



A.D. MDLXII

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Dottorato di Ricerca in
PRODUZIONE E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE
XX CICLO

L'ECHINOCOCCOSI CISTICA
IN SARDEGNA

Coordinatore: Prof. A. M. Cosseddu

Docente Guida: Prof. Giovanni Garippa

Tesi di dottorato del
Dott. Antonio Varcasia

ANNO ACCADEMICO 2006 - 2007

Introduzione

L'Echinococcosi rappresenta un importante problema di sanità pubblica in numerose aree del mondo e assume fra l'altro particolare rilevanza nel bacino del Mediterraneo, dove è considerata una delle principali parassitosi degli animali in produzione zootecnica e riveste un notevole significato sociale per l'alta diffusione nell'uomo (Eckert et al., 2001). Questa importante zoonosi continua ad imperversare in quelle regioni geografiche in cui il binomio ovino-cane è ancora ben rappresentato. E' infatti ormai ampiamente assodato che seppure la parassitosi possa coinvolgere varie specie animali, uomo compreso, sia soprattutto la stretta convivenza tra queste sue specie animali (ovino e cane) il fattore più importante per la persistenza in alcuni distretti geografici colpiti da questa infestazione.

Tutto questo si perpetua ormai da tempo immemorabile, nonostante nei suoi confronti si siano spesso concentrati gli sforzi di varie categorie (veterinari, medici, politici) per cercare di arginare una parassitosi che varie cause (sociali,

economiche e politiche), hanno reso il suo controllo od eradicazione non sempre possibile.

E' il caso ad esempio della Sardegna, in cui l'Echinococcosi Cistica seppure da sempre "massivamente presente", ancora oggi costituisce un problema sanitario per il patrimonio zootecnico e per l'uomo di primario interesse.

Ad oltre dieci anni dall'ultima campagna di eradicazione, abbiamo voluto fornire un aggiornamento epidemiologico sull'Echinococcosi Cistica in alcuni fra i più importanti ospiti intermedi del cestode in Sardegna.

Tassonomia e classificazione biomolecolare del parassita

Nel genere *Echinococcus* sono attualmente incluse, come tassonomicamente valide, quattro specie: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* ed *E. vogeli* (Thompson e McManus, 2002) (Tabella n. 1). La morfologia del parassita adulto e dello stadio larvale (metacestode) è stata per molto tempo il criterio più frequentemente usato per la caratterizzazione della specie, spesso in combinazione con altri parametri, quali quelli biologici ed epidemiologici (Eckert et al., 2001).

Questa variabilità intraspecifica può essere rilevata inoltre sulla base di differenze nella sequenza nucleotidica e si riflette nei caratteri fenotipici, quali ciclo biologico, specificità d'ospite, capacità di sviluppo, patogenicità, antigenicità, sensibilità ai chemioterapici, dinamica di trasmissione ed epidemiologia (Thompson e McManus, 2002).

Nei primi studi epidemiologici, le tecniche usate per la caratterizzazione delle specie e dei ceppi si basavano principalmente su rilievi di tipo morfometrico e/o biochimico e sulla caratterizzazione degli Isoenzimi.

Successivamente, col progresso delle biotecnologie, sono state utilizzate le più sensibili tecniche biomolecolari per l'analisi del DNA, che hanno permesso di ottenere importanti progressi nella differenziazione delle specie e dei ceppi, e hanno confermato la complessità della variabilità genetica all'interno di *E. granulosus* (Thompson e McManus, 2002).

Questa variabilità può essere rilevata tramite l'analisi del DNA mitocondriale (mtDNA) utilizzabile per discriminare organismi strettamente imparentati o mediante il DNA ribosomiale (rDNA) per lo studio dell'eterogeneità genetica.

Le metodiche maggiormente utilizzate sono le seguenti:

- RFLP (Polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione) di DNA ribosomiale o di altre regioni del genoma. Il DNA viene digerito con enzimi di restrizione e i frammenti che risultano dalla digestione vengono separati elettroforeticamente e successivamente analizzati. Recentemente questa tecnica è stata modificata e semplificata grazie all'uso combinato con la PCR (PCR-RFLP).
- Sequenziamento dei geni: le sequenze nucleotidiche dei geni mitocondriali (ad es: CO1 ed NADH) vengono determinate dopo preventiva PCR e successivamente confrontate con quelle presenti in Banca dati (Gene Bank).
- RAPD-PCR (Analisi del polimorfismo di sequenze casuali): è una tecnica in cui il DNA genomico viene amplificato tramite PCR usando dei primers con sequenze scelte arbitrariamente.
- SSCP (Polimorfismo conformazionale degli acidi nucleici a singolo filamento): è un metodo che ha la potenzialità di discriminare mutazioni puntiformi (anche di un singolo nucleotide) in DNA a singola elica.

Attraverso questi criteri di classificazione sono stati evidenziati all'interno della specie *Echinococcus granulosus* diversi ceppi e varianti genetiche riportate nella Tabella 2 e nel Grafico 1 (Thompson e McManus, 2002).

Echinococcus granulosus (E.g.)

Morfobiologia del parassita

E' un cestode di dimensioni variabili da 2 a 7 mm di lunghezza, provvisto di uno scolice con quattro ventose rotonde e di rostello con una doppia corona di uncini, una piccola (22-39 micron) e una grande (31-49 micron) (Casarosa, 1985). Il parassita è normalmente provvisto di tre o quattro proglottidi, che in alcuni casi possono raggiungere anche il numero di sei (Euzeby, 1981). Gli ospiti definitivi sono diversi carnivori, nei confronti dei quali si manifesta una specie-specificità abbastanza marcata. In Italia il cane è da considerarsi in assoluto il più importante ospite definitivo, nel cui intestino tenue si sviluppano i parassiti adulti (le infestazioni nel lupo presentano frequenze bassissime) (Arru et al., 1991; Guberti et al., 1993).

Altri carnivori sono poco sensibili alla parassitosi: ad esempio la volpe (*Vulpis vulpis*) si infesta solo con alcuni "ceppi" di *E. granulosus* o non consente perlomeno in Sardegna lo sviluppo completo del cestode (Deiana et al., 1962; Euzeby, 1971) mentre i felini (gatti compresi) non sembrano suscettibili all'infestazione fatta eccezione per un ceppo che infesta il leone.

L'infestazione avviene mediante l'ingestione delle forme larvali del cestode contenenti protoscolici vitali presenti nei visceri o nelle carni degli ospiti intermedi parassitari (Casarosa, 1985).

A livello intestinale nell'ospite intermedio si ha l'evaginazione dei protoscolici e la loro successiva fissazione alla parete. La formazione delle proglottidi, apprezzabile per la comparsa di un abbozzo genitale, comincia a 11 giorni dall'infestazione, mentre a 14 giorni si osserva già il primo segmento nettamente separato dallo scolice; uno o due giorni più tardi dall'abbozzo genitale si dipartono i rami laterali dell'utero (Thompson et al., 1995).

Dopo l'apparato riproduttore iniziano a formarsi le uova, in tempi che oscillano dai 34 ai 58 giorni dal momento dell'insediamento (periodo prepatente) (Cordero del Campillo et al., 1999). La vita media di *E. granulosus* si stima tra 6-20 mesi, anche se non esistono studi precisi che convalidano questo dato.

Il numero dei parassiti adulti riscontrabile nel cane è variabile: la somministrazione di una stessa quantità di protoscolici determina l'insorgenza nel 95% dei cani sottoposti a tale prova una carica parassitaria compresa tra da 0 a 100.000 elminti (il 72% alberga oltre 1.000 cestodi). Tuttavia i dati delle infestazioni naturali non coincidono con quelli sperimentali, in quanto nel primo caso solo il 2,5% dei cani parassitati solitamente alberga più di 1.000 tenie (Thompson et al., 1995).

Le proglottidi gravide e le uova in esse contenute vengono liberate con le feci nell'ambiente e contribuiscono a contaminare i pascoli, l'acqua ecc., perpetuando il ciclo grazie anche alla estrema resistenza ai fattori chimico-fisici e climatici che le caratterizza (Laws, 1968)

Perché il ciclo biologico continui, le uova devono essere ingerite da un ospite intermedio adatto, rappresentato da diverse specie di ungulati domestici e

selvatici e anche dall'uomo (Casarosa, 1985; Euzeby, 1971; Urquhart et al., 1998).

Nel lume intestinale si realizza la schiusa delle uova che si articola in due fasi: la disgregazione dei blocchi dell'embriofo e l'attivazione dell'oncosfera, detta anche larva esacanta. La prima inizia nello stomaco grazie all'azione proteolitica della pepsina e si completa nell'intestino tenue tramite la pancreaticina. L'oncosfera, attraverso un complesso sistema muscolare responsabile di una serie di movimenti ritmici dell'intero corpo e degli uncini, si libera dai suoi involucri e si ancora tenacemente ai villi della mucosa (Thompson et al., 1995).

Nella fase successiva, entro 30-120 minuti dopo l'ancoraggio, la larva esacanta migra rapidamente attraverso l'epitelio raggiungendo la lamina propria; la penetrazione avviene mediante i movimenti del corpo e degli uncini ed è favorita dalle secrezioni prodotte dalle ghiandole di penetrazione che causano la degenerazione dei tessuti dell'ospite (Euzeby, 1971).

L'oncosfera, sfruttando le vie linfatiche e venose dell'ospite, raggiunge le sedi di localizzazione definitive: fegato e polmoni rappresentano i distretti più parassitati, ma anche reni, milza, tessuto muscolare, SNC, etc., possono essere coinvolti (Urquhart et al., 1998).

Il metacestode maturo prende il nome di cisti idatidea, di forma sferica, ripiena di liquido e tipicamente uniloculare; occasionalmente può dare origine a gruppi di altre cisti figlie che si localizzano all'interno della cisti madre (vescicolizzazione secondaria interna) (Thompson et al., 1995).

*Echinococcus granulosus nel suo ospite definitivo, il cane**Le uova*

Le uova di *Echinococcus granulosus* al momento dell'espulsione dall'ospite definitivo possono trovarsi in differenti stadi evolutivi: mature e quindi immediatamente infestanti, ed immature ma in grado di svilupparsi nell'ambiente esterno in presenza di appropriate condizioni microclimatiche (Gemmel et al., 1996). Hanno dimensioni comprese fra 30-50 x 22-44 micron e sono indifferenziabili dalle uova degli altri tenidi (Foto n. 2) (Euzeby, 1966; Thienpont et al., 1986). L'oncosfera è protetta dall'embriofo, un rivestimento duro ed impermeabile formato da blocchi poligonali di una proteina simile alla cheratina che conferisce all'uovo una forte resistenza alle offese ambientali (Morseth, 1965). Non si sa esattamente quante uova vengano prodotte, in quanto i numeri indicati in bibliografia sono molto variabili (100-1500 per proglottide) (Heat et al., 1991; Thompson et al., 1982); allo stesso modo non si conosce con certezza la frequenza con cui si formano le proglottidi gravide: si stima che nei primi 40 giorni dell'infestazione, se ne formi una ogni 7-14 giorni (Gemmel, 1962; Shantz, 1982).

Le contrazioni stesse delle proglottidi ne favoriscono la loro migrazione a vari centimetri dalla massa fecale; le uova, inoltre, una volta fuori dalla proglottide, possono disperdersi in un'area molto maggiore di quella che si può immaginare ad opera di vettori passivi, come mammiferi, uccelli, artropodi, lombrichi,

molluschi, oltre che attraverso il vento, la pioggia e corsi d'acqua (Cordero del Campillo et al., 1999).

La capacità di sopravvivenza delle uova è maggiore a basse temperature: a 21° C e con sufficiente umidità esse permangono vitali per oltre 28 giorni; alla temperatura di 7° C la loro sopravvivenza è di circa 294 giorni circa. Al di sotto dei 0° C (da -35° a -50°C) le uova possono resistere per 24 ore conservando la loro capacità infestante, mentre a -70° C muoiono nell'arco di poche decine di minuti (Laws, 1968; Thompson et al., 1995). A temperature elevate (60°-100° C) le uova resistono da 1 a 2 minuti.

Tuttavia è il fattore umidità a limitarne la sopravvivenza più della temperatura, al punto che si può dire che in natura l'essiccamento è il principale responsabile della morte delle uova (Laws, 1968).

Nonostante la notevole resistenza in determinate condizioni ambientali, le uova nel tempo subiscono un processo di "invecchiamento" che si manifesta con una riduzione del numero e della sopravvivenza delle forme larvali una volta insediate nell'ospite intermedio (Thompson et al., 1995); in ogni caso anche le uova "invecchiate" sono capaci di evocare una risposta immunitaria completa (Gammel, 1962).

Le metodiche diagnostiche

Coprologia macroscopica

L'esame macroscopico delle feci nel cane permette di individuare eventuali parassiti adulti presenti (Ascaridi), che si rendono facilmente riconoscibili per

la loro forma caratteristica (“a spaghetti”). Inoltre possono essere riscontrate le proglottidi di Cestodi. Alcune di queste sono sicuramente più riconoscibili, come quelle di *Dipylidium caninum* e *Mesocostoides lineatus*, che si distaccano attivamente dalla strobila e sono mobili sulla superficie della massa fecale appena emessa (Euzeby, 1981; Thienpont et al., 1986).

Coprologia microscopica

Esame coprologico per sedimentazione e flottazione delle uova

L’esame copro microscopico delle feci rimane ancora oggi il più importante mezzo diagnostico per le endoparassitosi intestinali del cane. Sono state descritte numerose tecniche e varianti, così come sono numerose le soluzioni ad alto peso specifico utilizzate per la flottazione. Riportiamo per brevità la tecnica di sedimentazione e flottazione utilizzata di routine nel nostro laboratorio.

Per l’esame microscopico delle feci, si prelevano 2 gr. circa di materiale fecale e lo si filtra con un setaccio a maglie non inferiori a 100 micron, omogenando la massa fecale sotto un tenue getto di acqua di fonte in un cono. Si fa sedimentare il tutto per circa 15-20 minuti, si elimina il surnatante e si versano 3-4 ml del sedimento in una provetta da 15 ml. Si aggiunge quindi al sedimento della soluzione flottante con peso specifico variabile da 1100 a 1450, fino a formare all’estremità della provetta un menisco positivo su cui si appoggia un vetrino coprioggetto (Thienpont, 1986). Dopo aver atteso la flottazione delle uova per circa 10 minuti si prende il coprioggetto e lo si

dispone su un vetrino portaoggetto per osservarlo al microscopio ottico (Euzeby, 1981).

Già ad un ingrandimento di 20X si possono osservare le uova dei cestodi, che si presentano tondeggianti e con diametro variabile fra i 25 e i 45 micron, parete spessa ed embrioforo provvisto di uncini.

Resta comunque difficile poter fare una diagnosi differenziale tra *Echinococcus* spp. e altri tenidi attraverso un normale esame copro-microscopico stante la loro similitudine con le diverse specie appartenenti a questo *taxon* che possono parassitare il cane (Foto n. 3) (Aluja, 1987; Craig et al., 1986; Euzeby, 1966). Uniche uova identificabili con certezza risultano quelle di *Dipylidium caninum*, in quanto risultano eliminate conglomerate fra loro a formare le cosiddette capsule ovigere (Foto n. 4).

La coprologia microscopica tuttavia presenta una sensibilità estremamente ridotta nella diagnosi delle infestazioni da cestodi. Infatti le uova di questi vengono eliminate dall'ospite nella maggior parte dei casi ancora racchiuse nell'involucro delle proglottidi gravide, e come tale la coprologia può risultare negativa anche in presenza del parassita adulto nell'apparato intestinale.

Nel caso di *E. granulosus*, le ridotte dimensioni delle proglottidi e le difficoltà di evidenziarle nella massa fecale, complicano o rendono vano l'esame macroscopico.

Tecniche di purificazione e concentrazione

Può rendersi necessario isolare le uova per poi utilizzarle per altre metodiche diagnostiche (ad esempio: estrazione del DNA o preparazione di antigeni

specifici), attraverso tecniche di concentrazione e centrifugazione (Craig et al., 1988; Teleman, 1908).

Interessante e poco indaginosa è la metodica di concentrazione proposta da Mathis et al. (1995), che prevede un'iniziale filtrazione con maglie di 100 micron, e la successiva centrifugazione a 4000 rpm per 15 o 30 minuti con soluzione flottante: nel surnatante si localizzeranno le uova di vari agenti parassitari; quelle dei Cestodi saranno separate utilizzando un'ulteriore filtrazione con matraccio a maglie da 40-50 micron (Mathis et al., 1995).

La diagnosi di Echinococcosi nel cane

La metodica standard fino a poco tempo fa raccomandata dalle direttive WHO/OIE per la diagnosi di Echinococcosi nei cani è il trattamento con il *Bromidrato di Arecolina* (1,75-3,5 mg/kg p.v.). Questo parasimpaticomimetico determina mediante la sua azione sulla muscolatura liscia del tenue, il distacco dei parassiti dalle pareti intestinali e quindi rende possibile la loro evidenziazione nelle feci emesse dopo il trattamento.

Diversi lavori epidemiologici sono stati realizzati con questa metodica che per molto tempo è stata l'unica alternativa all'esame autoptico per la diagnosi specifica. Tuttavia, la tecnica presenta diversi inconvenienti quali le violente e dolorose scariche diarroidiche che colpiscono l'animale trattato, la pericolosità conseguente alla incontrollata dispersione nell'ambiente delle proglottidi mature e la mancata certezza di evidenziare i parassiti immaturi eventualmente presenti nell'ospite: infatti alcuni lavori sperimentali condotti in Tunisia hanno dimostrato come solo il 68% dei cani trattati risponda al trattamento.

Come già precedentemente descritto, la diagnostica copromicroscopica per questa specie parassitaria risulta estremamente problematica, pertanto è importante ricordare: 1) che la presenza di uova di *Echinococcus* spp. nella massa fecale non rappresenta la norma, 2) la coprologia microscopica non rappresenta la tecnica più idonea per diagnosi di Echinococcosi nel cane, 3) il riscontro casuale di uova di tenidi, in caso di sospetta infestazione da *Echinococcus* spp., deve essere confermato con tecniche specifiche quali lo studio dei coproantigeni o tecniche molecolari.

Metodiche immunologiche

Rilevamento dei coproantigeni

Un approccio alternativo alla diagnosi di *Eg* è dato dal rilevamento degli antigeni di secrezione-escrezione del verme adulto nelle feci, i cosiddetti coproantigeni (CA) (Foto n. 5). Antigeni di diverse specie di cestodi sono stati identificati nelle feci, incluse quelli di animali con infezione prepatente e quindi anche in assenza di uova (Allan et al., 1990; Deplazes et al., 1990).

Successivamente Allan et al. (1992) e Deplazes et al. (1992) hanno parallelamente sviluppato delle metodiche immunoenzimatiche (ELISA) per la diagnosi genere-specifica di *Echinococcus* spp. attraverso l'uso di antigeni estratti dalle feci di cane. Queste metodiche hanno il vantaggio di poter processare contemporaneamente un gran numero di campioni con un rischio ridotto per l'operatore non contenendo infatti la soluzione con i CA uova dei cestodi. I test sono capaci di identificare infezioni prepatenti e dimostrano solo

occasionalmente cross-reattività con infestazioni causate da *Taenia hydatigena* (Ahmad et al., 1998; El-Shehabi et al., 2000). Il metodo descritto da Deplazes et al. è inoltre capace di svelare anche infestazioni causate da *E. multilocularis* nelle volpi e garantisce la sicurezza dell'operatore grazie al preventivo congelamento. L'inattivazione del potere infestante delle uova può essere effettuata anche attraverso il trattamento con formalina del campione da esaminare. Tuttavia quest'ultima precauzione, suggerita da Allan et al. (1992), presenta l'inconveniente che il sedimento ottenuto dopo l'estrazione dei CA non è utilizzabile per ulteriori studi e ricerche di tipo biomolecolare per la nota azione denaturante della formaldeide sugli acidi nucleici. I CA vengono normalmente estratti aggiungendo 2 g di feci a 8 ml di PBS a pH 4 (*ratio* 1:4) e centrifugando la miscela fecale per 10 minuti a 4000 rpm. Il surnatante prelevato viene stoccato a -20° fino al suo utilizzo (Varcasia e Scala, 2003). In commercio esistono diversi kits diagnostici che utilizzano normalmente un ELISA con anticorpi policlonali. Tuttavia sono tuttora in corso lavori sperimentali per la validazione di ELISA con anticorpi monoclonali rivolti contro *E. granulosus* (Malgor, 1997), che permetterebbero una maggiore specificità del test e la drastica riduzione delle cross reazioni con altri cestodi (e quindi dei falsi positivi). Nelle feci emesse e lasciate sul campo i CA persistono per un tempo non inferiore ai 15-20 giorni, mentre in quelle conservate in contenitori sigillati possono resistere oltre 13 mesi (Thompson, 1995). La bassa specificità e sensibilità del CA-ELISA test in zone dove si osserva una bassa prevalenza di *E. granulosus* può costituire un fattore limitante l'impiego di questa tecnica; alcuni Autori suggeriscono in questi casi

di affiancare alla metodica la PCR per il rilevamento del DNA specifico del parassita (Deplazes et al., 1999; Dinkel et al., 1998; Mathis et al., 1995). Le cross-reazioni dell'CA-ELISA con altri cestodi appartenenti a *Taenia* spp. possono essere invece un fattore di complicazione in aree dove la parassitosi è endemica e quindi con alte prevalenze di *Echinococcus* e *Tenia*.

Tuttavia in un'ottica di controllo dei problemi relativi alla sanità pubblica nei confronti di questi cestodi, appare chiaro come un'alta prevalenza per *T. hydatigena* nei cani dimostri un effettivo fallimento di tutte le misure di profilassi e controllo anche per l'Echinococcosi, in quanto è evidente in entrambi i casi come i cani abbiano avuto libero accesso ai visceri di animali morti naturalmente e/o macellati (Christofi et al., 2002; Scala et al., 2002). Il rilevamento dei CA, oltre che con l'ELISA può essere condotto tramite il Western Blotting, tuttavia la metodica risulta più complicata e richiede un'attrezzatura più costosa (Guarnera et al., 2000).

CA-ELISA con anticorpi monoclonali

Il rilevamento dei coproantigeni attraverso l'ELISA usando anticorpi policlonali rivolti verso antigeni di secrezione/escrezione (ES) di *Echinococcus granulosus* ha mostrato una sensibilità del 56% e una specificità del 96% comparando i risultati ottenuti con l'esame *post-mortem* di cani naturalmente infestati (Deplazes et al., 1992). Allan et al. (1992), usando un antisiero rivolto verso antigeni somatici sempre per il rilevamento dei coproantigeni ha invece descritto una sensibilità dell' 88%. I falsi negativi

ottenuti sono stati imputati in questi studi ad una bassa concentrazione di parassiti a livello intestinale.

L'alta sensibilità degli anticorpi monoclonali (Mab) verso antigeni specifici dei parassiti può sicuramente aumentare l'affidabilità di questi test. L'anticorpo monoclonale EmA9 prodotto contro antigeni nel tegumento, parenchima e corpuscoli calcarei e dotti escretori di *Echinococcus multilocularis* (Kohn et al., 1995) riconosce anche i tessuti somatici di *E. granulosus* e rileva i suoi coproantigeni nei cani infestati (Malgor et al., 1997). L'utilizzo di questi anticorpi inoltre presenta un grande vantaggio per il personale tecnico, infatti EmA9 rileva epitopi costituiti da carboidrati termoresistenti e quindi il test può essere condotto con campioni sterilizzati col calore (Kohn et al., 1995).

L'attendibilità dei risultati ottenuti attraverso l'ELISA sono stati avvalidati per *E. multilocularis* tramite l'esame *post mortem* di volpi naturalmente infestate in Hokkaido (Giappone) (Morishima et al., 1999).

Il test ha dimostrato un'alta sensibilità (94%) purché siano presenti a livello intestinale più di cinque parassiti, e un'alta specificità (100%) (Morishima et al., 1999).

Questi risultati sono stati confermati per *E. granulosus* da Malgor et al. (1997) che ha rilevato i coproantigeni nel 100% di cani sperimentalmente infestati che albergavano quantità variabili di parassiti provenienti da diversi ospiti intermedi. Cross reazioni verso *T. hydatigena* sono state evidenziate anche con questa metodica, che tuttavia possono essere ridotte o eliminate attraverso lo screening con ulteriori anticorpi monoclonali (Malgor et al., 1997).

Rilevamento degli anticorpi sierici

Un'altra metodica immunologica per la diagnosi dell'Echinococcosi nel cane è quella che sfrutta il rilevamento degli anticorpi specifici nel siero. Tuttavia la presenza dei vermi nell'intestino e la loro scarsa attitudine ad evocare una forte risposta immunitaria sistemica hanno da sempre fatto sorgere accesi dibattiti sulla reale potenzialità di questo test diagnostico. Gli studi effettuati nel corso degli anni passati hanno comunque mostrato in maniera inequivocabile come i cani producano una risposta anticorpale contro i cestodi tenidi e come questa sia stadio-specifica e rilevabile prima e dopo la patenza dell'infestazione (Thompson, 1995). Alcuni gruppi di ricerca hanno svolto approfondite indagini sulle reali potenzialità della diagnosi mediante sierologia dell'Echinococcosi nei cani in aree dove la parassitosi è endemica (Gasser et al., 1988; Gasser et al., 1990; Gasser et al., 1992; Gasser et al., 1993; Jenkins et al., 1990). Questi studi hanno rivelato che tali tests hanno una bassa sensibilità e la loro specificità non è stata ancora ben chiarita, infatti oltre il 60% dei cani infestati sono risultati negativi quando testati per anticorpi IgG specifici (Jenkins et al., 1990).

Ulteriori messe a punto nella metodica e nella ricerca di diverse classi anticorpali ne hanno aumentato la sensibilità (Gasser et al., 1992); tuttavia non si è ancora riuscito a spiegare come alcuni cani, anche con cariche parassitarie elevate, risultino negativi sierologicamente (Craig et al., 1995).

Un ulteriore problema legato alla sierologia è dato dai falsi positivi riscontrati soprattutto in zone endemiche; a questo proposito è ipotizzabile che l'animale sia stato infestato in passato dal cestode e quindi il test riferisca una reale positività non supportata dal rinvenimento del parassita o che effettivamente l'animale sia “*parasite-free*” e pertanto trattasi di reali falsi positivi (Gasser et al., 1993).

Studi comparativi fra la diagnosi mediante CA e la sierologia per la ricerca di *E. granulosus* su cani infestati hanno mostrato come il test dei coproantigeni sia 2,5 volte più sensibile rispetto alla diagnosi mediante sierologia (Craig et al., 1995; Walters et al., 1992).

Immunofluorescenza indiretta

E' stato messo a punto un metodo per la diagnosi specie specifica delle uova di Echinococco da terreno e acqua contaminati tramite immunofluorescenza indiretta con l'uso di anticorpi monoclonali ottenuti dalle oncosfere (Eg0H6-4E5) (Craig et al., 1988). La diagnosi con questa metodica evidenzia una specificità del 100% quando comparata con infestazioni da *Taenia hydatigena* in cani naturalmente infestati. Tuttavia questo tipo di indagine non è stato mai utilizzato in nessun programma di controllo (Cabrera et al., 2002; Craig et al., 1988).

Metodiche biomolecolari

PCR

Negli anni '90, grazie ai progressi della biologia molecolare, sono comparsi i primi lavori di PCR (*Polymerase Chain Reaction*) per la diagnosi specie-specifica di Echinococco a partire da materiale fecale. La metodica presenta un'alta sensibilità e specificità e consente di fare una diagnosi "certa" della presenza diretta del parassita nel materiale fecale (proglottidi e/o uova). Prevede tempi di esecuzione accettabili (fra estrazione del DNA e PCR una giornata di lavoro) e i costi possono essere ammortizzati quando si effettua un elevato numero di analisi. Questo tipo di approccio diagnostico, tuttavia, può essere perseguito solo in un idoneo laboratorio di biologia molecolare e deve tener conto delle difficoltà che la metodica richiede per l'allestimento del campione; infatti estrarre il DNA dalle feci è abbastanza complesso e presenta una serie di inconvenienti, prima fra tutte la presenza di diversi inibitori della *Taq* polimerasi nelle stesse (Mathis, 2003).

La prima metodica per identificare il DNA di *Echinococcus multilocularis* dalle feci di volpi venne messa a punto da Bretagne et al. (1993); la sequenza target per l'amplificazione era la porzione *E. multilocularis* U1 sRNA gene. Gli amplificati positivi mostravano una banda di 337 paia di basi (bp), che invece non compariva quando si utilizzava DNA di *Eg*.

Successivamente altri lavori sempre su *E. multilocularis* hanno confermato l'alta sensibilità e specificità di questo test diagnostico (Dinkel et al., 1998; Mathis et al., 1995).

Recentemente è stato pubblicato un protocollo di PCR per la diagnosi di *Echinococcus granulosus* dalle feci tramite l'identificazione del DNA

oncosferico che consente anche per questo parassita la diagnosi differenziale con uova di altri tenidi (Cabrera et al., 2002). La reazione a catena della polimerasi permette di amplificare parte della sequenza di un gene mitocondriale del cestode che codifica per la citocromo ossidasi: nei campioni positivi si rende visibile dopo corsa elettroforetica e successiva colorazione, una banda di DNA pari a 285 bp, che consente la diagnosi certa e permette di rilevare l'infestazione anche con un solo uovo di echinococco presente nelle feci (Cabrera et al., 2002).

Aspetti epizootologici e morfo-biologici dell'Echinococcosi nell'Equino

L'idatidosi degli equini è quasi sconosciuta, anche laddove tali animali pascolano insieme agli ovini, com'è nella Nuova Zelanda (Williams e Sweatman, 1963).

Per quanto concerne l'Italia, Biocca e Massi nel 1952 accertarono negli equini macellati a Roma una percentuale d'infestazione dello 0,8% dello 0,81% (con una percentuale di fertilità delle cisti del 70%).

pienotti (1954) riscontrò sei casi d'idatidosi (1,66%) su 360 equini macellati in Toscana (Livorno e Pisa) ed in Sicilia (Catania e Messina), con una fertilità delle cisti pari all' 83,33%.

Corsalini (1955) a Matera osservò tre casi positivi (2,91%) su 103 animali esaminati. Le cisti, tutte localizzate nel fegato, erano complessivamente 16, di cui 10 fertili. Gallo (1955) esaminò complessivamente 1345 equini, di cui il 46% muli, il 26% cavalli ed il 28% asini. La percentuale d'infestazione risultò

notevolmente elevata: a Palermo del 28,43%, a Catania del 13,24%. Le cisti erano localizzate nel 985 dei casi in sede epatica e nel 2% in sede polmonare.

Ancora Corsalini, in indagini effettuate a Bari nel 1958, su 215 asini ebbe da osservare tre casi d'infestione (1,86%) unicamente in polmone (cisti tutte fertili); su 1971 cavalli accertò dieci casi positivi (0,61%), di cui sette con localizzazione epatica di cisti tutte fertili, due con localizzazione polmonare di cisti sterili ed uno con localizzazione polmonare di cisti fertili; non riscontrò alcun caso in 150 muli.

Romboli e Pierotti (1960) condussero un'indagine statistica comparata tra le diverse regioni italiane, osservando, su 448.085 equini complessivamente macellati dal 1956 al 1959, ben 3714 casi d'idatidosi, pari allo 0,82%. Le quote più alte furono riscontrate in Sicilia (dal 9,76% del 1956 al 4,44% del 1959) con una tendenza graduale alla diminuzione nell'Italia meridionale e centrale; nell'Italia settentrionale l'infestione risultò rara o del tutto eccezionale.

Interessante è la situazione in Sardegna dove Tanda (1960) su 1978 cavalli e 919 asini macellati a Sassari osservò un solo caso d'idatidosi in un asino.

Dato che in Sardegna gli equini sono allevati allo stato brado o semibrado nello stesso ambiente di rischio di ovini, bovini, caprini e suini, animali tutti che presentano percentuali elevatissime di idatidosi, si ripete in questa isola la stessa situazione epizootica osservata da Williams e Sweatman (1963) in Nuova Zelanda.

L'idatidosi equina è stata inquadrata sul piano eziologico da Williams e Sweatman (1963). È -secondo questi AA.- sostenuta dalla forma larvale di

Echinococcus granulosus equinus, Williams e Sweatman, 1963, una sottospecie dell' *Echinococcus granulosus* Batsch, 1786.

L' *Echinococcus granulosus equinus* è un cestode lungo da 4 a 7 mm., munito di scolice con 24-41 uncini, disposti in due corone; gli uncini grandi misurano 36-52 μ (media 40,4 μ), i piccoli 22-44 μ (media 34,2 μ). Lo stobila è composto da tre a quattro segmenti, talvolta cinque. Nella proglottide matura, preterminale, sono presenti da 32 a 42 testicoli (in media 35), di cui più della metà distribuiti nella porzione anteriore al poro genitale, generalmente con due o tre file disposte dietro la ghiandola vitellina. La tasca del cirro, di forma rotondeggiante, misura circa 140x110 μ ; il dotto del cirro è inclinato dall'alto al basso e dall'interno verso l'esterno e sbocca nel poro geniale, che è situato a metà o leggermente dietro la metà del segmento. La proglottide gravida – che è terminale – presenta ancora numerosi testicoli.

Lo stadi larvale di questo elminto sviluppa elettivamente nell'equino (Williams e Sweatman, 1963). Le cisti ubicate quasi esclusivamente in sede epatica si presentano di colore decisamente biancastro: il che è da porre in relazione, secondo Pienotti (1954) e Romboli e Pierotti (1960), col notevole spessore sia della capsula reattiva ospitale che della membrana parassitaria lamellare. Gli ovini non rappresentano un ospite conveniente: infatti Williams e Sweatman (1963) non riuscirono che raramente a provocare l'infestione sperimentale in questi animali con sviluppo di cisti di piccole dimensioni (5 mm di diametri) e sterili.

Per quanto concerne i roditori, è stato osservato che il topo bianco è recettivo all'inoculazione parenterale di protoscolici sia d'origine ovina che equina

(idatidosi secondaria serimentale) come accertato da Devè (19359, De Waele e De Cooman (1938), Coutelen, Lecroart e Cochet (1939). Il coniglio, mentre è recettivo all'inoculazione intraperitoneale di protoscolici d'origine ovina, risulta invece refrattario a quelli d'origine equina (De Waele e De Cooman, 1938; Bacigalupo, 1933); il contrario avviene nel ratto bianco (De Waele e De Cooman, 1938).

Quanto all'ospite definitivo del cestode in discussione, Williams e Sweatman riuscirono ad ottenere l'infestione sperimentale del cane; secondo i suddetti AA. però l'elevato tasso d'infestione idatidea nel cavallo in Inghilterra rendeva difficile ammettere che il cane fosse il solo ospite definitivo del parassita.

Più tardi Howkins, Gemmel, e Smith (1965) riuscirono ad infestare anche la volpe.

Materiali e metodi

Nel periodo compreso fra marzo 2004 ad aprile 2007, al fine di valutare la diffusione di *Echinococcus granulosus* nei principali animali da reddito della Sardegna, sono stati esaminati campioni di fegato, polmone e milza ottenuti da 770 ovini, 229 bovini, 141 equidi (95 cavalli e 46 asini) e infine 2672 suini macellati in Sardegna. Di questi, 2330 provenivano da allevamenti di tipo intensivo, mentre 342 da macellazioni familiari. Parallelamente è stata condotta una indagine in parallelo sui cinghiali, esaminando 461 soggetti regolarmente abbattuti durante le stagioni venatorie 2004/2007 in diversi comuni del Nord e Centro Sardegna (Periodo compreso fra Novembre e Gennaio). Su ogni capo riscontrato positivo all'infestazione sono stati valutati il numero, la localizzazione e il tipo di idatidi riscontrabili secondo la seguente classificazione: fertili, acefalocisti, caseose e calcificate. Al fine di valutarne la fertilità, sono state prelevate, con tecniche di routine, le membrane proligere e i protoscolici. Di questi ultimi è stata valutata la vitalità attraverso l'esame a fresco (conformazione, movimenti, evidenziazione delle cellule a fiamma vibratili) ed eventuale colorazione con coloranti vitali (rosso neutro 0,5%) (Foto 4-10). I dati ottenuti sono stati successivamente elaborati statisticamente mediante software SPSS 12.

Da un aliquota di Idatidi fertili enon è stata inoltre prelevata la membrana proligera e il liquido cistico per le indagini biomolecolari.

Il DNA è stato quindi estratto da circa 0,1 gr di materiale cistico da 124 campioni, rispettivamente da 63 ovini, 14 bovini, 8 equini, 36 suini e 3 Cinghiali usando il kit commerciale ROCHE DNA Template extraction kit.

Si è proceduto quindi alla genotipizzazione degli isolati attraverso l'amplificazione di alcuni frammenti dei geni mitocondriali codificanti per la NADH deidrogenasi (ND1) e la Citocromo Ossidasi (CO1) mediante PCR con i primers selezionati da Bowles e McManus (ND1: JB11 5'-AGATTCGTAAGGGGCCTAATA-3' e JB12 5'-ACCACTAACTAATTCACTTTC-3'; COI: JB3 5'-TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT-3' e JB4.5 5'-TAA AGA AAG AAC ATA ATG AAA ATG-3') (Bowles e McManus, 1993; Bowles et al., 1992).

Le reazioni a catena della polimerasi (25µl) sono state effettuate in 10mM Tris-HCl (pH8.4); KCl di 50mM; MgCl₂ di 2mM; 250µM di ogni dNTP; 25pmol di ogni primer e della polimerasi di 2 U Taq (Roche) .

Le condizioni di PCR utilizzate sono state: 94°C per 30 secondi, 55°C per 30 secondi, 72° gradi per 30 secondi per 35 cicli e 72°C per 7 minuti (estensione finale). I prodotti di PCR venivano quindi fatti correre in un gel di agarosio al 2%, gli ampliconi, rispettivamente di circa 470bp e 376bp, venivano quindi fotografati e quelli che mostravano le caratteristiche migliori per il sequenziamento venivano purificati mediante sistema a colonnine (Millipore) e successivamente sequenziati sia in *forward* che in *reverse* mediante sequenziatore capillare (Applied Bio-systems).

Le sequenze ottenute venivano quindi lette, appaiate e confrontate con quelle presenti nelle banche dati sul web per poter determinare il grado di omologia

di ciascun campione sequenziato, mediante softwares BLAST (NCBI) e Bioedit.

Negli isolati di origine Equina, per la particolarità del ritrovamento, è stato utilizzato un ulteriore marker per la genotipizzazione, ovvero la sequenza parziale del gene 12S secondo il protocollo messo a punto Von Nickisch-Rosenegk et al. (1999).

E' stato inoltre utilizzato, come metodo di screening rapido per i principali clusters dei ceppi, il protocollo pubblicato da Dinkel *et al.* (2004) per discriminare il ceppo G1 di *E. granulosus* dai ceppi G5 e G6/7 con quattro reazioni differenti di PCR. La reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata effettuata per l'amplificazione della sequenza del gene mitocondriale del rRNA 12S in un volume 25µl che contiene 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM di KCl, 2 mM di MgCl₂, 250µM di ogni dNTP, 2U di Taq polimerasi (Roche) e 25 pmol di ogni primer. La PCR specifica per *E. granulosus* G1 (g1 PCR) è stata effettuata con i primers E.g.ss1for. (5 ' GTA TTT TGT AAA GTT GTT CTA 3') e E.g.ss1rev. (5 ' CTA AAT CAC ATC ATC TTA CAA T 3'). I campioni negativi in questa PCR sono stati esaminati con una seconda PCR che amplifica un frammento di 254 bp di *E. ortleppi* (G5) e dell' *E. granulosus* G6/7. I primers usati sono E.g.cs1for. (5 ' ATT TTT AAA ATG TTC GTC CTG 3') e E.g.cs1rev. (5 ' CTA AAT AAT ATC ATA TTA CAA 3'). In un secondo step, per discriminare fra *E. ortleppi* e *E. granulosus* G6/7 sono state usate due seminested PCRs, usando una coppia di primers specifica per G6/7 (g6/7 PCR; E.g. camel.for. 5 'ATG GTC CAC CTA TTA TTT CA 3' e E.g.cs1rev.) e per *E. ortleppi* (g5 PCR; E.g.cattle.for. 5' ATG GTC CAC CTA

TTA TTT TG 3' e E.g.cs1rev.), ciascuna che amplifica un frammento differente di 171 bp, come descritto dagli autori (Dinkel *et al.*, 2004). L'amplificazione è stata effettuata in 40 cicli come segue: denaturazione per 30 s a 94°C, annealing 1 minuto 57°C ed allungamento per 40 s a 72 °C. Dopo l'amplificazione, 10 µl del prodotto di amplificazione è stato rilevato e fotografato su un gel di agarosio 1.5%.

Risultati

Ovini

Negli ovini esaminati sono state riscontrate complessivamente 4070 idatidi, con una prevalenza totale del 75,3% (580/770). La percentuale di ovini con cisti fertili è risultata del 10,3% (80/770). Il metacestode è stato rilevato nel 62,2% dei fegati e nel 53,7% dei polmoni esaminati ($\chi^2 = 11,26$; $P = 0,0007$). Una prevalenza maggiore è stata riscontrata nei polmoni (8,7%) rispetto al fegato (4,4%) ($\chi^2 = 11,54$; $P = 0,0006$). Le cisti sono state trovate contemporaneamente in entrambi gli organi bersaglio (fegato e polmoni) nel 41,2% degli animali positivi, mentre la percentuale di ovini con infestazione massiva (più di 10 idatidi) era del 16,4% (21,8% dei positivi). L'abbondanza (numero di idatidi/animale) era 5,28, mentre l'intensità media (numero di idatidi/ animali positivi) era 7,01. Riguardo la tipologia delle cisti repertate, 57,4% erano calcificate, mentre le fertili, acefalocisti e le idatidi caseose sono state trovate rispettivamente nel 13,1%, 25,1% e 4,4% del numero totale di cisti esaminate.

Bovini

Nei Bovini esaminati è stata osservata una prevalenza totale per l'infestazione (1189 cisti riscontrate) pari al 41,5% degli animali esaminati, con una fertilità del 2,6%. Le Idatidi sono state riscontrate nel 33,2% dei casi nel fegato e nel

31,8% nei polmoni ($\chi^2 = 0,09$; $P = 0,76$). Un maggior numero di idatidi è stato trovato nei polmoni (52) rispetto al fegato (2) ($\chi^2 = 65,15$; $P < 0,00001$). I parametri che evidenziano il grado di pressione parassitaria, hanno evidenziato un 16,2% di animali che albergavano oltre 10 cisti (infestazione massiva), mentre nel 23,6% dei capi esaminati è stato possibile evidenziare un'infestazione di tipo misto, con fegato e polmoni colpiti contemporaneamente (38,9% dei positivi). L'abbondanza era 5,19, mentre l'intensità media pari a 12,5. Per quanto riguarda i morfotipi delle cisti esaminate, il 58% erano di tipo caseoso, mentre le fertili, le acefalocisti e le idatidi calcificate sono state riscontrate rispettivamente nel 4,5%, in 20,5% e in 17% del totale.

La G1 PCR ha amplificato selettivamente il genotipo G1 di *E. granulosus* con una banda specifica di 254 bp, che ha permesso di discriminare 89 su 91 campioni del DNA, mentre la G5/6/7 PCR è risultata positiva su 2 campioni di suino con una banda caratteristica di 254 bp. Su questi due campioni è stata condotta successivamente una semi-nested PCR per discriminare fra i ceppi G5 e G6/7 dando un prodotto specifico di 171 bp tipico dei ceppi G6/G7. Usando questa metodologia, non è possibile discriminare fra i genotipi G6 e G7 di *E. granulosus*. Lo stesso risultato è stato ottenuto usando la metodica PCR-RFLP: 89 isolati sono stati identificati come il genotipo G1, mentre 2 isolati sono stati identificati come genotipo G7. Il sequenziamento dei geni mitocondriali ha indicato che tutti gli ovini e bovini esaminati erano infestati dal ceppo G1 di *E. granulosus*.

Equini

Cisti idatidee sono state repertate in quattro su 95 cavalli esaminati (prevalenza: 4,2%).

Nessuna idatide è stata invece riscontrata nei 46 asini esaminati. Gli animali positivi all'infestazione mostravano una differente morfologia dei metacestodi repertati: in tre soggetti sono state riscontrate esclusivamente piccole e numerose acefaloscisti dalla parete sottile e contenente un liquido cristallino privo di protoscolici (sterili) esclusivamente a livello epatico. Le infestazioni manifestavano una carica parassitaria moderata (8, 6 cisti per animale) eccetto un caso dove sono state riscontrate bene 14 cisti a livello epatico (infestazione massiva).

Nel quarto cavallo riscontrato positivo sono state invece riscontrate tre grandi idatidi superficiali delle dimensioni comprese fra 4-10 cm di diametro, rispettivamente nei polmoni (2) e nel fegato (1), con una membrana pericistica spessa circa 3,5 millimetri.

Le idatidi mostravano una membrana germinale bianca con uno spessore medio di 1.07 millimetri (dev. st. 0.202) e contenevano un liquido trasparente in cui era visibile ad occhio nudo una abbondante sabbia idatidea, di colore grigio scuro, decisamente diversa da quella normalmente repertata sia negli animali oggetto di studio che in altri ospiti intermedi macellati in Sardegna (ovini).

Le caratteristiche del metacestode appena descritto combaciavano con la descrizione fatta da Ponce-Gordo e Cuesta-Bandera (1998) in Spagna sempre su idatidi isolate in equini.

L'esame microscopico del liquido cistico e del preparato derivato dallo striscio a fresco della membrana proligerica ha consentito di rilevare successivamente una fertilità delle idatidi isolate dal cavallo n.4 pari al 100%.

Le differenze morfologiche rilevate nei due morfotipi nei metacestodi repertati nei cavalli sono state confermate tramite i risultati di genotipizzazione e sequenziamento.

Il DNA estratto dalle idatidi dei primi tre cavalli che albergavano cisti piccole e sterili, è stato identificato come appartenente al ceppo G1 o sheep strain di *Echinococcus granulosus*, segnalato peraltro nella maggior parte degli animali da reddito macellati nell'isola da precedenti lavori (Varcasia et al., 2006).

Il DNA del metacestode isolato dal quarto cavallo risultato positivo ha invece mostrato una omologia del 100% le sequenze parziali dei geni sequenziati (ND1, CO1 e 12S) con il ceppo G4 o horse strain di *Echinococcus granulosus* (GenBank: EF143833, EF143834, EF143835) (Tabelle 3 e 4).

L'indagine anamnestica condotta sugli equidi positivi inerente la presenza o meno di una sintomatologia legata ad una eventuale insufficienza epatica e/o respiratoria (per l'equino n. 4 colpito da idatidosi polmonare) non ha mai evidenziato la presenza di nessun sintomo clinico particolare. Tutti i soggetti infatti sono stati macellati non per problemi legati al loro stato sanitario. Ulteriori dati relativi ai dati anagrafici e di provenienza dei cavalli positivi

all'infestazione sono riportati nella Tabella 3 insieme a quelli relativi alla classificazione biomolecolare delle formazioni parassitarie riscontrate.

Suini

L'indagine condotta sui suini provenienti da allevamenti intensivi ha consentito di rilevare l'assenza di *Echinococcus granulosus*, a fronte di una prevalenza totale all'infestazione per Echinococcosi cistica del 11,1% (38) nei suini macellati per uso familiare, nei quali è stata evidenziata una fertilità del 7,6% (pari al 68,4% dei soggetti positivi all'infestazione). Non è stata rilevata una differenza statisticamente significativa fra infestazione nel fegato e nei polmoni ($\chi^2 = 0,5$; $P = 0,478$). Nei suini macellati per uso familiare è stata inoltre rilevata una infestazione massiva (>10 Idatidi) in due soggetti dove sono state identificati idatidi anche a livello del miocardio, milza e muscoli scheletrici.

Nei cinghiali invece è stata rilevata una prevalenza complessiva del 3,7% (17) anche se con valori disomogenei nelle tre aree esaminate.

Dei 39 isolati sottoposti a sequenziamento dei geni mitocondriali ND1 e CO1, il 5,1% (2) apparteneva al ceppo G7 o *Pig strain* mentre il 94,9% (37) apparteneva al ceppo G1 o *sheep strain*. Tutti gli isolati provenienti dai cinghiali sono risultati appartenenti al ceppo G1. Le sequenze ottenute sono state esaminate e confrontate a quelle presenti in banca dati (NCBI genbank) e quindi depositate in rete (Accession numbers: DQ023703; DQ062857; DQ062858). I risultati della genotipizzazione sono riassunti nella Tabella 3.

Considerazioni e conclusioni

Il presente lavoro ha consentito di aggiornare la situazione epidemiologica dell'Echinococcosi cistica in Sardegna e di determinare le principali varianti genetiche del parassita circolanti nel territorio dell'isola.

Per quanto riguarda i protocolli utilizzati, la metodica di screening rapido (Nested PCR) ha permesso la distinzione di un numero limitato di genotipi, tuttavia ha dimostrato una sua utilità nello screening di massa dei campioni. Il sequenziamento d'altra parte si è confermato essenziale per caratterizzare i ceppi ed identificare le varianti genetiche del parassita. I campioni del DNA analizzati ottenuti da ovini e bovini sono stati identificati come appartenenti al ceppo G1, la variante genetica specifica dell'ovino (sheep strain).

Questo genotipo sembra essere il più diffuso nella regione mediterranea potendo colpire una vasta gamma di ospiti intermedi e riveste un'importanza particolare in quanto è il genotipo maggiormente responsabile delle infestazioni nell'uomo (Eckert e Thompson, 1997). Il basso livello di fertilità (rispetto al passato) riscontrato nelle cisti degli ovini sembra essere correlato con il migliore *management* delle aziende agricole in Sardegna durante gli ultimi 10 anni (Scala et al. 2004; Garippa et al. 2004). Molti allevatori praticano trattamenti antelmintici periodici contro i parassiti gastro-intestinali degli ovini e nel 47% dei casi vengono utilizzati Benzimidazolici. Diversi studi hanno dimostrato come questi farmaci abbiano un'azione cestodicida, in particolare contro il metacestode di *E. granulosus* (Garippa et al. 2004; Scala et al. 2004a).

L'analisi delle sequenze ottenute nello screening dei parassiti isolati dal bovino ha consentito di determinare che il ceppo di *Echinococcus granulosus* presente era il G1 *strain* o *Sheep strain*, il ceppo che comunemente si riscontra negli ovini e in generale nell'area del Mediterraneo. Non è stato invece possibile isolare il ceppo G5 o *Cattle strain*, proprio del Bovino. Gli scarsi valori di fertilità (2,6%) nel bovino sono molto probabilmente da imputare, almeno in Sardegna, al fatto che questo ruminante viene colpito dalla variante genetica dell'Echinococco non propria.: infatti attraverso la tassonomia biomolecolare è stato possibile capire che è il ceppo ovino G1 e non il ceppo bovino G5 che è responsabile dell'infestazione.

Mentre nel bovino si osservano comunemente delle prevalenze elevate accompagnate tuttavia da dei livelli di fertilità esigui, nel suino, come suddetto, il parassita pare adattarsi molto bene, con una prevalenza del 11% con il 68% degli animali infestati che albergavano cisti fertili. In questa specie sono stati infatti rilevati ben due genotipi, G1 e G7, quest'ultimo isolato per la prima volta in Sardegna ed in Italia da due suini macellati nell'agro di Oliena. Dai risultati della presente indagine si evince come l'Echinococcosi sia ancora ben radicata negli allevamenti della Sardegna.

Il ceppo G1 ovino risulta quello maggiormente riscontrato negli ultimi lavori di genotipizzazione del parassita e può essere considerato endemico nell'isola; così come segnalato in Spagna, Tunisia e nell'Est Europeo (Gonzales *et al.*, 2003; Thompson e McManus, 2002; Varcasia *et al.*, 2004), è capace di infestare anche altre specie animali non proprie, come il suino appunto, e il bovino, come peraltro è stato segnalato recentemente anche in Sardegna (Scala

et al., 2004). L'isolamento della variante genetica del suino è da considerarsi rilevante soprattutto perché mostra come in un'isola relativamente piccola, due varianti genetiche dello stesso parassita abbastanza lontane fra loro dal punto di vista filogenetico, possano infestare la stessa specie animale con successo.

Il ceppo G7 differisce morfologicamente, epidemiologicamente e per i tempi di sviluppo (più corti rispetto a tutti gli altri ceppi) oltre che geneticamente dagli altri ceppi di *Echinococcus granulosus*, e in particolare dal gruppo G1-G2-G3 (Eckert e Thompson, 1997). Inoltre alcuni autori hanno recentemente confermato che il ceppo del suino può essere infestante per l'uomo (Kedra *et al.* 1999). Il ciclo suino/cane sembra quindi rappresentare una via alternativa per il mantenimento e la diffusione del cestode nell'isola. Il ruolo di questo genotipo nei casi di infestazione umana nel nostro paese non può essere definito senza ulteriori studi che possano chiarire quali ceppi del parassita colpiscano l'uomo, finora purtroppo assenti. Queste conoscenze possono avere una importante applicazione per il controllo di questa parassitosi e costituire inoltre uno dei primi passi per nuovi piani di controllo della malattia.

Dai risultati della prima parte della presente indagine si evince come l'Echinococcosi nel suino sia ancora ben radicata negli allevamenti a conduzione familiare. L'allevamento intensivo infatti non permette la realizzazione del ciclo biologico del parassita salvo in casi (da noi non rilevati) di contaminazione di mangimi con materiale fecale di cani infestati. La diffusione nei cinghiali assume invece un andamento molto variegato, legato inevitabilmente al contatto con realtà zootecniche dove l'Echinococcosi è presente. Questo è dato è confermato dall'assenza della malattia nei cinghiali

cacciati nell'alta Gallura, dove la malattia è sicuramente meno diffusa rispetto ad altri distretti come la Provincia di Nuoro. L'abitudine nefasta e spesso radicata dei cacciatori di dare in pasto i visceri dell'animale predato per "ricompensare" i cani, è sicuramente uno dei motivi che contribuiscono alla diffusione della parassitosi.

La prevalenza rilevata nei suini macellati per uso famiglia è invece allarmante considerando questo dato anche in relazione con il livello di fertilità delle cisti repertate: in questa specie infatti ben il 68% delle idatidi risultano fertili, e quindi potenzialmente infestanti. Ciò è particolarmente rilevante dal punto di vista epidemiologico in quanto il suino costituisce un ottimo ospite intermedio per il parassita, a differenza ad esempio del bovino, dove nonostante prevalenze di infestazione più elevate, i livelli di fertilità sono molto bassi (2,6%) e quindi può essere considerato un fondo cieco per la sopravvivenza del parassita.

I suini colpiti dalla metacestodosi risultano inoltre spesso massivamente infestati a causa dell'attitudine coprofaga che fa sì che possano ingerire un elevato numero di uova. A ciò consegue spesso il rilievo di infestazioni massive, oltre che nel fegato e polmone anche in altri distretti come milza, rene e muscolatura scheletrica. Questo fa sì che l'ospite definitivo che ingerisca questi organi si possa infestare a sua volta in maniera imponente, dato anche l'elevato livello di fertilità delle cisti che si riscontrano come detto in questa specie animale.

Questa evenienza è tutt'altro che remota specie negli allevamenti familiari dove spesso i cani sono in "prima fila" durante la macellazione.

La presenza di un numero elevato di parassiti intestinali nel cane è fra l'altro molto importante come fattore favorente lo scambio di materiale genetico fra i parassiti che possono in questi casi occasionalmente dar luogo ad una eterofecondazione. In questa maniera aumentano le possibilità di adattamento del parassita e quella della creazione di nuove varianti genetiche.

Questo fatto dà spunto alla discussione sui risultati ottenuti nella seconda parte della presente indagine, dove è stato possibile isolare ben due varianti genetiche del parassita all'interno dello stesso ospite, i ceppi G1 e G7 appunto. I risultati ottenuti nell'indagine condotta negli equini ci consentono di descrivere per la prima volta a livello biomolecolare la presenza del ceppo G4 di *Echinococcus granulosus* in Italia, a distanza di circa 50 anni dalle prime descrizioni del parassita in equidi macellati in Italia (Romboli, 1954; Romboli e Pierotti, 1960; Macchioni e Gallo, 1967).

Il ceppo del cavallo è stato identificato sia nel fegato che nei polmoni, contrariamente agli studi precedenti che hanno identificato questa variante genetica solo nel fegato (Williams e Sweatman, 1963; Thompson, 1977; Ponce-Gordo e Cuesta-Bandera, 1998; Daniel Mwambete et al, 2004).

Questo fatto assume quindi un interesse biologico particolare in quanto costituisce una nuova acquisizione per l'E/C dell'equino e risulta interessante anche per gli eventuali riflessi ispettivi del problema.

Tale segnalazione costituisce un dato epidemiologico estremamente importante per la Sardegna, in quanto viene per certi versi amplificato il "range" d'azione dell'E/C coinvolgendo una specie solitamente ritenuta indenne da questa parassitosi.

La biologia molecolare sembrerebbe costituire un approccio fondamentale per stabilire la presenza sul territorio delle varie specie e ceppi di *Echinococcus* nell'isola. Tuttavia questa tecnica sperimentale è risultata fondamentale soprattutto per ciò che concerne lo studio dei vari ceppi di *Echinococcus granulosus* su bovini, suini, caprini, laddove l'aspetto morfologico delle idatidi non aiuta molto a differenziare i vari ceppi presenti.

Le differenze morfologiche relative alle Idatidi riscontrate nel fegato e nei polmoni del cavallo infestato da *E. equinus* (G4), rispetto ad altre (vedi soprattutto lo spessore della membrana proliferata), rendono la diagnosi di "ceppo" già attendibile a livello macroscopico con una certa attendibilità.

E' interessante notare come il riscontro di idatidi nel cavallo, che continua ad essere a onor del vero una evenienza estremamente rara, pone tuttavia degli importanti interrogativi di tipo epidemiologico soprattutto nel caso di *E. equinus*. E' evidente infatti che il riscontro del ceppo G1, tipico dell'ovino, anche negli equidi della Sardegna non assume carattere di novità biologica particolare. L'Echinococcosi cistica causata dal ceppo G1 purtroppo risulta massivamente presente sul territorio, per cui il passaggio ad un ospite improprio, come ad esempio l'equino, non è un evento certamente raro e si presenta con tutti i caratteri tipici di questa patologia parassitaria. In questi casi infatti nell'equino si repertano numerose idatidi sterili nel fegato provviste di una membrana proliferata molto assottigliata e priva di capsule e/o protoscolici. Tale evenienza quindi sotto l'aspetto "insorgenza" non costituisce sicuramente un problema interpretativo: equidi che pascolano in terreni infestati da uova di *E. granulosus* del ceppo G1 possono dare luogo ad un quadro di E/C con

idatidi sterili soprattutto nei casi di forte inquinamento ambientale da uova del cestode in oggetto e/o quando le condizioni di recettività al parassita da parte dell'equide interessato aumentano (carenze alimentari, malattie intercorrenti, predisposizione genetica, etc.). Diverso è invece sicuramente il caso dell'Echinococcosi equina da noi evidenziato, in cui i problemi interpretativi legati alla possibile insorgenza della parassitosi non sono poi così pochi! Il primo riguarda sicuramente l'origine del caso: è autoctono della Sardegna, o la parassitosi è arrivata dal Piemonte, regione d'origine del cavallo?

Tuttavia anche in questo caso si aprono numerosi e purtroppo difficili problemi interpretativi. Ad esempio il caso da noi rilevato è proprio il primo arrivato in Sardegna? I casi già segnalati nel lontano 1960 come facciamo a sapere se erano attribuibili a *E. granulosus* o *E. equinus*? I problemi tassonomici risolvibili con la biologia molecolare attualmente, allora non erano tali e la descrizione “fina” fatta della morfologia delle idatidi fatte non sempre fornisce poi indicazioni sull'identificazione delle specie parassitarie allora riscontrate.

Sicuramente però l'E/C dell'equino in Sardegna non ha mai rappresentato un evento ispettivo e/o sanitario comune. D'altro canto appare anche difficile attribuire con una certa affidabilità al caso in oggetto un'origine piemontese, in quanto in base alla bibliografia consultata non sembrerebbe essere stato mai descritto in quella regione un caso di E/C negli equidi. Tale aspetto resta quindi ancora un nodo da sciogliere. In Sardegna sappiamo invece che il genere *Echinococcus* è presente con più ceppi, come ad esempio quello del suino che è abbastanza diffuso e quindi rende ragionevole una sua

“circolazione” sul territorio. Più difficile è invece capire la dinamica della eventuale diffusione dell'Echinococcosi equina nell'isola.

Nel caso di insorgenza di E/C dell'equino è decisamente più difficile da capire rispetto ad esempio all'ovino, per motivi legati soprattutto al valore commerciale della carcassa; in che modo infatti i visceri possono arrivare al cane?

Inoltre come spiegare la permanenza di tale parassitosi sul territorio stante la scarsissima diffusione di tale parassita? E' altresì noto infatti che il parassita adulto nel cane ha un corso di vita non più lungo di qualche mese, per cui tale parassitosi in assenza di ulteriori re-infestazioni dovrebbe essere destinata a scomparire naturalmente.

Come si potrebbe spiegare quindi l'insorgenza del caso da noi descritto?

E' ovvio che la via tramite le quali il parassita può raggiungere un ospite sono molteplici ma in questo caso la spiegazione è veramente difficile. Un'altra ipotesi riguarda i risultati ottenuti da Howkins et al. (1965) che indicano la volpe come possibile ospite definitivo “alternativo” al cane. Sarà stata questa quindi una possibile evenienza in Sardegna? Un equide deceduto sul campo i cui visceri infestati sono stati ingeriti da una volpe? Difficile come abbiamo detto fornire delle spiegazioni plausibili e certe sull'argomento tuttavia proprio questo fatto ci incuriosisce sotto l'aspetto parassitologico e ci impone per il futuro la non interruzione dell'indagine che vede la sezione di parassitologia e Malattie Parassitarie del D.B.A ancora impegnata in tal senso. In quest'ottica si è aperta una collaborazione con altri centri di ricerca nazionali che ha portato recentemente a isolare un nuovo caso di Echinococcosi da *E. equinus*

in un cavallo della Toscana. E' auspicabile quindi che il riscontro di altri casi nuovi possa aiutarci a capire le dinamiche epidemiologiche di questa interessante parassitosi se non altro in ambito nazionale.

Il presente lavoro ha consentito di aggiornare la situazione epidemiologica dell'Echinococcosi cistica negli equidi della Sardegna, dopo diversi anni in cui non si avevano dati sull'andamento di questa importante parassitosi in queste specie.

Inoltre grazie all'ausilio delle biotecnologie applicate alle tecniche parassitologiche classiche è stato possibile isolare per la prima volta in Italia il ceppo G4 di *Echinococcus granulosus*, da molti autori riconosciuto come specie propria, col nome di *Echinococcus equinus*. Il fatto che il cavallo riscontrato positivo all'infestazione con *E. equinus* sia stato introdotto in Sardegna solo un anno e mezzo prima della sua macellazione (mentre per oltre 15 anni ha vissuto nella provincia di Alessandria) non consente di affermare con certezza la provenienza reale del parassita, anche per l'assenza di ulteriori dati epidemiologici su questa specie sia in Sardegna che in Piemonte. Tuttavia, se le indagini ancora in corso confermassero la presenza del G4 anche in Sardegna, nell'isola si amplierebbe il numero dei ceppi sino ad ora evidenziati aggiungendosi al G1 e G7, dimostrando ancora una volta la estrema endemicità del parassita nell'isola, che si palesa anche con questa sua capacità di adattamento ai vari ospiti intermedi. Un motivo in più, qualora ce ne fosse bisogno, per continuare la ricerca e soprattutto studiare soluzioni e piani di controllo per far fronte a questa pericolosa zoonosi.

Bibliografía

Ahmad G., Nizami W.A., Coproantigens: early detection and suitability of an immunodiagnostic method for echinococcosis in dogs. *Veterinary Parasitology*, 1998, vol. 77, n. 4, pp. 237-244.

Allan J.C., Avila G., Garcia Noval J., Flisser A., Craig P.S., Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology*, 1990, vol. 101, n. 3, pp. 473-477.

Allan J.C., Craig P.S., Garcia Noval J., Mencos F., Liu D., Wang Y., Wen H., Zhou P., Stringer R., Rogan M., Zeyhle E., Coproantigen detection for immunodiagnosis of echinococcosis and taeniasis in dogs and humans. *Parasitology*, 1992, 104, pp. 347-355.

Aluja A., Cisticercosis, una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la Cisticercosis causada por *Taenia solium*. Biblioteca de la Salud. Instituto Nacional de Salud Pública, Mexico, 1987.

Arru E, Castiglia P, Azara A, Maida A . Hydatidosis control Within continental systems: About Italy. Archivos Intern de la Hidatidosis 33: 109-113, (1999).

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

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

Battelli G. Epidemiological surveillance of cystic echinococcosis. Inf Circ - WHO Mediterr Zoon Control Cent 51 : 5-7, (2001)

Bertocchi D . L'echinococcosi in Sicilia. Atti Soc Ital Sci Vet 5: 264-269, (1951)

Biocca E, Massi O, (1952) Il problema della echinococcosi in Italia: Indagini e considerazioni. Riv Parassit 13: 235-240. (In italian)

Bowie J, Mason PC, Oudemans G, Montgomery RH (1984) Equine hydatidosis: a new record for New Zealand. N Z Vet J 32: 151-3.

Bowles J, McManus DP (1993) Molecular variation in *Echinococcus*.
Acta Trop 53: 291-305.

Bowles J., Blair D. and McManus D.P., Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol* **54** , pp. 165–174, (1992)

Bowles J., McManus D.P., NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *International Journal for Parasitology*, vol. 23, n. 7, pp. 969-972, (1993).

Bowles J.; McManus D. P., Molecular variation in *Echinococcus*, *Acta Tropica*, Volume 53, Issue 3-4, Pages 291-305, (1993).

Bretagne S., Guillou J.P., Morand M. and Houin R., Detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in fox faeces using DNA amplification. *Parasitology*, 1993, vol. 106, pp. 193–199.

Busi M, Snabel W, Varcasia A, Garippa G, Perrone V, De Liberato C, D'Amelio S (2007) Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* revealed by multilocus DNA sequencing. *Vet Parasitol* (in press).

Cabrera M., Canova S., Rosenzvit M., Guarnera E., Identification of *Echinococcus granulosus* eggs. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2002, vol. 44, n. 1, pp. 29-34.

Cabrera P.A., Lloyd S., Haran G., Pineyro L., Parietti S., Gemmell M.A., Correa O., Morana A., Valledor S., Control of *Echinococcus granulosus* in Uruguay: evaluation of different treatment intervals for dogs. Veterinary Parasitology, 2002, vol. 103, n. 4, pp. 333-340.

Cannas A., Ponti N., Rolesu S., Il controllo della popolazione canina. Atti Tavola Rotonda Campagna di Eradicazione dell'Echinococcosi/Idatidosi in Sardegna: Attualità e Prospettive 43-47, (1990).

Capurso A, Pivellini P, Guarino C. Sulla diffusione di *Echinococcus granulosus* nei cani di Napoli e di alcuni comuni della provincia. Atti Soc Ital Sci Vet, 22: 725-729, (1968).

Casarosa L., Parassitologia degli animali domestici. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 1985.

Christofi G., Deplazes P., Christofi N., Tanner I., Economides P., Eckert J., Screening of dogs for *Echinococcus granulosus* coproantigen in a low endemic situation in Cyprus. Veterinary Parasitology, 2002, vol. 104, n. 4, pp. 299-306.

Conchedda M., Palmas C., Bortoletti G., Gabriele F., Ecca A.R. Hydatidosis: a comprehensive view of the Sardinian case. Parassitologia. Dec;39(4):359-66, (1997).

Cook BR (1989) The epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Great Britain. V. The status of subspecies of *Echinococcus granulosus* in Great Britain. Ann Trop Med Parasitol 83:51-61.

Cordero Del Campillo M., Rojo Vasquez F.A., Martinez Fernandez A.R., Sanchez Acedo M.C., Hernandez Rodriguez S., Navarrete Lopez-Cozar I., Diez Banos P., Quiroz Romero H., Carvalho Varela M., Parasitologia Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana de Espana, 1999.

Corsalini T (1955) Dati rilevati a Matera sulla frequenza della infestazione da *Echinococcus granulosus* nel cane e della idatidosi negli animali. Atti Soc Vet 9: 606-609. (In italian)

Corsalini T (1959) Frequenza dell'idatidosi nei soggetti delle diverse specie animali macellati a Bari. Veter Ital 10: 644-647. (In italian)

Craig P.S., Gasser R.B., Parada L., Cabrera P., Parietti S., Borgues C., Acuttis A., Agulla J., Snowden K., Paolillo E., Diagnosis of canine echinococcosis: comparison of coproantigen and serum antibody tests with arecoline purgation in Uruguay. Veterinay Parasitology, 1995, 56, pp. 293–301.

Craig P.S., Immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* and a comparison of techniques for diagnosis of canine echinococcosis. In: Andersen F.L., Ouhelli H., Kachani M. (Eds.), Compendium on Cystic Echinococcosis in Africa and Middle Eastern Countries with Special Reference to Morocco. Brigham Young University, Print Services, Provo, UT, 1997, pp. 85–118.

Craig P.S., Macpherson C.N.L., Nelson G.S., Immunodetection of *Echinococcus* eggs from naturally infected dogs and from enviromental

contamination sites in settlements in Turkana, Kenya. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1988, vol. 82, pp. 268–274.

Craig P.S., Macpherson C.N.L., Nelson G.S., The identification of eggs of *Echinococcus* by immunofluorescence using a specific anti-oncospherical monoclonal antibody. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1986, vol. 35, pp. 152–158.

Cringoli G, Captano F, Landolfi MC, Esposito A, Veneziano V, Rinaldi L. La Echinococcosi-Idatidosi in Campania. Atti Giornate Scientifiche Campane, 238, (1998).

Daniel Mwambete K, Ponce-Gordo F, Cuesta-Bandera C (2004) Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. Acta Trop 91: 87-93.

Deiana S., Arru E., *Echinococcus granulosus* in *Vulpes vulpes* della Sardegna. Rivista di Parassitologia, 1962, vol. 23, n. 4, pp. 262-275.

Demma I, Giambruno P, Virga A, Di Rosa S. L'idatidosi nel pubblico macello di Palermo nel quinquennio 1981-1985. Riv di Parassitol 6: 253-257, (1987).

Deplazes P., Alther P., Tanner I., Thompson R.C.A., Eckert J., *Echinococcus multilocularis* coproantigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay in fox, dog and cat populations. Journal of Parasitology, 1999, vol. 85, pp. 115–121.

Deplazes P., Gottstein B., Eckert J., Jenkins D.J., Ewald D., Jimenez-Palacios S., Detection of *Echinococcus* coproantigens by enzyme-linked immunosorbent assay in dogs, dingoes and foxes. Parasitology Research, 1992, vol. 78, pp. 303–308.

Deplazes P., Gottstein B., Stingelin Y., Eckert J., Detection of *Taenia hydatigena* coproantigens by ELISA in dogs. Veterinay Parasitology, 1990, vol. 36, pp. 91–103.

Deplazes P., Jimenez-Palacios S., Gottstein B., Skaggs J., Eckert J., Detection of *Echinococcus* coproantigens in stray dogs of northern Spain. Applied Parasitology, 1994, vol. 35, pp. 297–301.

Di Ventura M, Brugnola LM, Tieri E, Scacchia M, Gatti A Indagine sulla presenza di Cestodi in Volpi (*Vulpes vulpes*) e cani (*Canis familiaris*) nella provincia di Teramo. Atti Conv Naz “Problematiche veterinarie emergenti nelle aree Protette”: 57-59,(1995)

Dinkel A., Njoroge E., Zimmermann A., Wälz M., Zeyhle E., Elmahdi I., Mackenstedt U., Romig T., A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa, International Journal For Parasitology, Volume 34, Issue 5, April 2004, Pages 645-653.

Dinkel A., Von Nickisch-Roseneck M., Bilger B., Merli M., Lucius R., Romig T., Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host:

coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, vol. 36, pp. 1871–1876.

Eckert J., Deplazes P., Craig P.S., Gemmell M.A., Gottstein B., Heath D., Jenkins D.J., Kamiya M., Lightowers M., Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment. In: Eckert J., Gemmell M.A., Meslin F., Pawlowski X.Z. (Eds.), *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern*. World Organisation for Animal Health, Paris, 2001, pp. 72–99

Eckert J.; Thompson R.C., Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans, *Acta Tropica*, Volume 64, Issue 1-2, April 1, 1997, Pages 19-34.

El-Shehabi F.S., Kamhawi S.A., Schantz P.M., Craig P.S. and Abdel-Hafez S.K., Diagnosis of canine echinococcosis: comparison of coproantigen detection with necropsy in stray dogs and red foxes from northern Jordan. *Parasite*, 2000, vol. 7, pp. 83–90.

Euzeby J., *Diagnostic experimental des helminthoses animales – travaux pratiques d’helminthologie veterinaire, livre I, Edition Informations techniques des services veterinaires*, Paris, 1981.

Euzeby J., *Les echinococcoses animales et leurs relations avec les echinococcoses de l’homme*. Vigot Freres Paris, 1971.

Euzeby J., Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leur incidence sur la pathologie humaine. Tome III. Maladies dues aux plathelminthes, Bigot Frères edition, Paris, 1966.

Faggioli P, Baldelli R, Battelli G. Cystic echinococcosis in Italy: prevalence in food-producing animals slaughtered in the Emilia-Romagna Region. VI National Conference of Parasitology of the Bulgarian Society for Parasitology: 121, (2001)

Gallo C (1955) L'echinococcosi e la distomatosi degli equini in Sicilia. Atti Soc Ital Sci Vet 9: 689-691. (In italian)

Gallo C, De Girolamo G. Elmintiasi dei cani in Sicilia. Atti Soc Ital Sci Vet 14: 339-342, (1960).

Gargiulo M, Paganico G, Urbani G, Cipolletti V. Indagine epidemiologica sull'echinococcosi/idaatidosi in Abruzzo. Summa 4 (3): 191-194, (1987).

Garippa G., Masala S., Biddau M., Leori G., Arru E., New data on chemoprophylaxis of ovine hydatidosis, Parassitologia, 1998, 40, (1).

Garippa G., Varcasia A., Scala A., Cystic Echinococcosis in Italy from the 1950s to Today, Parassitologia, 2004.

Garippa G; Battelli G; Cringoli G; Giangaspero A; Giannetto S; Manfredi, M. T., Animal echinococcosis in Italy: epidemiological update, Parassitologia, Volume 46, Issue 1-2, June 2004, Pages 33-38

Gasser R.B., Jenkins D.J., Heath D.D., Lawrence S.B., Use of *Echinococcus granulosus* worm antigens for immunodiagnosis of *E. granulosus* infection in dogs. *Veterinary Parasitology*, 1992, vol. 45, n.1-2, pp. 89-100.

Gasser R.B., Jenkins D.J., Paolillo E., Parada L., Cabrera P., Craig P.S., Serum antibodies in canine echinococcosis, *International Journal for Parasitology*, 1993, vol. 23, n. 5, pp. 579-586.

Gasser R.B., Lightowlers M.W., Obendorf D.L., Jenkins D.J., Rickard M.D., Evaluation of a serological test system for the diagnosis of natural *Echinococcus granulosus* infection in dogs using *E. granulosus* protoscolex and oncosphere antigens, *Australian Veterinary Journal*, 1988, vol. 65, n. 12, pp. 369-373.

Gasser R.B., Lightowlers M.W., Rickard M.D., Lyford R.A., Dawkins H.J., Serological screening of farm dogs for *Echinococcus granulosus* infection in an endemic region, *Australian Veterinary Journal*, 1990, vol. 67, n. 4, pp. 145-147.

Gasser R.B., Zhu X., McManus D.P., Display of sequence variation in PCR-amplified mitochondrial DNA regions of *Echinococcus* by single-strand conformation polymorphism, *Acta Tropica*, 1998, vol. 71, n. 2, pp. 107-115.

Gammel M.A., Lawson J.R., Epidemiology and control of Hydatid disease. In: Thompson R.C.A. (ed.) *The biology of Echinococcus and*

Hydatid disease. George Allen & Unwin, London, 1986.

Gemmel M.A., Natural and acquired immunity factors interfering with development during the rapid growth phase of *Echinococcus granulosus* in dogs. Immunology, 1962, vol. 5, pp. 496-503.

Giannetto S, Virga A, Buriola E. Ricerche sui cestodi intestinali in cani da pastore della Sicilia occidentale. Atti Soc Ital Sci Vet 51: 311-312, (1997).

González L.M., Daniel-Mwambete K., Montero E., Rosenzvit M.C., McManus D.P., Gárate T., Cuesta-Bandera C. Further molecular discrimination of Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. Exp Parasitol 2003 102: 46-56.

Gordon H.M., Whitlock H.V., A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. J. of Council Scientific and Industrial Research, Australia, 1939.

Guarnera E.A., Santillan G., Botinelli R., Franco A., Canine echinococcosis: an alternative for surveillance epidemiology. Veterinary Parasitology, 2000, vol. 88, n. 1-2, pp. 131-134.

Hatch C, Smyth JD (1975) Attempted infection of sheep with *Echinococcus granulosus equinus*. Res Vet Sci 19:340.

Heath D.D., Lawrence S.B., Daily egg-production of dogs infected with

Echinococcus granulosus. Archives de la Hidatidosis, 1991, vol. 30, pp. 321-328.

Howkins AB, Gemmel MA, Smyth JD (1965) Experimental transmission of *Echinococcus* from horse to foxes. Ann Trop Med Parasit 59: 457-462.

Jenkins D.J., Gasser R.B., Zeyhle E., Romig T., Macpherson C.N., Assessment of a serological test for the detection of *Echinococcus granulosus* infection in dogs in Kenya, Acta Tropica, 1990, vol. 47, n. 4, pp. 245-248.

Kedra A.H., Z. Swiderski V.V. Tkach P. Dubinský Z. Pawlowski J. Stefaniak and J. Pawlowski , Genetic analysis of *Echinococcus granulosus* from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicenter study. *Acta Parasitol.* 199 (1999), pp. 248–254.

Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvela-Koski V, Meri S (2003) Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. Parasitology 127: 207- 215.

Laws G.F., Physical factors influencing survival of Taeniid eggs. Experimental Parasitology, 1968, vol. 22, pp. 227-239.

Le TH, Pearson MS, Blair D, Dai N, Zhang LH, McManus DP (2002) Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus*. Parasitology 124: 97-112.

Lorenzini R, Ruggieri A (1987) Distribution of echinococcosis/hydatidosis in Italy. J Helminthol 61:261-7.

Macchioni G, Gallo C (1967) Sulla presenza in Italia dell'*Echinococcus granulosus equinus* (Williams e Sweatman, 1963). Aspetti epizootologici e studio morfo-biologico del Parassita. Annali Fac. Med. Vet. Pisa 20: 58-77 (in italian).

Malgor R., Nonaka N., Basmadjian I., Sakai H., Carambula B., Oku Y., Carmona C. and Kamiya M., Coproantigen detection in dogs experimentally and naturally infected with *Echinococcus granulosus* by a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. International Journal for Parasitology, 1997, 27, pp. 1605–1612.

Marabelli R., Mantovani A., La Medicina Veterinaria presentata ai Pubblici Amministratori. Pubblicazione S.I.V.E.M.P. Roma, novembre 1997.

Mathis A., Deplazes P. and Eckert J., Improved test system for PCR-based detection of *E. multilocularis* eggs in faeces of final host, Limasol, Cyprus

- Meeting of the World Health Organization Informal Working Group on Echinococcosis, 1995.

Morishima Y., Tsukada H., Nonaka N., Oku Y., Kamiya U M.; Coproantigen survey for *Echinococcus multilocularis* prevalence of red foxes in Hokkaido, Japan - Parasitology International, 1999, 48, pp. 121-134.

Morseth D.J., Ultrastructure of developing taeniid embryophores and associated structures. Experimental Parasitology, 1965, vol. 16, pp. 207-216.

Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A (2006) A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. Parasitology 11: 1-10.

Nobile L, Virga A, Camelli A, Fioravanti ML. Indagine sulla presenza di elminti intestinali in Cani della Sicilia occidentale. Atti Soc Ital Sci Vet 47: 1427-1430, (1993).

Panebianco F, Sciutleri G. Indagini sulla diffusione delle elmintiasi nella popolazione canina della provincia di Messina. Vet Ital 6: 1203-1208, (1955).

Pierotti P (1954) Echinococcosi epatica in equino. Ann Fac Med Vet Pisa

7: 32-42. (In italian).

Poglayen G., Giannetto S., Scala A., Gaglio G. Parasitic fauna of the Sicilian Black Pig. WAAP 2001.

Ponce Gordo F, Cuesta Bandera C (1998) Observations on the *Echinococcus granulosus* horse strain in Spain. Vet. Parasitol. 76: 65-70.

Puccini V, Tassi P. Considerazioni sulla diffusione dell'idatidosi negli ovini e nei caprini macellati in Puglia dal 1975 al 1982. Atti SIPAOC 5: 315-329, (1983).

Romboli B, Pierotti P (1960) L'idatidosi degli equini. Ann Fac Med Vet Pisa 13: 67-78. (In italian).

Romboli B, Schiavo A, Poglayen G, Papalia S, De Giovanni F, Martini M. Rilevazioni statistiche inerenti l'incidenza della Echinococcosi-Idatidosi in Italia. Atti Tavola Rotonda Echinococcosi Idatidosi: 13-17, X Congr Naz. SOIPA, (1980).

Romig T, Dinkel A, Mackenstedt U (2006). The present situation of echinococcosis in Europe. Parasitol Int 55: 187-91.

Rozenzvit M.C., Zhang L.H., Kamenetzky L., Canova S.G., Guarnera E.A., McManus D.P., Genetic variation and epidemiology of

Echinococcus granulosus in Argentina. Parasitology, 1999, vol. 118, pp. 523–530.

Scala A, Espa A, Miculan A, Barbieri A. A parasitological survey on sheep slaughtered in the province of Cagliari (Italy). Atti Fe Me S P Rum 8: 239-24, (2000b).

Scala A, Pintori A, Uras P, Delogu ML. Hepatic hydatidosis of sheep in the province of Sassari: data from a recent survey. Parassitologia 42: 223, (2000a).

Scala A., Bitti P.L., Fadda M., Pilia A., Varcasia A., I trattamenti antiparassitari negli allevamenti ovini della Sardegna, VII Congress Fe.Me.S.P.Rum, 1999, pp. 267-272.

Scala A., Uras P., Pintori A., Poglayen G., Giannetto S., Brianti E., Garippa G., Epidemiological updating on Hydatidosis in sheep in insular Italy, XX International Congress of Hydatology, Turkey 2001, 34, pp. 303.

Scala A., Urrai G., Ruiu A., Leoni A., Marrosu R., Garippa G., Una metacestodosi spesso sottovalutata negli ovini: la cisticercosi da *Cysticercus tenuicollis*. XV Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C., Chia, 2002, 15, pp. 92.

Scala A., Varcasia A., Garippa G., Cystic Echinococcosis in Sardinia: the current role of sheep. - Parassitologia 46, 2004.

Schiavo A, De Giovanni F, Ferlicca A, Martini M, Stagni M, Mantovani A. Indagine conoscitiva sullo stato igienico-sanitario degli allevamenti ovini e caprini in Italia. Riv di Zootec e Vet 5: 351-374, (1979).

Schiavo A, Pansini G. Responsabilità sanitarie ed echinococchi. Ob e Doc Vet 6: 81-84, (1996).

Seimenis A, Battelli G. Epidemiological situation and surveillance, Issue dedicated on Cystic Echinococcosis & The Mediterranean. Inf. Circ. – WHO Mediterr Zoon Control Cent 57: 6-8, (2003).

Shantz P.M., Echinococcosis. In: J.Steele (ed.), CRC Handbook series in Zoonoses, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982.

Smyth J.D. and McManus D.P., The physiology and biochemistry of cestodes, Cambridge University Press, Melbourne, Australia, 1989.

Tanda S (1960) Osservazioni sull'Echinococcosi (idatidosi) degli animali macellati a Sassari. Vet Ital 11: 3-14. (In italian)

Teleman W., Eine methode von Parasitein faeces deutsch. Med Wochenschr, 1908, vol. 34, pp. 1510–1511.

Thienpont D., Rochette F., Vanparijs O.F.J., L'esame coprologico nella diagnosi delle elmintiasi. Janseen Research Foundation, Beerse, Belgium, 1986.

Thompson R. C. Andrew; McManus, Donald P., Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*, Trends In Parasitology, Volume 18, Issue 10, October 2002, Pages 452-457.

Thompson R.C.A., Eckert J., The production of eggs by *E. multilocularis* in the laboratory following *in vivo* and *in vitro* development. Zeitschrift fur Parasitenkunde, 1982, vol. 68, pp. 227-34.

Thompson R.C.A., Lymbery, A., *Echinococcus* and Hydatid Disease. CAB International, England, 1995.

Thompson R.C.A., McManus D.P., Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*, Trends in Parasitology, 2002, vol. 18, n. 10, pp. 452-457.

Thompson RCA, Smyth JD (1975) Equine hydatidosis: a review of the current status in Great Britain and the results of an epidemiological survey. Vet. Parasitol 1: 107–127.

Tieri E, Gatti A. Echinococcosi/Idatidosi nella provincia di Teramo: indagine epidemiologica e considerazioni. Boll Epidem Vet Suppl Vet It, 14: 1-6, (1995).

Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M., Jennings F.W.,
Parassitologia veterinaria. Edizione Italiana a cura di C. Genchi, UTET,
1998.

Varcasia A, Canu S, Lightowlers MW, Scala A, Garippa G (2006)
Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* strains in
Sardinia. Parasitol Res. 98: 273- 277.

Virga A. L'idatidosi negli animali macellati in Sicilia nel biennio 1988/89.
Ob e Doc Vet 3: 43-47, (1991).

Von Nickisch-Roseneck M, Lucius R, Loos-Frank B (1999)
Contributions to the phylogeny of the Cyclophyllidea (Cestoda) inferred
from mitochondrial 12S rDNA. J Mol Evol 48: 586- 596.

Walters T.M. and Craig P.S., Diagnosis of *Echinococcus granulosus*
infection in dogs. Veterinary Record, 1992, vol. 131, pp. 39-40.

Williams RJ, Sweatman GK (1963) On the transmission, biology and
morphology of *Echinococcus granulosus equinus*, a new subspecies of
hydatid tapeworm in horses in Great Britain. Parasitology 53: 391-407.

Zhang L., Gasser R. B., Zhu X., McManus D. P., Screening for different
genotypes of *Echinococcus granulosus* within China and Argentina by
single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis, Transactions

of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1999, vol. 93, n. 3, pp. 329-334.

Tabella 1:Le specie del genere *Echinococcus*

Specie	Caratteristiche
<i>E. granulosus</i> (Batsch, 1786)	Cosmopolita, utilizza diversi carnivori come ospiti definitivi e come ospiti intermedi circa 50 specie animali.
<i>E. multilocularis</i> (Leuckart, 1863)	Parassita allo stadio adulto della volpe, del cane e anche del gatto. Gli ospiti intermedi sono piccoli roditori; è una specie prevalente nell'emisfero nord, in particolare nel centro ed est Europa, Canada ed ex URSS.
<i>E. oligarthrus</i> (Diesing, 1863)	Ospiti definitivi sono felidi selvatici (puma, giaguaro) e gli ospiti intermedi grandi roditori come <i>Pacas</i> e <i>Agoutis</i> (<i>Cuniculus paca</i>). Geograficamente si trova nel Sud e Centro America.
<i>E. vogeli</i> (Rausch e Bernstein, 1972)	Ha un ciclo biologico che include canidi selvatici (<i>Speothos venaticus</i>) tra i definitivi e grandi roditori (<i>Cuniculus paca</i>) tra gli ospiti intermedi; è presente nel Sud e Centro America. Il cane domestico è suscettibile all'infestazione ed è il principale vettore del parassita nella patogenesi dell'Echinococcosi policistica nell'uomo.
<i>E. shiquicus</i>	Xiao et al., International Journal for Parasitology, Volume 35, Issue 6, May 2005, Pages 693-701 - 2005

Tabella 2:

Echinococcus granulosus: ceppi e genotipi finora isolati e nuova nomenclatura proposta a livello internazionale.

Ceppo/variante genetica (strains)	Nuova Classificazione	Ospiti intermedi	Ospiti definitivi	Distribuzione geografica
G1 (Ceppo ovino)	<i>Echinococcus granulosus</i> “ <i>sensu stricto</i> ”	ovino, bovino, suino, cammello, caprino, uomo	cane, volpe, dingo, sciacallo, iena	Australia centrale, Europa, USA, Nuova Zelanda, Africa, Cina, Medio Oriente, Sud America, Federazione Russa, Tasmania, Argentina
G2 (Ceppo ovino della Tasmania)		ovino, bovino, uomo	cane, volpe	Tasmania, Argentina
G3 Ceppo del bufalo		bufalo, bovino (?), uomo (?)	cane, volpe (?)	Asia
Lion Strain	<i>Echinococcus felidis</i>	vari ruminanti africani, uomo (?)	leone	Africa
G4 (Ceppo equino)	<i>Echinococcus equinus</i>	cavallo e altri equini	cane	Europa, Medio Oriente, Sud Africa, Nuova Zelanda (?), USA (?)
G5 (Ceppo Bovino)	<i>Echinococcus ortleppi</i>	bovino, uomo	cane	Europa, Sud Africa, India, Sri Lanka, Federazione Russa, Sud America (?)
G6 (Ceppo del cammello)	<i>Echinococcus canadensis</i> ?????	cammello, caprino, bovino (?), uomo	cane	Medio Oriente, Africa, Cina, Argentina
G7/9 (Ceppo del suino)		suino, uomo	cane	Europa, Federazione Russa, Sud America
G8 (Ceppo del cervo)		cervo, uomo	lupo, cane	Nord America, Eurasia
G10 (Ceppo Fennoscandinavo)		cervo	lupo, cane	Finlandia

Tabella 3: Campioni di *Echinococcus granulosus* (Idatidi) su cui è stato condotto il lavoro di caratterizzazione biomolecolare in Sardegna con i risultati ottenuti per ciascuna metodologia impiegata

	Strain PCR	NADH	COI	Nuova nomenclatura
Ovini				
63	G1	G1	G1	<i>E. granulosus</i> s.s.
Bovini				
14	G1	G1	G1	<i>E. granulosus</i> s.s.
Suini				
34	G6/G7	G7	G7	<i>E. canadensis</i> G7
2	G1	G1	G1	<i>E. granulosus</i> s.s.
Cinghiali				
3	G1	G1	G1	<i>E. granulosus</i> s.s.
Equini	12S			
6	G1	G1	G1	<i>E. granulosus</i> s.s.
2	G4	G4	G4	<i>E. equinus</i>

Grafico 1:

