyloides ratti IgG ELISA contenente: la metodica, i pozzetti sensibilizzati, i reagenti, i controlli e il telaio per le strips – Bordier Affinity Products – [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch)

## ESECUZIONE DEL TEST

Tutti i componenti del kit "*Strongyloides ratti* IgG ELISA", prima del loro utilizzo, sono stati portati a temperatura ambiente.

La procedura analitica del saggio ELISA indiretto per la ricerca di anticorpi specifici di classe IgG anti-*Strongyloides stercoralis* si è articolata nelle seguenti fasi:

- I. Fase di Bloccaggio → ogni pozzetto è stato riempito con 200  $\mu$ L di tampone di diluizione al fine di reidratare gli antigeni posti sul fondo. La piastra è stata incubata a temperatura ambiente per 5 minuti. Al termine, la soluzione è stata rimossa.
- II. Incubazione dei Campioni → i sieri di controllo e i campioni seguono un ordine specifico all'interno della micropiastra.

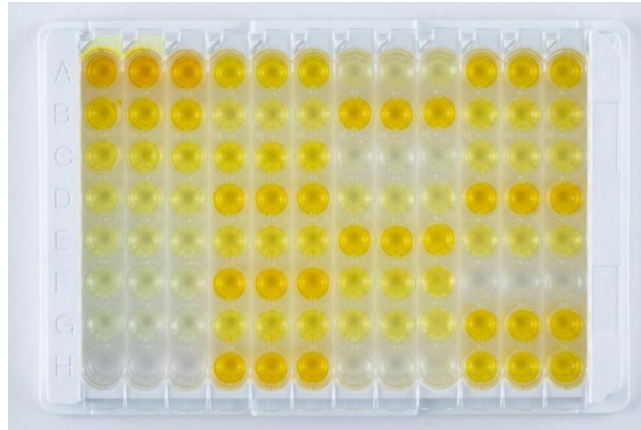
I pozzetti sono stati allestiti come segue:

- a. BIANCO: 100  $\mu$ L di tampone di diluizione (senza siero)
- b. CTR NEGATIVO: 100  $\mu$ L di siero di controllo negativo diluito
- c. CTR CUT-OFF: 100  $\mu$ L di siero di controllo cut-off diluito
- d. CTR POSITIVO: 100  $\mu$ L di siero di controllo positivo diluito
- e. CAMPIONI di SIERO: 100  $\mu$ L di campione di siero diluito

La micropiastra è stata sigillata con Parafilm e incubata per 30 minuti in termostato a 37°C.

- III. Fase di Lavaggio → sono state rimosse le soluzioni da ogni pozzetto e sono stati eseguiti 4 cicli di lavaggio con 250  $\mu$ L di Wash.
- IV. Incubazione con il Coniugato → sono stati dispensati 100  $\mu$ L di coniugato enzimatico diluito in ogni pozzetto. La piastra è stata sigillata con Parafilm e incubata per 30 minuti in termostato a 37°C.
- V. Fase di Lavaggio → al termine dell'incubazione, il coniugato è stato rimosso e si sono effettuati 4 cicli di lavaggio con 250  $\mu$ L di Wash.
- VI. Incubazione con il Substrato → 100  $\mu$ L di substrato diluito sono stati distribuiti in ogni pozzetto. L'incubazione è avvenuta a 37°C per 30 minuti in termostato, sigillando la micropiastra con il Parafilm.

- VII. Arresto della Reazione → la reazione enzimatica è stata bloccata con l'aggiunta di 100  $\mu$ L di soluzione d'arresto in ogni pozzetto.
- VIII. Lettura allo Spettrofotometro → si è misurata l'Assorbanza (A) ad una lunghezza d'onda di 405 nm utilizzando lo Spettrofotometro per micropiastre [32].



*Figura 18\_ELISA test: viraggio dell'intensità e della colorazione gialla a seguito della terza incubazione con il substrato cromogeno – Integra BioSciences*

#### STRUMENTO UTILIZZATO PER LA SPETTROFOTOMETRIA

Le misure di assorbanza di ogni campione sono state effettuate utilizzando il lettore per micropiastre BioTek – ELx800 della BioTek Instruments Inc. (Winooski, VT, USA, parte di Agilent Technologies).

È un sistema automatizzato progettato per i saggi ELISA con un range spettrofotometrico compreso tra 400 e 750 nm.

Lo strumento opera secondo il principio della spettrofotometria ad assorbimento, basato sulla legge di Lambert-Beer, misurando l'intensità della luce trasmessa attraverso il campione per determinare la densità ottica (optical density – OD).

Il sistema ottico dello strumento utilizza una lampada alogena al tungsteno come sorgente luminosa che garantisce un'elevata accuratezza (<1% a 2,0 OD) essenziale per la riproducibilità delle letture fotometriche.

L'apparecchiatura presenta un carrier per micropiastre. È in grado di trasportarle all'interno della camera oscura e assicurare l'isolamento dei pozzetti riducendo al minimo le interferenze della luce ambientale.

Può eseguire un'agitazione orbitale per prevenire la comparsa di bolle all'interno dei pozzetti che potrebbero interferire con le letture.

È presente lateralmente un pannello, costituito da una tastiera e un display, che permettono di selezionare i protocolli e definire la lunghezza d'onda. Per il presente studio, è stata selezionata una lunghezza d'onda di 405 nm, come indicato sulla metodica [33].



*Figura 19\_BioTek ELx800 strumento utilizzato per la lettura spettrofotometrica dei test ELISA su micropiastre – Marshall Scientific*

## ANALISI DEI DATI E CRITERI DI VALIDAZIONE

L'elaborazione della lettura spettrofotometrica è stata eseguita in modo automatico dallo strumento, in grado di correggere la densità ottica sottraendo il valore del "bianco senza siero" da tutti i valori misurati.

Il test è stato considerato valido solo se i risultati soddisfacevano i criteri stabiliti dalle linee guida della metodica:

- Assorbanza (A) Controllo Positivo (C+): > 1,200
- Assorbanza (A) Cut-Off: 18% di C+
- Assorbanza (A) Controllo Negativo: < 10% di C+
- Assorbanza (A) Bianco senza Siero: < 0,350

L'interpretazione dei campioni è stata calcolata tramite un indice (*index*) definito come il rapporto tra l'assorbanza del campione e l'assorbanza del siero soglia (*cut-off*):

$$Index = \frac{Assorbanza\ del\ Campione}{Assorbanza\ del\ Siero\ Soglia}$$

I valori calcolati si classificano secondo i seguenti parametri:

- Negativo < 1,0: indica una concentrazione di anticorpi IgG specifici non significativa alla diagnosi.
- Positivo > 1,0: indica una concentrazione di anticorpi IgG specifici significativa, suggerendo un contatto avvenuto con il parassita.
- Borderline/Dubbio: definita "zona grigia" in presenza di valori vicini alla soglia della positività. Il protocollo prevede la ripetizione del test dopo 2-4 settimane con un nuovo prelievo [32].

# RISULTATI

## 5. INTRODUZIONE AI RISULTATI SPERIMENTALI

In questo capitolo vengono presentati e analizzati i dati ottenuti dall'attività di diagnostica sierologica condotta presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità di Novara.

L'obiettivo principale dello studio è stato valutare la sieroprevalenza e l'accuratezza diagnostica della Toxocariasi e Strongiloidiasi, due parassitosi provocate rispettivamente dai nematodi *Toxocara canis* e *Strongyloides stercoralis*. L'indagine è stata condotta su un totale di 66 campioni complessivi, suddivisi equamente per ottenere un confronto statistico bilanciato tra due specifiche coorti di riferimento. Il gruppo costituito dalla categoria degli agricoltori, selezionati in quanto lavoratori vulnerabili e potenzialmente esposti al rischio di infezione, è composto da 33 soggetti; mentre i restanti 33 campioni costituiscono il gruppo di controllo che rappresenta la popolazione generale.

### 5.1 RISULTATI SPERIMENTALI

L'analisi condotta tramite Immunoblot ha permesso di identificare la presenza di anticorpi specifici anti-*Toxocara canis*.

I dati mostrano una netta differenza nella sieropositività tra il gruppo degli agricoltori e il gruppo di controllo:

- Gruppo Agricoltori: su 33 soggetti analizzati, 11 sono risultati positivi. La sieroprevalenza in questa categoria professionale è risultata pari al 33,3%.
- Gruppo di Controllo: su 33 soggetti sono state riscontrate solo 2 positività, pari ad una sieroprevalenza del 6%.

AGRICOLTORI		
N°	<i>Toxocara</i>	<i>Strongyloides</i>
N002	NEG	NEG
N006	POS	NEG
N021	NEG	POS
N037	POS	NEG
N041	NEG	NEG
N045	POS	NEG
N046	POS	NEG
N047	POS	NEG
N048	POS	NEG
N049	POS	POS
N050	NEG	NEG
N051	NEG	NEG
N066	NEG	NEG
N068	NEG	NEG
N069	NEG	NEG
N070	POS	NEG
N072	NEG	NEG
N077	NEG	NEG
N078	NEG	NEG
N079	POS	NEG
N080	NEG	NEG
N082	POS	NEG
N086	NEG	NEG
N088	NEG	POS
N091	NEG	NEG
N092	NEG	NEG
N093	POS	NEG
N095	NEG	NEG
N097	NEG	NEG
N099	NEG	NEG
N100	NEG	NEG
N101	NEG	NEG
N108	NEG	NEG

GRUPPO DI CONTROLLO		
N°	<i>Toxocara</i>	<i>Strongyloides</i>
N001	NEG	NEG
N003	POS	NEG
N005	NEG	NEG
N007	NEG	NEG
N008	NEG	NEG
N009	NEG	NEG
N010	POS	NEG
N011	NEG	NEG
N013	NEG	NEG
N014	NEG	NEG
N015	NEG	NEG
N016	NEG	NEG
N017	NEG	NEG
N022	NEG	NEG
N023	NEG	NEG
N024	NEG	NEG
N025	NEG	NEG
N027	NEG	NEG
N028	NEG	NEG
N030	NEG	NEG
N031	NEG	NEG
N032	NEG	NEG
N033	NEG	NEG
N035	NEG	NEG
N036	NEG	NEG
N042	NEG	NEG
N081	NEG	NEG
N083	NEG	NEG
N084	NEG	NEG
N085	NEG	NEG
N089	NEG	NEG
N098	NEG	NEG
N109	NEG	NEG

Tabella 1\_Risultati di Sieroprevalenza per *Toxocara canis* e *Strongyloides stercoralis*

Per quanto riguarda la ricerca di *Strongyloides stercoralis* mediante saggio ELISA, i risultati hanno mostrato una positività inferiore rispetto a *Toxocara*, ma comunque circoscritta quasi esclusivamente al gruppo dei lavoratori esposti professionalmente:

- Gruppo Agricoltori: sono stati identificati 3 soggetti positivi (9,1%).
- Gruppo di Controllo: non è stata riscontrata alcuna positività (0 casi), confermando l'assenza di circolazione del parassita nei soggetti non esposti ad attività agricola nei campioni esaminati.

Dall'incrocio dei dati è emerso un unico caso di co-infezione. Il soggetto identificato con il codice N049, appartenente al gruppo degli agricoltori, è risultato simultaneamente positivo sia per *Toxocara canis* che per *Strongyloides stercoralis*.

AGRICOLTORI		
PARASSITA	Campioni (n=33)	Prevalenza totale (%)
<i>Toxocara canis</i>	11	33%
<i>Strongyloides stercoralis</i>	2	6%

GRUPPO di CONTROLLO		
PARASSITA	Campioni (n=33)	Prevalenza totale (%)
<i>Toxocara canis</i>	3	9%
<i>Strongyloides stercoralis</i>	0	0%

## 5.2 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica dei risultati ottenuti, effettuata tramite il Chi-Square Test, ha evidenziato differenze significativamente rilevanti di positività tra i due gruppi. In merito a *Toxocara canis*, è stato riscontrato un p-value <0,05 (p=0,016; valore del Chi-Quadrato  $\chi^2= 5,8022$ ).

Per *Strongyloides stercoralis*, la differenza non è risultata statisticamente significativa, avendo ottenuto un p-value >0,05 (p=0,076; valore del Chi-Quadrato  $\chi^2= 3,1429$ ).

## CONCLUSIONI

Il presente studio ha permesso di analizzare la sieropidemiologia della Toxocariasi e della Strongiloidiasi in una popolazione selezionata del Piemonte Orientale. Sebbene queste parassitosi siano classificate come Neglected Tropical Disease (NTD), i dati ottenuti confermano che esse rappresentano una realtà rilevante anche in contesti non tropicali e in Paesi industrializzati come l'Italia.

I dati emersi dalla ricerca fanno luce sulla positività per *Toxocara canis* e *Strongyloides stercoralis* nella coorte dei lavoratori agricoli, offrendo un confronto con l'attuale situazione epidemiologica italiana.

Nello specifico, lo studio condotto da Nicoletti et al. (2019) nella città di Catania, ha riportato una sieroprevalenza per *Toxocara canis* dell'8% su un campione di 287 adulti. Il gruppo di controllo dello studio ha una percentuale simile a quella dello studio, e suggerisce che tali risultati rappresentino l'infezione nella popolazione non esposta lavorativamente.

Il divario è considerato ancora più netto se si considerano gli studi storici citati in letteratura scientifica che riportano dati come l'1,6% nel Centro Italia e il 4% nel Nord Italia [34].

Secondo quanto riportato da Buonfrate et al. (2013-2014), la prevalenza di Strongiloidiasi tra i cittadini italiani autoctoni con eosinofilia è pari all'8%, mentre scende all'1% nei soggetti non eosinofili.

Il valore del 6% raccolto nello studio è sovrapponibile a quella dei gruppi clinici a rischio a livello nazionale. La letteratura scientifica sottolinea come in Italia, l'infezione sia spesso legata a soggetti nati prima degli anni '50 che hanno vissuto in aree rurali quando la parassitosi era endemica [29].

Dall'analisi dei campioni degli agricoltori esaminati nel nostro studio, è emersa una significativa positività per *Toxocara canis*. Nello specifico si sono evidenziate differenze sostanziali tra i due gruppi esaminati, in cui è stata riscontrata una sieroprevalenza del 33,3% negli agricoltori (11 positivi su 33) rispetto al 9% del gruppo di controllo (3 positivi su 33), con una netta significatività statistica ( $p=0,016$ ).

Questo divario conferma l'ipotesi iniziale. Il contatto prolungato con il terreno e le attività di manipolazione della terra, tipiche della professione agricola, rappresentano un fattore di rischio determinante per l'ingestione accidentale di uova embrionate di *Toxocara*.

Il dato del gruppo di controllo (9%) suggerisce una circolazione ambientale del parassita che non va sottovalutata nella popolazione generale.

Il problema è dovuto alla persistente infestazione nei contesti urbani; la presenza delle deiezioni di canidi e felidi, sia domestici che randagi, lasciate in giardini pubblici e parchi gioco, rappresenta una fonte di contaminazione del parassita estendendo la possibilità di contagio ben oltre il solo ambito professionale agricolo.

Per quanto riguarda *Strongyloides stercoralis*, lo studio ha identificato solo 3 casi di positività esclusiva nel gruppo degli agricoltori con una prevalenza del 6% (2 positivi su 33) a fronte dello 0% nel gruppo di controllo.

Anche in questo caso, la specificità dei dati nel gruppo professionalmente esposto, pur non raggiungendo un livello statisticamente significativo ( $p=0,076$ ), suggerisce una correlazione con l'ambiente lavorativo rurale dove le larve di *Strongyloides* possono penetrare attraverso la cute integra attraverso il contatto con il suolo contaminato.

Di particolare interesse, è stato rilevato un caso di co-infezione del paziente N049, risultato positivo per entrambi i parassiti. Tale dato può significare come l'esposizione ambientale in ambito agricolo possa essere multipla.

Il soggetto N049 ha età anziana e suggerisce che, negli anni '40 e '50 del secolo scorso, la contaminazione del suolo da parte di reflui e deiezioni era presente favorendo la persistenza e la trasmissione delle infezioni.

All'epoca la prevalenza di *Strongyloides stercoralis* in Italia, soprattutto nelle zone rurali e risicole del Nord Italia, era molto alta [29].

Il caso evidenzia come la storia anamnestica e professionale di ogni paziente rappresenti un elemento chiave per l'interpretazione dei risultati sierologici, confermando che l'esposizione rurale prolungata nel tempo aumenti la probabilità di infezione.

Un limite di questo studio è rappresentato dalla ridotta numerosità dei campioni, che non permette di raggiungere la significatività statistica per le differenze relative a *Strongyloides stercoralis*. Per questo motivo sarà utile continuare questa indagine aumentando il numero dei soggetti reclutati per verificare la diffusione epidemiologica del parassita. Il numero di campioni per *Toxocara canis* è statisticamente rilevante; tuttavia, l'inclusione di ulteriori dati permetterebbe di consolidare i risultati ottenuti.

Un ulteriore limite è rappresentato dalla circoscrizione geografica dello studio, condotto esclusivamente nella zona agricola del Piemonte Orientale; pertanto, le prevalenze riscontrate potrebbero non essere rappresentative di altre regioni italiane.

Sarà quindi opportuno condurre studi multicentrici in diverse zone d'Italia prendendo in considerazione le variabili agricolo-ambientali per ottenere una visione più completa dell'epidemiologia nazionale di questi patogeni.

In base a questi dati, riteniamo che sia necessario promuovere una maggior consapevolezza tra i professionisti sanitari e i lavoratori del settore agricolo riguardo ai rischi di zoonosi parassitarie, incentivando pratiche igieniche e protocolli di sverminazione regolare degli animali domestici.

Poiché tali infezioni decorrono spesso in modo asintomatico o con sintomatologia aspecifica, il monitoraggio sierologico viene indicato come lo strumento diagnostico per l'identificazione dei soggetti positivi.

In prospettiva, l'adozione di test diagnostici specie-specifici permetterà di definire con maggior precisione il carico di queste malattie nella nostra regione, migliorando l'approccio terapeutico e le strategie di prevenzione.

## RINGRAZIAMENTI

*Desidero ringraziare la Prof.ssa Elisa Bona per aver ricoperto il ruolo di Relatrice e per aver saputo consigliare il tirocinio più adatto al mio percorso: l'esperienza di laboratorio ospedaliero non è stata solo una tappa fondamentale per la realizzazione della tesi, ma una crescita professionale e umana che porterò sempre con me.*

*Desidero esprimere la mia profonda gratitudine al Prof. Paolo Ravanini per avermi guidato con estrema competenza e saggezza per tutto lo sviluppo di questo studio.*

*Ringrazio la Dott.ssa Giulia Faolotto per il suo prezioso supporto, la sua costante disponibilità e la sua dolcezza. È stata fondamentale per arricchire il valore di questa ricerca.*

*Ai tecnici di laboratorio,  
che con estrema generosità mi hanno insegnato le numerose metodiche di  
laboratorio e per aver reso il mio periodo di stage più leggero, con sorrisi e  
tanta allegria tra un esperimento e l'altro.  
Ringrazio in modo particolare Christian, Marzia e Simonetta che mi hanno  
trasmesso ogni giorno la loro energia travolgente.*

*Ai miei compagni di università,  
Alessia, Elisa, Giulia, Letizia, Luca, Martina, Mirko, Sabrina, Serena e Sofia;  
grazie per aver condiviso ogni passo della magistrale, le risate fuori dalle  
aule e le sessioni infinite.  
Senza il supporto reciproco e la nostra instancabile ironia, questo percorso  
non sarebbe stato così indimenticabile.*

*Alle amiche d'infanzia,  
Matilde, Beatrice e Alessia.  
Ci siete sempre state in ogni tappa di questo viaggio. Avete saputo ascoltare i  
miei silenzi, i miei momenti di stanchezza e avete trasformato le mie ansie in  
risate e i miei dubbi in coraggio.*

*Alla mia famiglia,  
le radici profonde che mi hanno permesso di restare in equilibrio tra fiducia  
e realtà. Mi avete insegnato il valore dell'impegno e dei sacrifici. E vi  
ringrazio per il sostegno silenzioso che ha permesso di concentrarmi solo  
sugli studi.*

*Al mio Andrea,  
il mio sostegno d'amore.  
Mi sei stato accanto ogni giorno con la tua tenerezza e la tua pazienza.  
Hai condiviso con me ogni mia incertezza.  
Hai saputo far chiarezza quando tutto sembrava confuso.  
Sei il mio dono più grande e questo traguardo è anche il tuo.  
Sei la mia luce.*

*E infine... me stessa.  
Un pensiero va alla bambina che sono stata. A lei, così timida e insicura.  
È per ricordarle che la sua introversione non è stata un limite.  
Per non essermi mai arresa, per aver protetto questo sogno ed essere la  
donna che sono oggi.*

## BIBLIOGRAFIA

- [1] *Introduzione Parassiti Elminti Nematodi* – Insegnamento di Parassitologia e Micologia, UniBo, docente Prof. Marialetizia Fioravanti
- [2] *Parassitologia umana – Nematelminti* – Biologia e microbiologia sanitaria, 2012 Zanichelli Editore S.p.A., Bologna
- [3] Roberts L. S., Janovy J. & Schmidt G. D. (2020). *Foundations of Parasitology* (10th ed.) - McGraw-Hill Education
- [4] Lezione12 – Nematodi (2020). Università di Roma Tor Vergata
- [5] M.A. Taylor, R.L. Coop & R.L. Wall (2022). *Parassitologia e Malattie Parassitarie degli Animali* (4a ed.). Edra
- [6] Martinez E., Gonzalez R. et al. (2025). *Manuale di Parassitologia per tecnici veterinari*. Edra
- [7] *Toxocara canis* - MeSH (Medical Subject Headings) – NCBI – NIH (National Library of Medicine)
- [8] Rostami A, Riahi SM, Holland CV, et al. - *Seroprevalence estimates for toxocariasis in people worldwide: A systematic review and meta-analysis* - PLoS - Negl Trop Dis. (2019 Dec 19)
- [9] Rostami A., Ma Guangxu, Wang T. et al, *Human toxocariasis – A look at a neglected disease through an epidemiological ‘prism’* (2019), Volume 74 - Infection, Genetics and Evolution, Elsevier
- [10] Ma Guangxu et al., - *Human toxocariasis* - The Lancet Infectious Diseases (2018), Volume 18, Issue 1, e14 - e24
- [11] Roberts L. S., Janovy J. & Schmidt G. D. (2020) - *Foundations of Parasitology* (10th ed.) - McGraw-Hill Education
- [12] Muzny, MD, MSPH, Division of Infectious Diseases, University of Alabama at Birmingham – Reviewed on gen 2025 – Malattie Infettive, Nematodi (Ascaridi), *Toxocariasi* – MSD Manual versione professionisti
- [13] Calum N.L. Macpherson – *The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance* (Nov 2013) – International Journal for Parasitology, Volume 43, Issues 12-13

- [14] Yang, Y., Zhong, D., Wu, H. *et al.* - *Prevalence of Toxocara infection and associated risk factors: a cross-sectional study in Zhejiang, China* - *Infectious Diseases of Poverty* 14, 43 (2025)
- [15] Tesi di Simonato Giulia - *Parassiti intestinali in popolazioni canine, fecalizzazione ambientale nella città di Padova e rischi per l'uomo* - Università degli Studi di Padova, scuola di dottorato di ricerca in scienze veterinarie ciclo XXVIII
- [16] Genchi C, Di Sacco B *et al.* - *Epidemiology of human toxocariasis in northern Italy* - *Parassitologia*. (1990 Dec)
- [17] Beraldo P, Candusso S *et al.* - *Canine faecal contamination in Udine and evaluation of health risk* - *Experimental Clinical Medicine*, University of Udine, Italy. Congresso Nazionale SoIPa. (Giugno 2014)
- [18] *Strongyloides stercoralis* - MeSH (Medical Subject Headings) - NCBI - NIH (National Library of Medicine)
- [19] Ruibing Y., Meiyining X., Lichao zhang, *et al.* - *Human Strongyloides stercoralis infection* - *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* - (aug 2024), Volume 58, Elsevier
- [20] Dickson D. Despommier, Daniel O. Griffin, *et al.* - *Parasitic Diseases (7th ed.)* - Parasites Without Borders, Inc. NY - (2019)
- [21] Yeh MY, Aggarwal S. *et al.* - *Strongyloides stercoralis Infection in Humans: A Narrative Review of the Most Neglected Parasitic Disease* - *Cureus*. (oct 2023)
- [22] *Soil-transmitted helminth infections* - World Health Organization [www.WHO.int](http://www.WHO.int) - (gen 2023)
- [23] Muzny, MD, MSPH, Division of Infectious Diseases, University of Alabama at Birmingham - Reviewed and Modified on april 2025 - *Malattie Infettive, Nematodi (Ascaridi), Strongiloidosi* - MSD Manual versione professionisti
- [24] Roberts L. S., Janovy J. & Schmidt G. D. (2020). *Foundations of Parasitology* (10th ed.) - McGraw-Hill Education
- [25] Burton J., Clint E. *et al.* - *Human Parasitology* - 4th ed. (2013 Academic Elsevier)

- [26] Lynne Shore Garcia et. al – *Diagnostic Medical Parasitology* (5th ed.) - 2007
- [27] Buonfrate D., Bisanzio D., et al. - *The Global Prevalence of Strongyloides stercoralis Infection* – Pathogens. (2020 Jun) – PubMed Central – MDPI
- [28] Elizabeth A. Zeibig – *Clinical Parasitology a Pratical Approach* - (2nd ed.) Elsevier (2013)
- [29] Buonfrate D, Bisoffi Z, Baldissera M, et al. CCM Strongyloides Study Group – *Epidemiology of Strongyloides stercoralis in northern Italy: results of a multicentre case-control study, February 2013 to July 2014* – Euro Surveill. (2016 Aug)
- [30] LDBIO Diagnostics – Sezione Immunoblots – *Toxocara* Western Blot IgG – <https://ldbiodiagnostics.com/en/our-products/immunoblots/toxocara-western-blot-igg/>
- [31] MIKROGEN DIAGNOSTIK – Product & Automation – Dynablot Plus – sito web – <https://www.mikrogen.de/en/products-automation/product-finder/dynablot-plus>
- [32] Bordier Affinity Product S.A. – Metodica *Strongyloides ratti* IgG ELISA – [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch)
- [33] Agilent Technologies – Absorbance Microplate Readers – BioTek ELx800 – [www.biotek.com](http://www.biotek.com) – <https://www.agilent.com/en/product/microplate-instrumentation/microplate-readers/absorbance-microplate-readers/biotek-800-ts-absorbance-reader-1623177>
- [34] Nicoletti A, Cicero C. E, Mantella A et al. - *Seroprevalence of Toxocara Canis in the city of Catania, Italy* - Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases (2019 April)