

INDICE

Introduzione pag.2

PARTE GENERALE

L'echinococcosi/iatidiosi pag.5

Tassonomia pag.5

Echinococcus granulosus

Morfologia e biologia pag.10

Morfologia e biologia della forma larvale (Iatide) pag.12

Ciclo biologico pag.16

Epidemiologia della echinococcosi/iatidiosi
nell'ospite definitivo e negli ospiti intermedi pag.18

Epidemiologia della echinococcosi/iatidiosi nell'uomo pag.25

Epidemiologia molecolare nel Mondo pag.30

Epidemiologia molecolare in Italia pag.35

Problemi clinici pag.36

Diagnosi pag.39

Terapia pag.47

Controllo e piani di eradicazione pag.58

Impatto socio-economico pag.67

La biologia molecolare in parassitologia pag.70

E. granulosus - Studi di biologia molecolare pag.90

PARTE SPERIMENTALE

Premessa pag.93

Materiali e metodi pag.95

Risultati pag.117

Discussione e conclusioni pag.135

Bibliografia pag.143

Introduzione

L'echinococcosi/idatidosi è una zoonosi parassitaria causata dagli stadi adulti e larvali del cestode *Echinococcus granulosus*. Le segnalazioni di questa parassitosi risalgono a tempi remoti; già nel IV secolo a.C. Ippocrate, nel libro sulle “Afezioni interne”, descrisse “tumori conteneti acqua” nei polmoni di diversi uomini, che talvolta si rompevano nella cavità pleurica, paragonandoli a quelli isolati in alcuni animali (Eckert et al., 2001).

Da allora, sono stati descritti molti casi di echinococcosi/idatidosi, ed è per questo che è considerata una delle principali parassitosi degli animali da reddito e una delle zoonosi parassitarie più importanti (Bortoletti, dati personali).

Nonostante i notevoli progressi fatti per lo sviluppo di appropriati ed efficaci metodi di analisi, di controllo e di prevenzione di questa malattia, essa rimane uno dei maggiori problemi sanitari in campo medico e medico veterinario in molte zone del mondo, specialmente dove è particolarmente diffusa la pastorizia; anche perché le strategie utili al suo contenimento sono difficili e costose (Eckert et al., 2001).

Alla luce di tutto ciò, la valutazione dell'impatto reale di questa zoonosi appare di estrema utilità.

Vi è da sottolineare che i dati in letteratura, così come le statistiche ufficiali basate sulle notifiche obbligatorie, raramente rappresentano una misura attendibile della diffusione della malattia.

In campo umano spesso le informazioni provengono da pubblicazioni di indagini parziali, occasionali e da casistiche personali.

In campo animale i dati spesso si riferiscono ad indagini svolte presso singoli mattatoi, tra l'altro frequentemente senza indicazione circa la provenienza dei capi, l'età, il sesso e la localizzazione delle cisti.

Nonostante l'echinococcosi/idatidosi sia iperendemica nei Paesi del Bacino del Mediterraneo, la scarsa conoscenza dei dati epidemiologici, la lunga latenza della malattia e l'inconsapevolezza dei costi della zoonosi e dei benefici di un controllo, concorrono alla sua sottovalutazione da parte della popolazione, dei mass-media e delle Autorità Sanitarie (Bortoletti, dati personali; Mantovani e Lasagna, 2004; Poglayen et al., 2007).

In questa tesi si riportano i risultati di una serie di indagini finalizzate alla valutazione della presenza e diffusione della idatidosi in bufali e bovini allevati in Campania e di ricerche molecolari su cisti prelevate da bovini, bufali e ovini basate sulla tecnica di sequenziamento e su un innovativo protocollo di PCR-Real-time per caratterizzare i diversi genotipi di *E. granulosus*.

Questi studi hanno consentito di avere una prima valutazione del reale impatto di questa parassitosi nella regione Campania, nonché di delineare i principali fattori di rischio per l'uomo e per il patrimonio zootecnico. I risultati emersi dagli studi saranno certamente utili a ricercatori ed a quanti si occupano di questa parassitosi - erroneamente ritenuta strettamente legata al solo mondo rurale - di notevole importanza sanitaria ed economica sia in campo umano che veterinario.

PARTE GENERALE

Echinococcosi/idatidosi

La echinococcosi è una malattia parassitaria cosmopolita causata dalla forma adulta di cestodi appartenenti al genere *Echinococcus* [*Echínos*: guscio spinoso; *cóccos*: bacca], i cui ospiti definitivi sono i cani e diverse specie di canidi.

Gli stadi larvali, determinano, invece, l'idatidosi o echinococcosi cistica (EC), caratterizzata da un lungo periodo di crescita delle cisti metacestodiche (idatide) negli ospiti intermedi (erbivori ed onnivori, tra cui l'uomo) (Zhang e Mc Manus, 2006).

Tassonomia

PHYLUM	PLATYHELMINTHES
CLASSE	CESTODA
SOTTOCLASSE	EUCESTODA
ORDINE	CYCLOPHILLIDEA
FAMIGLIA	TAENIDAE
GENERE	ECHINOCOCCUS

La classificazione del genere *Echinococcus* (Rudolphi, 1801) è molto controversa: durante la prima metà del XX secolo, esclusivamente in base alla specificità ospite-parassita, sono state descritte ben 16 specie e 13 sottospecie; una precisa valutazione delle caratteristiche morfologiche ha portato a riconoscere solo quattro specie di *Echinococcus* (Thompson e McManus, 2002).

Le specie più diffuse e di maggiore importanza dal punto di vista medico e medico veterinario sono *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) ed

E. multilocularis (Leuckart, 1863), che causano rispettivamente l'idotidosi cistica e l'idotidosi alveolare.

Le altre due specie: *E. vogeli* (Rausch e Bernstein, 1972) ed *E. oligarthrus* (Diesing, 1863), diffuse solo in America Centrale e Sud America, sono responsabili della idotidosi policistica (McManus e Thompson, 2003).

Recentemente, è stata descritta una quinta specie, *E. shiquicus*, morfologicamente simile ad *E. multilocularis*, parassita della volpe tibetana (*Vulpes ferrilata*) e della pika (*Ochotona curzoniae*) in una regione della Cina (Xiao et al., 2005) e la cui patogenicità non è ancora conosciuta (Xiao et al., 2006).

Durante gli ultimi 40 anni, ricerche di laboratorio e studi di campo hanno rilevato una considerevole variabilità fenotipica tra gli isolati del genere *Echinococcus*.

Questa variabilità è stata osservata soprattutto tra gli isolati di *E. granulosus* da diverse specie di ospiti intermedi.

Smyth e Davies (1974) furono i primi a dimostrare che vi erano differenze significative nello sviluppo biologico tra isolati di *E. granulosus* di equino e di ovino. Tale studio ha fornito la base per comprendere le diversità di sviluppo ed infettività, esistenti tra gli isolati provenienti da diverse specie di ospiti in varie parti del mondo.

Dato il significato epidemiologico della variabilità intraspecifica di *E. granulosus*, è stato necessario adottare una nuova nomenclatura, così si è sviluppato il concetto di “ceppo o genotipo” (Thompson e McManus, 2002).

Questa variabilità può influenzare: il ciclo biologico, la specificità d'ospite, il tasso di sviluppo, la patogenicità, l'antigenicità, la sensibilità ai chemioterapici e l'epidemiologia della EC (Thompson and McManus, 2001).

Dal punto di vista pratico, la conoscenza dei genotipi è un importante prerequisito per i programmi di controllo mirati a limitare la trasmissione di *E. granulosus* nelle regioni endemiche.

La EC è considerata la più importante zoonosi parassitaria del mondo, specialmente dove esiste una stretta convivenza tra uomo e animali. Per interrompere i cicli di trasmissione, è necessario conoscere quali genotipi sono presenti e quali ospiti colpiscono. L'applicazione di tecniche molecolari per caratterizzare gli isolati, ha dato un importante contributo per la conoscenza della genetica, della epidemiologia e della tassonomia del parassita (Thompson e McManus, 2002).

Precedentemente la caratterizzazione di genere e di specie si basava su criteri morfologici (Lymberly, 1998) e sullo studio di markers isoenzimatici e biochimici (McManus e Briant, 1995). L'analisi del DNA, grazie alla sua elevata sensibilità, ha fornito elementi molto utili per discriminare i differenti genotipi (Thompson e McManus, 2002).

La specie *E. granulosus* comprende diversi genotipi, mentre, sembrano essere molto poche le varianti genetiche di *E. multilocularis* (Rinder et al., 1997); non sono disponibili dati per *E. vogeli* ed *E. oligarthrus* (McManus e Thompson, 2003).

Fino ad oggi, gli studi molecolari hanno consentito la identificazione di 10 genotipi o ceppi (G1-G10) di *E. granulosus*, differenziati in base ai polimorfismi della sequenza nucleotidica di alcuni geni, in particolare quelli del DNA mitocondriale (mtDNA): G1 (ceppo ovino), G2 (ceppo ovino Tasmania), G3 (ceppo bufalo), G4 (ceppo cavallo), G5 (ceppo bovino), G6 (ceppo cammello), G7 (ceppo suino), G8 (ceppo cervide), G9 (ceppo umano), G10 (ceppo cervide finnoscandinavo) (McManus, 2002; Lavikainen et al., 2003; Maravilla et al., 2004) (Tabella 1). Tuttavia la validità del ceppo G9 è in discussione (Snabel et al., 2000), poiché esso sembra corrispondere al ceppo G7.

Recentemente, Huttner et al. (2007) hanno trovato in Uganda un ‘ceppo leone’, che era stato già precedentemente descritto in sud Africa come *E. felis* (Ortlepp, 1937). Comunque sono ancora in corso maggiori studi genetici per confermare questo ceppo.

Sono state descritte anche “varianti” di alcuni genotipi quali: G1a, G1b, G1c, G1d, G1e, G2a, G2c, G7a e G7b (Kamenetzky et al., 2002).

Recentemente, Nakao et al. (2007) hanno proposto una revisione tassonomica di questi ceppi in base alle loro relazioni filogenetiche, valutate mediante analisi molecolare del genoma mitocondriale completo, per cui, i genotipi G1, G2 e G3 dovrebbero essere raggruppati in un’unica specie, *E. granulosus sensu stricto*; il ceppo equino G4 ed il ceppo bovino G5 rappresenterebbero due nuove specie, *E. equinus* e *E. ortleppi*, rispettivamente. Infine, i genotipi G6, G7 e G8 potrebbero essere unificati in un’unica specie, *E. canadensis*, nella quale potrebbero rientrare anche i genotipi G9 e G10, poiché esiste una stretta relazione tra i ceppi G7 e G9 e tra G8 e G10. Una revisione alternativa vorrebbe invece unificare solo G8 e G10 in *E. canadensis*, mentre G6, G7 e G9 potrebbero rappresentare una nuova specie.

Tabella 1. Rappresentazione schematica delle 4 specie di *Echinococcus* e dei principali genotipi di *E. granulosus*, dei corrispondenti ospiti intermedi, definitivi e aree di massima diffusione (da Thompson and McManus, 2002).

<i>E. granulosus</i>	OSPITE INTERMEDIO CONOSCIUTO	UOMO	OSPITE DEFINITIVO CONOSCIUTO	DIFFUSIONE
G1 - Ovino	Ovino, Bovino, Maiale, Cammello, Capra	Si	Cane, Volpe, Dingo, Sciacallo, Iena	Mondiale
G2 - Ovino Tasmania	Ovino, Bovino (?)	Si	Cane, Volpe	Argentina-Tasmania
G3 - Bufalo (?)	Bufalo, Bovino	SI	Cane, Volpe?	Asia
G4 - Cavallo (<i>E.equinus</i>)	Cavallo ed altri equini	No	Cane	Europa, Medio Oriente, Sud Africa
G5 - Bovino	Bovino (ovino, caprino?)	Si	Cane	Europa, India
G6 - Cammello	Cammello, Capra, Bovino ?	Si	Cane	Africa, Medio Oriente, Cina, Argentina
G7 - Maiale	Maiale	Si	Cane	Europa, Russia, Sud America
G8 - Cervidi	Cervidi	Si	Cane, Lupo	Eurasia, Nord America
G9 - Uomo	Uomo		Cane	Polonia
G10 - Cervo Finnoscandinavo	Renne, Alci	?	?	Finlandia
Genotipo Leone	Zebra, Antilope, Giraffa?, Ippopotamo?	?	Leone	Africa
<i>E.multilocularis</i>	Roditori, Lagomorfi, Maiali domestici e selvatici, Cane, Cavallo, Asino	Si	Volpe r., Volpe artica, Coyote, Cane, Lupo, Gatto	Eurasia, Nord America
<i>E. vogeli</i>	Roditori	Si	Bush dog	America centrale e Sud America
<i>E. oligarthrus</i>	Roditori	Si	Felidi selvatici	America centrale e Sud America

***Echinococcus granulosus* - Morfologia e biologia**

E. granulosus è una piccola tenia, di lunghezza variabile da 2 a 7 mm, costituita da testa, collo e strobilo.

La testa o scolice presenta quattro ventose tondeggianti disposte in posizione equatoriale ed è armata, ovvero munita di un rostello con una doppia corona di uncini, una piccola (22-39 micron) ed una grande (31-49 micron) (Casarosa, 1985).

Il collo è corto e stretto.

Il corpo o strobilo è normalmente costituito da 3 o 4 proglottidi, che in alcuni casi possono raggiungere il numero di 6 (Euzeby, 1968).

Le proglottidi più prossime al collo sono quelle *sessualmente immature*, seguono quelle *mature*, con organi sessuali atti alla riproduzione e, poi quelle *gravide*, in cui sono presenti le uova.

Ogni proglottide è ermafrodita, ossia dotata di un apparato genitale maschile e di uno femminile ed è provvista di un solo poro genitale.

Quando l'ultima in seguito ad autofecondazione diventa gravida, si stacca dal corpo del parassita ed insieme con le feci del proprio ospite, viene eliminata nell'ambiente esterno, dove vengono disseminate le uova per disintegrazione della proglottide stessa.

Al momento dell'espulsione dall'ospite definitivo, le uova di *E. granulosus* possono trovarsi in differenti stadi evolutivi: mature e quindi immediatamente infestanti, ed immature, tuttavia in grado di svilupparsi nell'ambiente esterno in presenza di appropriate condizioni microclimatiche (Thompson e Lymberly, 1995).

Le uova, di 30-50 x 22-44 micron di diametro, possono essere sferiche o ovali. All'esame microscopico sono morfologicamente indistinguibili da quelle degli altri cestodi appartenenti alla famiglia Taenidae. Infatti, studi ultrastrutturali effettuati sulle uova di *E. granulosus*, *E.*

multilocularis e diverse specie di *Taenia*, hanno evidenziato strutture simili, composte da una serie di strati e/o membrane che avvolgono l'embrione esacanto o oncosfera. Procedendo dall'esterno, le uova comprendono: capsula, membrana vitellina, embrioforo, strato granuloso, membrana oncosferica (Morseth, 1965; Sakamoto, 1981; Swiderski, 1982).

L'embrioforo è un rivestimento formato da blocchi poligonali di una proteina simile alla cheratina che funge da protezione per l'embrione esacanto, conferendo all'uovo una forte resistenza a diversi fattori chimico-fisici e climatici (Gemmell e Lawson, 1986). La capacità di sopravvivenza delle uova è maggiore a basse temperature: a 21°C e con sufficiente umidità, esse permangono vitali per oltre 28 giorni; a 7°C la loro sopravvivenza è di circa 294 giorni. Al di sotto di 0°C (da -35°C a -50°C) le uova possono resistere per 24 ore conservando la loro capacità infestante, mentre a -70°C si devitalizzano nell'arco di poche decine di minuti. A temperature elevate (60°C-100°C) le uova resistono da 1 a 2 minuti (Laws, 1968; Thompson e Lyubery, 1995). Tuttavia, più che la temperatura, è l'umidità a limitarne la sopravvivenza; infatti, in natura, l'essiccamento è il principale responsabile della morte delle uova (Laws, 1968). Non si sa esattamente quante uova vengano prodotte, in quanto i numeri indicati in bibliografia sono molto variabili (100-1500 per proglottide) (Arundel, 1972; Rausch, 1975; Thompson e Eckert, 1982; Heath e Lawrence, 1991). Allo stesso modo non si conosce con esattezza la frequenza con cui si formano le proglottidi gravide: si stima che nei primi 40 giorni dall'infestazione, se ne formi una ogni 7-14 giorni (Gemmell, 1962; Smyth, 1964; Shantz, 1982).

***Echinococcus granulosus* - Morfologia e biologia della forma larvale (Idatide)**

L' idatide o cisti idatidea [dal greco *údatos*: acqua] è la forma larvale polisomatica di *E. granulosus* (Marcato, 2002).

La cisti è già visibile dopo tre settimane dall'impianto dell'embrione esacanto nell'organo bersaglio dell'ospite intermedio.

Nella parete della cisti si distinguono, dall'esterno verso l'interno, il *pericistio* o *avventizia* e la *membrana elmintica*.

L'*avventizia* è uno strato di tessuto fibroso, costituito da cellule mononucleate, eosinofili, cellule giganti, cellule endoteliali e fibroblasti, ed è prodotta dall'ospite intermedio, come reazione di difesa nei confronti del parassita.

La *membrana elmintica* è a sua volta composta da due strati: uno *strato germinativo* o *membrana prolifera*, interno e sottilissimo (12-15 micron), ricco di cellule ed uno *strato cuticolare* o *membrana chitinosa*, di spessore variabile, a lamelle concentriche.

Nello strato germinativo si differenziano cellule che generano la sostanza chitinosa e cellule che determinano la fertilità dell'idatide. Esistono, infatti, idatidi fertili e sterili. L'idatide fertile è caratterizzata dalla presenza di *capsule* o *cisti prolifere* o *cisti nido* che contengono una sottilissima membrana con all'interno un minimo di 6 fino ad un massimo di 30 protoscolici. Le *cisti nido* sono biancastre, grandi come un granello di sabbia e aderiscono con un sottile peduncolo alla membrana germinativa rendendola granulosa, o in altra maniera, se ne distaccano rimanendo libere nel liquido cistico. Anche i protoscolici si possono rendere liberi, raccogliendosi sul fondo della cisti madre formando la così detta *sabbia idatidea*.

La tipologia più semplice di cisti è quella uniloculare, biancastra, sferoidale, di volume variabile, con una sola cavità contenente liquido incolore (*liquido idatideo*) e sabbia idatidea. La membrana germinativa risulta per lo più tappezzata da numerose vescicole proligere adese e distribuite in modo non uniforme. Risulta pertanto cisti sempre fertile, pur evidenziando nei diversi reperti, indipendentemente dalla loro grandezza, una notevole variabilità del numero e della vitalità dei protoscolici.

Si può considerare come una forma del parassita relativamente “giovane” (di alcuni anni), in grado di evolvere nel corso del tempo in forme più complesse come le *cisti multivescicolari* o *multiloculari*.

Il ciclo evolutivo della cisti viene spesso complicato da moltiplicazioni di idatidi primitive per la fuoriuscita, dalla cisti idatidea, di protoscolici che possono subire la trasformazione vescicolare, oppure perchè porzioni di membrana elmintica possono incunearsi nei tessuti pericistici, superare la capsula avventizia ed evolvere generando nuove idatidi, che rimangono unite e comunicanti con l'idatide madre oppure si rendono libere (cisti figlie esogene), portandosi in altre sedi e formando nuove idatidi. Meno frequentemente, le cisti figlie si formano all'interno dell'idatide madre (cisti figlie endogene), caratterizzate da una cavità occupata da liquido idatideo e da cisti figlie endogene, talora contenenti anche cisti nipoti. Risultano fertili nella maggior parte dei casi ed evidenziano in genere dimensioni notevoli (10-12 cm). Sebbene possano assumere una forma sferoidale, per lo più risultano lobate o plurilobate e talora a contorni irregolari, probabilmente a causa della pressione esercitata dalle cisti figlie verso l'esterno.

La vescicolizzazione secondaria è dovuta ad alterazioni parietali ed anche a soluzioni di continuo delle cisti madri indotte da traumi.

I protoscolici fuoriusciti dalla cisti lesionata possono raggiungere i bronchi, i dotti biliari, i vasi sanguigni, la pleura ed il peritoneo causando bronchiti, angiocoliti echinocistiche, embolismi echinocistici.

Quando la formazione di cisti figlie esogene, tutte allo stesso stadio di sviluppo e con propria capsula avventizia, avviene in un distretto parenchimale circoscritto, questa particolare idatidosi secondaria extracistica si denomina *cisti pseudomultiloculare*.

Spesso le cisti regrediscono e allora rimangono piccole, la loro cavità è riempita da strati di tessuto laminare sovrapposti e più volte ripiegati (*cisti iperlamine*) che si formano in seguito allo stipamento di cisti figlie collassate e collabite, che strettamente pressate, formano masse più o meno compatte e degenerate di tessuto laminare. A questo processo di trasformazione spesso concorre anche lo strato cuticolare, dopo la sua espansione e il suo distacco dal pericistio, andando talora a costituire la parte più cospicua degli strati di tessuto laminare presenti nella cavità. Queste cisti non sono più vitali, cioè non più in grado di produrre protoscolici, e pertanto risultano sterili. Tuttavia, vanno considerate cisti ex-fertili, come dimostrato dal costante ritrovamento tra i vari strati di tessuto laminare di uncini residui e di vescicole proligere e protoscolici altamente degenerati o colliquati.

Sono forme che possono permanere nell'organo in modo silente anche per molti anni (decenni), andando, eventualmente, incontro ad ulteriori processi degenerativi, caratterizzati, nei diversi casi, dall'accumulo di materiale caseoso, granuloso e/o gelatinoso. Pertanto, in relazione alla presenza di strati di tessuto laminare e al tipo di materiale a questi interposto, molte cisti appaiono come "iperlamine caseose", "iperlamine granulose" ed "iperlamine gelatinose".

Quando l'idatide è completamente degenerata, si ha la *cisti caseosa* o la *cisti calcifica*.

La *cisti caseosa* è caratterizzata da una cavità occupata esclusivamente da materiale denso, di colore giallastro, di consistenza cremosa o caseosa, del tutto simile al materiale presente nelle cisti iperlamine caseose. La diversità con queste è unicamente legata all'assenza di strati di tessuto laminare, per cui si può ipotizzare che in questo caso la degenerazione caseosa inizi in una fase antecedente lo sviluppo delle cisti figlie e prima dell'eventuale distacco dello strato cuticolare nella cavità.

La *cisti calcifica* è caratterizzata dalla solidificazione della cisti, con calcificazione delle pareti ed assorbimento del liquido cistico.

La calcificazione della cisti è segno certo della sua morte.

Infine, un'altra cisti frequentemente ritrovata è l'*acefalocisti* o *cisti sterile*. Quest'idatide è dotata di una membrana germinativa che non è in grado di produrre vescicole proligere e protoscolici e pertanto è caratterizzata da una cavità occupata soltanto da liquido idatideo (Casarosa, 1985, Marcato, 2002; Bortoletti G., 2007).

***Echinococcus granulosus* - Ciclo biologico**

E. granulosus, allo stadio adulto, vive nell'intestino tenue degli ospiti definitivi, cane e altri canidi (lupo, coyote, dingo, sciacallo, iena e alcune specie di volpi), che si infestano con l'ingestione di organi contenenti cisti idatidee con protoscolici vitali. Dopo l'ingestione, i protoscolici fuoriescono dalle cisti, si attaccano alla mucosa intestinale, grazie alle quattro ventose e agli uncini presenti sullo scolice, e si trasformano in stadi adulti (McManus e Thompson, 2003).

La maturità sessuale (lunghezza di 3-6 mm) è raggiunta nelle 4-5 settimane successive all'insediamento del protoscolice (periodo prepatente) (Cordero et al., 1999).

Le proglottidi gravide e le uova in esse contenute vengono eliminate nell'ambiente con le feci, contaminando terreno, pascoli e acqua, grazie anche alla estrema resistenza ai fattori chimico-fisici e climatici che le caratterizza (Laws, 1968).

Quando le uova vengono ingerite da un ospite intermedio specifico, rappresentato da diverse specie di ungulati domestici e selvatici e dall'uomo, si ha la disgregazione dell'embrioforo e l'attivazione dell'oncosfera (Thompson e Lymbery, 1995).

La disgregazione dell'embrioforo inizia nello stomaco grazie all'azione proteolitica della pepsina e si completa nell'intestino tenue tramite la pancreaticina.

L'embrione esacanto attivato, attraverso un complesso sistema muscolare responsabile di una serie di movimenti ritmici dell'intero corpo e degli uncini, si libera dai suoi involucri e si ancorai ai villi della mucosa intestinale, probabilmente proprio grazie ai suoi uncini.

Dopo l'ancoraggio, l'oncosfera penetra rapidamente attraverso l'epitelio, raggiungendo la lamina propria in 30-120 minuti, mediante i movimenti

del corpo e degli uncini coadiuvato dalle secrezioni prodotte dalle ghiandole di penetrazione, che causano la degenerazione dei tessuti dell'ospite (Thompson e Lymbery, 1995).

L'oncosfera, sfruttando la via ematica e quella linfatica, si diffonde in tutto l'organismo dell'ospite intermedio, localizzandosi prevalentemente nel fegato e nel polmone e più raramente nei muscoli, rene, milza, sistema nervoso centrale (SNC), tessuto osseo, encefalo, cuore e altri organi (qui riportati in ordine decrescente di frequenza di localizzazione).

In tali sedi, l'oncosfera diventa cisti idatidea (metacestode), tramite una serie di trasformazioni che durano da 1 a 14 giorni (Fig.1) (McManus e Thompson, 2003).

Negli organi bersaglio la cisti, di forma sferica e ripiena di liquido, si accresce di circa 1 cm l'anno, raggiungendo considerevoli dimensioni (McManus e Thompson, 2003).

***Echinococcus granulosus* - Epidemiologia nell'ospite definitivo e negli ospiti intermedi**

E. granulosus ha una distribuzione cosmopolita. E' stato isolato in tutti i continenti, con prevalenza più alta nei Paesi del Bacino del Mediterraneo, nella ex URSS, in Cina, in nord ed est Africa, Australia e Sud America (Eckert et al., 2001). In riferimento ai Paesi del Bacino del Mediterraneo, le incidenze e/o prevalenze sono riassunte nella review proposta da Seimenis (2003; Tabella 2).

Tabell 2. Incidenze e/o prevalenze dell' echinococcosi/idadidosi nei paesi del Bacino del Mediterraneo.

Country	Year	Human	Dog	Cattle	Sheep	Goat	Camels	Control Measures
Algeria	1997	2.09		◆◆◆	◆◆◆	◆◆	◆◆◆	◆◆◆◆
	1998	1.78		◆◆◆	◆◆◆	◆◆	◆◆◆	◆◆◆◆
	1999	2.27	9.4-12	22.3	69.8	7.9	42-56.5	◆◆◆◆
	2000	2.26		◆◆◆	◆◆◆	◆◆		◆◆◆◆
Bulgaria	1996			28.34	30.26			
	1997-2000	7.42	◆◆◆	9.2-25.9	◆◆◆◆	◆◆◆◆		
Egypt	1994	9.01	2 - 12.5	◆ 0.3 - 0.5	◆ 0.2 - 0.3	==	◆ 2.3 - 8.0	◆◆◆◆
	1997	4.29						◆◆◆◆
	2000	==	3-10	◆	◆◆	==	◆	◆◆◆◆
Italy	1990-1999	8.0	16-20	23.7	86.9	==		◆◆◆◆
Greece	1981	11.14	0-50	0-53	0-62	0-12		PnT(D)*
	1989-1998	3.5-1.22	0-10	0-5.3	0.23-21	0-6.8		
Jordan	1985-1994	2.9 - 8.2	11.1 - 15	◆ 11.4	◆◆ 1.3-4.5	0.5-2.3	8.8 - 26.7	◆◆◆◆*
	1995	==	9.7	12.9	12.7	0.9	11.1	◆◆◆◆*
Libya	1992	1.4 - 1.7	11.8 - 40.3	(◆) 5.4	◆ 12.7	◆ 1.5	◆ 39.8	P-
Morocco	1980-1992	3.06 - 5.5	22.8 - 58.8	23 - 57	◆◆◆	◆◆◆	==	◆◆◆◆
	2000	5.2-7.1	35-48.4	13-40	2.3 - 26	2.07 - 3.3	==	◆◆◆◆
Portugal	1998-2000	1.82	◆◆◆◆	◆◆◆◆	◆◆◆◆	◆◆◆◆		◆◆◆◆
Spain	1986	2.52	0 - 8	◆	76 - 82	◆◆◆◆		PaT*
	1998	0.75	0 - 1.3	◆	10 - 79.8	◆◆◆◆		PaT*
Syria	1993	◆◆◆◆	◆◆◆◆	3.3	2.8	2	==	Pr
Tunisia	1986-994	0.4-3.6	30 - 68	◆◆ 12-17	◆◆ 0.1-70	◆◆ 1-16	44.5	Pr*
	1999-2000	1.5-2.05	◆◆◆◆	◆◆◆◆	◆◆◆◆	◆◆◆◆	◆◆◆◆	◆◆◆◆
Turkey	1980-1992	0.38-1.02	0.32-59.2	2.8	3.9	2	==	T(D)*
	1987-1997	4.4	0.9-40.5	9.4	57.1		==	
	1994-1995	3.77	◆◆◆◆	◆◆◆◆	◆◆◆◆	◆◆◆◆	◆◆◆◆	◆◆◆◆
	2000-2001	4.00	◆◆◆◆	25.9	30.6	12.7	==	◆◆◆◆

CODE: **DISEASE CONTROL**
Pa Control programme for only some areas of the country or certain types of breeding
Pn Control programme for the whole country
Pr Control programme in preparation
P- No control programme
T(D) Treatment to owned dogs
* Notifiable disease
DISEASE OCCURRENCE
(◆) Exceptional occurrence
◆ Low sporadic occurrence
◆◆ Enzootic
◆◆◆ High occurrence
◆◆◆◆ No information available
== Not reported

From FAO/OIE/WHO Animal Health Yearbooks, WHO/O.I.E. Manual on Echinococcosis in Humans and Animals, 2001, country reports and other sources.

In riferimento alle diverse regioni italiane, i vari studi condotti nel corso degli anni sulla echinococcosi/idadidosi sono riassunti nelle review proposte da Garippa et al. (2004, 2006).

In Italia, la presenza di *E. granulosus* è legata soprattutto alle zone con maggior numero di allevamenti ovini, come Sardegna, Sicilia, Campania, Lazio ed Abruzzo (Garippa et al., 2004).

La prima delle indagini sulla diffusione della EC in Italia risale al 1952 (Pellegrini e Cilli, 1995) ed evidenzia una maggiore diffusione della parassitosi nelle regioni insulari e meridionali rispetto alle altre.

Nei bovini si passa, infatti, dal 4,08% dell'Italia settentrionale, all'11,45% di quella centrale, al 13,27% della meridionale, fino al 55,09% della Sardegna. Negli ovini le prevalenze sono state le seguenti: 15,93% al Nord, 14,94% al Sud, 21,74% al Centro con un picco del 41,76% in Toscana, 68,72% in Sardegna, 21,44% in Sicilia. Nei caprini le prevalenze variano tra l'1,82% del Nord (6,22% in Piemonte), l'8,14% del Centro (31,37% in Toscana), il 10,33% del Sud, il 7,55% della Sicilia e il 12,75% della Sardegna. La EC suina varia invece da un massimo del 19,81% in Sardegna, al 14,66% in Basilicata, al 13,24% in Umbria, al 3,21% in Sicilia fino al 2,01% in Emilia.

Sulla base di prospetti annuali inviati al Ministero della Sanità nel 1972-1977, Schiavo et al. (1979) rilevano le seguenti prevalenze: ovini 11,6%, caprini 5,6%, bovini 1,54%, suini 1,11%, equini 0,45%.

Altra indagine sulla diffusione della EC in Italia, è stata quella condotta da Romboli et al. (1980), usando informazioni e dati ufficiali, sebbene sottostimati. I dati nazionali riferiti al decennio 1968-1978 riportano le seguenti prevalenze: 8,1-15,2% per i bovini, 8,1-15,3% per gli ovini, 2,7-8,9% per i caprini, 0,7-1,2% per i suini e 0,4-0,9% per gli equini. I dati regionali che si riferiscono, invece, al periodo 1972-1978, sempre divisi

per specie animale confermano che la EC è più diffusa negli animali del Centro, Sud Italia e delle isole, rispetto a quelli del Nord Italia.

Infine l'indagine di Lorenzini e Ruggeri (1987), sebbene più recente, per i limiti insiti nella metodica di rilevamento dati (questionario inviato ai mattatoi di ogni capoluogo di provincia e il fatto che i dati della specie ovina e caprina sono associati), può solo confermare che la parassitosi è più diffusa nell'Italia meridionale ed insulare ed in particolare in quelle aree dove le tecnologie zootecniche sono meno sviluppate e gli animali, soprattutto gli ovini, sono allevati con metodi tradizionali.

Dati più recenti sulla diffusione della EC nel Nord Italia sono limitati alla Valle d'Aosta, Piemonte ed Emilia Romagna. In Valle d'Aosta, la prevalenza varia dallo 0,08% allo 0,18% negli animali da macello dal 1995 al 2003 (dati forniti dall'ASL della Valle d'Aosta). La relazione dell'attività 2002 dei Servizi Veterinari delle ASL della regione Piemonte riporta la presenza di EC nello 0,011% dei bovini macellati che risulta dimezzata rispetto al 2001 (0,023%) e una prevalenza sul patrimonio bovino regionale pari allo 0,006%. Per gli ovicaprini viene riportata una prevalenza dello 0,51% sui capi macellati e dello 0,085% sul patrimonio totale.

Faggioli et al. (2001) indicano la prevalenza di EC in animali regolarmente macellati in Emilia Romagna tra il 1996 e il 1999: suini 0,95/milione, bovini 0,39%, ovini 0,30%, caprini 0,39%, equini 0,34%.

Indagini svolte nel 2006 da Guazzetti et al. hanno evidenziato una presenza di EC nei bovini dello 0,41-0,54%.

Nel 2007 Manfredi et al., infine, riportano valori di EC dello 0,3% nelle pecore e di 0,1% nei bovini in Lombardia.

I dati disponibili per il Centro e il Sud Italia sono più numerosi, ma non sono sufficienti per avere un quadro ben chiaro della diffusione e soprattutto dell'evoluzione temporale della parassitosi.

In Abruzzo, l'evoluzione della parassitosi negli animali da reddito, e in particolare negli ovini e nei caprini, non appare lineare, poiché in alcuni periodi la regione è una delle più colpite, mentre in altri la prevalenza diminuisce. Nel 1981, Manilla (1986) riporta una percentuale del 50,8% in ovini adulti a Teramo (Gargiulo et al., 1987). In uno studio effettuato dal 1985 al 1989, solo su animali adulti, Schiavo et al. (1992) rilevano una diminuzione della positività nei bovini (3,5-2,3%) e negli equini (3,8-1%) e una stabilizzazione nei suini (0,3-0,6%). Nella specie caprina si è osservata una diminuzione dal 16,3% al 4,5%, ma con un picco del 22,5% nel 1988. In media, la situazione fu stabile durante i cinque anni per gli ovini con il 17,8%. Dati più recenti indicano nella provincia di Teramo (1985-1994) una prevalenza media del 32,14% in ovini/caprini e tra il 4 e il 6% in bovini, equini e suini (Tierì e Gatti, 1995). Recenti indagini svolte nell'ambito dei Programmi di Ricerca di Rilevante Interesse Nazionale (PRIN 2003) hanno evidenziato in ovini di 2-5 anni della provincia di Teramo una prevalenza del 22%, con una fertilità complessiva del 4,6%. Gli unici dati disponibili sugli ospiti definitivi in Abruzzo mostrano una positività per *E. granulosus* nel 4% di cani esaminati, dei quali il 2,6% erano randagi e il 50% cani da pastore (Di Ventura et al., 1995).

Gli ultimi dati epidemiologici hanno mostrato che la idatidosi è stata trovata nel 47% degli ovini macellati nella provincia di Arezzo (Bio e Fagiolo, 2004).

Queste prevalenze alte negli ospiti intermedi in Italia Centrale confermano che i precedenti dati disponibili sono probabilmente sottostimati e sono necessari ulteriori studi per capire meglio la diffusione dell'infezione.

In una indagine condotta in Puglia, sulla diffusione di *E. granulosus* nei cani si evidenziano prevalenze comprese tra il 12,9% nel periodo 1955-

1958, il 10,51% nel periodo 1962-1963 e il 5,73% nel periodo 1971-1974 (Puccini et al., 1975). Tra il 1975 e il 1982, la idatidosi è stata rilevata in circa il 4,88% degli ovini, il 3,9% dei caprini (Puccini e Tassi, 1983). Nel periodo 1989-1993, Schiavo e Pansini (1996) riscontrano prevalenze variabili dal 3,2% allo 0,47% negli ovini e dal 5,88% allo 0,35% nei caprini macellati nell'ASL1 di Taranto. Puccini riporta nel periodo 1978-1987 nella provincia di Lecce, una percentuale del 7% per i bovini, 14% per gli ovini, 12% per i caprini e nel macello di Foggia nel 2003, le seguenti prevalenze: 5,47% nei bovini, 5% negli ovini adulti, 0,02% negli equini.

Per il periodo 1996-2002, in Basilicata, Quaranta (2003), riporta la presenza di idatidosi nel 2-3% dei bovini, 5-28% degli ovini, 4-25% dei caprini, 0,05-0,5% per i suini, 0,04-0,1% per gli equini.

Studi effettuati in Campania, su bovini, ovini, caprini, suini ed equini macellati nelle province di Avellino e Salerno hanno permesso di rilevare una prevalenza media inferiore al 5%. Tuttavia, in alcuni distretti, sono state riscontrate negli ovini e nei bovini prevalenze tra il 16% e il 21% (Cringoli et al., 1998). Infine, per quanto riguarda la diffusione nell'ospite definitivo, Capurso et al. (1968), hanno evidenziato una diffusione, nei cani della città di Napoli e di alcuni comuni della provincia, dell'1% su 500 cani sottoposti ad esame necroscopico.

Numericamente superiori sono le indagini sulla parassitosi condotte in Sicilia. Le prime ricerche effettuate risalgono a Bertocchi (1951) che riporta prevalenze del 6-10% nei bovini macellati a Palermo, Messina, Catania e del 2,08% nei cani in provincia di Palermo. Panebianco e Sciotteri (1995) rilevano la idatidosi nel 4,6% dei cani a Messina e nel 3,4% dei cani a Palermo (Gallo e De Girolamo, 1960); nettamente superiori invece quelle riscontrate da Virga e Giannetto (1998) in cani da

pastore trattati con bromidrato di arecolina delle province di Agrigento (23,2%) e Palermo (16,2%).

Rilievi effettuati nel macello di Palermo tra il 1981 e il 1985, evidenziano una prevalenza del 29,41% negli ovini, 2,87% nei bovini, 2,69% negli equini e 0,32% nei suini (Demma et al., 1987). Tra il 1988-89, Virga (1991), sulla base delle registrazioni effettuate dagli ispettori veterinari ai sensi dell'O.M. 21 aprile 1964, rileva le seguenti prevalenze: bovini 2,29%, ovicaprini 10,90%, suini 0,82%, ed equini 3,1%. Magliarditti e Niutta (1995) mostrano una prevalenza dell'11,13% per i bovini, 43,22% per gli ovini, 2,85% per i caprini e 4,71% per i suini. Nel suino nero siciliano del Parco dei Nebrodi (ME), Poglayen et al. (2001) rilevano il 49% di positività e più recentemente (1998-2000) è stata riscontrata una prevalenza del 15,6% ed una fertilità dell'1,9% (Scala et al., 2001). Nel 2003, Poglayen et al., hanno rilevato una prevalenza di idatidosi del 15% negli ovini macellati in 8 province, con un massimo del 36,5% a Palermo ed un minimo del 6,5% ad Agrigento ed una fertilità media del 31%, variabile tra il 90% di Agrigento e il 13% delle province di Enna, Messina e Ragusa. Nel 2004, Giannetto et al., invece, hanno riscontrato una prevalenza del 67,1% nei bovini e del 57,6% negli ovini, con una percentuale di fertilità rispettivamente del 4,0% e del 9,2%.

Infine *E. granulosus* è stato riscontrato nel 19,3% dei cani da pastore delle province di Agrigento e Palermo (Giannetto et al., 1997).

In Sardegna, in base agli studi di Arru et al. (1990°) e Conchedda et al., (1997), la prevalenza di idatidosi si attesta sull'87% negli ovini, 24% nei caprini, 30% nei bovini e 20% nei suini, con tassi di fertilità del 40% negli ovini e del 30% nei caprini, 25% nei bovini e 25% nei suini.

Nel cane la prevalenza è dell'11% per i cani randagi e del 25,42% per i cani da pastore, con una prevalenza regionale complessiva del 16,2%

(Arru et al., 1990b). Inoltre, sebbene siano stati effettuati tre piani di eradicazione (1960, 1978 e 1987) (Arru et al., 1999), dati recenti dimostrano prevalenze ancora elevate: 75,6% negli ovini della provincia di Sassari, con presenza di cisti fertili del 6,9% degli animali esaminati e del 9,1% di quelli infetti (Scala et al., 2000a). Indagini condotte nel 1999 nella provincia di Cagliari (Scala et al., 2000b) evidenziano risultati simili, con una presenza di cisti idatidee nel 72,2% degli ovini. Più preoccupante è la situazione rilevata nel 2000 a Goceano, un distretto della Sardegna Centrale, tra le province di Sassari e Nuoro, con il 92,8% di prevalenza e fertilità del 27,1% (Soro et al., 2002). Risultati preliminari di un secondo studio su animali regolarmente macellati nelle province di Nuoro e Sassari evidenziano alti livelli di infestazione (82,6%) e fertilità (17,3%) superiori a quelli del primo studio, che erano rispettivamente del 70,6% e del 7,3%.

Recentemente in uno studio condotto da Varcasia et al. (2007) è stata evidenziata la presenza di EC nel 75,3% degli ovini, nel 41,5% dei bovini e nel 9,4% dei suini, con una fertilità rispettivamente del 10,3%, del 2,6% e del 7,9%. Infine, davvero pochi sono gli studi effettuati su animali selvatici in Italia. Un'indagine condotta da Arru et al. (1986) evidenzia una prevalenza della echinococcosi pari al 1,18% nelle volpi in Sardegna, mentre Guberti et al. (1983) riporta una prevalenza del 16,9% nei lupi.

***Echinococcus granulosus* - Epidemiologia dell'echinococcosi cistica nell'uomo**

Dal 1991 l'ISTAT non riporta più nei suoi Annuari il numero di casi di idatidosi umana verificatisi in Italia, poiché i casi denunciati erano molto pochi; basti pensare che nel 1991 erano solo 36. In realtà, la media era molto più alta ed inutili sono stati gli sforzi da parte di diversi gruppi di ricerca per dimostrare che la situazione era ben diversa (Gabriele et al., 2004).

Comunque, proprio grazie al lavoro dei singoli gruppi di ricerca italiani è stato possibile delineare un quadro indicativo dell'andamento di questa malattia nella popolazione umana in Italia.

In Tabella 3 sono riportati i dati delle più recenti rilevazioni effettuate su base regionale.

Tabella 3. Casi di idatidosi umana rilevati di recente in alcune Regioni italiane. Numeri assoluti e incidenza media annua per 100.000 abitanti (Gabriele et al., 2004)

	Operati		Diagnosticati
	N.casi	Incidenza	N.casi
Emilia Romagna (1989-1993)	324 ⁽¹⁾	1,57	200
Sardegna (1990-1995)	971 ⁽¹⁾	9,77	357
Sicilia (1989-1991)	361 ⁽²⁾	2,30	142
Puglia (1996-2000)	468 ⁽³⁾	2,33	707

(1) Solo residenti. (2) Quattro non residenti. (3) Residenti e non residenti, solo cisti epatiche.

L'incidenza della EC nell'uomo, soprattutto in Sardegna, risulta particolarmente alta. Questo dato è legato in particolar modo all'attività pastorale (circa 3 milioni di pecore) molto diffusa (Ecca et al., 1998).

Non in linea con quanto sopra appaiono i dati registrati in Emilia Romagna (Ostanello et al., 1997), considerato che in questa regione erano presenti solo 92.000 ovini. Si deve considerare però che gran parte dei casi erano pazienti residenti in altre regioni o persone residenti, immigrate da molto tempo, che avevano contratto l'idatidosi nelle loro Regioni di origine

Difficile è valutare la reale situazione anche in Sicilia e Puglia, ma l'aspetto importante che si ricava nel complesso da questi dati è che sebbene la stima dei casi di echinococcosi umana, risulta approssimativa ed imprecisa, è evidente che i soli casi operati in sole quattro Regioni ammontano ad alcune centinaia ogni anno (Gabriele et al., 2004).

Tabella 4. Incidenza media annua per 100.000 abitanti dei casi di idatidosi umana operati in alcune Regioni italiane in periodi diversi (Gabriele et al., 2004).

	1948-52 ⁽¹⁾	1980-84 ⁽²⁾	1989-93 ⁽⁴⁾	1989-91 ⁽⁵⁾	1990-95 ⁽⁶⁾	1996-00 ⁽⁷⁾
Abruzzi Molise	2,63	2,86 ⁽³⁾				
Basilicata	2,24	1,76				
Campania	0,51	0,46				
Emilia Romagna	0,99		1,57			
Lazio	2,33	2,03				
Puglia	1,86	1,07				2,33
Sardegna	14,88	12,51 ⁽⁶⁾			9,77	
Sicilia	1,90	1,99		2,30		
Toscana	2,31	0,89				
Umbria	1,34	1,36				

(1) Pellegrini e Cilli 1955; (2) Pauluzzi *et al.*, 1989; (3) Di Nardo *et al.*, 1987; (4) Ostanello *et al.*, 1997; (5) Virga *et al.*, 1994; (6) Ecca *et al.*, 1998; (7) Punzo *et al.*, 2002.

Da un esame più completo per confronto tra il periodo 1948-52 e il periodo 1980-84 (Tabella 4) si evidenzia come, in generale, vi sia stato

un calo, anche se leggero dell'incidenza tra il primo e il secondo periodo in diverse Regioni, mentre vi è un incremento nelle rilevazioni più recenti. Questo aumento si può spiegare con il fatto che nelle precedenti rilevazioni erano state escluse le case di cura private, che le tecniche di rilevamento si sono affinate nel tempo e la diagnostica per immagine ha fatto notevoli progressi. Infine l'evoluzione delle tecniche chirurgiche e anestesologiche ha permesso di operare anche casi prima considerati inoperabili soprattutto in persone anziane.

La reale pressione parassitaria nei confronti dell'uomo può però essere stimata valutando l'andamento delle cisti presumibilmente giovani, dovute a infestazioni recenti. Le cisti polmonari sono sicuramente giovani perché crescono in fretta trovando scarsa resistenza nel tessuto circostante, danno quindi una sintomatologia precoce e vengono operate tutte entro pochi anni dall'infestazione.

Le cisti epatiche invece rimangono silenziose a lungo, spesso per tutta la vita del soggetto (Gabriele et al., 1989).

La Tabella 5 mostra l'andamento nel tempo delle due localizzazioni principali. La caduta dei livelli igienico-sanitari e i movimenti di popolazioni dalle città alle campagne durante gli anni di guerra, hanno creato uno scenario decisamente favorevole all'aumento delle infestazioni, che si esplicita nel forte aumento dei casi polmonari operati a livello nazionale. La situazione in Sardegna non cambia nel decennio successivo (Floris et al., 1964).

Tabella 5. Percentuale dei casi di idatidosi umana localizzati al fegato o al polmone in diversi periodi (Gabriele et al., 2004).

	Tutte le Regioni ⁽¹⁾		Sardegna ⁽²⁾	Nove Regioni ⁽³⁾	Sicilia ⁽⁴⁾	Emilia Romagna ⁽⁵⁾	Sardegna ⁽⁶⁾
	1941	1952	(1951-60)	(1980-84)	(1989-91)	(1989-93)	(1990-95)
Fegato	59,1	39,8	39,0 ^(a)	70,1	86,7 ^(b)	62,0 ^(a)	75,9
Polmone	29,6	48,6	48,3 ^(a)	18,2	12,7 ^(b)	6,5 ^(a)	15,7

(1) Giromini e Granati 1954; (2) Floris *et al.*, 1964; (3) Pauluzzi *et al.*, 1989; (4) Virga *et al.*, 1994; (5) Ostanello *et al.*, 1996; (6) Ecce *et al.*, 1998. (a) Operati e diagnosticati; (b) comprese localizzazioni multiple, totale generale >100.

L'industrializzazione del Paese, l'inurbamento e il miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie hanno il loro effetto anche sull'idatidosi, l'incidenza delle polmonari crolla al 18,2‰0000 abitanti nel complesso di nove Regioni del centro-sud.

I dati più recenti mostrano un'ulteriore diminuzione della localizzazione polmonare in accordo con la diversa vocazione pastorale delle singole Regioni.

L'epidemiologia dell'idatidosi nell'uomo presenta comunque aspetti particolari, legati al modo di rilevamento di dati, sempre retrospettivo, e alla latenza spesso lunga tra infestione e individuazione della cisti. Il reale andamento di questa parassitosi, sia dal punto di vista parassitologico che da quello sanitario, potrebbe essere meglio descritto se si disponesse di serie temporali relative a lunghi periodi.

Pur con la scarsa disponibilità di dati è possibile fare alcune considerazioni. L'emergenza sanitaria, notevole in passato, si mantiene ancora a livelli relativamente alti, l'incidenza attuale dei casi operati infatti risente ancora e probabilmente risentirà per parecchi anni del probabile alto tasso di infestazione che si aveva 30-40 anni fa.

Purtroppo le recenti disposizioni sulla tutela della privacy anche in campo sanitario, renderanno sempre più difficile l'accesso a dati

sensibili, come quelli anagrafici o delle cartelle cliniche, ma essenziali per una corretta ed attuale conoscenza dell'epatite umana (Gabriele et al., 2004).

In riferimento ai paesi del bacino del Mediterraneo le incidenze e/o prevalenze sono riassunte nella review proposta da Seimenis (2003; Tab.2).

***Echinococcus granulosus* - Epidemiologia molecolare nel Mondo**

Esistono due cicli di trasmissione di *E. granulosus*: uno classificato come “domestico”, che coinvolge i cani domestici come ospiti definitivi e diverse specie di ungulati domestici come ospiti intermedi; l’altro è classificato come “selvatico” e coinvolge canidi selvatici come ospiti definitivi e/o ospiti intermedi selvatici, come cervi, alci, ecc. (Eckert e Deplazes, 2004), quantunque la loro importanza zootecnica sia minima se paragonata ai cicli domestici (Thompson e McManus, 2001).

In Africa anche il leone viene annoverato tra gli ospiti definitivi di *E. granulosus*, ma è il solo felide considerato coinvolto nel ciclo biologico del parassita.

In Australia, esistono entrambi i cicli: il primo sembra coinvolgere gli ovini, considerati i principali ospiti intermedi; bovini e suini sembrano giocare solo un ruolo marginale nella diffusione, in quanto ospiti intermedi accidentali con cisti usualmente sterili. L’altro ciclo coinvolge macropodi marsupiali (canguri). Esiste un’interazione tra questi due cicli grazie ad alcune specie di carnivori (cani domestici, cani selvatici, dingo e volpi rosse) che fungono da ospiti definitivi. Studi morfologici, analisi isoenzimatiche e analisi del DNA, hanno evidenziato la presenza del genotipo ovino (G1) (Hope et al., 1992).

In Sud America un ruolo importante come ospite definitivo è rappresentato dalla volpe del genere *Dusicyon*. Molto probabilmente anche la volpe rossa (*Vulpes vulpes*), presente anche in Europa, potrebbe avere un ruolo nella diffusione di *E. granulosus*, essendo sensibile all’infestazione, come è stato riscontrato in Australia (Thompson, 1983; Jenkins e Craig, 1992; Jenkins e Morris, 2003), Iran (Dalimi et al., 2002; Dalimi et al., 2006) e nel Regno Unito (Clarkson e Walters, 1991; Jones e Walters, 1992; Richards et al., 1995).

Altri cicli selvatici che coinvolgono lupi, cani da slitta, cervi, alci, renne, si sono diffusi in regioni montagnose del Nord America ed Europa (Rausch, 1995).

Il ciclo “domestico” cane-pecora, è comunque, quello più diffuso nel mondo e di rilevante importanza per la salute pubblica (McManus, 2002).

E. granulosus sensu stricto è altamente endemico e tra i tre genotipi che comprende, quello ovino G1 è il più presente in Europa, soprattutto nel Bacino del Mediterraneo (in particolar modo Spagna, Grecia e Italia Meridionale ed Insulare) ed in Gran Bretagna (Thompson e McManus, 2002; Jekins et al., 2005; Varcasia et al., 2007), a causa della notevole presenza di allevamenti ovini in tali zone.

E. granulosus sensu stricto ha un ciclo domestico e coinvolge il cane come ospite definitivo e per lo più la pecora come ospite intermedio. Tuttavia, in alcuni stati, come la Bulgaria, sono coinvolti canidi selvatici, per esempio il lupo, come ospiti definitivi (Breyer et al., 2004).

La presenza di questa specie coincide anche con l’alta prevalenza dell’idatidosi umana (Craig, 1996).

Recentemente G1 è stato identificato anche in Romania, in ovini, bovini e uomini (Bart et al., 2004) e il genotipo ovino Tasmania (G2) in ovini e bovini (Bart et al., 2006).

In Cina, dove l’idatidosi è la patologia che dà maggiori problemi alla salute pubblica, visto che più casi sono stati registrati in ben 22 province, studi eseguiti con diverse tecniche molecolari, hanno evidenziato che il “genotipo ovino” è il più diffuso nelle regioni nord-orientali. Inoltre, gran parte degli animali da reddito agirebbero da serbatoio per l’infezione dell’uomo (McManus et al., 1994; Zhang et al., 1998).

In India sono stati ritrovati sia il ceppo G2 che quello bufalo G3 nei bufali (Bhattacharya et al., 2007).

In alcuni stati dell’Africa settentrionale (Algeria ed Egitto) il ceppo G1 è stato trovato nell’uomo, oltre che in pecore e bovini (Bart et al., 2004; Azab et al., 2004).

Studi effettuati in Libia su 30 cisti idatidee (12 da bovini, 3 da uomini, 5 da cammelli, 10 da ovini) hanno rivelato che tutti gli isolati appartenevano al genotipo G1 (Tashani et al., 2002).

In Tunisia, il genotipo più diffuso è il G1, che infesta i cammelli (Lahmar et al., 2004).

Secondo una ricerca effettuata in Iran nel 1998 (Zhang et al., 1998) su 200 isolati, il genotipo ovino sarebbe quello più presente in ovini, caprini, bovini, uomo e, occasionalmente, cammelli.

La idatidosi rappresenta una grossa piaga per la salute pubblica anche in Argentina, essendo endemica in molte zone del Paese. Analisi molecolari hanno dimostrato la presenza di numerosi genotipi, tra i quali il G1 e il G2 in ovini e uomini (Rosenzvit et al., 1999).

Il genotipo equino G4, invece è stato riscontrato in equidi (cavalli, asini e zebre) di diverse zone del Mondo (Europa, Medio Oriente e Sud Africa) (Thompson e McManus, 2002; Daniel Mwambete et al., 2004). Non sono, comunque, mai stati documentati casi umani, suggerendo, quindi, l’apatogenicità per l’uomo di tale genotipo.

Il genotipo bovino G5 non è molto diffuso e sporadici casi sono stati ritrovati in Asia, alcune zone dell’Africa (Magambo et al., 2006) e in Sud America e fino ad oggi solo un caso umano è stato collegato a questo genotipo, dimostrando quindi una bassa patogenicità per l’uomo (Bowles et al., 1992).

Il genotipo cammello G6, quello suino G7, il ceppo cervide G8, il genotipo uomo G9 e il ceppo finnoscandinavo G10 sono stati trovati raramente e confinati ognuno in specifiche zone, tanto che si pensa che siano varianti geografiche di un’unica specie di *Echinococcus*.

Nell'Africa settentrionale (Marocco, Algeria, Tunisia, Libia ed Egitto), il ceppo del cammello G6 insieme a quello ovino G1 è il più diffuso sia nell'uomo che negli animali (Macpherson e Wachira, 1997; Bardonnet et al., 2003).

In Kenya (Africa centro-orientale), c'è un'alta incidenza della idatidosi che è iperendemica all'interno di due comunità di pastori, i Turkana nel nord-ovest e i Massai nel sud-ovest. Analisi molecolari dimostrano la presenza di due genotipi (ovino G1 e cammello G6) e il genotipo cammello sarebbe maggiormente concentrato nella regione del Turkana, dove è più diffuso l'allevamento di questi animali. Le specie di ospiti intermedi per entrambi i genotipi sembrano simili (ovini, caprini, cammelli e bovini) ad eccezione del fatto che il genotipo cammello non è stato isolato da nessuno dei casi umani di idatidosi esaminati (Wachira et al., 1993).

In Sudan è stato identificato il ceppo G6 nell'uomo (Omer et al., 2004) e recentemente anche in ovini, bovini, cammelli, cani e volpi (*Vulpes pallida*) (Elmahdi et al., 2007).

Secondo una ricerca effettuata in Iran il genotipo cammello (G6) è presente nei cammelli ed in isolati umani, oltre che in ovini e bovini (Harandi, 2002).

In Nepal, dove l'idatidosi è ritenuta un grande problema per la salute pubblica anche nelle aree urbane, due isolati umani sono stati identificati come G6 (Zhang et al., 2000).

Infine, anche in Argentina, come in Asia, è stata dimostrata la presenza del genotipo cammello nell'uomo ed inoltre è stato riscontrato il genotipo suino (G7) nei suini (Schantz et al., 1995; Rosenzvit et al., 1999).

Il genotipo G7 è stato isolato in suini anche in Spagna, Polonia, Romania, Lituania, Slovacchia e Ucraina (Kedra et al., 1999; Snabel et

al., 2000; Gonzalez et al., 2002; Bart et al., 2004) e recentemente in Grecia nelle capre (Varcasia et al., 2007) e in Turchia negli ovini e nell'uomo (Snabel et al., 2007).

La presenza del genotipo G7 in molti dei Paesi dell'Est e del Sud-Est Europa è dovuta al fatto che la macellazione privata dei suini è una pratica comune in queste zone. Comunque, l'infettività di questo genotipo per l'uomo è bassa (Pawlowski et al., 1993).

In Canada e Alaska, un ciclo selvatico coinvolge cani o lupi come ospiti definitivi, ed alci, renne e altri cervidi come ospiti intermedi del genotipo cervide G8 (Rausch, 2003).

La validità del ceppo G9 (ritrovato solo in Polonia; Scott et al., 1997) è stata messa in discussione da diversi autori e sembra che esso corrisponda al genotipo G7 (Snabel et al., 2000).

La presenza del genotipo cervide finnoscandinavo (G10) è stata confermata nel Nord-Est della Finlandia ed in Svezia (Lavikainen et al., 2003) e anch'esso sembra avere bassa infettività per l'uomo (Oksanen e Lavikainen, 2004).

***Echinococcus granulosus* - Epidemiologia molecolare in Italia**

In Italia, la presenza di *E. granulosus* è legata soprattutto alle zone con un cospicuo numero di allevamenti ovini, come Sardegna, Sicilia, Campania, Lazio ed Abruzzo (Garippa et al., 2004).

Il ceppo ovino G1 è stato isolato in ovini e bovini in Abruzzo (Giangaspero et al., 2006) e Sicilia (Brianti et al., 2006), mentre in Sardegna è stato riscontrato in ovini e suini (Scala et al., 2006), e in Lazio in ovini, bovini, cinghiali e uomo (Busi et al., 2007a).

Il ceppo ovino Tasmania G2 è stato ritrovato in ovini e bovini del Lazio e della Sardegna (Busi et al., 2004, 2007a).

Il ceppo bufalo G3 è presente in bovini in Abruzzo (Giangaspero et al., 2006) e in ovini, bovini cinghiali e uomo nel Lazio (Busi et al., 2007a).

Il genotipo equino G4 è stato riscontrato solo in equini in Sardegna (Scala et al., 2006).

Il ceppo bovino G5, invece, non è molto diffuso ed è stato isolato recentemente in Italia da un solo bovino allevato in Lombardia (Casulli et al., 2007).

Il genotipo G7, infine, è stato identificato nei suini in Sardegna (Scala et al., 2006).

***Echinococcus granulosus* - Problemi clinici**

L'echinococcosi nell'ospite definitivo è quasi sempre asintomatica, anche in presenza di migliaia di cestodi.

Negli ospiti intermedi, l'idatidosi può risultare a lungo subclinica, soprattutto se le sedi colpite sono quelle epatica, polmonare o renale, mentre è possibile notare manifestazioni cliniche nel caso in cui le cisti presentino localizzazioni ossee o al SNC.

Negli ovini le idatidi sono localizzate in uno o più organi, prevalentemente fegato e polmone, ma anche milza, cuore, rene e altri organi possono essere infestati (Orlando, 1997). Anche nei caprini, fegato e polmone sono i siti prediletti del parassita (Rausch, 1995).

Nei bovini, le cisti sono spesso uniloculari, sterili e presenti in più organi (in genere fegato e polmone). Se i bovini sono infestati dal genotipo G5 (bovino), le cisti sono localizzate per lo più nel polmone e sono fertili (Eckert et al., 2001). Meno frequentemente si trovano nella milza, nel cuore, cervello e nel midollo spinale (Rausch, 1995).

Nel bufalo il 90% delle cisti ritrovate sono sterili. Le cisti si localizzano soprattutto nei polmoni, ma anche nel fegato, con minore incidenza nella milza, rene, cuore, cervello, diaframma e muscolatura uterina. Sono stati riscontrati anche molti casi di idatidosi secondaria localizzata a livello di pleura e peritoneo. Questi casi derivano dalla rottura delle cisti primarie localizzate nel polmone e nel fegato (Thompson, 1977).

Negli equini, le cisti si accrescono molto lentamente, infatti in cavalli di 11-16 anni non superano i 4 cm di diametro, tuttavia si possono trovare anche cisti più grandi che spesso risultano asintomatiche (Thompson e Smith, 1975). Il fegato è l'organo più parassitato, ma sono state ritrovate cisti anche nei polmoni, cervello, cuore, pericardio, pleura, milza, rene

ed utero. In alcuni casi, gli equini possono presentare manifestazioni cliniche della parassitosi (Bauer et al., 1986; Hermann et al., 1988).

In un caso riscontrato in Svizzera (Hermann et al., 1988), un cavallo di 9 anni, di razza Irish, è risultato fortemente parassitato con oltre 100 cisti epatiche e polmonari (del diametro variabile tra 1 ed 8 cm) e mostrava una evidente epatomegalia (fegato di circa 6,5 volte più grande del normale), notevole rialzo dei livelli sierici degli enzimi epatici, iperbetaglobulinemia, coliche intermittenti, ostruzione polmonare cronica, anoressia ed emaciazione.

Nei suini, la forma di idatidosi epatica è la più comune, ma cisti sono state ritrovate anche nei polmoni, rene, milza, cuore, muscoli e raramente nei testicoli (Rausch, 1986).

Anche se spesso questa parassitosi negli ospiti intermedi è asintomatica, sono stati registrati casi di animali in cui si ha un abbassamento dell'indice di conversione, di riproduzione, della produzione di latte, di lana o pellame (Battelli, 2004). Questi effetti sono economicamente importanti soprattutto in zone endemiche povere (Torgerson et al., 2000, 2001).

Nell'uomo, la fase iniziale dell'infezione è quasi sempre asintomatica, perchè lo sviluppo delle cisti è estremamente lento (può durare molti mesi o diversi anni), infatti, spesso le infestioni contratte in età giovanile si rivelano dopo anni.

La natura e l'intensità delle manifestazioni cliniche dipendono dal numero di cisti presenti, dalla loro localizzazione ed evoluzione.

In alcuni casi, infatti, la cisti idatidea regredisce spontaneamente con parziale riassorbimento o calcificazione.

La presenza delle cisti può diventare sintomatica in seguito a rottura della parete cistica o per azione compressiva della cisti in accrescimento,

oppure, in seguito a contaminazione batterica, si può trasformare in un ascesso.

La rottura improvvisa dovuta a traumi o a casi spontanei può causare la disseminazione secondaria dei protoscolici (idatidosi secondaria; può essere anche una conseguenza di un'operazione di idatidosi primaria) con la comparsa di reazioni di ipersensibilità (per la liberazione nell'organismo degli antigeni del parassita che presentano un elevato potere immunogeno).

Si possono così avere eosinofilia, orticaria, prurito, dispnea, crisi asmatiche fino allo shock anafilattico (McManus, 2003).

Più del 90% delle cisti si localizzano nel fegato e/o in entrambi i polmoni; sono riportate occasionalmente (2-3%) nel rene, nella milza, nella cavità peritoneale, nei muscoli e raramente (1%) nel cuore, cervello, colonna vertebrale, ovaie (Menghebat et al., 1993).

Complicanze dovute alla rottura delle cisti sono: colangite e ostruzione epatica da cisti figlie nei condotti biliari, bronchiti a livello polmonare, embolia a livello cardiaco. La presenza di cisti a livello osseo determina spesso fratture e le cisti a localizzazione encefalica si manifestano con deficit neurologici focali o segni di ipertensione endocranica (McManus, 2003).

***Echinococcus granulosus* - Diagnosi**

Considerando l'alta diffusione della idatidosi, risulta fondamentale poter disporre di metodiche veloci e sensibili per poter diagnosticare la parassitosi negli ospiti definitivi.

Un'accurata diagnosi dell'infestazione nell'ospite definitivo, infatti, gioca un ruolo importante negli studi epidemiologici e nei programmi di controllo dell'idatidosi (Pawlowski, 2001).

La diagnosi di echinococcosi nel cane, nonostante l'ausilio delle moderne tecnologie, è tuttora un problema solo parzialmente risolto.

In passato, la diagnosi era affidata all'esclusivo riscontro diretto del parassita (esame necroscopico) nell'intestino o all'uso di purganti che permettevano l'espulsione dei parassiti adulti e quindi la loro evidenziazione nelle feci (esame macroscopico).

Il miglior metodo per l'esame necroscopico è conosciuto come "tecnica di sedimentazione e conta" (STC) (Eckert et al., 2001). Questa tecnica consiste nella sedimentazione del contenuto intestinale e nella conta dei parassiti adulti al microscopio. Sebbene questo metodo sia molto sensibile e specifico, è laborioso ed eticamente discutibile, in quanto può essere utilizzato solo su animali morti.

Il trattamento con purganti quali il bromidrato di arecolina è stato per molti anni l'unica alternativa all'esame necroscopico e anche l'unica possibilità di diagnosi dell'animale in vita.

L'arecolina è una sostanza parasimpaticomimetica che, somministrata ai cani *per os* alla dose di 1,75-3,5 mg/kg di peso vivo, incrementa i movimenti peristaltici intestinali, favorendo il distacco dei cestodi e quindi la loro possibile evidenziazione nelle feci emesse subito dopo il trattamento.

Per la sua alta specificità, sono state numerose le ricerche epidemiologiche realizzate con questa metodica, tuttavia presenta diversi inconvenienti quali: contaminazione ambientale, elevati rischi per l'operatore, percentuale elevata di soggetti "non sensibili alla purga" e non ultimo la sua incompatibilità con il benessere animale (Eckert et al., 2001).

Nella diagnosi parassitologica una tecnica "classica" è l'esame copromicroscopico previo arricchimento (flottazione) volto alla ricerca ed identificazione delle uova dei parassiti. Le infezioni da *E. granulosus* negli ospiti definitivi (canidi) non possono essere diagnosticati con la ricerca microscopica delle uova nei campioni di feci in quanto le uova di questo parassita non sono morfologicamente distinguibili da quelle di *E. multilocularis* e delle altre specie di *Taenia*.

Inoltre, l'emissione di uova è incostante e naturalmente non presente durante il periodo prepatente.

L'esame coprologico potrebbe risultare utile, invece, se associato a tecniche più specifiche, come quelle immunologiche o quelle biomolecolari (Varcasia, 2004).

Anticorpi sistemici, specifici (IgG, IgA e IgE) contro gli antigeni dei protoscolici di *E. granulosus* possono essere rilevati nel siero di cani infestati (Gasser et al., 1993) tramite tecniche immunoenzimatiche (ELISA).

Tuttavia, uno dei problemi legato a questa metodica è principalmente dovuto alla persistenza degli anticorpi dopo l'eliminazione del parassita. Inoltre, la presenza dei parassiti nell'intestino si associa ad una ridotta risposta immunitaria sistemica che ha sempre messo in discussione la reale potenzialità di questo test diagnostico (Eckert et al., 2001).

Ulteriori perfezionamenti di metodiche volte alla ricerca delle diverse classi anticorpali ne hanno aumentato la sensibilità (Gasser et al., 1992);

tuttavia non si è ancora riusciti a spiegare come alcuni cani, anche con cariche parassitarie elevate, risultino sierologicamente negativi (Craig et al., 1995).

Alla diagnosi sierologica si preferisce la diagnosi immuno coprologica, basata sul rilevamento, mediante metodiche immunoenzimatiche, nelle feci, dei cosiddetti coproantigeni (CA), rappresentati da antigeni somatici del parassita adulto (Allan et al., 1992) e da prodotti di secrezione-escrezione rilasciati dalle proglottidi (Deplazes et al., 1992).

La sensibilità (> del 96% per cani infestati con più di 100 esemplari di *E. granulosus*) e la specificità (> 96,5%) di queste tecniche è notevole, come è documentato in numerosi studi (Craig et al., 1995).

Studi comparativi fra la diagnosi sierologica e quella immuno coprologica su cani infestati, hanno dimostrato come la seconda metodica sia 2,5 volte più sensibile rispetto alla diagnosi sierologica (Craig et al., 1995).

Inoltre, si è visto che i CA possono essere identificati anche nelle feci di animali con infezione prepatente e quindi in assenza di uova (Allan et al., 1990; Deplazes et al., 1990); infatti, in cani infestati sperimentalmente i CA sono rilevabili già a partire da 5-10 giorni dopo l'infezione e scompaiono in 2-5 giorni dopo l'eliminazione del parassita (Deplazes et al., 1992; Sakashita et al., 1995).

In commercio esistono due kits ELISA che utilizzano anticorpi policlonali di coniglio per la ricerca dei CA: *Echinococcus-ELISA* (Genzyme-Virotech GmbH, Germania) ed il *Chekit Echinotest* (Bommeli AG, Svizzera).

Tuttavia, sono tuttora in corso lavori sperimentali per la validazione di ELISA con anticorpi monoclonali (MAb) rivolti contro antigeni somatici di *E. granulosus* (Sakai et al., 1995; Malgor et al., 1997), che

permetterebbero una maggiore specificità del test e la drastica riduzione delle cross-reazioni con altri cestodi (e quindi dei falsi positivi).

Recentemente, è stata messa a punto una ELISA sandwich per la ricerca di CA, che utilizza due anticorpi monoclonali murini: EgC1 ed EgC3, rivolti verso antigeni di secrezione-escrezione prodotti da *E. granulosus* (Casaravilla et al., 2005). Il complesso antigene-anticorpo è rilevato mediante l'utilizzo di anticorpi policlonali di coniglio specifici per i prodotti di escrezione/secrezione del cestode.

Sette degli 8 cani sperimentalmente infettati e testati con anticorpi EgC1, e tutti e 8 i cani testati con EgC3, sono risultati positivi. Inoltre, i campioni di feci provenienti da 2 cani sperimentalmente infettati con *E. multilocularis* sono risultati negativi per l'ELISA con EgC1. Questo risultato evidenzia che questa tecnica potrebbe essere utilizzata per discriminare infezioni da *E. granulosus* da quelle sostenute da *E. multilocularis* (Casaravilla et al., 2005).

La bassa sensibilità e specificità della copro-ELISA in zone dove si osserva una bassa prevalenza di *E. granulosus* può costituire un fattore limitante l'impiego di questa tecnica. Un altro fattore limitante della tecnica ELISA è il problema delle cross-reazioni con altri cestodi appartenenti alla famiglia Taeniidae.

Negli anni '90, grazie ai progressi della biologia molecolare, sono comparsi i primi lavori di PCR (Polymerase Chain Reaction) per la diagnosi di echinococcosi nel cane. Tale metodica è utile quando c'è una bassa presenza del parassita nell'ospite definitivo (Christofi et al., 2002) e soprattutto per discriminare le infestazioni da *Echinococcus* rispetto a quelle di altre tenie. Infatti, grazie alla sua alta sensibilità e specificità, la PCR consente di fare una diagnosi "di certezza" della presenza del parassita (proglottidi e/o uova) nel materiale fecale (Cabrera et al., 2002; Abbasi et al., 2003; Dinkel et al., 2004; Stefanic et al., 2004).

Due metodi differenti vengono usati per isolare il DNA: uno prevede l'estrazione del DNA dalle feci tal quale, un altro invece, prevede prima la concentrazione delle uova, mediante l'utilizzo di soluzioni flottanti (Mathis et al., 1996). Questo secondo protocollo sembra molto utile, perché le feci contengono sostanze che inibiscono la PCR e quindi è spesso indispensabile una laboriosa purificazione del DNA (Stefanic et al., 2004).

Tuttavia, è opportuno considerare che, sebbene la PCR sia una tecnica molto sensibile, che consente di rilevare la presenza anche di un solo uovo, l'estrazione del DNA parassitario dalle feci è abbastanza complessa ed è comunque legata alla presenza delle uova. Quindi, considerando la incostante emissione di uova da parte di *E. granulosus*, una PCR negativa non può escludere la presenza del parassita (Varcasia, 2004).

Negli animali ospiti intermedi, la diagnosi dell'idatidosi si basa prevalentemente sull'esame anatomico-patologico, per la messa in evidenza delle cisti nei vari organi.

In molti casi, infatti, la parassitosi è asintomatica e richiede tecniche diagnostiche sofisticate per l'identificazione delle cisti, come l'ecografia, usata talvolta nei piccoli ruminanti (ovini e caprini) (Roneus et al., 1982; Lahmar et al., 2007) e per gli equini (Hermann et al., 1988).

Negli ospiti intermedi la diagnosi su base sierologica è resa difficile dalla cross-reattività antigenica con altre specie di *Taenia* come *T. hydatigena* e *T. ovis* e dal fatto che gli ospiti intermedi producono scarse risposte anticorpali (McManus et al., 2003).

Il rilevamento degli antigeni circolanti, invece, non sembra essere utile a scopi diagnostici (McManus et al., 2003).

Nell'uomo, la diagnosi certa di idatidosi cistica, nella maggioranza dei casi, avviene mediante la diagnostica per immagini: radiologia (usata per

la diagnosi di cisti polmonari, ossee o muscolari), ecografia (per la diagnosi di cisti addominali o muscolari; Tabella 6), tomografia assiale computerizzata (TAC) (che consente la diagnosi in tutti gli organi) e risonanza magnetica (per lo studio post-chirurgico delle lesioni residue e delle recidive) (Pawlowski et al., 2001).

Tuttavia, tali tecniche, non sono sempre risolutive, poiché le cisti, alcune volte possono presentare un “aspetto atipico” che non permette di differenziarle da ascessi o tumori e spesso sono richieste metodiche sierologiche (Siracusano et al., 2006).

Tabella 6. Classificazione ecografia dell’Informal Working Group on Echinococcosis – World Health Organization. Le cisti sono organizzate in lesioni cistiche di natura non specificata (CL), attive (CE1, CE2) e inattive (CE4, CE5) (da Garlaschelli et al., 2004).

Stadio secondo classificazione WHO	Caratteristiche ecografiche
CL	Lesione cistica generica ; di natura non ancora determinata
CE1	Cisti parassitaria completamente liquida, indistinguibile da una cisti semplice
CE2	Cisti parassitaria liquida con cisti figlie al suo interno
CE3a	Cisti parassitaria liquida con distacco della membrana
CE3b	Cisti parassitaria solida ma con cisti figlie al suo interno
CE4	Cisti parassitaria solida
CE5	Cisti parassitaria calcifica

L’immunodiagnosi non è utile solo per la diagnosi precoce, ma anche per monitorare i pazienti dopo trattamenti chirurgici e/o farmacologici (Ito, 2002).

La scelta di una tecnica sierologica dipende dalla sua sensibilità e specificità.

La metodica per la ricerca degli antigeni circolanti è risultata finora meno sensibile di quella per la ricerca degli anticorpi, che rimane il metodo di scelta.

L'ELISA, l'emoagglutinazione indiretta (IHA) e l'immunoblotting sono i metodi immunologici più usati. Meno usati sono l'immunofluorescenza (IFAT) e l'arc5 immunoelettroforesi (IEF) (McManus et al., 2003).

Il liquido cistico costituito da glico-lipoproteine, carboidrati e sali, è la principale fonte antigenica per l'immunodiagnosi (Zhang e McManus, 2003). Le lipoproteine, antigene B (AgB) e antigene 5 (Ag5), sono i maggiori componenti del liquido cistico e vengono largamente usati per l'immunodiagnosi dell'iatidiosi (Poretti et al., 1999).

Tuttavia vi sono notevoli difficoltà nell'impiego di questi antigeni relative a problemi di standardizzazione del loro utilizzo e la loro bassa specificità e sensibilità.

Spesso, infatti, si hanno falsi positivi in corso di neoplasie o di cirrosi epatica o falsi negativi nel caso di cisti recenti (CE1) o in fase involutiva (CE4-5). Le cross-reazioni con antigeni di altri parassiti, in particolare di altre tenie, infine, sono il problema maggiore.

Attualmente, comunque, non c'è nessun metodo standardizzato altamente sensibile e specifico utilizzabile per la rilevazione di anticorpi nei casi di malattia conclamata (McManus et al., 2003).

La risposta anticorpale, infatti, varia a seconda delle caratteristiche della cisti idatidea quali la localizzazione (più intensa nelle cisti epatiche ed ossee rispetto a quelle cerebrali o spleniche dove si può avere anche una sieronegatività), la vitalità (cisti fertili sono accompagnate da una risposta immunitaria più forte rispetto a quella di cisti sterili, senescenti

o calcifiche) e l'integrità (cisti integre sono meno immunogeniche di cisti fessurate).

I metodi sierologici utilizzati per seguire la fase post-chirurgica o post-farmacologica, sono invece volti alla ricerca delle IgG4, IgE ed IgM in quanto tali classi anticorpali tendono a scomparire dopo una terapia efficace.

Un approccio innovativo si basa sul dosaggio dell'Interleuchina 4 nel siero; infatti, questa citochina tende a ridursi di livello se la terapia intrapresa è stata efficace (McManus et al., 2003).

***Echinococcus granulosus* - Terapia negli ospiti definitivi**

Chemioterapia

Negli ospiti definitivi sono diverse le molecole farmacologiche testate verso *E. granulosus* (Gemmel e Johnstone, 1981; Eckert, 1986; Roberson, 1988; Oakley, 1991; Bauer, 1994; Nonaka et al., 1996).

Fino al 1970, il trattamento nei cani veniva effettuato mediante l'utilizzo di purghe a base di bromidrato di arecolina, ma dovevano essere eseguiti anche 9 trattamenti per eliminare il 99,9% dei parassiti (Eckert, 1986).

Oggi il farmaco di prima scelta per il trattamento della echinococcosi nel cane è il praziquantel, un isochinolonico pyrazine derivato (2 - cyclohexylcarbonyl - 1, 2, 3, 6, 7, 11b - hexahydro-2-H-pyrazino [2, 1] isoquinoline-4-one (*Droncit*, *Drontal*, *Bioquantel*, *Seroquantel* ed altri nomi commerciali) (Eckert, 1986).

La dose raccomandata nei cani e nei gatti è di 5,0 mg/kg/p.v. *per os* e di 5,7 mg/kg p.v. per via intramuscolare. A questi dosaggi il farmaco è risultato altamente efficace verso gli stadi a localizzazione intestinale (immaturi e maturi) di *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *Taenia* spp. ed altri cestodi (WHO, 1984; Oakley, 1991; Bauer, 1994).

Tuttavia, questa molecola non presenta azione ovicida (Thakur et al., 1979). Nella maggior parte degli studi effettuati, una singola somministrazione orale di praziquantel (5,0 mg/kg/pv) è stata efficace al 100% verso *E. granulosus* in tutti i cani trattati e solo in alcuni studi è stata riportata una residua seppur bassa carica parassitaria (Oakley, 1991; Bauer, 1994).

Il Praziquantel è disponibile in compresse ed in formulazione iniettabile per somministrazione intramuscolare (quella sottocutanea è meno efficace verso *Echinococcus*) (WHO, 1984).

Il Praziquantel è caratterizzato da un alto indice di sicurezza (nel cane > 36), anche negli animali gravidi sono tollerati alti dosaggi per prolungati periodi senza presentare danno agli organi e disturbi della riproduzione (Thomas e Gonnert, 1978; Andrews et al., 1983).

Epsiprantel è la molecola di più recente introduzione, strutturalmente molto simile al praziquantel (2-(cyclohexylcaronyl)-4-oxo-1,2,3,4,7,8,12b-octahydropyrazino[2,1a][2]benzazepine).

Epsiprantel (*Cestex*) è disponibile in compresse per somministrazione a cani (5,5 mg/kg/pv *per os*) e a gatti (2,75 mg/kg/pv).

Questo farmaco è altamente efficace verso diverse specie di *Taenia* e *Dipylidium caninum* nei cani e nei gatti (Corwin et al., 1989; Manger e Brewer, 1989; Oakley, 1991), ed anche verso *Echinococcus* spp.

In due ricerche (Arru et al., 1990b; Thompson et al., 1991), una singola somministrazione di epsiprantel alla dose di 5,0 mg/kg pv ha eliminato in media il 99,9% di *E. granulosus* dai cani.

Tuttavia, in questi studi solo 2 dei 10 cani risultarono completamente liberi da *E. granulosus* dopo il trattamento.

Epsiprantel è ben tollerato nei cani e nei gatti (indici di sicurezza di 90 nel cane e di 36 nel gatto). A differenza del praziquantel, epsiprantel è limitatamente assorbito dall'ospite, e quindi è ipotizzata una azione diretta verso i cestodi (Manger e Brewer, 1989).

Altre molecole come il nitroscanato e vari benzimidazolici sono risultati parzialmente efficaci verso *E. granulosus*, ma nessuna di esse raggiunge i livelli di efficacia degli isochinolonici (pranziquantel e epsiprantel).

Per i programmi di controllo della echinococcosi nel cane, Cabrera et al. (1996) suggeriscono un trattamento ripetuto ad intervalli di 6 settimane, in quanto il periodo di prepatenza di questa tenia supera i 42 giorni.

Tuttavia, possono residuare basse cariche parassitarie, specialmente dopo il trattamento con epsiprantel, quindi è consigliabile un secondo trattamento da ripetersi dopo 1-7 giorni dal primo.

I risultati dei trattamenti farmacologici dovrebbero essere valutati con copro-ELISA o se possibile PCR.

E' stata studiata anche la reazione immunitaria degli ospiti definitivi sia all'infestazione di *E. granulosus* e di altre tenie, sia alla vaccinazione.

Un considerevole numero di esperimenti per indurre l'immunità attraverso la vaccinazione è stato fatto con vaccini inattivati. A tale scopo sono stati usati antigeni presenti nel liquido cistico, estratti di membrana cistica, parassiti adulti e protoscolici, ma con scarsi risultati (Heath, 1986, 1995).

***Echinococcus granulosus* - Terapia negli ospiti intermedi**

Diversi gruppi di farmaci citostatici, antibiotici, sulfonamidici, antiprotozoari e molti antielmintici sono stati testati contro lo stadio metacestode di *Echinococcus*. Risultati incoraggianti sono stati ottenuti con i benzimidazolici. I primi studi sugli effetti antielmintici di questo gruppo di sostanze verso i cestodi sono stati condotti da Thienpont et al. (1974), che descrissero gli effetti del mebendazolo su *T. taeniformis* nel topo. In seguito, sono stati effettuati diversi studi usando altri derivati benzimidazolici, come l'albendazolo, il fenbendazolo e il flubendazolo. Questi ultimi sono stati testati su topi con idatidosi secondaria indotta sperimentalmente mediante iniezione intraperitoneale di protoscolici di *E. granulosus*. La dose efficace per la riduzione di volume e la scomparsa delle cisti era di 30-50 mg/kg p.v. somministrata per 60-80 giorni (Eckert, 1986; Amman e Eckert, 1995).

Studi su animali domestici, sono stati effettuati utilizzando solo il mebendazolo su ovini e suini. Per eliminare i protoscolici, 50 mg/kg di mebendazolo sono stati somministrati giornalmente per 3 mesi (Gammel e Roberts, 1995).

Sono stati testati gli effetti del praziquantel, anche sulle cisti degli ospiti intermedi, anche se con risultati contrastanti. Si è visto, infatti, che questo farmaco inibisce lo sviluppo delle cisti nel topo fino al 97% se somministrato per pochi giorni prima dell'infezione con protoscolici.

Se, invece, viene somministrato dopo l'infezione, l'efficacia diminuisce notevolmente (78%). Anche in ovini infestati sperimentalmente con *E. granulosus* e trattati con praziquantel, sia somministrato per via sottocutanea (50 mg/kg) che per via orale (100 mg/kg), non sono stati rilevati effetti visibili sulle cisti (Richards et al., 1988).

Notevoli passi avanti sono stati fatti nella profilassi dell'infestazione degli ospiti intermedi con gli stadi larvali del cestode in Australia e in Nuova Zelanda. E' stato, infatti, messo a punto un vaccino ricombinante per *T. ovis* negli ovini, usando antigeni derivati dalle oncosfere (Johnson e Baverstock, 1989; Lightowlers, 1994; Lightowlers e Gottstein, 1995). Recentemente, usando lo stesso principio, è stato sperimentato un vaccino ricombinante contro *E. granulosus* (EG 95) e si è visto che negli ovini il livello di protezione ottenuto nei confronti delle uova era del 97-98% (Heath e Lightowlers, 1997; Jenkis, 1998; Lightowlers et al., 1999). Nei bovini, invece, Heath et al. (2003) hanno descritto un livello di protezione, acquisita grazie all'EG 95, tra l'89 e il 99%. Un alto livello di immunità persiste per 6 mesi ed in ovini gravidi alti livelli di anticorpi vengono trasferiti agli agnelli (Heath et al., 2003). Quindi, in base alle conoscenze odierne, piani di vaccinazione con più richiami, potrebbero essere utili per ottenere una elevata protezione del gregge (Heath et al., 2003).

***Echinococcus granulosus* - Terapia nell'uomo**

In medicina umana la terapia chirurgica è stata ed è a tutt'oggi considerata il trattamento più efficace della idatidosi (Eckert et al., 2001). E' indicata per le cisti di grosse dimensioni contenenti diverse cisti figlie, per quelle superficiali o prossime alla rottura, per quelle complicate da infezioni e localizzate in organi vitali. L'intervento chirurgico non può essere praticato in pazienti con cisti molto piccole, multiple o di difficile accesso, cisti parzialmente o totalmente calcificate. Il trattamento chirurgico è spesso molto invasivo e quindi controindicato in pazienti anziani e/o con altre complicanze (come problemi cardiaci, renali o epatici, diabete, ecc.) e nelle donne in gravidanza.

Le tecniche chirurgiche sono di due tipi: radicale e conservativa (Menezes da Silva, 2003). Le metodiche di asportazione delle cisti, più radicali, sono associate a rischi più alti, anche se sono associate ad una bassa incidenza di recidive.

La recidiva è usualmente dovuta ad una incompleta asportazione della cisti o allo sviluppo di cisti che durante l'intervento erano passate inosservate. L'incidenza di recidive varia dal 2 al 25%.

Le tecniche chirurgiche radicali comportano l'enucleazione della cisti con il prelievo del tessuto circostante (ad esempio epatectomia parziale o lobectomia, in caso di cisti multiple localizzate in una parte o in un unico lobo) o enucleazione di cisti di medio, piccolo calibro localizzate superficialmente (pericistectomia).

L'intervento conservativo prevede invece l'endocistectomia (con o senza omentoplastica) eseguita svuotando la cisti e rimuovendo l'intero endocistio o (palliativo) il drenaggio della cisti infetta. Nel caso di cisti non infette a volte è il drenaggio stesso ad essere causa di sovrainfezioni. Inoltre, lasciando in sede la membrana pericistica si possono avere delle

complicanze legate alla formazione di fistole biliari, infezioni batteriche, sepsi e recidive locali.

La mortalità è di circa il 2% ed è legata il più delle volte a reazioni anafilattiche per fuoriuscita di liquido cistico (Amman e Eckert, 1996).

L'introduzione di un efficace trattamento chemioterapico pre-operatorio con benzimidazolici, ha ridotto la necessità di procedure chirurgiche troppo invasive, poiché ammorbidisce le cisti e ne riduce la pressione interna.

Alcuni studi sono stati effettuati anche per valutare l'efficacia chemioterapica sull'incidenza di recidive post-operatorie (Morris e Taylor, 1988; Amman e Eckert, 1995). Nei topi, lo sviluppo delle cisti derivanti da protoscolici inoculati per via intraperitoneale si è ridotto dell'80-90% se il trattamento con albendazolo viene iniziato dopo l'inoculo per una settimana (10 mg/kg al giorno) (Morris e Taylor, 1988). In base a ciò, nel caso di fuoriuscita di protoscolici, durante l'intervento, è meglio effettuare un trattamento post-operatorio con albendazolo o mebendazolo, immediatamente dopo l'operazione per 1 mese (albendazolo) e per 3 mesi (mebendazolo).

L'uso di protoscolicidi durante l'intervento è invece dubbio, poiché non esiste una sostanza che risulti contemporaneamente efficace e sicura (Eckert et al., 2001). L'azione letale osservata *in vitro* potrebbe essere annullata *in vivo* dall'instabilità della sostanza utilizzata (per es. perossido di idrogeno) o dalla sua difficoltà di penetrare nelle cisti figlie. I protoscolicidi a più basso rischio di tossicità sono l'etanolo (70-95%), i sali ipertonici (15-20%) e la cetramide (0,5%). La formalina non deve mai essere utilizzata. Per un'ottima efficacia, le sostanze protoscolicide devono essere lasciate nella cavità della cisti per almeno 15 minuti. Inoltre, se c'è continuità tra le vie biliari e la cisti potrebbero

manifestarsi colangiti da cause chimiche (colangite sclerosante fatale) (Eckert et al., 2001).

A metà degli anni '80 è stata introdotta una tecnica chirurgica per il trattamento dell'idatidosi in maniera poco invasiva, meno pericolosa e più economica del trattamento chirurgico: la PAIR (Puncture, Aspiration, Injection, Reaspiration) (Brunetti et al., 2004). Tale metodica prevede la puntura percutanea ecoguidata, l'aspirazione del contenuto delle cisti e l'iniezione di sostanze ad azione scolicida (non esiste una sostanza che sia allo stesso tempo efficace e sicura, si usano preferibilmente soluzioni alcoliche sterili, contenenti il 95% di etanolo o soluzioni saline ipertoniche; approssimativamente si aggiungono in quantità equivalente a 1/3 del liquido aspirato) ed infine la riaspirazione del contenuto cistico dopo 5 minuti. Se si utilizza una soluzione ipertonica di NaCl (almeno al 15%) come sostanza scolicida, l'azione è più lenta, quindi la riaspirazione deve avvenire dopo 15-20 minuti (Eckert e Deplazes, 2004).

Solo medici esperti possono effettuare questa tecnica, con il supporto di personale di terapia intensiva pronto ad intervenire nel caso di complicanze intraoperatorie.

La PAIR dovrebbe essere effettuata solo in pazienti sottoposti ad un precedente trattamento chemioterapico di 4 giorni con benzimidazolici e per almeno 1 mese post-PAIR con albendazolo o per 3 mesi con mebendazolo, in modo da limitare il rischio di insorgenza di cisti secondarie.

La PAIR è la tecnica più adatta per le cisti epatiche CL, CE 1, CE 2 e CE 3, in particolar modo se con un diametro superiore ai 5 cm di diametro e per cisti multiloculari e multiple, sempre superiori ai 5 cm (Eckert e Deplazes, 2004).

Questa tecnica può essere utilizzata anche in pazienti che hanno presentato recidive dopo l'intervento chirurgico o dopo scarsa risposta ai chemioterapici; è invece controindicata per il trattamento di cisti superficiali o inaccessibili e per cisti che sono calcificate o in comunicazione con i dotti biliari (per pericolo di colangite, dovuta all'eventuale contatto dell'agente scolicida con le vie biliari) e per le cisti polmonari (Eckert et al., 2001).

Effetti collaterali associati alla PAIR sono presenti in circa il 28% dei pazienti non trattati precedentemente con albendazolo, che si riducono al 5-10% in caso di contemporaneo trattamento chemioterapico. I rischi di questa tecnica sono quelli associati alla puntura (emorragia, danno meccanico di tessuti ed infezioni), shock anafilattico o reazioni allergiche causate dalla fuoriuscita del liquido cistico, l'idatidosi secondaria e la colangite sclerosante chimica.

I casi di recidiva sembrano essere rari (1-6%), così come gli esiti mortali (0,1%) (McManus et al., 2003).

In riferimento al trattamento farmacologico delle cisti idatidee, oltre 2000 casi ben documentati, sono stati invece trattati con i benzimidazolici (Ammann e Eckert, 1996; De Rosa et al., 1996; Horton, 1997). Dopo 12 mesi dall'inizio della cura, il 10-30% dei pazienti hanno mostrato la regressione delle cisti, il 50-70% la degenerazione delle stesse e/o una significativa riduzione, ma il 20-30% non ha mostrato alcun cambiamento. I casi di recidiva sono piuttosto alti (fino al 14-25%), ma sono, in genere, sensibili ad un secondo trattamento (Todorov, 1997).

La chemioterapia è apparentemente più efficace sui giovani pazienti che su quelli anziani. Il trattamento chemioterapico è indicato per pazienti inoperabili o con cisti multiple in uno o più organi o anche per prevenire l'idatidosi secondaria. La chemioterapia è controindicata per cisti grandi

con rischio di rottura, molto superficiali, complicate da infezioni secondarie, calcificate. Inoltre, pazienti con insufficienza epatica non possono essere trattati con chemioterapici.

Due benzimidazolici, albendazolo e mebendazolo, sono i capisaldi del trattamento chemioterapico della EC. Studi effettuati da Horton (1997) hanno evidenziato che l'albendazolo al dosaggio di 10-15 mg/Kg/die (due dosi giornaliere) ha determinato su 665 cisti trattate la scomparsa nel 48% e la riduzione nel 24%. Il mebendazolo al dosaggio di 40-50 mg/kg/die (tre dosi giornaliere) è risultato, invece, meno efficace in quanto in solo il 28% di 516 cisti trattate si è avuta la completa scomparsa e nel 30% la riduzione delle stesse.

Anche il praziquantel è stato usato per il trattamento dell'EC in umana. In uno studio recente si è visto che il praziquantel (25 mg/kg/die) in associazione all'albendazolo (10mg/kg/die) un mese prima dell'intervento avrebbe un effetto più potente del solo albendazolo (Cobo et al., 1998).

Il trattamento chemioterapico è un trattamento non invasivo che può essere usato su pazienti di qualunque età ed è meno limitato dallo stato dei pazienti (escluso donne gravide) rispetto al trattamento chirurgico, anche se va effettuato per lunghi periodi (3-6 mesi) con risultati non sempre prevedibili e differenze di risposta da individuo ad individuo (Eckert et al., 2001).

L'efficacia della terapia è legata alla durata del trattamento, al tipo e alla localizzazione della cisti trattata, e alla concentrazione ematica raggiunta dal farmaco.

Le cisti giovani sembrano essere più responsive probabilmente a causa della presenza di una membrana pericistica più sottile o di un metabolismo più attivo (Brunetti et al., 2004).

Effetti collaterali abbastanza comuni sono rialzo delle transaminasi, nausea, epatotossicità, neutropenia, proteinuria, disturbi gastrointestinali e, solo occasionalmente, alopecia. I potenziali rischi includono anche embriotossicità e teratogenicità che, comunque, sono state osservate solo negli animali da laboratorio durante i primi mesi di gravidanza.

Sono necessari controlli medici ed esami di laboratorio per monitorare l'eventuale comparsa di effetti collaterali, inizialmente ogni due settimane, poi mensilmente. Tutti i pazienti dovrebbero essere controllati per quanto riguarda la conta leucocitaria ogni due settimane per i primi tre mesi, perché si potrebbe avere una leucopenia non sempre reversibile, durante le primi fasi del trattamento (Eckert et al., 2001).

***Echinococcus granulosus* - Controllo e piani di eradicazione**

Negli ultimi trent'anni, un'ampia esperienza è stata raggiunta a livello internazionale circa le dinamiche di trasmissione ed i metodi di controllo di *E. granulosus*.

Due filosofie sono state applicate nel controllo.

La prima si basa su un “*approccio orizzontale*”, finalizzato principalmente alla salute umana, che si basa sullo sviluppo socio-economico della popolazione migliorando le condizioni e lo stile di vita. Questo approccio include l'educazione sanitaria, il miglioramento delle condizioni igieniche e sanitarie, il miglioramento dei controlli sugli alimenti. Questa metodologia tuttavia può non sempre risultare specifica per il controllo di *E. granulosus* e talvolta non si associa ad una riduzione della prevalenza della malattia (Gemmell, 1997; Gemmell e Schantz, 1997, Schantz, 1997, Schantz et al., 1995).

Di contro, sembra che uno specifico programma di controllo, che possa essere di successo, debba essere targato sul parassita e quindi debba prevedere un “*approccio verticale*” con l'utilizzo, per esempio, dell'arecolina bromidrato per la diagnosi in vita nei cani e sul trattamento regolare degli stessi volto alla eliminazione del parassita.

Questo approccio enfatizza l'utilizzo dei farmaci.

Queste due differenti filosofie di controllo non si escludono ma, anzi, devono essere considerate complementari.

L'approccio verticale prevede necessariamente indagini epidemiologiche di base e la sorveglianza degli ospiti intermedi al fine di monitorarne i progressi (Gemmell et al., 1986b, 1987; Gemmell e Schantz, 1997; Schantz, 1997, Schantz et al., 1995).

Le fasi di un programma di controllo

Sulla base dei programmi svolti nel corso del XX secolo, il controllo della echionoccosi-idadidosi può essere strutturato in quattro fasi:

- I) fase preparatoria o di planning
- II) fase di attacco
- III) fase di consolidamento
- IV) fase di mantenimento della eradicazione

Durante la fase di attacco le misure di controllo sono applicate indiscriminatamente alla totalità della popolazione ospite a rischio.

Un esempio di questo sono il trattamento antielmintico di tutti i cani presenti in una determinata area e l'introduzione di misure restrittive sulla alimentazione degli stessi.

Nella fase di consolidamento, attraverso la sorveglianza epidemiologica, devono essere identificate le aree e/o le aziende "a rischio" e solo verso loro vanno indirizzate tutte le misure di controllo. In questa fase l'ispezione delle carni e la messa in quarantena degli infetti sono premesse fondamentali.

Il mantenimento della fase di eradicazione può essere messo in atto una volta che il parassita è stato probabilmente eliminato. Questa ultima fase si basa principalmente sul controllo ispettivo delle carni insieme con un regolare controllo alle frontiere per prevenire la reintroduzione della malattia (Gemmell e Roberts, 1995; Gemmel, 1987; Gemmell e Schantz, 1997; Gemmel et al., 1986a, b, 1987).

In alcuni Paesi, la sola attuazione di programmi di educazione sanitaria, sono stati sufficienti per far capire la necessità di misure di prevenzione, mentre in altri, l'educazione sanitaria è stata associata a leggi appropriate. Solo in pochi Paesi - Islanda (1863-1960), Nuova Zelanda

(1938-2002), Tasmania (1964-1996), Cipro (1971-1985), Isole Falkland (1965-1997), due province dell'Argentina (Neuquen, 1970-1988 e Rio Grande, 1980-1997) e Cile (1978) - sono stati messi a punto programmi di controllo efficaci per l'eradicazione del parassita negli ospiti definitivi e intermedi (Craig e Larrieu, 2006).

Questo spiega il peggioramento o al massimo la stabile situazione del quadro epidemiologico della echinococcosi-iatidiosi a livello mondiale.

La Campagna di eradicazione in Islanda è stato uno dei primi programmi di controllo specifico ed è forse l'unico esempio di "approccio orizzontale", basato sulla sola educazione sanitaria, che abbia portato ad una significativa diminuzione della trasmissione della parassitosi. La principale ragione del successo di questo tipo di programma in Islanda è stata l'alta percentuale di persone colte presenti nel Paese, nonché l'obbligo di leggere l'opuscolo sul controllo dell'iatidiosi proposto da Krabbe (1864).

Questo tipo di piano di controllo, anche se è molto economico, è molto lento, ed è stato utilizzato in Islanda solo dal 1863 al 1890.

Anche in Nuova Zelanda è stato utilizzato inizialmente un tipo di "approccio orizzontale" (1938-1958), ma senza alcun effetto positivo, perciò dal 1959, è stato invece adottato un "approccio verticale", basato sul trattamento dei cani con bromidrato di arecolina.

Pur basandosi sulle stesse metodiche, la "fase di attacco" della Nuova Zelanda (13 anni di trattamento con arecolina, seguiti da 19 anni di trattamento con praziquantel) è stata più lunga di quella della Tasmania (11 anni). Ciò è stato conseguenza principalmente delle differenze di gestione del piano di eradicazione; infatti, mentre quello della Nuova Zelanda è stato gestito da un organo non governativo, il Consiglio Nazionale per l'iatidiosi, quello della Tasmania è stato gestito dal Dipartimento dell'Agricoltura.

Un altro motivo della maggiore efficienza del piano di attacco della Tasmania è stato la scelta del Dipartimento dell'Agricoltura di utilizzare una unità mobile che si occupasse dello screening annuale dei cani rispetto alla scelta della Nuova Zelanda di un Centro di controllo centralizzato.

Comunque, entrambi i programmi basati sull'uso dell'arecolina nei cani, hanno portato ad una eradicazione di *E. granulosus* nel giro di 20-25 anni e la scomparsa di casi umani in 10-12 anni dall'inizio della fase di attacco (Liu, 1997).

Il programma delle Isole Falkland, con una fase di attacco durata anch'essa 32 anni, è stato relativamente efficace, infatti non ha portato alla completa eliminazione del parassita, poiché come in Islanda c'era una notevole difficoltà ad attuare le misure di controllo in diverse aziende ovine isolate (Reichel et al., 1996).

Cipro, invece, ha adottato un approccio di eradicazione molto veloce, basato sulla massiva riduzione della popolazione canina randagia e che ha portato alla riduzione della trasmissione, fino alla scomparsa di casi umani nuovi in 7-10 anni. Anche se nel 1985 il programma di eradicazione è stato dichiarato chiuso, dal 1993 si è dovuto riattuare, poiché in seguito alla divisione dell'isola nel 1974, solo nella parte greca si era continuato il programma.

L'esempio di Cipro dimostra che la fase di consolidazione, basata sulla sorveglianza, deve essere protratta nel tempo, al fine di prevenire il riemergere della parassitosi in seguito a movimenti di cani e bestiame dalle zone non controllate.

I programmi di controllo continentali, invece, non sono stati così efficienti.

In Sud America, per esempio, sebbene in molti stati siano state adottate misure preventive, solo in Cile e in Argentina si è avuta una diminuzione

dell'echinococcosi, soprattutto grazie all'attuazione dei programmi già messi a punto sulle isole con buon esito (uso del Praziquantel come nelle Isole Falkland e in Nuova Zelanda dopo il 1990).

Anche in Europa, molti Paesi o quantomeno regioni hanno cercato di attuare misure preventive o piani di controllo ed eradicazione (Scozia, Bulgaria, Croazia, Grecia, Sardegna e Spagna), ma ancora senza alcun successo.

In Sardegna sono stati messi a punto tre piani di controllo ed eradicazione. Il primo ebbe inizio nel luglio 1960 a Nuoro, per poi estendersi nel 1962 alle province di Cagliari e Sassari. La Campagna fu condotta con un "approccio verticale" che prevedeva innanzitutto un piano di educazione sanitaria tramite proiezione nelle scuole e nelle piazze dei paesi di un filmato prodotto dall'ENPI e distribuzione di opuscoli informativi. Inoltre la Campagna prevedeva un trattamento dei cani con bromidrato di arecolina somministrato 1 volta l'anno nel periodo 1962-63 e 2 volte nel 1964.

Si proseguì stentatamente fino al 1967 quando l'inadeguatezza dei finanziamenti e la scarsa efficacia del tenifugo, unite al forte peso delle carenze strutturali, alla precarietà dei sistemi di macellazione, alla scarsa consapevolezza della popolazione e al venir meno della volontà politica determinarono l'interrompersi della Campagna.

Solo nel 1976 però la Giunta Regionale approvò la seconda Campagna di lotta alla EC che, a parte gli esigui fondi stanziati inizialmente (appena 2 miliardi), non venne poi rifinanziata. Prescindendo quindi dall'inevitabile episodicità degli interventi, la Campagna si basava anche stavolta sull'educazione sanitaria e il trattamento dei cani. Stavolta il farmaco era il praziquantel, definito però erroneamente dalla stampa locale come "vaccino" e il trattamento era condotto su base volontaria con l'invito rivolto ai proprietari dei cani a recarsi in un luogo specifico

di concentramento portando con sé un pezzetto di carne dove il farmaco sarebbe stato nascosto per la somministrazione, senza peraltro particolari precauzioni successive, nonostante il farmaco fosse notoriamente un vermifugo e non un ovicida.

Alla fine degli anni '80 la Regione Sardegna approvò un nuovo “Piano di azione per la eradicazione della Echinococcosi/Idatidosi” e ne affidò la realizzazione ad una Agenzia individuata nello Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna sotto la guida di un team di esperti, stanziando 15 milioni di € di finanziamento in 10 anni. I capisaldi del programma erano: l'educazione sanitaria degli allevatori e della popolazione attraverso videoproiezioni, distribuzione di opuscoli informativi e incontri tra veterinari e allevatori; controllo della popolazione canina attraverso anagrafatura, uso di microchips, trattamento farmacologico con praziquantel di tutti i cani, seguito da distruzione per incenerimento delle deiezioni; controllo della macellazione con la definizione di misure amministrative e legislative per il controllo e l'ispezione delle carni anche durante la macellazione domiciliare, per migliorarne il controllo, come prescritto dalle legislazioni specifiche (Bortoletti, dati personali).

Il fatto che solo pochi Paesi sono riusciti a realizzare adeguati piani di controllo e/o eradicazione, dimostra la complessità e la diversità dei fattori che contribuiscono al mantenimento della infezione.

Perciò, ciascun programma di controllo deve adattarsi ed essere specifico per le diverse condizioni locali e deve basarsi sul contemporaneo coinvolgimento di differenti figure professionali: medici veterinari ed umani, proprietari dei cani, allevatori, macellai, personale addetto alla macellazione ed alla distruzione di carcasse ed organi sequestrati.

Inoltre, un altro prerequisito in un programma di controllo è la sensibilizzazione delle autorità amministrative all'importanza della echinococcosi-iatridosi ed al rischio zoonosico ad essa associato.

Queste condizioni sono essenziali per il raggiungimento del controllo della malattia, ma richiedono un notevole sforzo sia in termini legislativi, che educativi ed attuativi da parte di tutti gli operatori (Masala e Parodi, 2004).

In Italia, l'azione di lotta contro tale parassitosi è imperniata su tre cardini essenziali, così come descritto nel Regolamento di polizia veterinaria (Benazzi, 2002 - Capitolo XXXVI).

Basi della lotta

- *educazione sanitaria delle popolazioni, volta a far conoscere le modalità di contagio ed i mezzi di difesa igienica;*
- *attrezzature nei macelli per la distruzione dei visceri colpiti da cisti di Echinococco;*
- *trattamento antielmintico dei cani pastore e da caccia, specie nelle zone ove l'infestazione è più diffusa per la presenza dell'allevamento ovino.*

Trattamento antielmintico dei cani

Circa il trattamento antielmintico dei cani, è opportuno richiamare l'attenzione dei colleghi sulla necessità di metter sotto controllo gli animali, ai quali viene somministrato il medicinale per un periodo di tempo, così da provvedere alla raccolta ed al trattamento delle feci evacuate, ed evitare il disperdimento massivo di uova del parassita, che si può verificare qualora i cani vengono lasciati in libertà.

Disposizioni Normative

O.M. 21 aprile 1964

Profilassi della idatidosi

Art. 1 - Alle malattie degli animali, per le quali si applicano le disposizioni del regolamento di polizia veterinaria, approvato con D.P.R. 8 febbraio 1954, n. 320, è aggiunta l'idatidosi (echinococcosi).

Art. 2 - I casi di idatidosi (echinococcosi) degli animali non sono soggetti a denuncia nei modi stabiliti dagli art. 2, 3 del regolamento di polizia veterinaria..

I veterinari addetti all'ispezione delle carni, tuttavia, devono riportare su un registro, conforme al modello allegato, i casi di idatidosi (echinococcosi) riscontrati negli animali macellati. I dati raccolti nel predetto registro devono essere trasmessi annualmente al veterinario provinciale.

I visceri infestati da cisti di Echinococco devono essere sequestrati e totalmente distrutti.

Nell'ambito degli impianti pubblici e privati di macellazione non è consentita la presenza dei cani.

*Art. 3 - I direttori degli istituti e dei laboratori, indicati all art. 6 del D.P.R.. 8 febbraio 1954, n. 320, devono informare il veterinario provinciale ed il veterinario comunale dei casi accertati di infestazione nel cane da *E. granulosus*.*

Il veterinario comunale a sua volta informa l'ufficiale sanitario e provvede al trattamento antielmintico obbligatorio nei cani nei quali sia stata accertata l'infestazione.

Art. 4 - Nelle province ove l'idatidosi assume notevole diffusione, i veterinari provinciali, previa autorizzazione del Ministero della Sanità, possono rendere obbligatorio, con apposita ordinanza, il trattamento antielmintico periodico contro E. granulosus dei casi esistenti nel territorio della provincia.

Art. 5 - I trattamenti antielmintici, resi obbligatori in conformità del disposto dell'articolo precedente, devono essere eseguiti dai veterinari comunali, o da veterinari appositamente incaricati dal veterinario provinciale, secondo le norme che verranno fissate nell'ordinanza suddetta.

Art. 6 - Trascorso il termine fissato nell'ordinanza di cui al precedente articolo 4 per l'esecuzione del trattamento antielmintico, sarà proceduto d'ufficio, a spese dei proprietari interessati e con le modalità previste nella legge comunale e provinciale, al trattamento dei casi che non risultano trattati.

Inoltre, in base al D.M. del 15 dicembre 1990, l'idatidosi, in quanto zoonosi, era classificata come malattia di classe quinta e come tale doveva essere notificata dal medico curante all'unità sanitaria, indicando la malattia sospetta o accertata, gli elementi identificativi del paziente, gli accertamenti diagnostici eventualmente effettuati, la data di comparsa della malattia. Dall'unità sanitaria locale, la notifica doveva essere fatta alla regione, poi al Ministero, all'ISS e all'ISTAT attraverso appositi modelli.

Dal 1991 tale notifica non viene più effettuata in quanto l'echinococcosi non è più ritenuta un problema di rilevante importanza (Gabriele et al., 2004).

***Echinococcus granulosus* - Impatto socio-economico dell'echinococcosi cistica**

Negli animali le conseguenze dell'EC sono: riduzione della quantità e della qualità della carne, della produzione di latte e di lana; riduzione delle nascite; diminuzione dell'indice di accrescimento.

E' difficile quantizzare tali perdite ed escludere eventuali fattori di errore, per cui i dati disponibili vanno interpretati con cautela.

Negli ovini con EC è stata riscontrata una perdita nella produzione lattea del 7-10%, di carne o del peso totale della carcassa del 5-20%, della produzione di lana del 10-40%. Si è anche stimato che il peso alla nascita degli agnelli di animali infetti può essere fino al 20-30% in meno rispetto a quelli nati da ovini sani.

In Sardegna, che ha una popolazione di circa 3 milioni di pecore da latte, nel 1982 si è avuta una perdita nella produzione di latte di circa 13,7 milioni di US \$. Questa valutazione è stata fatta in base alla presunta riduzione di latte del 7% in pecore infette e alla prevalenza dell'80% riscontrata nella popolazione ovina (Battelli, 2004).

Tra le perdite economiche causate dalla EC bisogna annoverare anche le spese necessarie per la distruzione dei visceri e degli animali morti. La quantificazione di questo tipo di perdite è relativa, in quanto dipende sia dalle leggi di ogni Paese che dal numero di animali macellati sotto controllo veterinario. Infatti, i costi di una distruzione efficace dei visceri parassitati sono molto alti. In Estremadura, Spagna, nel 1991 i costi dei visceri parassitati sono stati stimati essere di circa il 2% dei costi annuali della EC, sia negli animali che nell'uomo. Nel sud dell'America Meridionale, ogni anno sono distrutti i visceri di 2 milioni di bovini e 3,5 milioni di pecore e il costo di tale distruzione è di 6,3 milioni di US \$ in Argentina e di 2,5 milioni di US \$ in Cile (Thakur et al., 2002).

Nell'uomo la EC porta diverse conseguenze economiche e sociali: costi per la diagnosi; costi medici, chirurgici, di ospedalizzazione e di medicinali; perdita di giorni di lavoro; costi di trasporto per le cure sia dei pazienti che dei loro familiari; sofferenza; mortalità; abbandono delle aziende o dell'agricoltura da parte delle persone infette o a rischio (Battelli, 2004).

Alcune conseguenze sono difficili da valutare da un punto di vista economico mentre altre possono essere valutate soprattutto o esclusivamente in termini sociali.

Tra i costi associati all'identificazione e al trattamento della EC, quelli correlati alla durata dell'ospedalizzazione e alla convalescenza rappresentano le componenti più importanti. In base alle esperienze nel Bacino del Mediterraneo e in America Latina, è stato calcolato che la durata dell'ospedalizzazione varia da due settimane a più di un mese in caso di intervento chirurgico e di circa 8 giorni per la diagnosi e la terapia. Dove esistono servizi efficaci e tecniche moderne, il periodo di ospedalizzazione è diminuito del 50% circa in pochi anni.

In Italia, nel principale ospedale di Bologna, per esempio, nel 1995, il costo medio di un caso chirurgico è stato di circa 14000 US \$, e di un caso clinico circa 2500 US \$. Il numero medio di giorni di ospedalizzazione è stato di 28 e di 8 rispettivamente per i casi chirurgici e per quelli clinici (Battelli, 2004).

Per i casi chirurgici, le spese sono state le seguenti: giorni di ospedalizzazione (73,4% dei costi totali); esami di laboratorio (6,8%); esami di diagnosi per immagini (4,3%); medicinali (0,5%); materiale farmaceutico (0,1%); anestesia (1,5%); attrezzature chirurgiche (3,8%); sangue e prodotti per il sangue (2,1%) esami istologici (6,2%); visite mediche (0,4%); vestiario chirurgico (0,4%); personale (0,4%).

Sempre in Italia, nel 1999, è stato fatto uno studio per valutare i costi della diagnosi e della terapia con albendazolo del fegato in pazienti ambulatoriali. Considerando un periodo di post-diagnosi di 10 anni e che le recidive si presentano in quasi il 25% dei pazienti, è stato valutato un costo medio di circa 2000 US \$ (quasi il 70% pagato dai pazienti). In queste spese non sono annoverate quelle per gli stipendi dei medici, i costi di viaggio e spese correlate per i pazienti e le loro famiglie. Nella provincia di Rio Negro, Argentina, nel 1997, i costi dei casi chirurgici in due ospedali variavano da 4600 US\$ a 6000 US \$ e il costo medio per paziente infetto era di circa 4500 US \$ (Battelli, 2004). Oggi è molto utilizzata la PAIR, molto efficace soprattutto per il trattamento delle cisti epatiche, richiede tempi brevi di trattamento ed è un'ottima tecnica alternativa alla chirurgia in termini di costi e di tempo di ospedalizzazione.

Nel 2006, in base ai dati raccolti all'Ospedale S.Matteo in Lombardia, si è visto che il costo medio di un trattamento PAIR per 3 giorni di ospedalizzazione e 1 anno di diagnosi era di 2072 EUR.

Le principali spese sono:

- giorni di ospedalizzazione: 1500 € (72,4% del costo totale);
- attrezzature: 239 € (11,5%);
- personale: 156 € (7,5%);
- medicinali (30 giorni di somministrazione con albendazolo come profilassi dell'echinococcosi secondaria): 72 € (3,5%);
- diagnosi (pagata dai pazienti): 105 € (5,1%).

La PAIR è una tecnica relativamente economica per cisti non complicate. Comunque anche per questa tecnica le spese di ospedalizzazione rappresentano la quota maggiore (Brunetti et al., 2007).

La biologia molecolare in parassitologia

Negli ultimi anni ci sono stati notevoli progressi nel campo della biologia molecolare. Questi sviluppi hanno avuto importanti implicazioni anche in molti campi della parassitologia, che includono lo sviluppo di nuovi approcci per il controllo delle parassitosi attraverso una migliore comprensione dello sviluppo e della riproduzione dei parassiti.

Inoltre, le moderne tecniche biomolecolari hanno permesso anche un'accurata identificazione dei parassiti e delle loro caratteristiche genetiche, importanti per la sistematica (tassonomia e filogenesi), la genetica di popolazione, l'ecologia e l'epidemiologia, per la diagnosi, il trattamento e controllo delle malattie da essi causate, nonché per studi di farmacoresistenza e sviluppo di vaccini (Gasser, 2006).

L'utilizzo di tecniche biomolecolari in parassitologia risale, molto probabilmente, agli anni 1983-84 quando vennero pubblicati i primi studi sul clonaggio e l'espressione di geni codificanti importanti antigeni di *Plasmodium* spp., l'agente eziologico della malaria (Zarlenga e Geary, 2001).

Questa tecnologia era stata inizialmente vista come una panacea, poiché avrebbe consentito lo sviluppo di vaccini ricombinanti con lo scopo di "liberare il mondo dai parassiti". Sfortunatamente negli ultimi vent'anni, sono stati preparati pochi vaccini ricombinanti per curare le malattie parassitarie. La difficoltà, inaspettata, è legata soprattutto alle straordinarie strategie di sopravvivenza insite nei parassiti da centinaia di milioni di anni, ma anche alla mancanza di conoscenza delle complesse risposte immunitarie che avvengono nell'ospite infetto (Zarlenga e Higgins, 2001).

In particolare, l'avvento della PCR (Polymerase Chain Reaction) (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986) ha rivoluzionato il campo della ricerca parassitologica trovando diversi campi di applicabilità, soprattutto in quello diagnostico, grazie alla sua alta sensibilità che permette l'amplificazione di geni o parti di geni, partendo da quantità piccolissime di materiale parassitario.

I parassiti sono identificati, infatti, di solito, in base ai caratteri morfologici, l'ospite che infestano, le modalità di trasmissione, effetti patologici sull'ospite e/o l'origine geografica. Comunque questi criteri spesso sono insufficienti per un'identificazione precisa. Diverse tecniche di biologia molecolare rappresentano un utile approccio alternativo o, per meglio dire, complementare alle tecniche parassitologiche tradizionali (Gasser, 2006).

PCR

La Polymerase Chain Reaction (PCR) è una tecnica che permette l'amplificazione di una regione specifica di DNA mediante una sintesi ciclica.

Ogni ciclo (in genere ripetuto 30-40 volte) prevede una *denaturazione* delle due eliche di DNA, ad alte temperature, poi abbassate per permettere l'appaiamento (*annealing*) dei primers specifici, complementari alla sequenza da amplificare. Nell'ultima fase, che è quella di vera e propria sintesi del DNA (*extension*) interviene una polimerasi termostabile (Taq polimerasi, isolata da *Thermophilus aquaticus*) che progredisce su entrambi i filamenti dell'acido nucleico, aggiungendo i nucleotidi trifosfato presenti nella miscela di reazione (Gasser, 1999).

Alla fine di ogni ciclo, il frammento da amplificare sarà duplicato, per cui, una volta terminata la reazione, si avranno milioni di copie di esso.

La scelta del template dipende dallo scopo che si vuol perseguire. Ad esempio, gli introni e le regioni non codificanti sono, rispetto alle regioni codificanti, più soggette nel tempo a subire mutazioni; viceversa, geni associati a particolari funzioni sono scarsamente soggetti a subire mutazioni spontanee, in quanto sovente correlati alla sopravvivenza dell'organismo.

Se l'utilizzo della PCR è mirato all'identificazione di specie, il template deve presentare variazioni intraspecifiche di entità significativamente inferiore rispetto alle variazioni interspecifiche. Se il template deve avere marcatori per l'identificazione dei diversi ceppi, deve esserci un significativo livello di variazioni di sequenze fra le specie oggetto di studio. Diversi target, come il DNA nucleare ribosomiale (rDNA), il DNA mitocondriale (mtDNA) ed elementi ripetitivi del DNA, sono stati utilizzati per l'identificazione dei parassiti a specie o genotipo (Hu et al., 2004).

Il DNA ribosomiale è un DNA nucleare che codifica per gli rRNA che, insieme alle proteine costituiscono i ribosomi, importanti per la sintesi proteica. Esso è un target impiegato per l'identificazione di specie e/o di markers ceppo specifici: le sequenze di rDNA presentano omogeneità elevata soprattutto intraspecifica piuttosto che interspecifica (Gasser, 1999).

Negli ultimi anni, diversi studi hanno mostrato che gli spaziatori di trascrizione interna (ITS-1 e ITS-2) del DNA ribosomiale nucleare rappresentano dei marcatori genetici molto utili per l'identificazione di un ampio range di parassiti appartenenti a diversi ordini (Jacobs et al., 1997; Zhu et al., 1998a, 1999, 2000, 2002; Gasser et al., 2002; 2004; Otranto e Traversa, 2004; Rinaldi et al., 2005).

Il DNA mitocondriale codifica per le proteine mitocondriali e presenta nel tempo variazioni evoluzionarie più frequenti rispetto al DNA nucleare ed indipendenti da quest'ultimo; pertanto, è utilizzato soprattutto nello studio delle variazioni filogenetiche all'interno di una singola popolazione parassitaria e tra popolazioni diverse (Zhang et al., 1998).

Teoricamente i marcatori utilizzati per studiare la diversità biologica delle popolazioni dovrebbero essere selettivamente neutrali, altamente polimorfici, distribuiti nel genoma e espressi in maniera co-dominante.

I mini e microsattelliti, sequenze non trascritte, ripetute in tandem, "disperse" casualmente nel genoma, stanno acquisendo sempre più largo uso come template per la PCR (McManus e Thompson, 2003), poiché soddisfano tutti questi criteri. I satelliti sono caratterizzati da ipervariabilità allelica: sono stati perciò oggetto di studio per la definizione delle strutture genetiche di popolazioni parassitarie così come per il mappaggio genetico (Schlotterer, 2000; Barker, 2002). Tale analisi è relativamente semplice e permette di esaminare simultaneamente più marcatori genetici.

I mini e microsattelliti sono stati utilizzati come markers per studi tassonomici di diverse popolazioni di nematodi parassiti (Gasser, 2001) e di cestodi (Bretagne et al., 1996; Binz et al., 2000), oltre che del trematode *Schistosoma* spp. (Stohler et al., 2004).

La loro crescente popolarità nella genetica di popolazione e nell'ecologia molecolare è limitata solo dalla laboriosa ricerca per identificarli (Rosenthal, 2001).

Una volta individuato il template, se non sono disponibili dati in bibliografia, è necessario disegnare i primers specifici, in direzione 5'→3'; in particolare, i primers oligonucleotidici disegnati su regioni di DNA specie-specifiche vengono utilizzati a scopi diagnostici (Samson-Himmelstjerna et al., 1997). Per la caratterizzazione dell'rDNA e del

mtDNA, è possibile utilizzare primers altamente conservati, specifici per le sequenze di un certo numero di parassiti o per intere popolazioni parassitarie (McManus e Bowles, 1996).

PCR-RFLP

La PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) è una metodica utilizzata per rilevare sostituzioni anche di una singola base, sia se crea un sito capace di essere digerito mediante enzimi di restrizione, sia se, al contrario comporta l'abolizione di un sito di restrizione; quindi, si tratta è una tecnica molto utile per la definizione del ceppo (Singh, 1997).

Dopo aver utilizzato la PCR per amplificare una regione di un gene che contiene mutazioni di una singola o di più basi, il prodotto di PCR viene digerito con uno o più enzimi di restrizione, poi separati mediante elettroforesi su gel di agarosio (Gasser et al., 1994). La PCR-RFLP è stata ampiamente utilizzata per la identificazione di numerose specie di nematodi (Zhu et al., 1999; Umehara et al., 2006), trematodi (Huang et al., 2004; Sugiyama et al., 2006; Thaenkham et al., 2007), cestodi (Zanini et al., 2006; Gonzalez et al., 2006; Villalobos et al., 2007) e protozoi (Garcia et al., 2007; Nagamani et al., 2007).

AP-PCR

L'individuazione di markers specie-ceppo-specifici, è possibile anche con la tecnica chiamata "Arbitrary Primed-PCR" (AP-PCR) o Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Welsh e McClelland, 1990; Williams et al., 1990), basata sull'amplificazione random di tratti di DNA genomico con primers a sequenza arbitraria (di 10-12 bp e con contenuto in G+C superiore al 50%) e separazione dei frammenti di DNA mediante elettroforesi su gel. Anche questa tecnica è stata utilizzata per la diagnosi

di diversi parassiti (Maravilla et al., 2004; Botilde et al., 2006; de Oliveira et al., 2007; Patra et al., 2007), ottenendo così la definizione di markers specifici per una ampia gamma di ceppi e specie.

Nonostante questa tecnica sia semplice e veloce, in quanto non richiede la preliminare conoscenza della sequenza della regione da amplificare, non offre riproducibilità elevate come la PCR standard e, per questi suoi limiti, viene utilizzata sempre più raramente (Gasser et al., 2006).

Multiplex PCR

Tale metodica si basa sull'utilizzo contemporaneo di più di una coppia di primers, in modo da avere una maggiore specificità di reazione, dovuta alla minore probabilità di incorrere in risultati falsamente negativi, specialmente se si usa per amplificare due o più tratti di DNA bersaglio.

La multiplex PCR, in particolare, è stata utilizzata per la differenziazione dei cestodi *Taenia saginata* e *Taenia solium* (Yamasaki et al., 2004) o dei nematodi *Haemonchus contortus* e *Haemonchus placei* (Zarlenga et al., 1994), nonché di diverse specie del trematode *Schistosoma* (Vidigal et al., 2002).

Sequenziamento

Il template amplificato con la PCR può essere sequenziato, il che costituisce un utile mezzo per l'identificazione dei parassiti e per studi di sistematica (Johnson e Baverstock, 1989; Reddy, 1995; McManus e Bowles, 1996). La conoscenza delle proprietà chimico-fisiche degli acidi nucleici ha reso possibile la messa a punto di due tecniche di sequenziamento del DNA: il metodo chimico di Maxam e Gilbert e quello enzimatico di Sanger.

Il primo si basa sull'impiego di un procedimento chimico per il taglio parziale del DNA, ma è laborioso e necessita di radioattività e di reagenti altamente tossici. Per questi motivi, questo metodo è stato sostituito dal sequenziamento enzimatico.

Tale metodica si basa sul principio della terminazione della catena di DNA di neosintesi - complementare a quello stampo - grazie all'inserimento di dideossinucleotidi a livello di basi specifiche.

I protocolli tradizionali del sequenziamento, in base al metodo di Sanger, sono adatti per frammenti di DNA clonato, perché da essi si può preparare DNA a singolo filamento, mentre non producono risultati totalmente riproducibili a partire da templati a doppio filamento, come i prodotti di PCR.

Il sequenziamento affidabile dei prodotti di PCR, si ottiene con il "cycle sequencing". In questa variante della reazione a catena della polimerasi, il DNA viene amplificato con una DNA polimerasi termostabile a partire da un unico primer di sequenza, in presenza di ddNTPs che bloccano la polimerizzazione a livello di basi specifiche.

Essendo a tutti gli effetti un'amplificazione termica, questa PCR pre-sequenziamento è in grado di produrre ottimi risultati anche a partire da basse quantità di DNA, nell'ordine di femto/picomoli.

In genere esistono dei kit di cycle sequencing, usati soprattutto per il sequenziamento automatico che utilizza un metodo di marcatura fluorescente e non radioattivo.

In letteratura sono riportati dati derivanti dal sequenziamento di amplificati relativi alla distinzione di specie/ceppo e alla definizione di markers specifici (Gamboa et al., 2007; Bandyopadhyay et al., 2007), all'identificazione di specie criptiche (Zhu et al., 1998 c; Parvizi et al., 2003), a ricostruzioni filogenetiche (Chilton et al., 1997 a; Blaxter et al.,

1998; Newton et al., 1998 b; Nakao et al., 2002; Le et al., 2002) di nematodi, cestodi e trematodi.

SSCP e DGGE

Metodiche innovative rispetto alle precedenti sono la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) e la DDGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), utili per l'analisi di particolari variazioni genetiche. La SSCP è una tecnica basata sul principio che la mobilità elettroforetica di un singolo filamento di DNA in un gel non-denaturato dipende dalla sua struttura e misura (Orita et al., 1989; Hayashi, 1991).

Essa è molto utile soprattutto quando bisogna analizzare molti campioni, dato il suo costo contenuto. Le molecole a filamento singolo prendono una conformazione secondaria o terziaria in soluzione, dovuta all'appaiamento delle basi all'interno del filamento stesso. Queste conformazioni dipendono dalla lunghezza del filamento e dall'ubicazione e dal numero delle basi che si appaiano. Esse dipendono anche dalla struttura primaria della molecola, tanto che il cambiamento di un nucleotide in una particolare posizione può alterare la sua conformazione.

Quando vengono separate molecole che differiscono per la mutazione di un solo nucleotide, in un gel di poliacrilamide non-denaturante, come conseguenza del cambiamento di conformazione, esse migreranno in modo diverso a causa della differenza di mobilità.

Questa tecnica solitamente è usata per evidenziare punti di mutazioni per piccoli ampliconi (100-300 bp) (Cotton, 1997), anche se recenti studi hanno dimostrato che tale tecnica è utile anche per ampliconi di 300-530 bp (Gasser e Zhu, 1999).

Per esempio, l'analisi SSCP è stata impiegata per l'identificazione di alcune specie di elminti parassiti, quando l'identificazione dei caratteri morfologici è risultata inattendibile (Zhu e Gasser, 1998; Zhu et al., 1998 a, b, 2000 a, b; Zhang et al., 1999; Yamasaki et al., 2002).

La DDGE è stata descritta per la prima volta da Fischer e Lerman (1983) e prevede l'elettroforesi dei frammenti di DNA ad alte temperature (50-60°C) in un gel di acrilamide contenente un gradiente di denaturante (un solvente come la formamide o l'urea) (Gueldberg et al., 1997). Quando i frammenti di DNA migrano nel gel, incontrano concentrazioni crescenti di denaturante. La posizione nel gel alla quale il DNA migra, è determinata dalla sua sequenza nucleotidica e dalla composizione. Quindi i frammenti di DNA della stessa lunghezza ma con sequenza differente migrano in diverse posizioni.

La DDGE originariamente è stata usata per l'analisi del DNA genomico (Abrams e Stanton, 1992), ma recentemente è stata adottata anche per i prodotti di PCR e permette di individuare addirittura il 100% di mutazioni in una sequenza di meno di 500 bp (Fodde e Losekoot, 1994). Questa metodologia è comunque ancora poco utilizzata in parassitologia (Gasser et al., 1996, 1998).

Real-time PCR

Questa tecnica è stata messa a punto all'inizio degli anni '90 (Higuchi et al., 1992) e permette che l'amplificazione della PCR sia monitorata in tempo reale. Tutti i sistemi di real-time permettono la visualizzazione della PCR tramite l'utilizzo di chimiche contenenti fluorocromi. Il principale vantaggio della PCR real-time è che permette l'analisi in un "sistema chiuso", poiché non richiede altre manipolazioni dopo l'amplificazione e, oltre alla quantizzazione, permette anche la

differenziazione degli ampliconi con sequenze diverse mediante l'analisi della curva di melting.

Il principio della metodica originale era l'incorporazione di uno specifico colorante (etidio bromuro) che si intercalava nella PCR per quantificare il cambiamento di fluorescenza dopo ogni ciclo, usando una camera digitale e un fluorometro collegato alla reazione che avveniva nel tubo (Higuchi et al., 1993). La tecnica è stata poi modificata per includere altri coloranti nella reazione e nell'analisi, utilizzando un capillare/fluorometro, che permette la quantizzazione assoluta o relativa mediante identificazione del ciclo al quale l'amplificazione comincia. Il DNA standard (a concentrazione nota) e i campioni testati sono soggetti alla amplificazione nello stesso tempo e i loro Ct (Cycle threshold) possono essere comparati. In base ai dati ottenuti dall'analisi del DNA standard può essere costruita una curva standard, e la quantità del template nei campioni testati viene calcolato in relazione a questa curva.

I coloranti intercalanti possono essere di due tipi: coloranti non specifici che si legano al DNA a doppio filamento, come il SYBR Green, e quelli specifici che si legano al DNA a singolo filamento.

Il SYBR Green I è una chimica utilizzata per molte applicazioni per il suo basso costo e per la sua applicabilità a tutti i markers.

Un altro vantaggio dell'utilizzo di questo intercalante è che i prodotti amplificati possono essere caratterizzati mediante analisi delle loro curve di melting. Questa tecnica di real-time PCR in associazione con l'analisi della curva di melting è stata introdotta per la prima volta nel 1997, per l'identificazione e la discriminazione dei patogeni (Ririe et al., 1997; Lay e Wittwer, 1997), ma in campo parassitologico è ancora poco utilizzata.

Il punto di melting di un amplicone, infatti, è relazionato alla composizione ed alla lunghezza della sequenza nucleotidica (Herrmann

et al., 2006), quindi l'analisi di melting può essere usata per visualizzare e/o caratterizzare la variazione di sequenza in e fra campioni. Questo punto è calcolato mediante la misurazione dei cambiamenti di fluorescenza, quando la temperatura è incrementata (in genere tra 70 e 95°C). La melting curve analysis può essere usata anche per confermare l'amplificazione di target corretti (Ririe et al., 1997).

Lo svantaggio dei coloranti non specifici è che si legano a tutti i DNA double-stranded, inclusi i primer dimers e i prodotti non specifici. Questo limite può essere superato mediante acquisizione della fluorescenza ad una temperatura che denatura i campioni non specifici e lascia i prodotti specifici intatti.

Diversi sono i lavori sull'applicazione del SYBR Green I real-time PCR ai protozoi, tra i quali *Cryptosporidium*, *Leishmania* e *Trypanosoma* (Nicolas et al., 2002; Becker et al., 2004; Widmer et al., 2004).

Lo sviluppo di nuove tecniche più sensibili e più specifiche ha portato allo sviluppo di metodiche basate sull'utilizzo di sonde marcate con due fluorogeni (Heid et al., 1996).

Tra queste la più utilizzata è quella che prevede l'utilizzo di sonde Taqman (Heid et al., 1996), oligonucleotidi marcati con un fluoroforo al 5' (reporter) e una molecola quencher al 3' che assorbe la luce emessa dal fluoroforo al 5'. La sonda è disegnata in modo da legarsi al frammento da amplificare e viene degradata durante la fase di extension come risultato dell'attività esonucleasica 5'-3' della Taq DNA polymerasi. La degradazione del probe comporta un segnale di fluorescenza. Questa chimica è stata utilizzata per lo studio di alcuni protozoi (Bruna-Romero et al., 2001; Jauregui et al., 2001).

Un'altra tecnica utilizza le sonde FRET (Fluorescence-resonance-energy-transfer; Chen e Kwok, 1999) che ibridizzano in regioni adiacenti. Il terminale 3' di una sonda è coniugato con un fluoroforo

donatore, mentre il terminale 5' di una sonda adiacente è marcato con un fluoroforo accettore. Nella fase di annealing di ciascun ciclo di PCR, le sonde legano le sequenze target, inducendo l'emissione di un segnale fluorescente.

La sonda Molecular Beacons (Piatek et al., 1998), invece, è un oligonucleotide che forma una forcina, la cui sequenza è complementare al bersaglio amplificato, e un piccolo tratto duplex formato da 5-7 coppie di basi. Un'estremità è marcata con un reporter mentre l'altra con un quencher. Quando la sonda è libera in soluzione, il reporter e il quencher si trovano appaiati e non si ha l'emissione di fluorescenza. Nella fase di annealing di ciascun ciclo di PCR, la forcina si lega alla sequenza bersaglio ed il quencher si allontana dal reporter, che emetterà fluorescenza che verrà rilevata dalla macchina. Questo tipo di sonde è molto utilizzato per discriminare differenze di sequenze puntiformi (SNP) (Tyagi, 1996).

Infine la sonda Scorpions è un primer con l'estremità 5' legata ad una molecola simile ad una sonda Molecular Beacons. Durante la PCR, il primer Scorpions viene esteso e la sequenza specifica della sonda che forma l'ansa è in grado di legare la sequenza complementare che si trova all'interno dello stesso filamento di DNA.

Mentre però le applicazioni della real-time sono molto utilizzate per i protozoi, non lo sono altrettanto per la diagnosi dei metazoi (Gasser, 2006).

Il DNA ribosomiale (rDNA)

Il DNA ribosomiale (rDNA) codifica per le tre componenti strutturali dell'rRNA presente nei ribosomi di tutti gli eucarioti (18 S, 5.8 S, 28 S), che svolgono un ruolo fondamentale nella trascrizione del mRNA e quindi nella sintesi proteica. La loro funzione effettrice in tali meccanismi biologici essenziali alla cellula, fa sì che la struttura dei geni dell'rDNA sia, in alcune porzioni, altamente conservata in tutti i metazoi (Gerbi, 1986).

I geni dell'rDNA, nella maggior parte degli eucarioti si presentano in sequenze ripetute (Long e Dawid, 1980) con il medesimo orientamento trascrizionale (Paskewitz e Collins, 1997). Il numero di copie varia a seconda dell'organismo, ma in genere sono sempre più di 1000 (Hillis e Dixon, 1991). Le diverse copie dell'rDNA possono essere presenti in più loci distinti ovvero in unica sequenza.

Le unità di trascrizione sono separate tra di loro da regioni di spazi intergenici (IGS) anche note come “not transcribed spacers” (NTS) che possono contenere corte regioni sub-ripetute, in numero variabile, implicate probabilmente in meccanismi di trascrizione.

All'interno di ogni unità di trascrizione sono presenti due principali regioni codificanti per le subunità 18S e 28S di rDNA e una regione più piccola codificante per la subunità 5.8 S. Quest'ultima regione è separata dalla 18S e dalla 28S mediante due “internal transcribed spacers”, definiti ITS1 (tra i geni 18 S e 5.8 S) e d ITS2 (tra i geni 5.8 S e 28 S).

Queste differenti regioni hanno un alto grado di variabilità intra- ed interspecifica e, in particolare, mentre le regioni 5.8S, 18S e 28S presentano sequenze altamente conservate, le regioni IGS e le ITS1 e ITS2 presentano un rilevante polimorfismo intra- e interspecifico; queste ultime regioni, infatti, sono excise dall'RNA in un processo di splicing

post trascrizionale e quindi, non codificando per un prodotto genico, sono soggette ad elevata variabilità di sequenza. Questa variabilità rende particolarmente interessante l'impiego di metodiche di biologia molecolare quali la PCR-RFLP per la differenziazione di specie. Inoltre, la loro localizzazione tra regioni conservate (18S e 28S) permette l'impiego di primers universali. Le regioni ITS1 e ITS2 hanno inoltre una evidente divergenza evolutiva, anche se ad un minor livello rispetto alle IGS. Poiché le regioni ITS sono più corte delle IGS, sono più frequentemente scelte per studi di biologia molecolare che prevedono l'impiego del clonaggio e del sequenziamento dopo amplificazione con PCR. I diversi gradi di variabilità delle sequenze di rDNA all'interno di uno stesso taxon così come in diversi taxa offrono l'opportunità di usare le sequenze di rDNA per studiare questioni filogenetiche a diversi livelli.

Deve essere tenuto presente che alcune specie possono avere un alto grado di variazioni intraspecifiche e intraindividuali nelle sequenze ITS e ciò complica notevolmente l'impiego di queste regioni per la diagnostica di specie.

L'rDNA ha altri vantaggi come target in studi di sistematica in quanto è presente in elevato numero di copie nei differenti stadi evolutivi degli elminti parassiti e poiché rappresenta un indice variabile di evoluzione nelle sue diverse regioni.

Solitamente, le regioni ITS presentano basse variazioni intraspecifiche; talvolta alcune popolazioni parassitarie mostrano eterogeneità elevata in sequenza e/o lunghezza, che riflette "variazioni di popolazione" (Gasser e Chilton, 1995).

La PCR sui geni dell'rDNA è considerata una metodica affidabile per identificare specie tassonomicamente molto affini, per studi filogenetici e per scopi diagnostici.

Poiché possono esserci differenze di sequenza sia intra- che interindividuali, in uno screening iniziale, devono essere attentamente esaminati più individui provenienti da diverse popolazioni per ogni specie.

Le regioni ITS1 e ITS2 sono amplificate con reazioni di PCR mediante l'impiego di primers disegnati sulle frazioni 18 S, 5.8 S, 28 S.

Come finora osservato, le regioni ITS sono molto utili in quanto possono fornire più sequenze variabili e quindi utilizzabili per i fini su descritti, ma possono anche determinare dei problemi in fase di amplificazione a causa delle variazioni di lunghezza del frammento.

Anche i tratti IGS, che come precedentemente descritto sono regioni altamente variabili, possono essere amplificati mediante PCR, nonostante la loro notevole dimensione.

Dopo la reazione di PCR se i prodotti di amplificazione delle zone target mostrano, in gel di elettroforesi, diversa dimensione per le specie in esame, il lavoro può essere considerato terminato e richiederà solamente una successiva fase di validazione della sensibilità e specificità del test.

In genere, i prodotti di amplificazione ITS di specie affini non possono essere distinti per grandezza su gel e quindi si deve ricorrere ad analisi di restrizione o a sequenziamento dei tratti in esame.

Identificate le sequenze specie-specifiche, possono essere disegnati i primers specifici; questi dovrebbero essere lunghi 20 o più bp, a seconda della dimensione del frammento da amplificare, e contenere il 50% di G+C. Una volta disegnati i primers, devono essere definiti i parametri della reazione in prove empiriche in modo da ottimizzare la metodica e non avere frammenti di amplificazione aspecifici. Poiché i primers così disegnati saranno specifici per l'organismo in esame e l'rDNA template è presente in numerose copie, la temperatura di annealing può essere mantenuta a 45-55°C e possono essere sufficienti 25-35 cicli di reazione.

Terminata la fase di valutazione del test diagnostico per le diverse specie è necessario esaminare esemplari provenienti da popolazioni di diverse aree geografiche. Se questi esemplari, anch'essi identificati in una fase preliminare con metodiche differenti, producono i frammenti di amplificazione attesi, il test può essere impiegato su un più numeroso campione.

Poiché la PCR è un test diagnostico altamente sensibile, in quanto può amplificare quantità di DNA nell'ordine di picogrammi, il problema della contaminazione nei laboratori di biologia molecolare è particolarmente sentito. Tuttavia, l'elevato numero di copie di rDNA presente negli organismi diminuisce l'importanza delle contaminazioni da rDNA in quanto esse in genere "scalzano" l'rDNA contaminante.

L'rDNA è stato studiato per numerosi protozoi (Brindley et al., 1993), nematodi (Gasser et al., 1994; Hoste et al., 1993; Schnieder et al., 1999), trematodi (Luton et al., 1992; Anderson e Barker, 1993; Adlard et al., 1993; Michot et al., 1993), cestodi (Bowles e McManus, 1993 b; Wachira et al., 1993) e artropodi (Collins et al., 1998; Paskewitz e Collins, 1990; Zhaller et al., 1997).

Riguardo agli elminti parassiti dei ruminanti, la letteratura riporta numerosi studi sul rDNA di nematodi appartenenti alle famiglie Filaridae, Strongylidae, Trichostrongylidae ed Anisakidae; di contro, per quanto riguarda i trematodi, ed in particolare quelli appartenenti alla famiglia Paramphistomidae, gli studi di biologia molecolare sono ancora frammentari e scarsi.

Inoltre, le applicazioni pratiche della rDNA-PCR per lo studio dei nematodi hanno avuto come oggetto tutti gli stadi dei parassiti (uova, larve, adulti), mentre per quanto riguarda i trematodi lo studio è stato quasi sempre condotto su parassiti adulti.

In particolare la ITS2 è stata utilizzata come marker per differenziare i seguenti trematodi parassiti: *Schistosoma haematobium* da *S. bovis* (Barber et al., 2000) e *Fasciola hepatica* da *F. gigantica* (Huang et al., 2004).

Inoltre, è stato condotto uno studio di PCR-RFLP e sequenziamento della ITS2 che ha consentito la caratterizzazione molecolare di tre specie di paramfistomi in Giappone: *Calicophoron calicophorum*, *Orthocoelium streptocoelium* e *Homalogaster poloniae* (Itagaki et al., 2003).

Di recente la ITS2 è stata utilizzata anche per la caratterizzazione di *Calicophoron daubneyi* isolati da diversi ospiti intermedi (ovini, bovini e bufali) allevati in diverse zone dell'Italia Meridionale tramite PCR-RFLP e sequenziamento (Rinaldi et al., 2005).

Infine è stato condotto uno studio volto alla caratterizzazione molecolare di diversi esemplari di *D.dendriticum* e di alcuni esemplari di *D.hospes* tramite l'analisi sia dell'ITS2 che della regione ribosomiale 28S (Maurelli et al., 2007).

DNA mitocondriale (mtDNA): struttura e funzioni

Il DNA mitocondriale (mtDNA) è piccolo (in genere meno di 20000 bp nei metazoi; Boore, 1999), circolare ed ereditato maternamente. Il mtDNA tende ad accumulare mutazioni più velocemente rispetto al DNA nucleare. Questo potrebbe scaturire da cause biochimiche e statistiche: gli enzimi mitocondriali replicano il DNA con minore fedeltà, e le frequenze alleliche dei geni ereditati solamente da un genitore sono molto più soggette a cambiamenti perché la loro “effettiva grandezza di popolazione” è la metà di quella dei geni nucleari. Inoltre sebbene un contributo paterno dei mitocondri può qualche volta produrre

cellule con genomi mitocondriali eterogenei (denominati eteroplasmii) (Curtis et al., 2001), raramente si ricombinano (Ladoukakis e Kouros, 2001), per cui l'ereditarietà materna è più comune.

Per questi motivi e per il suo alto numero di copie nelle cellule, il DNA mitocondriale si è rivelato un ottimo target per studi genetici e filogenetici (Le et al., 2000 a, b, 2001 a, b, 2002 a, b; Nakao et al., 2002, 2003).

E' stato definito il genoma mitocondriale completo o parzialmente completo per 12 specie di elminti: 6 cestodi (*Echinococcus granulosus* G1, G4, *E. multilocularis*, *Hymenolepis diminuta*, *Taenia asiatica*, *T. crassiceps*, *T. solium*) e 6 trematodi (*Schistosoma japonicum*, *S. malayensis*, *S. mekongi*, *S. mansoni*, *Fasciola hepatica*, *Paragonimus westermani* (2n), *P. westermani* (3n) (McManus et al., 2004).

Il genoma mitocondriale del cestode *E. granulosus* (genotipo G1; 13558 bp) in Fig.2 è un esempio della sua organizzazione in diversi organismi (Le et al., 2002b).

Vi sono 12 proteine geni codificanti: il complesso nicotinamide deidrogenasi (subunità *nad 1-6* e *nad4L*); il complesso della citocromo c ossidasi (subunità *cox 1-3*); citocromo *b* (*cob*) e la subunità 6 adenosina trifosfatasi (*atp6*). Come per molti altri metazoi non c'è l'*atp8*. Due sono, invece, i geni che codificano per le subunità del RNA ribosomiale: la subunità grande (*rrnL* o 16S) e la subunità piccola (*rrnS* o 12S). Come in tutti i genomi mitocondriali, ci sono 22 geni tRNA. Tutti i geni del mtDNA sono trascritti nella stessa direzione e mancano di introni; in genere, sono separati l'un l'altro da pochi nucleotidi o sono contigui. Tuttavia, alcuni geni, come *nad4* e *nad4L* si sovrappongono. Inoltre, nel genoma mitocondriale esistono due regioni relativamente lunghe non codificanti (NRs) che potrebbero essere associate con la replicazione del genoma mitocondriale.

I genomi mitocondriali dei vermi piatti non sono molto differenti da quelli di altri metazoi.

Il loro codice genetico differisce un po' da quello universale (Telford et al., 2000); essi usano AAA per l'asparagina (lisina nel codice universale), AGA e AGG codificano per la serina (arginina nel codice universale) e UGA codifica per il triptofano (STOP nel codice universale). UAG e UAA fungono entrambi da codoni di STOP (Le et al., 2002 b; Nakao et al., 2003).

Sebbene il codone AUG è, in genere, il codone d'inizio più usato dai vermi piatti, qualche volta vengono utilizzati anche altri codoni (Le et al., 2001 b, 2002 b).

Inoltre il DNA mitocondriale dei vermi piatti è ricco di coppie A+T, ma la loro percentuale varia tra i diversi ordini di trematodi (per esempio in *S. mekangi* è del 72,7% contro il 51,6% di *P. westermani*), anche se il significato biologico di ciò non è chiaro (Le et al., 2001 b, 2002 a).

Si è visto addirittura che anche fra parassiti appartenenti alla stessa famiglia vi sono differenze legate alla lunghezza del genoma mitocondriale dovute alla struttura e all'estensione delle NRs (McManus et al., 2004).

Tale scoperta è stata molto importante, visto che fino a non molti anni fa si pensava che il genoma mitocondriale rimanesse stabile per lunghi periodi di tempo e che variasse solo a livello di classe o phylum, mentre a livello della stessa famiglia fosse raro riscontrare differenze (Boore e Brown, 1998).

Per esempio, è stata rilevata una notevole differenza fra *Schistosoma mansoni* (Africa) e altri schistosomi e cestodi (Le et al., 2000b). Nei cestodi le due NRs sono separate dal gene *nad5* e da diversi tRNA, nei trematodi, invece, come *Schistosoma*, le NRs sono divise da uno o più geni tRNA in una piccola NR (SNR) e in una più lunga (LNR).

La lunghezza delle LNRs in *S. mansoni* provenienti da diverse zone geografiche è stato visto variare da <2000 a 10000 nucleotidi (Desprès et al., 1991). In altre specie di *Schistosoma* varia da 5000 a 7000 nucleotidi (Le et al., 2001b).

Pena et al. (1995) hanno dimostrato la presenza di due differenti elementi ripetuti nelle LNR, uno di 558 nucleotidi, l'altro di 62. Numeri variabili di elementi più piccoli si ripetono in tandem tra le copie dei più grandi. Questi elementi si possono trovare tutti o in parte anche nel genoma nucleare.

Il solo genoma mt completo conosciuto per i trematodi è quello di *Fasciola hepatica* (Le et al., 2001b). L'SNR (187 nucleotidi) non mostra notevoli cambiamenti. Comunque, l'LNR è ricca di G e contiene 8 identiche ripetizioni tandem di 85 nucleotidi e una ulteriore sequenza di 102 nucleotidi che include una copia imperfetta della ripetizione.

Le NR dei cestodi esaminati sono molto più piccole e quindi sono state amplificate e sequenziate per sei specie di cestodi (Le et al., 2002a).

Le NR1 variano da 65 a 183 nucleotidi, e solo *Taenia crassiceps* e *Echinococcus multilocularis* può formare strutture stem-loop lunghe e stabili. Le NR2 sono più lunghe delle NR1 (177-444 nucleotidi). In *Hymenolepis diminuta* (444 nucleotidi), ci sono 13 ripetizioni in questa regione.

Le variazioni di sequenza nelle NR sembrano essere consistenti tra specie molto vicine. Questo è sicuramente vero per specie/genotipi di *Echinococcus* (Le et al., 2002b). Allo stesso modo, le sequenze ripetute presenti in *S. mansoni* non dovrebbero essere amplificate per le altre specie di *Schistosoma*, anche se molto vicine. Così, sebbene lunghe, le NR in queste specie o c'è solo una piccola similarità in queste specie o non c'è proprio, un fatto che può essere utilizzato per disegnare marcatori specie-specifici.

***Echinococcus granulosus* - Studi di biologia molecolare**

I primi studi di biologia molecolare sulla variabilità genetica in *Echinococcus* si basavano sull'analisi RFLP e sulla tecnica del Southern blotting (McManus e Rishi, 1989).

Successivamente, questo protocollo RFLP convenzionale è stato semplificato in una metodica meno laboriosa, ma non meno accurata, basata sulla PCR-RFLP. Come marcatore è stato utilizzato l'ITS-1 ed i primers sono stati disegnati sulle regioni conservate fiancheggiando tale regione (18S e 5.8S). I prodotti di PCR sono stati poi digeriti con enzimi di restrizione che tagliavano siti di 4 basi (Bowles e McManus, 1993).

La PCR-RFLP è stata utilizzata per diversi studi di variabilità genetica su campioni di *E. granulosus* provenienti da differenti località.

Anche la RAPD è stata molto utilizzata per analizzare le relazioni genetiche tra diversi individui. In particolare, questa tecnica è stata molto efficace per caratterizzare le 4 specie ufficiali di *Echinococcus* (Scott e McManus, 1994).

Tuttavia, la metodica più utilizzata è il sequenziamento. Il confronto di sequenze nucleotidiche di segmenti di DNA è il metodo più diretto e più sensibile per l'analisi della variabilità genetica. Il target più utilizzato è stato ed è ancora il DNA mitocondriale; in particolare, la citocromo c ossidasi subunità 1 (CO1) e la NADH deidrogenasi 1 (ND1) sono stati i marcatori genetici più studiati. Proprio tramite l'analisi delle sequenze di questi due marcatori sono stati identificati i 10 genotipi di *E. granulosus* fino ad oggi conosciuti.

Inoltre, mediante questa tecnica è stata definita una variabilità nucleotidica tra le 4 specie di *Echinococcus* di 6-11,5% (McManus, 2002).

La ND1, invece, è risultata essere più variabile della CO1; infatti, sono stati osservati valori di 13-16% di variabilità tra le specie di *Echinococcus*.

Sebbene molto utili, i metodi precedentemente menzionati non sempre permettono una identificazione accurata o definizione della variabilità di sequenza (McManus, 2002). Inoltre, possono essere abbastanza laboriose quando devono essere analizzati molti campioni. L'SSCP offre una buona alternativa per la sua alta risoluzione e per il fatto che permette l'analisi di più campioni contemporaneamente.

Questa tecnica è stata utilizzata da Zhang et al. (1999) per l'analisi di isolati di *Echinococcus* provenienti da Cina ed Argentina. Tramite tale tipo di analisi è stato possibile analizzare 4 tipi di varianti definite con la CO1 e con ND1 e successivamente sequenziate. Quindi, l'SSCP riduce il numero di campioni da sequenziale, dimezzando i costi e il tempo per la genotipizzazione.

Un altro metodo per l'analisi di mutazioni è il dideossifingerprinting (ddF), che è un ibrido tra l'SSCP e il sequenziamento. Questa tecnica utilizza il principio del sequenziamento di Sanger usando solo un dideossinucleotide ed un'elettroforesi con gel non-denaturante. La presenza di un cambiamento nucleotidico può essere visualizzata come conseguenza di un'introduzione o di una perdita di un frammento con dideossi terminazione (componente dideossi) e/o mediante un cambiamento di mobilità di uno o più frammenti terminali che determinano un cambiamento nucleotidico (componente SSCP). Recentemente, questa tecnica è stata utilizzata per visualizzare direttamente le variazioni di sequenza nel gene CO1 e per tipizzare e differenziare tutti i genotipi di *Echinococcus* esaminati mediante le loro caratteristiche ed i profili riproducibili di ddF fingerprinting (McManus, 2002).

PARTE SPERIMENTALE

Premessa

Ad oggi, oltre a qualche sporadica segnalazione, in letteratura risultano solo tre indagini epidemiologiche effettuate sulla echinococcosi-iatidiosi negli animali in Campania.

La prima è stata condotta da Damiano (1964) e riporta valori di prevalenza del 7,1% in bovini macellati nella provincia di Caserta.

Qualche anno dopo, Capurso et al. (1968) hanno rilevato valori di prevalenza del 1% in cani della provincia di Napoli e del 2,4% in ospiti intermedi (bovini, ovini, caprini, suini, equini) regolarmente macellati nella stessa zona.

A dieci anni di distanza, Cringoli et al. (1998), in collaborazione con le AA.SS.LL. (Dipartimento Prevenzione - Servizio Veterinario area A e B) e con il Servizio Veterinario Regionale, hanno monitorato la macellazione di bovini, ovini, caprini, suini ed equini, presso 26 macelli delle province di Salerno ed Avellino, al fine di individuare animali con cisti iatidiche. In totale sono stati esaminati 11.641 animali adulti, presenti sul territorio regionale da almeno due anni. Dopo 6 mesi di attività, sono stati riscontrati valori di prevalenza media inferiori al 5%. La provenienza degli animali positivi ha evidenziato tre “zone a rischio”, due nel Salernitano ed una nell’Avellinese, dove la percentuale di bovini ed ovini positivi è risultata piuttosto elevata. La prima “zona a rischio” comprendeva i comuni di Buccino, Ricigliano, Oliveto Citra e San Giorgio Magno (21,2%); la seconda comprendeva i comuni di Polla, S. Rufo e Atena Latina in provincia di Salerno (17,3%); la terza, i comuni di Nusco e Montella in provincia di Avellino (16,6%).

Da segnalare anche un’indagine sull’echinococcosi cistica nell’uomo in Campania, effettuata nel 1998 da Cringoli et al., in collaborazione con l’Osservatorio Epidemiologico Regionale. La fonte informativa utilizzata

è stata l'archivio di 729.000 schede di dimissione ospedaliera in regime ordinario. I pazienti ospedalizzati nel 1995 sono risultati 122; di questi, 21 hanno ricevuto più di un ricovero (circa 4 in media). La localizzazione delle cisti più frequente è risultata quella epatica. La distribuzione territoriale delle residenze ha fatto rilevare un più elevato numero di casi nelle aree rurali (Cringoli et al., 1998).

Nella presente tesi si riportano i risultati di cinque studi, tutti effettuati sul territorio della regione Campania:

1) Presenza e diffusione della echinococcosi cistica in bufali e bovini

2) Caratterizzazione molecolare di ceppi di *E.granulosus* in isolati da bufali e bovini mediante PCR e sequenziamento, utilizzando due marcatori genetici, ovvero una parte del gene mitocondriale codificante per la subunità 1 della citocromo c ossidasi (CO1) ed una parte del gene ribosomiale 12S.

3) “Clustering” mediante Sybr Green I/real-time per l'identificazione rapida dei genotipi appartenenti alla sottospecie *E.granulosus sensu stricto*, usando come marcatore genetico una parte della regione 12S del DNA ribosomiale.

4) Caratterizzazione molecolare di ceppi di *E.granulosus* in isolati da ovini mediante PCR e sequenziamento della regione codificante per la CO1 **ed analisi della curva di melting** della regione 12S.

5) Questionnaire survey sulla Echinococcosi cistica nell'uomo.

Materiale e Metodi

1) Presenza e diffusione della EC in bufali e bovini

Fase di monitoraggio al macello

Da Ottobre 2004 a Settembre 2005, con frequenza programmata, è stato effettuato un monitoraggio presso tre macelli (due in provincia di Caserta ed uno in provincia di Salerno).

Durante le giornate di macellazione di capi bufalini (*Bubalus bubalis* di razza Mediterranea) e bovini, sono state effettuate ispezione e palpazione degli organi al fine di individuare la presenza di eventuali cisti idatidee.

Ad ogni sopralluogo sono stati annotati: il numero di bufali e bovini macellati, l'età, il sesso e la loro provenienza (comune, località e codice aziendale).

In caso di soggetti positivi, si è proceduto al prelievo degli organi (fegato, polmone, etc.), che sono stati riposti in apposite buste, etichettati e trasportati in laboratorio.

Attività di laboratorio

Una volta in laboratorio, gli organi sono stati sottoposti ad un primo accurato esame anatomico-patologico per valutare il numero delle cisti.

Le cisti sono state poi incise ed esaminate per determinare la tipologia (uniloculare, pseudomultiloculare, iperlaminata) ed eventuali modificazioni degenerative (cisti con necrosi caseosa e/o cisti calcificate).

Per valutare la vitalità delle cisti, si è proceduto a prelevare la membrana prolifera e, quando presente, il liquido idatideo.

La membrana proligerà prelevata è stata poi strisciata su un vetrino portaoggetti, al fine di esaminare mediante microscopia i protoscolici eventualmente presenti, mentre il liquido idatideo prelevato è stato centrifugato ed alcune gocce sono state poste su un vetrino portaoggetti ed esaminate sempre al microscopio.

La fertilità è stata valutata in base alla conformazione ed ai movimenti dei protoscolici e delle loro cellule a fiamma.

Analisi statistica

Il test del chi-quadro (χ^2) è stato utilizzato per analizzare i dati circa l'età degli animali positivi e la localizzazione anatomica delle cisti.

Inoltre, il test χ^2 , con significatività valutata con il metodo di simulazione Monte Carlo, è stato usato per analizzare l'associazione tra la vitalità delle cisti esaminate e la localizzazione delle stesse.

Infine, il modello di regressione lineare è stato utilizzato per valutare la correlazione tra l'età degli animali parassitati (variabile dipendente) e il numero di cisti (variabile indipendente).

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software SPSS 13 (Information Technology Services).

2) Caratterizzazione molecolare di ceppi di *E.granulosus* in isolati da bufali e bovini mediante PCR e sequenziamento

Preparazione dei campioni

Le analisi molecolari sono state eseguite su 59 cisti idatidee bufaline e 19 cisti bovine prelevate e dissezionate in condizioni sterili, da fegati e/o polmoni di altrettanti animali. Una volta prelevati, il liquido idatideo (dove presente) e la membrana proligena di ogni cisti (dopo tre lavaggi con PBS - Phosphate Buffer Saline/Tampone Fosfato Salino), sono stati conservati separatamente in provette da 2 ml a -20° C fino al momento dell'estrazione del DNA.

Estrazione del DNA

Da ciascuna membrana germinativa e/o dal liquido idatideo delle cisti bufaline e bovine, è stata eseguita la estrazione del DNA mediante QIAmp DNA mini kit della QIAGEN che prevede tre fasi: digestione enzimatica, purificazione ed eluizione.

Digestione enzimatica – Fase iniziale: le membrane proligena e gli eventuali protoscolici contenuti nei liquidi sono stati sottoposti a digestione enzimatica. Nello specifico 25 mg di membrana, pesati con bilancia tecnica di precisione (Sartorius, BP 2105) su piastra Petri, sono stati posti in provette da 2 ml. All'aliquota di tessuto, tagliata in più parti (in modo da favorire la digestione enzimatica) sono stati aggiunti 160 μ l di buffer ATL e 40 μ l di Proteinasi k (20mg/ml).

I liquidi, invece, sono stati centrifugati a 1500 rpm per 5'a + 4°C. I pellets ottenuti sono stati digeriti con 180 μ l di buffer ATL e 20 μ l di Proteinasi k (20mg/ml).

Le provette sono state vortexate ed incubate a 56°C in agitazione a 1000 rpm in un Termomixer (Eppendorf) per circa 4h.

Sono stati, quindi, aggiunti 4 µl di Rnasi A (1 mg/ml) ed, una volta vortexate le provette, sono state incubate in stufa (Bicasa) a 37°C per 20'.

Aggiunti 200 µl di buffer AL, per favorire la lisi cellulare, i campioni sono stati vortexati ed incubati a 70°C.

Purificazione - Seconda fase, durante la quale sono stati allontanati sali, proteine e tutti gli altri contaminanti del DNA.

Dopo aver aggiunto 200 µl di etanolo nelle provette e dopo averle vortexate per 15'', i campioni sono stati trasferiti nelle colonnine QIAamp e quindi centrifugati a 8000 rpm per 1' (Eppendorf, Mini Spin Plus), allo scopo di far aderire il DNA alla matrice di gel di silice e contemporaneamente cominciare ad allontanare le sostanze, presenti nella miscela di estrazione, che potrebbero interferire con le ulteriori fasi dell'analisi molecolare.

Recuperate le colonnine, sono state messe su tubi di raccolta nuovi e sono state sottoposte a due fasi di "lavaggio", con due differenti buffers: AW1 e AW2, necessari per l'allontanamento dei sali residui ancora legati al DNA fissato alla matrice delle colonnine.

Dopo l'aggiunta di 500 µl di buffer AW1, le colonnine sono state centrifugate a 8000 rpm per 1'; recuperate nuovamente, alle stesse, sono stati aggiunti 500 µl di buffer AW2, quindi sono state centrifugate a 14000 rpm per 3'.

Eluizione - Terza fase, che ha permesso di recuperare il DNA estratto scevro da impurità.

Prima di iniziare questa fase, le colonnine sono state poste in stufa a 37°C per 5', in modo da far evaporare tutto l'etanolo eventualmente presente dopo i lavaggi.

Alle colonnine, trasferite su tubi da 2 ml, sono stati aggiunti 150 μ l di H₂O deionizzata, per eluire il DNA, mediante centrifugazione a 8000 rpm per 1'.

Quantificazione

La fase di quantificazione ha consentito di valutare la resa dell'estrazione di DNA. Essa è stata effettuata mediante analisi spettrofotometrica (Biophotometer, Eppendorf) considerando che:

1 O.D. (densità ottica) ($\lambda=260$ nm) = 50 μ g/ml di dsDNA

Per effettuare la lettura, 60 μ l di campione, eventualmente diluito, sono stati posti in Uvette di plastica ed analizzati con il programma dsDNA.

Le letture, in triplicato, sono state effettuate dallo spettrofotometro a 260 nm e 280 nm, lunghezze d'onda alle quali lo strumento rileva, rispettivamente, gli acidi nucleici e le proteine presenti nella soluzione analizzata.

E' stato valutato anche il rapporto O.D. 260/280 (che dovrebbe essere compreso tra 1,8 e 2,0), indice della purezza del campione.

PCR

Sono state preparate due mix di PCR differenti per amplificare le due diverse regioni del DNA mitocondriale: la CO1 e la 12S.

Per l'amplificazione della CO1 sono state utilizzate 25 pmol di ogni primer, JB3 e JB4.5 (Bowles et al., 1992; tabella 1) in un volume finale di 50 μ l contenente 10-100 ng di DNA, 200 μ M di ciascun dNTP (Invitrogen), 2,5 mM di MgCl₂, 2U di TaqGold DNA polimerasi e 1x di Taq Gold buffer (tutti prodotti Applied Biosystems).

Tabella 1. Nome e sequenza dei primers impiegati nella reazione di PCR per l'amplificazione della regione mitocondriale CO1.

Nome dei primers	Sequenza (5' → 3')
JB3	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT
JB4.5	TAAAGAAAGAACATAATGAAAAT

La reazione enzimatica è stata effettuata in un ciclizzatore AB 2700 (Applied Biosystems) alle seguenti condizioni: una fase iniziale di denaturazione a 95°C per 10' per l'attivazione della Taq Gold, seguita da 40 cicli di amplificazione a 94°C per 30'' (denaturazione), 53°C per 60'' (annealing), 72°C per 60'' (estensione) e una fase finale di estensione a 72°C per 7' per la stabilizzazione dei prodotti di PCR.

Per l'amplificazione della 12S sono state utilizzate 40 pmol di ogni primer, 60F e 375R (von Nickisch-Rosenegk et al., 1999; tabella 2) in un volume finale di 100 µl contenente: 10-100 ng di DNA, 200 µM di ciascun dNTP (Invitrogen), 2,0 mM di MgCl₂, 2U di FastStart Taq DNA Polimerasi e 1x di Taq buffer (tutti prodotti Roche).

Tabella 2. Nome e sequenza dei primers impiegati nella reazione di PCR per l'amplificazione di un tratto della regione ribosomiale 12S.

Nome dei primers	Sequenza (5' → 3')
60F	TTAAGATATATATGGTACAGGATTAGATACCC
375R	AACCGAGGGTGACGGGCGGTGTGTACC

La reazione enzimatica è stata effettuata in un ciclizzatore AB 2700 (Applied Biosystems) alle seguenti condizioni: una fase iniziale di denaturazione a 95°C per 4' per l'attivazione della FastStart Taq DNA Polimerasi, seguita da 50 cicli di amplificazione a 93°C per 1' (denaturazione), 55°C per 1' e 30'' (annealing), 72°C per 2' (estensione) e una fase finale di estensione a 72°C per 7' per la stabilizzazione dei prodotti di PCR.

Elettroforesi

I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati per entrambe le PCR su gel di agarosio al 2% ad alta risoluzione (Nusieve GTG, Cambrex Bio Science), usando come tampone il TBE 1 X (100 mM Tris, 90 mM acido borico, 10 mM EDTA, Invitrogen) ed applicando un voltaggio di 90 V costanti per circa 1 h.

Gli amplificati, colorati con bromuro di etidio (0,5 µg/ml), sono stati visualizzati con lampada a raggi UV (Biometra, TI 1) e fotografati con il software Shortcut to Digi Doc-It (UVP Inc.).

Il peso molecolare del frammento amplificato è stato stimato per confronto con il ladder 100bp (GeneRuler, Fermentas).

Purificazione dei prodotti di PCR della CO1 e della 12S

Per determinare la composizione nucleotidica dei marcatori genetici CO1 e 12S, i prodotti di PCR sono stati opportunamente purificati, utilizzando il QIAquick gel extraction kit (QIAGEN), per allontanare dimeri, primers, nucleotidi residui, DNA polimerasi e sali.

Tale kit contiene delle colonnine che possiedono una membrana di gel di silice che, in presenza di alte concentrazioni di sali e $\text{pH} \leq 7,5$, assorbono il DNA e tre buffers: QG, PE ed EB utili per ottimizzare l'efficienza di recupero del DNA.

Come da protocollo, inizialmente, in una provetta da 2 ml, al prodotto di PCR è stato aggiunto un volume di buffer QG, in quantità pari a 3 volte il peso dell'amplificato tagliato da gel.

Una volta che il gel si è completamente disciolto, dopo incubazione dei campioni a 50°C per 10', vortexando ogni 2-3', è stato aggiunto l'isopropanolo, in quantità pari al peso iniziale del pezzetto di gel.

Il tutto è stato poi trasferito nelle colonnine QIAquick, dopo miscelazione, e sottoposto a centrifugazione a 13000 rpm per 1'.

Il DNA, dopo tale operazione, è stato adsorbito dalla membrana ed il resto, fluito sul fondo del tubo di raccolta, è stato eliminato.

Per aumentare la resa di DNA recuperato, dopo aver svuotato il tubo di raccolta, sono stati aggiunti 500 µl di buffer QG, e le colonnine sono state centrifugate a 13000 rpm per 1'.

Successivamente, sono stati eseguiti dei lavaggi con il buffer PE, necessario per l'allontanamento dei sali residui. Questo buffer di

lavaggio, aggiunto in quantità pari a 750 μ l, è stato poi allontanato, centrifugando le provette a 13000 rpm per 1'.

Per ottenere un eluato più pulito, sono stati effettuati due ulteriori cicli di lavaggio, non previsti dal protocollo, ognuno con una quantità di buffer PE pari a 500 μ l, allontanato centrifugando entrambe le volte le provette a 13000 rpm per 1'.

Per eliminare ogni eventuale residuo di buffer PE, contenente etanolo, che avrebbe potuto interferire con le successive reazioni enzimatiche, i campioni sono stati ricentrifugati a 13000 rpm per 2'.

Nella fase finale di eluizione, le colonnine sono state trasferite in nuovi tubi da 2 ml e, dopo l'aggiunta di 50 μ l di buffer EB (10mM Tris-HCl, pH 8,5), sono state centrifugate a 13000 rpm per 1'.

Sequenziamento

Tutti gli amplificati sono stati sequenziati utilizzando la chimica BigDye terminator ver 1.1 (Applied Biosystems), che si basa sull'amplificazione ciclica del DNA, interrotta dall'inserimento di un dNTP che diventa 3' terminale.

Per la mix per la reazione di sequenza sono stati utilizzati: 4 μ l di mix di sequenziamento (contenente i dideossinucleotidi marcati), 2 μ l di buffer di sequenziamento (5 X), 3,2 μ l di primer (1 μ M) e 5 ng di DNA per 100 bp di amplificato in un volume finale di 20 μ l.

Come controllo di reazione è stato usato DNA del plasmide pGEM come indicato dal produttore.

La reazione di sequenziamento, ciclica, è stata eseguita in un GenAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems) alle seguenti condizioni: una fase iniziale di denaturazione a 96°C per 1', seguita da 25 cicli di

amplificazione a 94°C per 10'' (denaturazione), 50°C per 5''(annealing) e 60°C per 4'(estensione).

Ogni campione è stato sequenziato 3 volte per ogni primer utilizzato.

Purificazione post-sequenziamento

La purificazione è stata effettuata per allontanare i sali, i dideossinucleotidi marcati residui e altri componenti della mix di reazione non esauriti, a basso peso molecolare.

A tale fine sono state usate le Centriceps (Applied Biosystems), colonnine che permettono la purificazione dei prodotti marcati al 3' terminale mediante il principio della gel-filtrazione.

Queste ultime, dopo essere state centrifugate velocemente (in modo da non far disperdere la "polvere" di gel in esse contenute) sono state reidratate con 800 µl di H₂O deionizzata.

Dopo circa 2h, è stata rimossa l'acqua dalle Centriceps, in parte per gravità e in parte mediante centrifugazione per 2' a RT a 500 g, in modo da compattare il gel.

Per la purificazione dei campioni, le colonnine sono state poste nei tubi di eluizione e, successivamente, sono stati caricati i campioni, ottenuti dalla PCR di sequenziamento, al centro delle Centriceps.

Le colonnine, infine, sono state centrifugate a 500 g per 2' a RT; in tal modo, è stato possibile recuperare l'eluato, da analizzare tramite elettroforesi capillare.

Elettroforesi capillare

Per evitare gli appaiamenti inter e intra-specifici, in grado di inficiare la elettroforesi capillare, sono stati aggiunti 5 µl dell'eluato, ottenuti

dall'uso delle Centricepts, a 20 μ l di formammide (Applied Biosystems); il tutto è stato denaturato a 94°C per 3'.

Lo strumento usato per il sequenziamento è stato l'ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) che separa i frammenti di DNA utilizzando il polimero POP-4TM e/o POP-6TM (Performance Optimized Polymers).

Le sequenze sono state sottoposte ad analisi molecolare mediante i software Chromas versione 1.3, BLASTn, (MedLine) e ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/).

3) “Clustering” mediante Sybr Green I/real-time

Estrazione del DNA

Sono state utilizzate 11 cisti idatidee bufaline e 19 cisti idatidee bovine, dalle quali è stata effettuata l'estrazione del DNA utilizzando il Qiaamp DNA, come precedentemente descritto.

Tutti i campioni di DNA sono stati eluiti con lo stesso buffer (in questo caso H₂O deionizzata), perché buffer diversi potrebbero avere effetti differenti sulla T_m (Montgomery et al., 2007).

Scelta dei primers e ottimizzazione della PCR

I primers utilizzati per la amplificazione di una porzione della regione 12S rDNA sono stati scelti in base alle sequenze disponibili in GenBank (Access Numbers: DQ822451; AY462129) usando il software Primer Express version 2.0 (ABI-Applied Biosystems Incorporated) e sono stati sintetizzati dalla Primm.

La sequenza dei primers scelti e le loro caratteristiche sono elencate nella tabella 3.

Tabella 3. Primers PCR e loro caratteristiche

Nome primer	Sequenza Primer (5'-3')	T _m (°C)	Contenuto GC (%)	Grandezza amplificato (bp)
12S F	GTAAAGCTAAGTCTATGTGCTGC	66	43,5	126
12S R	CTCTCTTCACATCAACAAACTCATTAA	74	32,1	
12S F	GTAAAGCTAAGTCTATGTGCTGC	66	43,5	167
12S R ₂	GTGGTAACCGAGGGTGACG	62	63,2	

La PCR è stata ottimizzata variando i seguenti parametri: temperatura di annealing tra 62°C e 66°C; concentrazione di ioni magnesio di 2,5 e 3,0 mM; concentrazione di primers tra 0,1- 0,5 µM.

Le diverse combinazioni di concentrazioni e temperature sono state utilizzate in reazioni di amplificazione preparate con: 0.2 mM di ogni dNTP (Invitrogen) e 2.5 U TaqGold DNA Polimerasi usata con il TaqGold PCR Buffer (Applied Biosystems).

La reazione enzimatica è stata effettuata in un Mastercycler Epgradient S (Eppendorf) alle seguenti condizioni: una fase di denaturazione iniziale a 95°C per 10 min, seguita da 40 cicli a 94°C per 30 s (denaturation), 62-66°C per 30 s (annealing), 72°C per 30 s (extension), e una fase di estensione finale a 72°C per 7 min.

I prodotti di PCR sono stati visualizzati su un gel al 2% ad alta risoluzione (Nusieve GTG, Cambrex Bio Science), usando come tampone il TBE 1 X (50 mM Tris, 45 mM acido borico, 0.5 mM EDTA, Invitrogen), ed applicando un voltaggio di 90 V costanti per circa 1 h e 30'.

Gli amplificati, colorati con bromuro di etidio (0,5 µg/ml) sono stati fotografati, previa esposizione ai raggi UV (Biometra, TI 1).

Sistema di Real-time PCR e analisi della curva di melting

Definite le condizioni chimico-fisiche “ideali” per l’amplificazione del target atteso, in seguito all’analisi elettroforetica, la mix della real-time PCR è stata preparata con 25 µl di 1x iQ SYBR Green Supermix kit (Bio-Rad Laboratories), 2 µl di DNA (2ng/PCR) e 0.125 µM di ogni primer in un volume finale di 50 µl.

La real-time PCR è stata effettuata in un Mini Opticon (Real-time) PCR Detection System (Bio-Rad). Dopo una fase a 95 °C per 3 min,

necessaria per attivare la polimerasi, sono stati effettuati 40 cicli di amplificazione, ognuno comprendente: una fase di denaturazione a 94°C per 30 sec, l'extension a 62°C per 30 sec e l'annealing a 72°C per 30 sec, seguiti da una extension finale a 72°C per 7 min.

La fluorescenza è stata misurata una sola volta per ciclo, alla fine della fase di extension, mentre la temperatura di melting è stata rilevata mediante monitoraggio continuo della fluorescenza da 45 a 99°C con incrementi di 0.2° C/sec.

I picchi di melting sono stati visualizzati mediante grafico della derivata prima rispetto alla temperatura di melting. La T_m è stata definita come il picco della curva.

I dati dell'analisi quantitativa e della T_m sono stati ottenuti con il software iQ Cycler, versione 3.1 (Bio-Rad).

Ripetibilità

Per confermare la ripetibilità dell'analisi, due replicati di ogni campione sono stati analizzati nella stessa prova di amplificazione per valutare la variazione intra-assay; inoltre la stessa prova è stata poi ripetuta tre volte per valutare la variazione della temperatura di melting inter-assay.

Il coefficiente di variazione (CV) è stato calcolato dividendo la deviazione standard per la media aritmetica dei valori di temperatura di melting misurati ($CV = SD/\text{valore medio}$). I CVs intra-assay rappresentano i coefficienti di variazione media dei risultati dei replicati di tutti i genotipi di *E. granulosus* nella stessa corsa. I CVs inter-assay rappresentano i CV medi dei risultati ottenuti nelle tre prove ripetute.

Sensibilità analitica, specificità e accuratezza

Per valutare la sensibilità analitica e la specificità della real-time sono state preparate delle diluizioni seriali da 10 to 0,1 µg/ml del DNA estratto dalle cisti e del DNA di bufalo e di bovino.

La concentrazione iniziale del DNA è stata valutata spettrofotometricamente usando il Biophotometer (Eppendorf).

Inoltre, per confermare i risultati della real-time PCR, tutti i campioni sono stati sequenziati per la 12S come descritto precedentemente.

Per controllare l'uniformità della temperatura del blocco del ciclizzatore, infine, sono stati analizzati più replicati di un campione a genotipo noto, posto in differenti posizioni del blocco, nella stessa prova di amplificazione.

4) Caratterizzazione molecolare di ceppi di *E.granulosus* in isolati da ovini mediante PCR e sequenziamento ed analisi della curva di melting

Preparazione dei campioni

Settantanove cisti idatidee ovine sono state isolate dagli organi parassitati (fegati e polmoni) di 27 animali e dissezionate in condizioni sterili. Da ogni cisti sono stati prelevati il liquido idatideo, dove presente, o la membrana proligena e sono stati conservati in provette da 2 ml a -20°C fino al momento dell'estrazione del DNA.

Estrazione del DNA

Da ciascuna membrana germinativa o liquido idatideo delle cisti ovine è stata eseguita l'estrazione del DNA mediante QIAmp DNA mini kit della QIAGEN secondo il protocollo già descritto precedentemente nello studio di “Caratterizzazione molecolare di ceppi di *E.granulosus* in isolati da bufali e bovini mediante PCR e sequenziamento”.

Quantificazione

La fase di quantificazione ha consentito di valutare la resa dell'estrazione di DNA. Essa è stata effettuata mediante analisi spettrofotometrica (Biophotometer, Eppendorf) considerando che:

1 O.D. ($\lambda=260\text{ nm}$) = 50 $\mu\text{g/ml}$ di dsDNA

Per effettuare la lettura, 60 μl di campione, eventualmente diluito, sono stati posti in Uvette di plastica ed analizzati con il programma dsDNA.

Le letture, in triplicato, sono state effettuate dallo spettrofotometro a 260 nm e 280 nm, lunghezze d'onda alle quali lo strumento rileva, rispettivamente, gli acidi nucleici e le proteine presenti nella soluzione analizzata.

E' stato valutato anche il rapporto O.D. 260/280 (che dovrebbe essere compreso tra 1,8 e 2,0), indice della purezza del campione.

PCR per l'amplificazione della CO1 e PCR real-time per l'amplificazione della 12S

Per l'amplificazione della CO1 sono state utilizzate 25 pmol di ogni primer, JB3 e JB4.5 (Bowles et al., 1992; tabella 1) in un volume finale di 50 µl contenente 10-100 ng di DNA, 200 µM di ciascun dNTP (Invitrogen), 2,5 mM di MgCl₂, 2U di TaqGold DNA polimerasi e 1x di Taq Gold buffer (tutti prodotti Applied Biosystems).

La reazione enzimatica è stata effettuata in un ciclizzatore AB 2700 (Applied Biosystems) alle seguenti condizioni: una fase iniziale di denaturazione a 95°C per 10' per l'attivazione della Taq Gold, seguita da 40 cicli di amplificazione a 94°C per 30'' (denaturazione), 53°C per 60'' (annealing), 72°C per 60'' (estensione) e una fase finale di estensione a 72°C per 7' per la stabilizzazione dei prodotti di PCR.

L'amplificazione della 12S è stata effettuata utilizzando la metodica real-time. La mix di PCR è stata preparata con: 25 µl di 1x iQ SYBR Green Supermix kit (Bio-Rad Laboratories), 2 µl di DNA (2ng/PCR) e 125 nM di ogni primer 12S F e 12S R in un volume finale di 50 µl.

La real-time PCR è stata eseguita in un Mini Opticon (Real-time) PCR Detection System (Bio-Rad). Dopo una fase di pre-incubazione a 95 °C per 3 min, per attivare la polimerasi, sono stati effettuati 40 cicli di amplificazione, ognuno comprendente: una fase di denaturazione a 94°C

per 30 sec, l'estensione a 62°C per 30 sec e l'annealing a 72°C per 30 sec, seguiti da una estensione finale a 72°C per 7 min.

Elettroforesi per i campioni amplificati per la CO1

I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati su gel di agarosio al 2% ad alta risoluzione (Nusieve GTG, Cambrex Bio Science), usando come tampone il TBE 1 X (50 mM Tris, 45 mM acido borico, 0.5 mM EDTA, Invitrogen), ed applicando un voltaggio di 90 V costanti per circa 1 h e 30'.

Gli amplificati, colorati con bromuro di etidio (0,5 µg/ml) sono stati visualizzati con lampada a raggi UV (Biometra, TI 1) e fotografati.

Il peso molecolare del frammento amplificato è stato stimato con il ladder 100bp (GeneRuler, Fermentas) per confronto.

Purificazione dei prodotti di PCR della CO1 e della 12S

Per determinare la composizione nucleotidica dei marcatori genetici CO1 e 12S, i prodotti di PCR sono stati opportunamente purificati, utilizzando il QIAquick gel extraction kit (QIAGEN), per allontanare dimeri, primers, nucleotidi residui, DNA polimerasi e sali.

Tale kit contiene delle colonnine che possiedono una membrana di gel di silice che, in presenza di alte concentrazioni di sali e $\text{pH} \leq 7,5$, assorbono il DNA e tre buffers: QG, PE ed EB utili per ottimizzare l'efficienza di recupero del DNA.

Come da protocollo, inizialmente, in una provetta da 2 ml, al prodotto di PCR è stato aggiunto un volume di buffer QG, in quantità pari a 3 volte il peso dell'amplificato tagliato da gel.

Una volta che il gel si è completamente disciolto, dopo incubazione dei campioni a 50°C per 10', vortexando ogni 2-3', è stato aggiunto l'isopropanolo, in quantità pari al peso iniziale del pezzetto di gel.

Il tutto è stato poi trasferito nelle colonnine QIAquick, dopo miscelazione, e sottoposto a centrifugazione a 13000 rpm per 1'.

Il DNA, dopo tale operazione, è stato adsorbito dalla membrana ed il resto, fluito sul fondo del tubo di raccolta, è stato eliminato.

Per aumentare la resa di DNA recuperato, dopo aver svuotato il tubo di raccolta, sono stati aggiunti 500 µl di buffer QG, e le colonnine sono state centrifugate a 13000 rpm per 1'.

Successivamente, sono stati eseguiti dei lavaggi con il buffer PE, necessario per l'allontanamento dei sali residui. Questo buffer di lavaggio, aggiunto in quantità pari a 750 µl, è stato poi allontanato, centrifugando le provette a 13000 rpm per 1'.

Per ottenere un eluato più pulito, sono stati effettuati due ulteriori cicli di lavaggio, non previsti dal protocollo, ognuno con una quantità di buffer PE pari a 500 µl, allontanato centrifugando entrambe le volte le provette a 13000 rpm per 1'.

Per eliminare ogni eventuale residuo di buffer PE, contenente etanolo, che avrebbe potuto interferire con le successive reazioni enzimatiche, i campioni sono stati ricentrifugati a 13000 rpm per 2'.

Nella fase finale di eluizione, le colonnine sono state trasferite in nuovi tubi da 2 ml e, dopo l'aggiunta di 50 µl di buffer EB (10mM Tris-HCl, pH 8,5), sono state centrifugate a 13000 rpm per 1'.

Sequenziamento

Tutti gli amplificati sono stati sequenziati utilizzando la chimica BigDye terminator ver 1.1 (Applied Biosystems), che si basa sull'amplificazione

ciclica del DNA, interrotta dall'inserimento di un dNTP che diventa 3' terminale.

Per la mix per la reazione di sequenza sono stati utilizzati: 4 µl di mix di sequenziamento (contenente i dideossinucleotidi marcati), 2 µl di buffer di sequenziamento (5 X), 3,2 µl di primer (1 µM) e 5 ng di DNA per 100 bp di amplificato in un volume finale di 20µl.

Come controllo di reazione è stato usato DNA del plasmide pGEM come indicato dal produttore.

La reazione di sequenziamento, ciclica, è stata eseguita in un GenAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems) alle seguenti condizioni: una fase iniziale di denaturazione a 96°C per 1', seguita da 25 cicli di amplificazione a 94°C per 10'' (denaturazione), 50°C per 5''(annealing) e 60°C per 4'(estensione).

Ogni campione è stato sequenziato 3 volte per ogni primer utilizzato.

Purificazione post-sequenziamento

La purificazione è stata effettuata per allontanare i sali, i dideossinucleotidi marcati residui e altri componenti della mix di reazione non esauriti, a basso peso molecolare.

A tale fine sono state usate le Centriceps (Applied Biosystems), colonnine che permettono la purificazione dei prodotti marcati al 3' terminale mediante il principio della gel-filtrazione.

Queste ultime, dopo essere state centrifugate velocemente (in modo da non far disperdere la "polvere" di gel in esse contenute) sono state reidratate con 800 µl di H₂O deionizzata.

Dopo circa 2h, è stata rimossa l'acqua dalle Centriceps, in parte per gravità e in parte mediante centrifugazione per 2' a RT a 500 g, in modo da compattare il gel.

Per la purificazione dei campioni, le colonnine sono state poste nei tubi di eluizione e, successivamente, sono stati caricati i campioni, ottenuti dalla PCR di sequenziamento, al centro delle Centriceps.

Le colonnine, infine, sono state centrifugate a 500 g per 2' a RT; in tal modo, è stato possibile recuperare l'eluato, da analizzare tramite elettroforesi capillare.

Elettroforesi capillare

Per evitare gli appaiamenti inter e intra-specifici, in grado di inficiare la elettroforesi capillare, sono stati aggiunti 5 µl dell'eluato, ottenuti dall'uso delle Centriceps, a 20 µl di formammide (Applied Biosystems); il tutto è stato denaturato a 94°C per 3'.

Lo strumento usato per il sequenziamento è stato l'ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) che separa i frammenti di DNA utilizzando il polimero POP-4™ e/o POP-6™.

Le sequenze sono state sottoposte ad analisi molecolare mediante i software Chromas ver 1.3, BLASTn, (MedLine) e ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/).

5) *Questionnaire survey* sulla EC nell'uomo

Raccolta dati

Per indagare sulla presenza e diffusione della idatidosi nell'uomo in Campania, in collaborazione con il Dipartimento di Medicina Pubblica e della Sicurezza Sociale (Sezione di Malattie Infettive) della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" e con l'indispensabile supporto territoriale della Bayer Italia spa, è stata attivata una *questionnaire survey* presso un significativo numero di medici di base, variamente distribuiti sul territorio della nostra regione. Le analisi statistiche relative ad i risultati ottenuti sono state effettuate utilizzando il software SPSS 13.

Risultati

1) Presenza e diffusione della EC in bufali e bovini

Bufali

Nel periodo di monitoraggio sono stati esaminati 722 bufali, dei quali 76 sono risultati portatori di cisti idatidee (prevalenza media = 10,5%; 95% intervallo di confidenza - IC = 8,4-13,0%) (Fig.1-4).

L'età dei bufali positivi variava tra 2 e 19 anni (età media = 8,3 anni; 95% IC = 7,4-9,2), 67 femmine e 9 maschi.

Le frequenze e le prevalenze dei bufali risultati positivi a *E. granulosus* ripartite in base all'età sono indicate nella tabella 4 che segue.

Tabella 4. Frequenze e prevalenze dei bufali positivi a *E. granulosus* ripartite per classi di età.

Classe di età (anni)	Frequenza (n° positivi=76)	Prevalenza (%)	95% IC
2-3	8	10,5	4,9-20,2
>3 - ≤6	18	23,7	15,0-35,1
>6 - ≤9	18	23,7	15,0-35,1
>9	32	42,1	31,0-54,0

Il test chi-quadro per le differenze delle classi di età è risultato significativo ($\chi^2= 15.4$; $P = 0.002$), dimostrando un trend di incremento di prevalenza con l'età degli animali.

Dalla attenta ispezione effettuata all'esame anatomopatologico dei fegati e polmoni è stato possibile mettere in evidenza un totale di 327 cisti idatidee.

Il numero medio di cisti per bufalo è risultato pari a 4,3 (minimo 1, massimo 45); 17 bufali presentavano idatidi solo a livello epatico (con una media di 5 cisti/fegato), 34 solo a livello polmonare (con una media di 1,8 cisti/polmoni) e 25 in entrambi gli organi.

Le frequenze e le prevalenze dei bufali risultati positivi a *E. granulosus* ripartite in base alla localizzazione anatomica sono riportate nella tabella 5 che segue.

Tabella 5. Frequenze e prevalenze dei bufali positivi a *E. granulosus* ripartite rispetto alla localizzazione anatomica delle cisti.

Localizzazione delle cisti	Frequenza (n° positivi=76)	Prevalenza (%)	95% IC
Fegato	17	22,2	13,9-33,6
Polmoni	34	44,7	33,5-56,5
Fegato e polmoni	25	32,9	22,8-44,7

Cisti fertili sono state riscontrate in 10 dei 76 animali positivi (13,2%; 95% IC = 6.8-23.3%).

Il numero di cisti ritrovate in ogni organo e la loro vitalità sono riportati nella tabella 6 che segue.

Tabella 6. Numero e vitalità delle cisti idatidee raccolte da differenti organi dei bufali.

Organo	N° di cisti	Vitalità delle cisti		
		Fertile	Sterile	calcifica/caseosa
Fegato	167	31	49	87
Polmoni	160	33	59	68
Totale	327	64	108	155

Non sono state riscontrate associazioni statisticamente significative tra la localizzazione e la vitalità delle cisti esaminate (fertile, sterile, calcifica/caseosa) ($\chi^2 = 4.0$; $P = 0.138$).

Infine, i risultati della regressione lineare non hanno mostrato correlazioni significative tra l'età dei bufali infestati ed il numero di cisti ($R^2 = 0.00$; $F = 0.02$; $P = 0.916$).

Bovini

Dei 434 bovini esaminati durante il periodo di monitoraggio, 45 presentavano cisti idatidee (prevalenza media = 10,4%; 95% IC = 7,7-13,7%).

L'età dei bovini positivi variava tra 1 e 19 anni (età media = 8,2; errore standard = 0,59), 433 femmine ed 1 maschio.

Le frequenze e le prevalenze dei bovini risultati positivi a *E. granulosus* ripartite in base all'età sono indicate nella tabella 7 che segue.

Tabella 7. Frequenze e prevalenze dei bovini positivi a *E. granulosus* ripartite per classi di età.

Classe di età (anni)	Frequenza (n° positivi=45)	Prevalenza (%)	95% IC
1-3	9	20,0	10,1-35,0
>3 - ≤6	3	6,7	1,7-19,3
>6 - ≤9	16	35,5	22,3-51,3
>9	17	37,8	24,2-53,5

Il test chi-quadro per le differenze di classe di età è risultato significativo ($\chi^2 = 11.4$; $P = 0.01$), dimostrando anche per i bovini un trend di incremento di prevalenza con l'età degli animali.

Dalla attenta ispezione effettuata all'esame anatomopatologico dei fegati e polmoni è stato possibile mettere in evidenza 363 cisti.

Il numero medio di cisti per bovino è risultato pari a 8,1 (minimo 1, massimo 74); 14 bovini presentavano idatidi solo a livello epatico (con una media di 8 cisti/fegato), 1 solo a livello polmonare (con 2 cisti/polmoni), mentre in 30 soggetti le cisti erano presenti in entrambi gli organi.

Le frequenze delle cisti idatidee in base alla localizzazione anatomica sono rappresentate nella tabella 8 che segue.

Tabella 8. Frequenze e prevalenze dei bovini positivi a *E. granulosus* rispetto alla localizzazione anatomica delle cisti idatidee.

Localizzazione delle cisti	Frequenza (n° positivi=45)	Prevalenza (%)	95% CI
Fegato	14	31,1	18.6-46.8
Polmoni	1	2,2	0.1-13.2
Fegato e polmoni	30	66,7	50.9-79.6

Il test chi-quadro per la differenza di localizzazione anatomica delle cisti è risultato significativo ($\chi^2 = 30.4$; $P = 0.00$).

Il numero di cisti ritrovate in ogni organo e la loro vitalità sono riportati nella tabella 9 che segue. Non sono state trovate cisti fertili.

Tabella 9. Numero e vitalità delle cisti idatidee ritrovate in diversi organi

Organi	N° di cisti	Vitalità delle cisti		
		Fertile	Sterile	calcifica/caseosa
Fegato	239	0	91	148
Polmoni	124	0	64	60
Totale	363	0	155	208

I risultati della regressione lineare non hanno mostrato correlazioni significative tra l'età dei bovini infestati e il numero di cisti ($R^2 = 0.001$; $F = 0.036$; $P = 0.850$).

2) Caratterizzazione molecolare di ceppi di *E.granulosus* in isolati da bufali e bovini mediante PCR e sequenziamento

PCR CO1

La coppia di primers JB3 e JB 4.5 ha amplificato una regione di circa 446 bp (Fig. 5) sia per i 59 campioni bufalini che per i 19 campioni bovini analizzati.

Sequenziamento della CO1 degli isolati di cisti idatidee prelevate da bufali

Per la regione CO1 delle cisti idatidee prelevate da bufali è stata definita una sequenza di 416 bp da tutti i campioni.

Le sequenze ottenute sono state analizzate con il software Chromas ver 1.3 e confrontate con quelle presenti in GenBank utilizzando il software BLASTn; tuttavia, siccome non è stato possibile fare una caratterizzazione immediata mediante tale software, poiché la differenza tra i vari genotipi e le varianti è minima, si è dovuto effettuare l'allineamento di tutte le sequenze ottenute dai nostri campioni, sia tra di loro, che con quelle presenti in GenBank, mediante il software ClustalW. Per 33 campioni è stata riscontrata una identità del 100% con il genotipo ovino G1 (GenBank U50464; Fig.6), per 3 campioni è stata riscontrata una identità del 100% con il genotipo ovino Tasmania G2 (GenBank M84662; Fig.6), mentre per altri 15 campioni è stata evidenziata una identità assoluta con il genotipo bufalo G3 (GenBank M64663; Fig.6).

Inoltre per 3 campioni è stata evidenziata una identità del 100% con la variante G1c (GenBank AY686565; Fig.7), mentre i restanti 5 campioni hanno mostrato una identità del 99% con il genotipo G2 (Tabella 10).

Tabella 10. Risultati del sequenziamento della CO1 delle n. cisti idatidee prelevate da bufali.

Genotipo	n.campioni	Identità
G1	33	100%
G2	3	100%
G3	15	100%
Varianti	n.campioni	Identità
G1c (AF458873)	3	100%
G2	5	99%

Questi ultimi 5 campioni presentavano tutti una sola base differente rispetto al “classico” genotipo G2, ovvero: 1 campione una transizione di una guanina al posto di una adenina in posizione 247 (G247A) con una conseguente sostituzione di una glicina con una serina in posizione 83, 1 altro campione una transizione di una citosina con una timina in posizione 257 (T257C), con la sostituzione di una alanina con una valina in posizione 86. Negli altri 3 campioni c’erano sempre transizioni: C66T in 1 campione e T11C in 2 campioni.

Tuttavia tali mutazioni risultavano “silenti”, non determinando alcun cambiamento aminoacidico rispetto al classico genotipo G2 (Tabella 11).

Tab.11 Cisti idatidee bufaline che presentavano il 99% di identità con la CO1 del genotipo G2 (GenBank M84662).

Isolato n.	Mutazione nucleotidica	Sostituzione aminoacidica*
55	T111C	Nessuna
56	T111C	Nessuna
57	C66T	Nessuna
58	T257C	A86V
59	G247A	S83G

*ORF (open reading frame) traslati con il codice genetico mitocondriale degli echinoderma (Rice et al., 2000), utilizzando il software Translate tool (www.expasy.org/tools/dna.html).

Sequenziamento della CO1 degli isolati di cisti idatidee prelevate da bovini

Anche dal sequenziamento della regione CO1 delle cisti idatidee prelevate da bovini è stata definita una sequenza di 416 bp per tutti i campioni.

Dopo analisi di sequenza effettuata mediante il software ClustalW si sono evidenziati i seguenti risultati: 8 campioni presentavano un'identità del 100% con il genotipo G1 (GenBank U50464; Fig.6), 1 era identico al genotipo G2 (GenBank M84662; Fig.6), mentre 6 campioni presentavano una perfetta corrispondenza con il genotipo G3 (GenBank M84663; Fig.6).

Inoltre, 1 campione presentava un'identità del 100% con la variante G1c (GenBank AY686565; Fig.8), mentre 3 campioni presentavano un'identità del 99% con il genotipo G2 (Tabella12).

Tab.12 Risultati del sequenziamento della CO1 delle 19 cisti idatidee prelevate da bovini.

Genotipo	n.campioni	Identità
G1	8	100%
G2	1	100%
G3	6	100%
Varianti	n.campioni	Identità
G1c (AY686565)	1	100%
G2	3	99%

In particolare di questi ultimi 3 campioni: 1 mostrava una transizione di una adenina con una guanina (G247A), con conseguente sostituzione di una serina con una glicina in posizione 83 (come in uno dei campioni bufalini analizzato), 1 una transizione di una citosina con una timidina (T257C), con conseguente sostituzione di una alanina con una valina in posizione 86 e il rimanente aveva una sostituzione di una adenina con una guanina (G228A), senza alcun “effetto” nella sequenza aminoacidica (Tabella 13).

Tabella 13. Cisti idatidee bovine che presentavano il 99% di identità con la CO1 del genotipo G2 (GenBank M84662).

Isolato n.	Mutazione nucleotidica	Sostituzione aminoacidica*
17	G247A	S83G
18	T257C	A86V
19	G228A	Nessuna

*ORF tradotti con il codice genetico mitocondriale degli echinoderma (Rice et al., 2000), utilizzando il software Translate tool (www.expasy.org/tools/dna.html).

PCR 12S

La coppia di primers 60F e 375R usata per la PCR ha amplificato una regione di circa 370 bp del gene codificante per la 12S (Fig. 9) in tutti i campioni bufalini e bovini analizzati.

Sequenziamento della 12S degli isolati di cisti idatidee prelevate da bufali

Dal sequenziamento dei prodotti di PCR ottenuti per la regione 12S delle cisti idatidee prelevate dai bufali è stata definita una sequenza di 341 bp in ognuno dei campioni analizzati.

Dopo analisi di sequenza effettuata mediante il software ClustalW sono stati ottenuti i seguenti risultati: 33 campioni identificati come G1 con la CO1 sono stati classificati come G1 (GenBank AY462129; Fig.10) anche con la 12S; 15 campioni identificati come G3 con la CO1 sono stati classificati come G3 (GenBank DQ822451; Fig.10) anche con la 12S.

Inoltre, i 3 campioni identificati come variante G1c usando la CO1, sono stati classificati come G1 con la 12S.

Infine, si è visto che la sequenza 12S dei genotipi G2 e G3 è identica al 100%, almeno nel tratto della regione analizzata, per cui i 3 campioni identificati con la CO1 come G2, nonché 4 dei 5 campioni identificati come varianti del genotipo G2, hanno presentato un'identità del 100% con la sequenza del genotipo G3 presente in GenBank (DQ822451). Solo l'isolato 57, identificato come variante G2 (C66T) dall'analisi della CO1, è stato identificato come G1 usando la 12S (Tabella 14).

L'assegnazione finale del genotipo è stata effettuata in base alla regione CO1, in quanto quest'ultima regione è più variabile rispetto alla 12S.

Tabella 14. Isolati di *E. granulosus* bufalini, esaminati per le sequenze CO1 e 12S e relativi genotipi assegnati

Isolato n.	Genotipo assegnato utilizzando la CO1	Genotipo assegnato utilizzando la 12S	Genotipo finale assegnato
1-33	G1	G1	G1
34-36	G2	G2/G3	G2
37-51	G3	G3	G3
52-54	G1 c	G1	G1 c
55	G2 variante(T111C)	G2/G3	G2 variante
56	G2 variante(T111C)	G2/G3	G2 variante
57	G2 variante(C66T)	G1	Non determinato
58	G2 variante(T257C)	G2/G3	G2 variante
59	G2 variante(G247A)	G2/G3	G2 variante

Sequenziamento della 12S degli isolati di cisti idatidee prelevate da bovini

Dal sequenziamento della regione 12S delle cisti idatidee prelevate da bovini è stata definita una sequenza di 341 bp per tutti i campioni.

Dei 19 campioni bovini, 8 sono stati identificati come G1 (GenBank AY462129; Fig.10) e 6 come G3 (GenBank DQ822451; Fig.10), confermando i risultati ottenuti con la CO1.

Inoltre, l'isolato bovino identificato come G1c usando la CO1, è stato classificato come G1 usando la 12S; mentre il campione bovino identificato come G2 e 2 dei 3 campioni identificati come varianti G2 con la CO1, hanno presentato un'identità del 100% con la sequenza del genotipo G3 presente in GenBank (DQ822451). Solo l'isolato 18 identificato come variante G2 (T257C) con la CO1, è stato identificato come G1 usando la 12S (Tabella 15).

Tabella 15. Isolati di *E. granulosus* da bovini esaminati per la CO1 e per la 12S e relative assegnazione del genotipo.

Isolato n.	Genotipo assegnato utilizzando la CO1	Genotipo assegnato utilizzando la 12S	Genotipo finale assegnato
1-8	G1	G1	G1
9	G2	G2/G3	G2
10-15	G3	G3	G3
16	G1 c	G1	G1 c
17	G2 variante(G247A)	G2/G3	G2 variante
18	G2 variante(T257C)	G1	Non determinato
19	G2 variante(G228A)	G2/G3	G2 variante

3) “Clustering” mediante Sybr Green I/real-time

Scelta dei primers e ottimizzazione della PCR

Entrambe le coppie di primers hanno prodotto ampliconi della grandezza attesa; tuttavia, i primers 12SF e 12S R hanno dato i risultati migliori, poichè il prodotto ottenuto non presentava aspecifici.

Per quanto riguarda invece la ottimizzazione delle componenti della mix di PCR, la concentrazione di ioni magnesio scelta è stata di 2,5 mM, mentre la concentrazione finale dei primers è stata di 125 nM.

La migliore temperatura di annealing è invece risultata quella di 62°C.

Analisi della curva di melting, identificazione dei campioni e ripetibilità delle prove

Visto che i campioni analizzati già erano stati sequenziati per la CO1, è stato possibile definire che la T_m dei campioni G1 variava tra 76.2°C e 76.6°C, mentre per i campioni G2 e G3 variava tra 76.8°C e 77.2°C (indipendentemente dall'ospite) (Fig.11, 12).

Quattordici campioni hanno presentato una T_m media di 76,4°C, mentre sedici campioni hanno presentato una T_m media di 77°C. La T_m media e la SD di ogni genotipo sono riportate in Tabella 16.

Tabella 16. T_m e SD medie dei differenti genotipi

Genotipo	T_m (°C) media	SD
G1	76,4	0,15
G2	77	0,13
G3	77	0,14

I CVs inter (0.12%) e intra-assay (0.06%) calcolati sono riportati in Tabella 17.

Tabella 17. CV intra ed inter-assay per ogni genotipo

Genotipo	CV (%) intra-assay	CV (%) inter-assay
G1	0,02	0,11
G2	0,08	0,14
G3	0,03	0,11
media	0.06	0.12

Sensibilità analitica, specificità e accuratezza

La concentrazione limite, che permette una accurata identificazione del genotipo, è risultata quella di 2ng/PCR per tutti i campioni; al di sotto di questo valore di concentrazione, la T_m non è risultata ripetibile.

Il DNA di bufalo e di bovino è risultato non amplificabile con i primers per la 12S, per cui si è visto che in nessun modo il DNA dell'ospite interferisce con l'analisi.

I risultati ottenuti mediante la Real-time PCR per tutti i campioni sono stati confermati mediante sequenziamento della regione 12S; infatti, i 14 campioni che presentavano una T_m compresa tra 76,2 e 76,6°C presentavano il 100% di identità con quella del genotipo G1 presente in GenBank (AY462129), mentre i 16 campioni che presentavano una T_m compresa tra 76,8 e 77,2°C presentavano il 100% di identità con quella del genotipo G3 presente in GenBank (DQ822451).

Anche con questo tipo di analisi non è stato possibile discriminare tra i genotipi G2 e G3 utilizzando come marcatore la 12S; inoltre, anche con la real-time, è stata rilevata la discordanza tra i risultati delle analisi di sequenza della CO1 e della 12S di due campioni, 1 bufalino e 1 bovino.

Infine, per quanto riguarda la prova di uniformità della temperatura del blocco, si è visto che tutti i replicati dello stesso campione posto in diverse posizioni ha dato la stessa T_m , per cui i risultati ottenuti sono tutti attendibili.

4) Caratterizzazione molecolare di ceppi di *E.granulosus* in isolati da ovini mediante PCR e sequenziamento ed analisi della curva di melting

CO1

La coppia di primers JB3 e JB 4.5 usata per la PCR ha amplificato una regione di circa 446 bp (Fig. 5) per tutti i 77 campioni ovini analizzati.

Dal sequenziamento della regione CO1 delle cisti è stata definita una sequenza di 416 bp per tutti i campioni.

Le sequenze ottenute sono state analizzate con il software Chromas ver 1.3 e confrontate con quelle presenti in GenBank utilizzando i software BLASTn e ClustalW.

Per 52 campioni è stata riscontrata una identità del 100% con il genotipo ovino G1 (GenBank U50464), mentre per 25 campioni, è stata evidenziata una identità assoluta con il genotipo bufalo G3 (GenBank M64663).

12S

I risultati ottenuti dall'analisi della 12S tramite real-time PCR sono in accordo con quelli ottenuti dall'analisi di sequenza della CO1; infatti, per 52 campioni G1 la T_m variava tra 76.2°C e 76.6°C, mentre per 25 campioni G3 variava tra 76.8°C e 77.2°C.

5) *Questionnaire survey* sulla EC nell'uomo

Nella *questionnaire survey* sono stati coinvolti 233 medici, dei quali 68 (29,2%) hanno e/o hanno avuto casi di echinococcosi. I risultati sono riportati in tabella 18.

Tabella 18. Risultati dell'indagine sulla echinococcosi cistica nell'uomo in Campania

	Frequenza	%
Ha pazienti con EC	12	5,1
Ha avuto pazienti con EC	53	22,7
Ha ed ha avuto pazienti con EC	3	1,3
TOTALE MEDICI	68	29,2

I pazienti che hanno avuto e/o hanno EC sono in totale 77. In Fig.13 sono indicati i comuni di provenienza dei 77 pazienti positivi, 38 maschi e 39 femmine

Le frequenze e le prevalenze dei pazienti positivi riportati in base all'età sono indicate nella tabella 19 che segue.

Tabella 19. Frequenze e prevalenze dei pazienti con echinococcosi cistica rispetto alla classe di età

Classe di età (anni)	Frequenza (n° positivi=77)	Prevalenza (%)	95% CI
<10	2	2,6	0.4-9.9
10-20	6	7,8	3.2-16.8
20-50	30	39,0	28.3-50.8
>50	35	45,5	34.2-57.2
No dato	4	5,2	1.7-13.5

Il test chi-quadro per le differenze delle classi di età è risultato significativo ($\chi^2=4.5$; $P = 0.000$), dimostrando anche per l'uomo un trend di incremento di prevalenza con l'età dei pazienti.

Le frequenze delle cisti idatidee in base alla localizzazione anatomica sono rappresentate nella tabella 20 che segue.

Tabella 20. Frequenze e prevalenze dei pazienti positivi rispetto alla localizzazione anatomica delle cisti idatidee

Localizzazione delle cisti	Frequenza (n° positivi=77)	Prevalenza (%)	95% CI
Fegato	56	72,7	61.2-82.0
Polmone	8	10,4	4.9-20.0
Fegato e polmone	7	9,1	4.0-18.4
Altra sede	1	1,3	0.1-8.0
No dato	5	6,5	2.4-15.1

In Fig.14 è rappresentata la frequenza dei pazienti positivi rispetto alla professione.

Discussione e conclusioni

I risultati di questi tesi portano un importante contributo di conoscenze relative alla epidemiologia della echinococcosi cistica (EC) nei bufali, bovini, ovini ed uomo in Campania.

Riguardo alla EC dei bufali, a tutt'oggi, mancavano indagini mirate (sia in Italia e nell'intera area del Mediterraneo), come emerge anche da una recente review del Centro di Controllo delle Zoonosi Mediterranee (WHO) (Seimenis, 2003) dove sono riportati valori di incidenza e/o prevalenza di echinococcosi-iatridosi relativi all'uomo, ai bovini, agli ovini, ai caprini, ai cammelli ed ai cani.

Dalla letteratura internazionale, risultano solo le indagini svolte in Bangladesh (Islam, 1982), in India (28,6-36,0%) (Singh et al., 1988; Irshadullah et al., 1989), in Pakistan (33,1%) (Khan et al., 1990), in Iran (con prevalenze variabili dal 4 al 12%) (Mehrabani et al., 1999; Dalimi et al., 2002; Daryani et al., 2007) ed in Nepal (Joshi, 2007).

I valori di prevalenza di EC nei bufali nel presente studio pari al 10,5% sono da ritenere piuttosto elevati essendo, tra l'altro, più alti rispetto a quelli riportati da Cringoli et al. (1998) in bovini (3,8%), ovini (5,0%), caprini (1,23%) e suini (0,8%) della stessa regione.

I risultati del modello di regressione lineare non hanno evidenziato correlazioni significative tra l'età dei bufali parassitati ed il numero di cisti rilevate, contrariamente a quanto riportato in altre specie di ospiti intermedi (pecore, capre, cavalli) (Torgerson e Heath, 2003). Ciò può essere spiegato dal fatto che in altre specie, es. piccoli ruminanti, la pressione parassitaria è pressoché costante, in relazione alla contaminazione dei pascoli con le uova del cestode. Di contro, considerando l'attuale sistema di allevamento del bufalo in Italia (intensivo al chiuso e alimentazione con foraggi secchi e/o con

integrazione di concentrati), l'ingestione di uova di *E. granulosus* da parte dei bufali sembra essere occasionale.

Riguardo alla localizzazione delle cisti, nella maggior parte degli parassitati sono state rilevate a livello polmonare.

In merito alla tipologia delle cisti il 19,6% localizzate sia a livello polmonare che epatico è risultato fertile, cisti caseose e calcificate erano più frequenti nel fegato (52,0%), cisti sterili sono state più frequentemente riscontrate nei polmoni (36,8%).

Nessuna correlazione positiva, comunque, è stata rilevata tra la vitalità delle cisti e la loro localizzazione anatomica.

Nei bovini i valori di prevalenza riscontrati (10,4%) sono sovrapponibili a quelli riscontrati nei bufali e più elevati rispetto a quelli riportati in precedenti studi sui bovini in Campania (Damiano et al., 1964; Capurso et al., 1968; Cringoli et al., 1998).

Questi risultati, inoltre, se comparati ai dati nazionali, confermano che la EC è più diffusa nel Sud Italia e nelle isole piuttosto che nel Nord Italia (Garippa et al., 2004). Difatti, i valori di prevalenza nei bovini sono pari a 0,1% e 0,5% in Lombardia ed Emilia-Romagna, rispettivamente (Guazzetti et al., 2006; Manfredi et al., 2007); 4,0% (Giangaspero et al., 2006) in Abruzzo; mentre, in Sicilia ed in Sardegna raggiungono il 67,2% e 41,5%, rispettivamente (Varcasia et al., 2007).

I risultati del modello di regressione lineare, come nei bufali, non hanno mostrato correlazioni significative tra l'età degli animali positivi ed il numero di cisti idatidee.

La maggior parte degli animali positivi (66,7%) presentava cisti sia nel fegato che nei polmoni, in accordo con quanto riscontrato anche da Giannetto et al. (2004) e da Azlaf e Dakkak (2006).

In merito alla tipologia, sono state ritrovate cisti caseose e calcifiche più frequentemente nel fegato (62%), mentre nei polmoni sono state più

frequentemente riscontrate cisti sterili (51,6%) come riportato anche da Scala et al. (2004) e come ritrovato anche nei bufali.

In questi studi non sono state mai riscontrate cisti fertili nei bovini esaminati. Questo dato è in accordo con quanto presente in letteratura circa le basse prevalenze di fertilità delle cisti bovine rispetto a quelle degli altri ospiti intermedi: 0% in Libia (Khan et al., 2001), 0,7% in Australia (Banks et al., 2006), 0,76% in Sardegna (Scala et al., 2004), 4% in Sicilia (Giannetto et al., 2004).

Molto probabilmente, la fertilità delle cisti idatidee è correlata con il genotipo. Come riportato da Eckert e Thompson (1997), sono stati riscontrati valori di fertilità pari al 90% in bovini infestati con il genotipo G5 (genotipo bovino).

Per quanto riguarda le indagini molecolari, i risultati di questo studio hanno dimostrato la presenza dei genotipi G1 (genotipo ovino), G2 (genotipo ovino Tasmania), G3 (genotipo bufalo) e varianti di G1 e G2, sia nelle cisti bovine che bufaline; mentre non è stato mai ritrovato il genotipo G5.

In accordo con quanto rilevato da Busi et al. (2006), per quanto riguarda il gene 12S, tra G1 (GenBank AY462129) e G3 (DQ822451) ci sono due nucleotidi di differenza - in posizione 181 (T in G1, G in G3) e in posizione 220 (A in G1, G in G3) (Fig. 10).

I risultati acquisiti con questa tesi hanno dimostrato, per la prima volta, che i genotipi G2 e G3 hanno la stessa sequenza per il gene 12S; quindi, questo marcatore non risulta utile per discriminare i genotipi G2 e G3 di *E. granulosus*.

Il genotipo G1 è risultato quello più diffuso nei bovini allevati in Campania (42,1%), in accordo con i dati di letteratura inerenti l'Italia ed i Paesi del Bacino del Mediterraneo (Seimenis, 2003). Anche la presenza dei genotipi G2 (5,3%) e G3 (31,6%) nei bovini conferma quanto già

riportato in precedenti studi (Busi et al., 2004; Giangaspero et al., 2006; Busi et al., 2007; Varcasia et al., 2007). Inoltre, nel presente studio, sono state identificate alcune varianti del genotipo G1 (5,3%) e del genotipo G2 (15,7%).

Il bufalo asiatico (*Bubalus bubalis*) si rivela un importante ospite intermedio di *E. granulosus*. Studi di biologia molecolare hanno dimostrato che è sensibile, oltre al “proprio” ceppo G3, anche ai genotipi G1 e G5 (Thompson e McManus, 2002). A livello mondiale, mancavano indagini molecolari finalizzate alla identificazione dei genotipi di *E. granulosus* nel bufalo. Le indagini hanno consentito la identificazione dei genotipi G1 (55,9%), G2 (5,1%) e G3 (25,4%), della variante G1c (5,1%) e di alcune varianti di G2 (8,5%); in particolar modo, una variante del genotipo G2, ritrovata in un isolato bufalino, denominata G2 variante C66T, è stata precedentemente identificata in un ovino in Marocco (GenBank EF367260.1). In linea con questi risultati, Bhattacharya et al. (2007) hanno recentemente riscontrato la presenza del genotipo G2 e sue varianti in bufali indiani.

La real-time PCR, a differenza della classica PCR, è stata finora utilizzata solo in pochissimi studi di identificazione e di discriminazione di parassiti, soprattutto protozoi (Bell e Ranford-Cartwright, 2002).

La real-time PCR, utilizzata per la prima volta su *E. granulosus*, è una tecnica caratterizzata da elevata sensibilità, specificità, accuratezza e ripetibilità, tutti parametri ben evidenziabili anche nel metodo qui descritto. Difatti, nel presente studio, non ha amplificato il DNA dell'ospite, ma solo il target desiderato (12S mtDNA di *E. granulosus*); inoltre, i valori delle T_m dei prodotti di PCR ottenuti sono risultati altamente ripetibili, con valori di CV inter e intra-assay bassi (0,12% e 0,06%, rispettivamente).

I valori di T_m , sebbene mostrano un certo range di variabilità (per G1 76,2-76,6°C, mentre per G2/G3 76,8-77,2°C), non si sovrappongono in nessun intervallo di valori. La differenza media di T_m rilevata tra il genotipo G1 e i genotipi G2/G3 è stata di 0,6°C. Tale differenza permette una veloce e semplice identificazione dei diversi genotipi di *E. granulosus*.

I risultati di questo studio, inoltre, hanno dimostrato che la discriminazione dei genotipi realizzata mediante PCR real-time è in accordo con quella ottenuta dall'analisi di sequenza della 12S. La real-time, però, risulta più veloce ed economicamente più conveniente rispetto al sequenziamento.

Anche in base ai risultati ottenuti dall'analisi molecolare delle cisti ovine si è potuta avere quindi una conferma della validità, sensibilità e specificità di quest'ultima metodica. Il genotipo ovino G1 è risultato il più diffuso in questi piccoli ruminanti (67,5%), come si riscontra in tutta l'area del Mediterraneo (Busi et al., 2007; Varcasia et al., 2006; Mwambete et al., 2004; Varcasia et al., 2007). Inoltre, è stata riscontrata anche la presenza del genotipo G3 (32,5%), dato sovrapponibile a quello riscontrato negli ovini allevati in Lazio (33,7%; Busi et al., 2007).

Solo in Lazio e in Campania, fino ad ora, è stato identificato il genotipo G3 negli ovini, probabilmente, per la presenza, in tali regioni, della maggior parte del patrimonio bufalino nazionale. Nessuna delle cisti idatidee prelevate da ovini nel presente studio è stata identificata come G2, genotipo finora identificato solo in un isolato ovino della Sardegna (Busi et al., 2007).

Per quanto riguarda la diffusione della echinococcosi cistica nell'uomo non è semplice da definire, soprattutto a causa della latenza - spesso lunga - tra infestione e individuazione della cisti. Inoltre, non è facile accedere alle cartelle cliniche e quindi risulta difficile avere a

disposizione i dati dei pazienti ospedalizzati, essenziali per una corretta conoscenza dell'echinococcosi cistica umana. I risultati della *questionnaire survey* hanno evidenziato che il 29,2% dei medici intervistati, variamente distribuiti sul territorio, hanno e/o hanno avuto pazienti con EC, per un totale di 77 casi. Dai dati estrapolati dalle schede è stato possibile definire un quadro parziale su alcune caratteristiche epidemiologiche della EC nell'uomo in Campania. Il 45,5% dei pazienti positivi aveva più di 50 anni, probabilmente proprio per il lungo intervallo di tempo tra infestione e individuazione della cisti. Il fegato è risultato l'organo più parassitato (72,7%), in accordo con quanto precedentemente riportato in Campania (Cringoli et al., 1998) ed in altre regioni italiane (Gabriele et al., 2004). Riguardo alla professione dei pazienti positivi, si è osservato che la EC non è relegata esclusivamente ad allevatori, pastori ed agricoltori, come riscontrato anche da Torgerson et al. (2003)

La distribuzione (per comune di residenza) dei pazienti positivi ha dimostrato che l'echinococcosi cistica non è legata solo alle zone rurali, ma anche ai grandi centri urbani, infatti la più alta frequenza di casi è stata riscontrata nelle città di Napoli e Benevento.

In conclusione, i risultati degli studi riportati nella presente tesi, hanno permesso di definire un quadro piuttosto ampio circa la EC nei bufali, bovini, ovini e uomo in Campania.

Gli ovini sono sicuramente i principali *reservoir* di *E. granulosus* (Romig, 2003; Scala et al., 2004; Daryani et al., 2007), per il fatto che gli organi parassitati di questi ruminanti sono di facile accesso per cani domestici e selvatici (e forse per la volpe rossa); infatti, la macellazione "domestica" degli ovini è molto diffusa in Italia, così come in altri Paesi (Scala et al., 2004). Di contro, in Italia, i bovini ed i bufali sono per lo più allevati in modo intensivo e la macellazione illegale è di norma

assente; inoltre, questi animali vengono macellati in strutture moderne ed efficienti, dove gli organi parassitati vengono distrutti e dove la presenza dei cani è assolutamente vietata. Per queste ragioni è molto improbabile che i cani e/o altri canidi possano ingerire organi infetti di bovini e/o bufali.

Recentemente, uno studio di epidemiologia spaziale, eseguito mediante l'utilizzo di un Geographical Information System (GIS), ha confermato il ruolo chiave degli ovini per la trasmissione della EC a bovini e bufali della regione Campania; difatti, è stata evidenziata una stretta correlazione tra le aziende bovine e/o bufaline positive ad EC con le aziende ovine (Cringoli et al., 2007). Quindi, è verosimile che cani vaganti si infettino di *E. granulosus* alimentandosi su carcasse ovine con cisti idatidee, per poi andare a contaminare le aziende bovine/bufaline vicine.

A testimonianza di ciò, bovini, bufali ed ovini allevati in Campania albergano gli stessi genotipi di *E. granulosus*: G1 (genotipo ovino) e G3 (genotipo bufalo), che costituiscono la sotto-specie *E. granulosus sensu stricto* (Nakao et al., 2007).

Il genotipo G1 è risultato quello più diffuso in tutti e tre gli ospiti intermedi analizzati: bovini (42,1%), bufali (55,9%), ovini (67,5%).

Il fatto che anche nei bufali questo genotipo sia il più presente non deve stupire, infatti risulta come ulteriore prova che i vari genotipi di *E. granulosus* non sono esclusivamente confinati al loro tipico ospite intermedio.

Il genotipo G3 è anch'esso molto presente in tutti e tre gli ospiti analizzati (bovini 31,6%, bufali 25,4%, ovini 32,5%), ed era stato isolato in Italia prima di ora solo in ovini, bovini, cinghiali e uomo nel Lazio (Busi et al., 2007) ed in bovini Abruzzo (Giangaspero et al., 2006).

La presenza dei genotipi G1, G2 e G3 è molto importante dal punto di vista della sanità pubblica, poiché il genotipo G1 è il principale responsabile delle infezioni umane in molte parti del mondo (Dinkel et al., 2004), sebbene anche il genotipo ovino Tasmania G2 (Maillard et al., 2006) e quello bufalo G3 (Busi et al., 2004) sono ad alto potenziale zoonosico.

In conclusione, i risultati di questa tesi apportano un importante contributo di conoscenze circa la presenza, la diffusione e l'epidemiologia molecolare dell'echinococcosi cistica nella Regione Campania, e saranno certamente utili a ricercatori e a quanti si occupano di questa parassitosi - erroneamente ritenuta strettamente legata al solo mondo rurale - di notevolissima importanza sanitaria ed economica sia in campo umano che veterinario.

Bibliografia

Abbasi I., Branzburg A., Campos-Ponce M., Abdel Hafez S.K., Raoul F., Craig P.S., Hamburger J., 2003. Copro-diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. *Am J Trop Med Hyg.*;69(3):324-30.

Abrams E.S., Stanton jr. V.P., 1992. Use of denaturing gradient gel electrophoresis to study conformational transitions in nucleic acids. *Methods Enzymol*; 212: 71-104.

Adlard R.D., Barker S.C., Blair D., Cribb T.H., 1993. Comparisons of the second internal transcribed spacer (Ribosomal DNA) from population and species of Fasciolidae (Digenea). *Int J Parasitol*; 23 (3): 423-425.

Allan J.C., Avila G., Garcia Noval J., Flisser A., Craig P.S., 1990. Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology*; 101 (3): 473-7.

Allan J.C., Craig P.S., Garcia Noval J., Mencos F., Liu D., Wang Y., Wen H., Zhou P., Stringer R., Rogan M. et al., 1992. Coproantigen detection for immunodiagnosis of echinococcosis and taeniasis in dogs and humans. *Parasitology*; 104 (2): 347-56.

Ammann R.W., Eckert J., 1995. Clinical diagnosis and treatment of echinococcosis in humans. In *Echinococcus* and hydatid diseases (R.C.A. Thompson & A.L. Lymbery, eds.); CAB International, Wallingford, Oxon: 411-463.

Ammann R.W., Eckert J., 1996. Cestodes. *Echinococcus*. In *Parasitic diseases of the liver and intestines* (J.V. Weinstock, ed.). *Gastroenterol. Clin N Am*; 25(4): 655-689.

Anderson G.R., Barker S.C., 1993. Species differentiation in the (Didymozoidae: Digenea): restriction fragment length differences in the internal transcribed and 5.8 S ribosomal DNA. *Int J Parasitol*, 23: 133-136.

Andrews P., Thomas H., Pohlke R. & Seubert J. 1983. – Praziquantel. *Med Res Rev*; 3: 147-200.

Arru E., Cerchi S., Ligios C., Masala S., Schianchi G., 1990a. Diffusione attuale dell'Echinococcosi-Idatidosi in Sardegna. Atti Tavola Rotonda Campagna di Eradicazione dell'Echinococcosi/Idatidosi in Sardegna: Attualità e Prospettive: 9-18.

Arru E., Garippa G., Fico R., 1986. Sulla presenza di *Echinococcus granulosus* nella volpe (*Vulpes vulpes*) e nel lupo (*Canis lupus*). Atti Soc Ital Sci Vet; 42: 1089-1092.

Arru E., Garippa G., Manger B.R. 1990b. Efficacy of epsiprantel against *Echinococcus granulosus* infections in dogs. Res vet Sci; 49: 378-379.

Arru E., Pastiglia P., Azzara A., Maida A., 1999. Hydatidosis control within continental systems: about Italy. Arch. Intern. Hydatidosis; 33: 109-113.

Arundel J.H., 1972. A review of cysticercoses of sheep and cattle in Australia. Aust Vet J; 48: 140-53.

Azab M.E., Bishara S.A., Helmy H., Oteifa N.M., El-Hoseiny L.M., Ramzy R.M., Ahmed M.A., 2004. Molecular characterization of Egyptian human and animal *Echinococcus granulosus* isolates by RAPD-PCR technique. J Egypt Soc Parasitol; 34(1):83-96.

Azlaf R., Dakkak A., 2006. Epidemiological study of the cystic echinococcosis in Morocco. Vet Parasitol; 137 (1-2): 83-93.

Bandi C., La Rosa G., Bardin M.G., Damiani G., Comincini S., Tasciotti L., Pozio E., 1995. Random amplified polymorphic DNA fingerprints of the eight taxa of *Trichinella* and their comparison with allozyme analysis. Parasitology; 110: 401-407.

Bandi C., La Rosa G., Comincini S., Damiani G., Pozio E., 1993. Random amplified polymorphic DNA technique for the identification of *Trichinella* species. Parasitology; 107: 419-427.

Bandyopadhyay K., Kellar K.L., Moura I., Casaquei Carollo M.C., Graczyk T.K., Slemenda S., Johnston S.P., da Silva A.J., 2007. Rapid microsphere assay for identification of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* in stool and environmental samples. J Clin Microbiol; 45 (9): 2835-40.

Banks D.J., Copeman D.B., Skerratt L.F., Molina E.C., 2001. *Echinococcus granulosus* in northern Queensland. 1. Prevalence in cattle. *Aust Vet J*; 84 (9): 303-7.

Barber K.E., Mkoji G.M., Loker E.S., 2000. PCR-RFLP analysis of the ITS2 region to identify *Schistosoma haematobium* and *S. bovis* from Kenya. *Am J Trop Med Hyg*; 62 (4): 434-440.

Bardonnet K., Benchikh-Elfegoun M.C., Bart J.M., Harraga S., Hannache N., Haddad S., Dumon H., Vuitton D.A., Piarroux R., 2003. Cystic echinococcosis in Algeria: cattle act as reservoirs of a sheep strain and may contribute to human contamination. *Vet Parasitol.*; 116(1):35-44.

Barker G.C., 2002. Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*; 96 Suppl 1:S21-4.

Bart J.M., Bardonnet K., Elfegoun M.C.B., Dumon H., Dia L., Vuitton D.A., Piarroux R., 2004. *Echinococcus granulosus* strain typing in North Africa: comparison of eight nuclear and mitochondrial DNA fragments. *Parasitology*; 128: 229-234.

Bart J.M., Morariu S., Knapp J., Ilie M.S., Pitulescu M., Anghel A., Cosoroaba I., Piarroux R., 2006. Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. *Parasitol Res*; 98 (2): 130-7.

Battelli G., 2004. Socio-economic impact of cystic echinococcosis and of its control; some data and consideration. *Parassitologia*; 46: 359-62.

Bauer C., 1994. Anthelminthika zum Einsatz gegen Helminthen des Verdauungstraktes, der Atemwege und Harnblase bei Hund und Katze - eine Übersicht. *Kleintierpraxis*; 39: 771-790.

Bauer C., Dausches A., Stoye M., 1986. Effect of a combination of fenbendazole and triclabendazole on naturally acquired helminth infections of sheep. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.*; 93(9): 456-8.

Becker S., Franco J.R., Simarro P.P., Stich A., Abel P.M., Steverding D., 2004. Real-time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 50 (3): 193-9.

Bell A.S., Ranford-Cartwright L.C., 2002. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol*; 18(8):337-42.

- Benazzi P., 2002. Manuale di Polizia Veterinaria. Esculapio editore.
- Bertocchi D., 1951. L'Echinococcosi in Sicilia. Atti Soc Ital Sci Vet; 5: 264-269.
- Bhattacharya D., Bera A.K., Bera B.C., Maity A., Das S.K., 2007. Genotypic characterisation of Indian cattle, buffalo and sheep isolates of *Echinococcus granulosus*. Vet Parasitol, 143 (3-4): 371-4.
- Binz T., Reusch T.B., Wedekind C., Scharer L., Sternberg J.M., Milinski M., 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci from the tapeworm *Schistocephalus solidus*. Mol Ecol; 9(11): 1926-7.
- Bio C., Fagiolo A., 2004. Incidence of Hydatidosis in a sheep's slaughterhouse in the province of Arezzo, Italy. Parassitologia; 46 (Suppl 1): 28.
- Blaxter M.L., De-Ley P., Garey J.R., Liu L.X., Scheldeman P., Vierstraete A., Vanfleteren J.R., Mackey L.Y., Dorris M., Frisse L.M., Vida J.T., Thomas W.K., 1998. A molecular evolutionary framework for the Phylum Nematoda. Nature; 392: 71-75.
- Boore J.L., Brown W.M., 1998. Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. Curr Opin Genet Dev; 8(6): 668-74.
- Bortoletti G., 2007. Cystic echinococcosis in the human liver. Mappede parassitologiche 9. Series Editor Giuseppe Cingoli.
- Botilde Y., Laurent T., Quispe Tintaya W., Chicarro c., Cañavate C., Cruz I., Kuhls K., Schönian G., , Dujardin J.C., 2006. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. Infect Gen Evol; 6 (6): 440-6.
- Bowles J., Blair D., McManus D.P., 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. Mol Biochem Parasitol.; 54(2): 165-73.
- Bowles J., McManus D.P., 1993. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. Mol Bioch Parasitol; 57: 231-240.

- Bretagne S., Assouline B., Vidaud D., Houin R., Vidaud M., 1996. *Echinococcus multilocularis*: microsatellite polymorphism in U1 snRNA genes. *Exp Parasitol*; 82(3): 324-8.
- Breyer I., Georgieva D., Kurdova R., Gottsein B., 2004. *Echinococcus granulosus* strain typing in Bulgaria: the G1 genotype is predominant in intermediate and definitive wild hosts. *Parasitol Res*; 92 (3): 127-30.
- Brianti E., Poglayen G., Virga A., Manfredi M.T., Di Cerbo A.R., Varcasia A., Tomaselli A., Giannetto S., 2006. Echinococcosis and Hydatid Disease in Sicily (Italy). *Parassitologia*; 48: 330.
- Brindley P.J., Gazzinelli R.T., Denkers E.Y., Davis S.W., Dubey J.P., Belfort jr. R., Martins M.C., Silveira C., Jamra L., Waters A.P., Sher A., 1993. Differentiation of *Toxoplasma gondii* from closely related coccidia by riboprint analysis and a surface antigen gene polimerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*; 48: 447-456.
- Bruña-Romero O., Hafalla J.C., González-Aseguinolaza G., Sano G., Tsuji M., Zavala F., 2001. Detection of malaria liver-stages in mice infected through the bite of a single Anopheles mosquito using a highly sensitive real-time PCR. *Int J Parasitol.*;31(13):1499-502.
- Brunetti E., Maiocchi L., Garlaschelli A.L., Gulizia R., Filice C., 2004. Attualità in tema di terapia dell'echinococcosi cistica. *Parassitologia*; 46: 45-51.
- Brunetti E., Filice C., Grisolia A., Battelli G., 2007. PAIR. A preliminary evaluation of cost in Italy. Proceeding book of 22nd International Congress of Hydatidology & International Symposium on Zoonoses, OP94, Atene, 15-19 May.
- Busi M., Varcasia A., Garippa G., Šnábel V., Perrone V., De Liberato C., D'Amelio S., 2006. Molecular genotyping of *Echinococcus granulosus* hydatid cysts in Italy by DNA sequencing of the 12S mitochondrial gene confirms the genetic differentiation of the G1 and G3 genotypes. *Parassitologia*; 48: 174.
- Busi M., Šnábel V., Varcasia A., Garippa G., Perrone V., De Liberato C., D'Amelio S., 2007. Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* in Italy revealed by multilocus DNA sequencing. *Vet Parasitol*; 150 (1-2): 75-83.

Cabrera M., Canova S., Rosezvit M., Guarnera E., 2002. Identification of *Echinococcus granulosus* eggs. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 44(1):29-34.

Cabrera P.A., Parietti S., Haran G., Benavidez V., Lloyd S., 1996. Rates of reinfection with *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena*, *taenia ovis* and other cestodes in a rural dog population in Uruguay. *Int J Parasitol*; 26(1): 79-83.

Capurso A., Rivellini P., Guarino C., 1968. Sulla diffusione di *Echinococcus granulosus* nei cani di Napoli e di alcuni comuni della provincia. *Atti Soc Ital Sci Vet*; 22: 725-729.

Casaravilla C., Iborra F., Sim R.B., Ferriera F., Diaz A., 2004. Unique precipitation and exocytosis of a calcium salt of myo-inositol hexakisphosphate in larval *Echinococcus granulosus*. *J Cell Biochem*; 93(6):1272-81.

Casaravilla C., Malgor R., Casarosa L., 1985. *Parassitologia degli animali domestici*. Casa editrice Ambrosiana: 161-169.

Casaravilla C., Malgor R., Rossi A., Sakai H., Nonaka N., Kamiya M., Carmona C., 2005. Production and characterization of monoclonal antibodies against excretory/secretory products of adult *Echinococcus granulosus*, and their application to coproantigen detection. *Parasitol Int*; 54 (1): 43-9.

Casulli A., La Rosa G., Manfredi M.T., Genchi C., Pozio E., 2007. First detection of *Echinococcus ortleppi* in Italy. *Proceeding book of 22nd International Congress of Hydatidology & International Symposium on Zoonoses*, PO06, Atene, 15-19 May.

Chen X, Kwok PY., 1999. Homogeneous genotyping assays for single nucleotide polymorphisms with fluorescence resonance energy transfer detection. *Genet Anal*;14(5-6):157-63.

Chilton N.B., Gasser R.B., Beveridge I., 1995. Differences in a Ribosomal DNA sequence of morphologically indistinguishable species within the *Hypodontus macropi* Complex (Nematoda: Strongyloidea). *Int J Parasitol*; 25 (5): 647-651.

Chilton N.B., Gasser R.B., Beveridge I., 1997. Phylogenetic relationships of Australian Strongyloid Nematodes inferred from Ribosomal DNA sequence data. *Int J Parasitol* ; 27 (12): 1481-1494.

Christofi C., Deplazes P., Christofi N., Tanner I., Economides P., Eckert J., 2002. Screening of dogs for *Echinococcus granulosus* coproantigen in a low endemic situation in Cyprus. *Vet Parasitol* 2; 104(4): 299-306.

Clarkson M.J., Walters T.M., 1992. The growth and development of *Echinococcus granulosus* of sheep origin in dogs and foxes in Britain. *Ann Trop Med Parasitol*; 85 (1): 53-61.

Cobo F., Yarnoz C., Sesma B., Fraile P., Aizcorbe M., Trujillo R., Diaz-de-Liano A., Ciga M.A., 1998. Albendazole plus praziquantel versus albendazole alone as a pre-operative treatment in intra-abdominal hydatidosis caused by *Echinococcus granulosus*. *Trop Med Int Health*; 3(6): 462-6.

Collins F.H., Petrarca V., Mporfu S., Branding – Bennett A.D., Were J.B.O., Rasmussen M.O., Finnerty V., 1988. Comparison of DNA probe and cytogenetic methods for identifying field collected *Anopheles gambiae* complex mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*; 39: 545-550.

Conchedda M., Palmas C., Bortoletti G., Gabriele F., Ecça A.R., 1997. Hydatidosis : a comprehensive view of the Sardinian case. *Parassitologia*; 39: 359-366.

Conchedda M., Bortoletti G., Ecça A.R., Gabriele F., Palmas C., 2002. Study on immunobiology in endoparasites of public health interest: echinococcosis-hydatidosis. *Parassitologia*; 43: 11-9.

Cordero Del Campillo M., Rojo Vasquez F.A., Martinez Fernandez A.R., Sanchez Acedo M.C., Hernandez Rodriguez S., Navvarete Lopez-Cozar I., Diez Banos P., Quiroz Romero H., Carvalho Varala M., 1999. *Parassitologia veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana de Espana.

Corwin R.M., Green S.P., Keefe T.J. 1989. – Dose titration and confirmation test for determination of cestocidal efficacy of espiprantel in dogs. *Am J vet Res*; 50: 1076-1077.

Cotton R.G.H., 1997. *Mutation Detection*. Oxford University Press., Oxford.

Craig P.S., 1997. *Echinococcus granulosus*: immunodiagnosis and vaccination, a perspective. *Parassitologia*; 39(4): 345-7.

Craig P.S., Gasser R.B., Parada L., Cabrera P., Parietti S., Borgues C., Acuttis A., Agulla J., Snowden K., Paolillo E., 1995. Diagnosis of canine echinococcosis: comparison of coproantigen and serum antibody tests with arecoline purgation in Uruguay. *Vet Parasitol.*; 56(4): 293-301.

Craig P.S., Larrieu E., 2006. Control of cystic echinococcosis/hydatidosis: 1863-2002. *Adv Parasitol*; 61: 443-508.

Craig P.S., Rogan M.T., Allan J.C., 1996. Detection, screening and community epidemiology of taeniid cestode zoonoses: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. *Adv Parasitol*; 38: 169-250.

Cringoli G., Capuano F., Landolfi M.C., Esposito A., Veneziano V., Rinaldi L., 1998. La Echinococcosi-Idatidosi in Campania. *Atti Giornate Scientifiche Campane*: 238.

Cringoli G., 2001. *Mappe parassitologiche* 4.

Curtis J., Fraga L.A., de Souza C.P., Corrêa-Oliveira R., Minchella D.J., 2001. Widespread heteroplasmy in schistosomes makes an mtVNTR marker "nearsighted". *J Hered*; 92(3): 248-53.

Dalimi A., Motamedi G., Hosseini M., Mohammadian B., Malaki H., Ghamari Z., Ghaffari Far F., 2002. Echinococcosis/hydatidosis in western Iran. *Vet Parasitol*; 105 (2): 161-171.

Dalimi A., Sattari A., Motamedi G., 2006. A study on intestinal helminthes of dogs, foxes and jackals in the western part of Iran. *Vet Parasitol*; 142 (1-2): 129-33.

Damiano S., 1964 Indagini sulla frequenza della paramfistomosi riscontrata in bovini nel mattatoio di Aversa. *Acta Med. Vet.* 10: 397-401.

Daniel Mwambete K., Ponce-Gordo F., Cuesta-Bandera C., 2004. Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Acta Tropica*; 91 (2): 87-93.

Daryani A., Alei R., Arab R., Sharif M., Dehghan M.H., Ziaei H., 2007. The prevalence, intensity and viability of hydatid cysts in slaughtered animals in the Ardabil province of Northwest Iran. *J Helminthol*; 81 (1): 13-7.

Dawkins H.J.S., Spencer T.L., 1989. The isolation of nucleic acids from nematodes requires an understanding of the parasite and its cuticular structure. *Parasitol Today*; 5: 73-76.

de Oliveira J.P., Fernandes F., Cruz A.K., Trombela V., Monteiro E., Camargo A.A., Barral A., de Oliveira C.I., 2007. Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. *Kinetoplastid Biol Dis*; 6: 5.

De Rosa F., Lastilla M.G., Franchi C., Teggi A., 1996. Progressi nella terapia medica della idatidiosi umana. *Recent. Progr. Med.*; 87: 346-352.

Deplazes P., Gottstein B., Eckert J., 1992. Detection of *Echinococcus* coproantigens by enzyme-linked immunosorbent assay in dogs, dingoes and foxes. *Parasitol Res*; 78(4): 303-8.

Deplazes P., Gottstein B., Stingelin Y., Eckert J., 1990. Detection of *Taenia hydatigena* copro-antigens by ELISA in dogs. *Vet Parasitol*; 36: 91-103.

Després L., Imbert-Establet D., Combes C., Bonhomme F., Monnerot M., 1991. Isolation and polymorphism in mitochondrial DNA from *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*; 47: 139-42.

Di Nardo V., Albertoni F., Pitorri A., Capozzi A., Sommella L., Gargiulo M., Tassi C., Ferrelli R., Condoleo R.U., Pompilio S., Celletti S., De Stefano G., 1987. Stato attuale dell'idatidiosi in Italia Centrale. *G Mal Inf Paras*; 39: 228-235.

Di Ventura M., Brugnola L.M., Tieri E., Scacchia M., Gatti A., 1995. Indagine sulla presenza di Cestodi in volpi (*Vulpes vulpes*) e cani (*Canis familiaris*) nella provincia di Teramo. *Atti Conv Naz "Problematiche veterinarie emergenti nelle aree protette"*: 57-59.

Dinkel A., Njoroge E.M., Zimmermann A., Walz M., Zeyhle E., Elmahdi I.E., Mackenstedt U., Romig T., 2004. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. *Int. J. Parasitol.*; 34 (5): 645–653.

Ecca A.R., Bortoletti G., Conchedda M., Palmas C., Gabriele F., 1998. Human hydatidosis in Sardinian. A retrospective survey. *Parassitologia* 40 (Suppl.1): 49.

Eckert J., 1986. Prospects for treatment of the metacestode stage of *Echinococcus*. In *The biology of Echinococcus and hydatid disease* (R.C.A. Thompson, ed.). Allen & Unwin, London, 250-284.

Eckert J., Deplazes P., 2004. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev*; 17 (1): 107-35.

Eckert J., Deplazes P., Traig P.S., Gemmel M.A., Gottstein B., Heath D., Jenkins D.J., Kamiya M., Ligfhtowlers M., 2001. Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment. In Eckert J., Gemmel M.A., Meslin F., Pawloski X.Z. (eds.), *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in humans and animals: A Public Health Problem of global concern*. World Organization for animal health, Parigi: 72-99.

Eckert J., Gemmel M.A., Meslin F.-X., Pawlowski Z.S., 2001. *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern*.

Eckert J., Schneiter G., Wolff K., 1984. Fasinex (triclabendazole) a new fasciolicide. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*; 97(10): 349-56.

Ellsworth D.L., Rittenhouse K.D., Honeycutt N.L., 1993. Artfactual variation to randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques*; 14: 214-217.

Elmahdi I.E., Nkao M., Zeyhle E., Adam A.M., Warrage M.O., Hamid A.M., Romig T, Ito A., 2007. Molecular genotyping of *Echinococcus* species in Sudan. *Proceeding book of 22nd International Congress of Hydatidology & International Symposium on Zoonoses*, OP117, Atene, 15-19 May.

Embury S.H., Scharf S.J., Saiki R.K., Gholson M.A., Goulbus M., Arnheim N., Erlich H.A., 1987. Rapid prenatal diagnosis of sickle anemia by a new method of DNA analysis. *N Engl J Med*; 316: 656-660.

Euzeby J., 1968. Larval echinococcosis, a major zoonosis. Epidemiologic, etiologic and prophylactic study. *Maroc Med.*; 48(518): 643-60.

Faggioli P., Baldelli R., Battelli G., 2001. Cystic echinococcosis in Italy: prevalence in food-producing animals slaughtered in the Emilia-Romagna Region. VI National Conference of Parasitology of the Bulgarian Society for Parasitology: 121.

Felice C., Brunetti E., 1997. Use of PAIR in human cystic echinococcosis. *Acta Trop*; 64: 95-107.

Felleisen R.S.J., 1998. Comparative genetic analysis of Trichomonadid protozoa by the random amplified polymorphic DNA technique. *Parasitol Res*; 84: 153-156.

Fisher M.C., Lerman L.S., 1983. DNA fragment differing by single base pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory; *Proc Natl Acad Sci*; 80: 579-1583.

Floris M., Dessi A., Muntoni S., Boero N., 1964. La idatidosi in Sardegna. *Epidemiologia e danno economico. Rass Med Sarda*; 66: 185-206.

Fodde R., Losekoot M., 1994. Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Human Mutation*; 3: 83-94.

Gabriele F., Bortoletti G., Conchedda M., Palmas C., Ecça A.R., 2004. Idatidosi cistica umana in Italia: un problema di salute pubblica? Passato e presente. *Parassitologia*; 46: 39-43.

Gabriele F., Ecça A.R., Palmas C., Palazzo F., Attanasio E., 1989. Stima della prevalenza dell'idatidosi umana in Sardegna attraverso lo studio dei reperti autoptici. *Ig Mod*; 91: 569-575.

Gallo C., De Girolamo G., 1960. Elmintiasi dei cani in Sicilia. *Atti Soc Ital Sci Vet*; 14: 339-342.

Gamboa D., Torres K., Doncker S.D., Zimic M., Arevalo J., Dujardin J.C., 2007. Evaluation of an in vitro and in vivo model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology*; 1-8.

Garcia A.L., Tellez T., Parrado R., Rojas E., Bermudez H., Dujardin J.C., 2007. Epidemiological monitoring of American tegumentary leishmaniasis: molecular characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 101 (12): 1208-13.

Gargiulo M., Paganico G., Urbani G., Cipolletti V., 1987. Indagine epidemiologica sull'echinococcosi/idotidosi in Abruzzo. *Summa*; 4(3): 191-194.

Garlaschelli A.I., Brunetti E., Maiocchi L., Filice C., 2004. Ecografia e sierologia nella diagnosi e follow-up dell'echinococcosi cistica addominale. *Giornale Italiano di Ecografia*; 7 (4): 343-48.

Garippa G., 2006. Un update on Cystic Echinococcosis (CE) in Italy. *Parassitologia*; 48 : 57-59.

Garippa G., Battelli G., Cingoli G., Manfredi M.T., Di Cerbo A.R., Giangaspero A., Brianti E., Giannetto S., Poglayen G., Varcasia A., Scala A., 2007. Updating on epidemiology and molecular characterization of *echinococcus granulosus* strains in Italy. Proceeding book of 22nd International Congress of Hydatidology & International Symposium on Zoonoses, OP03, Atene, 15-19 May.

Garippa G., Varcasia A., Scala A., 2004. Cystic echinococcosis in Italy from the 1950s to present. *Parassitologia*; 46: 387-391.

Gasser, R.B., 1999. PCR-based technology in veterinary parasitology. *Vet Parasitol.*;84(3-4):229-58.

Gasser R.B., 2001. Identification of parasitic nematodes and study of genetic variability using PCR approaches. In: *Parasitic nematodes: molecular biology, biochemistry and immunology*. Ed. By Kennedy M.W. and Harnett W. CABI Publishing: 53-71.

Gasser R.B., 2006. Molecular technologies in parasitology, with an emphasis on genomic approaches for investigating parasitic nematodes. *Parassitologia*; 48 (1-2): 9-11.

Gasser R.B., Chilton N.B., Hoste H., Beveridge I., 1993. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nuc Ac Res*; 21 (10): 2525-2526.

Gasser R.B., Chilton N.B., Hoste H., Stevenson L.A., 1994. Species identification of Trichostrongyle nematodes by PCR-Linked RFLP. *Int J Parasitol*; 24 (2): 291-293.

Gasser R.B., Chilton N.B., 1995. Characterisation of taeniid cestode species by PCR-RFLP of ITS2 ribosomal DNA. *Acta Tropica*; 59: 31-40.

Gasser R.B., Hung G.C., Chilton N.B., Beveridge I., 2004. Advances in developing molecular diagnostic tools for strongyloid nematodes of equids: fundamental and applied implications. *Mol Cell Probes*; 18: 3-16.

Gasser R.B., Jenkins D.J., Heath D.D., Lawrence S.B., 1992. Use of *Echinococcus granulosus* worm antigens for immunodiagnosis of *E. granulosus* infection in dogs. *Vet Parasitol*;45(1-2): 89-100.

Gasser R.B., Jenkins D.J., Paolillo E., Parada L., Cabrera P., Craig P.S., 1993. Serum antibodies in canine echinococcosis. *Int J Parasitol*;23(5): 579-86.

Gasser R.B., Lightowlers M.W., Obendorf D.L., Jenkins D.J., Richard M.D., 1988. Evaluation of a serological test system for the diagnosis of natural *Echinococcus granulosus* infection in dogs using *E. granulosus* protoscolex and oncosphere antigens.

Gasser R.B., Lightowlers M.W., Richard M.D., 1990. Recombinant antigen with potential for serodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs. *Int J Parasitol*; 20(7):943-50.

Gasser R.B., Stewart L.E., Speare R., 1996. Genetic markers in ribosomal DNA for hookworm identification. *Acta Tropica*, 62: 15-21.

Gasser R.B., Zhu X.Q., 1999. Sequence-based analysis of enzymatically amplified DNA fragments by mutation detection techniques. *Parasitol Today*, 15: 462-465.

Gasser R.B., Zhu X.Q., Chilton N.B., 2002. The value of mutation scanning approaches for detecting genetic variation- implications for studying intestinal nematodes of humans (chapter 13). In: Holland C.V., Kennedy M.W., (Eds.), In: Black S., Seed J.R.(eds.), World Class Parasites: Volume 2. The Geohelminths: Ascaris, Trichuris and Hookworm. Kluwer Academic Press, Boston, pp. 219-233.

Gemmell M.A. 1997. The four phases of a control programme. Arch. int. Hidatid; 32, 56-60.

Gemmel M.A., Johnstone P.D., 1981. Cestodes. In Antiparasitic chemotherapy (H. Schoenfeld, ed.). Antibiotics Chemother; 30: 54-114.

Gemmel M.A., Lawson J.R., 1986. Epidemiology and control of hydatid disease. In: Thompson R.C.A. (ed.) The biology of *Echinococcus* and hydatid disease. George Allen & Unwin, London.

Gemmell M.A., Lawson J.R., Roberts M.G., Kerin B.R., Mason C.J. 1986a. Population dynamics in echinococcosis and cystercercosis: comparison of the response of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *T. ovis* to control. Parasitology; 93: 357-369.

Gemmell M.A., Lawson J.R., Roberts M.G. 1986b. Control of echinococcosis/hydatidosis. Bull. WHO; 64: 333-339.

Gemmell M.A., Lawson J.R., Roberts M.G. 1987. – Towards global control of cystic and alveolar hydatid diseases. Parasitol. Today; 3: 144-151.

Gemmel M.A., Roberts M.G., 1995. Modelling *Echinococcus* life cycles. In Echinococcus and hydatid diseases (R.C.A. Thompson & A.L. Lymbery, eds.) CAB International, Wallingford, Oxon: 333-354.

Gemmell M.A., Schantz P.M. 1997. – Formulating policies for control of *Echinococcus granulosus*: an overview of planning, implementation and evaluation. In Compendium of cystic echinococcosis in Africa and in the Middle Eastern Countries with special reference to Morocco (F.L. Andersen, H. Ouhelli & M. Kachani, eds). Brigham Young University Print Services, Provo, Utah, 328-345.

Gerbi S.A., 1986. The evolution of eukaryotic ribosomal DNA. Biosystems, 19: 247-258.

Gianguaspero A., Paoletti B., Gatti A., Iorio R., Traversa D., Capelli G., Manfredi M.T., Varcasia A., Garippa G., 2006. The epidemiological scenario of echinococcosis in the Abruzzo region. *Parassitologia*; 48 (1-2): 338.

Giannetto S., Virga A., Buriola E., 1997. Ricerche sui cestodi intestinali in cani da pastore della Sicilia occidentale. *Atti Soc Ital Sci Vet*; 51: 311-312.

Giannetto S., Poglayen G., Brianti E., Sorci C., Gaglio G., Canu S., Virga A., 2004. An epidemiological updating on cystic echinococcosis in cattle and sheep in Sicily, Italy. *Parassitologia*; 46 (4): 423-4.

Giromini M., Granati A., 1954. Studio su 5.048 casi di idatidosi verificatasi in Italia dal 1941 al 1952. *Folia Medica*; 37: 746-770.

Gonzalez L.M., Moreno Y., Gonzalez R., Hernandez J., Ferrus M.A., 2006. Development of a simple and rapid method based on polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism analysis to differentiate *Helicobacter*, *Campylobacter*, and *Arcobacter* species. *Curr Microbiol*; 53 (5): 416-21.

Gonzalez L.M., Daniel-Mwambete K., Montero E., Rosenzvit M.C., McManus D.P., Garate T., Cuesta-Bandera C., 2002. Further molecular discrimination of Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Exp Parasitol.*; 102: 46–56.

Guazzetti S., Micagni G., Ostanello F., Battelli G., 2006. Bovine echinococcosis in the province of Reggio Emilia (Italy): an example of integrated analysis of passive surveillance data. *Parassitologia*. In Press.

Guberti V., Stancampiano L., Francisci F., 1983. Intestinal helminth parasites community in wolves (*Canis lupus*) in Italy. *Parassitologia*; 35: 59-65.

Guldberg P., Nedergaard T., Nielsen H.J., Olsen A.C., Ahrenkiel V., Zenthen J., 1997. Single-step-DDGE-based mutation scanning of the p53 gene: application to genetic diagnosis of colorectal cancer. *Hum. Mutat.*, 9: 348-355.

Harandi M.F., Hobbs R.P., Adams P.J., Mobedi I., Morgan – Ryan U.M., Thompson R.C., 2002. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. *Parasitol*; 125(4): 367-73.

Hayashi K., 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Meth. Appl.*, 1: 34-38.

Heath D.D., 1986. Immunobiology of *Echinococcus* infections. In the biology of *Echinococcus* and hydatid disease (R.C.A. Thompson, ed.); Allen & Unwin, London: 164-188.

Heath D.D., 1995. Immunobiology of *Echinococcus* infections. In the biology of *Echinococcus* and hydatid disease (R.C.A. Thompson & A.L. Lymbery, eds.); CAB International, Wallingford, Oxon: 183-232.

Heath D.D., Jensen O., Lightowers M.W., 2003. Progress in control of hydatidosis using vaccination--a review of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes. *Acta Trop*; 85 (2): 133-43.

Heath D.D., Lightowers M.W., 1997. The WHO informal working group on Echinococcosis Board of the Who- IWGE. *Parassitologia*; 39(4): 349-53.

Heath D.D., Lawrence S.B., 1991. Daily egg-producton of dogs infected with *Echinococcus granulosus*. *Archives de la Hidatidosis*; 30: 321-8.

Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res*; 6 (10): 986-94.

Hermann M.G., Durtschi J.D., Bromley L.K., Wittwer C.T., Voelkerding K.V., 2006. Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation Scanning and Genotyping : Cross-Platform Comparison of Instruments and Dyes. *Clin Chem*; 52 (3): 494-503.

Hermann M., Eckert J., Howald B., Strickler E. and Gottstein B., 1988. Clinisch Manifeste Echinokokkose Bei Einem Pferd. *Pferdeheilkunde*; 4: 263-267.

Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)*; 11 (9): 1026-30.

Hillis D.M., Dixon M.T., 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*; 66: 411-453.

Hope M., Bowles J., Prociv P., McManus D.P., 1992. A genetic comparison of human and wildlife isolates of *Echinococcus granulosus* in Queensland: public health implications. *Med J Aust*; 156(1): 27-30.

Horton R.J., 1997. Albendazole in treatment of human cystic echinococcosis: 12 years of experience. *Acta Trop*; 64(1-2):79-93.

Hoste H., Gasser R.B., Chilton N.B., Mallet S., Beveridge I., 1993. Lack of intraspecific variation in the second internal transcribed spacer (ITS 2) OF *Trichostrongylus columbriformis* Ribosomal DNA. *Int. J. Parasitol.*, 23 (8): 1069-1071.

Hu M., Chilton N.B., Gasser R.B., 2004. The mitochondrial genomics of parasitic nematodes of socio-economics importance: recent progress, and implication for population genetics and systematics. *Adv Parasitol*; 56: 133-212.

Huang W.Y., He B., Wang C.R., Zhu X.Q., 2004. Characterization of *Fasciola* species from Mainland China by ITS-2 ribosomal DNA sequence. *Vet Parasitol*; 120: 75-83.

Huttner M., Nakao M., Wassermann T., Siefert L., Macpherson C.N.L., Mackenstedt U., Dinkel A., Ito A., Romig T., 2007. A new echinococcus genotype from ugandan lions. *Proceeding book of 22nd International Congress of Hydatidology & International Symposium on Zoonoses*, OP68, Atene, 15-19 May.

Irshadullah M., Nizami W.A., Macpherson C.N., 1989. Observations on the suitability and importance of the domestic intermediate hosts of *Echinococcus granulosus* in Uttha Pradesh, India. *J Helminthol*; 63 (1): 39-45.

Islam A.W., 1982. The prevalence of hydatid disease in buffaloes in Bangladesh. *Ann Trop Med Parasitol*; 76 (6): 623-6.

Itagaki T., Tsumagari N., Tsutsumi K., Chinone S., 2003. Discrimination of three amphistome species by PCR-RFLP based on rDNA ITS2 markers. *J Vet Med Sci*; 65 (8): 931-933.

Ito A., 2002. Collaboration for the control of cysticercosis/echinococcosis in Vietnam. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.*; 33 Suppl 3: 83-5.

Jacobs D.E., Zhu X., Gasser R.B., Chilton N.B., 1997. PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. *Acta Trop*; 68 (2): 191-200.

Jauregui L.H., Higgins J., Zarlenga D., Dubey J.P., Lunney J.K., 2001. Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. *J Clin Microbiol*; 39(6): 2065-71.

Jenkins D.J., 1998. Does the presence of *Spirometra erinacei* reduce the efficacy of praziquantel against *Echinococcus granulosus* in dogs? *Int J Parasitol*; 28(12): 1943-4.

Jenkins D.J., Craig N.A., 1992. The role of foxes *Vulpes vulpes* in the epidemiology of *Echinococcus granulosus* in urban environments. *Med J Aust*; 157 (11-12): 754-6.

Jenkins P., Dixon J.B., Rakha N.K., Carter S.D., 1990. Regulation of macrophage-mediated larvicidal activity in *Echinococcus granulosus* and *Mesocestoides corti* (Cestoda) infection in mice. *Parasitology*; 100 (2):309-15.

Jenkins D.J., Morris B., 2003. *Echinococcus granulosus* in wildlife in and around the Kosciuszko National Park, south-eastern Australia. *Aust Vet J*; 81(1-2): 81-5.

Jenkins D.J., Romig T., Thompson R.C., 2005. Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.--a global update. *Int J Parasitol*; 35 (11-12): 1205-19.

Johnson A.M., Baverstock B.P., 1989. Rapid ribosomal RNA sequencing and the phylogenetic analysis of protists. *Parasitol. Today*; 5: 102-105.

Johnson K.S., Harrison G.B.L., Lightowlers M.W., O'HoY K.L., Cogle W., Dempster R.P., Lawrence S.B., Vinton J.B., Heath D.D., Richard M.D., 1989. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature*; 338: 585-587.

Jones A., Walters T.M., 1992. The cestodes of foxhounds and foxes in Powys, mid-Wales. *Kamenetzky. Ann Trop Med Parasitol*; 86 (2): 143-50.

Joshi D.D., 2007. Epidemiological aspect of cystic echinococcosis/hydatidosis in Nepal. Proceeding book of 22nd International Congress of Hydatidology & International Symposium on Zoonoses, OP37, Atene, 15-19 May.

Kamenetzky L., Gutierrez A.M., Canova S.G., Haag K.L., Guarnera E.A., Parra A., Garcia E.A., Rosinzvit M.C., 2002. Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infect Genet Evolu.*; 2 (2): 129-36.

Kedra A.H., Swiderski Z., Tkach V.V., Dubinsky P., Pawlowski Z., Stefaniak J., Pawlowski J., 1999. Genetic analysis of *Echinococcus granulosus* from human and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicentre study. *Acta Parasitol*; 44: 248-254.

Khan M.Q., Afzal M., Ali S., 1990. Prevalence and serology of hydatidosis in large ruminants of Pakistan. *Vet Parasitol*; 37: 163-8.

Khan A.H., El-Buni A.A., Ali M.Y., 2001. Fertility of the cysts of *Echinococcus granulosus* in domestic herbivores from Benghazi, Libya, and the reactivity of antigens produced from them. *Ann Trop Med Parasitol*; 95 (4): 337-42.

Lahmar S., Debbek H., Zhang L.H., McManus D.P., Souissi A., Chelly S., Torgerson P.R., 2004. Transmission dynamics of the *Echinococcus granulosus* sheep-dog strain (G1 genotype) in camels in Tunisia. *Vet Parasitol.*; 121(1-2): 151-6.

Lahmar S., Chéhida F.B., Pétavy A.F., Hammou A., Lahmar J., Ghannay A., Gharbi H.A., Sarciron M.E., 2007. Ultrasonographic screening for cystic echinococcosis in sheep in Tunisia. *Vet Parasitol*; 143 (1): 42-9.

Lavikainen A., Lehtinen M.J., Meri T., Hirvela-Koski V., Meri S., 2003. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strains, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*; 127 (3): 207-15.

Laws G.F., 1968. Physical factors influencing survival of *Taeniid* eggs. *Exp. Parasitol.*; 22: 227-239.

Lay M.J., Wittwer C.T., 1997. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem*; 43 (12): 2262-7.

Le T.H., Blair D., McManus D.P., 2001a. Complete DNA sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the liverfluke, *Fasciola hepatica* L. (Platyhelminthes; Trematoda). *Parasitology*; 123(6):609-21.

Le T.H., Humair P.F., Blair D., Agatsuma T., Littlewood D.T., McManus D.P., 2001b. Mitochondrial gene content, arrangement and composition compared in African and Asian schistosomes. *Mol Biochem Parasitol* 28; 117(1):61-71.

Le T.H., Blair D., McManus D.P., 2000a. Mitochondrial genomes of human helminths and their use as markers in population genetics and phylogeny. *Acta Trop.*; 77(3):243-56.

Le T.H., Blair D., McManus D.P., 2000b. Mitochondrial DNA sequences of human schistosomes: the current status. *Int J Parasitol*; 30(3):283-90. Review.

Le T.H., Blair D., McManus D.P., 2002 a. Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. *Trends Parasitol*; 18(5):206-13.

Le T.H., Pearson M.S., Blair D., Dai N., Zhang L.H., McManus D.P., 2002 b. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*; 124(1): 97-112.

Lightowlers M.W., 1994. Vaccination against animal parasites. *Vet. Parasitol.*; 54: 177-204.

Lightowlers M.W., Gill H.S., Le Jambre L.F., 1996. Vaccination against cestode parasites. *Int. J. Parasitol.*; 26: 819-824. MacPherson C.L.N., Wachira T.M., 1997. Cystic echinococcosis in sub-saharan Africa: In: *Compendium on Cystic Echinococcosis in Africa and in Middle Eastern Countries with special reference to Morocco*, Andersen F.L., Ouhelli H., and Kachani M. (eds). Brigham Young University, Provo, USA: 245-277.

Lightowers M.W., Gottstein B., 1995. Echinococcosis/hydatidosis. Antigens, immunological and molecular diagnosis. *In* Echinococcosis and hydatid disease (R.C.A. Thompson & A.L. Lymbery, eds). CAB International, Wallingford, Oxon, 355-410.

Lightowers M.W., Jensen O., Fernandez E., Iriate J.A., Woolard D.J., Gauci C.G., Jenkins D.J. & Heath D.D., 1999. Vaccinations trials in Australia and Argentina comform the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. *Int J Parasitol*; 29: 531-534.

Liu Y.H. (1997). Continuous or intermittent treatment with albendazole? *Arch. int. Hidatid*, **32**, 171-173.

Lymbery, A.J., 1998. Combining data from morphological traits and genetic markers to determine transmission cycles in the tapeworm, *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*; 117: 185-192.

Long E.O., Dawid I.B., 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Ann Rev Biochm*; 49: 727-764.

Lorenzini R., Ruggeri A., 1987. Distribution of echinococcosis/hydatidosis in Italy. *J Helminthol.*; 61: 261-267.

Magliarditti D., Niutta P. P., 1995. L'idatidosi negli animali da macello nel territorio dell'USL 42 (ME) nel triennio 1991-93. *Atti Ass Sicil Sanità Vet*; 2: 165-167.

Luton K., Walker D., Blair D., 1992. Comparasion of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Mol. Biochem. Parasitol*; 56: 323-328.

Macpherson J.M., Eckstein P.E., Scoles G.J., Gajadar A.A.A, 1993. Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. *Mol Cell Prob*; 7: 293-299.

Macpherson C.N.L., Wachira T.W.M., 1997. Cystic echinococcosis in Africa south of Sahara, p.245-277. *In* Andersen F.L., Ouhell H., Kachani M. (ed.), *Compendium on cystic echinococcosis in Africa and Middle Eastern Countries with special reference to Morocco*. Brigham Young University Print Services, Provo, Utha.

Magambo J., Njoroge E., Zeyhle E., 2006. Epidemiology and control of echinococcosis in sub-Saharan Africa. *Parasitol Int*; 55 Suppl: S193-5.

Magliarditti D., Niutta P.P., 1995. L'iatidiosi negli animali da macello nel territorio dell'USL 42 (ME) nel triennio 1991-1993. *Atti Ass Sicil Sanità Vet*; 2: 165-167.

Malgor R., Nonaka N., Sakai H., Oku Y., Carmona C., Kamiya M., 1997. Coproantigen detection in dogs experimentally and naturally infected with *Echinococcus granulosus* by a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay.

Manilla G., 1986. La disinfezione dei pascoli come lotta contro l'iatidiosi. *Rivista parassitologica*; 3: 299-302.

Manfredi M.T., Di Cerbo A.R., Veneziani I., 2007. Echinococcosis risk in livestock from a non-endemic area in Italy. Proceeding book of 22nd International Congress of Hydatidology & International Symposium on Zoonoses, PO18, Atene, 15-19 May.

Manger B.R., Brewer M.D., 1989. Epsiprantel, a new tapeworm remedy. Preliminary efficacy in dogs and cats. *Br Vet J*; 145: 384-88.

Mantovani A., Lasagna E., 2004. Notes on cystic echinococcosis in the Mediterranean. *Parassitologia*; 46 (4): 359-62.

Maravilla P., Thompson R.C.A., Palacios-Ruiz J.A., Estcourt A., Ramirez-Solis E., Mondragon-de-la-Pena C., Moreno-Moller M., Cardenas-Mejia A., Mata-Miranda P., Aguirre-Alcantara M.T., Bonilla-Rodriguez C., Flisser A., 2004. *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico. *Acta Trop*; 92(3): 231-6.

Marcato P.S., 2002. Anatomia e istologia patologica speciale dei mammiferi domestici. Edagricole

Masala S. Parodi P., 2004. Health education and formation: essential tools into the echinococcosis/hydatidosis prevention programs. *Parassitologia*; 46(4): 393-6.

Mathis A., Deplazes P., Eckert J., 1996. An improved test system for PCR-based specific detection of *Echinococcus multilocularis* eggs. *J Helminthol*. 1996; 70(3):219-22.

Maurelli M.P., Rinaldi L., Capuano F., Perugini A.G., Veneziano V., Cringoli G., 2007. Characterization of the 28S and the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Dicrocoelium dendriticum* and *Dicrocoelium hospes*. *Parasitol Res.*; 101(5):1251-5.

McManus D.P., 2002. The molecular Epidemiology of *Echinococcus granulosus* and cystic hydatid disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyd.*; 96: 151-157.

McManus D.P., 2003. *Echinococcus*. *Lancet* 2003; Vol 362: 1265-304.

McManus D.P., 2006. Molecular discrimination of taeniid cestodes. *Paras Int.*; 55: S31-37.

McManus D.P., Bowles J., 1996. Molecular genetic approaches in parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. *Int J Parasitol*; 26 : 687-704.

McManus D.P., Bryant C.A., 1995. Biochemistry physiology and molecular biology of *Echinococcus*. In: *The biology of Echinococcus and hydatid disease* (Thompson R.C.A. and Lymbery A.J. eds): 135-181, CAB International.

McManus D.P., Ding Z., Bowles J., 1994. A molecular genetic survey indicates the presence of a single, homogeneous strain of *Echinococcus granulosus* in north-western China. *Acta Trop*; 56(1): 7-14.

McManus D.P., Knight M., Simpson A.J.G., 1985. Isolation and characterization of nucleic acids from the hydatid organism, *Echinococcus* spp. (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol*; 16: 251-266.

McManus D.P., Le T.H., Blair D., 2004. Genomics of parasitic flatworms. *Int J Parasitol*; 34(2): 153-8.

McManus D.P., Rishi A.K., 1989. Genetic heterogeneity within *Echinococcus granulosus*: isolates from different hosts and geographical areas characterized with DNA probes. *Parasitology*; 99 (1): 17-29.

McManus D.P., Thompson R.C.A., 2003. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology*; 127 Suppl: S37-51.

Menezes da Silva A., 2003. Hydatid cyst of the liver-criteria for the selection of appropriate treatment. *Acta Trop*; 85 (2): 237-42.

Menghebat L., Jiang L., Chai J., 1993. A retrospective survey for surgical cases of cystic echinococcosis in the Xinjiang Uygur autonomous region, PCR, 1951-90. In Compendium on cystic echinococcosis with special reference to the Xinjiang Uygur autonomous region, the peoples Republic of Cina (F.L. Andersen, J. Chai & F. Liu, eds). Brigham Young University, Print Services, Provo, Utah,: 135-145.

Mehrabani D., Oryan A., Sadjjadi S.M., 1999. Prevalence of *Echinococcus granulosus* infection in stray dogs and herbivores in Shiraz, Iran. *Vet Parasitol*; 86: 217-20.

Michot B., Despres L., Bonhomme F., Bachellerie J.P., 1993. Conserved secondary structures in the ITS2 of trematode pre-rRNA. *Fed. Europ. Bioch. Sciences Lett.*, 316: 242-252.

Montgomery J., Witter C.T., Palais R., Zhou L., 2007. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nature Protocols*; 2(1): 59-66.

Morris D.L., Taylor D.H., 1988. Optimal timing of post-operative albendazole prophylaxis in *Echinococcus granulosus*. *Ann Trop Med Parasitol*; 82: 65-66.

Morseth, D.J., 1965. Ultrastructure of developing taeniid embryos and associated structures. *Experimental Parasitology*; 16: 207-216.

Mullis K.B., Faloona F., Scharf F., Saiki R., Horn G., Erlich H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, 51, *Cold Spring Harbor Symp. Quantit Biol*: 263-273.

Mullis K.B., Faloona F.A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. In: *Methods Enzymol.* (WuR, ed.), Acad. Press. N.Y., 155: 335-350. Nonaka M., Iida M., Yagi K., Ito T., Ooi H.K., Oku Y., 1996. Time course of coproantigen excretion in *Echinococcus multilocularis* infections in foxes and an alternative definitive host, golden hamsters. *Int J Parasitol*; 26(11): 1271-8.

Nadler S.A., 1990. Molecular approaches to studying helminth population genetics and phylogeny. *Int J Parasitol*; 20: 11-29.

Nagamani K., Pavuluri P.R., Gyaneshwari M., Prasanthi K., Rao M.I., Saxena N.K., 2007. Indian J Med Microbiol; 25 (2) : 133-6.

Nakao M., McManus D.P., Schantz P.M., Craig P.S., Ito A., 2007. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. Parasitology; 134(5): 713-22.

Nakao M., Sako Y., Ito A., 2003. The mitochondrial genome of the tapeworm *Taenia solium*: a finding of the abbreviated stop codon U. J Parasitol.; 89(3): 633-5.

Nakao M., Yokoyama N., Sako Y., Fukunaga M., Ito A., 2002. The complete mitochondrial DNA sequence of the cestode *Echinococcus multilocularis* (Cyclophyllidea: Taeniidae). Mitochondrion; 1(6): 497-509.

Newton L.A., Chilton N.B., Beveridge I., Gasser R.B., 1998. Systematic relationships of some members of the genera *Oesophagostomum* and *Chabertia* (Nematoda: Chabertiidae) based on ribosomal DNA sequence data. Int J Parasitol; 28: 1781-1789.

Nicolas L., Milon G., Prina E., 2002. Rapid differentiation of old world *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. J Microbiol Methods; 51: 295-99.

Nonaka N., Iida M., Yagi K., Sakai H., Inohara J., Ooi H.K., Oku Y. & Kamiya M., 1996. A diagnostic method for the definitive host of *Echinococcus multilocularis* by coproantigen detection. In Alveolar echinococcosis. Strategy for eradication of alveolar echinococcosis of the liver (J. Uchino & N. Sato, eds). Fuji Shoin, Sapporo, 147-149.

Oakley G.A., 1991. Anthelmintics for cats and dogs. Anpar books, Berkhamsted, Herts, England: 447.

Oksanen A., Lavikainen A., 2004. Echinococcosis in Fennoscandia. Int Arch Hydatidosis; 35: 62.

Omer R.A., Dinkel A., Romig T., Mackenstedt U., Elamin M., Elnahas A., 2004. Strain Characterization of Human Hydatidosis in Sudan. Int Arch Hydatid; 35: 41.

Orita M., Suzuki Y., Sekiya T., Hayashi K., 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*; 5: 874-879.

Orlando D.F., 1997. Evolution of the programme for the control of hydatidosis in Uruguay. *Arch. Int. Hydatid*; 32: 69-72.

Ostanello F., Piccolomini L., Martinello F., Vizioli M., Battelli G., 1996. Echinococcosis/hydatidosis in the Emilia-Romagna region (Italy): investigation on hospitalisations during 1989 to 1993. *Parassitologia*; 38: 347.

Ostanello F., Piccolomini L., Martinello F., Vizioli M., Battelli G., 1997. Echinococcosi/idiatidosi in Emilia Romagna: indagine sui ricoveri ospedalieri nel periodo 1989-1993. *Epid Prev* 21: 41-47.

Otranto D., Traversa D., 2004. Molecular characterization of the first internal transcribed spacer of ribosomal DNA of the most common species of eyeworms (Thelazioidea: Thelazia). *J Parasitol*; 90 (1): 185-8.

Panbianco F., Sciutteri G., 1955. Indagini sulla diffusione delle elmintiasi nella popolazione canina della provincia di Messina. *Vet Ital*; 6: 1203-1208.

Parvizi P., Benlarbi M., Ready P.D., 2003. Mitochondrial and Wolbachia markers for the sandfly *Phlebotomus papatasi*: little population differentiation between peridomestic sites and gerbil burrows in Isfahan province, Iran. *Med Vet Entomol*; 17 (4): 351-62.

Paskewitz S.M., Collins F.H., 1990. Use of the Polymerase Chain Reaction to identify mosquito species of the *Anopheles gambiae* complex. *Med Vet Entomol*; 4: 357-373.

Paskewitz S.M., Collins F.H. PCR amplification of insect ribosomal DNA. In : *Molecular biology of insect disease vectors: A methods manual*. Chapman & Hall, 1997.

Pauluzzi S., Tassi C., Di Nardo V., Di Candilo F., Papili R., Sparsoli M., Albertoni F., Basile D., Cacopardo B., D'agostino M.T., D'Angelo T., Del Pezzo M., Di Bari C., Di Maria M., Dottorini S., Gabriele F., Giordano S., Guglielmetti P., Mantovani A., Lazzarone R., Orlando R., Palmas C., Palombo M., Pasquini G., Petrini R., Cantucci A., Scarlata F., Stornello C., Sturniolo G., Zampieri A., 1989. Indagine epidemiologica nazionale sull'idatidosi. *Parassitologia*; 31: 59-67.

Patra K.P., Ramu T., Hoti S.L., Pragasam G.S., Das P.K., 2007. Identification of a molecular marker for genotyping human lymphatic filarial nematode parasite *Wuchereria bancrofti*. *Exp Parasitol*; 116 (1): 59-65.

Pawlowski I., Eckert J., Vuitton D., 2001. Echinococcosis in humans: clinical aspects diagnosis and treatment. In: Eckert J., Gemmel M., Meslin F-X, Pawlowski Z., eds. *WHOI/OIE Manual on echinococcosis in humans and animals: A public health problem of global concern*. Paris: World Organization for Animal Health: 20-71.

Pawlowski Z., Mrozewicz B., Stefaniak J., Schantz P., Wilson M., Jacquier P., 1993. *Echinococcus granulosus* pig strain from Poland has a low infectivity to humans. *Am J Trop Med Hyg Suppl*; 49: 342-343.

Pellegrini D., Cilli V., 1955. L'Idatidosi in Italia. *Annali della Sanità Pubblica*; 16: 81-103.

Pena H.B., De Souza C.P., Simpson A.J., Pena S.D., 1995. Intracellular promiscuità in *Schistosoma mansoni*, nuclear transcribed DNA sequences are part of a mitochondrial minisatellite region. *Proc Natl Acad Sci US*; 92: 915-19.

Piatek A.S., Tyagi S., Pol A.C., Telenti A., Miller L.P., Kramer F.R., Alland D., 1998. Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Biotechnol.*;16(4):359-63.

Poglayen G., Giannetto S., Scala A., Gaglio G., 2001. Parasitic fauna of the Sicilian Black Pig. *WAAVP*; 18: 53 E11.

Poglayen G., Brianti E., Russo A., Gaglio G., Sorgi C., Giannetto S., 2003. Old dreams, new vision: Cystic echinococcosis in Sicily. *WAAVP*; 19: 164.

Poglayen G., Baldelli R., Battelli G., 2007. Zoonoses and information of the public: considerations on the role of media, with special reference to Italy. Proceeding book of 22nd International Congress of Hydatidology & International Symposium on Zoonoses, PO19, Atene, 15-19 May.

Poretti D., Felleisen E., Grimm F., Pfister M., Teuscher F., Zuercher C., Reichen J., Gottstein B., 1999. Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(2):193-8.

Puccini V., Lazari P., Sgherza F., 1975. Nuovi controlli sulla frequenza dell'infestazione del cane da *Echinococcus granulosus* (Batsch. 1786). *Acta Medica Veterinaria*; 21: 73-81.

Puccini V., Tassi P., 1983. Considerazioni sulla diffusione dell'idatidiosi negli ovini e nei caprini macellati in Puglia dal 1975 al 1982. *Atti SIPAOC*; 5: 315-329.

Punzo C., Mastrogiacomo M., Germinarlo C., De Leo G., Bonomo G.M., 2002. L'echinococcosi epatica in Puglia: analisi delle schede di dimissione ospedaliera (S.D.O.) negli anni 1996-2000. *Ann Ital Chir* 73: 605-610.

Quaranta V., 2003. Echinococcosi: presenza e diffusione della parassitosi in Basilicata. Convegno: Echinococcosi: una parassitosi da conoscere. Centro Sociale Camastra Alto Sauro, Anzi (PZ).

Rausch R.L., 1975. *Taeniidae*. In: McCulloch W.F. and Schurrenberger P.F. (eds), *Diseases Transmitted from Animals to Man*. Thomas, Springfield, Illinois: 678-707.

Rausch R.L., 1995. Life cycle patterns and geographic distribution of *Echinococcus* species. In *Echinococcus* and Hydatid disease (R.C.A. Thompson & A.L. Lymbery, eds). CAB International, Wallingford, Oxon: 88-134.

Rausch R.L., 2003. Cystic echinococcosis in the Arctic and Sub-Arctic. *Parasitology*; 127 Suppl: S73-85.

Rausch R.L., Wilson J.F., McMahon B.J., O’Gorman M.A., 1986. Consequences of continuous mebendazole therapy in alveolar hydatid disease with a summary of a ten-year clinical trial. *Ann Trop Med Parasitol.*; 80(4): 403-19.

Reddy G.R., 1995. Determining the sequence of parasite DNA. *Parasitol. Today*, 11: 37-42.

Reichel M.P., Baber D.J., Craig P.S., Gasser R.B., 1996. Cystic echinococcosis in the Falkland islands. *Preventive Veterinary Medicine*; 27: 115-123.

Richards D.T., Harris S., Lewis J.W., 1995. Epidemiological studies on intestinal helminth parasites of rural and urban red foxes (*Vulpes vulpes*) in the United Kingdom. *Vet Parasitol*; 59 (1): 39-51.

Richards K.S., Riley E.M., Taylor I.H., Morris D.L., 1988. Studies on the effect of short term, high dose praziquantel treatment against protozoa of ovine and equine *Echinococcus granulosus* within the cyst, and in vitro. *Trop Med Parasitol*; 39(4): 269-72.

Rinaldi L., Perugini A.G., Capuano F., Fenizia D., Musella V., Veneziano V., Cringoli G., 2004. Characterization of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Calicophoron daubneyi* from various hosts and locations in southern Italy. *Vet Parasitol*; 131 (3-4): 247-53.

Rinder H., Rausch R.L., Takchashi K., Kopp H., Thomschke A., Loscher T., 1997. Limited range of genetic variation in *Echinococcus multilocularis*. *J Parasitol.* 1997; 83(6): 1045-50.

Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T., 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*; 245 (2): 154-60.

Roberson E.L., Booth N.H., McDonald L.E., 1988. Anticestodal and antitrepatodal drugs. *Vet Pharmacol. Therapeut*; 6: 928-949

Romboli B., Schiavo A., Poglayen G., Papalia S., De Giovanni F., Martini M., 1980. Rilevazioni statistiche inerenti l’incidenza della Echinococcosi-Idatidiosi in Italia. *Atti Tavola Rotonda Echinococcosi Idatidiosi*: 13-17, X Congr Naz. SOIPA.

Romig T., 2003. Epidemiology of echinococcosis. *Langenbecks Arch Surg.* 2003 Sep;388(4):209-17.

Roneus O., Christensson D., Nilsson N.G., 1982. The longevity of hydatid cysts in horses. *Vet Parasitol.*; 11(2-3):149-54.

Rosenthal B.M., 2001. Defining and interpreting intraspecific molecular variation. *Vet Parasitol.*; 101 (3-4): 187-200.

Rosenzvit M.C., Zhang L.H., Kamenetzky L., Canova S.G., Guarnera E.A., McManus D.P., 1999. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology*; 118 (5): 523-30.

Saiki R.K., Bugawan T.L., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A., 1986. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-Dqalpha DNA with allele specific oligonucleotide probes. *Nature*; 324: 163-166.

Saiki R.K., Scharf S.J., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H., Arnheim N., 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle anemia. *Science*, 230: 1350-1354.

Sakai H., Malgor R., Basmadjian I., Gallardo R., Carmona C., Sato H., Oku Y., Kamiya M., 1995. An enzyme-linked immunosorbent assay (elisa) for the detection of *Echinococcus granulosus* coproantigen in dogs. *JPN J Parasitol*; 44: 453-461.

Sakamoto T., 1981. Electron microscopical observations on the eggs of *Echinococcus multilocularis*. *Memoirs of the faculty of Agriculture of Kagoshima University*; 17: 165-174.

Sakashita M., Sakai H., Kohno H., Ooi H.K., Oku I., Yagi K., Ito M., Kanya M., 1995. Detection of *Echinococcus multilocularis* coproantigens in experimentally infected dogs using murine monoclonal antibody against adult worms. *Jpn J Parasit*; 44: 413-420.

Samson-Himmelstjerna G.V., Woidtke S., Epe C., Schnieder T., 1997. Species-specific polymerase chain reaction for the differentiation of larvae from *Dictyocaulus viviparus* and *D. eckerti*. *Vet Parasitol*; 68: 119-126.

Scala A., Canu S., Tanda B., Basciu M., Polinas L., Sanna Coccone G.N., Pilloni S., Canu S., Varcasia A., Garippa G., 2004. An epidemiological and biomolecular survey of cystic echinococcosis in cattle in Sardinia. *Parassitologia*; 46 (4): 443-4.

Scala A., Espa A., Miculan A., Barbieri A., 2000b. A parasitological survey on sheep slaughtered in the province of Cagliari (Italy). *Atti Fe Me S P Rum*; 8: 239-243.

Scala A., Pintori A., Uras P., Delogu M.L., 2000a. Hepatic hydatidosis of sheep in the province of Sassari: data from a recent survey. *Parassitologia*; 42: 223.

Scala A., Uras P., Pintone A., Poglayen G., Giannetto S., Brianti E., Garippa G., 2001. Epidemiological updating on hydatidosis in sheep in insular Italy. *Arch. Intern. Hydatidosis*; 34: 303.

Scala A., Varcasia A., Pipia A.P., Pilo C., Garippa G., 2006. First molecular isolation of *Echinococcus granulosus* horse strain (G4) in Sardinia (Italy). *Parassitologia*; 48: 344.

Schantz P.M., 1997. Sources and uses of surveillance data for cystic echinococcosis. In: *Compendium on Cystic Echinococcosis in Africa and in Middle Eastern Countries with Special Reference to Morocco* (F.L. Andersen, H. Ouhelli and M. Kachani, eds), pp. 72-84. Provo: Brigham Young University Print Services.

Schantz P.M., Chai J., Craig P.S., Eckert J., Jenkins D.J., MacPherson C.N., Thakur A., 1995. Epidemiology and control of hydatid disease. In: Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (Eds.), *Echinococcus* and hydatid disease. CAB International, Wallingford, Oxon: 233—331.

Schiavo A., De Giovanni F., Ferlicca A., Martini M., Stagni M., Mantovani A., 1979. Indagine conoscitiva sullo stato igienico-sanitario degli allevamenti ovini e caprini in Italia. *Riv Zootec Vet*; 5: 351-374.

Schiavo A., Pansini G., 1996. Responsabilità sanitarie ed echinococcosi. *Ob e Doc Vet*; 6: 81-84.

Schlotterer C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*; 109(6): 365-71.

Schnieder T., Heise M., Epe C., 1999. Genus-specific PCR for the differentiation of eggs or larvae from gastrointestinal nematodes of ruminants. *Parasitol Res*; 85: 895-898.

Schiavo A., De Giovanni F., Ferlicca A., Martini M., Stagni M., Mantovani A., 1979. Indagine conoscitiva sullo stato igienico-sanitario degli allevamenti ovini e caprini in Italia. *Riv Zootec Vet*; 5: 351-374.

Scott J.C., McManus D.P., 1994. The random amplification of polymorphic DNA can discriminate species and strains of *Echinococcus*. *Trop Med Parasitol*; 45: 1-4.

Scott J.C., Stefaniak J., Pawlowski Z.S., McManus D.P., 1997. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*; 114 (1): 37-43.

Seimenis A., 2003. Overview of the epidemiological situation on echinococcosis in the Mediterranean region. *Acta Trop*; 85(2): 191-5.

Shantz P.M., 1982. Echinococcosis. In: J. Steele (ed.), *CRC Handbook series in Zoonoses*, CRC Press, Boca Raton, Florida.

Singh B., 1997. Molecular Methods for Diagnosis and Epidemiological Studies of Parasitic Infections. *Int J Parasitol*; 27 (10): 1135-1145.

Singh B.P., Deorani V.P., Srivastava V.K., 1988. Prevalence of hydatid in buffaloes in India and report of a severe liver infection. *J Helminthol*; 74: 177-81.

Siracusano A., Bruschi F., 2006. Cystic echinococcosis: progress and limits in epidemiology and immunodiagnosis. *Parassitologia*; 48(1-2): 65-6.

Smyth J.D., 1964. The biology of the hydatid organism. *Advances in Parasitology*; 2: 169-219.

Smyth J.D., Davies Z., 1974. Occurrence of physiological strains of *Echinococcus granulosus* demonstrated by in vitro culture of protoscoleces from sheep and horse hydatid cysts. *Int J Parasitol.*; 4(4): 443-5.

Šnábel V., Altintas N., D'Amelio S., Güneş K., Yolasigmaz A., Bartková D., Cielecka D., Salamatın R., Huettner M., Dubinský P., 2007. Genetic variants and heterogeneity of *Echinococcus granulosus* in some European and Asian regions. Proceeding book of 22nd International Congress of Hydatidology & International Symposium on Zoonoses, PO08, Atene, 15-19 May.

Šnábel V., D'Amelio S., Mathiopoulos K., Turcekova L., Dubinsky P., 2000. Molecular evidence for the presence of a G7 genotype of *Echinococcus granulosus* in Slovakia. J Helminthol.; 74(2): 177-81.

Soro C., Sardo D., Scala A., 2002. Epidemiologia delle principali endoparassitosi degli ovini nel Goceano (Sardegna). Atti SIPAOC; 15: 98.

Stefanic S., Shaikenov BS., Deplazes P., Dinkel A., Torgeson PR., Mathis A., 2004. Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* ("sheep strain") in naturally infected dogs. Parasitol Res. 2004; 92(4): 347-51.

Stohler R.A., Curtis J., Minchella D.J., 2004. A comparison of microsatellite polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*. Int J Parasitol ; 34: 595-601.

Sugiyama H., Morishima Y., Rangsiruji A., Binchai S., Ketudat P., Kawanaka M., 2006. Application of multiplex pcr for species discrimination using individual metacercariae of *Paragonimus* occurring in Thailand. Southeast Asian Trop Med Public Health; 37 Suppl 3: 48-52.

Swiderski Z., 1982. *Echinococcus granulosus*: embryonic envelope formation. Proceedings of the 10th International Congress of Electron Microscopy; 3: 513.

Tashani O.A., Zhang L.H., Boufana B., Jegi A., McManus D.P., 2002. Epidemiology and strain characteristics of *Echinococcus granulosus* in the Benghazi area of eastern Libya: protoscolex samples from Libya (12 from cattle, three from humans, five from camels and 10 from sheep) was sequenced, the sequences were all found to be identical to that published for the common sheep strain of *E. granulosus*. Annals of tropical medicine and parasitology; 96 (4): 369-381 (1 p.3/4).

Telford M.J., Herniou E.A., Russell R.B., Littlewood D.T., 2000. Changes in mitochondrial genetic codes as phylogenetic characters: two examples from the flatworms. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 97(21): 11359-64.

Thaenkham U., Visetsuk K., Dung do T., Waikagul J., 2007. Discrimination of *Opisthorchis viverrini* from *Haplorchis taichui* using COI sequence marker. *Acta Trop*; 103 (1): 26-32.

Thakur A.S., 2002. Epidemiology of hydatid disease in South America. In: *Perspectives and Possibilities of Control and Eradication of Hydatidosis*. PAHO/HCP/028/02. Pan American Health Organisation. Washington DC; 160-70.

Thakur A.S., Prezioso U., Marchevsky N. 1979. – *Echinococcus granulosus*: ovicidal activity of praziquantel and bunamidine hydrochloride. *Experim Parasitol*; 47, 131-133.

Thienpont D., Vanparijs O., Hermans L., 1974. Anthelmintic activity of mebendazole against *Cysticercus fasciolaris*. *J Parasitol*; 60(6):1052-3.

Thomas H., Gönnert R. 1978. – The efficacy of praziquantel against cestodes in cats, dogs and sheep. *Res vet Sci* ; 24 : 20-25.

Thompson R.C.A., 1977. Hydatidosis in Great Britain. *Helminthological Abstracts Series A*; 46: 837-61.

Thompson R.C.A., 1983. The susceptibility of the European red fox (*Vulpes vulpes*) to infection with *Echinococcus granulosus* of Australian sheep origin. *Ann Trop Med Parasitol*; 77 (1): 75-82.

Thompson R.C.A., Donald P., Mc Manus, 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends in Parasitology*; 18(10): 452-457.

Thompson R.C.A., Eckert J., 1982. The production of eggs by *Echinococcus multilocularis* in the laboratory following in vivo and in vitro development. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*; 68: 227-34.

Thompson R.C.A., McManus D.P., 2001. Aetiology: parasites and life cycles. In *manual on Echinococcosis in human and animals a Public health problem of Global Concern* (Eckert, J. et al), pp 1-19, World Organisation for Animal health (OIE).

Thompson, R.C.A., Lymberly A.J., 1995. The geographic distribution of hydatid infection in cattle in Western Australia. *Aust Vet J.*; 72(11): 430-432.

Thompson R.C.A., Reynoldson J.A., Manger B.R. 1991. – *In vitro* and *in vivo* efficacy of epsiprantel against *Echinococcus granulosus*. *Res vet Sci*; 51: 332-334.

Thompson R.C.A., Smyth J.D., 1975. Equine hydatidosis: a review of the current status in Great Britain and the results of an epidemiological survey. *Veterinary Parasitology*; 1: 107-27.

Tieri E., Gatti A., 1995. Echinococcosi/Idatidosi nella provincia di Teramo: indagine epidemiologica e considerazioni. *Boll Epid Vet Suppl Vet It*; 14: 1-6.

Todorov T., Georgiev P., Handjiev S., Vutova K., 1997. Potentials of benzimidazole compounds in treatment of human echinococcosis. *Arch. int. Hidatid.*; 32: 164-167.

Todorov T., Vutova K., Mechkov G., Georgiev P., Petrov D., Tonchev Z., Nedelkov G., 1992. Chemiotherapy in human cystic echinococcosis: comparative efficacy of mebendazole and albendazole. *Ann Trop Med Parasitol*; 86: 59-66.

Torgerson P.R., Carmona C., Bonifacino R., 2000. Estimating the economic effects of cystic echinococcosis: Uruguay, a developing country with upper-middle income. *Ann Trop Med Parasitol*; 94 (7): 703-13.

Torgerson P.R., Dowling P.M., Abo-Shehada M.N., 2001. Estimating the economic effects of cystic echinococcosis. Part 3: Jordan, a developing country with lower-middle income. *Ann Trop Med Parasitol*; 95 (6): 595-603.

Torgerson P.R., Shaikenov B.S, Rysmukhambetova A.T., Ussenbayev A.E., Abdybekova A.M., Burtisurnov K.K., 2001. Modelling the transmission dynamics of *Echinococcus granulosus* in dogs in rural Kazakhstan. *Parasitology*; 126 (5): 417-24.

Tyagi S, Kramer FR., 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*; 14(3): 303-8.

Umehara A., Kawakami Y., Matsui T., Araki J., Uchida A., 2006. Molecular identification of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitol Int*; 55 (4) : 267-71.

Utrilla J.G., Eyre F.P., Moguerza R., Alami H., Bueno J., 1991. Hydatidosis an la infancia. *Arch. Hydatid*; 30: 721-730.

Varcasia A., Brianti E., Kogkos A., Pipia A.,P., Giannetto S., Poglayan G., Scala A., Garippa G., 2007. Comparative study on cystic echinococcosis in three endemic areas of Mediterranean (Sardinia, Sicily and Peloponnesus). Proceeding book of 22nd International Congress of Hydatidology & International Symposium on Zoonoses, OP89, Atene, 15-19 May.

Varcasia A., Scala A., Garippa G., 2004. The diagnosis of *Echinococcus granulosus* in dogs. *Parassitologia*.; 46(4): 409-12.

Vidigal T.H., Magalhaes K.G., Kissinger J.C., Caldeira R.L., Simpson A.J., Carvalho O.S., 2002. A Multiplex-PCR approach to identification of the Brazilian intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 97 (Suppl 1): 95-7.

Villalobos N., Gonzalez L.M., Morales J., de Aluja A.S., Jimenez M.I., Blanco M.A., Harrison L.J., Parkhouse R.M., Garate T., 2007. Molecular identification of *Echinococcus granulosus* genotypes (G1 and G7) isolated from pigs in Mexico. *Vet Parasitol*; 147 (1-2): 185-9.

Virga A., 1991. L'idatidosi negli animali macellati in Sicilia nel biennio 1988-89. *Ob. E Doc. Vet.*; 3: 43-47.

Virga A., Filippazzo M.G., Dardanoni G., 1994. Human hydatidosis in Sicily between 1989-91. *Parassitologia* 36 (Suppl.1): 149.

Virga A., Giannetto S., 1998. *Echinococcus granulosus* in cani da pastore della Sicilia occidentale. *Large Anim Rev*; 4: 71-72.

von Nickisch-Rosenegk M., Lucius R., Loos-Frank B., 1999. Contributions to the Phylogeny of the Cyclophyllidea (Cestoda) inferred from mitochondrial 12S rDNA. *J Mol Evol*; 48: 586-96.

Wachira T.M.H., Bowles J., Zeyhle E., McManus D. P., 1993. Molecular examination of the sympatry and distribution of sheep and camel strains of *Echinococcus granulosus* in Kenya. *Am J Trop Med Hyg*; 48:473-479.

Welsh J., McClelland C.K., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res*, 18: 7213-7218.

Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res*, 18: 6531-6535.

Widmer G., Feng X., Tanriverdi S., 2004. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* with microsatellite markers. *Methods Mol Biol*; 268: 177-87.

World Health Organization (WHO) (1984). – Guidelines for surveillance, prevention and control of echinococcosis/hydatidosis (J. Eckert, M. Gemmell, Z. Matyas & E.J.L. Soulsby, eds). World Health Organization, Geneva, 1-147.

Xiao N., Nakao M., Qiu J., Budke C.M., Giraudoux P., Craig P.S., Ito A., 2006. Dual infection of animal hosts with different *Echinococcus* species in the eastern Qinghai-Tibet plateau region of China. *Am J Trop Med Hyg.*; 75(2): 292-4.

Xiao N., Qiu J., Nakao M., Li T., Yang W., Chen X., Schantz P.M., Craig P.S., Ito A., 2005. *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int J Parasitol* ; 35: 693-701.

Yamasaki H., Allan J.C., Sato M.O., Nakao M., Sako Y., Nakaya K., Qiu D., Mamuti W., Craig P.S., Ito A., 2004. DNA differential diagnosis of taeniasis and cysticercosis by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*;42(2): 548-53.

Zahler M., Filippova N.A., Morel P.C., Gothe R., Rinder H., 1997. Relationships between species of the *Rhipicephalus sanguineus* group: a molecular approach. *J Parasitol*; 83 (2): 302-306.

Zanini F., Gonzalo R., Perez H., Aparici I., Soto X., Guerrero J., Cerrone G., Elisondo C., 2006. Epidemiological surveillance of ovine hydatidosis in Tierra del Fuego, Patagonia Argentina, 1997-1999. *Vet Parasitol*; 138(3-4): 377-81.

Zarlenga D.S., Geary T., 2001. Preface. *Vet. Parasitol.*: 171-172.

Zarlenga D.S., Higgins J., 2001. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Vet Parasitol*; 101 (3-4): 215-30.

Zarlenga D.S., Stringfellow F., Nobary M., Lichtenfels J.R., 1994. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from three species of *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea) and identification of PCR primers for rapid differentiation. *Exp. Parasitol.*, 78: 28-36.

Zhang L.H., Chai J.J., Jiao W., Osman Y., McManus D.P., 1998a. Mitochondrial genomic markers confirm the presence of the camel strain (G6 genotype) of *Echinococcus granulosus* in northwestern China. *Parasitology*; 116: 29-33.

Zhang, L., Eslami A., Hosseini S.H., McManus D.P., 1998b. Indication of the presence of two distinct strains of *Echinococcus granulosus* in Iran by mitochondrial DNA markers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 59: 171-174.

Zhang L., Gasser R.B., Zhu X., McManus D.P., 1999. Screening for different genotypes of *Echinococcus granulosus* within China and Argentina by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 93 (3): 329-34.

Zhang L.H., Joshi D.D., McManus D.P., 2000. Three genotypes of *Echinococcus granulosus* identified in Nepal using mitochondrial DNA markers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*; 94: 258-260.

Zhang W., Li J., McManus D.P., 2003. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin Microbiol Rev.*; 16(1): 18-36.

Zhang W., McManus D.P., 2006. Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 47 (1): 24-41.

Zhu X., Chilton N.B., Jacobs D.E., Boes J., Gasser R.B., 1999. Characterisation of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol*; 29: 469-78.

Zhu X.Q., Gasser R.B., 1998. Single strand conformation polymorphism (SSCP)-based mutation scanning approaches to fingerprint sequence variation in ribosomal DNA of ascaridoid nematodes. *Electrophoresis*; 19: 1366-1373.

Zhu X.Q., Gasser R.B., Podolska M., Chilton N.B., 1998c. Characterisation of anisakid nematodes of potential zoonotic significance by ribosomal DNA. *Int J Parasitol*; 28: 1911-1921.

Zhu X.Q., Gasser R.B., Podolska M., Gasser N.B., 1998a. Characterization of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol*; 28 : 1911-1921.

Zhu X.Q., Jacobs D.E., Chilton N.B., Sani R.A., Cheng N.A.B.Y., Gasser R.B., 1998b. Molecular characterization of a *Toxocara* variant from cats in Kuala Lumpur, Malaysia. *Parasitology*; 117: 155-164.

Zhu X.Q., D'Amelio S., Paggi L., Gasser R.B., 2000. Assessing sequence variation in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA within and among members of the *Contraecum osculatum* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae). *Parasitol Res*; 86: 677-689.

Zhu X.Q., Gasser R.B., Jacobs D.E., Hung G.C., Chilton N.B., 2002. Relationships among some ascaridoid nematodes based on ribosomal DNA sequence data. *Parasitol Res*; 86: 738-744.

**FIGURE RELATIVE ALLA
PARTE GENERALE**

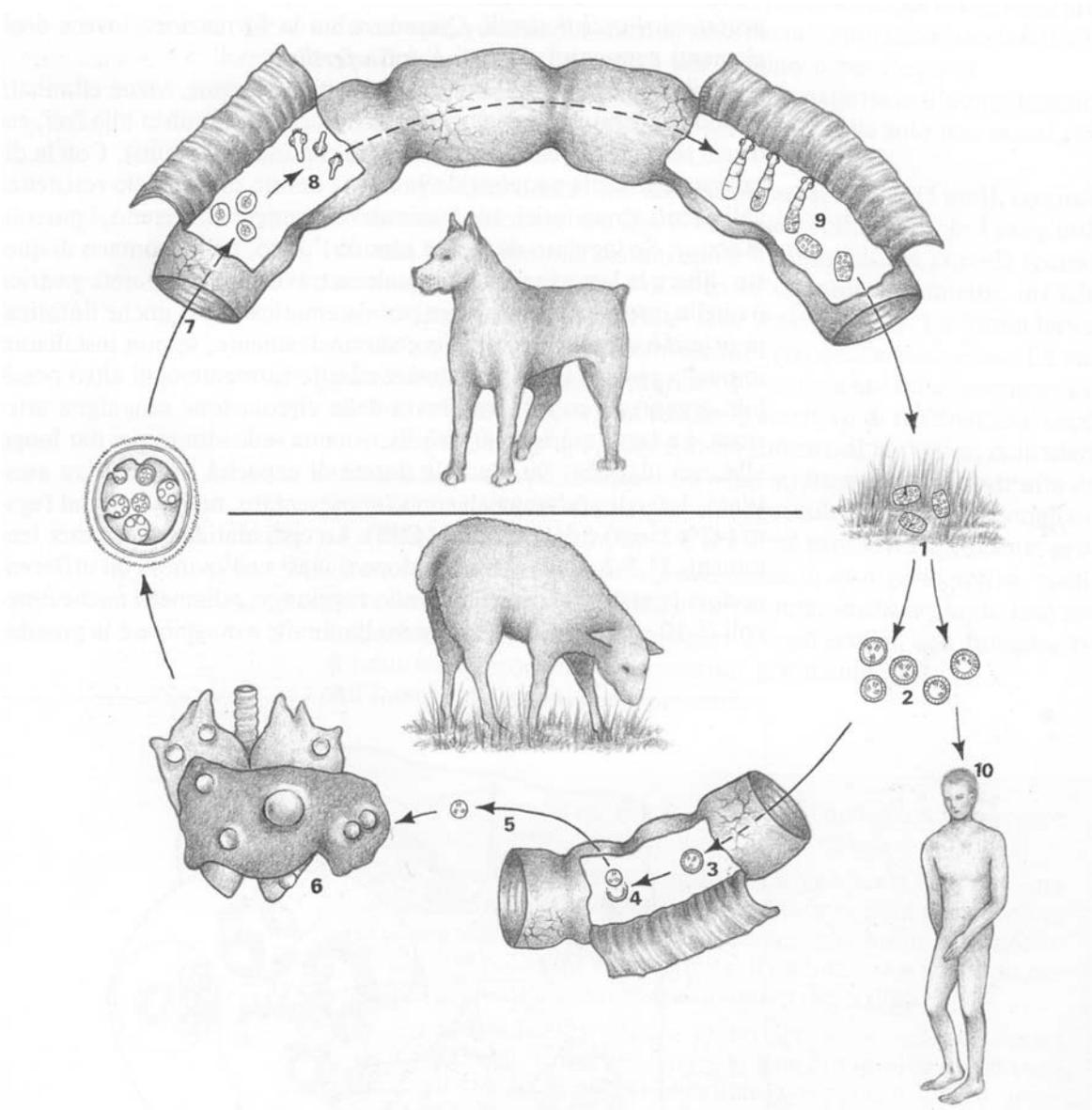


Fig.1 Ciclo biologico (Pampiglione e Canestri Trotti, 1990)

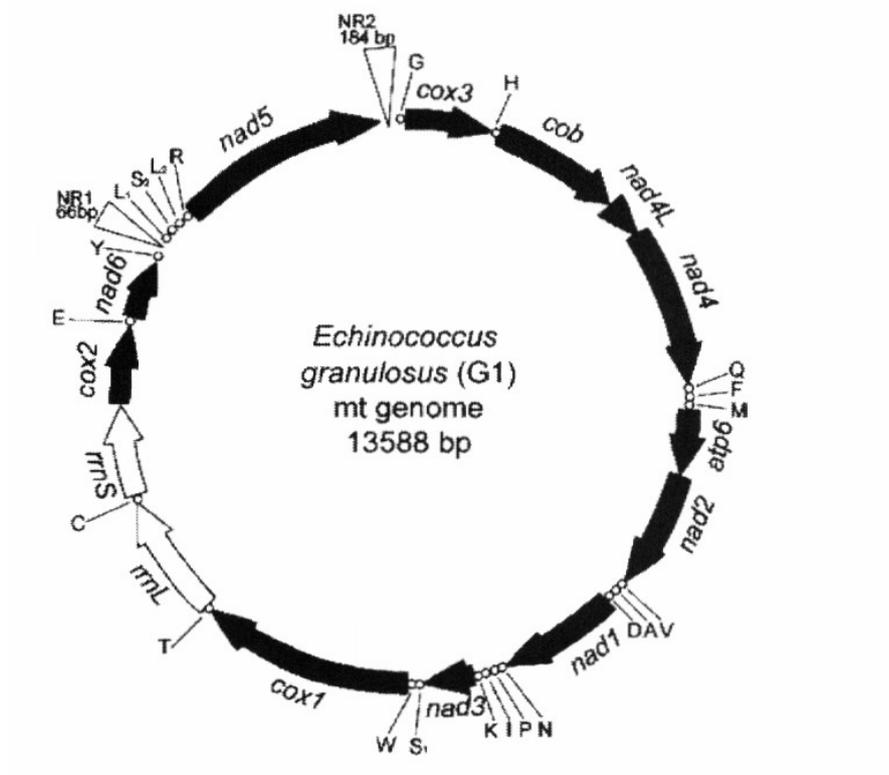


Fig. 2 Genoma mitocondriale di *E.granulosus* (McManus et al., 2004)

**FIGURE RELATIVE ALLA
PARTE SPERIMENTALE**

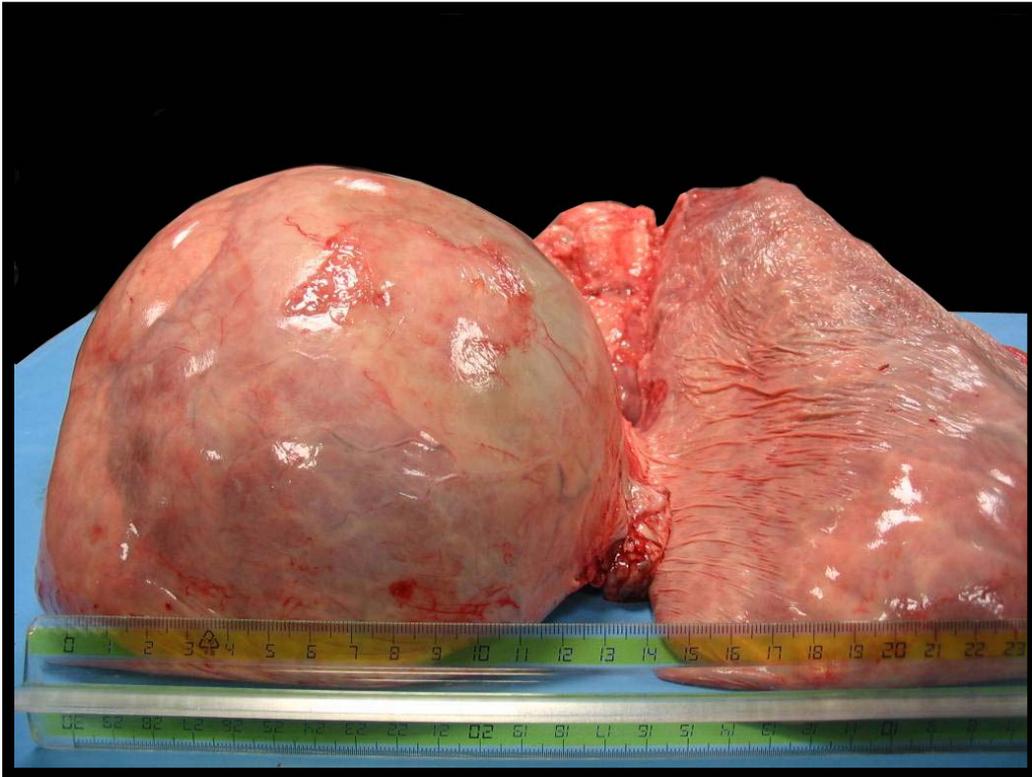


Fig.1 Bufalo - idatidosi polmonare



Fig. 2 Bufalo – idatidosi epatica

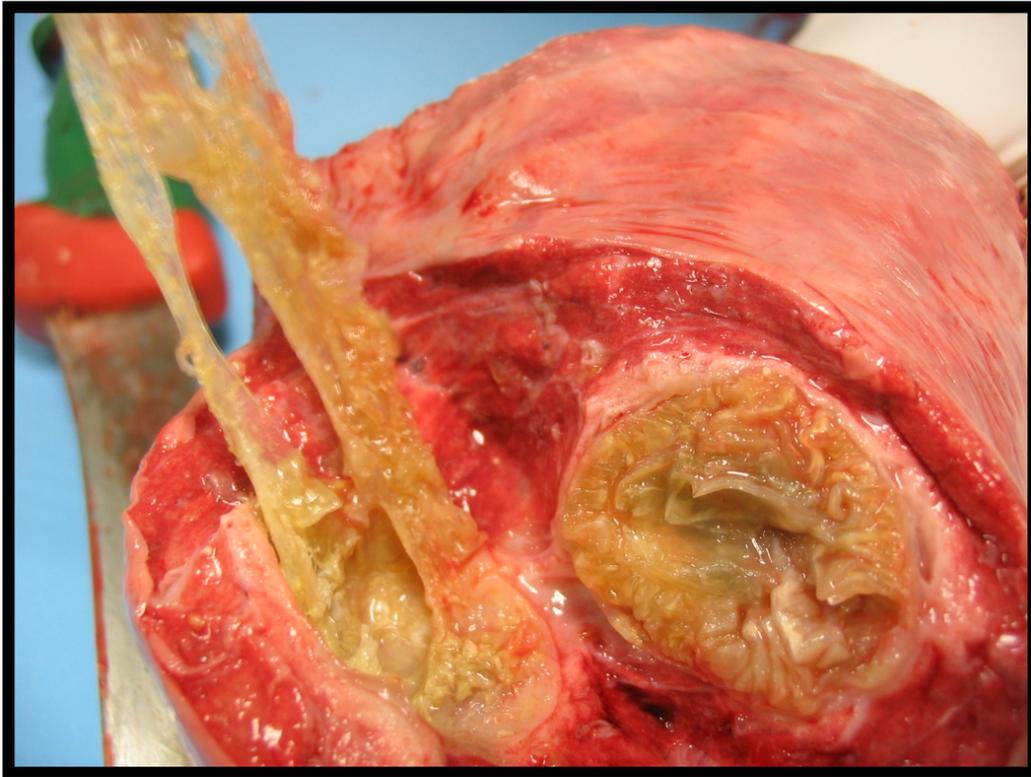


Fig.3 Bufalo - idatidosi polmonare



Fig. 4. Bufalo – idatidosi epatica

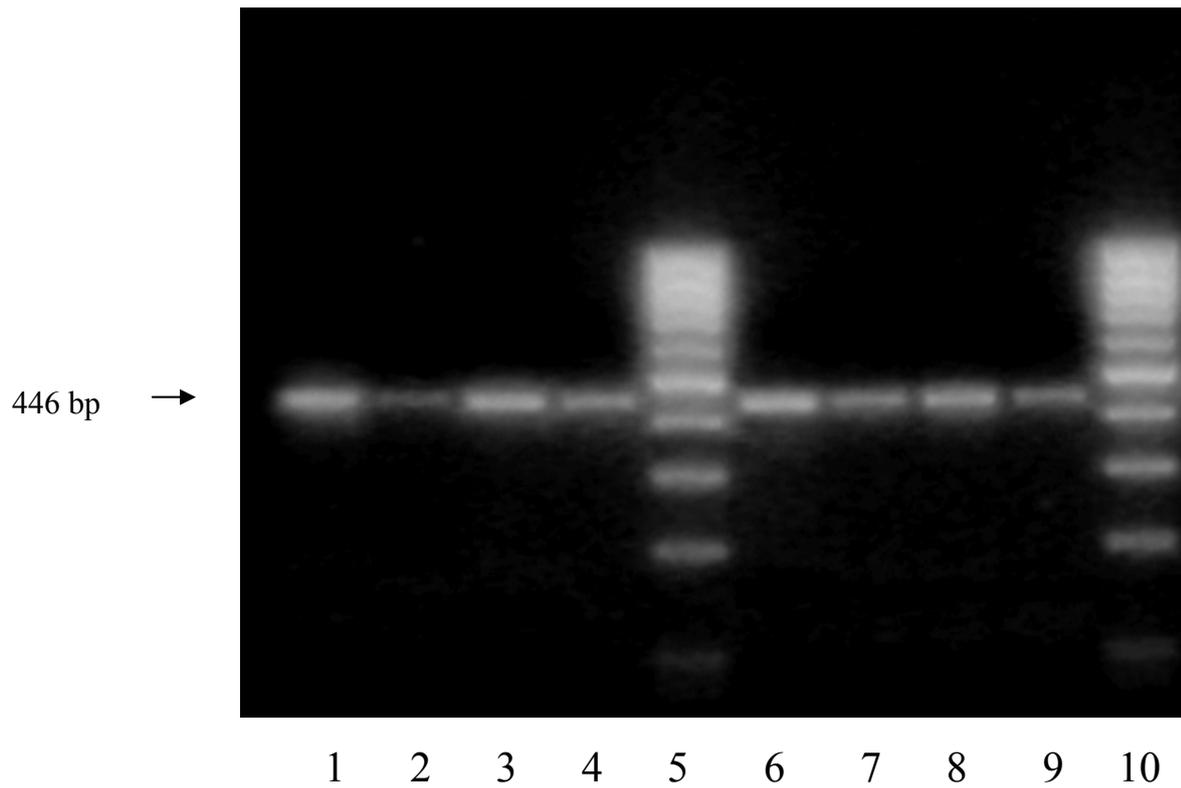


Fig. 5 Amplificazione della regione CO1. Nei pozzetti: 1, 2, 3, sono stati caricati tre campioni bufalini; nei pozzetti 4, 6, 7, sono stati caricati tre campioni bovini; nei pozzetti 8 e 9 ci sono due campioni ovini; nei pozzetti 5, 10 è stato caricato il ladder 100 bp.

```

G1 (U50464) TGTGTTGATTTTGCCTGGATTTGGTATAAATTAGTCATATTTGTTTGAGTATTAGTGCTAA 60
campioneG1 TGTGTTGATTTTGCCTGGATTTGGTATAAATTAGTCATATTTGTTTGAGTATTAGTGCTAA 60
G2 (M64662) -----CCTGGATTTGGTATAAATTAGTCATATTTGTTTGAGTATTAGTGCTAA 47
campioneG2 TGTGTTGATTTTGCCTGGATTTGGTATAAATTAGTCATATTTGTTTGAGTATTAGTGCTAA 60
G3 (M64663) -----CCTGGATTTGGTATAAATTAGTCATATTTGTTTGAGTATTAGTGCTAA 47
campioneG3 TGTGTTGATTTTGCCTGGATTTGGTATAAATTAGTCATATTTGTTTGAGTATTAGTGCTAA 60

G1 (U50464) TTTTGATGCGTTTGGGTTCTATGGGTTGTTGTTTGCTATGTTTTCTATAGTGTGTTTGGG 120
campioneG1 TTTTGATGCGTTTGGGTTCTATGGGTTGTTGTTTGCTATGTTTTCTATAGTGTGTTTGGG 120
G2 (M64662) TTTTGATGTGTTTGGGTTTATGGGTTGTTGTTTGCTATGTTTTCTATAGTGTGTTTGGG 107
campioneG2 TTTTGATGTGTTTGGGTTTATGGGTTGTTGTTTGCTATGTTTTCTATAGTGTGTTTGGG 120
G3 (M64663) TTTTGATGCGTTTGGGTTTATGGGTTGTTGTTTGCTATGTTTTCTATAGTGTGTTTGGG 107
campioneG3 TTTTGATGCGTTTGGGTTTATGGGTTGTTGTTTGCTATGTTTTCTATAGTGTGTTTGGG 120

G1 (U50464) TAGCAGGGTTTGGGGTCATCATATGTTTACTGTTGGGTTGGATGTGAAGACGGCTGTTTT 180
campioneG1 TAGCAGGGTTTGGGGTCATCATATGTTTACTGTTGGGTTGGATGTGAAGACGGCTGTTTT 180
G2 (M64662) TAGCAGGGTTTGGGGTCATCATATGTTTACTGTTGGGTTGGATGTGAAGACGGCTGTTTT 167
campioneG2 TAGCAGGGTTTGGGGTCATCATATGTTTACTGTTGGGTTGGATGTGAAGACGGCTGTTTT 180
G3 (M64663) TAGCAGGGTTTGGGGTCATCATATGTTTACTGTTGGGTTGGATGTGAAGACGGCTGTTTT 167
campioneG3 TAGCAGGGTTTGGGGTCATCATATGTTTACTGTTGGGTTGGATGTGAAGACGGCTGTTTT 180

G1 (U50464) TTTTAGCTCTGTTACTATGATTATAGGGGTTCCCTACTGGTATAAAGGTGTTTACTTGGTT 240
campioneG1 TTTTAGCTCTGTTACTATGATTATAGGGGTTCCCTACTGGTATAAAGGTGTTTACTTGGTT 240
G2 (M64662) TTTTAGCTCTGTTACTATGATTATAGGGGTTCCCTACTGGTATAAAGGTGTTTACTTGGTT 227
campioneG2 TTTTAGCTCTGTTACTATGATTATAGGGGTTCCCTACTGGTATAAAGGTGTTTACTTGGTT 240
G3 (M64663) TTTTAGCTCTGTTACTATGATTATAGGGGTTCCCTACTGGTATAAAGGTGTTTACTTGGTT 227
campioneG3 TTTTAGCTCTGTTACTATGATTATAGGGGTTCCCTACTGGTATAAAGGTGTTTACTTGGTT 240

G1 (U50464) ATATATGTTGTTGAATTCGAGTGTTAATGTTAGTGATCCGGTTTTGTGATGGGTTGTTTC 300
campioneG1 ATATATGTTGTTGAATTCGAGTGTTAATGTTAGTGATCCGGTTTTGTGATGGGTTGTTTC 300
G2 (M64662) ATATATGTTGTTGAATTCGAGTGTTAATGCTAGTGATCCGGTTTTGTGATGGGTTGTTTC 287
campioneG2 ATATATGTTGTTGAATTCGAGTGTTAATGCTAGTGATCCGGTTTTGTGATGGGTTGTTTC 300
G3 (M64663) ATATATGTTGTTGAATTCGAGTGTTAATGCTAGTGATCCGGTTTTGTGATGGGTTGTTTC 287
campioneG3 ATATATGTTGTTGAATTCGAGTGTTAATGCTAGTGATCCGGTTTTGTGATGGGTTGTTTC 300

G1 (U50464) TTTTATAGTGTTGTTTACGTTTGGGGGAGTTACGGGTATAGTTTTGTCTGCTTGTGTGTT 360
campioneG1 TTTTATAGTGTTGTTTACGTTTGGGGGAGTTACGGGTATAGTTTTGTCTGCTTGTGTGTT 360
G2 (M64662) TTTTATAGTGTTGTTTACGTTTGGGGGAGTTACGGGTATAGTTTTGTCTGCTTGTGTGTT 347
campioneG2 TTTTATAGTGTTGTTTACGTTTGGGGGAGTTACGGGTATAGTTTTGTCTGCTTGTGTGTT 360
G3 (M64663) TTTTATAGTGTTGTTTACGTTTGGGGGAGTTACGGGTATAGTTTTGTCTGCTTGTGTGTT 347
campioneG3 TTTTATAGTGTTGTTTACGTTTGGGGGAGTTACGGGTATAGTTTTGTCTGCTTGTGTGTT 360

G1 (U50464) AGATAATATTTTGCATGATACTTGGTTTGTG----- 391
G1campione AGATAATATTTTGCATGATACTTGGTTTGTGGTGGCTCATTTCATTATGTTCTTT 416
G2 (M64662) AGATAATATTTTGCATGAT----- 366
campioneG2 AGATAATATTTTGCATGATACTTGGTTTGTGGTGGCTCATTTCATTATGTTCTTT 416
G3 (M64663) AGATAATATTTTGCATGAT----- 366
campioneG3 AGATAATATTTTGCATGATACTTGGTTTGTGGTGGCTCATTTCATTATGTTCTTT 416

```

Fig. 6 Allineamento tra le sequenze presenti in GenBank G1 (U50464), G2 (M64662), G3 (M64663) e le sequenze corrispondenti ottenute dall'analisi sia dei campioni bufalini, bovini e ovini. In rosso sono indicate le basi diverse.

```

Glc(AF458873) TGTGTTGATTTTGCCTGGATTTGGTATAATTAGTCATATTTGTTTGAGTATTAGTGCTAA 60
campioneGlc  -GTGTTGATTTTGCCTGGATTTGGTATAATTAGTCATATTTGTTTGAGTATTAGTGCTAA 59

Glc(AF458873) TTTTGATGCGTTTGGGTTCTATGGGTTGTTGTTTGCTATGTTTTCTATAGTGTGTTTGGG 120
campioneGlc  TTTTGATGCGTTTGGGTTCTATGGGTTGTTGTTTGCTATGTTTTCTATAGTGTGTTTGGG 119

Glc(AF458873) TAGCAGGGTTTGGGGTCATCATATGTTTACTGTTGGGTTGGATGTGAAGACGGCTGTTTT 180
campioneGlc  TAGCAGGGTTTGGGGTCATCATATGTTTACTGTTGGGTTGGATGTGAAGACGGCTGTTTT 179

Glc(AF458873) TTTTAGCTCTGTTACTATGATTATAGGGTTCCTACTGGTATAAAGGTGTTTACTTGGTT 240
campioneGlc  TTTTAGCTCTGTTACTATGATTATAGGGTTCCTACTGGTATAAAGGTGTTTACTTGGTT 239

Glc(AF458873) ATATATGTTGTTGAATTCGAGTGTTAATGTTAGTGATCCGGTTTTGTGATGGGTTGTTTC 300
campioneGlc  ATATATGTTGTTGAATTCGAGTGTTAATGTTAGTGATCCGGTTTTGTGATGGGTTGTTTC 299

Glc(AF458873) TTTTATAGTGTGTTGTTTACGTTTGGGGGAGTTACGGGTATAGTTTTGTCTGCTTGTGTGTT 360
campioneGlc  TTTTATAGTGTGTTGTTTACGTTTGGGGGAGTTACGGGTATAGTTTTGTCTGCTTGTGTGTT 359

Glc(AF458873) GGATAATATTTTGCATGATACTTGGTTTGTG----- 391
campioneGlc  GGATAATATTTTGCATGATACTTGGTTTGTGGTGGCTCATTTTTCATTATGTTCTTTT 416

```

Fig. 7 Allineamento tra la sequenza presente in GenBank Glc (AF458873) e la sequenza corrispondente ottenuta dall'analisi di 3 campioni bufalini.

```

G1c (AY686565) -----TTTGGTATAATTAGTCATATTTGTTTGAGTATTAGTGCTAAT 41
campioneG1c   GTGTTGATTTTGCCTGGATTTGGTATAATTAGTCATATTTGTTTGAGTATTAGTGCTAAT 60

G1c (AY686565) TTTGATGTGTTTGGGTTCTATGGGTTGTTGTTTGCTATGTTTTCTATAGTGTGTTTGGGT 101
campioneG1c   TTTGATGTGTTTGGGTTCTATGGGTTGTTGTTTGCTATGTTTTCTATAGTGTGTTTGGGT 120

G1c (AY686565) AGCAGGGTTTGGGGTCATCATATGTTTACTGTTGGGTTGGATGTGAAGACGGCTGTTTTTT 161
campioneG1c   AGCAGGGTTTGGGGTCATCATATGTTTACTGTTGGGTTGGATGTGAAGACGGCTGTTTTTT 180

G1c (AY686565) TTTAGCTCTGTTACTATGATTATAGGGGTTCCCTACTGGTATAAAGGTGTTTACTTGGTTA 221
campioneG1c   TTTAGCTCTGTTACTATGATTATAGGGGTTCCCTACTGGTATAAAGGTGTTTACTTGGTTA 240

G1c (AY686565) TATATGTTGTTGAATTCGAGTGTTAATGTTAGTGATCCGGTTTTGTGATGGGTTGTTTCT 281
campioneG1c   TATATGTTGTTGAATTCGAGTGTTAATGTTAGTGATCCGGTTTTGTGATGGGTTGTTTCT 300

G1c (AY686565) TTTATAGTGTTGTTTACGTTTGGGGGAGTTACGGGTATAGTTTTGTCTGCTTGTGTGTTG 341
campioneG1c   TTTATAGTGTTGTTTACGTTTGGGGGAGTTACGGGTATAGTTTTGTCTGCTTGTGTGTTG 360

G1c (AY686565) GATAATATTTTGCATGATACTTGGTTTGTGGTGGCT----- 372
campioneG1c   GATAATATTTTGCATGATACTTGGTTTGTGGTGGCTCATTTCATTATGTTCTTTT 416

```

Fig. 8 Allineamento tra la sequenza presente in GenBank G1c (AY686565) e la sequenza corrispondente ottenuta dall'analisi del campione bovino.

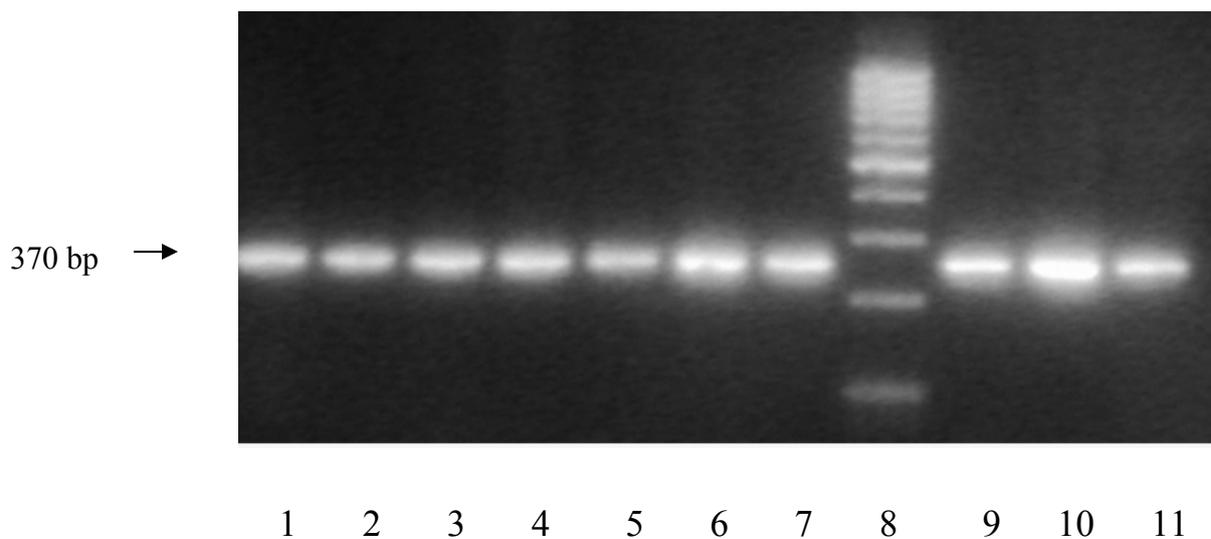


Fig. 9 Amplificazione della regione 12S mtDNA. Nei pozzetti: 1, 2, 3, 4, sono stati caricati cinque campioni bufalini; nei pozzetti 5, 6, 7, 9 sono stati caricati cinque campioni bovini; nei pozzetti 9 e 10 ci sono due campioni ovini; nel pozzetto 8 è stato caricato il ladder 100 bp.

```

G1 (AY462129) -----CTAGTTTTGTAACATAAAATGGTTTTGGCAGTGAGC 34
campioneG1 -ATTAATGTATTTTGTAAAGTTGTTCCCTAGTTTTGTAACATAAAATGGTTTTGGCAGTGAGC 59
G3 (DQ822451) CATTAATGTATTTTGTAAAGTTGTTCCCTAGTTTTGTAACATAAAATGGTTTTGGCAGTGAGC 60
campioneG3/G2 -ATTAATGTATTTTGTAAAGTTGTTCCCTAGTTTTGTAACATAAAATGGTTTTGGCAGTGAGC 59

G1 (AY462129) GATTCCTTATTAGGGGAATATGCATAGTGAAGGATGGTCCACCTATTAGTTTACTCTTTTT 94
campioneG1 GATTCCTTATTAGGGGAATATGCATAGTGAAGGATGGTCCACCTATTAGTTTACTCTTTTT 119
G3 (DQ822451) GATTCCTTATTAGGGGAATATGCATAGTGAAGGATGGTCCACCTATTAGTTTACTCTTTTT 120
campioneG3/G2 GATTCCTTATTAGGGGAATATGCATAGTGAAGGATGGTCCACCTATTAGTTTACTCTTTTT 119

G1 (AY462129) ATGTTGGTGTATGTCTGGTTTTGATATTATTGTTGAATAATTTAAGTTTGTGTAGTTTTAG 154
campioneG1 ATGTTGGTGTATGTCTGGTTTTGATATTATTGTTGAATAATTTAAGTTTGTGTAGTTTTAG 179
G3 (DQ822451) ATGTTGGTGTATGTCTGGTTTTGATATTATTGTTGAATAATTTAAGTTTGTGTAGTTTTAG 180
campioneG3/G2 ATGTTGGTGTATGTCTGGTTTTGATATTATTGTTGAATAATTTAAGTTTGTGTAGTTTTAG 179

G1 (AY462129) TTAAGCTAAGTCTATGTGCTGCTTATGGAGTTTTTGTGTGTTACATTAATAAGGGTGTT 214
campioneG1 TTAAGCTAAGTCTATGTGCTGCTTATGGAGTTTTTGTGTGTTACATTAATAAGGGTGTT 239
G3 (DQ822451) TTAAGCTAAGTCTATGTGCTGCTTATGGAGTTTTTGTGTGTTACATTAATAAGGGTGTT 240
campioneG3/G2 TTAAGCTAAGTCTATGTGCTGCTTATGGAGTTTTTGTGTGTTACATTAATAAGGGTGTT 239

G1 (AY462129) ATTGTAGATGATGTGATTTAGGACTTAATAGTAATGTTAAATGAGTTTGTGATGTGAA 274
campioneG1 ATTGTAGATGATGTGATTTAGGACTTAATAGTAATGTTAAATGAGTTTGTGATGTGAA 299
G3 (DQ822451) ATTGTAGATGATGTGATTTAGGACTTAATAGTAATGTTAAATGAGTTTGTGATGTGAA 300
campioneG3/G2 ATTGTAGATGATGTGATTTAGGACTTAATAGTAATGTTAAATGAGTTTGTGATGTGAA 299

G1 (AY462129) GAGAGTTTAGCTCAGGTACACACCGCCCGTCACCCTCGGTTA----- 316
campioneG1 GAGAGTTTAGCTCAGGTACACACCGCCCGTCACCCTCGGTTA----- 341
G3 (DQ822451) GAGAGTTTAGCTCAGGTACACACCGCCCGTCACCCTCGGTTACCACCTCTATTAACACTT 358
campioneG3/G2 GAGAGTTTAGCTCAGGTACACACCGCCCGTCACCCTCGGTTA----- 341

G1 (AY462129) ---- 316
campioneG1 ---- 341
G3 (DQ822451) CCTT 362
campioneG3/G2 ---- 341

```

Fig. 10 Allineamento tra le sequenze 12S presenti in GenBank G1 (AY462129) e G3 (DQ822451) e le sequenze corrispondenti ottenute dall'analisi sia dei campioni bufalini che di quelli bovini. In rosso sono indicate le basi differenti

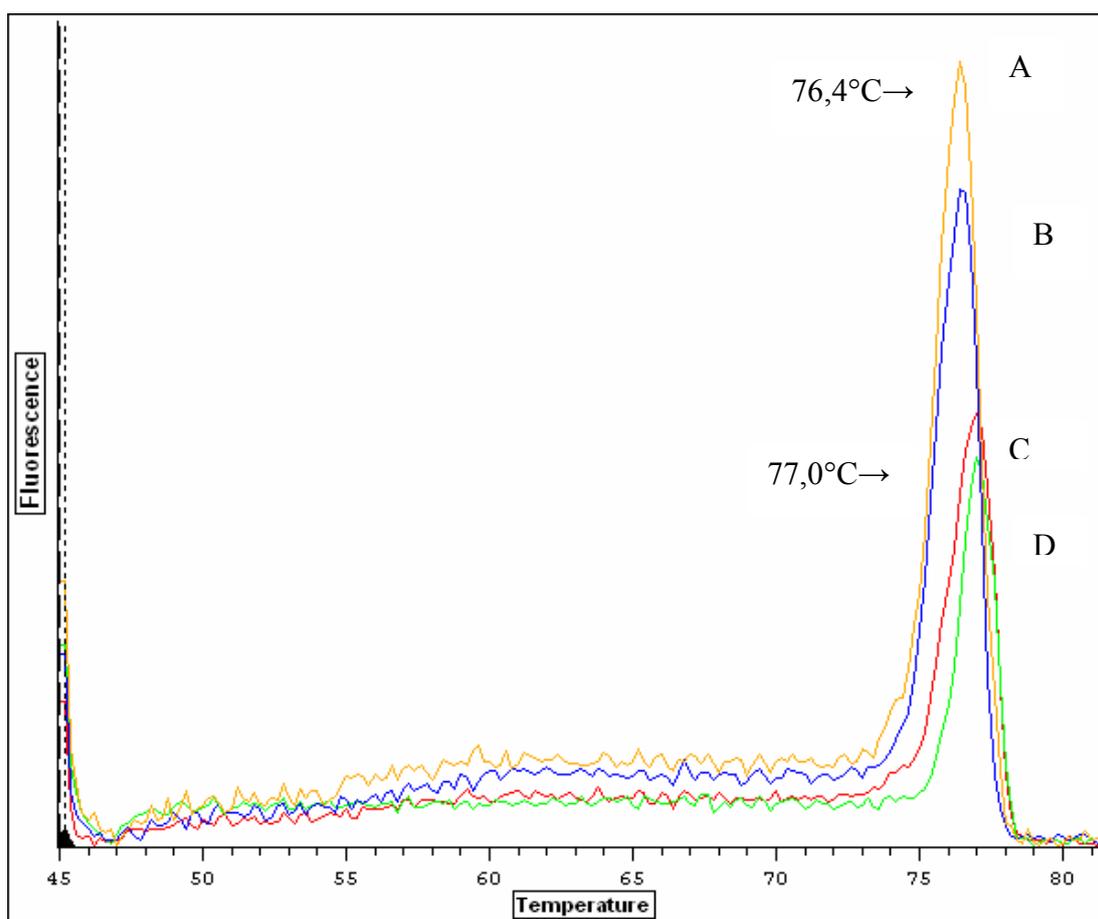


Fig. 11 T_m nei campioni analizzati A, B, C, D.
 A= G1 noto identificato tramite sequenziamento; B= G1 identificato mediante analisi della T_m ; C= G3 noto identificato tramite sequenziamento; D= G3 identificato mediante analisi della T_m

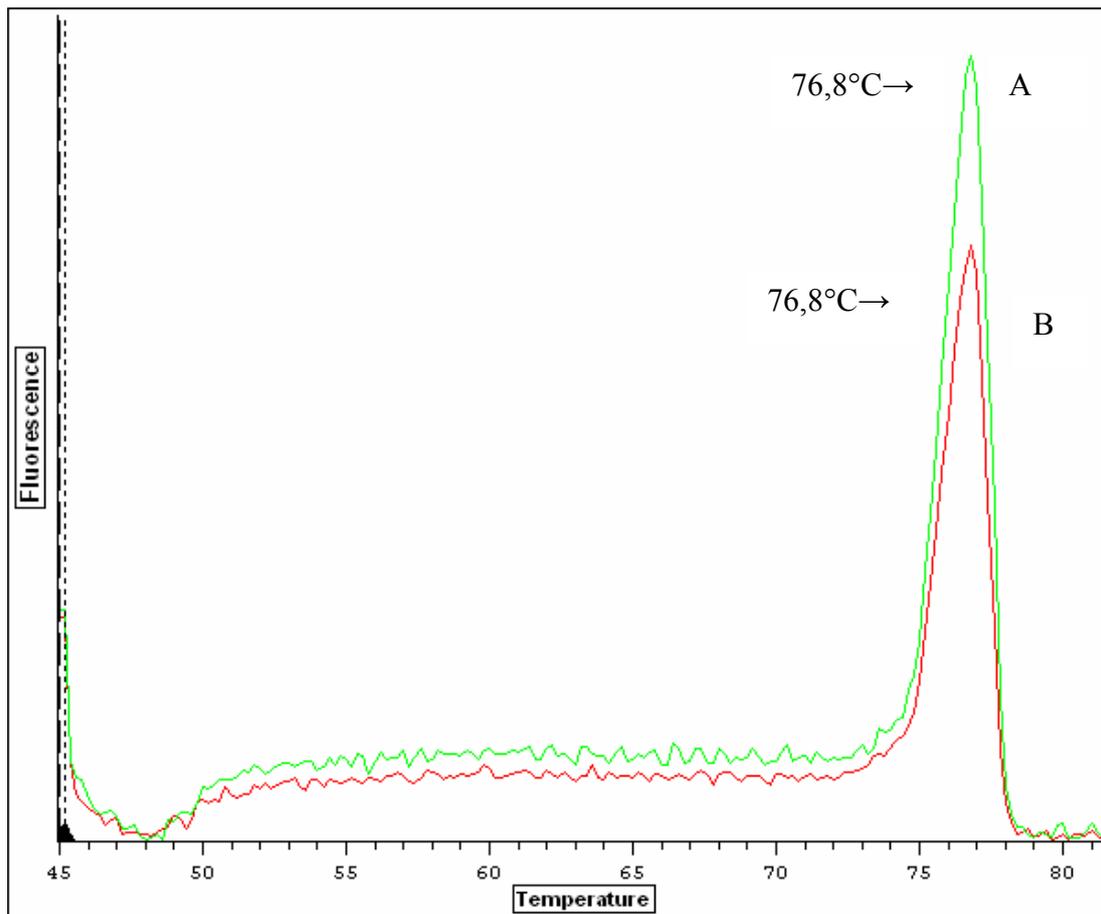


Fig.12 T_m nei campioni analizzati A, B.
 A= Campione identificato tramite sequenziamento come G2; B=
 Campione identificato tramite sequenziamento come G3

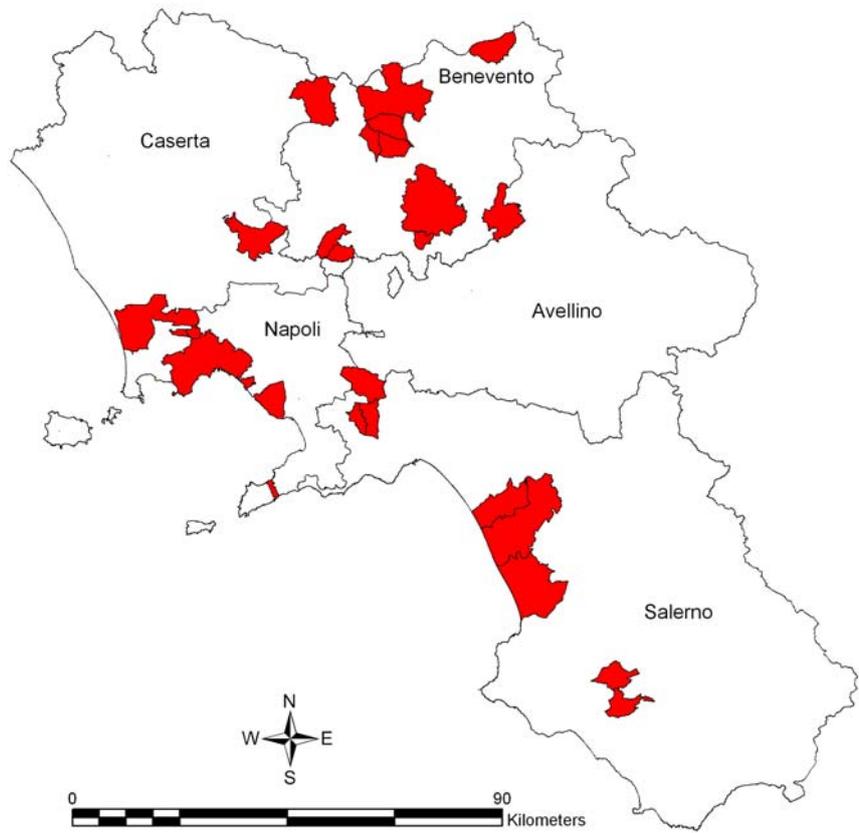


Fig. 13 Comuni di provenienza dei pazienti positivi

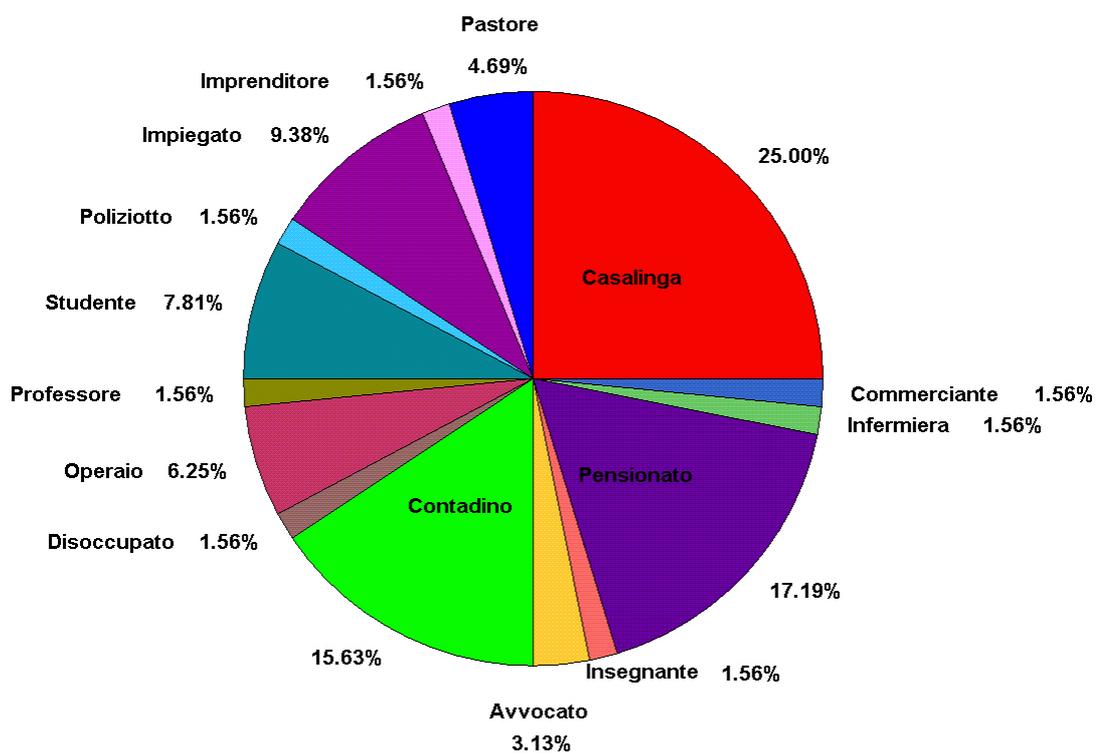


Fig. 14 Frequenza dei pazienti positivi rispetto alla professione.