

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**DOTTORATO DI RICERCA IN  
ORGANISMI MODELLO NELLA RICERCA  
BIOMEDICA E VETERINARIA**

**- XXVI CICLO -**

**MODELLI DI INTERAZIONE OSPITE-PARASSITA**

***DICROCOELIUM DENDRITICUM***

**ASPETTI EPIDEMIOLOGICI, BIOLOGICI, PATOLOGICI E MOLECOLARI**

*Dottorando*

**Dott.ssa Paola Pepe**

*Tutor*

**Prof. Laura Rinaldi**

*Coordinatore del Dottorato*

**Ch.mo Prof. Paolo De Girolamo**

Anni Accademici 2011-12/2013-14

## **INDICE**

<b>Premessa</b>	pag. 5
<b>PARTE GENERALE</b>	
<b>Dicrocoeliosi</b>	pag. 8
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	pag. 12
Morfologia	pag. 12
Ciclo biologico	pag. 15
Epidemiologia della dicrocoeliosi	pag. 19
Fattori ambientali	pag. 22
Fattori legati agli ospiti intermedi	pag. 23
Fattori legati agli ospiti definitivi (ovini, caprini e bovini)	pag. 26
Patogenesi, lesioni e risposta immunitaria	pag. 27
Diagnosi	pag. 31
Profilassi e trattamento	pag. 38
Infezione nell'uomo	pag. 43
<b>La biologia molecolare in parassitologia</b>	pag. 45
PCR	pag. 46
PCR - RFLP	pag. 49
AP-PCR	pag. 59
Multiplex PCR	pag. 50
Sequenziamento	pag. 50
SSCP e DGGE	pag. 52
Real-Time PCR	pag. 53
Il DNA ribosomiale (rDNA)	pag. 56
DNA mitocondriale (mtDNA): struttura e funzioni	pag. 61
<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	
<b>Obiettivi della ricerca</b>	pag. 66
<b>1. Indagine epidemiologica</b>	pag. 67

<b>1.1 Indagine epidemiologica in allevamenti ovini</b>	pag. 67
<b>Materiali e Metodi</b>	pag. 67
Area di studio	pag. 67
Dimensione del campione	pag. 68
Distribuzione del campione	pag. 68
Prelievo dei campioni	pag. 69
Indagini copromicroscopiche	pag. 69
Tecniche FLOTAC	pag. 70
<b>Risultati</b>	pag. 76
<b>1.2 Indagine epidemiologica negli scoiattoli</b>	pag. 78
<b>Materiali e Metodi</b>	pag. 78
Prelievo campioni	pag. 78
Fissazione e conservazione del campione	pag. 79
Indagini copromicroscopiche	pag. 79
Tecniche FLOTAC	pag. 80
<b>Risultati</b>	pag. 81
<b>2. Caratterizzazione molecolare di diversi esemplari di <i>Dicrocoelium dendriticum</i></b>	pag. 82
<b>Materiali e Metodi</b>	pag. 82
Raccolta dei parassiti	pag. 82
Estrazione del DNA	pag. 82
Quantificazione	pag. 84
Amplificazione delle regioni 28S e ITS-2 del rDNA	pag. 84
Elettroforesi	pag. 86
Purificazione	pag. 86
Sequenziamento	pag. 87
Purificazione post-sequenziamento	pag. 88
Elettroforesi capillare	pag. 88
<b>Risultati</b>	pag. 89
PCR	pag. 89
Sequenziamento	pag. 90

<b>3. Valutazione effetti degli antigeni somatici di <i>D. dendriticum</i> su cellule di epatocarcinoma</b>	pag. 94
<b>Materiali e Metodi</b>	pag. 94
Estrazione di antigeni somatici di <i>D. dendriticum</i>	pag. 94
Determinazione della concentrazione proteica	pag. 96
Colture cellulari	pag. 96
Saggi di proliferazione cellulare	pag. 97
Valutazione dell'apoptosi mediante analisi al citofluorimetro	pag. 98
Valutazione dell'autofagia	pag. 100
Valutazione dello stress ossidativo mediante analisi citofluorimetrica	pag. 100
<b>Risultati</b>	pag. 101
Analisi della vitalità cellulare mediante test MTT	pag. 101
Apoptosi	pag. 103
Autofagia	pag. 106
Stress ossidativo	pag. 107
<b>Discussione e Conclusioni</b>	pag. 109
<b>Bibliografia</b>	pag. 113

## PREMESSA

Il termine *parásitos* (*pará* = presso, *sítos* = cibo) significa in greco antico ‘che mangia insieme con’ e, nell’antichità, era attribuito a sacerdoti o magistrati ‘mantenuti’ dalla comunità. L’antico sostantivo è alla radice del nostro termine ‘parassita’, anche se i due significati sono abbastanza differenti. Infatti il termine greco indicava in origine prevalentemente il ‘commensale’, ovvero colui che mangia a spese del suo ospite ma che di fatto non gli causa danni, mentre nella nostra lingua il termine parassita indica qualcosa che vive sì a spese di un ospite, come il commensale, ma che in più può arrecargli danno. Nonostante esistano specie parassite in tutta la gamma dei viventi, classicamente, sia in ambito medico che medico veterinario, quando si fa riferimento ai parassiti si intendono i protozoi, gli elminti, gli artropodi ed i miceti. In particolare gli elminti si suddividono in 4 diversi Tipi (*Phyla*): Platelminti (Trematoda e Cestoda), Nematelminti (Nematoda), Acantocefali e Anellidi (Pampiglione e Canestri Trotti, 1999). I parassiti animali rientrano nella categoria dei ‘consumatori’ e contribuiscono a mantenere l’equilibrio naturale dell’ecosistema, che è un equilibrio dinamico tra gli individui e le popolazioni che occupano livelli trofici successivi. Le interazioni ospite-parassita sono il risultato di un lento adattamento tra queste due entità, avvenuto nel corso della filogenesi (Genchi e Pozio, 2003). In molti casi, questi rapporti producono profonde modificazioni del comportamento dell’ospite e hanno un significato evolutivo simile a quello delle interazioni predatore-preda, come è emerso dagli studi sugli aspetti comportamentali dei parassiti. Una più approfondita conoscenza delle interazioni ospite-parassita ha consentito di comprendere come da questo rapporto interattivo dipenda la regolazione della popolazione ospite, la selezione, il mantenimento del polimorfismo genico e la competizione interspecifica (Genchi e Pozio, 2003).

Diversi aspetti di questa relazione interspecifica hanno trovato ampio spazio in numerosi studi che vanno dal riconoscimento delle specie biologiche di parassiti mediante metodiche genetico-molecolari, al ruolo svolto dai parassiti nelle popolazioni ospiti ed, indirettamente, nell'ecosistema. I parassiti mostrano, inoltre, un'enorme diversità di cicli biologici che implicano differenti modalità riproduttive, capacità di dispersione, efficaci meccanismi nel parassitare un ospite, etc. (Criscione et al., 2005). Grazie a tutte queste qualità, le specie parassitarie si sono dimostrate molto utili come indicatori biologici di strutture e stabilità di reti trofiche, della biodiversità di un ecosistema, di inquinamento, di variabili ambientali, di distruzione ed alterazione dell'habitat, di migrazione delle popolazioni di ospiti, nonché e della biologia delle popolazioni di ospiti (MacKenzie, 1990; 2002; Thomas et al., 1996; Mattiucci et al., 2004; Marcogliese, 2005).

L'interesse verso tali interazioni, negli ultimi anni, ha subito un notevole impulso. Ciò è dovuto sia all'importanza delle infezioni parassitarie in sanità pubblica e veterinaria, sia all'interesse verso tali organismi parassiti da utilizzare come modelli.

Nell'ambito dell'ecologia, i parassitologi stanno studiando e validando modelli geografici e statistici da utilizzare per prevedere il comportamento della popolazione parassitaria nel tempo e nello spazio. Questi modelli, infatti, possono essere utilizzati per sorvegliare le situazioni epidemiologiche, per valutare l'efficacia delle misure di controllo attuate o per prevedere i risultati delle azioni intraprese dall'uomo tese a modificare l'ambiente, l'uso del suolo ed altre caratteristiche territoriali (Cringoli et al., 2013).

Lo studio dei prodotti parassitari in modelli di infezioni sperimentali ha permesso, invece, di mettere in atto delle contro risposte dell'ospite nei confronti del parassita. In particolari modelli di infezione sperimentale,

quali quelli da nematodi *Trichinella spiralis* (Robinson et al., 1995) ed *Ancylostoma caninum* (Ali et al., 1996), è stato dimostrato che la vaccinazione con alcuni di questi prodotti conferisce una buona protezione nei confronti dell'infezione.

Una maggiore comprensione dei meccanismi di interazione ospite-parassita riveste anche un interesse più generale, dal momento che l'estrema selettività di azione di alcune molecole di origine parassitaria, sui diversi tipi di cellule infiammatorie, ne fa prevedere un possibile impiego terapeutico in patologie infiammatorie particolarmente gravi (Bruschi, 1997). In un modello sperimentale, infatti, è stato dimostrato che un prodotto di *Ancylostoma caninum*, il cosiddetto NIF (Neutrophil inhibitory factor) è in grado di prevenire il danno a carico del polmone causato dai neutrofili (Barnard et al., 1995) e che riduce l'adesione dei neutrofili nel fegato dopo shock emorragico (Bauer et al., 1995).

Negli ultimi anni, l'interesse verso i modelli di interazione ospite-parassita si è rivolto principalmente alla comprensione del ruolo di alcune specie di parassiti nei meccanismi della carcinogenesi.

E' stato riscontrato, attraverso vari studi epidemiologici, come l'elevata prevalenza di infezioni parassitarie nella popolazione, la loro persistenza nell'ospite e le co-infezioni con altri agenti infettivi possano favorire l'insorgenza di una neoplasia (il 13% dei casi di cancro nel mondo è causato da infezioni croniche da parte di virus, batteri e parassiti) (Fried et al., 2011).

Sebbene numerosi parassiti, in particolar modo gli elminti, siano stati implicati nell'eziologia del cancro nell'uomo, ancora non è chiaro il meccanismo con cui essi trasformano le cellule dell'ospite in cellule cancerogene (Herrera e Ostrosky-Wegman, 2001). Questo perché i parassiti hanno un lungo periodo di prepatenza, durante il quale le infezioni da essi

sostenute risultano asintomatiche, per cui molti altri fattori esogeni ed endogeni potrebbero intervenire e nascondere una loro eventuale relazione.

L'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) considera, tra gli elminti, tre specie di trematodi, *Schistosoma haematobium*, *Opisthorchis viverrini* e *Clonorchis sinensis*, responsabili di indurre cancro nell'uomo (Fried et al., 2011). Tuttavia, il numero di elminti per il quale vi è un'evidente associazione con la trasformazione neoplastica è basso rispetto al numero di elminti che possono infettare l'uomo (Herrera e Ostrosky-Wegman, 2011).

Sulla base di queste osservazioni, quindi, lo scopo del presente studio è stato quello di indagare se altre specie di trematodi parassiti siano coinvolte nei processi della trasformazione neoplastica. In particolare, come oggetto di tale indagine, è stato scelto il parassita *Dicrocoelium dendriticum*, un trematode molto diffuso nei ruminanti al pascolo, nonché in altre specie animali, uomo compreso e quindi agente di una zoonosi trasmessa attraverso gli alimenti (*food-borne*), ancora oggi sottovalutata e negletta (Cringoli e Rinaldi, 2014).

# **PARTE GENERALE**

## **Dicrocoeliosi**

La dicrocoeliosi è un'infezione parassitaria causata da diverse specie del genere *Dicrocoelium*, trematode digeneo, comunemente chiamato “distoma lanceolato” o “piccolo distoma epatico”, per differenziarlo da *Fasciola hepatica* genericamente denominato “distoma epatico”, causa della fasciolosi.

Le specie di maggiore importanza sono: *D. dendriticum* (Rudolphi, 1819), *D. hospes* (Looss, 1907), *D. chinensis* (Tang et al., 1983) e *D. suppereri* (Hinaidy, 1983). *D. dendriticum* è la specie che presenta il più ampio areale di distribuzione, con valori di prevalenza elevati in Europa, Asia, Nord Africa e Nord America (Otranto e Traversa, 2003). Da adulto, questo parassita si localizza a livello dei piccoli dotti biliari e nella cistifellea di ruminanti domestici (ovini, caprini, bovini, bufali) e ruminanti selvatici. Coniglio, suino, cane, cavallo, piccoli mammiferi esotici ed uomo sono ospiti occasionali (Cringoli e Rinaldi, 2014). La dicrocoeliosi è ancora oggi un'infezione parassitaria poco conosciuta e spesso sottovalutata da ricercatori, medici e medici veterinari, questo è dovuto sia alla presenza di infezioni multiple, che mascherano la sua patogenicità, sia alla difficoltà nella diagnosi (Otranto e Traversa, 2003). Tuttavia, l'importanza economica e sanitaria della dicrocoeliosi non è da sottovalutare; negli animali da reddito è dovuta sia alle perdite dirette causate dalla confisca del fegato parassitato (Jithendran e Bhat, 1996) che dalle perdite indirette dovute ai disturbi digestivi derivanti dalle alterazioni epatobiliari, quali diminuzione del peso dell'animale, ritardo di crescita, ridotta produzione di latte, di carne, etc. Inoltre, devono essere considerati anche i costi aggiuntivi dovuti alla somministrazione di farmaci antielmintici (Manga-Gonzalez et al., 2001).

La dicrocoeliosi può essere occasionalmente zoonotica (Jeadron et al., 2011); l'infezione umana consegue l'ingestione accidentale di formiche

contenenti le metacercarie infettanti; è anche frequente la presenza di infezioni spurie dopo ingestione di fegato crudo o poco cotto (contenente le uova di *D. dendriticum*) proveniente da erbivori parassitati (Cabeza Barrera et al., 2011).

Il ciclo biologico di *D. dendriticum* è piuttosto complesso; molluschi di terra e formiche sono ospiti intermedi del parassita; i ruminanti rappresentano i principali ospiti definitivi. Di conseguenza, l'epidemiologia di questa parassitosi è influenzata da numerosi fattori, quali biologia ed epidemiologia degli ospiti intermedi, fattori meteorologici (temperatura, umidità, etc.), fattori ambientali (uso del suolo, indici di vegetazione, etc.), presenza e diffusione di ruminanti domestici o selvatici (ospiti definitivi), nonché fattori legati al pascolo degli animali (Cringoli et al., 2002; Musella et al., 2011).

## ***Dicrocoelium dendriticum***

(dal greco *dicros*: doppio, *choilia*: cavità del ventre, *dentriticon*: ramificato)

### **Tassonomia**

<b>PHYLUM</b>	PLATHELMINTHES
<b>CLASSE</b>	TREMATODA
<b>SOTTOCLASSE</b>	DIGENEA
<b>ORDINE</b>	PLAGIORCHIIDA
<b>FAMIGLIA</b>	DICROCOELIIDAE

Questo parassita da adulto vive nei dotti biliari di ovini, caprini, bovini, ruminanti selvatici, suini, conigli, piccoli mammiferi esotici ed occasionalmente uomo.

### **Morfologia**

*D. dendriticum* presenta corpo appiattito di forma lanceolata (detto anche *D. lanceolatum*), lungo 4-12 mm e largo 1,5-2,5 mm, con cuticola liscia (priva di spine) e trasparente che lascia intravedere gli organi interni.

Uno studio eseguito da Campo et al. (1998) per la caratterizzazione su base isoenzimatica (lattato deidrogenasi - LDH, glucosio fosfatasi isomerasi - GPI, fosfoglucomutasi - PGM, acido fosfatasi - AcP, alpha-glicerofosfatasi

deidrogenasi - alpha-GPDH, idrossibutirato deidrogenasi – HBDH e malato deidrogenasi - MDH), su 3.131 esemplari adulti di *D. dendriticum* isolati da bovini, ovini e caprini ha evidenziato una scarsa variazione tra gli elminti isolati da un unico ospite, da una singola specie e da specie differenti. Sebbene, tutti i campioni provenivano da una piccola area del nord ovest della Spagna, i risultati sembrerebbero evidenziare l'assenza di variazioni fenotipiche tra gli esemplari di *D. dendriticum*, anche se ulteriori studi genomici dovrebbero essere effettuati per valutare le differenze intraspecifiche.



*Dicrocoelium dendriticum*

Come tutti i distomi è munito di due ventose, una anteriore di 300-400  $\mu\text{m}$  di diametro, che dà inizio all'apparato digerente ed una posteriore, definita *acetabulum*, di 500-600  $\mu\text{m}$  di diametro, localizzata in posizione preequatoriale, che funge da organo di adesione.

L'apparato digerente comincia con la cavità orale che si trova sul fondo della ventosa anteriore; fanno seguito il faringe, un corto esofago ed un intestino costituito da due ciechi semplici e sinuosi, di lunghezza variabile, disposti nei campi laterali del corpo.

Mancano sia l'apparato respiratorio sia l'apparato circolatorio.

L'apparato escretore è composto da numerosi canalicoli confluenti in una vescichetta tubulare che comunica con l'esterno attraverso un poro escretore situato nella parte dorsale del corpo.

*D. dendriticum*, come tutti i trematodi, è ermafrodita.

L'apparato genitale maschile è costituito da due grossi testicoli lobati posti dietro la ventosa acetabolare, seguiti da deferenti, vescichette seminali e cirro.

L'apparato genitale femminile è costituito da ovario impari (tondeggiante e posteriore ai testicoli), ovidutto, ghiandola del Mehlis, utero, vagina, atrio genitale, infundibolo e poro genitale. L'utero occupa la parte posteriore del corpo e sbocca nell'atrio genitale, ventralmente al dotto maschile.

I vitellogeni occupano i campi laterali del corpo.

Le uova sono di colore bruno e presentano dimensioni di 38-45  $\mu\text{m}$  di lunghezza per 22-30  $\mu\text{m}$  di larghezza. Esse hanno la forma di un'ellissi irregolare, presentano un guscio spesso ed un opercolo poco distinguibile.

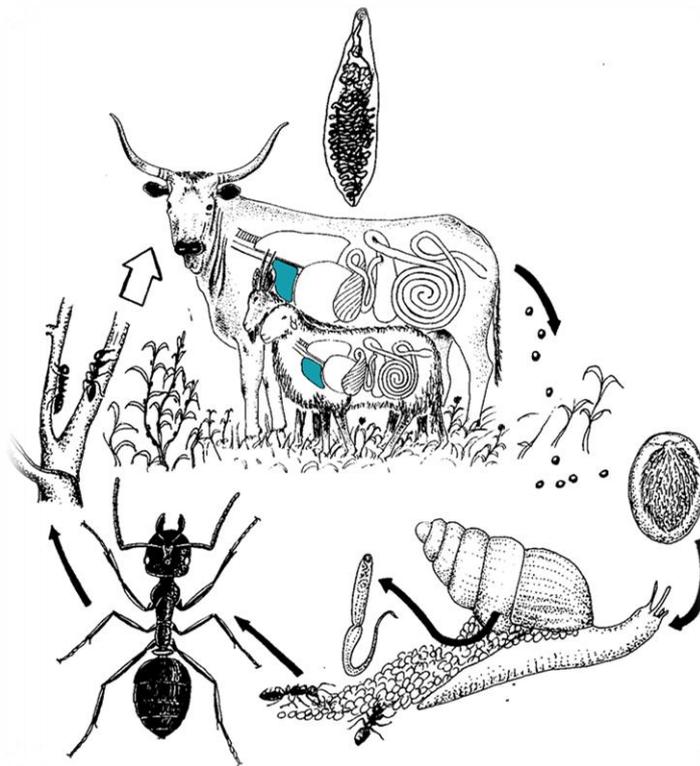
Quando vengono espulse con le feci dagli animali parassitati, esse contengono un embrione già formato.



Uovo di *Dicrocoelium dendriticum*

## Ciclo biologico

Per la sua complessità, il ciclo biologico di *D. dendriticum* non è stato completamente chiarito per oltre un secolo dalla prima descrizione morfologica del parassita (Rudolphi, 1819; Krull e Mapes, 1952). Il ciclo è indiretto, ha la durata di circa sei mesi e necessita di due ospiti intermedi: il primo è rappresentato da molluschi gasteropodi pulmonati terricoli appartenenti a diversi generi (*Helicella*, *Zebrina*, *Abida*, etc.), il secondo da formiche di varie specie (*Formica fusca*, *F. rufa*, *F. rufibarbis*, *F. pratensis*, etc.). I ruminanti rappresentano i principali ospiti definitivi.



Ciclo biologico di *Dicrocoelium dendriticum*

Per molti anni i molluschi sono stati considerati gli unici ospiti intermedi e questa ipotesi fu sostenuta da alcuni autori (Mattes, 1936; Neuhaus, 1936). Krull e Mapes (1952) dimostrarono il ruolo di *Formica* spp. come secondo ospite intermedio, successivamente numerose ricerche hanno confermato questo dato ed una ampia bibliografia è ora disponibile a riguardo (Hohorst e Lammler, 1962).

Nei dotti biliari dell'ospite definitivo i parassiti adulti depongono le uova che raggiungono l'intestino con la bile per poi essere eliminate con le feci dagli animali parassitati. Esse contengono già un *miracidium* e sono dotate di notevolissima resistenza sia alle basse temperature che alla disidratazione.

Il primo ospite intermedio, rappresentato da molluschi gasteropodi polmonati terricoli appartenenti a diversi generi (*Helicella*, *Zebrina*, *Ciochlicella*, *Abida*, etc), normalmente vive sui pascoli secchi ed è caratterizzato da una spiccata coprofilia (Ambrosi, 1995); i molluschi ingeriscono le uova che si schiudono nella loro cavità viscerale con la liberazione del primo stadio larvale, il *miracidium*. Esso presenta dimensioni di 45-50  $\mu\text{m}$  di lunghezza per 40-43  $\mu\text{m}$  di larghezza, forma ovalare, è ricoperto da una cuticola liscia e trasparente ed è provvisto di ciglia (Fasanella e Giangaspero, 1992).

In seguito, il *miracidium* migra sino all'epatopancreas del gasteropode, dove dà luogo a sporocisti di prima e seconda generazione. Queste ultime, a sviluppo completo, presentano corpo sacciforme (3 mm di lunghezza x 550-650  $\mu\text{m}$  di larghezza), pareti sottili e sono ripiene di numerose cellule germinali.

Ciascun mollusco può contenere fino a 300 sporocisti (Casarosa, 1980).

Dalle cellule germinali delle sporocisti di II generazione si formano numerose (fino a 40-60) cercarie (manca lo stadio di redia, presente in altri trematodi) che, a sviluppo completo, sono lunghe 190  $\mu\text{m}$ , larghe 115  $\mu\text{m}$  e

presentano strutture anatomiche caratteristiche: la ventosa ventrale, la ventosa orale (di 60  $\mu\text{m}$  e 43  $\mu\text{m}$  di diametro, rispettivamente) e la coda (Fasanella e Giangaspero, 1992).



I ospite intermedio di *D. dendriticum*: gasteropodi polmonati terricoli

Le cercarie completamente sviluppate, definite anche “cercarie vitrine” sono dotate di notevole mobilità, per cui migrano attivamente verso la camera polmonare del mollusco. Tale migrazione è favorita dalla presenza di uno stiletto, localizzato superiormente alla ventosa orale, dalla produzione di enzimi secreti dalle ghiandole cefaliche e dai movimenti della coda.

Nella camera polmonare del gasteropode, le cercarie si aggregano in grappoli, costituiti da 200-300 esemplari, tenuti assieme da una sostanza gelatinosa. Successivamente, questi boli di muco, definiti “*slime balls*”, vengono espulsi dal mollusco; in questo muco le cercarie sono in grado di

resistere sul pascolo anche per diverse settimane. L'espulsione è favorita da un abbassamento della temperatura (Restani e Pietrobelli, 1997) e da un aumento dell'umidità. Le “*slime balls*” contenenti le cercarie aderiscono agli steli d'erba e rappresentano un “ghiotto” pasto per il secondo ospite intermedio rappresentato da formiche di varie specie (*Formica fusca*, *F. rufa*, *F. rufibarbis*, *F. pratensis*, etc.). Nel tubo digerente di queste ultime, le cercarie si liberano dal muco, attraversano la parete dello stomaco e raggiungono il torace e la testa, dove, in circa 30-60 giorni, perdono la coda e si trasformano in metacercarie, lunghe 325-465  $\mu\text{m}$  e larghe 135-250  $\mu\text{m}$ . Una o più metacercarie si localizzano a livello del ganglio retrofaringeo della formica dal quale partono i nervi motori della bocca.



Il ospite intermedio di *D. dendriticum*: formiche di varie specie

Questa particolare localizzazione della metacercaria (definita anche “*brain worm*” o “verme del cervello”) determina un'anormale eccitazione dei

muscoli mandibolari e mascellari che presentano un vero e proprio spasmo (trisma mandibolare), particolarmente apprezzabile nelle ore più fresche della giornata (mattino e sera). Il trisma mandibolare determina una vera e propria paralisi della formica che rimane fissata sui fili d'erba con mandibole e mascelle contratte.

Questo fenomeno favorisce l'ingestione della formica (*plant-topping*), contenente le metacercarie, da parte dell'ospite definitivo che così si infesta. Nell'intestino dell'ospite definitivo, per azione dei succhi digestivi, le metacercarie si disincistano liberando le forme giovanili, che raggiungono i dotti biliari dove sviluppano a parassiti adulti. Secondo alcuni autori la migrazione dei giovani dicrocoeli dall'intestino ai dotti biliari avviene principalmente a ritroso attraverso il coledoco; altri, invece, ritengono che tale migrazione possa avvenire anche per via ematica (vena porta) e parenchimale, analogamente a quanto si verifica per *F. hepatica* (Restani e Pietrobelli, 1997). Il periodo di prepatenza, tempo che intercorre dal momento in cui l'animale si infesta ingerendo le metacercarie alla formazione dei parassiti adulti in grado di deporre le uova, è di 60-90 giorni (Restani e Pietrobelli, 1997).

### **Epidemiologia della Dicrocoeliosi**

La Dicrocoeliosi è una infezione parassitaria diffusa in tutto il mondo, sia sui pascoli di pianura sia su quelli di montagna, dove vi sono le condizioni adatte per la sopravvivenza e lo sviluppo degli ospiti intermedi (lumache e formiche) (Eckert e Hertzberg, 1994). Questa distomatosi è stata descritta nelle pecore e nelle capre, meno frequentemente, nei bovini e nei bufali. La dicrocoeliosi nei piccoli ruminanti è comune nei greggi di pecore con una prevalenza anche del 100% in molti paesi europei e dell'est (Manga-Gonzàles et al., 1991).

*D. dendriticum* può parassitare anche ruminanti selvatici come camelidi (lama ed alpaca) in sud America (Wenker et al., 1998; Gunsser et al., 1999) e yak (Somvanshi e Kaul, 1989).

In Italia *D. dendriticum* è uno degli elminti più diffusi negli allevamenti dei ruminanti.



Ovini: Principali ospiti definitivi di *D. dendriticum*

Dalle indagini eseguite nel corso degli anni da vari ricercatori, sono emersi valori di prevalenza estremamente elevati negli allevamenti ovini, pari al 100% in Emilia Romagna (Pavoncelli e Tampieri, 1978), 74% in Toscana, 66-99% in Umbria, 66-91% nelle Marche, 82% in Abruzzo, 25-57% in Puglia, 21-53% in Sardegna, 50% in Sicilia (Ambrosi, 1995).

Anche da ricerche condotte dall' Unità di Parassitologia e Malattie Parassitarie del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" in numerosi allevamenti ovini del centro-sud Italia, sono emersi alti valori di prevalenza aziendale: 67,5% in un'area appenninica a cavallo di tre regioni (Campania, Puglia e Basilicata), (Cringoli et al., 2002), 48% in Calabria (province di Catanzaro,

Cosenza e Crotone) (Veneziano et al., 1998), 61,2% in Basilicata (Bosco et al., 2011; Cringoli, 2012a) e 57,7% nel Lazio (provincia di Latina) (Cringoli, 2003).

Nei bovini allevati in Italia *D. dendriticum* è risultato presente con valori di prevalenza aziendali di circa il 7% negli allevamenti del Lazio (Ambrosi, 1981), 50% in allevamenti della Basilicata (Cringoli, 2012a), 25% in allevamenti della provincia di Bologna (Martini et al., 1986), 15% in allevamenti della provincia di Firenze (Battelli et al., 1987), 6,5% in allevamenti del Friuli Venezia Giulia (Pietrobelli et al., 1988), 17,7% in allevamenti della provincia di Genova (Poglayen et al., 1989), 31,1% in allevamenti della Sardegna (Scala et al., 1995). Un recente lavoro di Sanna et al. (2012) ha evidenziato una prevalenza di *D. dendriticum*, in allevamenti bovini della Sardegna, pari all'11,1%, sottolineando un notevole decremento rispetto al periodo 1994-95.



Bovino: ospite definitivo di *D. dendriticum*

In Molise, in allevamenti bovini della provincia di Campobasso, sono stati evidenziati valori di prevalenza aziendali pari al 20% (Cringoli et al., 1992). Analoghi risultati sono stati riscontrati in Campania con il 19% degli allevamenti risultati positivi in alta Irpinia (Cringoli et al., 1993). *D.*

*dendriticum* è risultato estremamente diffuso negli allevamenti di bovini al pascolo in un'area appenninica a cavallo di tre regioni (Campania, Puglia e Basilicata), con una prevalenza aziendale del 53,1% (Cringoli et al., 2002). Da notare l'alta prevalenza (80%) di questo distoma in bovini di razza podolica allevati in Puglia (promontorio del Gargano) (Puccini e Urbano, 1982). Alti valori di prevalenza aziendale sono stati riportati nelle Marche 77-93% ed in Umbria 54,5% (Ambrosi et al., 1986; Ambrosini et al., 1994).

*D. dendriticum* è risultato invece scarsamente presente (prevalenze aziendali del 2,3%) in un'indagine condotta in allevamenti bufalini nel basso Lazio (Condoleo et al., 2005) e completamente assente in una analoga ricerca condotta in Campania (provincia di Caserta) da Cringoli et al. (1995).

Negli ultimi 50 anni l'epidemiologia della dicrocoeliosi è stata ampiamente studiata per meglio analizzare i fattori che influiscono la diffusione di parassitosi, in particolare:

- i fattori ambientali;
- la presenza e l'etologia degli ospiti intermedi;
- la presenza dei ruminanti domestici e selvatici.

### **Fattori ambientali**

La presenza di *D. dendriticum* sembra essere associata ai terreni calcarei o alcalini dove vi sono biotipi favorevoli per la riproduzione e la sopravvivenza degli ospiti intermedi (Chartier e Reche, 1992). La dispersione delle uova e la contaminazione dei pascoli può essere causata dai ruminanti domestici e selvatici ma anche da conigli e lepri (Boray, 1985).

Le uova, eliminate con le feci, sono molto resistenti nell'ambiente alle variazioni di temperatura e possono superare la stagione invernale rimanendo infettanti sui pascoli anche per venti mesi. In condizioni di campo è stato dimostrato che la sopravvivenza delle uova non dipende dall'età delle stesse ma è un fenomeno legato alle stagioni (85% in inverno e valori minimi in estate) e non c'è nessuna relazione tra l'infettività delle uova e la loro età (Alunda e Rojo-Vázquez, 1983).

Negli ovini la dinamica di eliminazione delle uova nelle feci è associata alla stagione, con un picco di eliminazione durante l'inverno (90,5% di positività degli animali e numero medio di uova per grammo (upg) di feci pari a  $323,4 \pm 18,5$  upg).

Questo fenomeno è legato al momento dell'infezione dei ruminanti con le formiche, che avviene circa due mesi prima, prevalentemente a fine primavera - inizio dell'autunno (Manga-González et al., 1991).

### **Fattori legati agli ospiti intermedi**

In generale, diversamente da *F. hepatica*, gli ospiti intermedi di *D. dendriticum* non richiedono un ambiente umido e sono ampiamente presenti sui pascoli (Manga-González et al., 1991). Numerosi studi hanno dimostrato che più di 90 specie di molluschi possono fungere da ospiti intermedi di *D. dendriticum*; alcune specie, come ad esempio *Cochlicopa lubrica* sono presenti in tutto il mondo, mentre altre hanno una distribuzione limitata (*Helicella corderoi* in Spagna, *Zebrina hohenackeri* in Caucaso, *Helicella obvia* in Germania, *Cernella virgata* in Italia) (Fasanella et al., 1995).

In Germania, Schuster (1993) ha studiato il tasso di infestazione da elementi evolutivi di *D. dendriticum* nel mollusco *H. obvia* nel corso di

quattro stagioni di pascolo. La popolazione di lumache ha mostrato numerosi cambiamenti, con lumache di piccole dimensioni (diametro del guscio di 3-6 mm) da aprile a giugno, lumache di dimensioni medie (diametro del guscio di 9-10 mm) da luglio a settembre, lumache più grandi (diametro del guscio di 13-15 mm) nella primavera dell'anno seguente. Sono stati anche documentati due periodi di copula ed ovodeposizione (aprile-maggio e settembre-ottobre). Da questo studio è emerso che il tasso di infezione dei molluschi parassitati da sporocisti di *D. dendriticum* è direttamente proporzionale alla loro età e quindi alle loro dimensioni, anche perché le sporocisti trovano migliori condizioni metaboliche per il loro sviluppo nei molluschi adulti. La comparazione tra il tasso di infezione e l'età delle lumache ha evidenziato che le lumache giovani nel corso del primo anno sono meno coinvolte nell'epidemiologia della microcoeliosi (tasso di infezione = 3,77%) rispetto alle lumache di diametro medio (tasso di infezione = 34,77%), specialmente nell'estate del secondo anno. Di contro, la diminuzione del tasso di infezione nel corso dell'estate del secondo anno si può spiegare a causa della morte delle lumache con un numero troppo elevato di sporocisti che determinano la distruzione dell'epatopancreas del mollusco (importante per l'accumulo del glicogeno) e conseguentemente l'alterazione dell'attività riproduttiva e la riduzione della durata di vita delle lumache (Schuster, 1992). Gli effetti negativi della sporocisti di *D. dendriticum* sul primo ospite intermedio sono stati ampiamente confermati anche in studi con infezioni sperimentali di *Ceratomyxa (Xeromyxa) cespitum arigonis* e *C. virgata*, nelle quali le alterazioni istopatologiche (vacuolizzazione del citoplasma), furono osservate tre mesi post- infezione (Gomez et al., 1996). Sulla base delle ricerche condotte da Schuster, lo sviluppo delle sporocisti di prima e seconda generazione richiede circa 2 anni e la maturazione delle sporocisti segue il ciclo vitale della lumaca e diventa più attivo in primavera rispetto

all'estate e all'autunno. Nei luoghi dove gli animali pascolano durante tutto l'anno, si trovano molluschi infetti in quasi tutti i mesi. Nell'insieme, tutti i molluschi trovati infetti dall'inizio dell'anno sino alla fine della primavera sono stati infettati precedentemente, anche se in tempi diversi a seconda del grado di sviluppo del parassita. I molluschi che hanno ospitato sporocisti scarsamente sviluppate dalla fine dell'estate al mese di dicembre sono stati infettati in primavera o all'inizio dell'estate. Diversamente, quelli contenenti le cercarie ben sviluppate nello stesso periodo sono stati infettati all'inizio della primavera o addirittura l'anno precedente (Schuster et al., 1992).

Varie specie di formiche agiscono come secondo ospite intermedio di *D. dendriticum*. Studi condotti in Spagna, hanno evidenziato che il numero di metacercarie per formica varia tra le diverse specie. In particolare, *F. pratensis* e *F. rufibarbis* sono state ritrovate con un numero medio di metacercarie pari a 76 (da 2 a 313) e 38 (da 2 a 127), rispettivamente (Schuster, 1991). Il numero di metacercarie all'interno della stessa specie può variare a causa di una differente affinità per le "slime balls" e per il tipo di vegetazione presente. Il numero di metacercarie è proporzionale allo spazio disponibile in addome, le stesse possono rimanerci per più di un anno, senza compromettere la loro sopravvivenza. La lunga permanenza delle metacercarie nelle formiche in letargo svolge un importante ruolo nell'epidemiologia della dicroceliosi. Infatti, considerando un periodo di letargo da metà ottobre a febbraio, le prime formiche parassitate saranno presenti al pascolo a partire dal mese di marzo. Il numero delle formiche infette aumenterà in base alla dinamica dell'infezione del mollusco. I cambiamenti comportamentali delle formiche infettate, a causa del parassita presente a livello del ganglio subesofageo, sono regolati dalla fluttuazione della temperatura ambientale (Piergili Fioretti, 2012). Il blocco delle formiche sugli steli d'erba è di particolare importanza da un punto di vista biologico; è stato visto che le cercarie incistate a livello del ganglio

subesofageo si comportano da “altruiste” perché “sacrificano” se stesse per favorire il completamento del ciclo biologico attraverso l’ingestione della formica da parte dell’ospite definitivo (Otranto e Traversa, 2003).

### **Fattori legati agli ospiti definitivi (ovini, caprini e bovini)**

Nonostante non siano state riscontrate differenze statisticamente significative, in termini di carica infestante (elminti a livello epatico) e di uova per grammo di feci (upg), le pecore sembrano essere più suscettibili a *D. dendriticum* rispetto alle capre (Jithendran e Bhat, 1996). Ricerche condotte negli ovini e nei bovini hanno messo in evidenza dati contrastanti rispetto alla correlazione con l’età degli animali, la sensibilità all’infezione e l’eliminazione delle uova. Alcuni autori hanno riscontrato una media di upg più elevata ( $367,6 \pm 50,9$ ) negli agnelli rispetto alle pecore adulte (Manga-González et al., 1991) ed anche nei bovini fino a 2 anni di età rispetto agli animali più vecchi, con una lieve e graduale diminuzione delle upg con l’aumentare dell’età dell’ospite. Di contro, Ducommun e Pfister (1991) hanno evidenziato un aumento di bovini positivi a *D. dendriticum* con l’aumentare dell’età, con una prevalenza del 24,2% nei soggetti al di sotto dei 18 mesi e superiore al 70% negli animali di oltre 6 anni. Questi risultati possono indicare che l’età degli animali infetti potrebbe influenzare l’eliminazione delle uova, sebbene ulteriori studi siano necessari su tale argomento. Recentemente, la diretta correlazione tra la dose infettante di metacercarie con la presenza di elminti adulti a livello epatico e l’eliminazione delle uova è stata valutata con esami necroscopici e coprologici in 2 gruppi di agnelli sperimentalmente infettati con differenti dosi di metacercarie: 1000 e 3000. L’eliminazione delle uova, che è iniziata circa 2 mesi dopo l’infezione, è risultata essere più elevata negli agnelli infettati con 3000 metacercarie ( $347,2 \pm 42,4$  upg), rispetto a quelli

infettati con 1000 metacercarie ( $194,8 \pm 14,4$  upg); il numero medio di parassiti isolati agli esami necroscopici (a 120-180 gg post infezione) dal primo gruppo (infettato con 3000 metacercarie) è risultato più elevato ( $489,3 \pm 163,1$ ) rispetto al secondo gruppo ( $215,7 \pm 41,4$ ) infettato con 1000 metacercarie (Campo et al., 2000).

Anche il fattore sesso è stato considerato nel valutare la sensibilità degli animali all' infezione da *D. dendriticum* (Asanji e Williams, 1984). Gli esami necroscopici effettuati su 2033 fegati di bovini, naturalmente infettati, hanno rilevato una prevalenza dell' infezione del 62,5% nelle femmine e 9,8% nei maschi. Il valore estremamente più elevato nelle femmine potrebbe essere correlato al fatto che le manze e le vacche pascolano per diverse stagioni, contraendo l' infezione, mentre i maschi trascorrono lunghi periodi in stalla e nelle unità d' ingrasso (Ducommun e Pfister, 1991). Un ulteriore fattore condizionante l' epidemiologia della dicrocoeliosi è la transumanza, non solo perché motivo di stress per gli animali, ma anche perché molte specie di ospiti intermedi di *D. dendriticum* (in particolare *H. obvia*, *C. lubrica* e *F. pratensis*) vivono anche in pascoli di montagna ad altezze superiori ai 2000 m s.l.m. Analogamente, quando le pecore e le capre si spostano dai pascoli di pianura a quelli di montagna presentano maggiori probabilità di infestarsi (Eckert e Hertzberg, 1994).

### **Patogenesi, lesioni e risposta immunitaria**

E' difficile determinare con chiarezza gli effetti patogeni della dicrocoeliosi, in quanto risulta difficoltoso riprodurre infezioni sperimentali. Inoltre, le ricerche di campo non forniscono indicazioni precise ed accurate, in quanto condotte su animali naturalmente infettati e quindi sempre parassitati oltre che da *D. dendriticum* anche da altri

parassiti come nematodi gastrointestinali, nematodi broncopolmonari, altri distomi e coccidi. Tutti questi parassiti possono determinare sintomatologia simile a quella associata a *D. dendriticum*. Sono stati condotti vari studi sulle perdite di importanti componenti ematiche (come ad esempio le proteine plasmatiche), causate da parte dei nematodi gastrointestinali e dei distomi epatici. Tali ricerche sono state effettuate con l'utilizzo dei radioisotopi per valutare i patterns patofisiologici negli animali naturalmente infetti da *D. dendriticum* (Dargie, 1975). Dopo aver inoculato nelle pecore eritrociti marcati con  $^{51}\text{Cr}$  e  $^{59}\text{Fe}$ -citrato e albumina marcata con  $^{125}\text{I}$ , non è stata notata alcuna riduzione statisticamente significativa nella emivita degli eritrociti e delle albumine (Theodoridis et al., 1991). Questo ha permesso di evidenziare che ovini parassitati da oltre 4000 esemplari di *D. dendriticum* non presentano una significativa perdita di proteine nel sangue e nel plasma e che l'alterazione di questi parametri registrati nel corso di infezioni naturali sostenute da *F. hepatica* ed *Haemoncus contortus* confermano la maggiore patogenicità di questi due elminti (Holmes et al., 1968; Dargie e Allonby, 1975). In riferimento all'azione patogena delle forme giovanili di *D. dendriticum*, queste migrano direttamente risalendo il coledoco senza attraversare le pareti dell'intestino, la capsula di Glisson ed il parenchima epatico (come invece avviene per le adolescenti di *F. hepatica*). I sintomi clinici, quindi, non sono solitamente manifesti, anche nelle infezioni gravi, e quindi lesioni maggiori dovute alla disfunzione epatica sono evidenziabili solo a seguito di esami necroscopici. Anche se sono descritti in letteratura casi di dicrocoeliosi iperacuta derivanti da infestioni massive, con sintomi sovrapponibili a quelli descritti per *F. hepatica*, di solito la malattia presenta decorso subclinico, lento, con sintomi poco caratteristici: astenia, dimagrimento, anemia ed episodi diarroici. Nei soggetti colpiti possono manifestarsi edemi nelle parti più declivi del corpo, caduta della lana e

grave scadimento delle condizioni generali. Molto raramente si possono verificare casi di aborto (Puccini, 1992). Nel corso di infezioni croniche possono verificarsi cirrosi, severa fibrosi epatica e marcata distensione dei dotti biliari. Per la presenza di stiletti a livello della ventosa orale, *D. dendriticum* irrita la superficie dei dotti biliari causando proliferazione e cambiamenti nell'architettura dei lobuli epatici (Camara et al., 1996). Gli stessi autori hanno osservato una correlazione diretta tra il numero di elminti adulti presenti a livello epatico e uno *score* di lesioni macroscopiche:

1. fegato normale;
2. fegato marcatamente disteso e dotti ingranditi;
3. fegato sclerotico con lesioni evidenti;
4. fegato con grave fibrosi ed elevata carica di elminti.

Camara et al., (1996), inoltre, hanno riscontrato che le lesioni della superficie epatica, dei dotti biliari e la presenza di lesioni fibrotiche del fegato tendono ad aumentare con l'aumentare del livello di infezione, fino a 300 esemplari di *D. dendriticum*; mentre al di sopra di questo valore, fino a 600 parassiti, si riscontra una riduzione delle lesioni probabilmente dovuta dalla reazione immunitaria dell'ospite. In riferimento alle lesioni istopatologiche, in criceti sperimentalmente infettati da *D. dendriticum* sono state riscontrate proliferazione dei dotti biliari, infiltrazione di linfociti, macrofagi ed eosinofili nel sistema portale, infiltrazioni di collagene a livello dei setti interlobulari causa di atrofia epatica (Sanchez-Campos et al., 2000).



*D. dendriticum* – fegato ovino con lesioni

L'inflammatione cronica può essere collegata alle alterazioni ossidative. In particolare, la capacità di difesa antiossidante del fegato in criceti sperimentalmente infettati da metacercarie di *D. dendriticum* aumentò dopo 80-120 giorni post infezione. Nel frattempo, fu riscontrata una diminuzione dell'attività superossido-dismutasi (SOD) nei mitocondri che era indice di un' inefficiente espulsione dell'ossigeno, determinando un danno ossidativo del fegato ed un aumento dell'attività dell'alanina transaminasi (ALT) ed aspartato transaminasi (AST) (Sanchez-Campos et al., 2000).

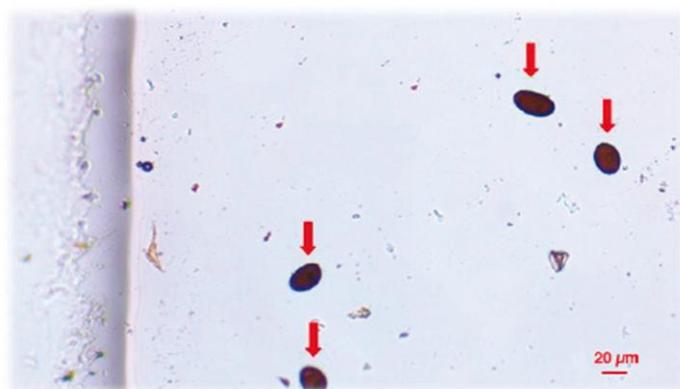
Per quanto riguarda la risposta immunitaria all'infezione da *D. dendriticum*, sulla scorta di studi condotti sui bovini e su ratti (infettati sperimentalmente) circa l'aumento di anticorpi anti-*F. hepatica* a livello della bile e della mucosa intestinale, Wedrychowicz et al. (1984) hanno studiato il ruolo degli antigeni somatici di *D. dendriticum* nella risposta anticorpale locale (bile). Una risposta anticorpale con IgG e IgA altamente specifica verso antigeni solubili TBS (tris-buffered saline), SDS (sodium dodecyl sulphate) e 2-Me (2-mercaptoethanol) è stata riscontrata nella bile di bovini naturalmente infettati da *D. dendriticum* che presentavano valori più elevati di IgAs per la stimolazione di antigeni somatici. Il ruolo

protettivo della risposta immunitaria locale ed il significato biologico delle IgA presenti nella bile richiedono studi ulteriori, sebbene sembra che le IgAs inducano inibizione della aderenza e della penetrazione del parassita nella superficie mucosale ed interferiscano con la crescita, la riproduzione e la produzione enzimatica di *D. dendriticum*. Sebbene i livelli anticorpali non sono correlati con la protezione immunitaria dell'ospite verso *D. dendriticum*, la loro presenza è estremamente importante per una rapida immunodiagnosi.

## Diagnosi

Dal punto di vista clinico, la diagnosi della dicrocoeliosi risulta estremamente difficile, per l'assenza di sintomi patognomonic. La diagnosi ante-mortem della parassitosi si basa su esami copromicroscopici che consentono la messa in evidenza delle uova nelle feci degli animali parassitati.

Gli esami copromicroscopici risultano le tecniche più utilizzate per la diagnosi di questa come di molte altre malattie ad eziologia parassitaria; questi esami permettono di rivelare la presenza di uova di piccole dimensioni, di colore giallo-marrone con pareti spesse con all'interno il miracidio.



Uova di *Dicrocoelium dendriticum*

La diagnosi copromicroscopica viene eseguita utilizzando metodiche di arricchimento, quali la sedimentazione e la flottazione, che permettono di concentrare le uova presenti nelle feci.

Diversamente da quanto si osserva in merito alla diagnosi della fasciolosi e della paramfistomosi la tecnica di sedimentazione non è così valida per la ricerca delle uova di *D. dendriticum*. Rehbein et al. (1999) hanno dimostrato che la tecnica di sedimentazione ha una percentuale di conta delle uova di *D. dendriticum* molto bassa ( $42,2 \pm 1,5\%$ ) se paragonata alle tecniche di flottazione.

Per la flottazione delle uova “pesanti” di *D. dendriticum* è necessario utilizzare soluzioni ad alto peso specifico (p.s.), non inferiore a 1.350.

In uno studio condotto da Rehbein et al. (1999) 3 diverse soluzioni ad alto p.s.:  $ZnSO_4$  (p.s.=1.300-1.450);  $K_2CO_3$  (p.s.=1.450) e  $HgI_2/KI$  (p.s.=1.440), sono state comparate con il metodo McMaster per la Faecal Egg Count (FEC) in feci di pecore. La soluzione  $HgI_2/KI$  ha determinato la percentuale più elevata di conta delle uova dalle feci ( $91,2 \pm 9,4\%$ ), non è stata riscontrata alcuna influenza statisticamente significativa del tempo di flottazione sulla conta delle uova. Cringoli et al. (2004) hanno effettuato una disamina sul metodo McMaster. Allo scopo hanno stimato le upg di strongili gastrointestinali e *D. dendriticum* in feci di ovini al pascolo naturalmente infestati. Per lo studio sono state utilizzate 14 soluzioni flottanti (con p.s. variabile tra 1.200 e 1.450), 6 livelli di diluizione del campione (1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50) e 4 livelli di lettura del vetrino McMaster (McM 0,15 ml, McM 0,3 ml, McM 0,5 ml, McM 1,0 ml). Dallo studio è emerso che la soluzione flottante, la diluizione del campione ed il livello di lettura del vetrino influenzano i risultati. In particolare, soluzioni ad uguale peso specifico hanno dimostrato una diversa capacità flottante. La jodomercurato di potassio (p.s. = 1.440) si è

rilevata la soluzione più efficiente per la flottazione delle uova di *D. dendriticum*, confermando i risultati ottenuti da Rehbein et al. (1999).

La affidabilità della tecnica McMaster è risultata alta alle diluizioni 1:10 e 1:15, per poi decrescere progressivamente all'aumentare della diluizione. In riferimento ai livelli di lettura del vetrino, la migliore affidabilità della tecnica si è espressa leggendo tutto il vetrino (McM 1,0 ml); le letture del singolo reticolo (McM 0,15 ml), del doppio reticolo (McM 0,3 ml) e della singola camera (McM 0,5 ml) oltre ad una scarsa ripetibilità, hanno evidenziato una tendenza alla sovrastima delle upg di *D. dendriticum*.

Recentemente, sono state messe appunto, dall'Unità di Parassitologia e Malattie Parassitarie del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali dell'Università degli studi di Napoli Federico II, nuove tecniche copromicroscopiche quantitative multivalenti altamente sensibili ed accurate, le tecniche FLOTAC (Cringoli et al., 2010).

Queste tecniche, basate sulla flottazione in centrifuga e successiva traslazione della porzione apicale della sospensione, consentono la messa in evidenza e la conta diretta degli elementi parassitari (EP = uova, larve, oocisti e cisti) presenti in 0,5 – 1 g di feci.

Le tecniche FLOTAC sono state ideate per ottenere una diagnosi più accurata, nella quale la quantità di elementi individuati rispecchi quanto più possibile la reale carica infestante. Tali tecniche presentano un ampio spettro diagnostico sia in campo veterinario che umano, consentendo la diagnosi contemporanea di protozoi che eliminano oocisti e cisti e di elminti che eliminano uova e larve. Inoltre, prevedono la flottazione in centrifuga e la successiva traslazione, con la quale gli elementi parassitari presenti nella porzione apicale della sospensione fecale, dopo flottazione appunto, vengono “traslati” senza alzare il vetrino. In questo modo tutti gli elementi parassitari presenti nel campione saranno evidenziabili.

Il FLOTAC comprende diversi componenti ed accessori: le componenti principali sono la base, il disco di traslazione e il disco di lettura. Gli accessori sono l'adattatore per centrifuga e per microscopio, il fondo, la chiave e la vite.

Queste tecniche sono state validate per la diagnosi di *D. dendriticum* sia in ambito medico che medico veterinario. In particolare, tali tecniche si sono dimostrate più sensibili del Kato-Katz (tecnica suggerita dalla WHO per diagnosi degli elminti in ambito umano) in uno studio effettuato in Kirgizstan da Jeadron et al. (2010). Inoltre, le tecniche FLOTAC sono risultate più sensibili, rispetto alle tecniche della flottazione semplice e del McMaster, nell'individuare le uova di *D. dendriticum* in allevamenti ovini (Rinaldi et al., 2011).



FLOTAC al microscopio

Una variante delle tecniche FLOTAC, sono le tecniche Mini-FLOTAC (Cringoli et al., 2013).

Queste sono state sviluppate per facilitare la diagnosi “di campo”, poiché non è previsto lo step della centrifugazione. Questo risulta particolarmente

importante in situazioni, quali ad esempio in campo o nei Paesi in via di sviluppo, dove non è possibile effettuare la centrifugazione.

Il Mini-FLOTAC si compone di: una base, un disco di lettura ed una chiave. E' raccomandabile utilizzare il Mini-FLOTAC in associazione con il Fill-FLOTAC, un kit per la raccolta e lavorazione delle feci, prima del riempimento del Mini-FLOTAC. Il Fill-FLOTAC è composto da un contenitore, un collettore ed un filtro e permette di effettuare gli steps della lavorazione del campione direttamente al suo interno. Questo ha due vantaggi: rende la preparazione del campione più veloce ed evita il contatto dell'operatore con il materiale biologico.

Cringoli et al. (2012b) hanno effettuato prove di comparazione tra le diverse tecniche copromicroscopiche per la validazione del Mini-FLOTAC in ambito veterinario. In particolare la tecnica Mini-FLOTAC è risultata più sensibile del McMaster, della flottazione semplice e della flottazione in centrifuga per la messa in evidenza delle uova di *D. dendriticum*.



Componenti della famiglia “FLOTAC”

La diagnosi post-mortem su *D. dendriticum* si basa su esami anatomo-patologici con la messa in evidenza delle lesioni e dei parassiti a livello epatico.



Esame necroscopico con la messa in evidenza di *D. dendriticum* a livello epatico

Dalla comparazione dei risultati ottenuti con gli esami coprologici e quelli necroscopici di fegati ovini e caprini, l'esame coprologico ha evidenziato la presenza della dicroceliosi in un caso su tre (Jithendran e Bath, 1996).

Negli ultimi anni sono state studiate numerose tecniche immunodiagnostiche come alternativa agli esami coprologici e necroscopici; l'immunofluorescenza, la precipitazione, l'emoagglutinazione passiva, la fissazione del complemento e l'ELISA, sono state impiegate per ricercare gli anticorpi anti-*Dicrocoelium* in animali naturalmente o sperimentalmente infettati (Schröder Geyer, 1976; Calamel, 1977; Piergili Fioretti et al., 1980; Savitskii Ponomareva, 1984; Jithendran et al., 1996).

I prodotti somatici (So) e escretori/secretori (ESP) di *Dicrocoelium* sono stati studiati come antigeni per l'ELISA, le loro caratteristiche chimiche sono state esaminate rispetto alla risposta anticorpale nella bile e nel siero. I risultati hanno mostrato che le proteine So e le molecole di superficie di *Dicrocoelium* stimolano una buona risposta anticorpale, sebbene problemi di bassa specificità e sensibilità potrebbero verificarsi nell'usare estratti di elminti interi invece di ESP o antigeni purificati (González-Lanza et al., 2000).

Studi condotti in agnelli naturalmente infettati hanno dimostrato che con l'ELISA è possibile ritrovare alti titoli anticorpali anti-*D. dendriticum* un mese dopo l'infezione (4-8 settimane prima che compaiano le uova nelle feci) consentendo così una diagnosi precoce (Ambrosi et al., 1980).

Uno studio recente ha ampiamente contribuito a chiarire alcuni aspetti della diagnosi immunologica della dicroceliosi (González-Lanza et al., 2000). La risposta anticorpale di IgG in 2 gruppi di pecore infettate sperimentalmente con 1000 e 3000 metacercarie è stata valutata con il metodo ELISA 19 e 23 giorni prima della comparsa delle uova nelle feci. I titoli di anticorpi hanno raggiunto un picco a 60 giorni post infezione in entrambi i gruppi sperimentali e sono rimasti elevati per almeno sei mesi. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata però riscontrata tra i titoli anticorpali ed il numero di metacercarie inoculate dimostrando che non c'è nessuna correlazione tra il numero di elminti adulti presenti e la risposta anticorpale (González-Lanza et al., 2000). Recentemente è stato condotta in Sardegna una indagine sieroepidemiologica con metodica ELISA utilizzando antigeni escretori/secretori di *D. dendriticum* allo scopo di valutare la presenza di anticorpi verso questo distoma in 738 pecore scelte at random. La tecnica della sedimentazione è stata utilizzata per la ricerca delle uova nelle feci. La sieropositività è stata riscontrata nel 86,2% degli animali esaminati,

mentre la prevalenza di animali positivi all'esame coprologico è stata del 6,7% (Sanchez-Andrade et al., 2003; Scala et al., 2002).

Alla luce di quanto sopra esposto, la ricerca di anticorpi anti-*D. dendriticum* tramite ELISA risulta un metodo promettente per condurre indagini siero-epidemiologiche e per una precoce diagnosi della dicrocoeliosi negli agnelli (gli anticorpi compaiono 30 giorni dopo l'infezione) permettendo di effettuare trattamenti tempestivi e mirati al fine di evitare perdite economiche. Questi esami, inoltre, hanno il vantaggio di poter essere applicati sia nella fase acuta che nella fase cronica della malattia (Keiser e Utzinger, 2009).

Uno degli svantaggi delle indagini sierologiche è che testimoniano solo un "contatto con il parassita", ma non la sua reale presenza (Scala, 2006).

Sandoval et al. (2013) hanno sviluppato per la prima volta una PCR per la diagnosi di *D. dendriticum* direttamente da campioni fecali. Hanno dimostrato che tale metodica è capace di rilevare la presenza di un minimo di 40 uova di *D. dendriticum* per grammo di feci e che quindi potrebbe essere un utile strumento molecolare per implementare la diagnosi coprologica convenzionale.

### **Profilassi e Trattamento**

Il controllo della dicrocoeliosi è molto difficile per la complessità del ciclo biologico di *D. dendriticum*. La profilassi è basata principalmente:

- su norme comportamentali (management aziendale);
- sul controllo degli ospiti intermedi;
- sul trattamento antielmintico degli animali infestati.

In riferimento alle norme comportamentali è consigliabile evitare di far pascolare gli animali nelle prime ore del mattino e di sera per ridurre la possibilità di infestione; in queste ore, infatti, le formiche paralizzate possono più facilmente essere ingerite dagli animali recettivi (*plant-topping*). Inoltre, le carte di utilizzo del suolo potrebbero essere utili per individuare i terreni calcarei in modo da evidenziare gli habitat adatti per lo sviluppo di *D. dendriticum* e quindi le aree a rischio. I metodi di controllo degli ospiti intermedi possono essere attuati solo in piccole zone, in quanto il loro costo elevato ne impedisce un uso diffuso. Il controllo degli ospiti intermedi usando sostanze chimiche, non è facilmente realizzabile a causa del notevole impatto ambientale di questi prodotti. Un metodo di lotta “biologica” abbastanza efficace consiste nell’immettere sui pascoli volatili da cortile (tacchini, polli, oche, anatre) che sono grandi divoratori di molluschi e formiche. Inoltre, ricoprendo i formicai con rami di alberi e cespugli, in un’area circolare di un metro dalla base del formicaio, si può prevenire o ridurre l’infezione degli animali poiché le formiche infettate dalle metacercarie presentano difficoltà motorie e quindi rimangono entro i 30-50 cm dal formicaio (Badie e Rodelaud, 1988). In riferimento a quanto prima esposto, la profilassi nelle aree endemiche si basa principalmente sull’utilizzo del farmaco con trattamenti strategici di tutti gli animali esposti direttamente all’infezione. Tra gli antielmintici, molti benzimidazolici (albendazolo, fenbendazolo, mebendazolo, tiabendazolo) e pro-benzimidazolici (netobimin, tiofanato) sono stati usati contro *D. dendriticum* a dosi più alte rispetto a quelle utilizzate per i nematodi gastrointestinali, i nematodi broncopolmonari e cestodi. L’albendazolo somministrato in ovini naturalmente infettati da *D. dendriticum*, alla dose di 15-20 mg/kg *per os*, ha determinato una riduzione di elminti adulti a livello epatico fino al 99,6% (Himonas e Liakos, 1980) mentre una singola dose di 15 mg/kg *per os* ha ridotto la carica parassitaria del 92,2%.

Recentemente questi valori di efficacia sono stati confermati anche in una prova controllata di campo condotta da Veneziano et al. (2006a), nella quale l'albendazolo sulfossido, somministrato *per os* alla dose di 10 mg/Kg in ovini naturalmente infestati da *D. dendriticum*, è risultato efficace in termini di FECR (97,7%, 96,5%, 96,6% e 98,0%, ai giorni 4, 8, 14 e 30, rispettivamente) ed altamente efficace in riferimento al riscontro necroscopico al giorno 14 (99,0%). Nel 2012, Bosco et al., hanno effettuato una prova controllata di campo sull'efficacia dell'albendazolo micronizzato al dosaggio di 10 mg/kg p.v. (*Valbazen 1,9%- Pfizer*) in singola e doppia somministrazione in ovini naturalmente parassitati. I risultati ottenuti da tale studio hanno dimostrato che l'albendazolo micronizzato somministrato due volte, a distanza di una settimana, alla dose di 10 mg/Kg ad ovini naturalmente infestati da *D. dendriticum* è "altamente efficace" rispetto al singolo trattamento, sia al rilievo copromicroscopico che necroscopico. Sanna et al. (2012) hanno, invece, valutato l'efficacia dell'albendazolo (15 mg/Kg) in 12 bovini naturalmente infestati da *D. dendriticum*. L'83,3% degli animali è risultato copronegativo a 21 giorni dal trattamento.

Corba et al. (1991) hanno testato l'efficacia dei boli intraruminali a lento rilascio di albendazolo verso i nematodi gastrointestinali e *D. dendriticum* su 300 pecore adulte valutando anche l'influenza del trattamento sulla produttività zootecnica (lana e formaggio). Gli animali trattati risultarono copronegativi per 10 settimane dopo la somministrazione dei boli e alle necroscopie presentarono una efficacia del 96,2 - 99,2% verso i nematodi gastrointestinali (*Nematodirus* spp., *Oesophagostomum* spp., *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp. e *Trichuris ovis*), e una efficacia del 88,5% verso *D. dendriticum*. Negli animali trattati si riscontrò anche un aumento delle produzioni zootecniche (2,56 kg di formaggio e 0,6 kg di lana in media in più rispetto al gruppo controllo non trattato), nonché una riduzione della contaminazione dei pascoli delle larve dei nematodi.

L'efficacia dei boli intraruminali di albendazolo è stata valutata anche in ovini con elevate infezioni da *D. dendriticum*. Una riduzione significativa delle upg è stata riportata durante la prima e la seconda settimana di trattamento con una efficacia del 91,8% (Corba e Krupicer, 1992). Il rischio di antielmintico resistenza deve essere preso in considerazione quando si utilizzano capsule e boli intraruminali.

Il triclabendazolo, un altro derivato benzimidazolico si è dimostrato un fasciolicida molto efficace verso gli elminti adulti e gli stadi giovanili di *F. hepatica*, a dosi *per os* di 5-10 mg/kg, ma nessuna efficacia è stata riscontrata contro la dicroceliosi e paramfistomosi (Güralp e Tinar, 1983). Una singola dose orale (40mg/kg) di tiofanato nei bovini, caprini ed ovini è risultata efficace contro *D. dendriticum* specialmente nelle pecore. La percentuale di metabolizzazione del tiofanato in etil-benzimidazol-carbamato (principale metabolita), è stata pari a 57% nei bovini, 52% nei caprini e 34% negli ovini (Delatour et al., 1988). L'attività di un singolo trattamento orale (7,5; 10 e 12,5 mg/kg) di luxabendazolo è stato testato contro i nematodi gastrointestinali, i nematodi polmonari e i distomi epatici in ovini naturalmente infettati. Sebbene a tutti i dosaggi testati, il luxabendazolo fu efficace al 100% verso i nematodi gastrointestinali (ad eccezione di *Strongyloides papillosus* – efficacia del 79,7-87,6%), l'azione distomicida fu inferiore verso *D. dendriticum* (efficacia 64,6; 63,2 e 83,8% alla dose di 7,5; 10 e 12,5 mg/kg rispettivamente). Di contro una doppia somministrazione di luxabendazolo alla dose di 12,5 mg/kg distanziate di una settimana l'una dall'altra hanno prodotto risultati soddisfacenti verso *D. dendriticum* (Kassai et al., 1988). Il Netobimin (profarmaco dell'albendazolo), è stato utilizzato per il trattamento della dicrocoeliosi nelle pecore alla dose di 20mg/kg (Sanz et al., 1987) e 15mg/kg (Rojo-Vazquez et al., 1989) con buoni risultati. Dopo un unico trattamento con netobimin (15mg/kg), si è verificata una diminuzione della FEC il secondo

e quarto giorno dal trattamento con una alterata morfologia delle uova (integrità, assenza di masse di cellule germinali, etc.), e il valore medio della carica parassitaria fu notevolmente diverso al riscontro necroscopico nelle pecore trattate (98 elminti) rispetto a quelle controllo (1215 elminti), facendo registrare una efficacia del 91,9%. Recentemente, questi valori di efficacia sono stati confermati anche in una prova controllata di campo condotta da Veneziano et al. (2006b), nella quale il netobimin, somministrato *per os* alla dose di 20 mg/Kg in ovini naturalmente infestati da *D. dendriticum*, è risultato efficace in termini di FECR (97,7%, 97,6%, 94,0% e 98,0%, ai giorni 4, 8, 14 e 30, rispettivamente) ed in riferimento al riscontro necroscopico al giorno 14 (96,4%). Una associazione di tiofanato e brotitanide (50 mg e 5,6 mg rispettivamente), ha dimostrato di avere un livello più elevato di efficacia verso *D. dendriticum* (100%) e verso *F. hepatica* (99,8%) se comparato con l'associazione tetramisolo e oxiclozanide (entrambi a 15mg/kg) (Tinar et al., 1988). L'efficacia verso *D. dendriticum* del tiofanato (50mg/kg) in associazione con l'albendazolo (5mg/kg, da ripetere dopo una settimana) è stata comparata in ovini con infezioni elevate. Al rilievo necroscopico effettuato dopo 28 giorni dal trattamento gli animali trattati presentarono una efficacia antielmintica del 74,4% (Onar, 1990). La scelta tra questi due principi attivi dipende dalla presenza o assenza concomitante di altri endoparassiti quali tenie e *F. hepatica* verso i quali l'albendazolo, diversamente dal tiofanato, è efficace. Sulla base dell'epidemiologia di *D. dendriticum* e degli ospiti intermedi, i trattamenti antielmintici sono consigliati 2-3 volte all'anno, all'inizio della primavera ed in autunno. Greggi di pecore e capre in transumanza andrebbero trattate quando raggiungono le valli (Jithendran e Bhat, 1996). Puccini (1992) consiglia di eseguire trattamenti strategici su tutti gli animali esposti all'infestazione, due o tre volte all'anno, all'inizio dell'estate, in autunno ed eventualmente anche in inverno. Nonostante studi

immunologici abbiano evidenziato l'esistenza di una risposta immunitaria nei confronti di *D. dendriticum*, non sono stati ancora condotte prove sulla profilassi vaccinale nei confronti della dicrocoeliosi.

### **Infezione nell'uomo**

Nell'uomo, *D. dendriticum* è causa di una zoonosi, del tratto biliare, trasmessa attraverso gli alimenti (*food-borne*), ancora oggi sottostimata e negletta. L'infezione avviene, come per gli altri ospiti definitivi, a seguito dell'ingestione accidentale di verdura e frutta contaminata con il secondo ospite intermedio (formica), contenente le metacercarie (Magi et al., 2009; Cringoli e Rinaldi, 2014). La migrazione di queste ultime nel sistema biliare causa un'irritazione cronica del fegato e dei dotti bilari (Karadag et al., 2005).

Frequenti sono le infezioni spurie da *D. dendriticum*, dovute all'ingestione di fegati di animali infetti, crudi o poco cotti; in tal caso, le uova passano invariate attraverso il tratto digerente. Gli unici metodi per differenziare le infezioni reali da quelle spurie sono: 1) ripetere l'esame coprologico (nei 3 giorni successivi) dopo che il paziente ha seguito una dieta priva di fegato di animale e 2) esame del liquido duodenale o biliare per la ricerca delle uova di *D. dendriticum* (Cringoli e Rinaldi, 2014).

Le manifestazioni cliniche nell'uomo sono simili a quelle causate da altri trematodi epatici, quali *Clonorchis sinensis*, *Fasciola hepatica* e *Opisthorchis viverrini* e possono includere problemi digestivi, flatulenza, vomito, diarrea, spesso in combinazione con costipazione, coliche, epatomegalia, ostruzione dei dotti bilari, ipereosinofilia e possibile orticaria (Sing et al., 2008). Complicazioni possono essere dovute allo stato immunitario del soggetto; casi di pazienti affetti dal virus HIV e *D. dendriticum* sono stati recentemente descritti (Zali et al., 2004).

La maggior parte delle zoonosi descritte in letteratura sono forme subcliniche, ma sono in aumento casi clinici di dicroceliosi umana, descritti in varie parti del mondo (Ashrafi, 2010; Cengiz et al., 2010).

Pochi dati sono riportati sulla prevalenza e la diffusione di questa parassitosi nell'uomo (Cringoli e Rinaldi, 2014).

Jeandron et al. (2011) hanno effettuato uno studio trasversale su 138 bambini, di età compresa tra i 2 ed i 15 anni, in un'area sub-urbana del Kyrgyzstan in Asia Centrale. Su 138 bambini analizzati, 11 sono risultati positivi a *D. dendriticum* (8%), utilizzando le tecniche FLOTAC. Sebbene non sia stato possibile verificare se le infezioni fossero reali o spurie, il prevalente sistema di allevamento presente nell'area di studio, la dieta e le condizioni igienico-sanitarie hanno fatto dedurre che l'area di studio del Kyrgyzstan fosse un habitat ideale per la trasmissione della dicrocoeliosi umana.

Un recente studio effettuato da Gualdieri et al. (2011), sugli immigrati presenti nella città di Napoli, ha mostrato una prevalenza di *D. dendriticum* dell'0,8%.

Nel 2007, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha inserito *D. dendriticum* nella lista degli agenti infettivi riportati dal *Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group* (FERG) (WHO, 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., 2004; Shu et al., 2012; Zhao et al., 2014).

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 microsatelliti, 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), poichè 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 microsatelliti 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 di 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; Nissene et al., 2012; Anshary et al., 2014), trematodi (Huang et al., 2004; Sugiyama et al., 2006; Thaenkham et al., 2007; Imani-Baran et al., 2012; Pyo et al., 2013), cestodi (Zanini et al., 2006; Gonzalez et al., 2006; Villalobos et al., 2007; Shahnazi et al., 2011; Onac et al., 2013) e protozoi (Garcia et al., 2007; Nagamani et al., 2007; Dubey et al., 2013).

### *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 Mc Clelland, 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; Subba Raju et al. 2008), 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). Negli ultimi anni, la multiplex PCR sta trovando sempre più spazio in parassitologia. Recentemente, ad esempio, Bisset et al. (2014) hanno sviluppato una multiplex PCR per identificare le larve degli strongili da feci ovine.

### *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; Blaxter et al., 1998; Newton et al., 1998; 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 DGGE (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., 1998a, b, 2000; Zhang et al., 1999; Ahmed et al., 2011).

La DGGE 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 denaturante (un solvente come la formamide o l'urea) (Guldberg 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 DGGE 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).

La DGGE è stata ad esempio utilizzata da Martynova-Vankley et al. (2008) per discriminare le diverse specie di *Eimeria* negli uccelli.

Questa metodologia è comunque ancora poco utilizzata in parassitologia (Gasser et al., 1996).

### *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).

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; Hadfield e Chalmers, 2012; Ceccarelli et al., 2014; ).

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; Wachira et al., 1993) e artropodi (Collins et al., 1998; Paskewitz e Collins, 1990; Zahler 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., 2004).

### *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, 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; 2001a, b, 2002a, 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) 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., 2002b; 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., 2001b, 2002b).

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., 2001b, 2002a).

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., 2000). 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 o non c'è proprio, un fatto che può essere utilizzato per disegnare marcatori specie-specifici.

# **PARTE SPERIMENTALE**

## Obiettivi della ricerca

Nel corso del mio dottorato ho approfondito diversi aspetti del trematode *Dicrocoelium dendriticum*, parassita a localizzazione epatica di diverse specie animali, uomo compreso. In particolare, *D. dendriticum* è stato utilizzato come modello di interazione ospite-parassita, focalizzando il mio studio sulla caratterizzazione degli aspetti epidemiologici, biologici, patologici e molecolari.

Nello specifico, gli obiettivi di questo lavoro sono stati raggiunti effettuando i seguenti studi:

- 1) Indagine epidemiologica nella regione Campania per verificare la presenza e la diffusione di *D. dendriticum* in diversi ospiti definitivi. Nello specifico, sono stati effettuati due studi trasversali (*cross-sectional surveys*) su: a) 121 allevamenti ovini distribuiti su tutto il territorio campano; b) 50 scoiattoli provenienti da diversi *pet shops* della regione Campania.
- 2) Caratterizzazione molecolare di diversi esemplari di *D. dendriticum* isolati da ruminanti (ovini e bovini) naturalmente infestati, allevati in diverse zone delle regioni Campania e Calabria.
- 3) Studio degli effetti degli antigeni somatici degli adulti di *D. dendriticum* su cellule di epatocarcinoma umano (HepG2 e HuH7). Sono stati effettuati saggi di vitalità cellulare (MTT- bromuro di dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio), saggi apoptotici e valutazione dello stress ossidativo.

## **1. Indagini epidemiologiche**

Obiettivo di tale studio è stato quello di valutare la diffusione di *D. dendriticum* in ovini e micro mammiferi della regione Campania.

### **1.1 Indagine epidemiologica in allevamenti ovini**

E' stata eseguita una indagine epidemiologica trasversale (*cross-sectional survey*) in 121 allevamenti ovini della regione Campania per valutare la presenza e la distribuzione spaziale di *D. dendriticum*. Per la pianificazione del campionamento e per la realizzazione delle mappe parassitologiche sono stati utilizzati *Geographical Information System* (GIS) (Cringoli et al., 2004a,b).

## **Materiali e Metodi**

### *Area di studio*

L'indagine è stata condotta in un'area di 13,590 km<sup>2</sup> della Regione Campania (39°59'– 41°30'N, 13°45'–15°48'E). L'area è prevalentemente collinare, con poca pianura e montagna e con un'altitudine compresa tra 0 a 1800 m s.l.m. L'idrografia del territorio è caratterizzata dalla presenza di pochi fiumi, alcuni torrenti e numerosi ruscelli; non sono presenti laghi. Il clima è mediterraneo con estati secche ed inverni piovosi. La maggior parte dei ruminanti sono allevati in piccole aziende agrozootecniche (con una superficie media di circa 50 ha) distribuite in tutta l'area. Le aree dedicate esclusivamente al pascolo sono tipiche delle zone marginali; inoltre, aree pascolive sono presenti in tutta la zona, disperse tra quelle utilizzate prevalentemente per la coltivazione dei cereali. Negli ultimi 50 anni, in alcune aree marginali non coltivabili, sono stati piantati alberi di conifere.



Area di studio

#### *Dimensione del campione*

Sono stati controllati 121 allevamenti ovini. Questa dimensione del campione è stata determinata utilizzando la formula proposta da Thrusfield (1995), considerando i seguenti 4 parametri: popolazione di allevamenti ovini semibradi presenti nell'area di studio (5.438), prevalenza attesa della dicrocoeliosi (50%); livello di confidenza (95%), ed errore massimo ammesso (5%). In questo studio sono stati considerati solo gli allevamenti ovini con oltre 50 capi al pascolo: occasionale, permanente o stagionale.

#### *Distribuzione del campione*

I 121 allevamenti ovini sono stati campionati in modo da essere omogeneamente distribuiti sul territorio. Per la selezione degli allevamenti campione, sull'intero territorio della regione Campania è stata sovrapposta

(con l'ausilio dei Sistemi Informativi Geografici – GIS) una griglia a maglie regolari di 10 x 10 Km di lato. Il territorio regionale è stato quindi suddiviso in 135 quadranti (= aree di campionamento). Di questi sono stati individuati e georeferenziati i centroidi, intorno ai quali sono state disegnate le aree di campionamento (AC), circolari e di 3 km di diametro. All'interno di ciascuna AC è stato calcolato l'allevamento più vicino al centroide. Solo gli allevamenti ovini, con un minimo di 50 adulti sono stati inclusi nel campionamento. Dei 135 quadranti, solo 121 avevano almeno un allevamento.

#### *Prelievo dei campioni*

In ogni allevamento sono stati effettuati prelievi individuali di feci raccogliendo il materiale direttamente dall'ampolla rettale. In funzione dell'età, gli animali sono stati suddivisi in due categorie: rimonte (4-18 mesi) ed adulti (> 18 mesi) ed in ogni allevamento sono stati sottoposti a prelievo 15 adulti e 5 rimonte.

#### *Indagini copromicroscopiche*

Per ciascun allevamento sono stati costituiti in laboratorio 4 pool (ciascuno composto da parti uguali di 5 campioni individuali), uno relativo alle rimonte e tre relativi agli animali adulti. Per la ricerca e la conta delle uova di *D. dendriticum* è stata utilizzata la FLOTAC *basic technique*, con sensibilità pari a 1 uova/larve/oocisti per grammo feci (upg/lpg/opg) (Cringoli et al., 2010). Allo scopo è stata utilizzata la soluzione flottante a base di zinco solfato (peso specifico =1.350).

## *Tecniche FLOTAC*

Il FLOTAC comprende diversi componenti ed accessori: le componenti principali sono la base, il disco di traslazione e il disco di lettura.

Gli accessori sono l'adattatore per centrifuga e per microscopio, il fondo, la chiave e la vite.

### **Componenti**

- **La Base**

La base ha forma circolare. Presenta due camere di flottazione, numerate rispettivamente con il numero 1, a sinistra, ed il numero 2, a destra. I numeri sono stampati in rilievo sul fondo di ognuna delle camere di flottazione, visibili in trasparenza.

Le due camere hanno forma trapezoidale, ovvero sono più strette sul fondo che non all'apertura; ciò per facilitare la flottazione degli elementi parassitari. Ognuna ha una capacità di 5 ml.

Sul bordo della base sono presenti quattro parole, ognuna contrassegnata da un diverso numero e da un diverso colore e distanti tra loro di circa 90°.

La loro funzione è quella di indicare le fasi operative del FLOTAC:

FILLING (riempimento = n°1 - verde)

CLOSED (chiuso = n° 2 - giallo)

READING (lettura = n° 3 - rosso)

OPEN (aperto = n° 4 - nero).

Le pareti della base sono state progettate in modo da accogliere con molta precisione i dischi di traslazione e di lettura.

Il bordo, nella parte inferiore della Base, presenta due sporgenze necessarie per attaccare il FLOTAC all'Adattatore microscopio.

Al centro della base è presente un foro, che permetterà il passaggio della vite in modo da sigillare tutte le componenti del FLOTAC dopo l'assemblaggio.

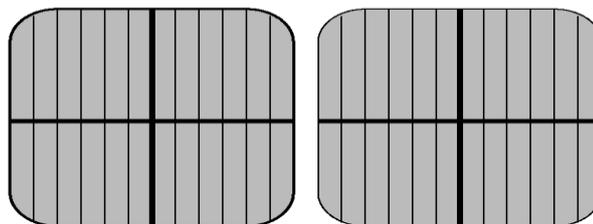
- Il Disco di Traslazione

Il disco di traslazione presenta al centro un foro per il passaggio della vite, e lateralmente due aperture di forma quadrata, che corrispondono esattamente alla porzione apicale delle due camere di flottazione.

Sono inoltre presenti due piccole asole, le quali hanno la funzione di accogliere i due piccoli agganci presenti sulla faccia inferiore del Disco di lettura.

- Il Disco di lettura

Il disco di lettura presenta due reticoli di lettura, di forma quadrata.



FLOTAC: reticoli di lettura

Ciascun reticolo lettura misura 18 x 18 mm ed è diviso in 12 sezioni verticali e parallele, delimitate da linee trasparenti stampate a rilievo.

Inoltre, due linee di maggiore spessore, disposte a croce, suddividono ulteriormente ogni reticolo in 4 quadranti.

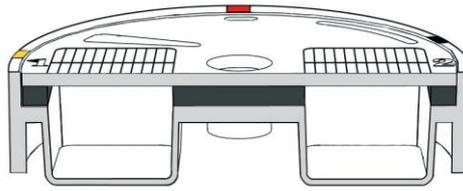
I due reticoli lettura sono contrassegnati con i numeri 1 e 2, stampati a rilievo sulla faccia superiore del disco.

In corrispondenza dei reticoli di lettura vi sono due aperture di forma triangolare, necessarie per il riempimento delle camere flottazione (asole riempimento).

Ci sono due versioni del Disco lettura: (a) Disco lettura 100X che, con i microscopi ordinari permette un ingrandimento ottimale di 100X; (b) Disco lettura 400X che consente un ingrandimento ottimale di 400X.

L'unica differenza tra i due dischi è nello spessore del reticolo lettura che è più sottile nel Disco lettura 400X.

Quando il FLOTAC è assemblato con il Disco lettura 100x viene indicato come FLOTAC 100. Con questa configurazione le due camere flottazione contengono ognuna un volume di 5 ml (volume totale = 10 ml). Quando il FLOTAC è assemblato con il Disco lettura 400x viene indicato come FLOTAC 400. Con questa configurazione le due camere flottazione contengono ognuna un volume di 5,5 ml (volume totale = 11 ml).



### FLOTAC: camere di flottazione

Sulla faccia inferiore del disco di lettura sono infine presenti due tasselli traslazione (per il trascinamento del Disco traslazione) ed al centro, una spirale realizzata per il meccanismo di apertura, e per lo stop durante la traslazione dei dischi.

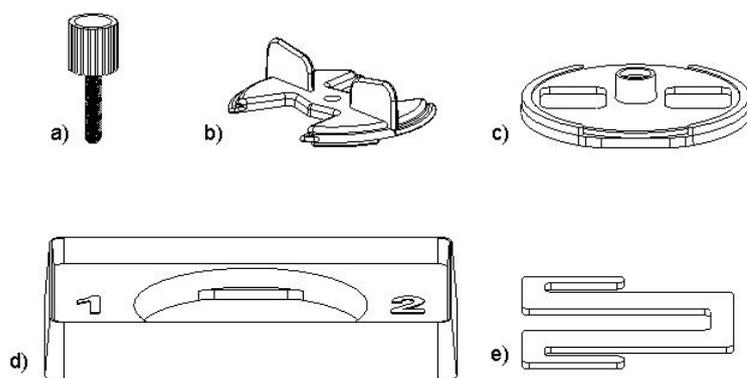
### **Accessori**

Per quanto riguarda gli accessori, il fondo è stato progettato per assorbire le forze di deformazione dell'apparato durante la fase di centrifugazione.

La chiavetta ha la funzione di bloccare i vari componenti del FLOTAC durante la centrifugazione; muove i dischi nelle varie fasi operative del FLOTAC e coadiuva l'apertura dell'apparato.

Infine il bullone insieme alla vite garantiscono la sicurezza del FLOTAC durante la centrifugazione, mentre l'adattatore per centrifuga, di forma rettangolare, con una depressione centrale per alloggiare il FLOTAC, consente la centrifugazione dell'apparato con i rotori per piastre microtiter. Inoltre, esso facilita l'utilizzo del FLOTAC, poiché porta stampati sulla faccia superiore i riferimenti per le fasi operative e raccoglie l'eventuale materiale fuoriuscito durante le varie fasi di lavoro.

L'adattatore per il microscopio, invece, accoglie gli alloggiamenti presenti sul bordo inferiore delle basi, consentendo la lettura del FLOTAC al microscopio.

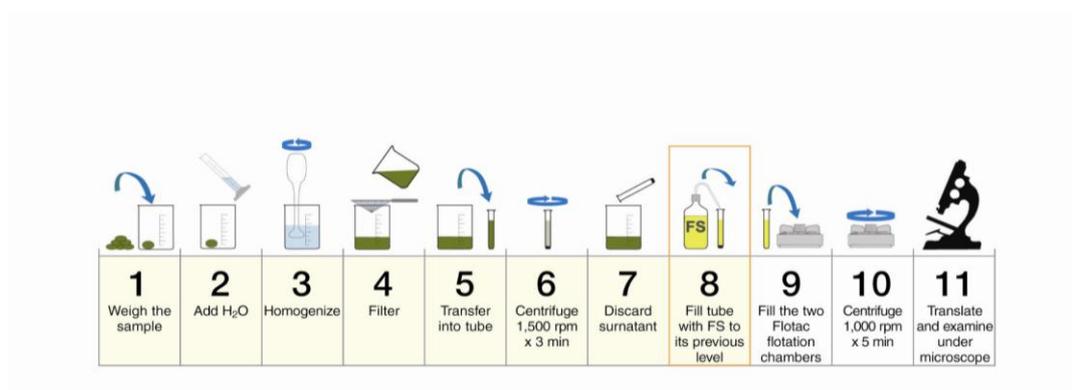


I FLOTAC 100 e 400 sono entrambi utilizzati nelle tecniche FLOTAC *basic, dual, double e pellet*.

Tutte le tecniche FLOTAC sono varianti di una stessa tecnica che prevede le seguenti fasi:

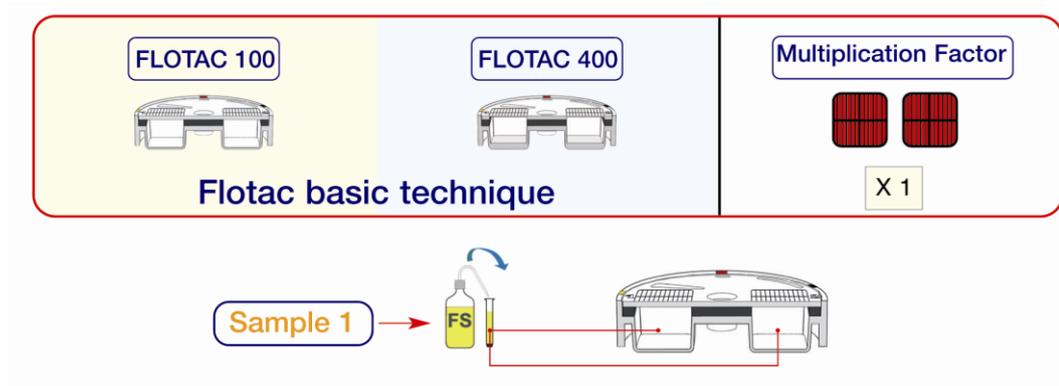
1. Pesare il *copros* (5-10 g).
2. Aggiungere acqua di fonte (rapporto di diluizione = 1:10).
3. Omogeneizzare accuratamente la sospensione.
4. Filtrare la sospensione con un filtro a maglie da 250 $\mu$ m.
5. Omogeneizzare il filtrato e trasferire 6 ml (nel caso delle tecniche *dual* e *double*, 11 ml nel caso della *basic*) della sospensione filtrata in una provetta a fondo conico.
6. Centrifugare le provette per 3' a 170 g.
7. Eliminare il surnatante.

8. Aggiungere al pellet la/le soluzione/i flottanti riportando il volume a 6 ml (11 ml nel caso della *basic*).
9. Dopo accurata omogeneizzazione delle sospensioni presenti nelle provette, riempire le due camere di flottazione del FLOTAC.
10. Chiudere il FLOTAC e centrifugare per 5' a 1000 a 120 g.
11. Dopo centrifugazione traslare la parte apicale della sospensione, esaminare il FLOTAC al microscopio e contare gli elementi parassitari nei due reticoli di lettura.



### FLOTAC BASIC TECHNIQUE

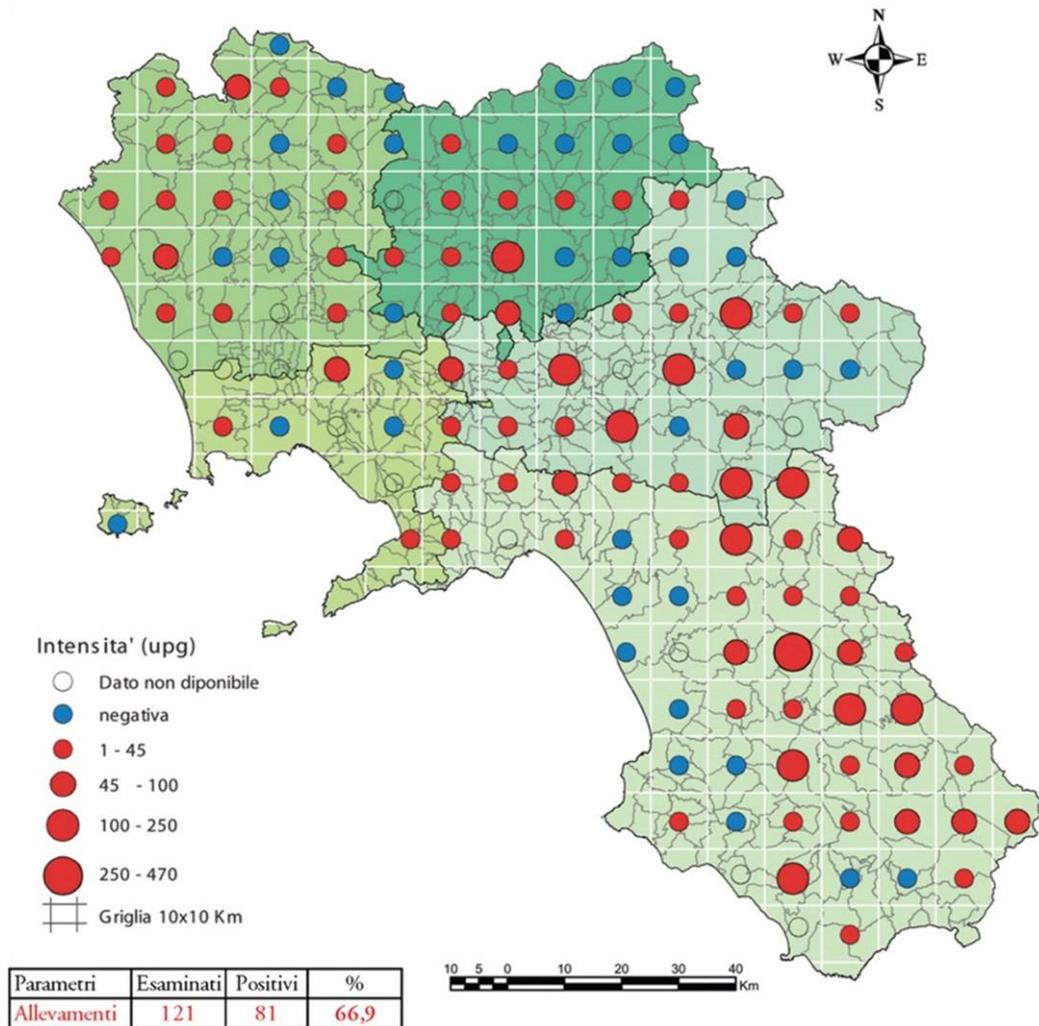
La FLOTAC *basic technique* prevede, durante l'esame del campione, l'utilizzo di una sola soluzione flottante, la più efficiente per l'elemento parassitario di interesse. Queste tecniche sono particolarmente indicate per la messa in evidenza e per la enumerazione di elementi parassitari di una sola specie parassita (infezioni monospecifiche naturali o sperimentali) o quando i campioni di *copros* contengono elementi parassitari differenti, ma che hanno lo stesso comportamento (in termini di flottazione) nei riguardi della soluzione flottante scelta. La sensibilità analitica della FLOTAC *basic technique* è di 1 UPG/LPG/OPG/CPG.



## Risultati

La presenza di *D. dendriticum* è stata riscontrata nel 66,9% degli allevamenti (81/121), con una intensità media di 52 upg (range 1-340). La distribuzione spaziale delle positività e l'intensità di *D. dendriticum* vengono presentati con due tipologie di mappe parassitologiche: mappa con omogenea distribuzione dei punti e mappa con cerchi proporzionati.

Nella mappa con cerchi proporzionati (Fig. 1), un cerchio di grandezza proporzionata disegnato in corrispondenza di ciascuna AC, rappresenta la intensità di *D. dendriticum* nell'allevamento ivi positivo. Le AC con allevamenti positivi sono segnate in rosso e le AC con allevamenti negativi in blu.



**Fig. 1.** Distribuzione spaziale delle positività e delle intensità di *D. dendriticum* in ciascuno dei 121 allevamenti controllati (*mappa con omogenea distribuzione dei punti e cerchi proporzionati*).

## 1.2 Indagine epidemiologica negli scoiattoli

E' stata eseguita una indagine epidemiologica trasversale (*cross-sectional survey*) in 50 scoiattoli della regione Campania per valutare la presenza di *D. dendriticum*.

### Materiali e Metodi

#### *Prelievo campioni*

Da Maggio ad Aprile 2013 sono stati prelevati 50 campioni di feci da scoiattoli presenti in *pet shops*. Gli scoiattoli analizzati erano tutti asintomatici ed appartenenti a 5 differenti specie (*Callosciurus finlaysonii*, n=6, *C. prevosti*, n=6; *Tamias striatus*, n=26, *T. sibiricus*, n=10; *Sciurus carolinensis*, n=2).



Scoiattolo - *Tamias striatus*

Per evitare cross-contaminazioni, sono stati inclusi nello studio solo gli animali alloggiati singolarmente nelle gabbie. Il prelievo di feci è stato effettuato raccogliendo la regione apicale del *copros* depositato sul terreno con degli abbassalingua sterili in legno. Il tutto è stato poi riposto in contenitori standard per la raccolta dei campioni biologici, ed al materiale fecale è stata aggiunta formalina al 5% per ottenere una migliore conservazione dei campioni.

#### *Fissazione e conservazione del campione*

I campioni così raccolti sono stati preservati in formalina 5% in quantità tale da avere un rapporto 1:4 e, successivamente, opportunamente omogeneizzati. La formalina 5%, da un attento studio bibliografico, è risultata il miglior fissativo per una adeguata conservazione del campione, per la conservazione dei potenziali parassiti presenti e per la protezione del laboratorista che ne viene a contatto in seguito alla loro manipolazione (Cringoli et al., 2010).

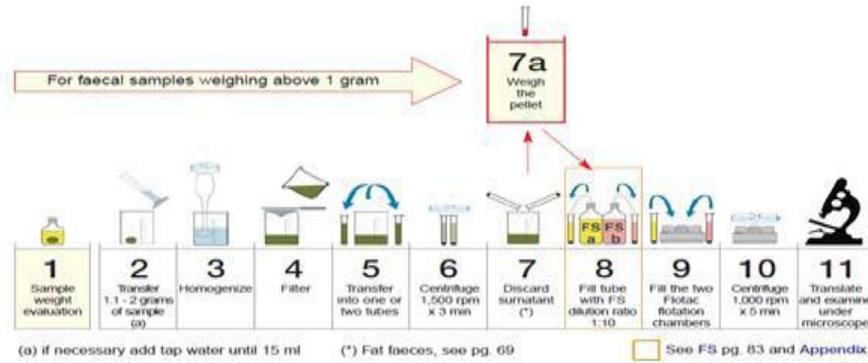
#### *Indagini copromicroscopiche*

Ciascun campione di *copros*, prelevato dai 50 scoiattoli e conservato in formalina al 5%, è stato analizzato mediante la FLOTAC *pellet technique* (Cringoli et al., 2006; Cringoli et al., 2010) per la ricerca e la conta delle uova dei *D. dendriticum* ed, eventualmente, di elementi parassitari (uova, cisti, oocisti) appartenenti ad altre specie di elminti e/o protozoi.

## FLOTAC *PELLET TECHNIQUE*

La FLOTAC *pellet technique* ha previsto le seguenti fasi:

- Valutazione del peso del campione
- Aggiunta di formalina 5% a tutti i campioni (1 parte di *copros* + 3 parti di formalina)
- Accurata omogeneizzazione della sospensione
- Filtrazione della sospensione con un filtro a maglie da 250  $\mu\text{m}$
- Trasferimento di due aliquote da 6 ml ognuna di sospensione fecale filtrata in due provette a fondo conico
- Centrifugazione delle provette per 3' a 170g
- Eliminazione del surnatante e pesa del pellet utilizzando una bilancia di precisione
- Aggiunta al pellet della soluzione flottante SF a base di Cloruro di Sodio (peso specifico = 1200) ed, all'altro pellet, della soluzione flottante SFb a base di Zinco Solfato (peso specifico = 1350), riportando il volume della provetta a 6 ml
- Dopo accurata omogeneizzazione delle sospensioni fecali presenti nelle provette, riempimento delle due camere di flottazione del FLOTAC®
- Centrifugazione del FLOTAC® per 5' a 120g. Dopo centrifugazione, traslazione della parte apicale della sospensione
- Lettura del FLOTAC® al microscopio e conta degli elementi parassitari nei due reticoli di lettura.



## Risultati

I risultati ottenuti da tale indagine hanno rilevato una notevole presenza di *D. dendriticum*, rispetto ad altri parassiti, negli scoiattoli *pet* presenti nella regione Campania. In particolare 4 scoiattoli su 50 (10,0%; 95% CI=3,7-22,6%) sono risultati positivi a *D. dendriticum* con un'intensità media di 12,5 upg (range 10-15).

## **2. Caratterizzazione molecolare di diversi esemplari di *Dicrocoelium dendriticum***

E' stata effettuata la caratterizzazione molecolare di diversi esemplari di *D. dendriticum* isolati da ruminanti (ovini e bovini) naturalmente infestati, allevati in diverse zone delle regioni Campania e Calabria.

### **Materiali e Metodi**

#### *Raccolta dei parassiti*

Gli esemplari adulti (n = 150) di *D. dendriticum* sono stati prelevati in più occasioni da fegati di ovini (n = 26) e bovini (n = 10) naturalmente infestati e regolarmente macellati presso alcuni mattatoi della Campania.

Gli esemplari prelevati da ciascun animale, sono stati lavati più volte con PBS e conservati in etanolo 70%, prima della successive fasi di estrazione del DNA.

#### *Estrazione del DNA*

L' estrazione del DNA è stata eseguita su individui adulti mediante QIAmp DNA mini kit della QIAGEN, che prevede tre fasi: lisi, purificazione ed eluizione.

Lisi – Fase iniziale, durante la quale sono stati completamente digeriti i tessuti dei trematodi. Dopo aver posto in ogni provetta da 2 ml un solo adulto, sono stati aggiunti 160 µl di buffer ATL e 40 µl di Proteinasi k (20mg/ml).

Quindi, le provette sono state vortexate ed incubate a 56°C in bagnetto termostato (Bicasa, BE-123 T) fino a quando i tessuti non sono apparsi completamente lisati (all'incirca 1 h e 30'). Sono stati, poi, aggiunti 4 µl di Rnasi A (1 mg/ml) ed, una volta vortexate, le provette sono state messe in bagnetto termostato 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 per 10'.

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, 5417 C), allo scopo di far aderire il DNA alla matrice di gel di silice ed allontanare tutti i contaminanti che avrebbero potuto interferire con le successive fasi di analisi molecolare.

Successivamente, i campioni sono stati sottoposti a due fasi di lavaggio, con due differenti buffers: AW1 e AW2, necessari all'allontanamento dei sali residui ancora legati al DNA fissato alla matrice delle colonnine. Dopo l'aggiunta di 500 µl di buffer AW1, le provette sono state centrifugate a 8000 rpm per 1'; sono stati quindi aggiunti 500 µl di buffer AW2 e le provette sono state centrifugate a 14000 rpm per 3'.

Eluizione - Terza fase, che ha permesso di raccogliere, sul fondo delle provette, 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, che avrebbe potuto interferire con le successive reazioni enzimatiche. Successivamente, le colonnine sono state poste in tubi da 2 ml ed il DNA è stato eluito mediante l'aggiunta di 150 µl di buffer AE, centrifugando i campioni 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 la tecnica spettrofotometrica (Biophotometer, Eppendorf), in base alla quale una densità ottica (O.D.) pari ad 1 corrisponde a 50 µg/ml di DNA a doppia elica. Per effettuare la lettura, 60 µl di campione, eventualmente diluito, sono stati posti in cuvette di plastica e analizzati con il programma dsDNA. Le letture, in triplicato, sono state effettuate mediante 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.

### *Amplificazione delle regioni 28S e ITS-2 del rDNA mediante PCR*

Sono state preparate due mix di PCR diverse, ciascuna di 50 µl, utilizzate per amplificare le regioni 28S e ITS-2 del rDNA, entrambe contenenti: 15 mM di Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM di KCl (Applied Biosystems), 6-12 ng di DNA, 0,2 mM di dNTP's (Takara, Japan) e 2,0 mM di MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems).

Per la 28S sono stati aggiunti alla mix di PCR: 0,2 µM di ogni primer 28F1 e 28R600 (Marcilla et al., 2002; Tabella 1) e 1,5 U di TaqGold DNA Polimerasi (Applied Biosystems).

**Tabella 1.** Nome e sequenza dei primers impiegati nella reazione di PCR

Nome dei primers	Sequenza (5' → 3')
28 F1	ACGTGATTACCCGCTGAACT
28R600	CTGAGAAAGTGCCTGACAAG

La PCR è stata effettuata in un cicizzatore termico AB 2700 (Applied Biosystems), alle seguenti condizioni: una fase iniziale di attivazione della Taq Gold a 95°C per 10', seguita da 40 cicli comprendenti una fase di denaturazione a 94°C per 30'', una fase di annealing a 60°C per 30'' e una fase di estensione a 72°C per 1'. Alla fase ciclica, è seguita un'estensione finale a 72°C per 5' necessaria per la stabilizzazione dei prodotti di amplificazione.

Per la regione ITS-2, invece, sono stati aggiunti alla mix di PCR: 12,5 pmol di ogni primer ITS2-F e ITS2-R (Itagaki et al., 2003; Tabella 2) (MWG Biotech, Germany) e 2,5 U di TaqGold DNA Polimerasi (Applied Biosystems).

**Tabella 2.** Nome e sequenza dei primers impiegati nella reazione di PCR per ITS-2.

Nome dei primers	Sequenza (5' → 3')
ITS2 - F	TGTGTCGATGAAGAGCGCAG
ITS2 - R	TGGTTAGTTTCTTTTCTCCGC

La PCR è stata effettuata in un ciclizzatore termico AB 2700 (Applied Biosystems), alle seguenti condizioni: una fase iniziale di attivazione della Taq Gold a 95°C per 10', seguita da 35 cicli comprendenti una fase di denaturazione a 94°C per 1', una fase di annealing a 53°C per 90" e una fase di estensione a 72°C per 1'. Alla fase ciclica, è seguita un'estensione finale a 72°C per 10'.

### *Elettroforesi*

Per visualizzare il prodotto ottenuto dalle due reazioni di PCR, un'aliquota di 8 µl di amplificato è stata caricata su gel di agarosio all'1%, usando come tampone EDTA 1X (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 90 mM acido borico, 1,0 mM EDTA, Invitrogen), ed è stata sottoposta ad elettroforesi, applicando un voltaggio di 90 V costanti per 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 100 bp (GeneRuler, Fermentas) per confronto.

### *Purificazione*

Prima di procedere alle ulteriori analisi degli amplificati, è stato necessario purificare i prodotti di PCR per entrambi i marcatori.

Tale purificazione è stata effettuata utilizzando il QIAquick PCR purification kit (QIAGEN), necessario per l'allontanamento dal DNA amplificato di dimeri, primers, nucleotidi residui, DNA polimerasi e sali; le colonnine di tale kit contengono una membrana di gel di silice che, in presenza di alte concentrazioni di sali e  $\text{pH} \leq 7,5$ , assorbe il DNA.

Inizialmente, al prodotto di PCR è stato aggiunto il buffer PB, in una quantità pari a 5 volte il volume dell'amplificato. Una volta vortexato, il

tutto è stato trasferito nelle colonnine sottoposte, poi, a centrifugazione a 13000 rpm per 60''. Il DNA, dopo tale operazione, è stato adsorbito dalla membrana e il resto, fluito sul fondo del tubo di raccolta, è stato eliminato. Successivamente, sono stati eseguiti 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 60''. Il tutto è stato ricentrifugato a 13000 rpm per 60'' per eliminare ogni eventuale residuo di buffer PE, contenente etanolo, che avrebbe potuto interferire con le successive reazioni enzimatiche. L'ultima fase è stata quella 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 60''.

### *Sequenziamento*

Tutti gli amplificati sono stati sequenziati utilizzando la chimica BigDye terminator ver 1.1 (Applied Biosystems).

Per la preparazione della mix necessaria alla 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 20 µl.

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 ciascuno dei primers utilizzati.

### *Purificazione post-sequenziamento*

La purificazione è stata effettuata per allontanare i dideossinucleotidi marcati non usati nel corso della reazione ciclica di sequenziamento.

A tale fine sono state usate le Centriceps (Applied Biosystems). 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 H<sub>2</sub>O deionizzata. Dopo circa 2h, è stata rimossa l'acqua dalle Centriceps, in parte per gravità e in parte mediante centrifugazione per 2' a temperatura ambiente (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*

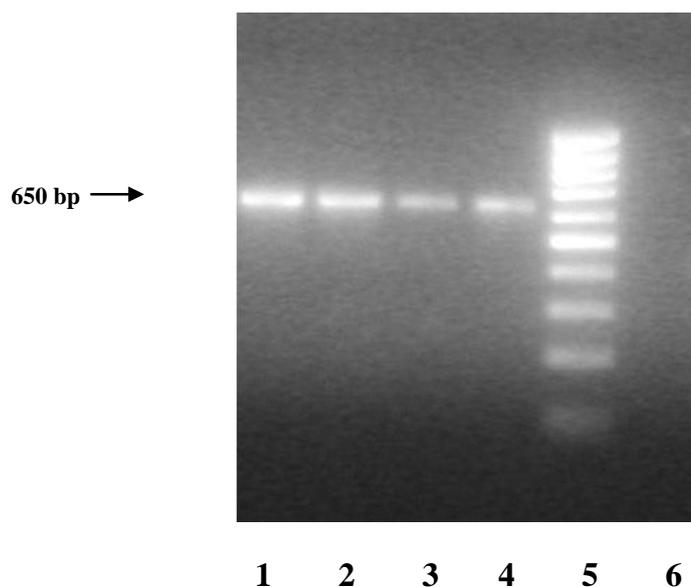
Per evitare gli appaiamenti inter e intra-specifici, in grado di inficiare la elettroforesi capillare, sono stati aggiunti 5 µl di eluato, ottenuti dall'uso delle Centriceps, a 20 µl di formamide; il tutto è stato denaturato a 94°C per 3'. Lo strumento usato per il sequenziamento è stato l'ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) che separa i frammenti di DNA

utilizzando il polimero POP-6<sup>TM</sup>. Una volta che i campioni sono stati collocati nel campionatore, il capillare di elettroforesi è entrato nelle provette, lo strumento ha applicato il voltaggio opportuno ed il DNA caricato negativamente è migrato verso l'elettrodo positivo. I frammenti di DNA, marcati con dei fluorocromi, sono stati colpiti dal raggio-laser e hanno emesso una luce che, raccolta a livello della CCD (Charged-coupled Device Camera), è stata convertita in picchi colorati. Una volta che lo strumento ha finito l'elettroforesi, le sequenze sono state sottoposte ad analisi molecolare mediante i software Chromas ver 1.3, BLASTn, (MedLine) e ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/))

## Risultati

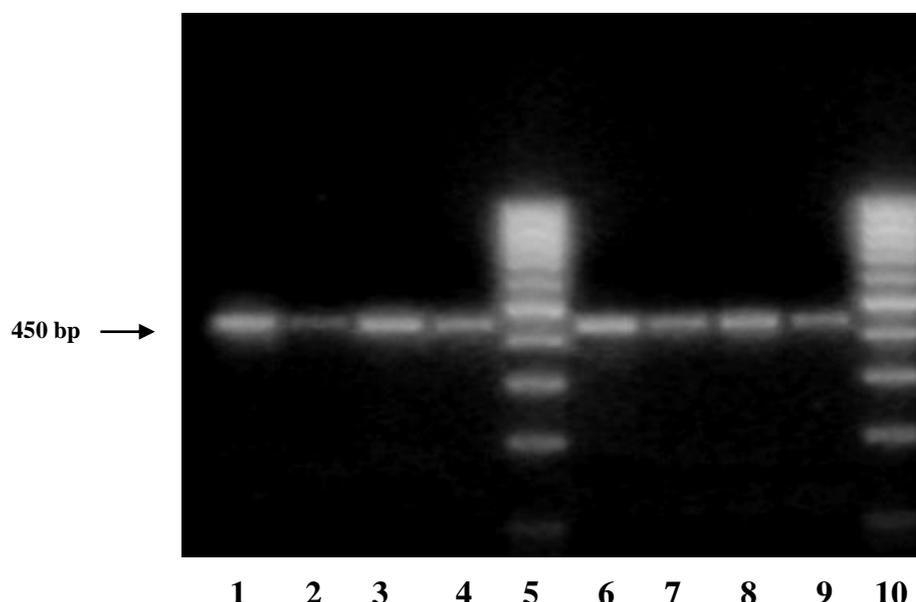
### PCR

La coppia di primers 28F1 e 28R600 usata per l'amplificazione della regione 28S ha amplificato un frammento di 650 bp (Fig. 2) per tutti i campioni analizzati.



**Fig. 2.** Amplificazione della regione 28S di *D. dendriticum*. Nei pozzetti: 1, 2, 3, 4, sono stati caricati i campioni; nel pozzetto 5 è stato caricato il ladder 100 bp; nel pozzetto 6 il controllo negativo.

L'amplificazione della regione ITS-2 ha prodotto una regione di 450 bp (Fig. 3) per tutti i campioni analizzati.



**Fig. 3.** Amplificazione della regione ITS-2 di *D. dendriticum*. Nei pozzetti: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 sono stati caricati i campioni; nei pozzetti 5, 10 è stato caricato il ladder 100 bp.

### *Sequenziamento*

Dal sequenziamento della regione 28S è stata ottenuta una sequenza di 581 bp.

Tutte le sequenze 28S ottenute hanno presentato una identità del 100% tra di loro e con la sequenza 28S di *D. dendriticum* già depositata in GenBank (numero di accesso in GenBank: AF 151939).

Dal sequenziamento della regione ITS-2 è stata ottenuta una sequenza di 402 bp. La sequenza ITS-2 di *D. dendriticum* non era presente in GenBank ed è ora disponibile con numero di accesso DQ 379986.

Mediante allineamento delle sequenze ITS-2 ottenute, sono state osservate variazioni intra- e interpopolazione. In particolare, 15 esemplari hanno presentato una sostituzione T\A in posizione 215 ed una sostituzione A\G in posizione 300; 4 esemplari hanno presentato solo una sostituzione T/A in posizione 215 e 9 esemplari una sostituzione C/A in posizione 267.

Le sequenze 28S ed ITS-2 ottenute sono state anche comparate con le sequenze di un'altra specie di *Dicrocoelium*, *D. hospes*, presenti in GenBank.

Per quanto riguarda la 28S, sono state riscontrate variazioni inter-specie. In particolare, la sequenza 28S di *D. dendriticum* ha presentato una differenza di nove nucleotidi rispetto alla sequenza di *D. hospes* avente numero di accesso EF102024, e di tre nucleotidi rispetto alla sequenza di *D. hospes* avente numero di accesso EF102025 (Tabella 3).

**Tabella 3.** Variazioni inter-specie tra le sequenze 28S rDNA di *D. dendriticum* (numero di accesso in GenBank: AF151939), *D. hospes* (numero di accesso in GenBank: EF102024) e *D. hospes* (numero di accesso in GenBank: EF102025).

Nucleotide	<i>D. dendriticum</i> (AF151939)	<i>D. hospes</i> (EF102024)	<i>D. hospes</i> (EF102025)
53	T	C	T
86	A	G	G
89	G	A	A
360	G	A	A
408	G	T	<b>G</b>
409	T	C	T
426	T	G	T
442	T	C	T
462	T	C	T

Per quanto riguarda la regione ITS-2, *D. dendriticum* ha presentato differenze rispetto a *D. hospes* per 33 nucleotidi: 26 sostituzioni e 7 delezioni. Le sostituzioni sono state sia transizioni purina-purina (A-G e G-A; n = 11) o pirimidina-pirimidina (C-T e T-C; n = 8), che transversioni purina/pirimidina (G-T, A-T; n = 5) o pirimidina/purina (T-G, T-A, C-G, C-A; n = 2) (Fig. 4).

```

Dd -----TAATGTGAACTGCATACTGCTTTG
24
Dh (EF102026) TTTGTGTCGATGAAGAGCGCAGCCAACTGTGTGAATTAATGTGAACTGCATACTGCTTTG 60

Dd AACATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCCATGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCG 84
Dh (EF102026) AACATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCCATGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCG 120

Dd AGGGTCGGCTTACAAACTATCACGACGCCCAATAAGTCGTGGCTTGGATTTTGCCAGCTG 144
Dh (EF102026) AGGGTCGGCTTATGAACTATCACGACGCCCAATAAGTCGTGGCTTGGATTTTGCCAGCTG 180

Dd GCTTTACTCCCCAGTCGGAACGTCAGGGGTGTCAGATCTATGGCGTTATCCTAATGTAT 204
Dh (EF102026) GCTTCAATCCCCAGACGAGAATGTCAGGGGTGTCAGATCTATGGCGTTATCCCAATATAT 240

Dd CCGGATACACWCACCTAGTTATCAGACAGGTGGAGATGTGTCTACGGAGTCGTGGCTCAG 264
Dh (EF102026) CCTGATGCACACATCTGGATAATACACAGATGGAGATGTGTCAACGGAGTCGTGGCTCAG 300

Dd TAMTATTTATGCGCGCTCTGTAGAACATCTCGTGTGTGTAATTCGGAAATACGGCCTTCT 324
Dh (EF102026) TG-TAATTATGCGCGCTCTGTAAAACATCTCG-----TGAATTCGGAAATATGACCTTCT 354

Dd AATCCTGACCTCGGATCAGACGTGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCACTAAGCGGAG 384
Dh (EF102026) AATCCCGACCTCGGATCAGACGTGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCACTAAGCGGAG 414

Dd GAAAAGAACTAACCAA 402
Dh (EF102026) GAAAAGAAC-TAAC--- 428

```

**Fig. 4.** Allineamento delle sequenze (5' → 3') delle regioni ITS-2 (in grassetto) di *D. dendriticum* (numero di accesso in GenBank: DQ379986) e *D. hospes* (numero di accesso in GenBank: EF102026). I gap sono indicati con il trattino (-). W = T/A; M = C/A; R = A/G.

Inoltre, sono state osservate variazioni inter-specie tra le “varianti” ITS-2 di *D. dendriticum* (gruppo di isolati 2,3,4) e di *D. hospes* (Tabella 4).

**Tabella 4.** Variabilità inter-specie nella regione ITS-2 in gruppi di isolati di *D. dendriticum* e *D. hospes*.

<i>D. dendriticum</i>	<i>D. hospes</i>	Variabilità
Gruppo di isolati 1 (n=122) <sup>a</sup>	Gruppo di isolati 1 <sup>e</sup>	8.2%
Gruppo di isolati 2 (n=15) <sup>b</sup>	Gruppo di isolati 1 <sup>e</sup>	8.5%
Gruppo di isolati 3 (n=9) <sup>c</sup>	Gruppo di isolati 1 <sup>e</sup>	8.2%
Gruppo di isolati 4 (n=4) <sup>d</sup>	Gruppo di isolati 1 <sup>e</sup>	8.5%

a) 80 campioni, la cui sequenza è stata depositata in GenBank con il numero di accesso: DQ379986; b) 15 campioni che presentavano le sostituzioni T215A e A300G; c) 9 campioni che avevano solo una sostituzione C/A in posizione 267; d) 4 campioni che mostravano solo una sostituzione T/A in posizione 215; e) 5 campioni di *D. hospes*.

### **3. Valutazione effetti degli antigeni somatici di *D. dendriticum* su cellule di epatocarcinoma**

Al fine di valutare l'effetto degli estratti proteici di *D. dendriticum* su cellule di epatocarcinoma (HepG2 e HuH7), sono stati eseguiti saggi di vitalità cellulare, apoptosi, autofagia e stress ossidativo.

#### **Materiali e metodi**

##### *Estrazione degli antigeni somatici di *D. dendriticum**

Fase di omogeneizzazione - Gli esemplari adulti di *D. dendriticum* prelevati al macello da fegati di animali naturalmente parassitati (principalmente ovini e caprini), sono stati sottoposti ad una serie di lavaggi con soluzione fisiologica, prima di essere omogenati. L'omogeneizzazione è stata ottenuta inizialmente mediante cicli di congelamento/scongelamento in azoto liquido e successivamente con l'utilizzo del Dounce.

I parassiti sono stati omogenati in PBS con l'aggiunta di :

- NaF (conc. finale 25mM)
- Ortovanadato di Sodio (conc. finale 1mM)
- Aprotinina (10µg/mL)
- Leupeptina (10µg/mL)
- PMSF (conc. finale 1 mM)

Rimozione dei lipopolisaccaridi (LPS) - L'omogenato ottenuto è stato incubato per 30' in ghiaccio e centrifugato a 12000 rpm a 4 °C per 5'.

Al surnatante (parte contenente il citoplasma) è stato aggiunto il Triton-X114, in modo da rimuovere tutti i residui di LPS, attraverso il seguente protocollo:

- Aggiunta dell'1% di Triton-X114 alla soluzione contenente le proteine
- Incubazione in ghiaccio per 5'
- Vortexare
- Incubazione a 37 °C per 5-10' (per permettere la formazione della fase ricca in micelle)
- Centrifugazione a 37 °C (rotore pre-riscaldato) per 1' a 13000 rpm
- Trasferimento del surnatante (proteine purificate) in una nuova provetta sterile
- Aggiunta delle Bio-Beads SM2 (Bio-Rad, CA, USA), precedentemente attivate, per rimuovere il Triton-X114.

Preparazione delle Bio-Beads SM2 - Unire 1 g di biglie a 10 mL di metanolo e miscelare invertendo. Lasciare che le biglie vadano sul fondo della provetta per 5', successivamente eliminare il metanolo. Aggiungere 10 mL di Triton-X114 buffer (Triton-X114 2 %, 20 mM di Tris-HCl pH8) alle biglie ed incubare per 2h a 4 °C. Successivamente, rimuovere il Triton-X114 buffer e lavare le biglie prima con metanolo e poi per 2-3 volte con PBS. Infine eliminare il buffer di lavaggio dalle biglie.

## RAPPORTO BIGLIE/SURNATANTE:

1gr di biglie per 5 mL di campione

- Incubare per 1h a 4 °C
- Rimuovere le biglie, centrifugando per 5' a 14000 rpm a 4 °C

Filtrare il tutto attraverso una membrana di 0,2 µm, aliquotare e congelare a -80 °C per i successivi saggi *in vitro*.

### *Determinazione della concentrazione proteica*

La concentrazione totale delle proteine è stata determinata mediante il metodo *Lowry*. A 5 µl di campione sono stati aggiunti 1,5 ml di una soluzione costituita da *Lowry A* (190 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 100 mM NaOH, 0,7 mM NaK tartato) e *Lowry B* ( 20 mM CuSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O) in rapporto 49:1. Successivamente, sono stati aggiunti 150 µl di una soluzione costituita da acqua e dal reagente folinico *Folin & Ciocalteu's Phenol reagent* (Sigma), in rapporto 7:5. La reazione avviene per 20' a temperatura ambiente. L'assorbanza dei campioni è misurata con uno spettrofotometro settato alla lunghezza d'onda di 660 nm. Concentrazioni crescenti di albumina bovina sierica sono state usate come standard.

### *Colture Cellulari*

Il sistema sperimentale utilizzato è rappresentato da due linee cellulari di epatocarcinoma, HepG2 e HuH7.

Le cellule di epatocarcinoma HepG2 sono state mantenute nel mezzo di coltura RPMI-1640, contenente 10% di Siero Fetale Bovino (Gibco) inattivato al calore, 100 unità/ml di penicillina, 100 unità/ml di streptomicina (ICN) e glutamina 2 mM. Le cellule HuH7, invece, sono state mantenute in DMEM, con 10% di Siero Fetale Bovino scomplementato, 100 unità/ml di penicillina, 100 unità/ml di streptomicina e HEPES 20 mM. Nel corso delle colture, le cellule sono state mantenute a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>.

### *Saggi di proliferazione cellulare*

Il saggio con MTT (bromuro di dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio) (MTT Cell Proliferation Assay Kit, Invitrogen) è un test colorimetrico quantitativo. Il saggio si basa sulla capacità degli enzimi succinato deidrogenasi mitocondriali, presenti nelle cellule vitali, di trasformare il sale MTT tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazolo-2-yl)-2,5-diphenyltetrasolium bromide, di color giallo, in cristalli di formazano, mediante rottura dell'anello tetrazolico. I cristalli presentano una colorazione porpora e sono insolubili in soluzioni acquose. I cristalli ridisciolti in isopropanolo acidificato formano una soluzione purpurea misurata spettrofotometricamente a 595 nm. I valori di assorbanza sono proporzionali alla quantità di formazano prodotta e, quindi, all'attività metabolica e alla vitalità cellulare. Questo test fornisce un'indicazione relativa della popolazione cellulare vitale e permette di valutare la tossicità di una sostanza, attraverso il confronto tra gli indici di vitalità cellulare ottenuti dalle cellule trattate rispetto ai controlli.

Le cellule HepG2 ed Huh7 sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti ad una densità di 5000 e 4500 cellule/pozzetto, rispettivamente. Dopo 24 h, le

cellule sono state trattate con le diverse concentrazioni degli antigeni somatici di *D. dendriticum* per 24, 48 e 72 ore. Terminato il periodo d'incubazione con i diversi trattamenti, l'MTT è stato aggiunto a tutti i pozzetti delle *multiwell* da 96, ad una concentrazione finale del 10%. Dopo un'incubazione minima di 4h, la soluzione terreno/MTT è stata rimossa; in seguito i sali di formazano sono stati solubilizzati con una soluzione di isopropanolo/HCL 0,1N per 20 minuti, in agitazione costante.

Infine, è stata eseguita la misura dell'assorbanza della soluzione presente rispettivamente in ogni pozzetto della *multiwell*, con un lettore ELISA (*Biorad 550*). Le letture di assorbanza sono state eseguite in doppia lunghezza d'onda (570nm-655nm). Il calcolo della percentuale di inibizione sulla crescita cellulare è stato eseguito utilizzando la formula seguente, che rappresenta il rapporto fra la differenza di assorbanza calcolata tra il controllo non trattato ed ogni campione trattato, e l'assorbanza del controllo non trattato.

### **Espressione dei risultati**

$$\text{Crescita cellulare: } \frac{\text{assorbanza media cellule trattate}}{\text{assorbanza media cellule controllo}} \times 100$$

### *Valutazione dell'apoptosi mediante analisi al citofluorimetro*

La valutazione dell'apoptosi è stata eseguita utilizzando la colorazione con ioduro di propidio (PI) e la marcatura con l'annessina V. L'annessina V si lega ai residui di fosfatidilserina, che vengono traslocati dal versante

interno al versante esterno della membrana plasmatica durante le prime fasi dell'apoptosi. Durante l'apoptosi le cellule si colorano con l'Annexina V dopo la condensazione della cromatina ma prima della perdita della capacità della membrana plasmatica di escludere lo ioduro di propidio. Quindi, mediante la colorazione delle cellule con annexina V e ioduro di propidio, è possibile identificare le seguenti popolazioni cellulari: le cellule vive non apoptotiche (negative sia per annexina V che per ioduro di propidio); cellule apoptotiche precoci (positive per annexina V e negative per ioduro di propidio); cellule in apoptosi avanzata o necrotiche (positive per annexina V e/o ioduro di propidio). La marcatura delle cellule apoptotiche è stata effettuata utilizzando l'Annexin-V-kit (BD Biosciences Pharmingen, Europe). Dopo i tempi di incubazione, le cellule sono state staccate mediante EDTA-Tripsina 0,02-0,05% e sono state risospese in terreno completo (DMEM 10% FBS). Aliquote da  $2,5 \times 10^5$  cellule sono state centrifugate per 8 minuti a 1200 rpm e lavate con PBS. Il pellet cellulare è stato incubato con l'annexina V in un apposito buffer (fornito dai produttori) per 10' a temperatura ambiente, lavato e risospeso nello stesso buffer, come descritto dai produttori. L'analisi delle cellule apoptotiche è stata effettuata al citofluorimetro (FACScan, Becton Dickinson). Per ciascun campione sono stati acquisiti  $2 \times 10^4$  eventi. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato. La valutazione dell'apoptosi mediante colorazione con ioduro di propidio è stata analizzata utilizzando il kit Apoptosis Detection Kits (MedSystems Diagnostics, Vienna, Austria). Le cellule, lavate in PBS e risospese in 190µl di un tampone prediluito (1:4), sono state incubate per 10' al buio con 10 µl di una soluzione ioduro di propidio 20µg /ml e analizzate al citofluorimetro.

L'apoptosi è stata espressa con la seguente formula:

$$\text{Apoptosi (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ cellule fluorescenti (verdi)}}{n^{\circ} \text{ cellule totali}} \times 100$$

Per numero di cellule totali si intende la somma delle cellule vive e delle cellule morte.

#### *Valutazione dell'autofagia*

La valutazione dell'autofagia è stata eseguita mediante incubazione con la monodansilcadaverina, un marcatore fluorescente specifico per gli autofagosomi. Le cellule HuH7, trattate per 24 h con gli antigeni somatici di *D. dendriticum* (100µg/ml), sono state piastrate in multiwell-6 alla densità di  $3 \times 10^5$  cellule/well, in terreno DMEM completo. Le cellule sono state incubate con monodansilcadaverina per 15'. Le cellule sono state poi lavate due volte con PBS e analizzate al FACS (FacSCAN, Becton Dickinson, San Josè, CA USA).

#### *Valutazione dello stress ossidativo mediante analisi citofluorimetrica*

L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita valutando il contenuto dei ROS (specie reattive dell'ossigeno) all'interno delle cellule. Le cellule HuH7, trattate per 72 h con gli antigeni somatici di *D. dendriticum* (100µg/ml), sono state piastrate in multiwell-6 alla densità di  $3 \times 10^5$  cellule/well, in terreno DMEM completo. Le cellule sono state incubate per 1 h con 20 ng/ml di diidroetidina. La diidroetidina (non fluorescente) entra liberamente nelle cellule e, legandosi agli ioni superossido, viene deidrogenata a bromuro di etidio (fluorescenza rossa). Le cellule sono state

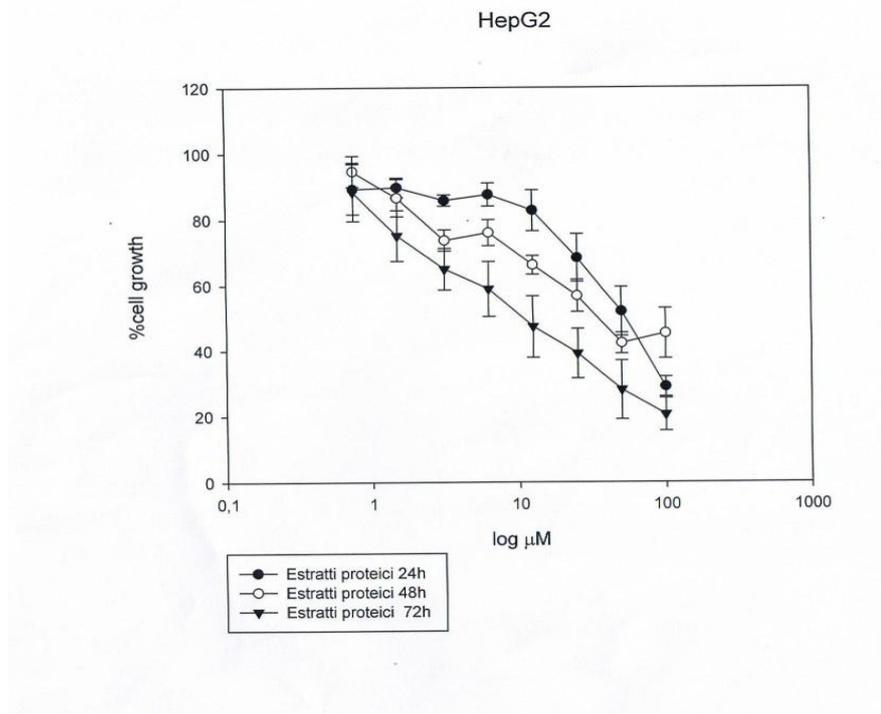
poi lavate due volte con PBS e analizzate al FACS (FacSCAN, Becton Dickinson, San Josè, CA USA). Per ciascun campione sono stati acquisiti circa 20000 eventi e la fluorescenza è stata misurata sul canale FL2-H mediante il software FACScalibur (Applied Biosystems).

## **Risultati**

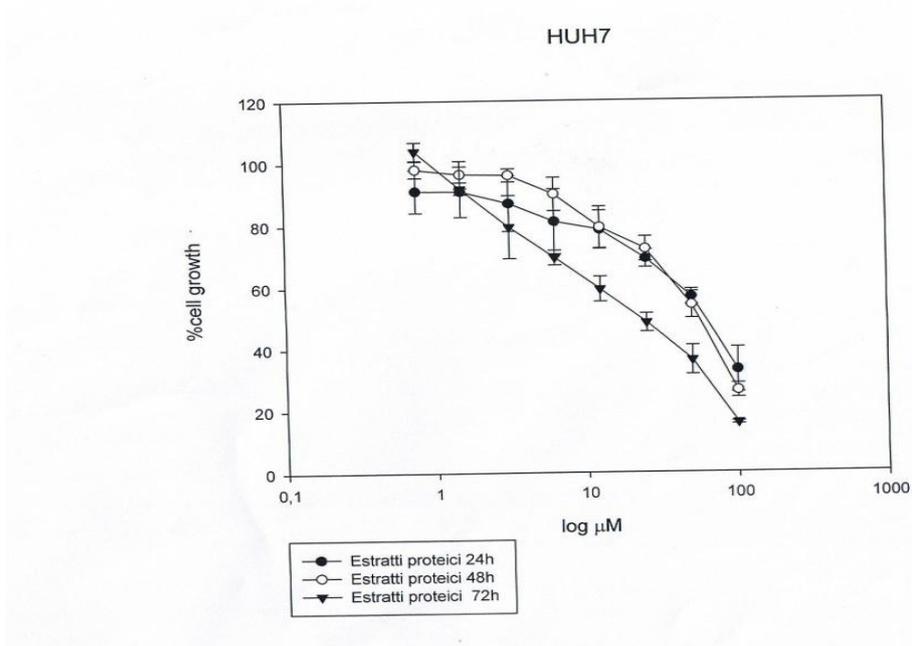
### *Analisi della vitalità cellulare mediante Test MTT*

Per capire gli effetti degli antigeni somatici di *D. dendriticum* sulle linee cellulari HepG2 e HuH7 è stata misurata la vitalità cellulare, mediante saggio con MTT, dopo trattamento per 24, 48 e 72 h con le diverse concentrazioni degli antigeni somatici di *D. dendriticum*.

L'esperimento è stato ripetuto per tre volte. Come è possibile vedere dai grafici di seguito riportati (Fig. 5-6), le cellule, a diverse ore e concentrazioni di trattamento con gli antigeni somatici di *D. dendriticum*, mostrano un'inibizione della crescita cellulare.



**Fig. 5.** Valutazione della vitalità cellulare mediante test MTT in HepG2 dopo 24, 48 e 72 h di trattamento con gli antigeni somatici di *D. dendriticum*. I risultati sono espressi come rapporto dell'assorbanza dei trattati sui controlli.



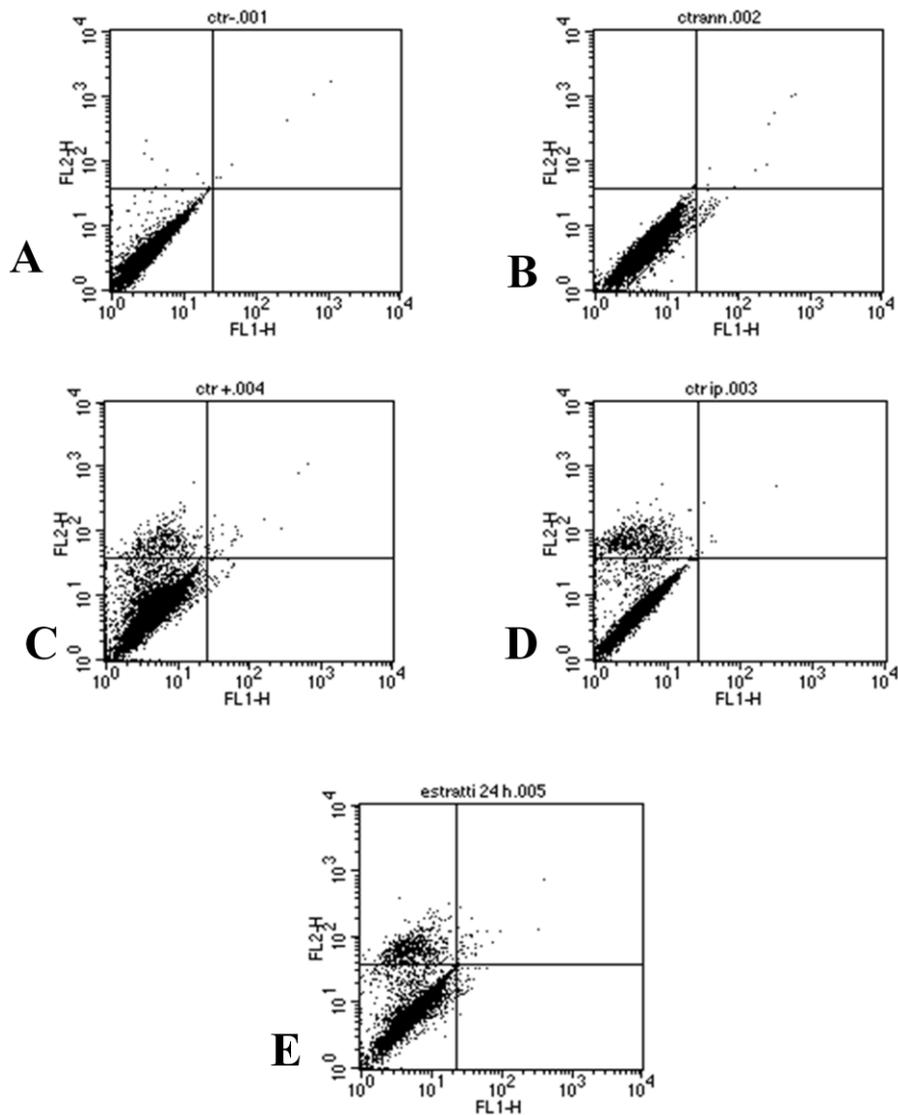
**Fig. 6.** Valutazione della vitalità cellulare mediante test MTT in HuH7 dopo 24, 48 e 72 h di trattamento con gli antigeni somatici di *D. dendriticum*. I risultati sono espressi come rapporto dell'assorbanza dei trattati sui controlli.

## *Apoptosi*

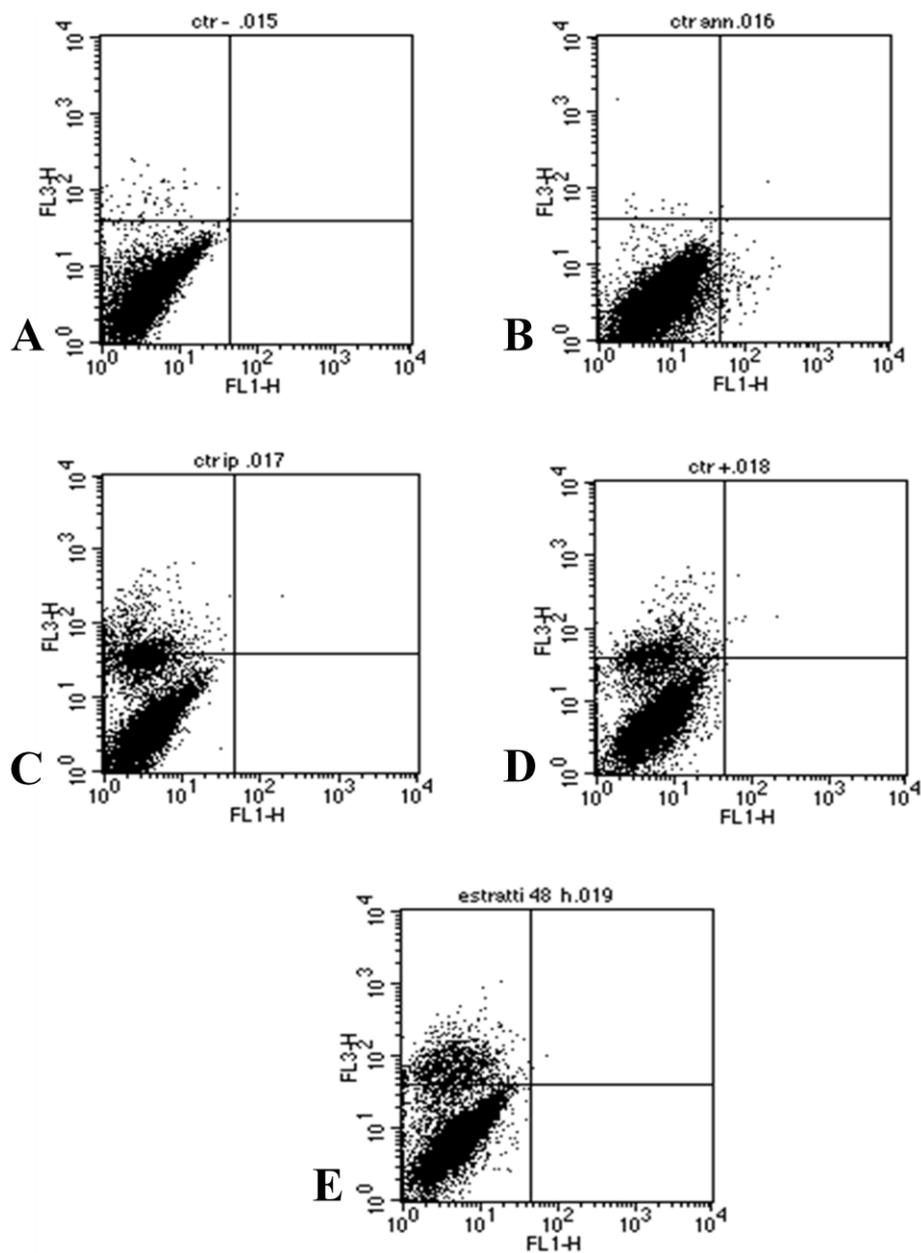
Abbiamo quindi voluto indagare se il meccanismo apoptotico fosse la causa del fenomeno di inibizione cellulare osservato. A tal fine le cellule sono state trattate per 24 e 48 h con gli antigeni somatici di *D. dendriticum* con una concentrazione di 100µg/ml, risultata essere quella con la maggiore capacità inibitiva (inibizione proliferativa = 45%). Sono stati preparati 4 controlli: uno con cellule non trattate, uno con cellule trattate con annessina V, uno con cellule trattate con ioduro di propidio ed uno con cellule trattate sia con annessina V sia con ioduro di propidio.

Per valutare la quota di cellule apoptotiche presenti nelle colture cellulari, è stato misurato, mediante analisi al citofluorimetro, il livello di incorporazione di annessina V e ioduro di propidio.

I risultati mostrano che non vi sono differenze tra la popolazione di controllo e quelle trattate con gli antigeni somatici di *D. dendriticum* sul numero di cellule apoptotiche. E' stato riscontrato solo un piccolo aumento della percentuale di cellule necrotiche. I grafici mostrano i risultati ottenuti a 24 h (Fig. 7) e a 48 h (Fig. 8) dal trattamento.



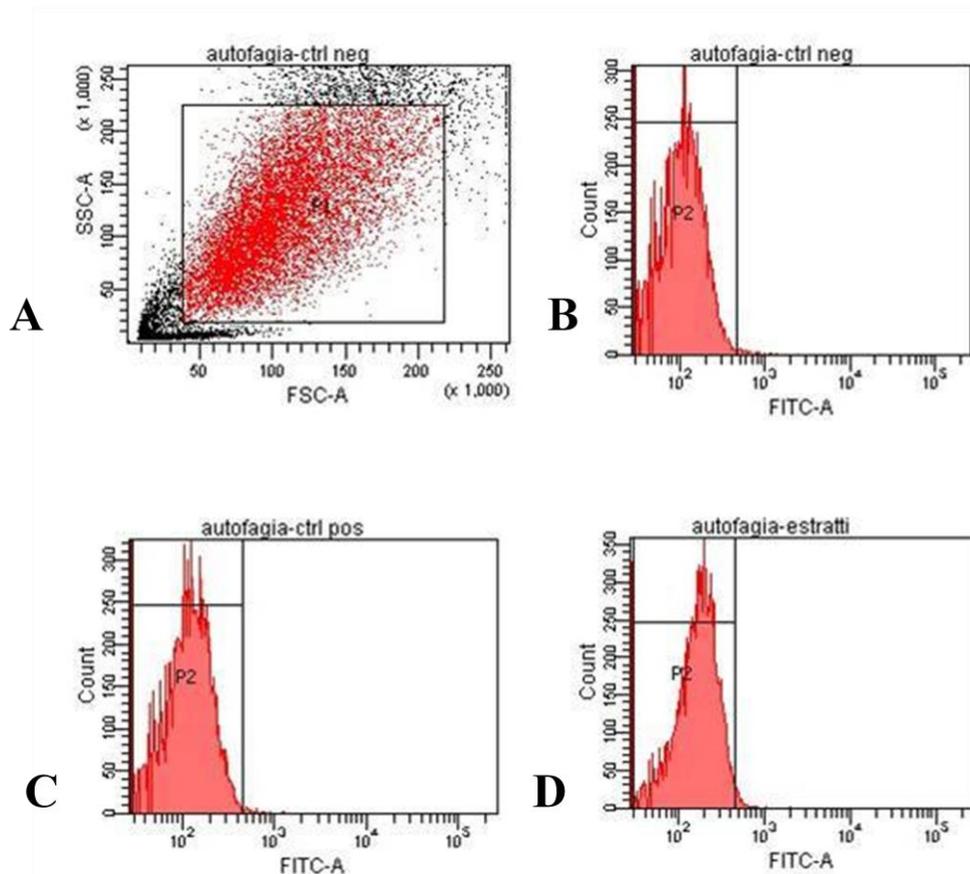
**Fig. 7.** Valutazione dell'apoptosi in cellule HuH7 dopo trattamento per 24 h con gli antigeni somatici di *D. dendriticum*. A: cellule non trattate; B: cellule trattate con annessina V; C: cellule trattate con ioduro di propidio; D: cellule trattate con annessina V e ioduro di propidio; E: cellule trattate con gli antigeni somatici di *D. dendriticum* (100 $\mu$ g/ml).



**Fig. 8.** Valutazione dell'apoptosi in cellule HuH7 dopo trattamento per 48 ore con gli antigeni somatici di *D. dendriticum*. A: cellule non trattate; B: cellule trattate con annessina V; C: cellule trattate con ioduro di propidio; D: cellule trattate con annessina V e ioduro di propidio; E: cellule trattate con gli antigeni somatici di *D. dendriticum* (100 $\mu$ g/ml).

## Autofagia

A questo punto si è valutato il grado di autofagia delle cellule in esame, andando ad analizzare la monodansilcadaverina, un marcatore fluorescente specifico per gli autofagosomi. A tal fine le cellule sono state trattate per 24 ore con gli antigeni somatici di *D. dendriticum* con una concentrazione di 100µg/ml, risultata essere quella con la maggiore capacità inibitiva (inibizione proliferativa = 45%). Sono stati preparati 2 controlli: uno negativo con cellule non trattate ed un controllo positivo trattato con monodansilcadaverina. I risultati non hanno mostrato alcuna differenza tra la popolazione di controllo e quella trattata (Fig. 9).

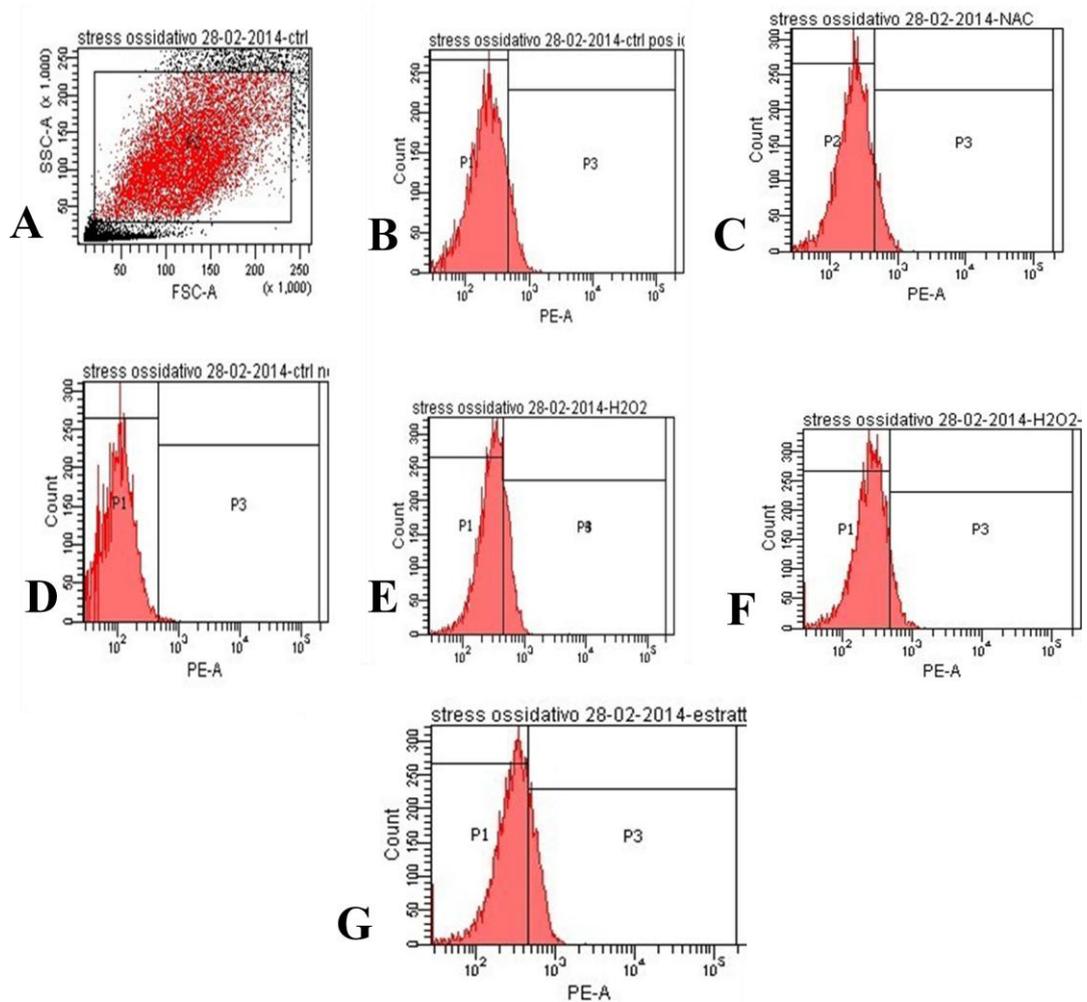


**Fig. 9.** Valutazione dell'autofagia in cellule HuH7 dopo trattamento per 24 h con gli antigeni somatici di *D. dendriticum*. A: popolazione cellulare; B: controllo negativo; C: controllo positivo con monodansilcadaverina; D: cellule trattate con gli antigeni somatici di *D. dendriticum* (100µg/ml).

### *Stress ossidativo*

In ultima analisi è stato valutato lo stress ossidativo in cellule HuH7, dopo 72 h dal trattamento con gli antigeni somatici di *D. dendriticum*, analizzando la diidroetidina. Le cellule sono state trattate per 72 h con gli antigeni somatici di *D. dendriticum* ad una concentrazione di 100µg/ml. Sono stati preparati 5 controlli: un controllo negativo, un controllo positivo con cellule trattate con diidroetidina, un controllo positivo con cellule trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un controllo positivo con cellule trattate con N-acetilcisteina (NAC), un controllo positivo con cellule trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NAC. La diidroetidina (20 ng/ml) veniva aggiunta dopo 72 h (prima della lettura al FACS) a tutti i controlli, tranne al controllo negativo.

I risultati mostrano un aumento dello stress ossidativo nelle cellule trattate con gli antigeni somatici di *D. dendriticum* di circa il 20% rispetto al controllo negativo (Fig. 10).



**Fig. 10.** Valutazione dello stress ossidativo in cellule HuH7 dopo trattamento per 72 h con gli antigeni somatici di *D. dendriticum*. A: popolazione cellulare; B: controllo positivo con diidroetidina (20 ng/ml); C: controllo positivo con N-acetil-cisteina (NAC); D: controllo negativo; E: cellule trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500UM); F: cellule trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NAC; G: cellule trattate con gli antigeni somatici di *D. dendriticum* (100μg/ml).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il modello biologico scelto per il mio lavoro di dottorato è stato *D. dendriticum*, un trematode diffuso in diverse specie animali ed agente di una zoonosi *food-borne*. In particolare, questo studio si è proposto di approfondire le nostre conoscenze su questo parassita, focalizzandoci sugli aspetti epidemiologici, biologici e molecolari. Infatti, per poter sviluppare misure di profilassi, per programmi sia di salute pubblica che veterinaria, è necessario approfondire le complesse interazioni che intercorrono tra questi differenti aspetti (Hurtrez-Boussès et al., 2001).

I risultati di questa tesi hanno dato un importante contributo alle conoscenze relative alla epidemiologia della dicrocoeliosi in Campania ed hanno consentito di caratterizzare le regioni ITS2 e 28S del rDNA di *D. dendriticum*. Inoltre, hanno fornito dati preliminari sui meccanismi molecolari mediati dall'interazione ospite-parassita.

Per quanto riguarda l'indagine epidemiologica, la presenza di *D. dendriticum* è stata riscontrata nel 66,9% degli allevamenti ovini esaminati nella Regione Campania. Questi risultati sono in linea con quelli riscontrati in Calabria (province di Catanzaro, Cosenza e Crotona - 48% ) (Veneziano et al., 1998), in un'area appenninica a cavallo di tre regioni (Campania, Puglia e Basilicata - 67,5%) (Cringoli et al., 2002), nel Lazio (57,7%) (Cringoli, 2003) ed in Basilicata (61,2%) (Bosco et al., 2011; Cringoli, 2012).

Tali dati confermano che la dicrocoeliosi è una parassitosi endemica negli allevamenti ovini della nostra penisola, sebbene spesso sottostimata. Solo attraverso la conoscenza della sua epidemiologia, si può porre rimedio alla diffusione di questa infezione parassitaria ed ai conseguenti effetti negativi sulle *performances* e sulla produttività degli animali da reddito (Cringoli et al., 2008).

Un dato molto interessante si è ottenuto dallo studio epidemiologico della dicrocoeliosi in scoiattoli considerati come nuovi “pets”. Questi animali sono divenuti sempre più presenti nelle nostre case come animali da compagnia e come tali sta crescendo l’interesse in medicina veterinaria. Negli ultimi anni, infatti stanno aumentando gli studi su questi “animali esotici” non convenzionali anche in ambito parassitologico (Rinaldi et al., 2012; d’Ovidio et al., 2014a). I risultati ottenuti dal presente studio mostrano una prevalenza di *D. dendriticum* del 10% negli scoiattoli in esame ed in accordo con quelli ottenuti in precedenza da Shimalov e Shimalov (2002) dimostrano come tali animali siano suscettibili all’infezione sostenuta dal piccolo distoma epatico. Inoltre tali studi hanno messo in evidenza come gli “animali esotici” siano *resevoir* di molte parassitosi, sottolineando l’importanza di effettuare appropriati programmi di controllo dal momento che molte di queste parassitosi sono di interesse zoonotico (d’Ovidio et al., 2014b).

Per quanto riguarda le analisi molecolari, i risultati di questo studio hanno innanzitutto evidenziato che tutti gli esemplari di *Dicrocoelium* esaminati, isolati da bovini ed ovini provenienti da diverse località del sud Italia, appartengono alla specie *D. dendriticum*.

Sebbene studi precedenti abbiano rilevato un’elevata variabilità nelle popolazioni di *D. dendriticum*, sia in base a parametri genetici (Sandoval et al., 1999) che morfologici (Birova e Macko, 1987; Macko e Birova, 1989), in questo lavoro è stata riscontrata una variabilità intra-specie inferiore all’1% (0,25%-0,50%) per quanto riguarda la regione ITS-2 e pari a zero per la regione 28S. Questi dati, invece, sono in linea con quelli riscontrati da Gorjipoor et al. (2013) che hanno riscontrato una variabilità intra-specie pari a 0-0,42%.

Di contro, dal confronto tra le sequenze di *D. dendriticum* ottenute e quella di *D. hospes* presenti in GenBank, è stata rilevata una variabilità inter-specie compresa tra 8,2% e 8,5% per quanto riguarda la regione ITS-2. La variabilità inter-specie calcolata per la 28S è risultata, invece, nettamente inferiore, con valori di 0,5-1,6%. Questo dato è in linea con quanto atteso, essendo la 28S una regione altamente conservata (Nolan e Cribb, 2005).

Per quanto riguarda la regione 28S, Otranto et al. (2007) hanno rilevato valori di variabilità inter-specifica pari a 1,4 e 1,7% tra *D. hospes* e *D. dendriticum* e tra *D. hospes* e *D. chinensis*, rispettivamente.

Analoghi studi condotti su altre specie di trematodi hanno evidenziato risultati simili riguardo la regione ITS-2; infatti, la variabilità inter-specifica tra i Trematodi epatici *Fasciola hepatica* e *F. gigantica* è del 2,8% e tra *F. hepatica* e *F. magna* è del 13,2% (Adlard et al., 1993); la variabilità inter-specifica tra i Trematodi ruminali *Calicophoron daubneyi* e *C. calicophorum* è del 2,8% e tra *C. daubneyi* e *C. microbothrioides* è del 2,6% (Rinaldi et al., 2005).

Infine, un altro aspetto di *D. dendriticum*, preso in considerazione nel nostro studio, è stato il suo potenziale coinvolgimento nella tumorigenesi. *D. dendriticum*, infatti, è una specie della classe dei Trematodi, a cui appartengono anche specie (*S. haematobium*, *O. viverrini* e *C. sinensis*) coinvolte in processi neoplastici (Fried et al., 2011). Per tale motivo abbiamo studiato l'effetto degli estratti proteici di *D. dendriticum* in cellule di epatocarcinoma umano (HepG2 e HuH7). I risultati ottenuti dal nostro studio mostrano che *D. dendriticum* non ha effetti su processi neoplastici quali proliferazione e apoptosi, come invece è stato riscontrato in studi condotti in precedenza su *S. haematobium*, *O. viverrini* e *C. sinensis* (Thuwajit et al., 2004; Kim et al., 2008; Botelho et al., 2009; Botelho et al., 2011), tuttavia i risultati mostrano che *D. dendriticum* induce uno stress

ossidativo in cellule di epatocarcinoma umano. Questo risultato è in linea con quanto riportato in molti lavori che dimostrano come le infezioni parassitarie siano associate a meccanismi di difesa da parte dell'ospite. In particolare, uno dei meccanismi di difesa, derivanti dall'interazione ospite-parassita, è la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Boczon et al., 1996; Sanchez-Campos et al., 1999). I ROS sono prodotti normalmente durante i processi metabolici, ma la percentuale di produzione aumenta durante alcune infezioni parassitarie quali ad esempio quelle da *F. hepatica* in ovini (SalehMostafa, 2008) e ratti (Kolodziejczyk et al., 2005) e da *D. dendriticum* in ovini (Simsek et al., 2006) e criceti (Sanchez-Campos et al., 1999). L'accumulo di questi ROS nelle cellule può danneggiare diverse biomolecole, e tra queste i lipidi sono probabilmente le più suscettibili se non controllate da un appropriato sistema antiossidante (Bahrami et al., 2014). Uno dei principali prodotti tossici della perossidazione lipidica è la malondialdeide (MDA). Recentemente, Bahrami et al. (2014) hanno riscontrato alti livelli di MDA in associazione con il leiomioma del fegato. Questo dato risulta particolarmente importante in considerazione del fatto che alti livelli di MDA sono stati riscontrati in un lavoro condotto da Değer et al. (2008) su 18 pecore con infezione mista da *F. hepatica*, *F. gigantica* e *D. dendriticum* (il numero minimo e massimo dei parassiti presenti a livello epatico era: 6-35, 1-7 e 300-5156, rispettivamente). Questi risultati pongono la necessità di effettuare ulteriori indagini per chiarire i complessi meccanismi che scaturiscono dall'interazione ospite-parassita e per definire meglio l'implicazione oncogenica di *D. dendriticum*.

In conclusione, considerando che le parassitosi rientrano nelle patologie più comuni, è auspicabile approfondire l'argomento avvalendosi anche di nuove tecniche di genomica, proteomica e biologia molecolare per studiare la biochimica dei parassiti ed il loro coinvolgimento in processi neoplastici.

## **Bibliografia**

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.

Ahmed M., Singh M.N., Bera A.K., Bandyopadhyay S., Bhattacharya D. 2011. Molecular basis for identification of species/isolates of gastrointestinal nematode parasites. *Asian Pac J Trop Med*; 4(8):589-593.

Ali H.F.B., Pritchard D.I., Stanssens P. 1996. Investigation of a novel hookworm glycoprotein, neutrophil inhibitory factor (NIF), as a potential vaccine candidate against human hookworm infection. *Parassitologia*; 38: 182.

Alunda J.M., Rojo-Vázquez F.A. 1983. Survival and infectivity of *Dicrocoelium dendriticum* eggs under field conditions in NW Spain. *Vet. Parasitol*; 13: 245-249.

Ambrosi M. 1981. Elmintiasi degli erbivori al pascolo: indicazioni epidemiologiche. *Parassitologia*; 23 (1,2,3): 303-311.

Ambrosi M. 1995. Parassitologia zootecnica. Ed. Edagricole, Bologna.

Ambrosi M., Adorasio P.L., Grelloni V. 1986. Endoparassitosi dei bovini nelle aree appenniniche: indagini orientative lungo la 55 dorsale umbro-marchigiana. *Atti Società Italiana di Buiatria*; 571-577.

Ambrosi M., Baldelli B., Piergili Fioretti D., Polidori G.A., Girelloni V., Moretti A., Principato M. 1980. Dicroceliosi ovina: insorgenza e decorso della infezione da *Dicrocoelium dendriticum* studiati con metodi parassitologici e sierologici (ELISA) in quattro gruppi di ovini di traccia. *Rivista di Parassitologia*; 3: 299-307.

Ambrosini E., Barcaccia E., Mondini S. 1994. Parassitosi bovine. *Obiettivi e Documenti Vet*; 5: 29-34.

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.

Anshary H., Sriwulan, Freeman M.A., Ogawa K. 2014. Occurrence and molecular identification of *Anisakis dujardin*, 1845 from marine fish in southern makassar strait, Indonesia. *Korean J Parasitol*; 52(1): 9-19.

Asanji M.F., Williams M.O. 1984. The effect of sex on seasonal variation on single and double infection of cattle in Sierra Leone by *Dicrocoelium hospes* and *Fasciola gigantica*. *Vet Parasitol*; 15: 247-255.

Ashrafi K. 2010. Human dicrocoeliasis in northern Iran: two case reports from Gilan province. *Ann Trop Med Parasitol*; 104(4):351-353.

Badie A., Rodelaud D. 1988. Les fourmis parasitées par *Dicrocoelium lanceolatum* Rudolphi en Limousin. Les relations avec le support végétal. *Rev Med Vet*; 139: 629-633.

Bahrami S., Esmailzadeh S., Oryan A. 2014. Role of oxidative stress in concomitant occurrence of *Fasciola gigantica* and leiomyoma in cattle. *Vet Parasitol*; [Epub ahead of print].

Bandyopadhyay K., Kellar K.L., Moura I., Casaqui 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): 2835-2840.

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.

Barker G.C. 2002. Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 96 (Suppl 1): S21-24.

Barnard J.W., Biro M.G., Lo S.K., Ohno S., Carozza M.A., Moyle M., Soule H.R., Malik A.B. 1995. Neutrophil inhibitory factor prevents neutrophil-dependent lung injury. *J Immunol*; 155: 4876-4881.

Battelli G., Poglayen G., Martini M. 1987. Indagine sulla diffusione della fascioliasi bovina in provincia di Firenze. *Summa*; 4: 45-49.

Bauer C., Siaplaouras S., Soule H.R., Moyle M., Marzi I. 1995. A natural glycoprotein inhibitor (NIF) of CD11b/CD18 reduces leukocyte adhesion in the liver after hemorrhagic shock. *Shock* ; 43: 187-192.

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): 193-199.

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): 1926-1927.

Birova V., Macko J.K. 1987. On the variability of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) in domestic and free-living animals. III. On variability of organophenotes from sheep and cattle in East Slovakia. *Helminthologia*; 24: 197-208.

Bisset S.A., Knight J.S., Bouchet C.L. 2014. A multiplex PCR-based method to identify strongylid parasite larvae recovered from ovine faecal cultures and/or pasture samples. *Vet Parasitol*; 200(1-2): 117-127.

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.

Boczoń K., Hadaś E., Wandurska-Nowak E., Derda M. 1996. A stimulation of antioxidants in muscles of *Trichinella spiralis* infected rats. *Acta Parasitol*; 41: 136-138.

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): 668-674.

Boray J.C. 1985. Flukes of domestic animals. In: Gafaar S.M., Howard W.E., Marsh R.E. (Eds.), *Parasites, Pests and Predators*. Elsevier, Amsterdam, pp. 179-218.

Bosco A., Rinaldi L., Musella V., Pintus D., Santaniello M., Morgoglione M.E., Zacometti G., Cringoli G. 2011. Helminths in sheep farms in the Basilicata Region (Southern Italy). *Atti S.I.S.Vet*; 111-113.

Bosco A., Rinaldi L., Salamina V., Santaniello M., Morgoglione M.E., Guariglia I., Cappelli G., Scala A., Cringoli G. 2012. Prova controllata di campo sull'efficacia dell'albendazolo micronizzato (VALBAZEN 1,9 %) verso *Dicrocoelium dendriticum* in ovini naturalmente parassitati. *Atti XX Congresso SIPAOC*; 11.

Botelho M., Oliveira P., Gomes J., Gartner F., Lopes C., da Costa J.M., Machado J.C. 2009. Tumourigenic effect of *Schistosoma haematobium* total antigen in mammalian cells. *Int J Exp Pathol*; 90(4): 448-453.

Botelho M.C., Oliveira P.A., Lopes C., Correia da Costa J.M., Machado J.C. 2011. Urothelial dysplasia and inflammation induced by *Schistosoma haematobium* total antigen instillation in mice normal urothelium. *Urol Oncol*; 29(6): 809-814.

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): 440-446.

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): 324-328.

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.

Bruschi F. 1997. Modulazione delle cellule infiammatorie nelle infezioni da elminti. *Ann Ist Super Sanità*; 4: 541-549.

Cabeza-Barrera I., Cabezas-Fernández T., Salas Coronas J., Vázquez Villegas J., Cobo F. 2011. *Dicrocoelium dendriticum*: an emerging spurious infection in a geographic area with a high level of immigration. *Ann Trop Med Parasitol*; 105(5): 403-406.

Calamel M. 1977. Application de la technique d'immunofluorescence indirecte a l'étude épidémiologique de la dicrocoeliose. *Rec Méd Vét*; 153: 343-348.

Camara L., Pfister K., Aeschlimann A. 1996. Analyse histopathologique de foie de bovin infesté par *Dicrocoelium dendriticum*. *Vet Res*; 27: 87-92.

Campo R., Manga-González M.Y., González-Lanza C. 2000. Relationship between egg output and parasitic burden in lambs experimentally infected with different doses of *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). *Vet Parasitol*; 87: 139-149.

Campo R., Manga-González M.Y., González-Lanza C., Rollinson D., Sandoval H. 1998. Characterization of adult *Dicrocoelium dendriticum* by isoelectric focusing. *J Helminthol*; 72: 109-116.

Casarsa L. 1980. *Parassitologia degli animali domestici*. Edizioni Medico Scientifiche, Torino.

Ceccarelli M., Galluzzi L., Migliazzo A., Magnani M. 2014. Detection and Characterization of *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* by SYBR Green-Based Real-Time PCR and High Resolution Melt Analysis Targeting Kinetoplast Minicircle DNA. *PLoS One*; 9(2): e88845.

Cengiz Z.T., Yilmaz H., Dulger A.C., Cicek M. 2010. Human infection with *Dicrocoelium dendriticum* in Turkey. *Ann Saudi Med*; 30(2):159-61.

Chartier C., Reche B. 1992. Gastrointestinal helminths and lungworms of french dairy goats: prevalence and geographical distribution in poitou-charentes. *Vet Res Commun*; 16: 327-335.

Chen X, Kwok PY. 1999. Homogeneous genotyping assays for single nucleotide polymorphisms with fluorescence resonance energy transfer detection. *Genet Anal*; 14(5-6):157-163.

Chilton N.B., Gasser R.B., Beveridge I. 1997. Phylogenetic relationships of australian Stongyloid Nematodes inferred from Ribosomal DNA sequence data. *Int J Parasitol*; 27(12): 1481-1494.

Collins F.H., Petrarca V., Mpofu 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.

Condoleo R.U., Rinaldi L., Santaniello M., Schioppi M., Penna L., Pergameno G., Cringoli G. 2005. Helminths in buffalo farms from southern Lazio: what's new? *Atti III Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo*; 215.

Corba J., Krupicer I. 1992. Efficacy of intraruminal albendazole boluses against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Parasitol Res*; 78: 640-642.

Corba J., Krupicer I., Legény J., Juris P., Vesely L. 1991. Effect of a controlled-release albendazole capsule on parasitism and productivity of sheep. *Vet Parasitol*; 40: 273-279.

Cotton R.G.H. 1997. Mutation Detection. Oxford University Press., Oxford.

Cringoli G. 2003. Mappe Parassitologiche 5. Mappe Comunali – tipo 3. I parassiti negli allevamenti ovini della provincia di Latina.

Cringoli G. 2006. FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. *Parassitologia*; 48(3): 381-384.

Cringoli G. 2012a. Mappe Parassitologiche 15. Parassiti in Basilicata - Quadro parassitologico di base negli allevamenti bovini ed ovini.

Cringoli G. 2012b. Copromicroscopic diagnosis of dicrocoeliosis: what's new? *Atti XXVII Congresso nazionale SOIPA*; 41-43.

Cringoli G., Capuano F., Pagano F. 1993. Ricerche preliminari sugli elminti nell'allevamento bovino in Alta Irpinia (Avellino): i distomi. *Atti S.I.S.Vet*; 1407-1409.

Cringoli G., Guarino A., Fusco G., Merla A., Bani A. 1995. Endoparassiti in allevamenti bufalini della provincia di Caserta: nota 1 - zona settentrionale. *Bubalus Bubalis*; 1, 4: 55-64.

Cringoli G., Occhionero M., Capilongo R. 1992. Indagini sulla diffusione di endoparassiti in bovini allevati in provincia di Campobasso: primi risultati. *Atti S.I.S.Vet*; 46: 1455-1456.

Cringoli G., Rinaldi L. 2014. Helminth-Trematode: *Dicrocoelium dendriticum*. *FOSA*; 2: 124-129.

Cringoli G., Rinaldi L., Albonico M., Bergquist R., Utzinger J. 2013. Geospatial (s)tools: integration of advanced epidemiological sampling and novel diagnostics. *Geospat Health*; 7(2): 399-404.

Cringoli G., Rinaldi L., Maurelli M.P., Utzinger J. 2010. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat Prot*; 5: 503-515.

Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V., Capelli G., Malone J.B. 2002. A cross-sectional coprological survey of liver flukes in 60 cattle and sheep from an area of the southern Italian Apennines. *Vet Parasitol*; 108(2): 137-143.

Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V., Capelli G., Scala A. 2004. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Vet Parasitol*; 123(1,2): 121-131.

Cringoli G., Veneziano V., Jackson F., Vercruysse J., Greer A.W., Fedele V., Mezzino L., Rinaldi L. 2008. Effects of strategic anthelmintic treatments on the milk production of dairy sheep naturally infected by gastrointestinal strongyles. *Vet Parasitol*; 156(3-4): 340-345.

Criscione C.D., Poulin R., Blouin M.S. 2005. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Mol. Ecol*; 14: 2247-2257.

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): 248-253.

Dargie J.D. 1975. Pathogenic processes in parasitic infections. In: Taylor A.E.R., Muller R. (Eds.). Symposium of the British Society of Parasitology, Vol. 13, Blackwell, Oxford. pp. 1-26.

Dargie J.D., Allonby E.W. 1975. Patophysiology of single and challenge infections of *Haemonchus contortus* in Merino sheep: study on the red cell kinetics and the "self-cure" phenomenon. *Int J Parasitol*; 5: 147-157.

d'Ovidio D., Pepe P., Ianniello D., Noviello E., Quinton J., Cringoli G., Rinaldi L. 2014a. First survey of endoparasites in pet ferrets in Italy. *Vet Parasitol*; [IN PRESS].

d'Ovidio D., Rinaldi L., Ianniello D., Donnelly T.M., Pepe P., Capasso M., Cringoli G. 2014b. FLOTAC for diagnosis of endo-parasites in pet squirrels in southern Italy. *Vet Parasitol*; 200(1-2): 221-224.

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.

Değer Y., Ertekin A., Değer S., Mert H. 2008. Lipid peroxidation and antioxidant potential of sheep liver infected naturally with distomatosis. *Turkiye Parazitol Derg*; 32(1): 23-26.

Delatour P., Besse S., Romdane M.N. 1988. Pharmacokinetics and anti-*Dicrocoelium* activity of thiophanate and its major metabolite in ruminants. *Ann Rech Vet*; 19: 119-122.

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: 139-142.

Dubey J.P., Hill D., Zarlenga D., Choudhary S., Ferreira L.R., Oliveira S., Verma S.K., Kwok O.C., Driscoll C.P., Spiker H., Su C. 2013. Isolation and characterization of new genetic types of *Toxoplasma gondii* and prevalence of *Trichinella murrelli* from black bear (*Ursus americanus*). *Vet Parasitol*; 196(1-2): 24-30.

Ducommun D., Pfister K. 1991. Prevalence and distribution of *Dicrocoelium dendriticum* and *Fasciola hepatica* infections in cattle in Switzerland. *Parasitol Res*; 77: 364-366.

Eckert J., Hertzberg H. 1994. Parasite control in transhumant situations. *Vet Parasitol*; 54: 103-125.

Fasanella A., Giangaspero A. 1992. Stadi larvali di *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) nel primo ospite intermedio: morfologia e fasi evolutive. *Atti S.I.S.Vet*; 1427-1428.

Fasanella A., Lia R., Giangaspero A. 1995. *Cerquaria virgata* (Mollusca: Gasteropoda: Pulmonata) hôte intermédiaire de *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) dans la région de Puglia Italie. *Parasite*; 2: 331-333.

Fodde R., Losekoot M. 1994. Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Hum Mut*; 3: 83-94.

Fried B., Reddy A., Mayer D. 2011. Helminths in human carcinogenesis. *Cancer Lett*; 305: 239-249.

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*; 135: 319-326.

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): 1208-1213.

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. 1995. Characterisation of taeniid cestode species by PCR-RFLP of ITS2 ribosomal DNA. *Acta Trop*; 59: 31-40.

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., 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., Zhu X.Q. 1999. Sequence-based analysis of enzymatically amplified DNA fragments by mutation detection techniques. *Parasitol Today*; 15: 462-465.

Gasser R.B., Nansen P., Guldberg P. Fingerprinting sequence variation in ribosomal DNA of parasites by DGGE. *Mol Cell Probes*; 10(2): 99-105.

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.

Genchi C., Pozio E. 2003. De Carneri. *Parassitologia generale e umana*. Ed. CEA.

Gerbi S.A. 1986. The evolution of eukaryotic ribosomal DNA. *Biosystems*; 19: 247-258.

Gomez B.J., Manga Y., Angulo E., Gonzalez C. 1996. Alteraciones histopatológicas producidas por *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) en dos especies de *Cerquaria* (Mollusca) sacrificadas a los tres meses post-infestación. *Iberus*; 14: 189-195.

González-Lanza C., Manga-González M.Y., Campo R., Del-Pozo M.P. 1997. Larval development of *Dicrocoelium dendriticum* in *Cerquaria* (*Xeromagna*) *cespitem arigonis* under controlled laboratory conditions. *J Helminthol*; 71: 311-317.

González-Lanza C., Manga-González M.Y., Campo R., Del-Pozo P., Sandoval H., Oleata A., Ramajo V. 2000. IgG antibody response to ES or somatic antigens of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) in experimentally infected sheep. *Parasitol Res*; 86: 472-479.

González-Lanza C., Manga-González M.Y., Del-Pozo-Carnero P., 1993. Coprological study of the *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea) egg elimination by cattle in highland areas in León province. Northwest Spain *Parasitol Res*; 79: 488-491.

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): 416-421.

Gorjipoor S., Moazeni M., Sharifiyazdi H. 2013. Characterization of *Dicrocoelium dendriticum* haplotypes from sheep and cattle in Iran based on the internal transcribed spacer 2 (ITS-2) and NADH dehydrogenase gene (nad1). *J Helminthol*; 11: 1-7.

Gualdieri L., Rinaldi L., Petrullo L., Morgoglione M.E., Maurelli M.P., Musella V., Piemonte M., Caravano L., Coppola M.G., Cringoli G. 2010. Intestinal parasites in immigrants in the city of Naples (southern Italy). *Acta Trop*; 117(3): 196-201.

Guldberg P., Nedergaard T., Nielsen H.J., Olsen A.C., Ahrenkiel V., Zenthen J. 1997. Single-step-DDGE-based mutation scanning of the p<sub>53</sub> gene: application to genetic diagnosis of colorectal cancer. *Hum Mutat*; 9: 348-355.

Gunsner I., Hanichen T., Maierl J. 1999. Leberegelbefall bei neuweltkameliden. Liver fluke in South American camelids. *Tierarztl Prax*; 27: 187-192.

Güralp N., Tinar R. 1983. Trematodiasis in Turkey: comparative efficacy of triclabendazole and niclofolan against natural infections of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in sheep. *J Helminthol*; 58: 113-116.

Hadfield S.J., Chalmers R.M. 2012. Detection and characterization of *Cryptosporidium cuniculus* by real-time PCR. *Parasitol Res*; 111(3): 1385-1390.

Hayashi K. 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Meth Appl*; 1: 34-38.

Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res*; 6(10): 986-994.

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.

Herrera L.A., Ostrosky-Wegman P. 2001. Do helminths play a role in carcinogenesis? *Trends Parasitol*; 17: 172-175.

Heussler V., Kaufmann H., Glaser I., Ducommun D., Müller C., Dobbelaere D. 1998. A DNA probe for the detection of *Dicrocoelium dendriticum* in ants of *Formica* spp. *Parasitol Res*; 84: 505-508.

Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)*; 11(9): 1026-1030.

Hillis D.M., Dixon M.T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol*; 66: 411-453.

Himonas C.A., Liakos V. 1980. Efficacy of albendazole against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Vet Rec*; 107: 288-289.

Hinaidy H.K. 1983. *Dicrocoelium suppereri* nomen novum (Syn. *D. Orientalis* Sudarikov et Ryjikov 1951), a new trematode for parasite fauna of Austria. *Zentralbl Veterinarmed*; B30: 576.

Hohorst W., Lammler A. 1962. Experimentelle dicrocoeliose-studien. Z. Tropenmed. *Parassit*; 13: 377-396.

Holmes P.H., Dargie J.D., MacLean J.M., Mulligan W. 1968. The anaemia in fasciolosis studies with G-labelled red cells. *J Comp Pathol*; 78: 415-420.

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.

Hurtrez-Boussès S., Meunier C., Durand P., Renaud F. Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes Infect*; 3(10): 841-849.

Imani-Baran A., Yakhchali M., Malekzadeh Viayeh R., Paktarmani R. 2012. Molecular study for detecting the prevalence of *Fasciola gigantica* in field-collected snails of *Radix gedrosiana* (Pulmonata: Lymnaeidae) in northwestern Iran. *Vet Parasitol*; 189(2-4): 374-377.

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.

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): 2065-2071.

Jeandron A., Abdylidaeva G., Usubalieva J., Ensink J.H., Cox J., Matthys B., Rinaldi L., Cringoli G., Utzinger J. 2010. Accuracy of the Kato-Katz, adhesive tape and FLOTAC techniques for helminth diagnosis among children in Kyrgyzstan. *Acta Trop*; 116(3): 185-192.

Jeandron A., Rinaldi L., Abdylidaeva G., Usubalieva J., Steinmann P., Cringoli G., Utzinger J. 2011. Human infections with *Dicrocoelium dendriticum* in Kyrgyzstan: the tip of the iceberg? *J Parasitol*; 97: 1170-1172.

Jithendran K.P., Bhat T.K. 1996. Prevalence of dicrocoeliosis in sheep and goats in Himachal Pradesh. India. *Vet Parasitol*; 61: 265-271.

Jithendran K.P., Bhat T.K. 1999. Epidemiology of parasitoses in dairy animals in the northwest humid himalayan region of India 66 with particular reference to gastrointestinal nematodes. *Trop An Health Prod*; 31: 205-214.

Jithendran K.P., Vaid J., Krishna L. 1996. Comparative evaluation of agar gel precipitation, counter immunoelectrophoresis and passive haemagglutination tests for the diagnosis of *Dicrocoelium dendriticum* infection in sheep and goats. *Vet Parasitol*; 61: 151-156.

Johnson A.M., Baverstock B.P. 1989. Rapid ribosomal RNA sequencing and the phylogenetic analysis of protists. *Parasitol Today*; 5: 102-105.

Karadag B., Bilici A., Doventas A., Kantarci F., Selcuk D., Dincer N., Oner Y.A., Erdinler D.S. 2005. An unusual case of biliary obstruction caused by *Dicrocoelium dendriticum*. *Scand J Infect Dis*; 37: 385-388.

Kassai T., Takáts C., Fok E., Redl P. 1988. Activity of luxabendazole against liver flukes, gastrointestinal roundworms, and lungworms in naturally infected sheep. *Parasitol Res*; 75: 14-18.

Keiser J., Utzinger J. 2009. Food-borne trematodiasis. *Clin Microbiol Rev*; 22(3): 466-483.

Kim E.M., Kim J.S., Choi M.H., Hong S.T., Bae Y.M. 2008. Effects of excretory/secretory products from *Clonorchis sinensis* and the carcinogen dimethylnitrosamine on the proliferation and cell cycle modulation of human epithelial HEK293T cells. *Korean J Parasitol*; 46(3): 127-132.

Kolodziejczyk L., Siemieniuk E., Skrzydlewska E. 2005. Antioxidant potential of rat liver in experimental infection with *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res*; 96: 367-372.

Krull W.M. 1958. The migratory route of the metacercarie of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 in the definitive host: dicrocoeliidae. *Cornell Vet*; 48: 17-24.

Krull W.M., Mapes C.R. 1952. Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Trematoda Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host *Cionella lubrica* (Müller) IV. Infection experiments involving definitive hosts. *Parasitol Res*; 42: 277-285.

Lay M.J., Wittwer C.T. 1997. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem*; 43(12): 2262-2267.

Le T.H., Blair D., McManus D.P. 2000. Mitochondrial DNA sequences of human schistosomes: the current status. *Int J Parasitol*; 30(3): 283-290.

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): 609-621.

Le T.H., Blair D., McManus D.P. 2002a. Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. *Trends Parasitol*; 18(5): 206-213.

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., Pearson M.S., Blair D., Dai N., Zhang L.H., McManus D.P. 2002b. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*; 124(1): 97-112.

Long E.O., Dawid I.B. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Ann Rev Biochem*; 49: 727-764.

Looss A. 1907. Notizen zur helminthologie aegyptens; VII, weber einige neue trematoden der aegyptischen fauna. *Zentbl F Bakt Abt I*; 43: 478-490.

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.

MacKenzie K. 1990. Cestode parasites as biological tags for mackerel (*Scomber scombrus* L.) in the Northeast Atlantic. *J Cons Int pour l'Explor la Mer*; 46: 155-166.

MacKenzie K. 2002. Parasites as biological tags in population studies of marine organisms: an update. *Parasitology*; 124: S153-S163.

Macko J.K., Birova V. 1989. On the variability of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) in domestic and free- living animals. V. On the variability of hostophenates from free-living Artiodactyla in Slovakia (Czechoslovakia). *Helminthologia*; 26: 177-186.

Magi B., Frati E., Bernini L., Sansoni A. Zanelli G. 2009. *Dicrocoelium dendriticum*: a true infection? *Infez Med*; 2: 115-116.

Manga-González M.Y. 1987. Some aspects of the biology and helminthofauna of *Helicella (Helicella) itala* (Linnaeus, 1758) (Mollusca). Natural infection by Dicrocoeliidae (Trematoda). *Rev Ib Parasitol Vol Extra-ordinario*; 131-148.

Manga-González M.Y., González-Lanza C., Cabanas E., Campo R. 2001. Contributions to and review of dicrocoeliosis, with special reference to the intermediate hosts of *Dicrocoelium dendriticum*. *Parasitology*; 123: 91-114.

Manga-González M.Y., González-Lanza C., Del-Pozo P. 1991. Dynamics of the elimination of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda, Digenea) eggs in the faeces of lambs and ewes in porma basin (León, Nw Spain). *Ann Parasitol Hum Comp*; 66: 57-61.

Manga-González M.Y., González-Lanza C., Del-Pozo-Camero P., Campo R., 1995. Studies on experimental infection by *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) of *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis* (Mollusca) specimens in a natural environment. In: Guerra A., Rolan E., Rocha F. (Eds.). Abstract of the Twelfth International Malacology Congress, Vigo.

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): 231-236.

Marcilla A., Bargues M.D., Mas-Coma S. 2002. A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Mol Cell Prob*; 16: 327-333.

Marcogliese D.J. 2005. Parasites of the superorganism: are they indicators of ecosystem health? *Int J Parasitol*; 35: 705-716.

Martini M., Poglayen G., Verza N., Capelli G. 1986. Fascioliasi e dicroceliasi dei bovini: indagine sulla diffusione e sui fattori di rischio in provincia di Bologna. *Arch Vet Italiano*; 37: 123-130.

Martynova-Vankley A., Syvyk A., Teplova I., Hume M., Nalian A. 2008. Rapid detection of avian *Eimeria* species using denaturing gradient gel electrophoresis. *Poult Sci*; 87(9): 1707-1713.

Mattes O. 1936. Der entwicklungsgang des lanzettegels *Dicrocoelium lanceatum*. *Z Parasitkde*; 8: 371-430.

Mattiucci S., Abaunza P., Ramadori L., Nascetti G. 2004. Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition. *J Fish Biol*; 65(2): 495-510.

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., Le T.H., Blair D. 2004. Genomics of parasitic flatworms. *Int J Parasitol*; 34(2): 153-158.

McManus D.P., Thompson R.C.A. 2003. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology*; 127 (Suppl): S37-S51.

Michot B., Despres L., Bonhomme F., Bachellerie J.P. 1993. Conserved secondary structures in the ITS2 of trematode pre-RNA. *Fed Europ Bioch Sciences Lett*; 316: 242-252.

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.

Musella V., Catelan D., Rinaldi L., Lagazio C., Cringoli G., Biggeri A. 2011. Covariate selection in multivariate spatial analysis of ovine parasitic infection. *Prev Vet Med*; 99: 69-77.

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., 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): 633-635.

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.

Neuhaus W. 1936. Untersuchungen über bau und entwicklung der lanzettegel-cercarie (*Cercaris vitrina*) und klarstellung des infectionsvorganges beim endwirt. *Z Parasitkde*; 8: 431-473.

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: 295-299.

Nissen S., Al-Jubury A., Hansen T.V., Olsen A., Christensen H., Thamsborg S.M., Nejsum P. 2012. Genetic analysis of *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* recovered from humans and pigs in a sympatric setting in Uganda. *Vet Parasitol*; 188(1-2): 68-77.

Nolan M., Cribb T. 2005. The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. *Adv Parasitol*; 60: 101-116.

Onac D., Györke A., Oltean M., Gavrea R., Cozma V. 2013. First detection of *Echinococcus granulosus* G1 and G7 in wild boars (*Sus scrofa*) and red deer (*Cervus elaphus*) in Romania using PCR and PCR-RFLP techniques. *Vet Parasitol*; 193(1-3): 289-291.

Onar E. 1990. Efficacy of thiophanate and albendazole against natural infections of *Dicrocoelium dendriticum*, *Fasciola hepatica*, and

gastrointestinal nematodes and cestodes in sheep, and gastrointestinal nematodes and cestodes in sheep. *Vet Parasitol*; 35: 139-145.

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.

Otranto D., Rehbein S., Weigl S., Cantacessi C., Parisi A., Lia R.P., Olson P.D. 2007. Morphological and molecular differentiation between *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) and *Dicrocoelium chinensis* (Sudarikov and Ryjikov, 1951) Tang and Tang, 1978 (Platyhelminthes: Digenea). *Acta Trop*; 104: 91-98.

Otranto D., Traversa D. 2003. Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease. *Trends Parasitol*; 9(1):12-15.

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): 185-188.

Pampiglione S., Canestri Trotti G. 1999. *Guida allo studio della parassitologia*. Società Editrice Esculapio.

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): 351-362.

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., 1997. PCR amplification of insect ribosomal DNA. In : Molecular biology of insect disease vectors: A methods manual. Chapman & Hall.

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.

Pavoncelli R., Tampieri M.P. 1978. The occurrence of hepatic trematodes in sheep from Emilia-Romagna. *Parassitologia*; 20(1-3): 217-220.

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: 915-919.

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): 359-363.

Pièrgili Fioretti D. 2012. *Dicrocoelium dendriticum*: epidemiological characteristics of a parasite of ruminants – Simposio 3. *Atti XXVII Congresso nazionale SOIPA*; 37-39.

Pièrgili Fioretti D., Baldelli B., Ambrosi M., Polidori G.A., Moretti A. 1980. Il metodo ELISA per la ricerca di anticorpi in ovini parassitati da *Dicrocoelium dendriticum*. *Rivista di Parassitologia*; 3: 289-292.

Pietrobelli M., Ciani M., Nicoloso P., Silvestrelli L. 1988. Parassitosi dell'apparato digerente del bovino: indagini preliminari in Friuli Venezia Giulia. *Parassitologia*; 30:142-143.

Pyo K.H., Kang E.Y., Hwang Y.S., Jun H.C., Sohn W.M., Cho S.H., Lee W.J., Chai J.Y., Shin E.H. 2013. Species identification of medically important trematodes in aquatic food samples using PCR-RFLP targeting 18S rRNA. *Foodborne Pathog Dis*;10(3): 290-292.

Poglayen G., Martini M., Sproviero C.D., Agretti D. 1989. Endoparassitosi bovine in Val d'Aveto (Genova). *Obiettivi e Documenti Vet*; 2: 49-51.

Puccini V. 1992. Guida alle Malattie Parassitarie degli animali domestici. Edagricole.

Puccini V., Urbano L. 1982. Le elmintiasi dei bovini di razza podalica allevati sul promontorio del Gargano. *Terra pugliese*; 9: 7-13.

Reddy G.R. 1995. Determining the sequence of parasite DNA. *Parasitol Today*;11: 37-42.

Rehbein S., Kokott S., Lindner T., 1999. Evaluation of techniques for the enumeration of *Dicrocoelium* eggs in sheep faeces. *Zentralbl Veterinarmed A*; 46: 133-139.

Restani R., Pietrobelli M. 1997. Distomatosi epatiche degli ovi-caprini. *Obiettivi e Documenti Vet*; 12(Suppl): 15-25.

Rinaldi L., Coles G.C., Maurelli M.P., Musella V., Cringoli G. 2011. Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. *Vet Parasitol*; 177: 345-352.

Rinaldi L., Perugini A.G., Capuano F., Fenizia D., Musella V., Veneziano V., Cringoli G. 2005. 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.

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.

Robinson K., Bellaby T., Chan C., Wakelin D. 1995. High levels of protection induced by a 40-mer synthetic peptide vaccine against the intestinal nematode parasite *Trichinella spiralis*. *Immunology*; 86: 495-498.

Rojo-Vazquez F.A., Meana A., Tarazona J.M., Duncan J.L. 1989. The efficacy of netobimin, 15 mg/kg, against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Vet Rec*; 124: 512-513.

Rosenthal B.M. 2001. Defining and interpreting intraspecific molecular variation. *Vet Parasitol*; 101(3-4): 187-200.

Rudolphi C.A. 1819. Entozoorum synopsis cui accedunt mantissa duplex et incidet loclupetissimi Sumtibus Augusti Rucker, Berolini.

Saiki R.K., Scharf S.J., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H., Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle anemia. *Science*; 230: 1350-1354.

Saleh Mostafa A., 2008. Circulating oxidative stress status in desert sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol*; 154: 262-269.

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.

Sanchez-Andrade R., Paz-Silva A., Suarez J.L., Arias M., Lopez C., Morrondo P., Scala A. 2003. Serum antibodies to *Dicrocoelium dendriticum* in sheep from Sardinia (Italy). *Prev Vet Med*; 57(1-2): 1-5.

Sanchez-Campos S., Gonzàlez P., Ferreras C., Gacia Jeglesias M.J., Gonzàlez Gallego J., Tunon M.J. 2000. Morphologic and biochemical changes caused by experimentally induced dicrocoeliosis in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Comp Med*; 50: 147-152.

Sanchez-Campos S., Tunon Gonzalez P., Gonzalez-Gallego J., 1999. Oxidative stress and changes in liver antioxidant enzymes induced by experimental dicrocoeliosis in hamsters. *Parasitol Res*; 85: 468-474.

Sandoval H., Manga-Gonzàlez Y., Campo R., Garcia P., Castro J.M., Pèrez de la Vega M. 1999. Preliminary study on genetic variability of

*Dicrocoelium dendriticum* determined by random amplified polymorphic DNA. *Parasitol Int*; 48: 21-26.

Sanna G., Bianco G.M., Pipia A.P., Dore F., Varcasia A., Scala A. 2012. Dicrocoeliosis in cattle: epidemiological updates in Sardinia and anthelmintic field trial. *Atti XXVII Congresso nazionale SOIPA*; 269.

Sanz F., Tarazona J.M., Jurado R., Frías J., Tarazona J.V., Duncan J.L. 1987. An evaluation of the efficacy of netobimin against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Vet Rec*; 17: 57-58.

Savitskii I.G., Ponomareva A.M. 1984. Diagnosis of ovine dicrocoeliasis by the ELISA (in Russian). *Veterinariya*; 1: 43-44.

Scala A. 2006. L'esame parassitologico diretto e la sua razionale applicazione nell'allevamento dei piccoli ruminanti. *Atti XVII Congresso SIPAOC*; 73-76.

Scala A., Chignine C., Sardo D., Garippa G., Sanchez-Andrade R. 2002. Test diagnostici per la dicrocoeliosi ovina a confronto: copro diagnosi mediante sedimentazione ed ELISA indiretta. *Atti S.I.S.Vet.*; 56: 201-202.

Scala A., Ligios C., Satta G., Gaetani W., Sini T. 1995. Monitoraggio parassitologico in bovini allevati allo stato brado nel nord-Sardegna. *Atti S.I.S.Vet.*; 49:194.

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.

Schröder L., Geyer E. 1976. Experimentelle Dicrocoeliose: Bildung Humoraler Antikörper Beim Goldhamster (*Mesocricetus auratus*, waterhouse). *Behring Inst Mitt*; 60: 24-37.

Schuster R., 1991. Factors influencing the metacercarial intensity in ants and the size of *Dicrocoelium dendriticum* metacercarial cysts. *J Helminthol*; 65: 275-279.

Schuster R. 1992. Zur beeinflussung von *Helicella obvia* durch *Dicrocoelium-Parthenitae*. *Angew Parasitol*; 33: 61-64.

Schuster R. 1993. Infection patterns in the first intermediate host of *Dicrocoelium dendriticum*. *Vet Parasitol*; 47: 235-243.

Shahnazi M., Hejazi H., Salehi M., Andalib A.R. 2011. Molecular characterization of human and animal *Echinococcus granulosus* isolates in Isfahan, Iran. *Acta Trop*; 117(1): 47-50.

Shimalov V.V., Shimalov V.T. 2002. Helminth fauna of the red squirrel (*Sciurus vulgaris* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie. *Parasitol Res*; 88(11): 1008.

Simsek S., Yuce A., Utuk A.E. 2006. Determination of serum malondialdehyde levels in sheep naturally infected with *Dicrocoelium dendriticum*. *Firat Univ Saglik Bil Dergisi*; 20: 217-220.

Sing A., Tybus K., Facler I. 2008. Acute urticaria associated with *Dicrocoelium dendriticum* infestation. *Indian J Med Microbiol*; 26: 96-98.

Singh B. 1997. Molecular Methods for Diagnosis and Epidemiological Studies of Parasitic Infections. *Int J Parasitol*; 27(10): 1135-1145.

Somvanshi R., Kaul G.L. 1989. Dicrocoeliasis in pashima goats. *Ind Vet Med J*; 13: 42-43.

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.

Subba Raju B.V., Singh R., Sreenivas G., Singh S., Salotra P. 2008. Genetic fingerprinting and identification of differentially expressed genes in isolates of *Leishmania donovani* from Indian patients of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Parasitology*; 135(Pt 1): 23-32.

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.

Taylor MA, Coop RL, Wall RL, 2010. *Parassitologia e Malattie Parassitarie degli Animali*. EMSI, Roma.

Tang C., Tang Z., Tang L., Cui Q., Lu H., Qian Y. 1983. Studies on the biology and epizootiology of *Dicrocoelium chinensis* in the eastern Inner Mongol Autonomous region. *Acta Zool Sinica*; 29: 340-349 (in Chinese).

Tarry D.W. 1969. *Dicrocoelium dendriticum*: the life cycle in Britain. *J Helminthol*; 43: 413-416.

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): 11359-11364.

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.

Theodoridis Y., Duncan J.L., MacLean J.M., Himonas C.A., 1991. Pathophysiological studies on *Dicrocoelium dendriticum* infection in sheep. *Vet Parasitol*; 39: 61-66.

Thomas F., Verneau O., de Meeûs T., Renaud F. 1996. Parasites as to host evolutionary prints: insights into host evolution from parasitological data. *Int J Parasitol*; 26(7): 677-686.

Thuwajit C., Thuwajit P., Kaewkes S., Sripa B., Uchida K., Miwa M., Wongkham S. 2004. Increased cell proliferation of mouse fibroblast NIH-3T3 in vitro induced by excretory/secretory product(s) from *Opisthorchis viverrini*. *Parasitology*; 129(Pt 4): 455-464.

Tinar B., Dogan H., Demir S., Akyol C.V. 1988. Treatment of *Dicrocoelium dendriticum* with a combination of thiophanate and brotianide. *Vet Rec*; 123: 650-651.

Tyagi S, Kramer FR. 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*; 14(3): 303-308.

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) : 267-271.

Veneziano V., Rinaldi L., Capogreco B., Maffei P., Capuano F., Cringoli G. 1998. Indagini parassitologiche in allevamenti ovicaprini della Calabria - Nota 1. *Atti XIII Congresso Nazionale SIPAOC*; 279-282.

Veneziano V., Rinaldi L., Santaniello M., Morgoglione M.E., Pennacchio S., Schioppi M., Rufrano D., Ermini L., Cringoli G. 2006a. Prova controllata di campo sull'efficacia dell'albendazolo sulfossido verso *Dicrocoelium dendriticum* in ovini naturalmente infestati. *Atti XVII Congresso Nazionale SIPAOC*.

Veneziano V., Santaniello M., Schioppi M., Morgoglione M.E., Rufrano D., Cringoli G. 2006b. Field trial on the efficacy of netobimin against *Dicrocoelium dendriticum* in naturally infected sheep. *Parassitologia*; 48 (1-2): 202.

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): 95-97.

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): 185-189.

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.

Wedrychowicz H., Bairden K., Pfister K., Armour J. 1984. Local antibody responses in the bile and faeces of sheep infected with *Fasciola hepatica*. *Res Vet Sci*; 37: 44-51.

Welsh J., McClelland C.K. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res*; 18: 7213-7218.

Wenker C., Hatt J.M., Hertzberg H., Ossent P., Hanichen H., BranckA., IsenbùgelE. 1998. Dikrozoliose bei neuweltkameliden. *Tieraztl Prax*; 26: 355-361.

Widmer G., Feng X., Tanriverdi S. 2004. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* with microsatellite markers. *Methods Mol Biol*; 268: 177-187.

Wikler W. 1976. Evolution-oriented ethology, kin selection, and altruistic parasites. *Z Tierpsychol*; 42: 206-214.

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.

WHO. 2007. WHO initiative to estimate the global burden of foodborne diseases. First formal meeting of the Foodborne Disease Burden Epidemiology Group (FERG). WHO, 26-28 November 2007, Geneva, Switzerland.

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): 548-553.

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.

Zali M.R., Mehr A.J., Rezaian M., Meamar A.R., Vaziri S., Mohraz M. 2004. Prevalence of intestinal parasitic pathogens among HIV-positive individuals in Iran. *Jpn J Infect Dis*; 57: 268-270.

Zanini F., Gonzalo R., Perez H., Aparici I., Soto X., Guerrero J., Cerrone G., Elissondo C. 2006. Epidemiological surveillance of ovine hydatidosis in Tierra del Fuego, Patagonia Argentina, 1997-1999. *Vet Parasitol*; 138(3-4): 377-381.

Zarlenga D.S., Geary T., 2001. Preface. *Vet Parasitol*; 101: 171-172.

Zarlenga D.S., Higgins J. 2001. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Vet Parasitol*; 101(3-4): 215-230.

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., Eslami A., Hosseini S.H., McManus D.P., 1998. 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): 329-334.

Zhao G.H., Hu B., Song J.K., Jia Y.Q., Li H.M., Wang C.R., Lin Q., Xu Q.X., Yu S.K., Deng Y. 2014. Characterization of *Oesophagostomum asperum* and *O. columbianum* by internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *J Helminthol*; 88(1):74-81.

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., 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 *Contracaecum osculatum* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae). *Parasitol Res*; 86: 677-689.

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., 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.

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.