



A.D. MDLXII

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Dottorato di Ricerca in

Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale

XXI Ciclo

**NUOVE PROSPETTIVE PER IL
CONTROLLO DELLA CENUROSI
CEREBRALE DEGLI OVINI**

Coordinatore: Prof. A. M. Cosseddu

Docente Guida: Prof. Giovanni Garippa

Tesi di dottorato della
Dott.ssa Anna Paola Pipia

ANNO ACCADEMICO 2007 - 2008

Indice

Introduzione	Pag 02
Morfobiologia del parassita	Pag 07
Diffusione geografica	Pag 11
Note epidemiologiche	Pag 12
Aspetti clinico-patologici	Pag 15
Diagnosi	Pag 17
Metodi di controllo e prevenzione	Pag 23
Terapia chirurgica	Pag 24
Aspetti zoonosici	Pag 26
La biologia molecolare in parassitologia	Pag 28
Le nuove frontiere dei vaccini	Pag 36
Scopo del lavoro	Pag 42
Materiali e metodi	Pag 43
Risultati	Pag 49
Considerazioni	Pag 52
Conclusioni	Pag 56
Bibliografia	Pag 58
Tabelle	Pag 72
Documentazione fotografica	Pag 76

Introduzione

La Cenurosi cerebro-spinale, è una metacestodosi sostenuta dalla forma larvale di *Taenia multiceps multiceps* (Leske, 1780) che allo stadio adulto vive nel piccolo intestino dei canidi, mentre la forma larvale, *Coenurus cerebralis*, si localizza nel cervello e più raramente nel midollo spinale dei ruminanti principalmente gli ovini più raramente i bovini, i caprini ed alcuni animali selvatici tra cui il muflone (Cubeddu 1990, Cancedda, 2002). È trasmessa dal cane e da altri canidi selvatici agli ospiti intermedi, soprattutto all'ovino, particolarmente sensibile a questa parassitosi. Colpisce preferibilmente gli animali al pascolo, i quali s'infestano ingerendo le uova mature di *Taenia multiceps* eliminate dal cane con le feci.

La Cenurosi, conosciuta fin dal XVII sec., è una parassitosi, che nonostante venga sottostimata dagli operatori del settore, rappresenta un rilevante problema in quelle regioni in cui l'allevamento ovino e caprino è preminente (Bagedda, 1949; Deiana, 1971).

Questa metacestodosi può arrecare negli allevamenti ovini dei danni notevoli; ciononostante spesso sono altre parassitosi meno invalidanti ad

attirare l'attenzione degli addetti ai lavori, sottovalutando così anche il ruolo che la malattia assume come zoonosi minore (Scala et al., 1992).

Essa è spesso sottostimata perché le forme più classiche sono riconosciute direttamente dall'allevatore, che non richiede solitamente una conferma diagnostica del Veterinario.

Pertanto questi casi solo raramente vengono segnalati, rendendo quindi difficile una esatta valutazione della sua diffusione nelle diverse aree geografiche.

Anche l'allevatore spesso tende a sottovalutare la Cenurosi, in considerazione del fatto che spesso la sua incidenza all'interno del gregge non è generalmente elevata, eccetto i rari casi in cui può essere colpito anche il 40% della quota di rimonta con un tasso di mortalità che può variare dall'1 all'80% (Scala et al., 1992).

La diffusione della parassitosi è spesso favorita dall'allevatore stesso che non riconosce nel cane l'ospite definitivo più importante.

In Sardegna ad esempio risultano molto numerose le macellazioni clandestine effettuate spesso all'aperto in prossimità dell'ovile e che consentono quindi ai cani un facile accesso ai visceri parassitati. Inoltre a causa dell'inadeguata applicazione delle normative sul controllo delle nascite e sull'anagrafe, la popolazione canina, specie quella da pastore e randagia cresce a dismisura e contribuisce alla diffusione di questa parassitosi, con conseguenti importanti perdite economiche ed aumentato

rischio zoonotico, anche per lo scarso impiego di trattamenti profilattico-terapeutici adeguati.

Il persistere di queste situazioni nelle aree interessate dalla Cenurosi cerebrale (macellazioni clandestine, randagismo, abbandono delle carcasse nei pascoli o nelle discariche abusive) ne rendono difficile il controllo.

In questo contesto, sovrapponibile peraltro in Sardegna a quello inerente anche altre metacestodosi di maggior interesse zoonosico, quali ad esempio l'Echinococcosi Cistica, in cui le normali norme di profilassi fino ad oggi adottate (trattamento antielmintico della popolazione canina, controllo della macellazione ed educazione sanitaria) non hanno mai fornito un risultato concreto, è sembrato utile ed opportuno valutare, sulla falsa riga di analoghe esperienze condotte con successo su altre metacestodosi (*Echinococcus granulosus*, *Taenia ovis*, *Taenia saginata*, *Taenia solium*, etc.), l'utilizzo di proteine ricombinanti per la profilassi vaccinale nei confronti della Cenurosi cerebrale negli ovini. Sotto l'aspetto metodologico si è ritenuto opportuno condurre questa sperimentazione, resa possibile grazie alla collaborazione con un gruppo di ricerca dell'Università di Melbourne (Australia), ed in particolare col Prof. Marshall Lightwolers, che ha fornito le proteine ricombinanti, attraverso delle prove di campo che hanno coinvolto direttamente diverse

aziende del Nord Sardegna, in cui la Cenurosi quasi ogni anno colpisce, in modo più o meno grave, diversi soggetti della rimonta.

È stato inoltre effettuato lo studio sulla caratterizzazione biomolecolare del genoma del parassita al fine di individuare eventuali varianti genetiche, dato che precedenti indagini condotte in Sardegna (Varcasia et al., 2006) avevano messo in evidenza la presenza di 3 varianti del parassita: Tm1, Tm2, e Tm3.

La presente ricerca rappresenta un importante passo avanti nella valorizzazione della filiera ovina in Sardegna, in particolare per ciò che concerne le produzioni primarie.

La Cenurosi infatti, andando a colpire soprattutto la quota di rimonta, ovvero soggetti selezionati scelti dall'allevatore per il loro patrimonio genetico relazionato alla massima resa quali-quantitativa in latte, va ad influire negativamente sulle produzioni stesse .

Pertanto la parassitosi assume, per le aziende e soprattutto per gli allevatori, un'importanza molto più rilevante (almeno dal loro punto di vista) rispetto ad altre metacestodosi come l' E/C.

In aggiunta possiamo affermare, sulla scorta di rilievi sul campo, il riscontro sempre più frequenti di focolai, anche consistenti, di CC in greggi di ovini adulti a stabulazione fissa.

Per motivi ancora da approfondire, ma che sembrerebbero essere legati ad una mancata stimolazione immunitaria sul campo, questi soggetti si

comportano nei confronti di *T. multiceps* esattamente come le agnelle da rimonta. Anche in questi casi spesso si tratta di capi di alto valore genetico che vanno incontro inesorabilmente ad exitus.

Fermo restando che la lotta alle metacestodosi vada condotta senza “abbassare la guardia” con la prevenzione ed informazione sanitaria, riteniamo che la vaccinazione degli OI consenta di disporre di greggi ed animali “Cenurosi free” (in quanto vaccinati) e che pertanto possa costituire un valido strumento per migliorare le produzioni primarie, garanzia non di poco conto quando si parla di riproduttori di alta genealogia.

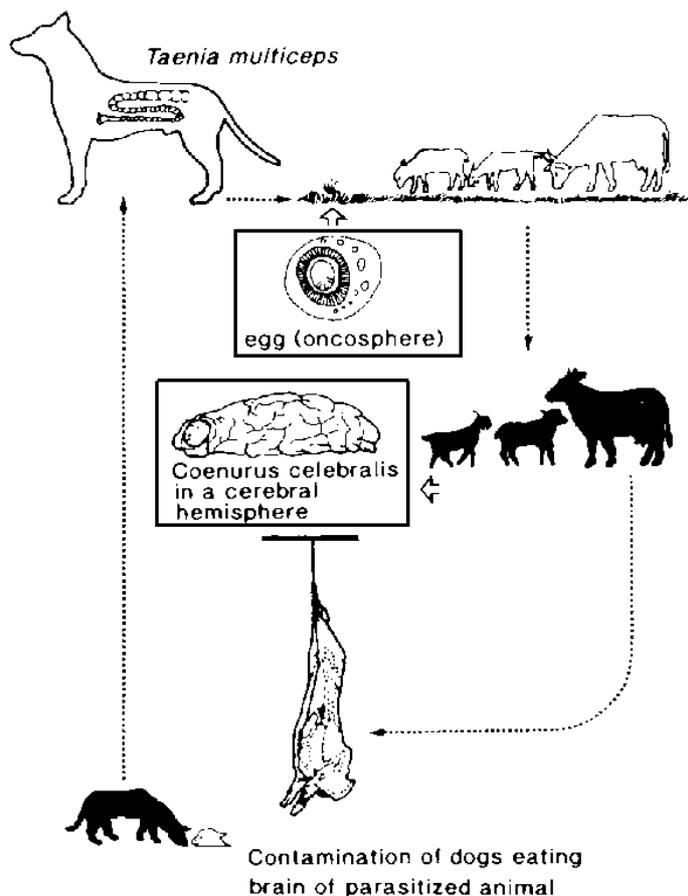
Morfo-biologica del parassita

Taenia multiceps è un cestode appartenente all'ordine *Ciclophyllidea*, famiglia *Taenidae*, che si localizza nell'ileo dell'ospite definitivo (O.D.) per 6/8 mesi; misura 40-80cm ed è munito di uno scolice piriforme avente diametro di 800 μ e dotato di rostro formato da una duplice corona di 22-23 uncini. La tenia raggiunge la maturità dopo 42 giorni circa dall'ingestione da parte dell'ospite definitivo della forma larvale. Le uova, liberate dalle proglottidi gravide in seguito all'autospremitura delle stesse, sono già mature al momento della loro emissione con le feci nell'ambiente esterno, pertanto immediatamente infestanti. Queste contaminano pascoli e corsi d'acqua e resistono all'esterno 15 gg. in ambiente secco, 24 h a temperature elevate e 3 settimane in ambiente umido (Euzéby, 1966).

Le caratteristiche biologiche relative alla resistenza delle uova nell'ambiente esterno risultano nettamente differenti da quelle di *Echinococcus granulosus* che possono sopravvivere nei pascoli anche un anno, mentre risultano morfologicamente indistinguibili rispetto a quelle di tutti i tenidi del cane, *Echinococco* compreso.

Una volta ingerito, l'uovo libera nell'intestino dell'ospite intermedio la larva esacanta grazie all'azione di una proteasi pancreatica che digerisce la sostanza cementante dei prismi esagonali di materiale proteico simil-cheratinico, tipici dell'embrioforo dei tenidi; contribuisce alla liberazione di tali larve esacante anche il movimento attivo dei loro uncini, che lacerano le membrane che le racchiudono (Euzeby, 1966).

Tramite il torrente circolatorio (vena porta e vene sovraepatiche), arrivano alla vena cava posteriore e attraverso il cuore destro si distribuiscono al polmone; le arterie polmonari le immettono nel cuore sinistro, per guadagnare quindi il grande circolo. Solo le larve pervenute nei centri nervosi cerebro-spinali possono evolvere vescicolizzandosi in un tipico cenuro, mentre le altre degenerano (Euzeby, 1966).



Le tappe cronologiche dell'evoluzione dell'oncosfera sono le seguenti:
 all'8° giorno circa raggiunge i centri nervosi; al 40° si vescicolizza assumendo aspetto pisiforme con scolici appena abbozzati; dopo 2 mesi raggiunge le dimensioni di una ciliegia; a 3 mesi è matura con scolici ben formati; a 7/8 mesi assume le dimensioni definitive, che variano da 2 a 6 cm (Euzéby, 1966).

In sede di localizzazione il cenuro maturo è circondato da un'esile membrana connettivale e da una reazione macrofagica-gigantocellulare

con la quale tuttavia ha solo rapporti di contiguità, perciò risulta facilmente enucleabile (Euzeby, 1966).

A questo stadio contiene un liquido chiaro, traslucido, con caratteristiche antigeniche ben definite, con numerose formazioni biancastre puntiformi, raggruppate irregolarmente e corrispondenti a scolici invaginati (fino a 500). Questi ultimi possono talvolta evaginarsi e procedere sulla superficie interna della vescicola; sono provvisti di un rostro armato di una corona di uncini chitinosi disposti su due file. Il parassita a questo stadio si nutre per osmosi.

Diffusione geografica

Sebbene presente soprattutto nei climi temperati, la Cenurosi può essere considerata cosmopolita, con focolai in America ed Eurasia.

È stata segnalata nel Galles, in cui risulta la neuropatologia più diffusa nelle pecore (Herbert et al., 1984), in Etiopia con prevalenze variabili dal 2,3%, al 4,5% (Achenef et al., 1999), in Giordania (Abo-Shehada et al., 2002), in Irlanda (Doherty et al., 1989), in Francia (Euzeby, 1966), in Russia (Aminzhanov et al., 1988) in India (Tirgari et al., 1987) ed in Iran sia nelle capre (Gharagozlou et al., 2003) che nelle pecore (Oryan et al., 1994; Ghazaei 2005).

In Italia è stata descritta in Sardegna (Deiana et al., 1971; Scala et al., 1992; Cancedda et al., 2002), in Puglia (Lia et al., 1996 e Troiano et al., 1990) in Sicilia (Di Marco et al., 1998; Guarda, 2002) nel Lazio (Tarantino et al., 2002), ed in Umbria (Veronesi et al., 2008). Le differenti prevalenze sopra descritte potrebbero essere imputabili alle diverse caratteristiche climatiche, nonché a differenti fattori sociologici ed ecologici (Sharma et Chauhan, 2005).

Note epidemiologiche

Il ciclo solitamente è di tipo rurale: l'infestazione si trasmette dal cane alla pecora e viceversa, tuttavia si potrebbe parlare anche di un tipo rurale-silvestre qualora fossero coinvolte le volpi e gli ungulati selvatici, così come riportato in Sardegna (Coda et al., 1988).

Anche se precedenti lavori indicano la volpe un'ospite improbabile per questo parassita, per via della difficoltà di questo canide ad intaccare la parete ossea della scatola cranica per asportarne l'encefalo (Deiana, 1971), recenti studi documentano invece che questa evenienza è possibile, come documentato dal riscontro del parassita adulto in sede di esame parassitologico diretto di diverse volpi (Varcasia, dati non pubblicati). Inoltre l'assottigliamento della teca ossea causato dalla compressione esercitata dalla cisti, assieme alla giovane età degli animali parassitati (e che quindi possiedono una componente ossea più "morbida"), può favorirne l'ingestione da parte di questi ospiti definitivi. Di norma però volpi e cani randagi, se non eccessivamente affamati, si cibano in un primo tempo dei tessuti molli degli ovini

mentre aggrediscono le parti ossee anche a distanza di vari giorni quando il tessuto nervoso è in via di putrefazione ed il parassita già devitalizzato (Coda et al., 1988). Ciò che invece sembra influenzare decisamente la diffusione del parassita è essenzialmente l'aspetto antropico, in quanto molto spesso è l'allevatore stesso che per curiosità apre il cranio delle agnelle infestate e successivamente non provvede allo smaltimento corretto del materiale parassitario, che può essere invece ingerito facilmente dagli ospiti definitivi.

La Cenurosi colpisce, in particolar modo, gli animali durante il primo anno di vita, in quanto il sistema immunitario dell'ospite successivamente completa il suo sviluppo ed acquisisce la possibilità di contrastare con maggiore efficienza lo sviluppo del parassita (Herbert et al., 1984).

Le uova di *Taenia multiceps*, risultano presenti nei pascoli in gran numero soprattutto durante il periodo dei parti, che in certe aree corrisponde alla stagione umida particolarmente favorevole anche alla loro sopravvivenza (Herbert et al., 1984).

Già in agnelli di 4/8 settimane di età è possibile rilevare i segni clinici dell'infestazione; ciò suggerisce che l'ingestione delle uova di *Taenia multiceps* possa avvenire durante i primi giorni di vita, anche perché il grado di protezione passiva acquisita attraverso l'assunzione di colostro sembrerebbe non durare a lungo (Herbert et al., 1984).

Shults (1959) conferma tale ipotesi rilevando i cenuri nell'80% dei casi in animali giovani, mentre solo raramente ha riscontrato la patologia negli adulti.

In Sardegna la malattia colpisce nel 69,5% dei casi gli agnelli, nel 26% le saccaie, e solo nel 4,3% i capi adulti e sembra coinvolgere i primi nel periodo primaverile (62% dei casi), mentre nelle saccaie la malattia si riscontra in fase cronica prevalentemente in autunno (72%) (Scala et al., 1992).

Alcuni studi suggeriscono l'esistenza di una correlazione tra il numero di scolici e l'età dei cenuri. La data d'insorgenza dell'infestazione può essere così stimata, con una certa attendibilità, dal logaritmo del numero medio di scolici presenti nella parete del cenuro (Herbert et al., 1984). Questa analisi potrebbe costituire dunque un valido supporto per lo studio epidemiologico di questa parassitosi nei vari distretti geografici.

Aspetti clinico-patologici

Nella Cenurosi vengono solitamente descritte due forme: acuta e cronica. La prima è provocata dalla penetrazione e migrazione delle oncosfere nei vari tessuti del SNC; i sintomi all'esordio della malattia, come riferisce Murzanandiev (1953), sono causati da una infiammazione acuta diffusa che è dovuta più ad una reazione tossica ed allergica, che all'azione meccanica della larva in migrazione. I segni clinici e la gravità della fase acuta sono dipendenti dal numero di uova ingerite, dall'entità della risposta infiammatoria e dalla localizzazione del parassita nel SNC.

Una singola lesione in una particolare area sensitiva o in un ganglio è più grave rispetto a lesioni multiple in altre regioni del cervello (Fankhauser et al., 1959).

Nella forma acuta viene anche descritta una fase quiescente, durante la quale il cenuro matura; qualora questo venga attaccato da neutrofili, si può registrare un recupero completo dell'animale colpito. In questi soggetti, in sede necroscopica, sono state rinvenute solo delle piccole lesioni caseose (Edwards et al., 1982).

La forma cronica si manifesta soprattutto in pecore di 10/18 mesi, è dovuta alla presenza nel S.N.C. di cenuri maturi che causano sintomi clinici solitamente evidenti; nella maggior parte dei casi è fatale per

l'animale colpito (Herbert et al., 1982). La morte in genere sopraggiunge 4/7 mesi dopo l'ingestione delle oncosfere (Scala et al., 1992).

Decorsi atipici possono talvolta essere messi in relazione con infestioni causate da un numero rilevante di cenuri che determinano forti compressioni al SNC già in una fase intermedia di sviluppo (Scala et al., 1992).

Baikhazkin (1977) ha indicato l'importanza dello stato nutrizionale sul decorso clinico della Cenurosi; infatti, agnelli infestati che si trovano in un buon stato di nutrizione presentano manifestazioni cliniche meno gravi rispetto a quelli mal nutriti.

Diagnosi

Nella forma acuta i sintomi clinici sono solitamente marcati, talvolta aspecifici, gli animali alternano periodi di apatia e di adinamia, a stati convulsivi con attacchi simil epilettici. Tuttavia nelle ultime fasi viene meno anche l'assunzione di alimenti, per cui i soggetti interessati dimagriscono vistosamente (Scala, 1992); infatti secondo Herbert (1982), la sola diminuzione del peso potrebbe essere presa in considerazione come indicatore di tale parassitosi.

Occasionalmente però i sintomi riscontrabili sono più gravi e l'animale può presentare encefalite, con convulsioni e morte dopo 4/5 giorni (Skerritt et al., 1991).

Nella fase cronica, invece, si evidenzia la tendenza ad isolarsi dal gregge e una minore reazione agli stimoli esterni. Quando la cisti aumenta di volume, i segni clinici evolvono verso uno stato di depressione, cecità, movimenti in circolo, deviazione della testa ed atassia (Bussell et al., 1997). La diagnosi si basa quindi su un'attenta osservazione del comportamento generale, dell'atteggiamento della testa e del collo e di qualsiasi anomalia di postura e di deambulazione.

Tali sintomi differiscono secondo la localizzazione o il numero di cisti presenti nel soggetto interessato. L'interpretazione dei segni clinici resta inoltre il miglior supporto diagnostico, in quanto allo

stato attuale i test sierologici sono ancora inattendibili (Skerritt et al., 1984). Infatti gli esami sierologici, come la fissazione del complemento e l'Elisa, non sono di alcun valore diagnostico, in quanto i cenuri possiedono antigeni in comune con larve di altri cestodi, quali *Cysticercus tenuicollis* ed *Echinococcus granulosus*, per cui potrebbero verificarsi reazioni crociate (Lia et al., 1998).

Alcuni sintomi frequentemente riscontrati nell'ambito di questa neuropatologia possono costituire una valida guida nella diagnosi di sede cerebrale e/o cerebellare: il maneggio è controlaterale ad una sede emisferica cerebrale della cisti; la cosiddetta sindrome d'immobilità corrisponde alla presenza del cenuro a livello ventricolare; l'opistotono e la testa al vento assieme all'atassia ad una localizzazione cerebellare; la testa incappucciata indica un coinvolgimento dell'area encefalica anteriore.

Particolarmente utile ai fini diagnostici si è dimostrata l'adozione di indagini complementari quali la prova del decubito obbligato e la prova anottica: quest'ultima consiste nel bendare l'ovino "sospetto". In questo modo si possono evidenziare sintomi latenti eventualmente compensati dall'animale attraverso il sistema sensoriale estero e propriocettivo (Bagedda et al., 1949). Il decubito laterale assunto dall'animale durante l'esecuzione della prova, indica che la cisti è localizzata nell'emisfero controlaterale.

Tuttavia la diagnosi di sede dei cisturi richiede precise cognizioni neurologiche, poichè il clinico deve saper distinguere i sintomi principali da quelli secondari. Non può essere considerata attendibile, per esempio, una sintomatologia presente negli stadi di grave ipertensione endocranica o nello stadio terminale per le interferenze e sovrapposizioni di alcuni sintomi sugli altri.

Un ulteriore mezzo diagnostico è rappresentato dall'esame elettroencefalografico che ha consentito di risolvere l'annoso problema della diagnosi di sede nella Cenurosi cerebrale e cerebellare (Bagedda et al., 1968). Secondo Doherty (1989) invece, l'uso degli ultrasuoni permetterebbe di conoscere con maggiore precisione la localizzazione della cisti, mentre Gonzalo-Onder (2000) suggerisce l'applicazione della tomografia computerizzata già applicata da Pau (1987) nella diagnosi della Cenurosi umana.

Una delle neuropatologie più importanti da prendere in considerazione per la diagnosi differenziale è la Scrapie, (soprattutto quando la Cenurosi si manifesta in animali di età compresa fra i due e tre anni) in considerazione della recente segnalazione nel territorio e quindi dell'istituzione di specifici piani di sorveglianza nei suoi confronti che rivalutano l'esame neurologico.

L'esame del liquor cefalo-rachidiano

Attualmente la diagnosi *intra vitam* è presuntiva basandosi sul segnalamento e sui segni clinici che, pur caratteristici, non sono sempre patognomonic. Accertamenti diagnostici quali gli esami sierologici non sono utili mentre l'uso della RMI e della TAC, specifici e sensibili, non sono compatibili con il rapporto costo/beneficio. Tuttavia la diagnosi in vita si rende quanto mai necessaria sia per differenziarla da malattie da prioni oggetto di misure sanitarie di controllo, sia per approntare un approccio terapeutico di tipo mediatico, al momento solo sperimentale, o chirurgico che può portare alla guarigione. Un aiuto potrebbe derivare dall'esame citologico del liquor cefalo rachidiano (LCR): metodica poco invasiva, rapida, economica e con un ottima attendibilità nell'individuare forme infiammatorie, neoplastiche o degenerative. I risultati preliminari ottenuti dai ricercatori della Clinica Chirurgica della Facoltà di Medicina Veterinaria di Sassari sono incoraggianti in quanto l'esame citologico LCR sembra fornire informazioni utili in corso di cenurosi in fase acuta. Infatti mentre la pleocitosi linfocitaria indica la presenza di un processo infiammatorio aspecifico, osservabile anche in altre patologie dell'ovino come la listeriosi o la necrosi cerebrocorticale, la pleocitosi eosinofilia è un reperto raro ,associato in genere a infestioni parassitarie (Manunta et al., 2008).

Lesioni anatomo-patologiche

Le lesioni anatomo-patologiche assumono un aspetto diverso secondo la fase della malattia. In quella acuta prevalgono tragitti superficiali tortuosi di colore giallastro, che le larve scavano durante la loro migrazione (Cartella et al., 2002). All'esame istologico in corrispondenza del passaggio della larva di cenuro è riscontrabile una reazione granulomatosa con un'area necrotica delimitata da un vallo di macrofagi, cellule giganti e da un infiltrato infiammatorio periferico; spesso si riscontrano manicotti flogistici perivascolari con rari eosinofili (Di Marco et al., 1998).

Le meningi in corrispondenza di queste aree sono ispessite, grigiastre ed opache, per la presenza di fibrina e all'esame istologico si osservano focolai più o meno estesi di flogosi che "cancellano" la struttura della membrana, anche per la presenza di emorragie e di zone necrotiche per lo più centrali, espressione del passaggio dell'oncosfera (Arru et al., 1978).

Attorno a tali focolai di detriti cellulari, si osserva la presenza di numerose cellule infiammatorie tra le quali prevalgono granulociti eosinofili e talvolta neutrofili; rare invece le cellule mononucleate (Arru et al., 1978).

La fase cronica è invece caratterizzata dalla presenza di cisti mature di dimensioni variabili, al cui interno si trovano numerosi protoscolici; queste possono essere in grado di causare evidenti fenomeni di asimmetria dei lobi encefalici e spesso si rendono responsabili di un'azione compressiva tale da determinare un assottigliamento del tavolato osseo, piuttosto frequente nei soggetti adulti, nei quali l'azione meccanica della cisti si è protratta nel tempo (Scala, dati non pubblicati).

Talvolta si possono rilevare fenomeni di idrocefalo conseguente ad un ostacolo del flusso del liquido cerebrospinale dovuto alla presenza di cisti. Di solito si ha un aumento del liquido nei ventricoli cerebrali (idrocefalo interno).

La papilla da stasi, responsabile di deficit visivi, è un'alterazione frequentemente riscontrata; è causata da un'imbibizione edematosa dell'area papillare sostenuta per lo più da un aumento della pressione intracranica e da un ostacolato deflusso venoso senza concomitanti fenomeni flogistici (Loverci et al., 1963). Nel muflone invece, l'assenza di edema della papilla ottica costituisce un interessante elemento di novità rispetto agli ovini (Petruzzi et al., 1988).

Metodi di controllo e prevenzione

La profilassi della Cenurosi cerebrale è sovrapponibile a quella di tutte le altre metacestodosi ovine con le quali spesso si associa, come l'Idatidosi e la Cisticercosi da *C. tenuicollis*. Le cause infatti, che consentono il perpetuarsi ed il persistere di queste parassitosi sono le stesse e debbono essere affrontate tenendo conto dei seguenti punti:

- a) controllo della popolazione canina e del randagismo;
- b) trattamento antielmintico dei cani;
- c) controllo delle macellazioni;
- d) educazione sanitaria;

In ogni caso l'applicazione "fedele" di tutti questi punti consentirebbe un adeguato controllo della Cenurosi e/o delle altre metacestodosi, tuttavia questa non sempre risulta praticabile nei vari territori. Inoltre un protocollo di questo tipo richiede la collaborazione attiva oltre che degli allevatori e dei veterinari, anche delle amministrazioni pubbliche e delle autorità politiche, di modo che possano vedere la Cenurosi come un problema reale in virtù degli ingenti danni che ogni anno causa alla zootecnia isolana, molto maggiori di quelli causati da altre malattie più "mediatiche", spesso dai risvolti zoonosici molto meno gravi.

Terapia chirurgica

La chirurgia può essere un valido strumento applicabile ai casi di Cenurosi perché le possibilità di successo possono essere elevate. In passato, era lo stesso allevatore ad intervenire direttamente sul cenuro in corrispondenza della zona di assottigliamento del tavolato osseo attraverso l'uso di un oggetto, spesso un mattone reso incandescente alla fiamma, applicato sulla sede presunta del cenuro. Si trattava di un rimedio non sempre efficace, in quanto nonostante l'aumento della temperatura provocata a livello locale potesse causare una devitalizzazione degli scolici, la presenza della parete della cisti permetteva ancora la formazione del liquido cistico. E' essenziale dunque la rimozione completa della formazione cistica, in modo da archiviare definitivamente il caso (Skerritt et al., 1984).

L'approccio chirurgico d'elezione deve essere mirato ad ottenere brecche operatorie quanto più ridotte possibili ed asportazione della parete della cisti parassitaria mediante una semplice trazione successiva all'aspirazione del liquido cistico. Inoltre è da rilevare talvolta la necessità del corretto scollamento della parete cistica integra dal tessuto

circostante, per evitare il pericolo di una reazione anafilattica dell'animale o di recidive (Cartella et al., 2002). Laddove la cisti non si trovi in prossimità della teca ossea l'intervento è più indaginoso ed invasivo, con percentuale di ripresa funzionale più contenuta. L'approccio chirurgico è a nostro modo di vedere destinato a soggetti di particolare pregio, a causa dei costi dell'intervento stesso.

L'intervento neurochirurgico è quindi allo stato attuale l'unico metodo che generalmente può consentire di risolvere in modo radicale la Cenurosi cerebrale e/o cerebellare.

Negli ovini con problemi visivi dovuti alla comparsa della papilla da stasi sottoposti ad intervento chirurgico, tale funzione viene riacquisita dopo 10/15 giorni (Loverci et al., 1963). Un recente studio condotto in Sardegna su 314 ovini di razza sarda operati per Cenurosi cronica, documenta una percentuale di riuscita dell'intervento pari al 74% ed un recupero parziale dell' 8,5% (Sanna Passino et al., 2006).

Aspetti zoonosici

In Sardegna sono stati segnalati ufficialmente 5 casi di Cenurosi umana (Pau, 1987) su circa 60 riscontrati al livello mondiale (Arumbolo et al., 1982). Fra gli ultimi casi vanno segnalati, per quanto concerne l'Italia quello descritto da Sabbatani (2004) in una donna di 46 anni abitante in una zona rurale dell'Appennino modenese mentre, a livello internazionale, Benifla et al., (2007) riportano un caso di cenurosi in una bambina di 4 anni in Israele.

Sicuramente questi dati sono sottostimati perché casi riportabili a Cenurosi cerebrale possono essere erroneamente diagnosticati come casi di Idatidosi e Cisticercosi.

Nell'uomo le localizzazioni nelle vie liquorali (cisternale o ventricolare) sono più gravi e spesso anche letali rispetto a quelle parenchimali, che viceversa sono più facilmente aggredibili chirurgicamente. Tuttavia l'incidenza di questa zoonosi in Sardegna è legata al fatto che il sistema di conduzione delle aziende ovine, data la natura collinare o montuosa dei pascoli non ha subito, rispetto al passato, rilevanti progressi tecnologici, perciò ancora oggi viene praticato un sistema tradizionale d'allevamento che impone l'uso del cane da pastore per la guida e la protezione del gregge che garantisce la persistenza della parassitosi e il coinvolgimento anche della salute

dell'uomo. Inoltre l'applicazione di trattamenti profilattico-terapeutici nel cane, nella maggior parte dei casi inadeguati in termini di frequenza ed uso di principi attivi, rende difficile la sua eradicazione. Sarebbe perciò auspicabile una più corretta informazione e sensibilizzazione degli allevatori di ovini e l'attuazione di quelle misure di profilassi diretta tendenti a ridurre l'incidenza delle patologie come la Cenurosi, che minacciano oltre il patrimonio ovino anche la salute pubblica (Cubeddu et al., 2002).

Fra le cause più importanti che determinano ad esempio il persistere della Cenurosi cerebrospinale nel nostro territorio deve essere senza dubbio annoverato lo scarso valore commerciale dell'ovino e la pratica comune di macellare, soprattutto gli ovini a fine carriera, al di fuori delle strutture pubbliche.

La biologia molecolare in parassitologia

Negli ultimi anni sono stati notevoli i 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, la diagnosi, il trattamento e controllo delle malattie da essi causate, nonché per studi sulla 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.*, (Zarlenga et Geary, 2001).

Questa tecnologia era stata inizialmente vista come una panacea, in quanto 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 controllare 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) (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).

La 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.

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), poiché soddisfano tutti questi criteri. I satelliti sono caratterizzati da ipervariabilità allelica: sono stati perciò oggetto di studio per la definizione delle strutture genetiche di popolazioni parassitarie così come per il mappaggio genetico (Schlotterer, 2000; Barker, 2002). Tale analisi è relativamente semplice e permette di esaminare simultaneamente più marcatori genetici. I mini e 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.

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. 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. La PCR-RFLP è stata ampiamente utilizzata per la identificazione di numerose specie di nematodi, trematodi, cestodi e protozoi.

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 (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 presequenziamento 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, all'identificazione di specie criptiche, a ricostruzioni filogenetiche di nematodi, cestodi e trematodi. A tal proposito citiamo lo studio condotto da Maurelli (2007) che prevedeva l'applicazione della tecnica del sequenziamento e di un protocollo di PCR-Real-time per la caratterizzazione dei diversi genotipi di *Echinococcus granulosus*.

Le nuove frontiere dei vaccini

I vaccini tradizionali sono costituiti dallo stesso agente patogeno della malattia per il quale è stato trattato in modo che possa ancora indurre nell'organismo la risposta immunitaria difensiva ma non sia più in grado di moltiplicarsi e indurre la malattia. La risposta immunitaria al vaccino permetterà in futuro all'organismo di difendersi dalla malattia per cui è stato vaccinato.

A seconda del trattamento subito dal microrganismo e quindi della costituzione dei vaccini, essi possono essere distinti in 3 tipi :

- 1) **vaccini vivi** costituiti dall' agente patogeno vivo ma indebolito (attenuato) che non è più in grado di portare alla malattia ma che è ancora in grado di attivare il sistema immunitario. Si tratta di vaccini efficaci ma che presentano alcuni rischi perché il microrganismo può, in alcuni casi , tornare virulento e quindi patogeno. Sono vaccini vivi quelli contro la rosolia, la poliomielite, il morbillo, il vaiolo ecc.
- 2) **vaccini con agenti infettivi devitalizzati** per mezzo del calore, o del pH o immergendoli in formalina. L'immunità conferita da questi vaccini è transitoria per cui è necessario effettuare ripetuti richiami
- 3) **vaccini a subunità** costituiti solamente dalle proteine antigeniche isolate dall'agente patogeno.

Limiti

1) I vaccini costituiti da patogeni devitalizzati non possono penetrare nelle cellule e danno luogo solo all'immunità umorale, non sono quindi efficaci contro i microrganismi che penetrano nelle cellule .

La durata dell'efficacia delle vaccinazioni è breve e può avere bisogno di più richiami.

2) I vaccini costituiti da patogeni attenuati (morbillo, vaiolo, ecc) hanno una lunga durata, ma in alcuni casi comportano rischi perché possono portare a reazioni allergiche o alla malattia stessa, in persone il cui sistema immunitario è compromesso (anziani, malati di AIDS) oppure il virus può mutare e riacquistare la virulenza.

Per questo negli ultimi 50 anni sono stati condotti numerosi studi per cercare di mettere a punto dei vaccini alternativi.

Tecniche di allestimento dei vaccini

La tecnologia del DNA ricombinante ha permesso di apportare dei miglioramenti a vaccini già esistenti e di svilupparne dei nuovi.

Esistono diverse nuove tecniche di preparazione dei vaccini tra cui le tecniche per:

- vaccini a subunità ricombinanti
- vaccini vivi ricombinanti

- vaccini basati su tossine modificate
- vaccini basati sull'accoppiamento antigene-carrier
- vaccini basati su peptici sintetici
- vaccini commestibili
- vaccini genetici

I vaccini a subunità ricombinanti sono formati da proteine antigeniche ottenute dopo clonazione del gene corrispondente, ma sono scarsamente immunogeni.

Nei **vaccini vivi ricombinanti** le proteine dei patogeni vengono espresse da microrganismi (virus e batteri) innocui che funzionano da vettori i quali moltiplicandosi nell'organismo umano permettono di sviluppare l'immunità contro l'agente infettivo, es. vaccino contro il vaiolo.

I vaccini basati su tossine modificate contengono microrganismi infettivi con genoma modificato di modo che le proteine antigeniche prodotte non siano patogene es. vaccino della pertosse.

Nei **vaccini basati sull'accoppiamento antigene-carrier**, gli antigeni vengono inclusi in una proteina-carrier capace di presentarli nel modo più opportuno al sistema immunitario.

I **vaccini basati su peptici sintetici** sono costituiti da proteine sintetiche molto simili a quelle naturali e capaci di indurre la stessa risposta immunitaria.

Nei **vaccini commestibili** si utilizzano piante transgeniche, in grado di produrre le sostanze che danno l'immunità. Questo sistema potrebbe essere molto utile per la vaccinazione massiccia delle popolazioni dei Paesi in via di sviluppo (PVS). Questi vaccini potrebbero infatti essere meno costosi perché non necessitano della purificazione e della refrigerazione e l'antigene non viene degradato durante la digestione.

I problemi ancora da risolvere per un uso massiccio di questo tipo di vaccino sono dovuti alla scarsa quantità di presidio immunizzante presente in una pianta, e all'esatto rapporto tra quantità di vaccino e quantità di cibo ingerito per avere il giusto grado di immunità; la pianta transgenica deve inoltre crescere velocemente, deve poter essere assunta senza cottura, per evitare la distruzione della proteina antigenica, on deve marcire rapidamente.

Fino ad ora si sono sperimentate la patata, le banane, i pomodori , ecc.

Vaccini a DNA

I vaccini genetici sono costituiti solo dal materiale genetico DNA o RNA dell'agente patogeno. Il microrganismo responsabile non viene più devitalizzato o indebolito, ma si utilizza una parte del DNA di esso. Si tratta di plasmidi cioè piccole molecole di circolari di DNA a doppio filamento proveniente da batteri. Questi vaccini sono incapaci di causare infezioni poiché vengono presi solo alcuni dei geni del microrganismo, quelli che codificano per le proteine antigeniche eliminando quelli che servono per la sua duplicazione e proliferazione. I vaccini genetici vengono introdotti tramite iniezione intramuscolare o pistola genica (su cute).

Come agiscono i vaccini genetici

I plasmidi si dirigono verso il nucleo delle cellule dove sono stati inoculati ed inducono le cellule a produrre le proteine antigeniche caratteristiche del batterio. La sintesi di queste proteine induce nell'organismo sia l'immunità umorale (linfociti B) che quella cellulare (linfociti T). Nella risposta umorale i linfociti B si legano alle proteine antigeniche liberate dalla cellula e poi si moltiplicano. Molte cellule

figlie producono molecole anticorpali che si fissano al patogeno e lo marciano per favorirne la distruzione. Altre invece diventano cellule memoria, che distruggeranno il patogeno se questo dovesse circolare di nuovo.

Intanto le proteine antigeniche presenti sulla superficie delle cellule inoculate possono indurre una risposta cellulare. I linfociti T citotossici dopo essersi legati ad esse sono indotti a moltiplicarsi e a uccidere le cellule legate e tutte quelle che espongono gli stessi peptidi. Alcune cellule attivate diventano cellule memoria pronte in futuro a eliminare le cellule aggredite dallo stesso patogeno.

Vantaggi

Con i nuovi vaccini si potrebbero mantenere gli aspetti positivi di quelli tradizionali evitandone allo stesso tempo i rischi. I plasmidi infatti non potranno mai provocare l'infezione e quindi la malattia mancando dei geni della duplicazione. Inoltre con le nuove tecniche di bioingegneria essi sarebbero facili da riprodurre ed anche economici. Essi risultano più stabili dei vaccini tradizionali.

Importante, infine, il fatto che sia possibile inserire nei plasmidi più geni per stimolare il sistema immunitario verso più patogeni.

Scopo del lavoro

Nella presente tesi, vengono presentati i risultati di una prova di campo in cui, per la prima volta a livello mondiale e sulla falsa riga di quanto attuato precedentemente dalla Scuola Australiana che ha collaborato con noi in questa occasione, sono state sintetizzate ed utilizzate delle proteine ricombinanti come vaccino contro la Cenurosi cerebrale in agnelle di razza Sarda provenienti da aziende problema della Sardegna. La vaccinazione potrebbe costituire un'arma in più nella lotta contro questa metacestodosi che inoltre rappresenta attualmente l'unica misura profilattica eseguibile negli ospiti intermedi, così come già attuato nei confronti dell'Echinococcosi cistica e di alcune Cisticercosi in varie parti del mondo (Ito et al.,1991; Lightowers M.W. et al., 1996; Harrison G.B.L et al.,1998; Plancarte A. et al., 1999; Gauci C.G et al., 2006, 2008; Lightowers M.W.1999, 2006; Woollard D. J. et al.,1999-2000; Lightowers M.W. et al., 2001;)

Materiali e metodi

Selezione delle aziende problema

Per cercare di fornire un ulteriore strumento di controllo della Cenurosi, è stato messo a punto e sperimentato sul campo, in collaborazione con il gruppo di ricerca australiano del Prof. Marshall Lightowlers dell'Università di Melbourne, un vaccino ricombinate contro *Taenia multiceps*. Per la prova di campo sono state selezionate nel corso del 2004 un gruppo di sei aziende “problema”, ovvero aziende in cui nei precedenti cinque anni alla sperimentazione si erano registrati focolai di Cenurosi. Nei suddetti allevamenti sono state effettuate visite nei sei mesi antecedenti la prova sperimentale per valutare le condizioni dell'allevamento, verificare la presenza di cani, l'attuazione di eventuali piani di profilassi e terapia degli ospiti definitivi del parassita.

In ciascuna azienda sono stati inoltre esaminati casi di Cenurosi che si presentavano nelle rimonte dell'anno precedente. Una volta documentata la situazione dei sei allevamenti selezionati (Tabella 1), ubicati prevalentemente nella zona del nord Sardegna, tutti i soggetti della rimonta venivano marcati con tatuaggio auricolare per il loro riconoscimento durante tutto il periodo della sperimentazione.

Il Vaccino TM16 e TM18

Il vaccino, è stato sintetizzato secondo un modello collaudato utilizzato con cestodi strettamente correlati a *Taenia multiceps*, che ha consentito di mettere a punto proteine ricombinanti per vaccini contro infestazioni da forme larvali di *Echinococcus granulosus*, *T. solium*, *T. saginata*, *T. ovis*.

Partendo dal DNA genomico estratto da uova di *T. multiceps* provenienti dalla Turchia, sono state prodotte in vitro due proteine oncosferiche, omologhe a quelle già sintetizzate e utilizzate nel vaccino per *T. ovis* (To16 e To18) chiamate pertanto Tm16 e Tm18.

Attraverso la trascrizione inversa e' stato possibile codificare la sequenza del DNA responsabile della produzione di queste due proteine, e successivamente queste sequenze sono state inserite in vettori di espressione genica (plasmidi) a loro volta inseriti in *E. coli* BL21 per la produzione in vitro delle proteine.

Dato che le proteine che hanno dimostrato funzionare per *T. ovis*, *T. solium* e *T. saginata* erano sempre le stesse (omologhe per ciascun parassita), era lecito ipotizzare che un parassita strettamente correlato come *T. multiceps* potesse rispondere alla stessa maniera, o meglio che utilizzando proteine che negli altri parassiti si dimostrano immunogene e protettive, potessero funzionare come vaccino anche nel caso della Cenurosi (Gauci et al., 2008).

Le proteine ottenute, una volta purificate venivano miscelate con saponina come adiuvante e iniettate sottocute, nella regione laterale del collo alla dose di 2 ml per capo, con una prima somministrazione a 10-12 settimane di età ed una successiva “booster” dopo 2-3 settimane dalla prima attraverso l’ausilio di una siringa automatica Socorex.

Per la prova sono state selezionate complessivamente 632 agnelle, di cui 424 sono state utilizzate come controllo e 208 vaccinate nelle sei differenti aziende (Tabella 2).

Prima di ciascuna vaccinazione e dopo 15 giorni dall’ultima somministrazione, da ciascun soggetto veniva effettuato un prelievo ematico, il cui siero, stoccato in provette da 1,5ml, veniva conservato a -20°C. Questi sieri venivano analizzati successivamente con la metodica ELISA per valutare l’evoluzione della risposta immunitaria dei soggetti vaccinati e dei controlli nonché per poter indagare qualora si presentassero eventuali cadute dell’immunità nei soggetti vaccinati.

Gli allevamenti oggetto della sperimentazione, iniziata nel gennaio 2005, sono stati quindi monitorati mensilmente fino alla data odierna (Settembre 2008), attraverso la registrazione degli eventuali casi di Cenurosi segnalati dai Veterinari dell’Associazione Regionale Allevatori e dagli allevatori stessi in stretto contatto con noi per l’intera durata della prova. Gli animali in questi casi venivano quindi macellati, i parassiti isolati, documentati e sottoposti ad indagini morfologiche e

biomolecolari. I dati e la documentazione fotografica venivano archiviati per la successiva elaborazione statistica attraverso i software Minitab ed Epi Info.

Caratterizzazione Biomolecolare del parassita

Dagli esemplari di *Taenia multiceps* giunti in laboratorio veniva estratto il DNA tramite kit ROCHE (DNA Template extraction kit) da circa 0,1gr di materiale parassitario (protoscolici).

Successivamente per la loro caratterizzazione veniva utilizzato lo stesso protocollo messo a punto da Bowles nel 1993 con successive modifiche.

Si procedeva amplificando dei frammenti dei geni mitocondriali codificanti per la NADH deidrogenasi (ND1) e la Citocromo Ossidasi (COI), che risultano essere degli ottimi marker della variabilità intraspecifica, mediante PCR con i primers selezionati da Bowles e McManus (ND1: JB11 5'-AGATTCGTAAGGGGCCTAATA-3 e JB12 5'-ACCACTAACTAATTCACCTTTC-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 and McManus, 1993; Bowles et al., 1992).

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 di circa 470bp e 376bp venivano quindi fotografati e 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.

Risultati

Attraverso l'analisi delle sequenze è stato possibile osservare che i parassiti isolati nelle aziende problema e quindi presumibilmente implicati nei focolai di Cenurosi osservati in passato in queste aziende, appartenevano al ceppo o variante genetica Tm1, ovvero la variante parassitaria finora più comune e isolata maggiormente in Sardegna ed in altri distretti (grafico 1) (Varcasia et al., 2006).

Nel periodo compreso fra Gennaio 2005 (inizio sperimentazione) e Settembre 2008 (data ultimo monitoraggio), si sono verificati nelle aziende monitorate 33 casi di Cenurosi cerebrale, di cui 32 in animali controllo e uno in una agnella vaccinata. I dati complessivi raccolti per ciascuna azienda sono riportati nella Tabella 2.

Dopo oltre 45 mesi dall'inizio della sperimentazione tutti i capi vaccinati, eccetto l'agnella summenzionata, sono regolarmente in vita e godono di buone condizioni di salute. L'elaborazione dei dati evidenzia differenze statisticamente significative sia all'interno di ciascuna azienda che nel confronto fra animali vaccinati e controllo delle aziende esaminate complessivamente per ciò che concerne il numero degli animali infestati e non ($\chi^2 = 14,08 - P < 0,00017$). Purtroppo l'assenza di casi di Cenurosi in due degli allevamenti monitorati non ha

consentito delle valutazioni a riguardo in tali aziende. D'altro canto le prove sperimentali sul campo possono comportare anche tali rischi.

Il dato statistico non significativo rilevato nell'azienda n°2, tuttavia non sembrerebbe deporre per una non efficacia del presidio immunizzante in quanto in ogni caso gli unici casi di Cenurosi registrati hanno sempre interessato gli animali delle quote controllo.

Nell'azienda numero 6, si sono verificati ben 18 casi di Cenurosi negli animali controllo a fronte di uno in quelli vaccinati ($\chi^2 = 11,79 - P < 0,0005$).

L'analisi dei sieri ha invece mostrato come la maggior parte degli animali abbia reagito bene alla somministrazione del vaccino, producendo livelli di anticorpi in quantità tale da garantire la protezione contro la parassitosi (Tabella 3).

Come si può notare infatti i livelli anticorpali riscontrati, per quanto riguarda la proteina Tm18, una delle due somministrate, in quasi tutti i soggetti delle sei aziende problema erano, al giorno zero, < 200 .

Questo può essere spiegato dal fatto che il livello anticorpale acquisito con l'immunità materna verso *T. multiceps* era in tale periodo ancora scarso e che gli stessi animali nel periodo antecedente la prova non erano ancora entrati in contatto con il parassita.

Dopo 15 giorni dalla prima vaccinazione ovvero al giorno del richiamo del vaccino ed al 30° giorno dall'inizio della prova, la risposta

immunitaria alla proteina Tm18 di quasi tutti gli animali è stata più che soddisfacente con aumenti significativi dei livelli anticorpali, così come si può rilevare in dettaglio dalla tabella 4.

Contrariamente tra gli animali che non hanno risposto alla somministrazione delle proteine possiamo notare il soggetto 3030 dell'azienda n°2 (vedi Tab.3) in cui il livello di anticorpi è rimasto praticamente invariato. Questo può essere dipeso da diverse cause attribuibili sia ad errori compiuti al momento della somministrazione del vaccino che a cause dipendenti dalle condizioni nutrizionali e sanitarie degli animali stessi.

Sempre sulla base di quanto riportato in tabella 3 possiamo notare come nell'azienda n° 5 vi sia stata la massima risposta immunitaria al vaccino dovuto forse ad un possibile contatto degli animali con il parassita.

L'inoculazione del prodotto vaccinale non ha determinato generalmente alcuna reazione locale ne generale. Soltanto in occasione di un richiamo nell'azienda n°5 sono stati registrati alcuni casi di leggera zoppia con rigonfiamento parziale degli arti per alcune ore (24-48h) dovuto presumibilmente all'effetto leggermente irritante della saponina (che tuttavia si è manifestato solo in alcuni capi di questa azienda e non nelle altre).

Considerazioni

I risultati ottenuti con l'utilizzo del primo vaccino ricombinante messo a punto contro *Taenia multiceps*, dimostrano in maniera inequivocabile attraverso l'elaborazione statistica, l'efficacia del presidio immunizzante sicuramente nei confronti del ceppo Tm1, cioè il più diffuso nel territorio. In Sardegna infatti sono state individuate almeno tre varianti genetiche di *Taenia multiceps* chiamate Tm1, Tm2 e Tm3. Vale la pena di sottolineare, che le varianti Tm3 isolate in Sardegna erano quasi sempre provenienti da casi di infestazione multipla (varie cisti nel SNC). Questo ceppo sembra avere differenze interessanti rispetto alla variante comune e ulteriori studi in corso d'opera consentiranno di chiarire meglio il suo ruolo nell'epidemiologia della Cenurosi.

Sicuramente è presumibile che il vaccino, in base al fatto che si tratta di proteine omologhe ricombinanti riscontrate anche su cestodi di specie diversa, possa presentare una efficacia ottimale anche nei confronti dei

ceppi di *T. multiceps* non isolati durante questa prova (Tm2 e Tm3) ma comunque presenti in Sardegna.

Tutto questo analogamente a quanto descritto per il genere *Echinococco* e le sue varianti genetiche.

Il fatto che nell'azienda n°2 non siano state registrate delle differenze statisticamente significative tra i casi di Cenurosi nei soggetti controllo e vaccinati probabilmente è dovuto alla scarsa pressione parassitaria nell'ambiente e in quanto gli unici casi, anche se coinvolgevano sempre i controlli (n°3), sono risultati fondamentali per determinare una differenza statisticamente significativa.

La prova di campo, per la sua stessa natura, risulta inoltre decisamente indicativa delle performances del vaccino in una situazione praticamente identica a quelle normalmente presenti negli allevamenti della Sardegna, in quanto l'intervento sperimentale si è limitato a monitorare una situazione già esistente, senza modificare altre variabili. Nella fattispecie gli animali oggetto della sperimentazione, non sono stati oggetto di trattamenti particolari, non erano "parasite free" e non godevano di attenzioni particolari da parte degli allevatori. Il fatto che invece un animale vaccinato sia deceduto (peraltro in condizioni fisiche pessime, in quanto presentava estrema magrezza, zoppia ed infestazione massiva da endoparassiti), a nostro avviso, non costituisce un fattore rilevante relativamente alla valutazione dell'efficacia del

vaccino in quanto la variabilità della risposta immunitaria è estremamente influenzata da vari fattori, primi fra tutti l'alimentazione, il management ed il buono stato generale degli animali. I risultati in ELISA sembrano confermare, con i valori di produzione delle proteine ricombinante (nel caso particolare la Tm18), questa variabilità nella produzione di anticorpi protettivi contro il parassita.

Al di là dei dati statistici, peraltro indicanti una reazione estremamente favorevole al prodotto vaccinale, l'intervento è stato valutato in modo estremamente positivo dagli allevatori, che hanno fornito notevoli apprezzamenti sullo stesso, tanto da suggerire il suo impiego anche ad altri loro colleghi con analoghi problemi. In realtà infatti durante la sperimentazione venivano richiesti interventi vaccinali anche da parte di altri allevatori che erano venuti a conoscenza dei positivi risultati ottenuti con l'uso del vaccino, superando facilmente la "primitiva" diffidenza nei confronti del "nuovo prodotto". Tale atteggiamento induce a sperare per il futuro un suo largo utilizzo anche in un ambiente difficile come quello agropastorale.

Anche i problemi legati alla somministrazione del vaccino sembrano essere molto contenuti ed in ogni caso assolutamente superabili (una leggera tumefazione nel punto di inoculo accompagnata da zoppia nei casi gravi non costituisce solitamente un problema di particolare rilevanza, specie in animali da rimonta).

Inoltre essendo delle proteine ricombinanti non determinano problemi equiparabili a quelli che invece si possono riscontrare in caso di vaccini vivi e/o attenuati.

Inoltre recenti studi sull'applicazione di questi vaccini ricombinanti hanno mostrato come la loro somministrazione possa essere facilitata utilizzando altri vaccini o farmaci come veicoli, abbattendo notevolmente i costi di produzione e somministrazione. Recentemente in Turchia una nota casa farmaceutica sta studiando la possibilità di includere il vaccino ricombinante contro l'Echinococcosi (EG95, analogo a quello usato in questa prova) associato in formulazioni vaccinali contro le clostridiosi degli ovini.

Conclusioni

Purtroppo la Cenurosi cerebrale negli ovini al pari di altre metacestodosi, quali l'E.C da *Echinococcus granulosus* e la Cisticercosi da *Cysticercus tenuicollis* (Scala et al. 2002), costituisce ancora oggi per la Sardegna un problema sanitario ed economico di primaria importanza per il settore ovino che mette a repentaglio anche la salute dell'uomo. La prova di campo del vaccino ricombinante contro *Taenia multiceps* utilizzato, sembrerebbe costituire già in questa fase preliminare, in considerazione dell'elevato grado di efficacia monitorato, un presidio idoneo per l'eventuale applicazione di routine sul campo in situazioni particolarmente a rischio.

E' ovvio che un suo utilizzo sul campo necessiti di ulteriori approfondimenti, soprattutto per ciò che concerne l'eventuale somministrazione con altri prodotti immunizzanti e/o antielmintici, ma è indubbio che la difficoltà in certi territori come la Sardegna ad applicare in modo razionale le normali misure di profilassi nei confronti della Cenurosi cerebro-spinale degli ovini, rendono questo tipo di vaccinazione un intervento ormai da prendere seriamente in considerazione sia alla luce dei risultati positivi ottenuti e sia per l'ottimo riscontro che tale sperimentazione ha sortito tra gli allevatori che ci fa ben sperare per un prossimo futuro.

In ogni caso sarebbe opportuno che la profilassi vaccinale, finalizzata al controllo di questa e di altre parassitosi di difficile controllo con le metodiche tradizionali venga presa in seria considerazione.

Bibliografia

Bibliografia

Abo-Shehada Mahmoud N., Jebreen Eyad, Arab Baker, Mukbel Rami, Torgerson Paul (2002) - Prevalence of *Taenia multiceps* in sheep in northern Jordan. *Preventive Veterinary Medicine*, 55, 201-202.

Achenef M., Markos T., Feseha G., Hibret A., Tembely S. (1999) - *Coenurus cerebralis* infection in Ethiopian Highland sheep: incidence and observation on pathogenesis and clinical signs.- *Tropical Animal Health and Production*, 31, 15-24.

Aminzhanov M. (1988) – Chemioprolifassi della Cenurosi negli ovini. *Veterinaria*, 10, 46-47.

Arru E., Guarda F. (1978-79) - Sullo stadio acuto della Cenurosi dell'agnello: contributo neuropatologico.- *Ann. Fac. Med. Perugia*, 14, 189-200.

Arumbolo P. (1982) - Handbook series in zoonoses, section C: Parasitic Zoonoses, vol. 1. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, 209-214.

Bagedda G. (1949) - Contributo alla diagnosi clinica di sede nella cenurosi degli ovini.- Studi Sassaesi, 27, 347-352.

Bagedda G. (1949) - La diagnosi di sede nella Cenurosi cerebrale e cerebellare degli ovini. Studi Sassaesi, 27, 329-340.

Bagedda G., Muzzetto P., Lepori S., Cancedda M., Petruzzi V. (1968) - Contributo alla diagnosi di sede mediante elettro-encefalografia nella Cenurosi cerebrale e cerebellare in *Ovis aries*.- La Clinica Veterinaria, 91 (12), 365-380.

Baikhazkin I. (1977) – Early diagnosis of Coenurosis as part of a control programme against this infection. Vestnik sel' sko- Khozyaistvennoi nauki Kazakhstana, 2, 83-85.

Barker G.C., (2002)- Microsatellite DNA: a tool for population genetic.- Analysis-Trans R Soc Trop Med Hyg.;96 Suppl 1:S21-4.

Benger A., Rennie RP. (1981) - A human Coenurus infection in Canada. Am J. Trop. Med Hyf, 30 (3), 638-44.

Benifla M, Barrelly R, Shelef I, El-On J, Cohen A, Cagnano E. (2007)- Huge hemispheric intraparenchymal cyst caused by *Taenia multiceps* in a child.- Case report. J Neurosurg. Dec;107(6 Suppl):511-4.

Binz T., Reusch T.B., Wedekind C., Scharer L., Sternberg J.M., Milinski M.,(2000)- Isolation and characterization of microsatellite loci from the tapeworm *Schistocephalus solidus*- Mol Ecol; 9(11): 1926-7.

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

Bowles J., McManus D.P. (1993) -NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*.- *Int J Parasitol* 23, 969–972

Bretagne S., Assouline B., Vidaud D., Houin R., Vidaud M., (1996)- *Echinococcus multilocularis*: microsatellite polymorphism in U1 snRNA genes- *Exp Parasitol*; 82(3): 324-8.

Bussell K.M., Kinder A.E. (1997) - Posterior paralysis in a lamb caused by a *Coenurus cerebralis* cyst in the lumbar spinal cord.- *Veterinary Record*, 140, 560.

Cancedda M.G., Scala A., Chighine C., Piazza C., Sardo D., Varcasia A., Ligios C. (2002) – Quadri clinici della Cenurosi ovina e diagnosi differenziale con altre neuropatologie.- *Atti S.I.P.A.O.C.*, XV,16.

Cartella I., Spadola F., Musicò M., Davì D., Costa G., Siracusano L., Cucinotta G. (2002) - La craniotomia nella terapia chirurgica della Cenurosi cerebrale. *Summa*, 3, 29-36.

Coda S., Ximenes L.A., Barbieri A., (1988) - La Cenurosi cerebrale del muflone (*ovis ammon musimon*, Scriver, 1972): considerazioni clinico-diagnostiche ed epidemiologiche.- *Atti S.I.SV et*, XLII, 1427-1429.

Cubeddu G.M., Pintori G., Mazzetto P., Lepori S. (1990)- La cenurosi cerebellare del bovino: caso clinico –Atti Soc. It Buiatria, Jesolo (VE).

Cubeddu G.M., Pintori G., Coda S., Pinna Parpaglia M.L., Cocco R. (2002) - Cenurosi ovina e bovina in Sardegna: osservazioni su randagismo e sanita' pubblica.- Atti X Congresso Fe.Me.S.P.Rum, 39-40

Deiana S. (1971) - Stato attuale della diffusione della Cenurosi cerebrale negli ovini e nell'uomo in Sardegna.- Parassitologia, 13 (1-2), 173-175.

Di Marco V., Riili S., Zanghì P., Capucchio M.T., Giraldo A., Guarda F. (1998) - Dati epidemiologici e reperti patologici della Cenurosi negli allevamenti ovi-caprini siciliani.- Large Animals Review, 3, 79-86.

Doherty M.L., McAllister H. (1989) - Ultrasound as an aid to *Coenurus cerebralis* cyst localisation in a lamb.- Veterinary Record, 124, 591.

Edwards G.T., Herbert V. (1982) - Preliminary investigation into the immunization of lambs against infection with *Taenia multiceps* metacestodes.- Veterinary Parasitology, 9, 193-199.

Edwards G.T., Herbert V. (1982)- Observation on the course of *Taenia multiceps* infections in sheep: clinical signs and post-mortem findings.- British vet. Journal, 138, 489-500.

Euzeby J. (1966) - Les maladies vermineuses des animaux domestiques, tome II, 494-525.

Fankhauser R., Hintermann J., Valette H. (1959) – Schweizer Archiv fur Tierheilkunde, 101, 15.

Gharagozlou M.J., Mobedi I., Akhavan P., et al. (2003)- A pathological and parasitological study of *Coenurus Gaigeri* infestation of goats from Iran.-*Indian J Vet Pathol* 27, 95-97.

Ghazaei C. (2005)-Evaluation of the effect of antihelminthic agents albendazole, febendazole and praziquantel in treatment of coenurosis disease in sheep.- *J Anim Vet Adv* 4: 852-854

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.

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., Stewart L.E., Speare R., (1996)-Genetic markers in ribosomal DNA for hookworm identification.- *Acta Tropica*, 62,15-21.

Gauci C.G., Vural G., Öncel T., Varcasia A., Damian V., Kyngdon C.T., Craig P. S., Anderson G.A., Lightowlers M.W. (2008) - Vaccination with recombinant oncosphere antigens reduces the susceptibility of sheep to infection with *Taenia multiceps*- *International Journal for Parasitology*, 38, (8-9): 1041-1050

Gauci C.G, Verástegui M.R., Gilman R.H., Lightowers M.W (2006)-
Taenia solium and Taenia ovis: Stage-specific expression of the vaccine
antigen genes, TSOL18, TSOL16, and homologues, in oncospheres-
Experimental Parasitology, 113, (4): 272-275

Gonzalo-Orden J.M., Altonaga (2000) - Correlation between MRI,
computed tomographic findings and clinical signs of ovine coenurosis.-
Veterinary Record, 146, 352-353.

Guarda F., Capucchio M.T. (2002) - Focolai atipici di Cenurosi bovina:
ruolo e importanza di questa parassitosi nella diagnosi differenziale delle
malattie neurologiche a decorso cronico del bovino.- Atti S.I.S.Vet,
XIV,195-196.

Harrison G.B L., Dempster R.P, Rickard M.D, Heath D., Lawrence S.B,
Vinton J. G, Lightowers M. W, O'Hoy K. L, Johnson K.S. (1998)-
Vaccines comprising antigenic polypeptides of taenia ovis- Comparative
Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 21: XI

Herbert V., Edwards G.T. (1984) - Some host which influence the
epidemiology of Taenia Multiceps in sheep. Annals of Tropical Medicine
and Parassitology, 78 (3), 243-248.

Ibechukwu B.I. (1991) -Intraocular coenurosis: a case report-
Br. J. Ophthalmol, 75 (7), 430-431.

Ito A., Bøgh H. O, Lightowers M. W., Mitchell G. F, Takami T., Kamiya
M., Onitake K., Rickard M. D (1991)- Vaccination against Taenia

taeniaeformis infection in rats using a recombinant protein and preliminary analysis of the induced antibody response- *Molecular and Biochemical Parasitology* 44,43-49.

Kelly D.F., Payne-Johnson (1993) - Cerebral healing after craniotomy to evacuate a *Coenurus cerebralis* Cyst. *Journal Comp. Path.*, 108, 399-403.

Lia R, Puccini A (1998)- La Cenurosi nell'allevamento ovino.- *Obiettivi e Documenti Veterinari* 8, 43-48

Lightowlers M. W., (2006) -Vaccines against cysticercosis and hydatidosis: Foundations in taeniid cestode immunology- *Parasitology International*, 55, (1): S39-S43

Lightowlers M.W., Gauci C.G.(2001)- Vaccines against cysticercosis and hydatidosis-*Veterinary Parasitology*, 101, 3-4: 337-352

Lightowlers M. W. (1999)- Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs- *International Journal for Parasitology*, 29, (6): 811-817

Lightowlers M. W., Rolfe R., Gauci C. G.(1996)- *Taenia saginata*:Vaccination against Cysticercosis in Cattle with Recombinant Oncosphere Antigens - *Experimental Parasitology*, 84,330-338

Ligos C., Bandino E., Di Guardo G., Ferrari G.C., Perfetti M.G., Eleni C., Ru G., Muceli G., Spanu G.P., Agrimi U., Pocchiari M. (1999) - Scrapie della pecora.- *O&DV* 1, 65-70.

Loverci L., Lepori S., Muzzetto P., (1963) - Immagini retinografiche nella Cenurosi cerebrale e cerebellare in ovis aries. Contributo alla diagnosi di sede.- Atti SISVet XVII, 339-350.

Manschot W.A (1976) - Coenurus infestation of eye and orbit. Arch Ophthalmol, 94 (6), 961-4.

Manunta M.L., Masala G., Zobba R, Evangelisti M.A., Pinna Parpaglia M.L., Antuonfermo E., Scala A., Sanna Passino E. (2008)- Citologia del liquor cefalo-rachidiano (LCR) nella diagnosi di cenurosi ovina: risultati preliminari.- Large Animal Review 14:194.

Mayhew I.G. (1989) - Large Animal Neurology. Lea &Febiger, Philadelphia.

McManus D.P., Thompson R.C.A., (2003)- Molecular epidemiology of cystic echinococcosis.- Parasitology; 127 Suppl: S37-51.

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.

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.

Murzanandiev A. (1953) – Thesis, Biblioteka im. V.I. Lenina cited by Abuladze (1964) 398.

- Oryan A., Moghaddar N., Gaur S.N., (1994)- Metacestodes of sheep with special reference to their epidemiological status, pathogenesis and economic implications in Fars Province, Iran.- *Vet Parasitol* 51:231-240
- Pau A., Perria C., Turtas S. (1990) - Long-term follow-up of the surgical treatment of intracranial coenurosis. *Br. J. Neurosurg.*, 4 (1), 39-43.
- Pau A., Turtas S., (1987) - Computed tomography and magnetic resonance imaging of cerebral coenurosis.- *Surg. Neurol.*, 27 (6), 548-52.
- Petruzzi V. (1989) - Recenti acquisizioni sulla cenurosi cerebrale negli agnelli: ipotesi eziopatogenetiche. *Atti S.I.S.Vet*. XLII, 1-4.
- Petruzzi V., Del Bue M. (1988) - Cenurosi cerebrale in Ovis Musimon (muflone).- *S.I.S.Vet* XLII, 1431-1433.
- Plancarte A., Flisser A., Gauci C.G., Lightowers M.W. (1999)- Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens- *International Journal for Parasitology*, 29, (4):643-647
- Sabbatani S, Zucchelli M, Calbucci F, Roncaroli F, Chiodo F. (2004) A case of cerebral Coenurosis.- *Infez Med*. 12: 205-210
- Saiki R.K., Scharf S.J., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H., Arnheim N., (1985)- Enzymatic amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle anemia.- *Science*, 230: 1350-1354.

Sanna Passino E., Careddu G.M., Manunta M.L., Masala G., Columbanu N., Mazzetto P., Mazzetto P. (2006) -Cerebral coenurosis in sheep. An always existing pathology.- Atti Società Italiana Scienze Veterinarie (SISvet)

Scala A, Ligios C, Leoni A, Nieddu AM (1992) -Cenurosi degli ovini in Sardegna: rilievi epidemiologici, parassitologici ed anatomoistopatologici.- Atti Società Italiana Scienze Veterinarie (SISVet) 46, 1435-1439

Scala A., Cancedda G.M., Varcasia A., Ligios C., Garippa G., Genchi C. (2007)- A survey of *Taenia multiceps* coenurosis in Sardinian sheep.- *Veterinary Parasitology* 143, 294-8,.

Schantz Pm. (1998) - Human Coenurosis in North America: case reports and review *Clin. Infect. Dis.*, 27 (3), 519-23.

Schlotterer C., (2000)- Evolutionary dynamics of microsatellite DNA.- *Chromosoma*;109(6): 365-71.

Skerritt G.C., Stallbaumer. (1984) - Diagnosis and treatment of coenuriasis (gid) in sheep.- *The Veterinary Record*, 115, 399-403.

Skerritt, G.C. (1991) – *Coenurosis Diseases of sheep*. Blackwell Scientific Publication, Oxford.

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.

Tirgari M., Howard B.R., Boargob A. (1987) - Clinical and radiographical diagnosis of coenurosis cerebri in sheep and its surgical treatment.- Veterinary Record., 120, 173-178.

Troiano P., Scaramozzini P., Iannibelli F., Fasanella A., Puccini V. (1990) – Atti SISVet XLVI, 1279-1281.

Varcasia A., M.W. Lightowers, G. Cattoli, G.M. Cancedda, S. Canu, G. Garippa, A. Scala, (2006) -Genetic variation within *Taenia multiceps* in Sardinia, Western Mediterranean (Italy).- Parasitology Research 99(5):622-6.

Veronesi F., Lepri E., Marchesi M.C., Filippini G., Mandara M.T. (2008)- Focolaio di cenurosi cerebrale in pecore provenienti da un allevamento umbro- Supplemento Large Animal Review 14:233

Verster A., Tustin R.C. (1982) - Preliminary report on the stimulation of immunity to the larval stage of *Taenia multiceps*.-Journal of The South African Veterinary Association 53, (3), 175-176.

Verster A., Tustin R.C. (1987) - Immunization of sheep against the larval stage of *Taenia multiceps*. Journal Vet. Res., 54, 103-105.

Woollard D. J., Gauci C. G., Heat D., Lightowers M.W. (2000)- Protection against hydatid disease induced with the EG95 vaccine is associated with conformational epitopes- Vaccine, 19, (4-5):498-507

Woollard D. J., Gauci C. G., Lightowlers M.W. (1999)- Synthetic peptides induce antibody against a host-protective antigen of *Echinococcus granulosus*- *Vaccine* 18, (9-10): 785-794

Willis J.M., Herbert V. (1987) - A method for estimating the age of coenuri of *Taenia multiceps* recovered from the brains of sheep.- *Veterinary Record*, 121, 216-218.

Tabelle

	1		2		3	
Anno	Morti	Rimonta presente	Morti	Rimonta presente	Morti	Rimonta presente
2004	8	120	20	200	20	60
2003	3	120	20	200	5	60
2002	2	120	10	200	0	60
2001	5	120	5	200	4	60
2000	3	120	5	200	5	60
	4		5		6	
Anno	Morti	Rimonta presente	Morti	Rimonta presente	Morti	Rimonta presente
2004	3	50	10	64	8	80
2003	30	50	2	60	15	80
2002	4	50	1	60	15	80
2001	5	50	2	60	50	80
2000	4	50	1	60	5	80

Tabella 1: Aziende problema selezionate per la vaccinazione – con la casistica di Cenurosi rilevata negli anni precedenti nell'ambito della quota di rimonta presente

Azienda	Località	Quota di Rimonta	Vaccinati	Infestati	Controllo	infestati	
1	Siligo	120	30	0	90	0	
2	Berchidda	250	60	0	190	3	$\chi^2 = 0,96 - P = 0,327$
3	Siligo	50	25	0	25	0	
4	Villanova M.	52	26	0	26	4	$\chi^2 = 4,33 - P = 0,03$
5	Villanova M.	60	27	0	33	7	$\chi^2 = 6,46 - P = 0,01$
6	Villanova M.	100	40	1	60	18	$\chi^2 = 11,79 - P = 0,0005$
Tot		632	208	1	424	32	$\chi^2 = 14,08 - P = 0,00017$

Tabella 2: Animali vaccinati e controllo, risultati della sperimentazione del vaccino Tm16-18 nell'ambito della sperimentazione (Gennaio 2005-Settembre 2007)

Az. 1	DAY 0	DAY 15	DAY 30	Az. 2	DAY 0	DAY 15	DAY 30	Az. 3	DAY 0	DAY 15	DAY 30
F01	240	370	600	3628	300	600	840	H01	290	400	25.000
F03	-200	395	3000	3629	-200	200	2600	H03	-200	200	7.500
F04	-200	350	920	3630	-200	225	-200	H04	240	305	50.000
F05	-200	275	1400	3631	-200	-200	1500	H05	-200	-200	400
F06	-200	220	1250	3632	-200	-200	2400	H06	590	290	39.000
F08	300	275	1900	3633	-200	-200	2600	H07	-200	240	8.600
F09	-200	500	1000	3634	-200	-200	8200	H13	-200	320	1.300
F10	260	395	3000	3635	-200	410	4000	H16	-200	-200	1.500
F12	290	270	2050	3636	250	-200	3100	H17	450	500	9.300
F13	-200	-200	400	3637	-200	-200	3600	H19	-200	480	1.800
Az. 4	DAY 0	DAY 15	DAY 30	Az. 5	DAY 0	DAY 15	DAY 30	Az. 6	DAY 0	DAY 15	DAY 30
C101	-200	640	3450	C01	240	790	14.000	1	400	650	1250
C102	290	700	2000	C02	-200	610	14.000	3	500	750	1750
C103	370	700	7500	C03	-200	1.450	17.000	5	-200	400	1.150
C104	600	460	3000	C05	-200	540	900	6	-200	750	610
C105	-200	490	2200	C06	300	1.200	16.000	7	-200	-200	690
C106	410	1350	17000	C07	260	2.300	47.000	8	-200	740	710
C107	-200	680	5200	C08	330	450	12.500	9	-200	700	640
C108	-200	610	4500	C09	300	1.300	16.000	10	330	300	1250
C109	440	900	6900	C10	350	8.400	23.000	11	680	200	680
C110	-200	620	6200	C12	420	1.550	16.000	12	-200	1250	1.150

Tabella 3 Indagine sierologica per valutare la risposta degli animali vaccinati alla proteina ricombinante Tm18 in ogni singola azienda (Az.)

AZIENDA	DAY 0	DAY 15	DAY 30	χ^2	P
1	40%	90%	100%	5,22	0,022
2	20%	40%	90%	10,4 2 gradi di libertà	0,005
3	40%	80%	100%	3,17	0,075
4	50%	100%	100%	6,33	0,011
5	70%	100%	100%	3,35	0,067
6	40%	90%	100%	5,22	0,022
TOT	56,6%	16,6%	1,6%	51,73 2 gradi di libertà	0,00001

Tabella 4 Percentuali dei livelli anticorpali superiori al limite soglia 200 calcolati per le diverse aziende problema.

Aziende	1	2	3	4	5	6	Totale
<i>Giorno 0</i>							
Conteggio	10	10	10	10	10	10	60
Somma	2290	2150	2770	3110	2800	2890	16010
Media	229	215	277	311	280	289	266,8333333
Varianza	1654,4	1138,9	18334,44	19498,9	5444,4	22143,3	11564,4
<i>Giorno 15</i>							
Conteggio	10	10	10	10	10	10	29/02/1900
Somma	3250	2715	3195	7340	18850	5990	41340
Media	325	271,5	319,5	734	1885	599	689
Varianza	8638,9	24889,1	11591,4	65715,5	5600161,1	106632,2	1206735,4
<i>Giorno 30</i>							
Conteggio	10	10	10	10	10	10	60
Somma	22620	29240	124460	58250	178400	9830	422800
Media	2262	2924	12446	5825	17840	983	7046,666667
Varianza	4791662,2	4896426,7	191229160	18637361,1	136600444,4	147401,1	92283219,2
<i>Totale</i>							
Conteggio	30	30	30	30	30	30	
Somma	28160	34105	130425	68700	200050	18710	
Media	938,6666667	1136,833333	4347,5	2290	6668,333333	623,6666667	
Varianza	2397649,9	3180259,4	93280218,5	12304869	109131952,3	169065,4	
ANALISI VARIANZA							
<i>Origine della variazione</i>	<i>F</i>	<i>F crit</i>	<i>SQ</i>	<i>gdl</i>	<i>MQ</i>	<i>Valore di significatività</i>	
Campione	43,02063954	3,0	1731285803	2	865642901,7	0,0000	
Colonne	8,49256706	2,2	854419003,3	5	170883800,7	0,0000	
Interazione	6,970011708	1,9	1402475933	10	140247593,3	0,0000	
In			3259694685	162	20121572,1		

Tabella 5: Analisi della varianza e significatività della risposta anticorpale alla proteina ricombinante Tm18 usata per la vaccinazione

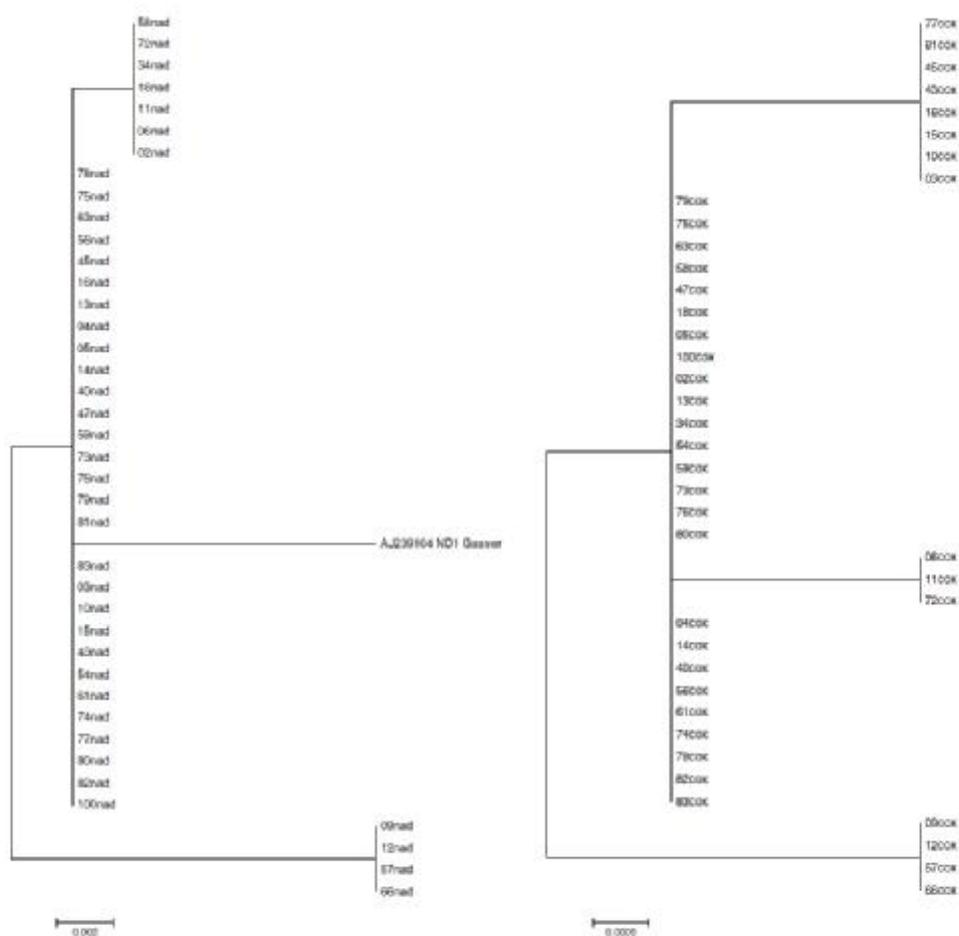


Fig. 1 Phylogenetic trees obtained for *Toxaria multiceps* isolates obtained from Sardinia for ND1 (LHS) and COI (RHS) prepared using MEGA 2 software

Documentazione fotografica



Foto 1: Il cane costituisce il principale ospite definitivo di *T. multiceps*, in cui il parassita si sviluppa in circa 42 giorni per poi eliminare numerose proglottidi "mobili" (Foto 2).



Foto 3: Il cestode adulto si localizza nel tenue e può raggiungere una lunghezza di 40-80cm, presenta pori genitali alternati irregolarmente (Foto 4), mentre le uova sono simili a quelle di altri tenidi (Foto 5).





Foto 6: Una agnella di quattro mesi colpita da encefalite acuta, determinata dalla migrazione massiva di numerose forme larvali nel SNC che causano tragitti necrotico-purulenti responsabili spesso della morte stessa dell'animale in pochi giorni (Foto 7).

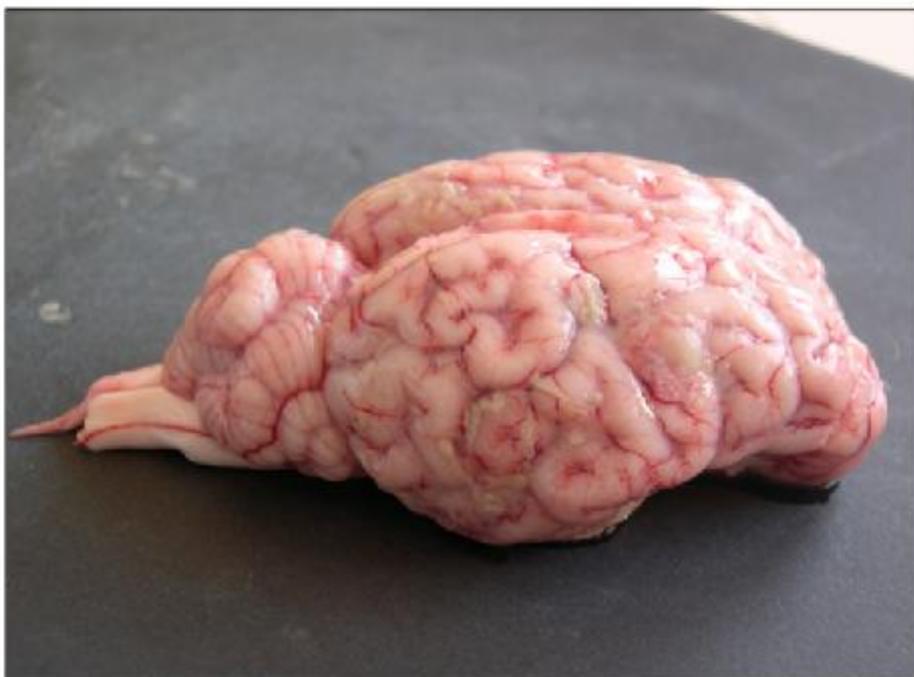




Foto 8: Agnella di nove mesi colpita da cenurosi cronica. In alcuni casi può essere riscontrata la presenza di più cisti a livello cranico (Foto 9). I Cenuri negli ovini sono generalmente fertili e già ad occhio nudo si possono osservare numerosi cluster di protoscolici (Foto 10).





Foto 11: Le agnelle di una delle aziende in cui è stata effettuata la prova sperimentale del vaccino. Gli animali venivano marchiati sia mediante tatuaggio per poterli identificare durante tutto il corso della prova.

Foto 12: Le proteine ricombinanti miscelate con saponina, utilizzata come adiuvante, venivano iniettate sottocute alla dose di 2 ml per capo, con una prima somministrazione a 10-12 settimane di vita degli agnelli e una successiva "booster" dopo 2-3 settimane dalla prima attraverso l'ausilio di una pistola Socorex nella regione laterale destra del collo.





Ringraziamenti

Si ringraziano i professori Garippa G. e Scala A. per gli insegnamenti e le opportunità avute durante il corso di dottorato.

Un ringraziamento particolare al Dott. Antonio Varcasia, per il sostegno e la fiducia e soprattutto per avermi dato la possibilità di partecipare alla realizzazione di tale progetto.