



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**Dottorato di Ricerca in
Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche
Indirizzo Microbiologia Molecolare e Clinica
(XXIV Ciclo)**

**L' Echinococcosi Cistica nell' uomo: allestimento di kit da
utilizzare nella diagnosi sierologica**

Direttore:
Ch.mo Prof. Bruno Masala

Relatore:
Ch.mo Prof. Piero Cappuccinelli

Dottorando:
Dott. Salvatore Ledda

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

ABSTRACT	pag. 1
1. INTRODUZIONE	pag. 3
<i>1.1 Echinococcus granulosus</i> : tassonomia	pag. 7
<i>1.2 Echinococcus granulosus</i> : morfologia e biologia	pag. 12
1.3 Ciclo biologico	pag. 19
1.4 L' Echinococcosi Cistica negli ospiti intermedi e nell' uomo: aspetti clinici	pag. 22
1.5 Diagnosi	pag. 26
1.6 Liquido cistico: principali antigeni	pag. 31
2. TECNICHE IMMUNOENZIMATICHE	pag. 33
2.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	pag. 33
2.2 Immunoblotting	pag. 41
3. SCOPO DELLA TESI	pag. 43
4. MATERIALI E METODI	pag. 45
4.1 Prelievo degli organi e del liquido cistico	pag. 45
4.2 Raccolta sieri umani	pag. 46
4.3 Identificazione di <i>E. granulosus</i> mediante PCR	pag. 47

4.4 Caratterizzazione biomolecolare di <i>E. granulosus</i> mediante RFLP	pag. 48
4.5 Analisi degli antigeni del liquido cistico	pag. 49
4.6 ELISA “Home made”	pag. 53
4.7 Calcolo dei parametri diagnostici del test ELISA “Home made”	pag. 55
4.8 Calcolo del coefficiente di correlazione di Pearson tra ELISA “Home made” e due kit del commercio	pag. 57
5. RISULTATI	pag. 60
5.1 Identificazione di <i>E. granulosus</i> mediante PCR e caratterizzazione biomolecolare mediante RFLP	pag. 60
5.2 Analisi degli antigeni del liquido cistico	pag. 61
5.3 Analisi mediante ELISA “Home made”	pag. 76
5.4 Parametri diagnostici	pag. 78
5.5 Coefficiente di correlazione di Pearson	pag. 79
6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pag. 82
BIBLIOGRAFIA	pag. 91

ABSTRACT

Cystic Echinococcosis (CE), caused by *E. granulosus*, represents a worldwide public health problem. CE serologic diagnosis is useful to confirm clinical infection.

The usual source of antigens for immunodiagnostic assays is the hydatid cyst fluid (HCF); Ag 5, a 67 kDa glycoprotein that under reducing conditions dissociate into 38 kDa and 22–24 kDa subunits, is one of the main components of HCF.

HCF from naturally infected sheep was analysed by SDS-PAGE, in reducing and non-reducing conditions.

Western-Blot (WB) assays, performed against positive human sera, showed a number of protein bands. Positive bands were analysed by mass spectrometry. All of them revealed the presence of Ag5 and/or AgB proteins.

HCF was separated by gel filtration (in reducing and in non reducing conditions) and the eluted fractions were loaded on SDS-PAGE. Surprisingly, WB assays revealed the presence of a 60 kDa positive band (possibly Ag5 precursor) into an unreduced gel filtration fraction corresponding to higher molecular weight; positivity was lost by WB in reducing conditions.

An ELISA assay was developed using as antigen the purified Ag 5 protein. Sera used for the assay were obtained from 40 patients with clinically diagnosed CE and from 40 uninfected controls.

The results showed high specificity (100%) and high sensitivity (95%), indicating

its potential as a diagnostic test, particularly in areas where CE is still endemic.

Purified Ag 5 may represent a further antigenic marker of infection.

1. INTRODUZIONE

L' Echinococcosi Cistica (E.C.) (Echinococcosi-Idatidosi) è una zoonosi parassitaria cosmopolita causata dalla forma adulta o larvale del cestode *Echinococcus granulosus* del genere *Echinococcus* (dal greco echino = guscio spinoso e coccus = granello), appartenente alla famiglia *Taeniidae*.

E. granulosus necessita di due ospiti (mammiferi) per il completamento del suo ciclo vitale. La forma adulta del parassita alberga nel cane domestico e in canidi selvatici, che rappresentano gli ospiti definitivi ed eliminano le uova nell'ambiente con le feci. Tale forma misura 2-7 mm di lunghezza ed è caratterizzata da uno scolice e da tre proglottidi, di cui la prima immatura, la seconda matura, l'ultima gravida e lunga più della metà dell'intero strobilo. Le uova hanno forma rotondeggiante (25-30 µm) e contengono il cosiddetto "embrione esacanto". La forma larvale, denominata "idatide", si sviluppa negli ospiti intermedi (ovini, caprini, suini, bovini, cavalli che si infestano ingerendo le uova ma anche l'uomo che rappresenta un ospite intermedio accidentale). L' idatide è una formazione cistica, ripiena di liquido di aspetto perfettamente limpido. In generale le dimensioni della cisti non superano i 5-10 cm di diametro, sebbene soprattutto nell'uomo siano state osservate idatidi anche di 50-60 cm localizzate preferenzialmente nella cavità addominale dove la crescita non è ostacolata da organi o tessuti parenchimatosi. E' possibile la formazione di idatidi figlie all'interno della cisti principale o, più raramente, all' esterno per fenomeni di

estrusione di frammenti della membrana germinativa attraverso il pericistio nel corso del processo di accrescimento. In quest' ultimo caso le cisti figlie possono essere trasportate in altre sedi per via ematogena e formare nuove idatidi, conferendo all'infestazione un carattere metastatico con localizzazione preferenziale in fegato e polmoni, ma, superata la sede polmonare, può essere raggiunto qualsiasi organo od apparato. Nell' uomo la clinica segue lo sviluppo e le modificazioni della cisti, indipendentemente dalla sua localizzazione: a) *aumento di volume*: processo inizialmente asintomatico; b) *fissurazione*: per forti resistenze tissutali periferiche la parete può lesionarsi lasciando fuoriuscire piccole quantità di materiale idatideo. Fa seguito una sintomatologia di natura tossico-allergica, caratterizzata da prurito, febbre, crisi asmatiche, orticaria ed ipereosinofilia. La diagnosi clinica dell' E.C. nell'uomo si effettua mediante tecniche strumentali “per immagini” (ecografia in primis ma anche TAC, RMN e Rx tradizionale) e va confermata con metodiche parassitologiche dirette e indirette anche se la percentuale di falsi negativi riscontrabili con la diagnosi sierologica può arrivare al 10-30%, per cross-reazioni con altre patologie parassitarie e non, anche neoplastiche.

La risposta anticorpale è peraltro correlata al grado di evoluzione ed alla localizzazione della cisti per cui, ad esempio, le cisti polmonari, spleniche e renali tendono ad essere associate ad una minore risposta rispetto a quelle epatiche.

Nella persistenza del ciclo del parassita gli ovini hanno un ruolo chiave a causa sia della consuetudine della macellazione domestica con errato smaltimento dei visceri, sia del frequente abbandono delle carcasse nei campi, oltre alla costante

presenza con il gregge di numerosi cani da pastore non controllati dal punto di vista sanitario.

Pertanto l' E.C. rappresenta un importante problema di sanità pubblica in numerose aree del mondo (Fig.1) e assume fra l'altro particolare rilevanza nel bacino del Mediterraneo, dove è considerata una delle principali parassitosi degli animali in produzione zootecnica e dove 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 due specie animali (ovino e cane) il fattore più importante per la persistenza nei 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' E.C. seppure da sempre "massivamente presente", ancora oggi costituisce un problema di primario interesse sanitario per il patrimonio zootecnico e per l'uomo; in questa regione si registrano ancora 7,2 ricoveri ogni 100.000 abitanti, con 1409 ricoveri totali dal 2001 al 2009 riguardanti 1071 pazienti (SDO dall' Assessorato dell' igiene e Sanità

e della Assistenza Sociale della RAS).

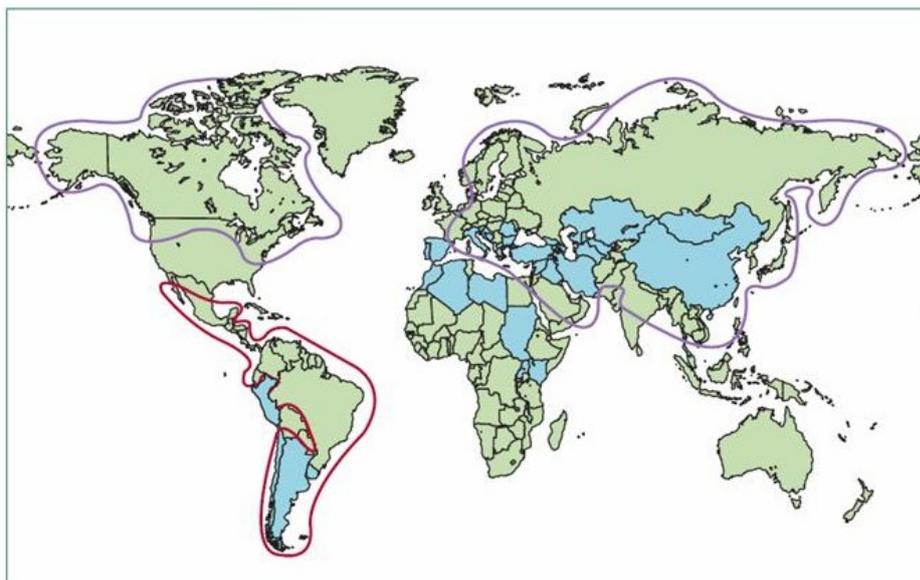


Figure 1: Geographical distribution of cystic, alveolar, and polycystic echinococcosis (hydatid disease)
Blue=countries endemic for cystic hydatid disease. Purple line=endemic areas for alveolar echinococcosis.
Red line=areas where polycystic echinococcosis has been reported.

Figura 1- Distribuzione geografica di *Echinococcus granulosus* (Craig *et al.*, 2007).

Nonostante l' E.C. sia endemica nei Paesi del Bacino del Mediterraneo, la scarsa conoscenza dei dati epidemiologici, la lunga latenza della malattia e l'inconsapevolezza dei costi della zoonosi e dei benefici di un controllo, concorrono alla sua sottovalutazione da parte della popolazione, dei mass-media e delle Autorità Sanitarie (Mantovani e Lasagna, 2004; Poglayen *et al.*, 2007). In questo contesto, la valutazione dell'impatto reale di questa zoonosi appare di estrema utilità. È da sottolineare che i dati in letteratura, così come le statistiche ufficiali basate sulle notifiche obbligatorie, raramente rappresentano una misura attendibile della diffusione della malattia.

1.1 *Echinococcus granulosus*: tassonomia

L' *Echinococcus granulosus* agente eziologico dell' E.C. è un cestode del phylum *Platyhelminthes*, classe *Cestoda*, sottoclasse *Eucestoda*, ordine *Cyclophyllidea*, famiglia *Taenidae*, genere *Echinococcus*.

Una precisa valutazione delle caratteristiche morfologiche ha portato a riconoscere solo quattro specie appartenenti al genere *Echinococcus* (*E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* ed *E. vogeli*) di cui una sola, *E. granulosus*, è presente nei paesi che si affacciano nel bacino del Mediterraneo (Thompson e McManus, 2002).

Le specie più diffuse e di maggiore importanza dal punto di vista medico e medico-veterinario sono *E. granulosus* ed *E. multilocularis* che causano rispettivamente l'idatidosi cistica ed alveolare.

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

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

Questa variabilità è stata osservata soprattutto tra gli isolati di *E. granulosus* da diverse specie di ospiti intermedi; Smyth e Davies (1974) furono i primi a dimostrare che vi erano differenze significative nello sviluppo biologico tra isolati di *E. granulosus* di equino e di ovino.

Tale studio ha fornito la base per comprendere le differenze esistenti tra gli isolati provenienti da diverse specie di ospiti in varie parti del mondo.

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

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

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

L’ E.C. è considerata la più importante zoonosi parassitaria del mondo, specialmente dove esiste una stretta convivenza tra uomo e animali.

Per interrompere i cicli di trasmissione, è necessario conoscere quali genotipi sono presenti in una determinata area e quali ospiti colpiscono; l’applicazione di tecniche molecolari per caratterizzare gli isolati ha dato un importante contributo per ampliare le conoscenze epidemiologiche (Thompson e McManus, 2002).

L’analisi del DNA, grazie alla sua elevata sensibilità, ha fornito elementi molto utili per discriminare i differenti genotipi (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) del 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 ND1) 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.

La specie *E. granulosus* comprende diversi genotipi, mentre, sembrano essere molto poche le varianti genetiche di *E. multilocularis* (Rinder *et al.*, 1997).

Fino a poco tempo fa, gli studi molecolari hanno consentito l' identificazione di 10 genotipi o ceppi di *E. granulosus*:

G1 (ceppo ovino), G2 (ceppo ovino della Tasmania), G3 (ceppo del bufalo), G4 (ceppo del cavallo), G5 (ceppo bovino), G6 (ceppo del cammello), G7 (ceppo suino), G8 (ceppo cervide), G9 (ceppo variante suino), G10 (ceppo cervide finno-scandinavo) (Lavikainen *et al.*, 2003; Maravilla *et al.*, 2004). La validità del ceppo G9 è in discussione (Snabel *et al.*, 2000), poiché esso sembra corrispondere al

ceppo G7.

La tassonomia di *E. granulosus* è stata attualmente ridefinita (Tabella 1):

- *E. granulosus* (da G1 a G3) in senso stretto.
- *E. equinus* (G4) recentemente inserito in una specie distinta che ha un ciclo cane-cavallo, presente nel Regno Unito, non sembra da considerarsi agente zoonotico.
- *E. ortleppi* (G5), specie presente in Europa centro-occidentale, con un ciclo cane-bovino; solo pochissimi casi di questo specie sono stati segnalati.
- Da G6 a G10 sono stati inseriti nella specie *E. canadensis*. (Thompson, 2008; Nakao *et al.*, 2007).

<i>E. granulosus</i>	G1 (ceppo ovino) G2 (ceppo ovino della Tasmania) G3 (ceppo del buffalo)
<i>E. equinus</i>	G4 (ceppo equino)
<i>E. ortleppi</i>	G5 (ceppo bovino)
<i>E. canadensis</i>	G6 (ceppo del cammello) G7 (ceppo suino) G8 (ceppo cervide americano) G9 (ceppo variante suino) G10 (ceppo cervide europeo)
<i>E. felidis</i>	Ceppo del leone

Tabella 1- Rappresentazione schematica dei principali genotipi di *E. granulosus*

(Thompson, 2008).

1.2 *Echinococcus granulosus*: morfologia e biologia

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

La testa (scolice) presenta quattro ventose tondeggianti disposte in posizione equatoriale munite di un rostrello con una doppia corona di uncini, delle quali una più piccola (22-39 micron) ed una grande (31-49 micron) (Casarosa, 1985).

Il collo è corto e stretto, il corpo (strobilo) è normalmente costituito da tre o quattro proglottidi, che in alcuni casi possono raggiungere il numero di sei (Euzeby, 1968).

Le proglottidi più prossime al collo sono sessualmente immature, seguono quelle mature, e l'ultima, gravida, che può contenere mediamente 500-800 uova. Ogni proglottide è ermafrodita, provvista di un solo poro genitale.

L'ultima proglottide, dopo autofecondazione, si stacca dal corpo del parassita e viene espulsa all'esterno con le feci del proprio ospite definitivo; qui avviene la disintegrazione della proglottide stessa con disseminazione delle uova nell'ambiente.

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

Le uova, di 30-50 x 22-44 micron di diametro, possono essere sferiche o ovali.

All'esame microscopico sono morfologicamente indistinguibili da quelle degli altri cestodi appartenenti alla famiglia *Taenidae*.



Figura 2- *Echinococcus granulosus* (cestode adulto).

Studi ultrastrutturali effettuati sulle uova di *E. granulosus*, *E. multilocularis* e diverse specie di *Taenia*, hanno evidenziato strutture simili, composte da una serie di strati e/o membrane che avvolgono l'embrione esacanto o oncosfera.

Procedendo dall'esterno verso l'interno, le uova comprendono: capsula, membrana vitellina, embrioforo, strato granuloso e membrana oncosferica (Morseth, 1965; Sakamoto, 1981; Swiderski, 1982).

L'embrioforo è un rivestimento formato da una proteina simile alla cheratina che funge da protezione per l'embrione esacanto, conferendo all'uovo una forte resistenza a diversi fattori chimico-fisici e climatici (Gemmell e Lawson, 1986).

La capacità di sopravvivenza delle uova è maggiore a basse temperature: a 21°C e con sufficiente umidità, esse permangono vitali per oltre 28 giorni; a 7°C la loro

sopravvivenza è di circa 294 giorni.

Al di sotto di 0°C (da -35°C a -50°C) le uova possono resistere per 24 ore conservando la loro capacità infestante, mentre a -70°C si devitalizzano nell'arco di poche decine di minuti. A temperature elevate (60°C-100°C) le uova resistono da 1 a 2 minuti (Laws, 1968; Thompson e Lymbery, 1995).

Tuttavia, più che la temperatura, è l'umidità a limitarne la sopravvivenza; infatti, in natura, l'essiccamento è il principale responsabile della morte delle uova (Laws, 1968).

Il numero di uova presenti in ciascuna proglottide gravida può essere molto variabile, da 100 a 1500 per proglottide (Arundel, 1972; Rausch, 1975; Thompson e Eckert, 1982; Heath e Lawrence, 1991).

Allo stesso modo non si conosce con esattezza la frequenza con cui si formano le proglottidi gravide: si stima che dopo 40 giorni dall'infestazione se ne formi una ogni 7-14 giorni (Gemmel, 1995; Smyth, 1964; Shantz, 1982).

L'idatide o cisti idatidea è la forma larvale (metacestode) polisomatica di *E. granulosus* (Marcato, 2002). La cisti è già visibile dopo tre settimane dall'impianto dell'embrione esacanto nell'organo bersaglio dell'ospite intermedio. Nella parete della cisti si distinguono, dall'esterno verso l'interno, il pericistio o avventizia e la membrana elmintica; all'interno della cisti si trova il liquido cistico, una sostanza chiara ed incolore composta di acqua, proteine, sali minerali e batteriologicamente sterile.

L'avventizia è uno strato di tessuto fibroso, costituito da cellule mononucleate, eosinofili, cellule giganti, cellule endoteliali e fibroblasti, ed è prodotta dall'ospite

intermedio, come reazione di difesa nei confronti del parassita.

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

Nello strato germinativo si differenziano cellule che generano la sostanza chitinosa e cellule che determinano la fertilità dell'idatide.

L'idatide fertile è caratterizzata dalla presenza di capsule o cisti prolifere o cisti nido con una sottilissima membrana e contenenti un minimo di 6 fino ad un massimo di 30 protoscolici.

Le cisti nido sono biancastre e grandi come un granello di sabbia; aderiscono con un sottile peduncolo alla membrana germinativa rendendola granulosa, o in altra maniera, se ne distaccano rimanendo libere nel liquido cistico.

Anche i protoscolici si possono rendere liberi, raccogliendosi sul fondo della cisti madre formando la così detta sabbia idatidea: ogni cisti ne contiene in media 3-6 ml, con circa 400.000 protoscolici per ml (2-3 milioni di protoscolici per cisti).

La tipologia più semplice di cisti è quella detta uniloculare, biancastra, sferoidale, di volume variabile, con una sola cavità contenente liquido idatideo e sabbia idatidea. La membrana germinativa risulta per lo più tappezzata da numerose vescicole prolifere adese e distribuite in modo non uniforme.

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

Il ciclo evolutivo della cisti viene spesso complicato da moltiplicazioni sia di idatidi primitive per la fuoriuscita dalla cisti idatidea che di protoscolici che possono subire la trasformazione vescicolare, oppure perchè porzioni di membrana elmintica possono incunearsi nei tessuti pericistici, superare la capsula avventiziale ed evolvere generando nuove idatidi; queste possono rimanere unite e comunicanti con l'idatide madre oppure si rendono libere (cisti figlie esogene), portandosi in altre sedi e formando nuove idatidi.

Meno frequentemente, le cisti figlie si formano all'interno dell'idatide madre e sono caratterizzate da una cavità occupata da liquido idatideo e da cisti figlie endogene, talora contenenti anche cisti nipoti.

Le cisti idatidee risultano fertili nella maggior parte dei casi ed in genere mostrano dimensioni notevoli (10-12 cm).

Sebbene possano assumere una forma sferoidale, per lo più risultano lobate o plurilobate e talora a contorni irregolari, probabilmente a causa della pressione esercitata dalle cisti figlie verso l'esterno.

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

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

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

pseudomultiloculare.

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

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

Quando l'idatide è completamente degenerata, si ha la cisti caseosa o la cisti calcifica. La cisti caseosa è caratterizzata da una cavità occupata esclusivamente da materiale denso, di colore giallastro, di consistenza cremosa o caseosa, del tutto simile al materiale presente nelle cisti iperlamine caseose.

La diversità con queste è unicamente legata all'assenza di strati di tessuto

laminare, per cui si può ipotizzare che in questo caso la degenerazione caseosa inizi in una fase antecedente lo sviluppo delle cisti figlie e prima dell'eventuale distacco dello strato cuticolare nella cavità.

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

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

1.3 Ciclo biologico

E. granulosus, allo stadio adulto, vive nell'intestino tenue degli ospiti definitivi, cane e altri canidi (lupo, coyote, dingo, sciacallo, iena e alcune specie di volpi), che si infestano con l'ingestione di organi contenenti cisti idatidee fertili.

Dopo l'ingestione, i protoscolici fuoriescono dalle cisti, si attaccano alla mucosa intestinale grazie alle quattro ventose ed agli uncini presenti sullo scolice, e si trasformano in stadi adulti (McManus e Thompson, 2003).

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

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

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

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

L'embrione esacanto attivato si libera dai suoi involucri e si ancora ai villi della

mucosa intestinale, probabilmente proprio grazie ai suoi uncini.

Dopo l'ancoraggio, l'oncosfera penetra rapidamente attraverso l'epitelio, raggiungendo la lamina propria in 30-120 minuti, mediante i movimenti del corpo e degli uncini coadiuvato dalle secrezioni prodotte dalle ghiandole di penetrazione che causano la degenerazione dei tessuti dell'ospite (Thompson e Lymbery, 1995). L'oncosfera, sfruttando la via ematica e quella linfatica, si diffonde in tutto l'organismo dell'ospite intermedio, localizzandosi prevalentemente nel fegato e nel polmone e, più raramente, nei muscoli, rene, milza, sistema nervoso centrale (SNC), tessuto osseo, encefalo, cuore e altri organi (qui riportati in ordine decrescente di localizzazione).

In tali sedi, l'oncosfera diventa cisti idatidea (metacestode), tramite una serie di trasformazioni che durano da 1 a 14 giorni (Fig.3) (McManus e Thompson, 2003). Negli organi bersaglio la cisti, di forma sferica e ripiena di liquido, si accresce di circa 1 cm l'anno, raggiungendo così considerevoli dimensioni (McManus e Thompson, 2003).

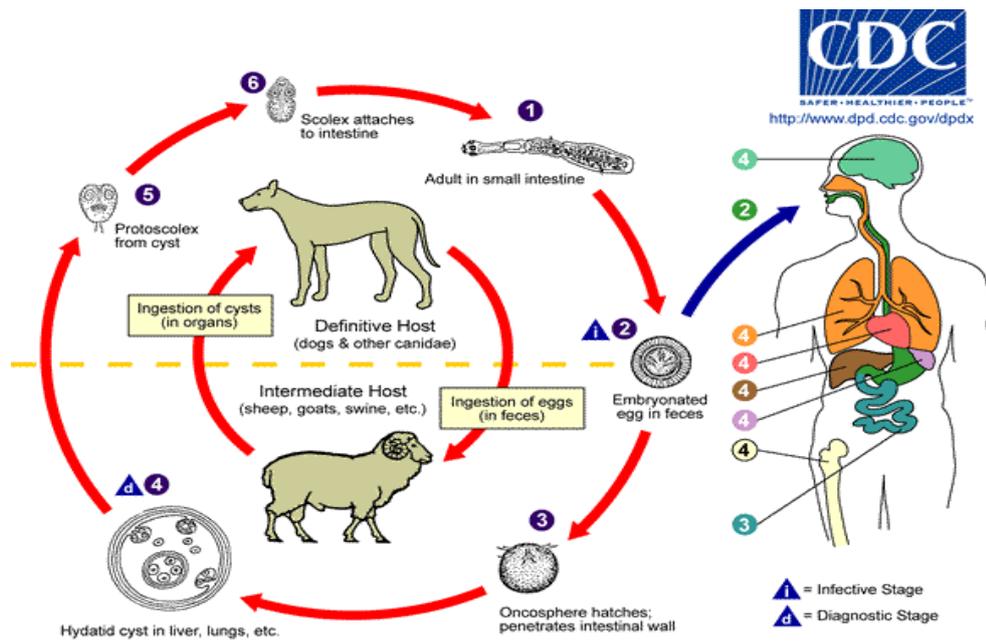


Figura 3- Ciclo biologico *E. granulosus*.

1.4 L' Echinococcosi Cistica negli ospiti intermedi e nell' uomo: aspetti clinici

Cisti di *E. granulosus* sono state trovate in numerose specie animali (ospiti intermedi ed aberranti) appartenenti a diversi gruppi inclusi bovini, cervi, suini, equini e nell' uomo.

La cisti idatidea cresce lentamente e può impiegare diversi anni prima di raggiungere dimensioni in grado di causare manifestazioni sintomatiche importanti.

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

Negli ovini le idatidi sono localizzate in uno o più organi, prevalentemente fegato e polmone (Fig.4), ma anche milza, cuore, rene e altri organi possono essere infestati (Orlando, 1997). Anche nei caprini, fegato e polmone sono i siti prediletti del parassita (Rausch, 1995).



Figura 4- Organi ovini parassitati.

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

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

Negli equini le cisti si accrescono molto lentamente; infatti in cavalli di 11-16 anni non superano i 4 cm di diametro. Tuttavia si possono trovare anche cisti più grandi che spesso risultano asintomatiche (Thompson e Smith, 1975). Il fegato è

l'organo più parassitato, ma sono state ritrovate cisti anche nei polmoni, cervello, cuore, pericardio, pleura, milza, rene ed utero. In alcuni casi, gli equini possono presentare manifestazioni cliniche della parassitosi (Bauer *et al.*, 1986; Hermann *et al.*, 1988).

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

Anche se spesso questa parassitosi negli ospiti intermedi è asintomatica, sono stati registrati casi di animali in cui si ha un abbassamento dell'indice di conversione, di riproduzione, della produzione di latte, di lana o pellame (Battelli, 2004). Questi effetti sono economicamente importanti soprattutto in zone endemiche povere (Torgerson *et al.*, 2000, 2001). Nell'uomo, la fase iniziale dell'infezione è quasi sempre asintomatica, perchè lo sviluppo delle cisti è estremamente lento (può durare molti mesi o diversi anni); infatti spesso le infezioni contratte in età giovanile si rivelano dopo anni.

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

In alcuni casi, infatti, la cisti idatidea regredisce spontaneamente con parziale riassorbimento o calcificazione. La presenza delle cisti può diventare sintomatica in seguito a rottura della parete cistica o per azione compressiva della cisti in accrescimento, oppure, in seguito a contaminazione batterica, si può trasformare in un ascesso.

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

Si possono così avere eosinofilia, orticaria, prurito, dispnea, crisi asmatiche fino allo shock anafilattico (McManus, 2003). Più del 90% delle cisti si localizzano nel fegato e/o in entrambi i polmoni; sono riportate occasionalmente (2-3%) nel rene, nella milza, nella cavità peritoneale, nei muscoli e raramente (1%) nel cuore, cervello, colonna vertebrale, ovaie (Menghebat *et al.*, 1993). Complicanze dovute alla rottura delle cisti sono: colangite e ostruzione epatica da cisti figlie nei condotti biliari, bronchiti a livello polmonare, embolia a livello cardiaco.

La presenza di cisti a livello osseo determina spesso fratture e le cisti a localizzazione encefalica si manifestano con deficit neurologici focali o segni di ipertensione endocranica (McManus, 2003).

1.5 Diagnosi

La sintomatologia dell' E.C. è strettamente dipendente dalla localizzazione e dall'evoluzione della cisti; dato il lento sviluppo di quest'ultima, la maggior parte dei casi iniziali di malattia sono asintomatici. Il clinico viene a conoscenza della cisti per quattro motivi principali: 1) compressione su organi interessati; 2) eosinofilia; 3) indagine strumentale (radiografia, ecografia, TAC); 4) reazione anafilattica per rottura delle cisti (Garlaschelli *et al.*, 2004).

Negli animali ospiti intermedi, la diagnosi dell' E.C. si basa prevalentemente sull'esame anatomico-patologico, per la messa in evidenza delle cisti nei vari organi. In molti casi, infatti, la parassitosi è asintomatica e richiede tecniche diagnostiche sofisticate per l'identificazione delle cisti, come l'ecografia, usata talvolta nei piccoli ruminanti (ovini e caprini) (Roneus *et al.*, 1982; Lahmar *et al.*, 2007) e per gli equini (Hermann *et al.*, 1988).

L' E.C. è una delle poche malattie parassitarie la cui diagnosi biologica si basa sulla sierologia invece che sull'isolamento del parassita (diagnostica indiretta); il rilevamento degli antigeni circolanti non sembra essere utile a scopi diagnostici (McManus, 2003).

La diagnosi sierologica è resa difficile dalla cross-reattività antigenica con altre specie di *Taenia* come *T. hydatigena* e *T. ovis* e dal fatto che gli ospiti intermedi producono scarse risposte anticorpali e poco prevedibili (McManus, 2003), con possibilità di falsi negativi e falsi positivi.

Nell'uomo, la diagnosi certa di E.C., nella maggioranza dei casi, avviene mediante la diagnostica per immagini: radiologia (usata per la diagnosi di cisti polmonari, ossee o muscolari), ecografia (per la diagnosi di cisti addominali o muscolari), tomografia assiale computerizzata (TAC) e risonanza magnetica (per lo studio post-chirurgico delle lesioni residue e delle recidive) (Pawlowski *et al.*, 2001).

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

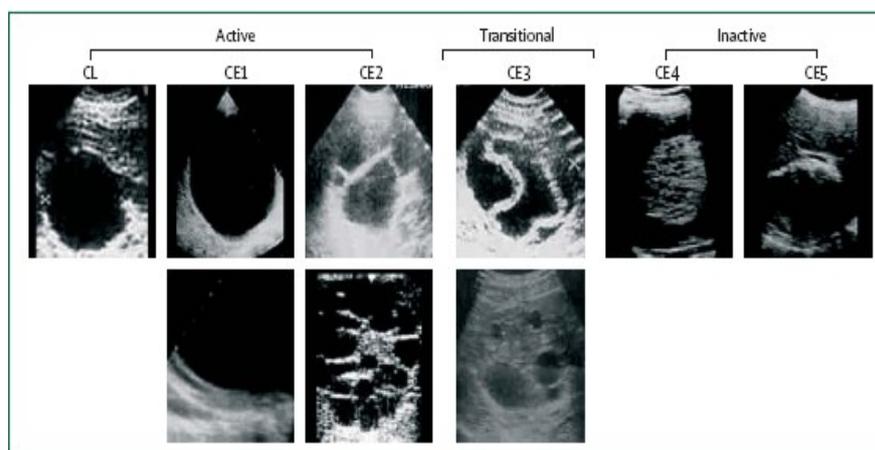


Figure 3: Ultrasound findings in cystic echinococcosis (WHO classification)
Cysts are classified as active, transitional, or inactive according to their imaging characteristics. Reproduced from reference 14, with permission from Elsevier.

Figura 5- Classificazione ecografia dell'Informal Working Group on Echinococcosis—World Health Organization.

Le cisti si possono dividere in lesioni cistiche di natura non specificata (CL), attive (CE1, CE2) e inattive (CE4, CE5) (Garlaschelli *et al.*, 2004) (Fig.5).

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

La scelta di una tecnica sierologica dipende dalla sua sensibilità e specificità. La metodica per la ricerca degli antigeni circolanti è risultata finora meno sensibile di quella per la ricerca degli anticorpi, che rimane il metodo di scelta.

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

Test come la reazione di Casoni, iniezione intradermica di determinanti antigeniche di *E. granulosus*, hanno ormai solo un valore storico e non devono più essere utilizzati. In anni recenti numerosi test più attendibili sono stati messi in commercio.

Il test di Boyden basato su un' emoagglutinazione indiretta (IHA, Indirect HemoAgglutination) è uno dei test più diffusi ed utilizzati sia per la semplicità d'esecuzione che per il costo relativamente basso; è caratterizzato da una specificità soddisfacente ma con una sensibilità non molto alta (Matossian *et al.*, 1976).

Il liquido cistico costituito da glico-lipoproteine, carboidrati e sali, è la principale fonte antigenica per l'immunodiagnosi (Zhang e McManus, 2006). Le lipoproteine, l' antigene B (AgB) e l' antigene 5 (Ag5) sono i maggiori componenti del liquido cistico e vengono largamente utilizzati per

l'immunodiagnosi dell' E.C. (Poretti *et al.*, 1999). Tuttavia vi sono notevoli difficoltà nell'impiego di questi antigeni relative a problemi di standardizzazione del loro utilizzo e alla loro bassa specificità e sensibilità.

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

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

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

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

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

Negli ultimi anni, a scopo diagnostico, sono state prodotte proteine ricombinanti e

peptidi diagnostici per aumentare la sensibilità e specificità dei test (Zhang *et al.*, 2003). Tuttavia l'uso dei componenti ricombinanti ha portato in qualche caso ad un abbassamento della sensibilità diagnostica (Carmena *et al.*, 2006).

1.6 Liquido cistico: principali antigeni

Il liquido cistico (HCF, hydatid cyst fluid) è una complessa miscela di glicolipoproteine, carboidrati e sali. Alcuni di questi componenti provengono dall'animale ospite (principalmente albumine e immunoglobuline) mentre altri derivano dall'attività metabolica del metacestode. Il liquido cistico è considerato la principale fonte antigenica per l'immunodiagnosi dell'E.C. umana. L'estratto crudo di liquido cistico ha un'alta sensibilità che varia dal 75% al 95% (Zhang *et al.*, 2003). Tuttavia la sua specificità è spesso bassa e si registrano problemi di cross-reattività quando i sieri provengono da pazienti affetti da altri cestodi (89%), nematodi (39%) e trematodi (30%) (Eckert e Deplazes, 2004). A causa di questo, l'estratto crudo HCF è raccomandato dall'WHO solo per lo screening sierologico di massa (WHO, 2001). Per una diagnosi specifica e mirata di E.C. è preferibile purificare e utilizzare due proteine dell'HCF: antigene B e antigene 5.

Antigene B (Oriol *et al.*, 1971) è una lipoproteina polimerica di 120-160 kDa fortemente immunogenica che, in condizioni riducenti, si dissocia in 3 subunità da 8/12, 16 e 20/24 kDa; pertanto l'antigene B può essere considerato come un multimerico di subunità da 8 kDa (Lightowers *et al.*, 1989). Il ruolo dell'antigene B nella biologia del parassita non è completamente chiaro ma sembra che sia coinvolto nella modulazione della risposta immunitaria dell'ospite. Sembra infatti che agisca come inibitore della chemiotassi dei neutrofili (Shepherd *et al.*, 1991), come promotore di una risposta immunitaria non protettiva di tipo Th2 (Riganò *et*

al., 2001), interferisca con le funzioni delle cellule dendritiche (DC) impedendo di differenziarsi in DC mature se stimolate dall' antigene (Siracusano *et al.*, 2008) e induttore di apoptosi delle cellule immunitarie nei pazienti con malattia attiva (Riganò *et al.*, 2002).

Attualmente, la diagnosi mediante immunoblotting dell'antigene B rappresenta il miglior sistema diagnostico di E.C. (Ortona *et al.*, 2000). Tuttavia va sempre tenuto presente che il 18% dei sieri di pazienti con E.C. non presenta anticorpi specifici rilevabili e che il 39% dei pazienti con echinococcosi alveolare cross-reagisce con questa componente (Maddison *et al.*, 1989).

Antigene 5 (Capron *et al.*, 1967) è una proteina termolabile e altamente immunogenica, composta da 2 componenti di 57 e 67 kDa (Di Felice *et al.*, 1986) che in condizioni riducenti si dissocia in subunità da 38 e 22-24 kDa (Lightowlers *et al.*, 1989). Il ruolo biologico di questa proteina è tuttora sconosciuto sebbene, l'elevata concentrazione nel HCF suggerisca un sua funzione nello sviluppo del metacestode. L'antigene 5 è stato utilizzato estesamente nella sierodiagnosi dell' E.C. umana. Tuttavia nel 10-40% di pazienti affetti da E.C. e sottoposti ad intervento chirurgico non è stato possibile rivelare in ELISA anticorpi anti-Ag5 (Schantz e Gottstein, 1986). A questo si aggiunge che l'Ag5 cross-reagisce con anticorpi presenti nei sieri dei pazienti affetti da altri cestodi, trematodi e nematodi (Yarzabal *et al.*, 1977; Di Felice *et al.*, 1986). Parte di questa reattività è correlata con la presenza della fosforil-colina legata alla subunità di 38 kDa (Lightowlers *et al.*, 1989).

2. TECNICHE IMMUNOENZIMATICHE

2.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (*ELISA*)

ELISA è l'acronimo dell'espressione *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, un metodo di analisi immunologica usato per rilevare l'eventuale presenza di un dato antigene in un campione, oppure per misurare la concentrazione di anticorpi nel plasma sanguigno. Il termine ELISA sta a significare che il saggio unisce la specificità della reazione antigene-anticorpo (reazione immunologica) con la sensibilità di un semplice dosaggio spettrofotometrico di un enzima. Nell'ambito dei vari metodi immunoenzimatici, la denominazione ELISA si riferisce esclusivamente ai sistemi in fase eterogenea, sistemi in cui anticorpi o antigeni sono adsorbiti o legati ad un substrato solido.

L'Antigene è una molecola che può legarsi ad una specifica immunoglobulina, grazie ad una struttura specifica detta epitopo. Una singola molecola di antigene può contenere diversi epitopi riconosciuti da anticorpi differenti.

L'anticorpo (o immunoglobulina) è una glicoproteina del siero con una peculiare struttura quaternaria: sono costituiti da una regione costante, comune a tutte le immunoglobuline appartenenti allo stesso isotipo e una regione variabile che contiene invece il sito di combinazione con l'antigene e che è quindi variabile a seconda della specificità dell'anticorpo per un dato antigene. Nell'ambito del sistema immunitario gli anticorpi hanno la funzione di neutralizzare corpi estranei come virus e batteri, riconoscendo ogni antigene legato al corpo come un

estraneo.

L'ELISA ha una elevata selettività nei confronti degli analiti da determinare; l'anticorpo, infatti, è in grado di riconoscere specificamente l'antigene che ha portato alla sua formazione. La costante di affinità per la formazione dei complessi antigene-anticorpo è estremamente elevata e, benché la reazione sia di tipo reversibile, l'equilibrio è di gran lunga spostato verso la formazione dei complessi antigene-anticorpo. La tecnica si basa sul fatto che, con adatti procedimenti, è possibile coniugare gli anticorpi di un siero con alcuni enzimi (perossidasi, fosfatasi alcalina, beta-galattosidasi) senza alterarne la capacità di combinazione con gli antigeni corrispondenti. Gli enzimi utilizzati sono in grado di catalizzare una reazione su un idoneo substrato con la formazione di un prodotto terminale colorato che permette così di evidenziare la quantità di antigene presente.

Nei formati commerciali le reazioni vengono, di norma, eseguite all'interno di pozzetti di polivinile o polistirene (micropiastre da 12 *strip* da 8 pozzetti ciascuna per un totale di 96 pozzetti) su cui sono adesi, a seconda dei casi, gli anticorpi specifici per l'antigene di interesse o l'antigene stesso. All'interno dei pozzetti vengono incubati i campioni da analizzare (plasma, siero, omogenati tissutali, latte etc.) e gli opportuni reagenti intervallati da lavaggi atti a rimuovere i reagenti in eccesso. Per ultimo si aggiunge il substrato che dà origine al prodotto colorato. La positività è valutata analizzando la comparsa o meno del colore, in seguito alla reazione catalizzata dall'enzima sul substrato (Fig.6).

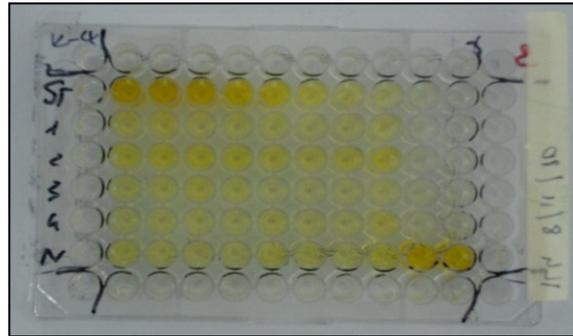


Figura 6- Esempio piastra ELISA.

La tecnica immunoenzimatica può essere impiegata per la ricerca sia di antigeni che anticorpi e si presta a numerose variazioni per altrettante applicazioni diverse. I *test* ELISA possono essere, infatti, di tipo competitivo o non competitivo (*sandwich*) (Fig.7).

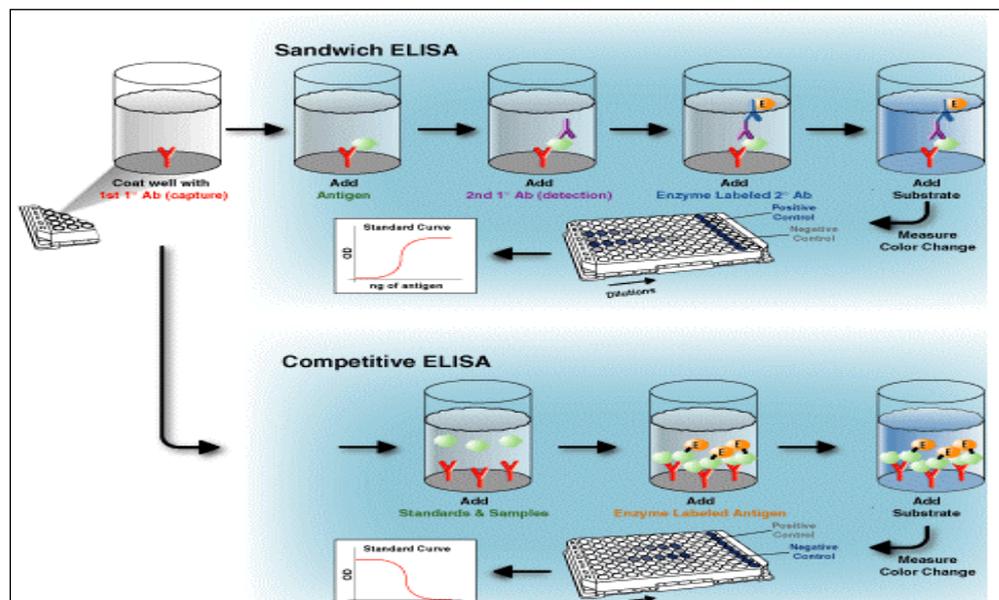


Figura 7 - Rappresentazione schematica di un saggio ELISA.

I saggi tipo *sandwich* sono generalmente utilizzati per la ricerca di molecole ad alto peso molecolare, come ad esempio, le proteine. Quando invece gli antigeni sono molecole a basso peso molecolare, come nel caso della ricerca di residui di farmaci o ormoni, i saggi sono sempre di tipo competitivo e possono essere a loro volta ulteriormente classificati in diretti e indiretti. Per i *test* competitivi, maggiore è la concentrazione di antigene, minore sarà il numero di immunocomplessi rilevabili per cui, contrariamente a quanto avviene generalmente in chimica analitica, esiste una proporzionalità inversa tra il segnale registrato (assorbanza) e concentrazione.

Nell' ELISA competitivo di tipo diretto, l'anticorpo specifico per l'analita è adsorbito sulla superficie dei pozzetti della micropiastra. Il campione in esame, nel quale si deve determinare la presenza dell'analita (antigene libero), e una quantità prefissata di coniugato (antigene legato all'enzima) vengono depositati nei vari pozzetti. Durante la fase di incubazione, l'antigene coniugato compete con l'antigene libero, eventualmente presente nel campione, per i siti di legame degli anticorpi adesi nei pozzetti. Quindi, il materiale non reagito viene rimosso grazie ad opportuni lavaggi e la quantità di analita coniugato, legata dagli anticorpi immobilizzati, è quantificata mediante l'aggiunta di un substrato che forma un prodotto colorato. La reazione viene arrestata mediante l'aggiunta di una soluzione acida (*stop solution*).

Nel caso dell' ELISA competitivo di tipo indiretto è l'analita (antigene), generalmente legato ad una proteina carrier come l'albumina di siero bovino, ad essere adsorbito sulla superficie dei pozzetti. Il campione viene addizionato nei

pozzetti e successivamente si aggiunge una quantità prefissata di anticorpo specifico per l'analita. Durante la fase di incubazione, gli anticorpi in soluzione si ripartiscono tra l'analita libero, eventualmente presente nel campione in analisi, e l'analita immobilizzato sulla superficie solida del pozzetto. Tutto ciò che non ha reagito durante l'incubazione viene successivamente rimosso mediante lavaggi e la quantità di anticorpo legato all'analita specifico nel pozzetto viene quantificata mediante aggiunta di un secondo anticorpo enzima-coniugato che si lega al primo. In seguito ad una seconda fase di incubazione e ai lavaggi, si aggiunge il substrato, si arresta la reazione e si procede alla lettura. Anche in questo caso, la quantità di colore sviluppatosi risulterà inversamente proporzionale alla quantità di analita libero nel campione.

Sempre nei saggi competitivi di tipo indiretto, in alcuni casi, nella superficie dei pozzetti sono adesi, invece che gli antigeni, degli anticorpi in grado di legare anticorpi anti-antigene. Durante l'esecuzione del test, si aggiunge la soluzione contenente gli anticorpi anti-antigene che si legano agli anticorpi adesi. Con l'aggiunta simultanea del coniugato e del campione (in cui può essere eventualmente presente l'analita libero si origina la reazione di competizione per i siti anticorpali già vista sopra. Lo schema di questo tipo di saggio è riportato in Figura 8. Si procede infine ai lavaggi e all'aggiunta del substrato. La reazione viene arrestata mediante una soluzione acida (*stop solution*).

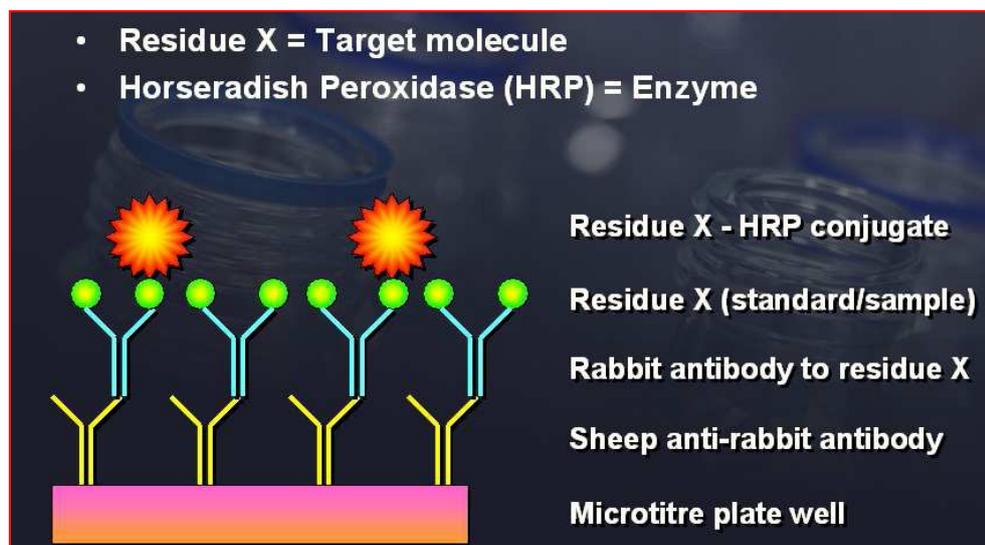


Figura 8 - Schema di un saggio competitivo indiretto.

Caratteristica dell'ELISA è la sua versatilità, cioè la sua abilità nel determinare antigeni di diverse morfologie e dimensioni. Gli svantaggi principali dei test ELISA sono l'impossibilità di osservare le cellule direttamente come nell'IFAS, la possibilità di osservare falsi positivi e negativi e la bassa sensibilità rispetto all'IFAS.

La lettura delle piastre viene fatta utilizzando uno specifico apparecchio (spettrofotometro) che avendo dei filtri interni è in grado di effettuare uno screening della radiazione luminosa, determinando così una quantificazione dell'assorbimento solamente a specifiche lunghezze d'onda, ottimizzate in base al substrato che si sta andando a rilevare (es. tetrametilbenzidine (TMB) 450 nm giallo, 5 bromo-4 cloro -3 indolifosfato 600-650 nm blu, para-nitrofenilfosfato 405-415 nm giallo). La lettura è espressa in Densità Ottica (O.D).

Il metodo diretto è frequentemente utilizzato per la determinazione (quantitativo/qualitativo) di antigeni in diversa matrice.

Il metodo indiretto è il più utilizzato per la determinazione (quantitativo/qualitativo) di anticorpi.

Il metodo sandwich è quello maggiormente utilizzato in quanto l'utilizzo di un primario adeso alla piastra e di un secondario marcato lo rendono molto sensibile e specifico riducendo al minimo "il rumore di fondo".

Il metodo per competizione è il più utilizzato per la determinazione (qualitativo) di anticorpi specifici in siero e di piccole molecole.

Nei primi tre casi l'attività enzimatica, dosata in condizioni standard, sarà direttamente proporzionale alla quantità di antigene presente.

Nel quarto caso, essendo una competizione il cui risultato positivo è dato dall'assenza di colorazione, non è possibile quantificare la presenza di anticorpi ma solo determinarne la presenza.

L'utilizzo di anticorpi monoclonali ha migliorato notevolmente l'accuratezza della tecnica: l'utilizzo, nella tecnica DAS-ELISA, di anticorpi monoclonali ottenuti da topo (o ratto) come anticorpi sonda, abbinato all'uso di anticorpi policlonali specifici fissati su piastre e anticorpi di coniglio anti-topo (o ratto) coniugati con l'enzima per la rivelazione sequenziale degli anticorpi sonda ha portato ad una riduzione significativa di false reazioni positive.

La tecnica ELISA risulta essere molto specifica, in particolare quando si usano anticorpi monoclonali, e di una estrema facilità e velocità di utilizzo.

Infatti per poter "leggere" una piastra da 96 pozzetti (di cui una ventina saranno

occupati dalla curva e dai bianchi) si impiegherà all'incirca dalle 2 alle 5 ore a seconda delle tempistiche di incubazione dei singoli anticorpi e dall'abilità manuale dell'operatore.

L'ELISA oramai è una tecnica standardizzata e sono presenti in commercio kit per i più svariati obiettivi contenenti tutti i reagenti necessari e lo standard necessario per fare la curva di calibrazione.

2.2 Immunoblotting

Il principio del metodo è analogo a quello dell'ELISA, ma gli antigeni (estrattivi, purificati o ricombinanti) sono adsorbiti su una sottile striscia di nitrocellulosa. Tale tecnica permette di identificare e fornire una stima semiquantitativa delle proteine precedentemente separate per elettroforesi (SDS-PAGE) e trasferite su membrana (Fig.9).

Il siero in esame opportunamente diluito viene incubato con la striscia che lega uno o più antigeni (gli eventuali anticorpi specifici presenti si legheranno ai rispettivi antigeni sulla membrana). Dopo i lavaggi che allontanano le proteine non legate, si aggiunge un anticorpo secondario anti-immunoglobuline coniugato ad un enzima. Dopo appropriata incubazione e successivi lavaggi per allontanare il reattivo che non ha reagito, si sviluppa la reazione con un substrato adatto.

Il peso molecolare dell'antigene proteico riconosciuto da ciascun anticorpo viene quindi determinato sulla base di proteine di riferimento a peso molecolare noto (Marker).

Per l'interpretazione dei risultati viene comparata la reattività di tutte le bande sulla striscia test del paziente con le corrispondenti bande presenti sulla striscia di controllo (cut-off). Il risultato è negativo se la reattività della banda in esame è minore od uguale al corrispondente cut-off, mentre il risultato è positivo se la reattività della banda in esame è maggiore del corrispondente cut-off.

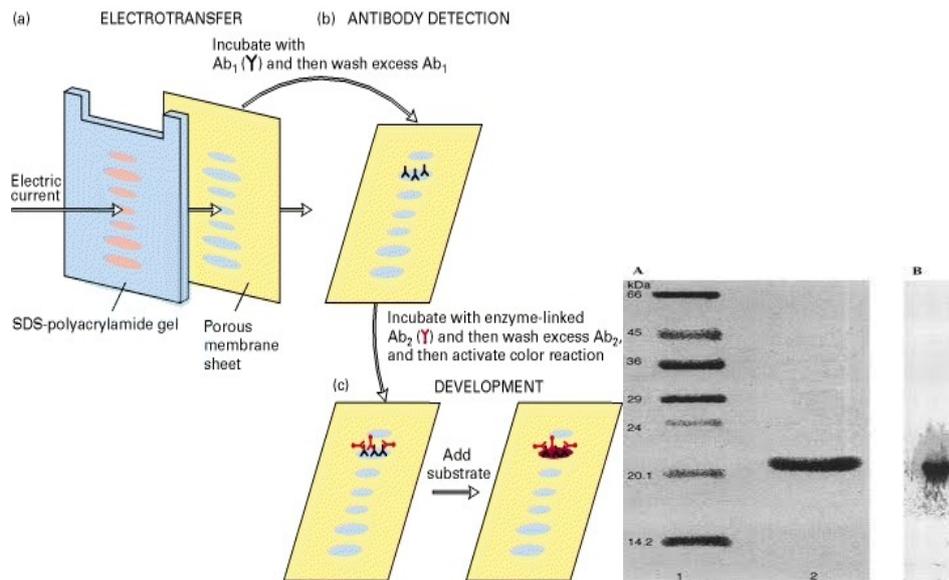


Figura 9-Immunoblotting.

Gli svantaggi del immunoblotting sono: a) sono disponibili test adeguati solo per alcuni autoantigeni, b) i risultati sono di tipo qualitativo, non sempre di univoca interpretazione da parte di operatori diversi, c) il costo del substrato è elevato. I vantaggi del immunoblotting sono: a) la possibilità di ottenere una risposta multi-parametrica, b) si tratta di un metodo semplice e facilmente automatizzabile, c) ha in genere una buona sensibilità e specificità.

3. SCOPO DELLA TESI

L' E.C. è una patologia cronica che colpisce sia l'uomo che gli animali e che pone dei seri problemi di sanità pubblica in ampie regioni del mondo, in particolare dove viene effettuato un' allevamento a carattere estensivo.

In Sardegna, nonostante le precedenti campagne di eradicazione abbiano notevolmente ridotto la pressione parassitaria, il problema persiste ed è tuttora considerata una regione ad alta endemia.

Poiché un pronto intervento riduce notevolmente il rischio di evoluzione sfavorevole nell'uomo, una diagnosi, non solo clinica ma anche basata su metodi immunologici, si rivela un fattore fondamentale.

La diagnosi dell' E.C. è basata sulla anamnesi, sull'indagine con metodiche di immagini (ecografia, TAC) e sulla determinazione sierologica delle IgG specifiche. Attualmente, i test diagnostici impiegano antigeni non purificati, o solo parzialmente purificati, ottenuti dal liquido cistico ovino.

Nonostante i grandi progressi tecnologici, l'esigenza di un miglioramento nella diagnosi sierologica è fortemente sentita sia per la presenza di soggetti "falsi negativi" (10-30%), pazienti con cisti molto giovani (stadio iniziale) o calcifiche (stadio finale) per le quali è necessaria un'elevata sensibilità, sia presenza di soggetti "falsi positivi" (20-40%), pazienti provenienti da zone geografiche con alta endemicità di altre elmintiasi per i quali è necessaria una elevata specificità delle tecniche utilizzate.

Un altro importante problema è rappresentato dalla mancanza di standardizzazione a livello internazionale delle tecniche e degli antigeni impiegati nei laboratori di analisi.

Nel presente lavoro è descritta l'applicazione di tecniche di analisi proteomica finalizzata alla caratterizzazione della frazione proteica e peptidica del liquido cistico.

Mediante tali tecniche sono state caratterizzate, nel liquido cistico di origine ovina, le principali proteine secrete dal parassita in grado di stimolare il sistema immunitario umano.

L'obiettivo di questo lavoro è stato purificare gli antigeni presenti nel liquido cistico da utilizzare nella messa a punto di metodiche diagnostiche, dotate di elevata specificità e sensibilità, in grado di fornire un ausilio diagnostico per i casi clinicamente difficili da valutare.

Infatti, volendo utilizzare un test sierologico di screening e/o di conferma per una corretta stima della diffusione di una infezione in una popolazione, non si può prescindere dal conoscere in modo dettagliato le caratteristiche intrinseche al test, quali i valori di sensibilità e specificità.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Prelievo degli organi e del liquido cistico

Per questa tesi, sono stati esaminati 1743 ovini di razza sarda regolarmente macellati in diversi mattatoi delle Province di Sassari e di Nuoro. Di tali animali abbiamo determinato la provenienza, l'età e la tipologia di allevamento. Su ogni organo, parassitato, sono stati rilevati il numero, la localizzazione e il tipo di idatidi secondo la seguente classificazione: fertili, acefalocisti, caseose e calcificate. Dalle cisti idatitiche è stato aspirato il liquido cistico, conservato a -20°C fino al momento dell'uso per la caratterizzazione e purificazione degli antigeni. Al fine di valutare la fertilità di tali formazioni, dopo l'aspirazione del liquido cistico, sono state prelevate le membrane proligere e i protoscolici (Fig.10). Di questi ultimi è stata valutata la vitalità attraverso l'esame a fresco al microscopio. Si è tenuto conto della conformazione, dei movimenti e dell'evidenziazione delle cellule a fiamma vibratili. Un'aliquota di liquido cistico e di membrane proligere è stata utilizzata per le indagini biomolecolari.



Figura 10-Prelievo liquido cistico e analisi protoscolici (esame microscopico a fresco).

4.2 Raccolta sieri umani

Un totale di 86 campioni di siero umano, 43 campioni provenienti da pazienti con Echinococcosi Cistica, clinicamente diagnosticata (ecografia), e 43 campioni provenienti da soggetti sani, sono stati raccolti presso il laboratorio del Centro Nazionale di Referenza per l' Echinococcosi (CeNRE) di Sassari. Tutti i campioni sono stati conservati a -20 °C prima dell'analisi.

I sieri dei pazienti con E.C. sono stati forniti dal Policlinico San Matteo di Pavia, mentre i sieri dei soggetti sani sono stati forniti dal Centro trasfusionale di Sassari.

I campioni di siero positivi sono stati prelevati da pazienti in età compresa tra 16 e 75 anni (23 maschi e 20 femmine):

33 pazienti avevano cisti epatiche (2 con cisti attive, 31 con cisti inattive); 2 pazienti avevano cisti polmonari (inattive); 2 pazienti avevano cisti nei reni (inattive); 1 paziente aveva una cisti peritoneale (inattiva) e 5 pazienti avevano cisti presenti in diversi organi (2 con cisti attive, 3 con cisti inattive).

Tredici pazienti avevano subito un intervento chirurgico per cisti da echinococco; 34 pazienti sono stati sotto terapia farmacologica negli anni precedenti al prelievo.

Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato.

4.3 Identificazione di *E. granulosus* mediante PCR

Il liquido cistico prelevato, una volta scongelato, è stato centrifugato a 6000 rpm per 20 minuti allo scopo di estrarre il DNA dai protoscolici.

Dal pellet così ottenuto (circa 25-50 mg per ogni campione) è stato estratto il DNA usando il kit commerciale Qiagen “DNeasy Blood & T issue kit”.

La fase di quantificazione ha consentito di valutare la resa dell'estrazione di DNA. Essa è stata effettuata mediante analisi spettrofotometrica (6505 UV/Vis Spectrophotometer JENWAY) considerando che: 1 O.D. (densità ottica) ($\lambda=260$ nm)= 50 μ g/ml di DNA. Le letture sono state effettuate dallo spettrofotometro a 260 nm e 280 nm, lunghezze d'onda alle quali lo strumento rileva, rispettivamente, gli acidi nucleici e le proteine presenti nella soluzione analizzata. E' stato valutato anche il rapporto O.D. 260/280 (che dovrebbe essere compreso tra 1,8 e 2,0), indice della purezza del campione.

Si è proceduto quindi all'amplificazione di un frammento del gene mitocondriale codificante per la NADH deidrogenasi, subunità 1(ND1), mediante PCR con i primers specifici per *E. granulosus* ND1-F: 5' -GGTTTGTTCAGAGGTTT-3' e ND2-R: 5' -TAATCAAATGGCCTACGAT-3' (Relazione finale della ricerca finalizzata 2003, Ministero della Salute).

Per l'amplificazione sono stati utilizzati 25 pmol di ogni primer in un volume finale di 100 μ l contenente 200 ng di DNA, 200 μ M di ciascun dNTP (Invitrogen), 1U di Taq Gold DNA polimerasi e 1x di PCR buffer con MgCl₂ (15mM) (tutti prodotti Applied Biosystems, Roche).

La reazione enzimatica è stata effettuata alle seguenti condizioni: una fase iniziale di denaturazione a 95°C per 5' per l'attivazione della Taq Gold, seguita da 40 cicli di amplificazione a 95°C per 20'' (denaturazione), 50°C per 60'' (annealing), 72°C per 60'' (estensione) e una fase finale di estensione a 72°C per 10' per la stabilizzazione dei prodotti di PCR.

I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati su gel di agarosio al 1,5%, usando come tampone il TAE 1x ed applicando un voltaggio di 90 V costanti per circa 1 h. Gli amplificati, colorati con SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen), sono stati visualizzati con lampada a raggi UV e fotografati. Il peso molecolare del frammento amplificato, 464 bp, è stato stimato per confronto con il ladder 100bp (Roche).

4.4 Caratterizzazione biomolecolare di *E. granulosus* mediante RFLP

la tecnica dell'RFLP (Restriction Fragments Length Polimorphisms) è una metodica biomolecolare che permette di frammentare regioni di DNA genomico (gDNA) o DNA ribosomiale (rDNA), precedentemente amplificate con la reazione di PCR, utilizzando delle apposite endonucleasi di restrizione, enzimi che riconoscono sequenze specifiche di DNA di ~4-6 bp a livello delle quali operano un taglio che frammenta il DNA di partenza in un numero di frammenti noto.

L'amplicone ottenuto con i primers per il gene ND1 viene digerito con le endonucleasi AluI, CfoI, RsaI, Sau3AI e TaqI per 2-10 ore e alla temperatura

indicata (adattato da Bowles and McManus, 1992). I polimorfismi di restrizione vengono analizzati in un gel di agarosio al 3% in TAE 1x .

Per la digestione sono stati utilizzati 10 U di ogni enzima tranne Sau3AI (3-5 U), 15 µl di amplificato e 1x di buffer con con MgCl₂ specifico per ogni enzima (Roche) in un volume finale di 30 µl. I pesi molecolari dei frammenti sono stati stimati per confronto con il ladder 100bp (Roche).

4.5 Analisi degli antigeni del liquido cistico

SDS-PAGE

I campioni di liquido cistico, una volta scongelati, sono stati centrifugati per 20 min a 12000g a 4°C. I surnatanti sono stati poi desalificati e concentrati per ultrafiltrazione mediante membrane Microcon (Millipore) con un cut off di 10 kDa.

A ciascun campione è stato aggiunto un opportuno volume di tampone di caricamento (Laemmli buffer) con o senza Ditiotreitolo (DTT) 400mM. La soluzione, dopo incubazione a 95°C per 5 minuti, è stata sottoposta ad analisi elettroforetica SDS-PAGE su un gel in gradiente 4-15% di acrilammide, usando il sistema Mini-Protean fornito dalla Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

La corsa elettroforetica è stata effettuata a 50-80 V finché il campione non è passato dallo *stacking* al *running gel*, quindi il voltaggio è stato aumentato a 100-150 V fino a fine corsa. Il gel è stato colorato con Blue Coomassie Colloidale.

Western-Immunoblotting

Le proteine separate in SDS-PAGE sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa mediante applicazione di un campo elettrico costante di 250 mA per 1 ora, in *Transfer Buffer* (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% Metanolo).

Dopo il trasferimento la membrana è stata colorata con rosso Ponceau per pochi secondi e decolorata con acqua mQ finché il fondo non è tornato bianco; successivamente è stata incubata per 2 ore a temperatura ambiente in *blocking solution* (5% skim milk in PBS-Tween) sotto una leggera agitazione.

Le membrane sono state incubate con l'anticorpo primario opportunamente diluito (siero diluito 1/200 in 2% skim milk in PBS-Tween) per 1ora. Dopo i lavaggi (5 volte per 3 min con un adeguato volume di PBS-T in rapida agitazione) si è condotta l'incubazione con l'anticorpo secondario (anti human IgG coniugato alla perossidasi di rafano) per 45 minuti (1:500000 in 2% skim milk in PBS-Tween).

Gli anticorpi secondari sono coniugati con l'enzima perossidasi di rafano la cui rivelazione si ha dopo incubazione con un adeguato volume (circa 3 ml per membrana, 2 ml di Reaction buffer e 1 ml di Reagent) del substrato chemiluminescente (Sigma) per 5 minuti.

In presenza di perossido di idrogeno l'enzima ossida il luminolo, il substrato chemiluminescente, con la concomitante produzione di luce. La luce emessa è rilevata esponendo la membrana ad una lastra autoradiografica.

Cromatografia ad esclusione molecolare

Per la desalificazione di grandi volumi (ca 40mL) di liquido cistico è stata utilizzata la colonna HiPrep26/10 Desalting.

Gli esperimenti di cromatografia ad esclusione molecolare sono stati condotti su un sistema AKTA Explorer 10 (GE Healthcare) (Fig.11). La colonna utilizzata è la Superdex 200, 10/300 GL, 24 ml di volume, equilibrata in tampone sodio fosfato 50mM, NaCl 150mM pH 7,4. La velocità di flusso a cui è stata condotta la cromatografia è di 1 ml/min.

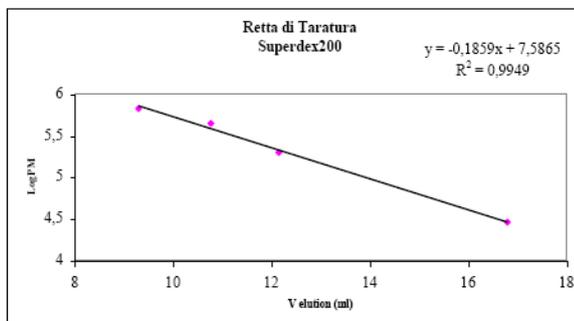


Figura 11- AKTA Explorer 10 (GE Healthcare).

Il liquido cistico (aliquote da 5mL per ciascuna corsa cromatografica), dopo desalificazione e liofilizzazione, è stato solubilizzato in 500 μ l di tampone di corsa e quindi filtrato a 8000 rpm (Ultrafree-MC Centrifugal Filter Units, PVDF 0.22 μ m, Millipore). Allo scopo di correlare i volumi di eluizione con i logaritmi delle masse molecolari è stata realizzata una retta di taratura costruita effettuando gli esperimenti nelle medesime condizioni, con proteine standard, in un ampio *range* di peso molecolare.

La retta ottenuta è riportata in basso.

Standard	V elution (ml)	PM (kDa)
Thyroglobulin	9,3	669
Apoferitin	10,77	443
B-Amylase	12,15	200
BSA	14,25	67
Carbonic Anhydrase	16,8	29



Identificazione proteica mediante spettrometria di massa

Un'aliquota delle frazioni proteiche raccolte da cromatografia è stata sottoposta ad idrolisi con tripsina, incubando il campione in un rapporto 1/50 (E/S, W/W), 37°C, O.N.; le miscele peptidiche generate sono state analizzate mediante XCT Ultra 6340 ion trap equipaggiato con un sistema HPLC HP1200 (Agilent Technologies).

I campioni, dopo caricamento, sono stati concentrati e desalificati su una colonna di arricchimento da 40 nl con acido formico allo 0,2% alla velocità di flusso di 4µl/min. I peptidi sono stati poi frazionati su una colonna a fase inversa C₁₈ (75 µm x 43 mm, Agilent Technologies) ad una velocità di flusso di 300 nl/min, utilizzando un gradiente lineare di eluente B (0,2% acido formico in acetonitrile al 95%) in A (0,2% acido formico in 2% acetonitrile) dal 3 al 60% in 20 minuti.

La velocità di scansione dello spettrometro di massa è stata impostata su 8100 uma/sec per la scansione MS e 26000 uma/sec per quella MS/MS. Il cromatogramma ottenuto è stato generato dagli spettri di massa, acquisiti in un intervallo compreso tra

250 e 2200 m/z, integrato con gli spettri MS/MS generati dalla frammentazione (in un intervallo compreso tra 100 e 2200 m/z) dei 3 ioni più intensi registrati dal *detector* nella fase precedente.

Gli spettri di MS e quelli di MS/MS generati dalla frammentazione sono stati analizzati utilizzando il software *Data Analysis* (6300 Series Ion Trap LCMS), fornito da Agilent. Il software ha generato una lista di picchi che è stata sottoposta all'analisi di Mascot Daemon MS/MS (versione 2.3, Matrix Science, Boston, MA), un software di ricerca per l'identificazione delle proteine.

4.6 ELISA “Home made”

I test sono stati condotti utilizzando come antigene la proteina Ag 5 purificata. Dapprima è stato fatto avvenire il *coating* della proteina in una micropiastra pretrattata per ELISA (Nunc-Immunoplate MaxiSorp). A tale scopo, 100 µl di una soluzione di antigene ad una concentrazione di 1 µg/ml in PBS sono stati depositati in ciascun pozzetto; la piastra è stata quindi incubata a 37° C in stufa fino alla completa asciugatura.

Dopo un lavaggio con PBS-Tween 0,05% (PBS-T), sono stati bloccati i siti aspecifici dei pozzetti depositando 250 µl di PBS-T/5% BSA per pozzetto ed incubando per 1 ora a 37°C. Successivamente è stata eliminata la soluzione di lavaggio ed aggiunti 100 µl di ciascun siero diluito 1:500 in PBS-T con BSA 2%. La piastra è stata quindi incubata a 37°C per 1 ora e lavata poi 5 volte con PBS-T. E' stato poi aggiunto l'anticorpo secondario (anti human IgG coniugato alla

perossidasi di rafano) diluito 1:100000 in PBS-T con BSA 2% ed incubato a 37°C per 1 ora.

Infine, dopo ulteriori lavaggi, è stato aggiunto a ciascun pozzetto il substrato (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine Liquid Substrate, Supersensitive, Sigma) (Fig.12). E' stato fatto avvenire lo sviluppo al buio, a temperatura ambiente, leggendo l'assorbanza a 620 nm in corrispondenza di 15', 30' e 1 ora di incubazione.

Al fine di ottenere una buona riproducibilità delle letture, tutti i sieri sono stati analizzati in duplicato; inoltre, per eliminare eventuali contributi aspecifici, per ciascuna piastra un pozzetto sensibilizzato è stato incubato direttamente con l'anticorpo secondario ed un altro solo con il substrato. I corrispondenti valori di assorbanza, mediati, sono stati sottratti alle misure dei campioni.

Il calcolo della soglia per la determinazione della positività all'echinococcosi è stato effettuato mediando i valori di assorbanza dei controlli negativi e sommando a tale media il doppio della deviazione standard tra le singole letture dei controlli negativi. I valori di assorbanza rientranti nel range definito dalla soglia $\pm 10\%$ della soglia stessa sono stati considerati dubbi.

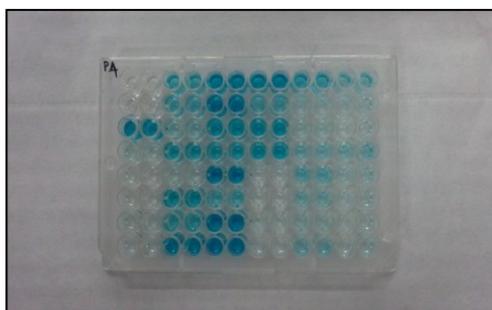


Figura 12-Micropiastra Elisa (Nunc-Immunoplate MaxiSorp).

4.7 Calcolo dei parametri diagnostici del test ELISA “Home made”

In base all’approccio suggerito dall’OIE (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2009) per il calcolo dei parametri diagnostici si è messo a confronto lo stato clinico dei soggetti esaminati (presenza o assenza di cisti) con i risultati del test di laboratorio.

Sono stati valutati la sensibilità e specificità diagnostica, il valore predittivo positivo e negativo (indici della probabilità che il soggetto sia realmente affetto dalla malattia oppure no).

I risultati sono stati riportati su una tabella di contingenza 2 X 2 :

		Casi clinici		
		Anamnesi Positiva	Anamnesi Negativa	
Risultato del test	Positivo	A (VP)	B (FP)	A + B (VP+FP)
	Negativo	C (FN)	D (VN)	C + D (FN+VN)
		A + C (VP+FN)	B + D (FP+VN)	A+B+C+D

Si è proceduto al calcolo di Sensibilità e Specificità secondo le relazioni seguenti:

$$\text{Sensibilità} = (\text{VP} / \text{VP} + \text{FN}) \times 100$$

$$\text{Specificità} = (\text{VN} / \text{VN} + \text{FP}) \times 100$$

Sono stati valutati gli intervalli di confidenza in base alla formula:

$$\text{CI (at 95 \%)} \approx p \pm 2 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}} \text{ with } n = N, N_+, N_- \text{ respectively for } p \text{ (in \%)} = \text{AC, SE, SP,}$$

CI sensibilità

$$\pm 2 \sqrt{\frac{SE \cdot SE}{N_+}}$$

dove N+ indica il numero dei soggetti con presenza di cisti, nel nostro caso A + C;

CI specificita'

$$\pm 2 \sqrt{\frac{SP \cdot SP}{N_-}}$$

dove N- indica il numero dei soggetti con assenza di cisti, nel nostro caso B + D;

Si è proceduto al calcolo del Valore Preditivo Positivo e del Valore Preditivo Negativo secondo le relazioni seguenti:

$$\text{VPP (valore predittivo positivo)} = \text{VP} / \text{VP} + \text{FP} \times 100$$

$$\text{VPN (valore predittivo negativo)} = \text{VN} / \text{FN} + \text{VN} \times 100$$

4.8 Calcolo del coefficiente di correlazione di Pearson tra Elisa “Home made” e due kit del commercio.

Sono stati utilizzati i kit Echinococcus IgG ELISA (DRG Diagnostics Germany) e Anti-Echinococcus granulosus ELISA IgG (Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG) per la determinazione qualitativa di anticorpi umani di classe IgG diretti contro *E. granulosus* nel siero. I kit che abbiamo utilizzato si basano sulla cosiddetta metodica ELISA “non competitiva indiretta”; essa prevede l’utilizzo di antigeni di *E. granulosus* ancorati ad una fase solida (micropiastra in polistirene da 96 pozzetti).

I saggi sono stati eseguiti in accordo con le procedure standard suggerite dai produttori dei kit.

-Echinococcus IgG ELISA (DRG Diagnostics, Germany):

Sono stati aggiunti 100 µl di ciascun siero diluito 1:100 in *Sample diluent*. La piastra è stata quindi incubata a 37°C per 1 ora e lavata poi 5 volte con *Wash solution*. Sono stati aggiunti 100 µl di *Enzime conjugate* (anti human IgG coniugato alla perossidasi di rafano, pronto all’uso) in ogni pozzetto e la piastra è stata incubata a temperatura ambiente per 30 minuti.

Dopo ulteriori lavaggi, sono stati aggiunti 100 µl di substrato (Tetramethylbenzidine) a ciascun pozzetto. E’ stato fatto avvenire lo sviluppo al buio, a temperatura ambiente, dopo 15 minuti di incubazione. La reazione è stata fermata con 100 µl di *Stop solution* ed è stata letta l’assorbanza a 450 nm.

Il calcolo della soglia per la determinazione della positività:

OD campione $> 1,1 \cdot CO$ (Cut Off), positivo; $0,9 \cdot CO \leq OD \text{ campione} \leq 1,1 \cdot CO$, dubbio; $OD_{\text{campione}} < 0,9 \cdot CO$, negativo.

-Anti-Echinococcus granulosus ELISA IgG (Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG):

Sono stati aggiunti 100 μl di ciascun siero diluito 1:100 in *Tampone di diluizione*.

La piastra è stata quindi incubata a temperatura ambiente per 30 minuti e lavata poi 3 volte con *Tampone di lavaggio*. Sono stati aggiunti 100 μl di *Coniugato enzimatico* (anti human IgG coniugato alla perossidasi di rafano, pronto all'uso) in ogni pozzetto e la piastra è stata incubata a temperatura ambiente per 30 minuti.

Dopo ulteriori lavaggi, sono stati aggiunti 100 μl di substrato (Tetramethylbenzidine) a ciascun pozzetto. È stato fatto avvenire lo sviluppo al buio, a temperatura ambiente, dopo 15 minuti di incubazione. La reazione è stata fermata con 100 μl di *Soluzione di arresto* ed è stata letta l'assorbanza a 450 nm.

Il calcolo della soglia per la determinazione della positività:

$OD_{\text{campione}} \text{ (o } OD_{\text{controllo}}) / OD_{\text{calibratore}} = \text{Ratio}$

Ratio $< 0,80$ negativo; $0,80 \leq \text{Ratio} < 1,1$, dubbio; Ratio $\geq 1,1$, positivo

Al fine di ottenere una buona riproducibilità delle letture, tutti i sieri sono stati analizzati in duplicato ed i corrispondenti valori di assorbanza sono stati mediati.

I risultati tra i tre test sono stati correlati mediante il calcolo del *coefficiente prodotto-momento di Pearson* (r) al fine di valutare l'indice di concordanza; l'intervallo di valori che r può assumere varia da -1, per una correlazione negativa perfetta, a +1 per una correlazione positiva perfetta; il punto intermedio di questo intervallo, tale per cui r è uguale a 0, sottende una totale assenza di correlazione.

Sono state stabilite delle soglie per interpretare l'intensità della relazione:

<i>Valore di r</i>	<i>Correlazione</i>	<i>Relazione</i>
<i>0.00-0.20</i>	<i>Piccola</i>	<i>Molto poco intensa, quasi inesistente</i>
<i>0.20-0.40</i>	<i>Bassa</i>	<i>Piccola, appena appena apprezzabile</i>
<i>0.40-0.60</i>	<i>Regolare</i>	<i>Considerevole</i>
<i>0.60-0.80</i>	<i>Alta</i>	<i>Intensa</i>
<i>0.80-1.00</i>	<i>Molto alta</i>	<i>Molto intensa</i>

La correlazione calcolata è risultata statisticamente significativa con $P < 0.01$.

I dati sono stati ottenuti mediante l' utilizzo del software statistico SPSS 11 (Giorgetti e Massaro, 2007).

5. RISULTATI

5.1 Identificazione di *E.granulosus* dal liquido cistico mediante PCR e caratterizzazione biomolecolare mediante RFLP

La coppia di primers ND1-F e ND2-R usata per la PCR ha amplificato una regione di circa 464 bp (gene ND1) per tutti i campioni di liquido cistico ovino analizzati, specifica per *E. granulosus* (Fig.13A).

L'amplicone ottenuto con i primers per il gene ND1, digerito con le endonucleasi AluI, CfoI, RsaI, Sau3AI e TaqI ha evidenziato il pattern tipico del genotipo G1 (Fig.13B).

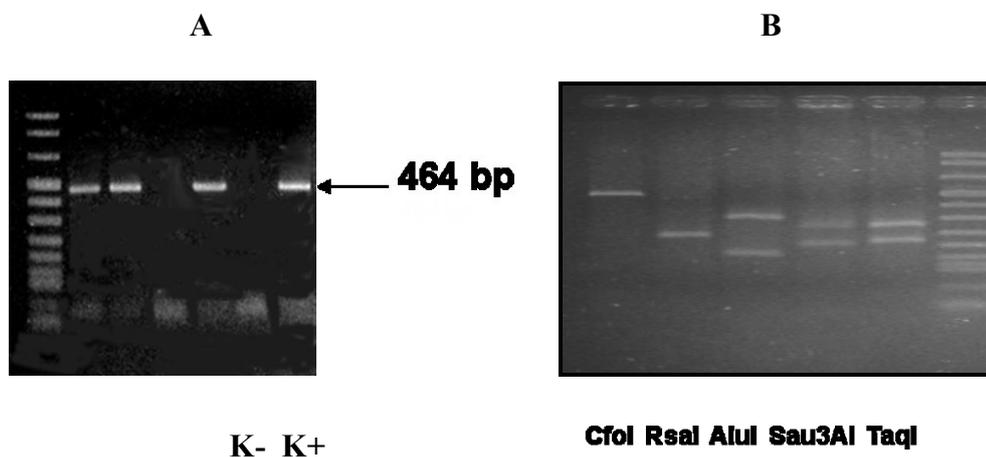


Figura 13-Amplificazione e digestione enzimatica del gene ND1 (NADH deidrogenasi mitocondriale, subunità 1)

5.2 Analisi antigeni liquido cistico

Il liquido cistico prelevato dal fegato e dal polmone di diverse pecore, è stato centrifugato per eliminare i protoscolici, desalificato e concentrato. L'analisi mediante SDS-PAGE ha evidenziato la presenza di circa 12 proteine di peso molecolare variabile approssimativamente da 5 a 120 kDa, con un elevato contenuto di proteine sieriche (Albumina, Transferrina, Immunoglobuline). Il liquido ha mostrato inoltre una composizione fortemente eterogenea che varia da cisti a cisti (Fig.14).

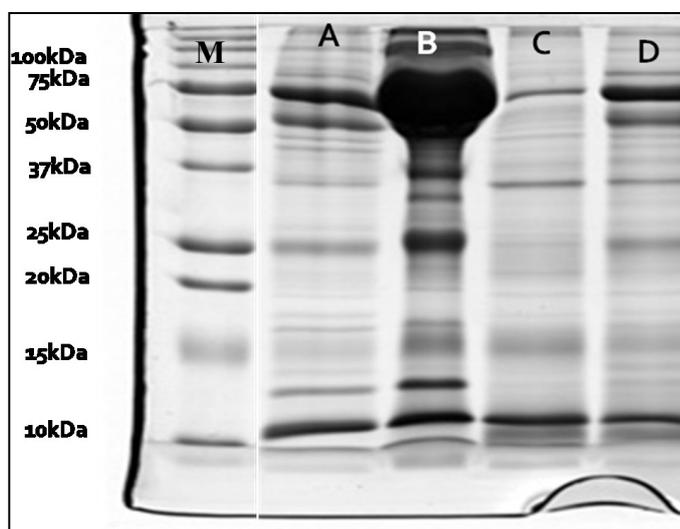


Figura 14 – Caratterizzazione delle proteine totali del liquido cistico. Lines **A** e **C**, corsa elettroforetica su gel SDS-PAGE delle proteine totali del liquido cistico proveniente dal fegato di ovini infestati; lines **B** e **D** liquido cistico proveniente dal polmone. line **M** , Marker (gel colorato con coomassie colloidale).

L'analisi mediante Western-Immunoblotting (Fig. 15) delle proteine totali del liquido cistico incubato con i sieri di un paziente con cisti epatica e di un soggetto sano, in condizioni riducenti e non, ha evidenziato una serie di bande riconosciute esclusivamente dal siero del paziente positivo.

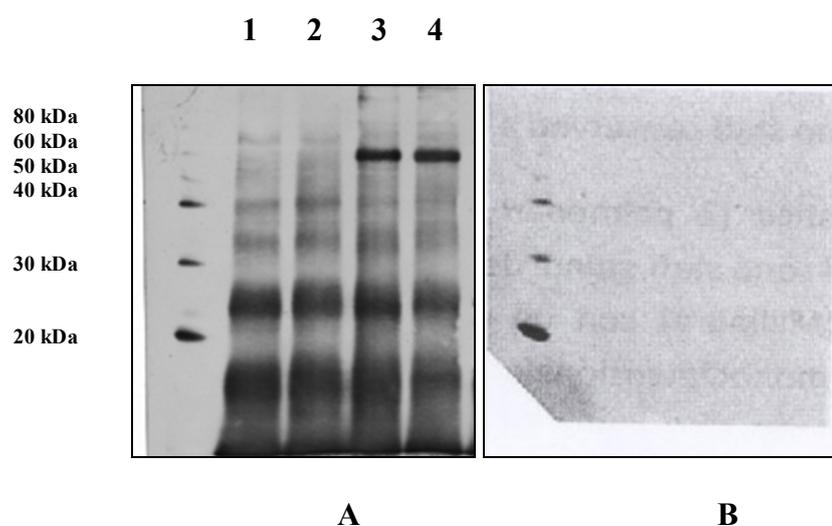


Figura 15- Determinazione dell'antigenicità delle proteine totali del liquido cistico in WB mediante l'utilizzo di un siero di un paziente con formazioni cistiche epatiche (A) e di un siero negativo (B).

Si nota in particolare la presenza in modo marcato di segnali positivi a pesi molecolari inferiori a 30 kDa, sia in condizioni riducenti (lines 1 e 2) che in condizioni non riducenti (lines 3 e 4), e la presenza di segnali positivi a circa 60 kDa solo in condizioni non riducenti.

Al fine di stabilire quali proteine fossero riconosciute dal siero, un certo numero di bande sono state escisse dal gel SDS-PAGE e digerite con tripsina (Fig.16). I frammenti ottenuti sono stati analizzate attraverso spettrometria di massa (HPLC chip Ion/Trap).

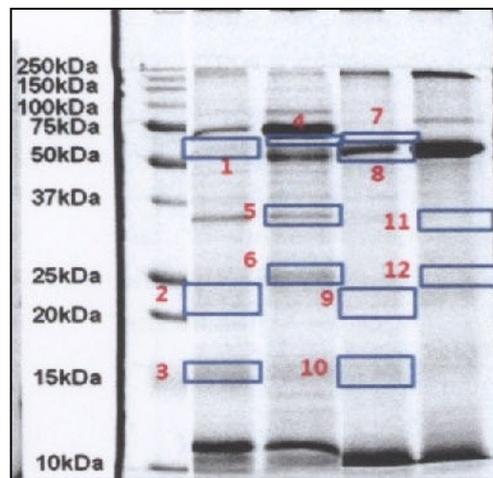


Figura 16- SDS-PAGE delle proteine totali del liquido cistico (i rettangoli indicano la posizione delle bande escisse).

Nelle tabelle sottostanti sono elencati i peptidi identificati mediante MS/MS (sono omesse tutte le proteine ovine) (Tab.2 e 3).

BANDA	IDENT.	MW(Da)	Cod NCBI	N° peptidi	SCORE
1 (60 kDa) Red	Putative glucose-P- isomerase	61459	62178020	7	266
	Ag5 precursor	55729	27651943	2	125
2 (22 kDa) Red	AgB/Sub 4	9436	34550886	1	93
	Ag5 precursor (C-Term)	55729	27651943	2	72
3 (15 kDa) Red	AgB/Sub 4	9392	34551020	4	261
	Ag5 precursor (N-Term)	55729	27651943	5	204
4 (62 kDa) Red	Putative glucose-P- isomerase	61549	62178020	5	209
	Ag5 precursor	55729	27651943	2	94
5 (37 kDa) Red	Ag5 precursor (C-Term)	55729	27651943	2	166
6 (26 kDa) Red	Ag5 precursor (C-Term)	55729	27651943	1	123
	Glutathione S- transferase	25936	21591409	1	61

Tabella 2-Identificazione delle proteine separate mediante SDS-PAGE (condizioni riducenti).

BANDA	IDENT.	MW(Da)	Cod NCBI	N° peptidi	SCORE
7 (75 kDa) No Red	Putative glucose-P- isomerase	61459	62178020	4	119
	Ag5 precursor	55729	27651943	5	198
8 (60 kDa) No Red	Putative glucose-P- isomerase	61459	62178020	3	65
	Ag5 precursor	55729	27651943	14	553
9 (22 kDa) No Red	AgB/Sub 4	9436	3455886	2	118
10 (15 kDa) No Red	AgB/Sub 4	9392	34551020	4	231
	AgB/Sub 1	8851	58465075	2	76
11 (37 kDa) No Red	Ag5 precursor (C-Term)	55729	27651943	2	93
	Tropomyosin B	25782	168071448	1	92
	Putative Malate dehydrogenase	36970	62178022	2	75
12 (26 kDa) No Red	AgB/Sub 4	9436	3455886	2	121

Tabella 3-Identificazione delle proteine separate mediante SDS-PAGE (condizioni non riducenti)

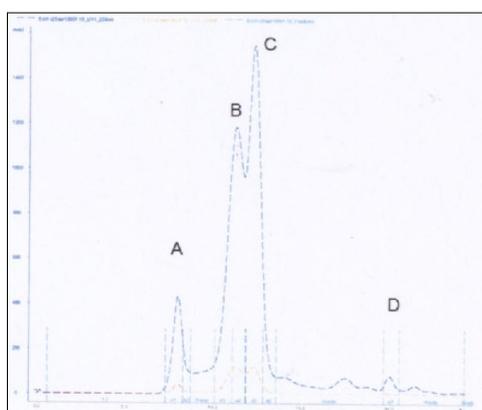
Dalle tabelle si deduce che le bande positive al Western-immunoblotting corrispondono principalmente ad Ag5 precursor, una proteina da 60 kDa ed AgB, un multimero di subunità da 8 kDa.

Entrambe le proteine sono riportate in letteratura come i principali antigeni di *E. granulosus*, in particolare risulta che Ag5 precursor sia caratterizzato da un sequenza di 484 aa, che, a seguito di cleavage post-traduzionale e di riduzione dei ponti disolfuro, dissocia in una porzione N-terminale (22 kDa) ed una C-terminale

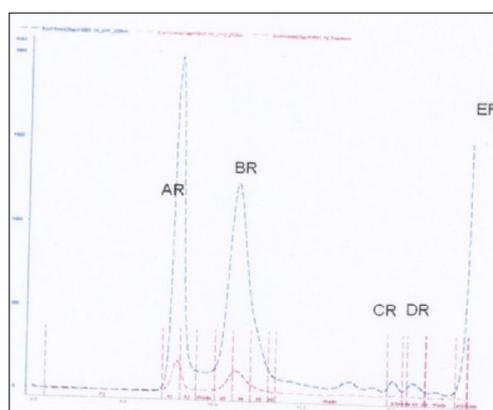
(38 kDa), considerata responsabile delle proprietà immunogene.

La discordanza osservata è relativa alla composizione della subunità da 22 kDa: le banche dati proteiche la associano alla sequenza 22-186, mentre la copertura di segnale ottenuta su Ag5 identificato nella banda 2 (22 kDa) riguarda la porzione C-terminale (peptidi 221-236 e 322-340).

Le indagini sono quindi proseguite mediante approcci di cromatografia ad esclusione molecolare, allo scopo di frazionare il liquido cistico e di valutare la risposta sierica verso sottogruppi di proteine. E' stata utilizzata una colonna Superose 12, con una capacità risolutiva tra 1 e 300 kDa. Il liquido cistico selezionato è stato preparato con aggiunta o meno di riducente (DTT), i cromatogrammi ottenuti sono riportati in basso:



Esperimento in condizioni non riducenti



Esperimento in condizioni riducenti

Le frazioni A, B, C ed E (esperimento in condizioni non riducenti) e AR, BR, DR ed ER (esperimento in condizioni riducenti) sono state raccolte ed un' aliquota sottoposta ad idrolisi con tripsina. I digeriti sono stati analizzati mediante MS. I risultati delle identificazioni sono riportati in tabella 4.

FR	IDENTIFICAZIONE	MW (Da)	Cod NCBI	N° pep	Score pep	SPECIE
A	Actin	41779	6626	2	129	[Caenorhabditis elegans]
	Alpha-2-macroglobulin	167470	157954061	1	44	[Bos taurus]
	Fibronectin	262263	255003702	2	88	[Bos taurus]
	Apolipoprotein A-IV precursor	42991	82697389	2	75	[Bos taurus]
	Immunoglobulin mu chain	53512	165945	2	65	[Ovis aries]
B	Ceruloplasmin precursor	119050	57619174	4	229	[Ovis aries]
	Complement component 3	187175	83764016	3	142	[Bos taurus]
	Putative calreticulin	42199	62178026	2	79	[Echinococcus granulosus]
	Immunoglobulin light chain	11073	5802448	2	69	[Ovis aries]
	Immunoglobulin heavy chain	50593	108750	1	30	[Bos taurus]
	Fructose-bisphosphate aldolase	39702	29336561	1	24	Echinococcus multilocularis
C	albumin precursor	69143	57164373	5	200	[Ovis aries]
AR	albumin precursor	69143	57164373	20	647	[Ovis aries]
	Ag5 precursor	54817	27651943	4	201	[Echinococcus granulosus]
	Type 1 actin	40497	404407	4	166	[Emiliana huxleyi]
	Hemoglobin subunit beta	16063	122686	5	162	[Ovis aries]
	Serotransferrin precursor	77689	114326282	4	124	[Bos taurus]
	vitamin D-binding protein	53307	78369364	2	102	[Bos taurus]
	gamma fibrinogen	8743	1916272	2	89	[Ovis dalli]
BR	albumin precursor	69143	57164373	4	191	[Ovis aries]
	Alpha-2-macroglobulin	167470	157954061	3	137	[Bos taurus]
	Ig heavy chain	33757	109029	3	102	[Ovis aries]
	alpha-2-HS-glycoprotein	38655	57526674	2	80	[Ovis aries]
	Actin 2	41600	3746938	2	58	[Anemia phyllitidis]

Tabella 4-Identificazione delle proteine separate mediante Gel-filtrazione.

Le altre frazioni analizzate non hanno restituito alcuna identificazione.

Le otto frazioni sono state analizzate in SDS-PAGE con e senza DTT, trasferite su due membrane di nitrocellulosa ed incubate con un siero di un paziente positivo per cisti epatica e con un siero di un paziente positivo per cisti polmonare (Fig.17).

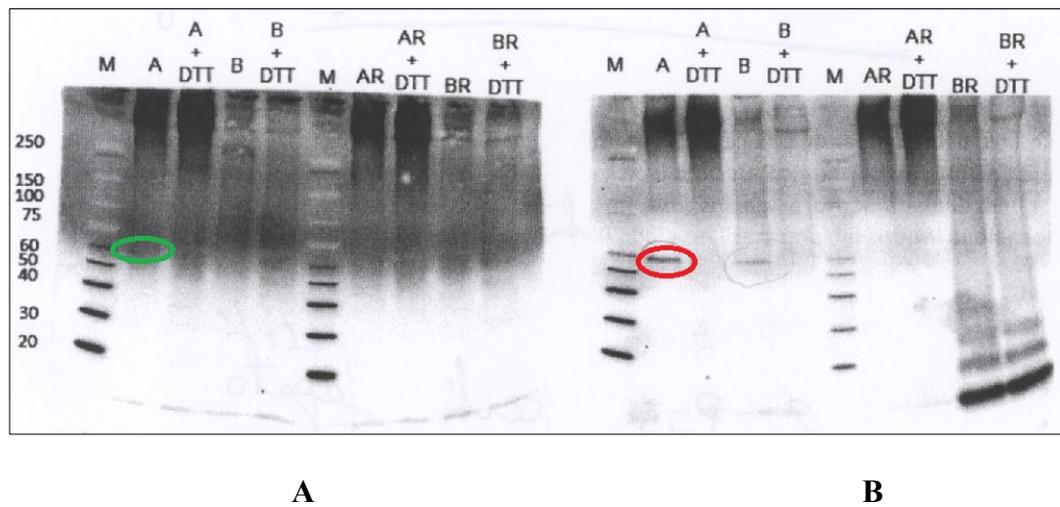


Figura 17-Immunoblotting delle frazioni separate mediante Gel filtrazione:
A-siero paziente con cisti polmonare; B-siero paziente con cisti epatica

La frazione A contiene Ag5 (banda positiva a 60 kDa), la risposta dei sieri è positiva anche verso bande di peso molecolare superiore a 250 kDa.

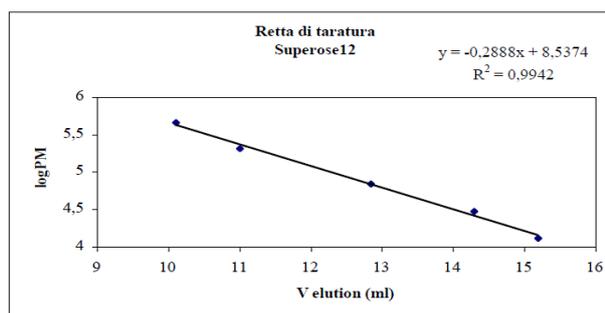
La frazione AR, che nelle analisi in MS mostrava contenere Ag5, continua a non evidenziare la banda positiva a 60 kDa, ma solo specie ad alto peso molecolare.

La frazione B, ricca di albumina ed immunoglobuline, genera anche essa una banda positiva a 60 kDa mentre frazione BR conferma il pattern tipico dell' AgB.

Da questi esperimenti si evidenzia in oltre la presenza di Ag5 e AgB in frazioni ad alto peso molecolare da gel filtrazione su Superose 12.

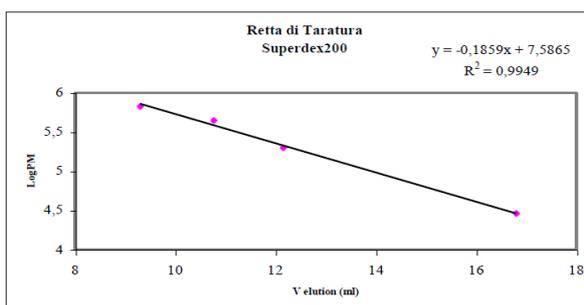
Data la discordanza rispetto ai pesi molecolari delle due specie in questione, si ipotizza una loro oligomerizzazione. Per dedurre il peso molecolare delle componenti dal loro volume di eluizione, è stata costruita una retta di taratura mediante l'utilizzo di proteine standard. La retta ottenuta è riportata in basso.

Standard	V elution (ml)	PM (kDa)
Apoferritin	10,12	443
B-Amylase	11,02	200
BSA	12,86	67
Carbonic Anhydrase	14,31	29
Cytochrome c	15,21	12,7



Dalla retta si deduce che la frazione A, con Vol di eluizione 8.05mL (cromatogramma “Fegato Onani – Superose 12” di seguito riportato), che rivelava contenere l’Ag5, corrisponderebbe ad un peso molecolare di circa 1600 kDa. C’è da sottolineare, però, che la linearità della retta, su questa colonna, si ha tra 1 e 300 kDa e che la frazione A coincide con il volume escluso della colonna. Si è reso pertanto necessario utilizzare una colonna con un maggior potere risolutivo ad alti pesi molecolari. E’ stata quindi selezionata la Superdex 200, che separa proteine tra 10 e 600 kDa. Anche in questo caso è stata costruita una retta di taratura mediante l’utilizzo di proteine standard. La retta ottenuta è riportata in basso.

Standard	V elution (ml)	PM (kDa)
Thyroglobulin	9,3	669
Apoferritin	10,77	443
B-Amylase	12,15	200
BSA	14,25	67
Carbonic Anhydrase	16,8	29



Salvatore Ledda

L’Echinococcosi Cistica nell’uomo: allestimento di kit da utilizzare nella diagnosi sierologia.

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Indirizzo Microbiologia Molecolare e Clinica
 Università degli Studi di Sassari

Le successive indagini sono state condotte pertanto su questa colonna, analizzando campioni di liquido cistico, aspirati da cisti polmonari e da cisti epatiche. Nelle corse cromatografiche i campioni di liquido cistico sono stati precedentemente desalificati e concentrati per ultrafiltrazione.

Alcuni dei cromatogrammi ottenuti sulla Superdex 200 ed il confronto con quello da Superose 12 sono riportati in figura 18.

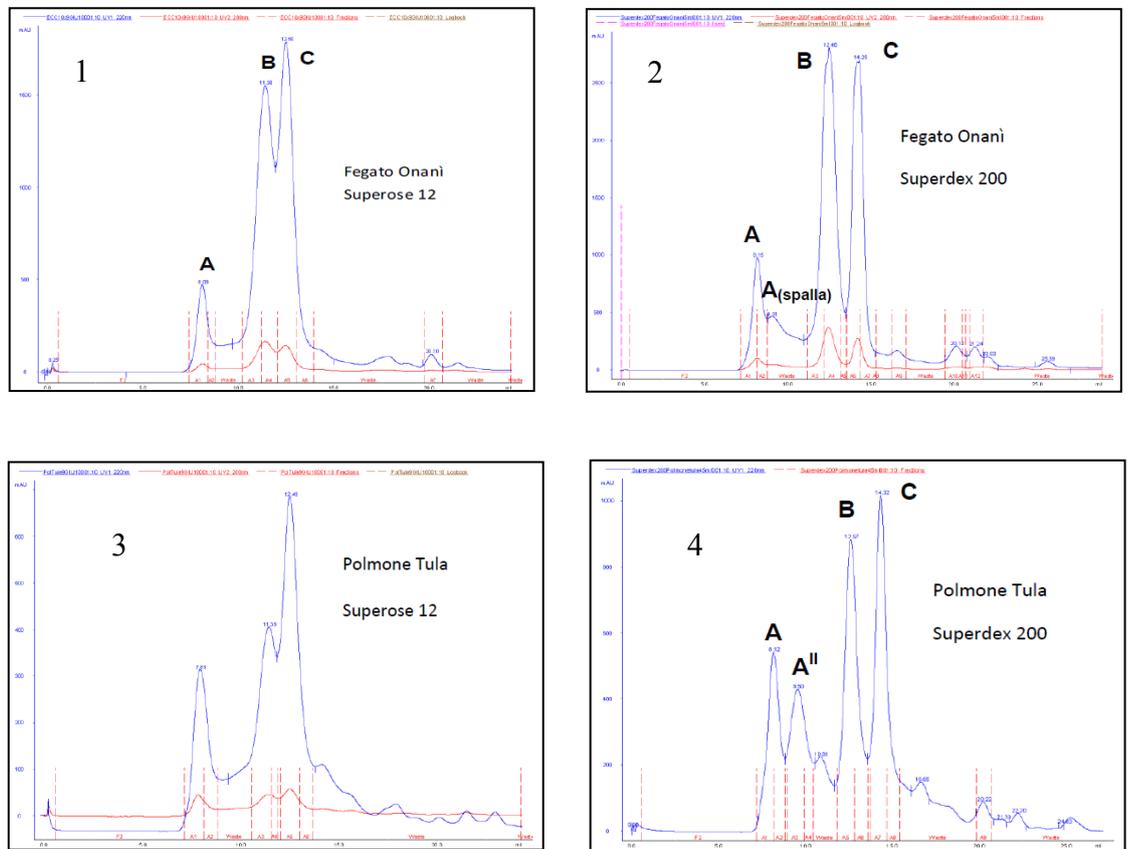


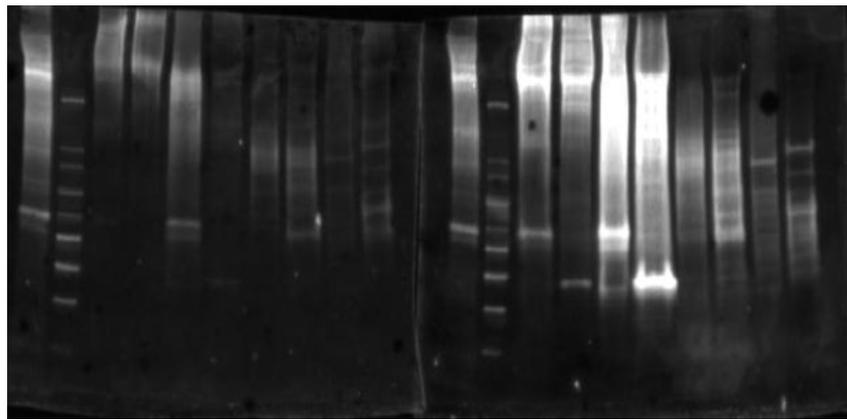
Figura 18-Cromatogrammi Superose 12 (1 e 3) e Superdex 200 (2 e 4)

Come si può notare, con l'utilizzo della Superdex 200, si evince la separazione di una "spalla" del picco A ed una maggiore risoluzione tra B e C.

Nei cromatogrammi precedentemente mostrati sono indicate le frazioni principali raccolte, le quali sono state desalificate e separate mediante SDS-PAGE, in condizioni riducenti e non. Dopo trasferimento su nitrocellulosa le membrane sono state incubate con il siero umano di due soggetti positivi uno per cisti polmonare inattiva (1) e uno per cisti epatica attiva (2). Le immagini delle due membrane dopo sviluppo sono riportate di seguito:

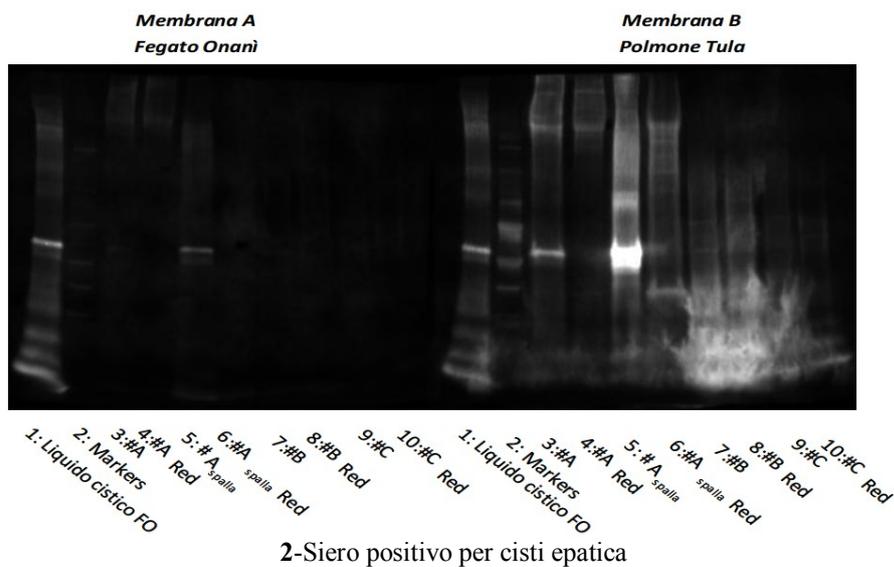
Membrana A
Fegato Onani

Membrana B
Polmone Tula



1: Liquido cistico FO
2: Markers
3: #A
4: #A Red
5: #A Red
6: #A spalla
7: #B Red
8: #B Red
9: #C Red
10: #C Red

1-Siero positivo per cisti polmonare



Dalle immagini si possono trarre una serie di conclusioni:

l'Ag5 è prevalentemente contenuto nella frazione indicata con "A_{spalla}"; la sua riduzione comporta la comparsa di una banda positiva a 38 kDa, tale banda è però riconosciuta solo molto debolmente nel campione Fegato Onani e comunque, in entrambi i campioni in maniera molto meno significativa dal siero 1; l'Ag B, riconosciuto solo dal siero 1, è invece eluito nella frazione B del campione Polmone Tula, questo campione è quindi più ricco negli antigeni principali.

Le frazioni indicate con "A_{spalla}" nei cromatogrammi del Fegato Onani e Polmone Tula sono state desalificate e concentrate.

Come conferma dell'identità dell'Ag 5 nella frazione "A_{spalla}" da Fegato Onani, una minima aliquota è stata sottoposta ad idrolisi con tripsina. I digeriti sono stati analizzati mediante HPLC-Chip/Ion Trap ed hanno consentito l'identificazione delle componenti proteiche in esse contenute. I risultati delle identificazioni sono riportati in tabella 5.

CAMPIONE	IDENTIFICAZIONE	MW (Da)	Cod NCBI nr	N° peptidi	Score peptidi	SPECIE	SEQUENZE
Fraz. "A spalla" Fegato Onani	Ag5 precursor	54817	27651943	8	409	[Echinococcus granulosus]	R.AGDTVLEGTR.T R.ENIYDGWSR.W K.SWPWHVGIYK.A K.SKSWPWHVGIYK.A R.WLYNSVGSVIQWINR.Y R.RRPFFNPFPPFGR.L R.WKDMDDDEADDAEAEER.G K.DMDDDEADDAEAEERGEYESER.L
	Actin	41415	467215	6	224	[Diphyllobothrium dendriticum]	K.EITSLAPSTMK.I K.DSVVGDEAQSKR.G K.QEYDESGPVIHR.K R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M R.TTGIVLDSGDGVTHSVPIYEGYALPHAILR.L
	Ig heavy chain C region	33757	109029	2	75	[Ovis Aries]	R.EPOQVYVLAPPOEELSK.S K.NGQPESEDKYGTITTSQLDADGSYFLYSR.L

Tabella 5-Identificazione delle proteine contenute nella frazione "A_{spalla}".

Il peso molecolare teorico dell'Ag 5, calcolato dalla retta di taratura condotta sulla Superdex 200 è quindi di circa 660 kDa, che potrebbe coincidere con un oligomero costituito da 10-11 unità.

La frazione “A_{spalla}” ed il liquido cistico intero sono stati quindi testati contro tutti i sieri umani disponibili, in presenza ed in assenza di riducente, mediante analisi Western Immunoblotting. I sieri utilizzati corrispondono a pazienti positivi per cisti epatica (siero 1), polmonare (sieri 2 e 3) e negativi (sieri 4, 5 e 6).

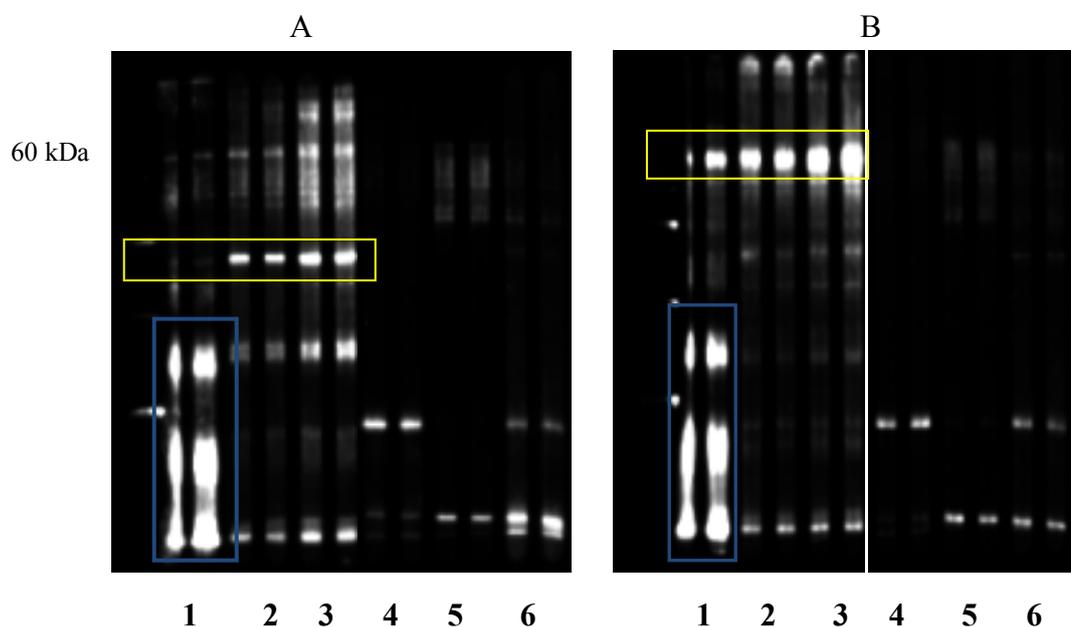


Figura 19 –Immunoblotting del liquido cistico intero in condizioni riducenti (A) e in condizioni non riducenti (B): 1, 2 e 3 sieri positivi; 4, 5 e 6 sieri negativi.

Come si può osservare paragonando le due immagini (Fig.19), in tutte le lanes incubate con i sieri positivi, in condizioni non riducenti è ben visibile una banda a 60 kDa, che non è presente in condizioni riducenti.

La membrana ottenuta in condizioni riducenti mostra invece la presenza di bande

a basso peso molecolare; in particolare si nota la comparsa di bande a circa 25 kDa e a circa 38 kDa che tuttavia non sono riconosciute da tutti i sieri positivi. Dal confronto con la stessa indagine condotta sul liquido cistico intero e la frazione “A_{spalla}” (Fig.20), si osserva una notevole riduzione dei segnali aspecifici.

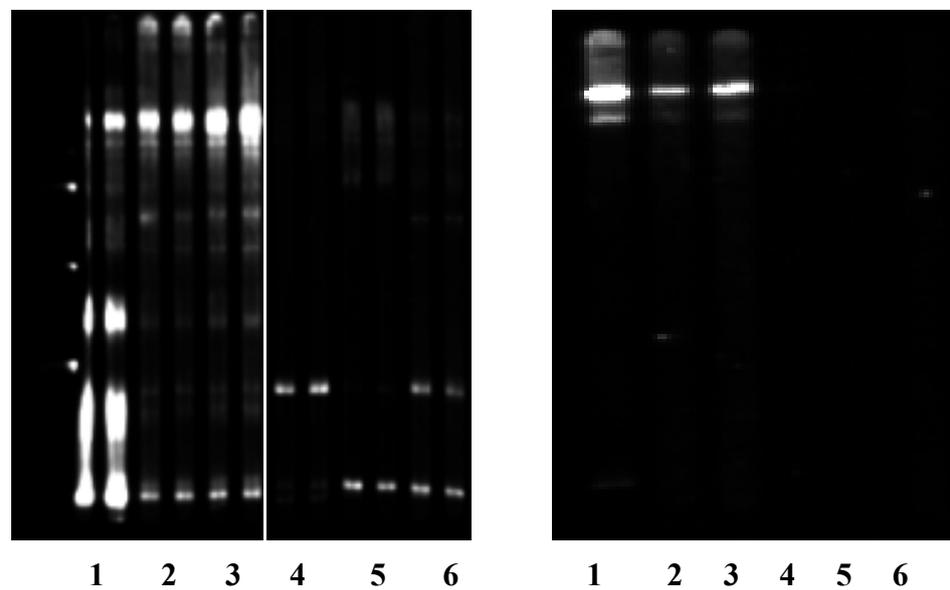


Figura 20 –Immunoblotting del liquido cistico intero (immagine sinistra) e della frazione “A_{spalla}” (immagine destra): 1, 2 e 3 sieri positivi; 4, 5 e 6 sieri negativi.

5.3 Analisi mediante ELISA “Home made”

Nel laboratorio del Centro Nazionale di Referenza per l’ Echinococcosi (CeNRE), presso l’ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, sono stati analizzati 80 campioni così suddivisi: 40 sieri di pazienti con Echinococcosi Cistica, diagnosticata clinicamente mediante tecniche per immagini (ecografia), provenienti dal Policlinico San Matteo di Pavia e 40 sieri di soggetti sani, provenienti dal Centro trasfusionale di Sassari.

Dei 40 pazienti positivi, 32 avevano cisti epatiche, 2 avevano cisti a livello renale, uno a livello peritoneale e 5 pazienti avevano cisti che coinvolgevano diversi organi (Tab.6). Le cisti sono state valutate attive o inattive (presenza o assenza di protoscolici vitali) in base alla classificazione proposta dall’ Organizzazione mondiale della Sanità (WHO).

ORGANO	N° DI CASI	CISTI ATTIVA	CISTI INATTIVA
FEGATO	32	1	31
RENE	2		2
PERITONEO	1		1
ORGANI MULTIPLI COINVOLTI	5	2	3
TOT	40	3	37

Tabella 6-Campioni clinici analizzati.

Al fine di valutare la potenzialità dell' Ag5 come marker per la rilevazione di anticorpi anti *E. granulosus*, tutti i sieri sono stati analizzati mediante ELISA, utilizzando la proteina purificata adsorbita ad una micropiastra pretrattata (ELISA "Home made"):

38 campioni sono risultati positivi, 2 campioni sono risultati dubbi (Tab.7), tutti i 40 campioni appartenenti ai soggetti sani sono risultati negativi. I campioni dubbi in ELISA sono risultati negativi in Immunoblotting (Fig.21 B).

ORGANO	N° DI CAMPIONI	CLINICA	ELISA "Home made"
FEGATO	32	32	30
RENE	2	2	2
PERITONEO	1	1	1
ORGANI MULTIPLI COINVOLTI	5	5	5
TOT	40	40	38

Tabella 7-Campioni risultati positivi in ELISA "Home made".

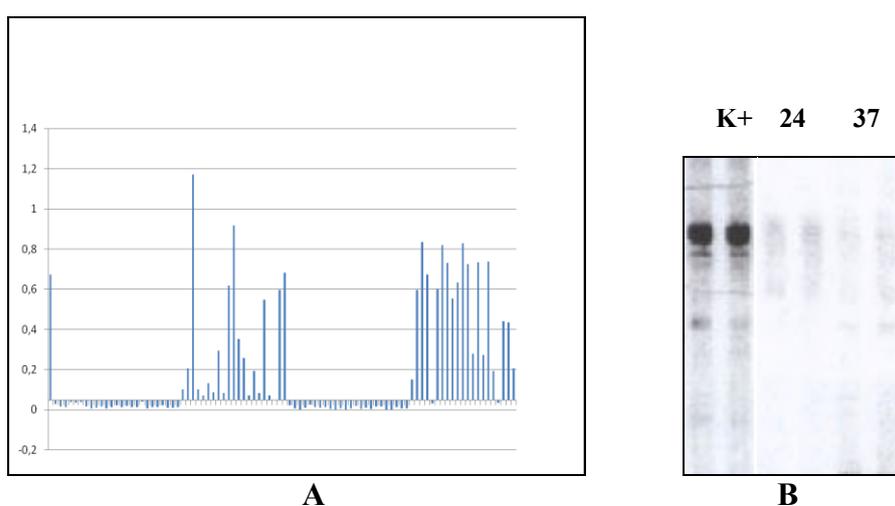


Figura 21-Valori delle densità ottiche (A); IB dei sieri dubbi in ELISA (B)

5.4 Parametri diagnostici

Sono stati valutati la sensibilità e specificità diagnostica, il valore predittivo positivo e negativo. I risultati sono stati riportati nella tabella di contingenza 2 X 2 (Tab.8).

		Segni clinici		Totale	
		Presenza cisti	Assenza cisti		
Risultato del Test	Positivo	38 (VP)	0 (FP)	38 (VP+FP)	VPP 100% VP/(VP+FP)
	Negativo	2 (FN)	40 (VN)	42 (FN+VN)	VPN 95,23% VN/(VN+FN)
Totale		40 (VP+FN)	40 (FP+VN)	80 (VP+FP+FN+VN)	
		DSe 95% VP/(VP+FN)	DSp 100% VN/(VN+FP)		

Tabella 8-Sensibilità e specificità.

La sensibilità del test è risultata pari al 95%: $DSe = 0.95$ (95%CI $0.864 < DSe < 1.036$). La specificità è risultata pari al 100%: $Dsp = 1.00$ (95% CI $1 < DSp < 1$). Il Valore Predittivo Positivo è risultato pari al 100%: $VPP = 1.00$

Il Valore Predittivo Negativo è risultato pari al 95%: $VPN = 0.952$

5.5 Coefficiente di correlazione di Pearson

I campioni clinicamente positivi sono stati analizzati con due kit del commercio (Echinococcus IgG ELISA, DRG Diagnostics Germany e Anti-Echinococcus granulosus ELISA IgG, Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG), i risultati sono riportati in tabella 9.

N° campione	Clinica	“Home made”	DRG kit	Euroim. kit
1	Pos	Pos	Pos	Pos
2	Pos	Pos	Pos	Dubbio
3-6	Pos	Pos	Pos	Pos
7	Pos	Pos	Dubbio	Neg
8-13	Pos	Pos	Pos	Pos
14	Pos	Pos	Neg	Neg
15-23	Pos	Pos	Pos	Pos
24	Pos	Dubbio	Neg	Neg
25-35	Pos	Pos	Pos	Pos
36	Pos	Pos	Pos	Neg
37	Pos	Dubbio	Neg	Neg
38-40	Pos	Pos	Pos	Pos

Tabella 9-Campioni analizzati con i diversi Kit.

Il campione 2 è risultato dubbio con il kit Euroimmun, positivo con gli altri due kit. Il campione 7 è risultato positivo con il kit “Home made”, dubbio con il kit DRG e negativo con il kit Euroimmun. Il campione 14 è risultato positivo con il kit “Home made”, negativo con entrambi i kit del commercio. Il campione 24 è risultato dubbio con il kit “Home made”, negativo con entrambi i kit del commercio. Il campione 36 è risultato positivo con il kit “Home made” e con il kit DRG, negativo con il kit Euroimmun. Il campione 37 è risultato dubbio con il kit “Home made”, negativo con entrambi i kit del commercio. Tutti gli altri campioni sono risultati positivi con tutti e tre i kit.

I risultati ottenuti con i tre kit sono stati correlati mediante il calcolo del *coefficiente prodotto-momento di Pearson* (r) (tab.10). I sieri risultati dubbi per il calcolo della correlazione sono stati considerati negativi.

La correlazione calcolata è risultata statisticamente significativa con $P < 0.01$.

		Home Made	DRG Kit	Euroimmun Kit
Home Made	Correlazione di Pearson	1	,688	,546
	Sig. (2-code)		,000	,000
	N	40	40	40
DRG Kit	Correlazione di Pearson	,688	1	,793
	Sig. (2-code)	,000		,000
	N	40	40	40
Euroimmun Kit	Correlazione di Pearson	,546	,793	1
	Sig. (2-code)	,000	,000	
	N	40	40	40

Tabella 10-Valori dei coefficienti di Pearson (r)

Le prove eseguite hanno riscontrato la presenza di una alta correlazione lineare positiva statisticamente significativa fra il test ELISA “Home made” e il test DRG, $r=0.688$; $n=40$; $p<0.01$; una regolare correlazione lineare positiva statisticamente significativa fra il test ELISA “Home made” e il test Euroimmun Kit, $r=0.546$ $n=40$; $p<0.01$ ed una alta correlazione lineare positiva statisticamente significativa fra il test DRG e il test Euroimmun Kit, $r=0.793$ $n=40$; $p<0.01$.

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Tra le zoonosi persistenti, emergenti o riemergenti l'Echinococcosi Cistica (E.C.), causata da *Echinococcus granulosus*, è fra le più importanti a causa dell'elevata endemicità in molti paesi del mondo (Schantz *et al.*, 1995; Craig *et al.*, 1996).

In Sardegna, nonostante le precedenti campagne di eradicazione abbiano notevolmente ridotto la pressione parassitaria, il problema persiste ed è tuttora considerata una regione ad alta endemia. Dall'analisi delle Schede di Dimissione Ospedaliera (SDO) relative agli anni 2001-2009, sono risultati 1409 ricoveri di cui 1071 primi ricoveri e 338 ricoveri successivi (dato non pubblicato). A causa della notevole variabilità dei segni e dei sintomi della malattia, la diagnosi clinica di E.C. è spesso difficile e richiede l'utilizzo di tecniche per immagini (Lightowlers e Gattstein, 1995).

L' E.C. è associata a numerose reazioni immunologiche e immunopatologiche; tuttavia, nonostante l'attivazione della risposta immunitaria di tipo umorale induca un' elevata produzione di anticorpi rilevabili nella immunodiagnosi, il parassita cresce, forma la cisti idatidea ed instaura una infezione cronica evitando gli effetti dannosi del sistema immunitario dell'ospite mediante meccanismi di immunoevasione passivi o attivi.

Pertanto lo scopo della tesi è stato quello di allestire tecniche di Immunoblotting ed ELISA, per rilevare la presenza di anticorpi anti-*E. granulosus* non solo nei soggetti malati ma anche in quelli a rischio (allevatori, veterinari, agronomi, ecc.)

che operano a contatto con il mondo agro-pastorale. Le tecniche sono state messe a punto partendo dalla caratterizzazione del liquido cistico mediante l'applicazione di tecniche di analisi biomolecolare e di proteomica con le quali vengono identificate e caratterizzate tutte le proteine secrete dal parassita, presenti nel liquido cistico ed in grado di stimolare il sistema immunitario umano.

I campioni di DNA ottenuti dalla raccolta del liquido cistico ovino, in seguito ad analisi mediante PCR e RFLP, sono stati identificati come appartenenti al ceppo G1, la variante genetica specifica dell'ovino (sheep strain).

Tale genotipo può essere considerato endemico in Sardegna (Varcasia *et al.*, 2006). Esso riveste un'importanza particolare in quanto è il genotipo maggiormente responsabile delle infestazioni nell'uomo (Eckert e Thompson, 1997).

Le tecniche di immunodiagnosi includono test iniziali di screening che utilizzano gli antigeni totali estratti dal liquido cistico (antigeni crudi) quali l'agglutinazione al lattice, la doppia diffusione, l'emoagglutinazione indiretta e il test ELISA, seguiti da test di conferma nei quali si utilizzano antigeni specifici, come l'immunoblotting (IB) (Lightowers e Gattstein, 1995).

Le proteine del parassita maggiormente utilizzate per la diagnosi di *E. granulosus* sono l'antigene 5 e l'antigene B. L'antigene 5 ha una componente da 38kDa caratterizzata da epitomi di fosforilcolina che sono ritenuti responsabili di cross reazioni (Shepherd and McManus, 1987; Lightowers *et al.*, 1989).

Conoscere la struttura delle proteine che entrano in gioco durante lo sviluppo dell'infezione cronica permette di evidenziare gli antigeni correlati sia

all'andamento dell'infezione che al successo od insuccesso della terapia farmacologia.

Nei campioni di liquido cistico esaminati nel presente lavoro è stata rilevata la presenza, mediante SDS-PAGE e Western-Immunoblotting, di bande riconosciute dai sieri positivi che pertanto sono state escisse dal gel ed analizzate mediante spettrometria di massa.

Tutte le bande corrispondono principalmente ad Ag 5 precursor ed Ag B (bande a 8, 16 e 24 kDa) (Carmena *et al*, 2006).

Il liquido cistico è stato quindi separato mediante gel-filtrazione, in condizioni riducenti e non, e le frazioni raccolte sono state analizzate mediante SDS-PAGE.

Sorprendentemente l' analisi in Immunoblotting ha rivelato la presenza di una banda positiva a 60 kDa (probabilmente Ag 5) in frazioni da gel filtrazione, in condizioni non riducenti, corrispondenti ad un alto peso molecolare.

Nelle frazioni ottenute in condizioni riducenti è stato osservato il pattern tipico dell' Ag B (Western-immunoblotting in condizioni riducenti); tali frazioni corrispondono anche esse ad alti pesi molecolari.

I risultati ottenuti suggeriscono che entrambe le proteine possiedono, in condizioni fisiologiche, una forma oligomerica come riportato in letteratura (Siracusano *et al*, 2009; Chemale *et al*, 2005).

Il peso molecolare teorico dell' Ag 5, calcolato dalla retta di taratura condotta sulla Superdex 200, è di circa 660 kDa, che potrebbe coincidere con un oligomero costituito da 10-11 subunità.

La frazione “A_{spalla}”, che ha rivelato contenere Ag 5, ed il liquido cistico intero sono stati quindi testati contro tutti i sieri umani disponibili, in presenza ed in assenza di riducente, mediante Western- Immunoblotting.

I sieri utilizzati provengono sia da pazienti positivi per la presenza di cisti epatiche e polmonari, attive ed inattive rispettivamente, che da soggetti negativi.

E' stato osservato che in tutte le lines incubate con i sieri positivi, in condizioni non riducenti è ben visibile una banda a 60 kDa, che non è presente in condizioni riducenti.

La membrana ottenuta in condizioni riducenti ha mostrato invece la presenza di bande a basso peso molecolare; in particolare si nota la comparsa di bande a circa 25 kDa e a circa 38 kDa che tuttavia non sono riconosciute da tutti i sieri positivi.

Le bande tipiche di Ag B sono state evidenziate solo nel siero del paziente con cisti attiva; è riportato in letteratura che la risposta anticorpale verso Ag B decresce o può essere assente in caso di cisti inattiva (Nouir *et al*, 2008): questa potrebbe essere la ragione per la quale lo stesso pattern non è stato riscontrato negli altri sieri positivi.

Dal confronto con la stessa indagine condotta sul liquido cistico intero e la frazione “A_{spalla}” si è osservata una notevole riduzione dei segnali aspecifici a conferma che il sistema più affidabile per la determinazione di infestazione da *E. granulosus* è la ricerca di positività a 60kDa in condizioni non riducenti.

Nonostante lo sviluppo di tecniche sensibili e specifiche come l'IB, l'immunodiagnosi dell' E.C. nella pratica clinica continua a rimanere una task complessa. Il primo problema è legato ai test di screening disponibili

commercialmente che hanno dimostrato avere un'alta percentuale di risultati "falsi negativi" superiore al 25%. Altri problemi includono risultati "falsi positivi" e mancanza di standardizzazione dei test, che nell'insieme contribuiscono a determinare notevoli discrepanze tra i vari laboratori diagnostici (Ortona *et al.*, 2003).

Solo pochi studi sottolineano il valore clinico dei test basati sull'utilizzo dell'antigene 5, probabilmente a causa della loro bassa specificità (Falcon *et al.*, 1991).

Molta più attenzione è stata focalizzata sull'antigene B ritenuto un antigene con un alto valore diagnostico.

I dati ottenuti in questo studio, al contrario, hanno incoraggiato l' utilizzo dell'antigene 5 come potenziale marker per la diagnosi dell' E.C.

Per questo scopo sono stati analizzati mediante ELISA 80 sieri, di cui 40 sieri appartenenti a pazienti con E.C. clinicamente diagnosticata e 40 sieri appartenenti a soggetti sani, utilizzando la proteina purificata adsorbita ad una micropiastra pretrattata (ELISA "Home made").

Questa tecnica ha il vantaggio di rispettare le esigenze di un laboratorio di analisi per la sua rapidità e facilità di esecuzione e per la sua alta sensibilità, caratteristica tipica di tutte le tecniche immunochimiche.

L'inconveniente principale è rappresentato dai possibili errori di interpretazione causati da cross reattività, motivo per cui spesso può essere necessaria una fase preliminare di purificazione e di arricchimento del campione.

Gli esiti dei campioni analizzati sono stati: 38 campioni sono risultati positivi, 2 campioni sono risultati dubbi, mentre tutti i 40 campioni appartenenti ai soggetti sani sono risultati negativi.

Sono stati valutati la sensibilità e la specificità diagnostica, il valore predittivo positivo e negativo (indici della probabilità che il soggetto sia realmente affetto dalla malattia oppure no).

La sensibilità del test è risultata pari al 95%, la specificità è risultata pari al 100%, il Valore Predittivo Positivo è risultato pari al 100% ed il Valore Predittivo Negativo è risultato pari al 95%

Un metodo è tanto più sensibile quanto più alta è la proporzione di positività al test tra i veri positivi; è tanto più specifico quanto più è alta la proporzione di negatività tra i veri negativi. Una sensibilità osservata del 95% indica che la proporzione di positività osservata ha una probabilità del 95% di essere conforme alla concordanza tra risultato sierologico positivo e sintomatologia clinica.

In maniera analoga una specificità del 100% indica che la proporzione di negatività osservata ha una probabilità del 100% di essere conforme alla concordanza tra risultato sierologico negativo e assenza di sintomatologia clinica.

Il test ha mostrato un buon livello di sensibilità ed un alto livello di specificità. Un test altamente specifico è utile per confermare una diagnosi sospetta quando un risultato falso positivo potrebbe risultare dannoso (sotto l'aspetto organico, emotivo per il proprietario, finanziario ecc.), ossia, un test molto specifico è di maggior utilità quando fornisce un risultato vero positivo se si deve utilizzare come test di screening in una popolazione dove la malattia è endemica.

Poiché, come già sottolineato, e' difficile nelle malattie infettive differenziare correttamente i soggetti non infetti (privi di anticorpi) da quelli infetti (portatori di anticorpi conseguenti al contatto con l'antigene infettivo), è risultato utile analizzare i sieri con esito dubbio all' ELISA "Home made" mediante la prova di conferma in immunoblotting; tali prove hanno dato esito negativo.

L'immunoblotting combina i vantaggi delle due tecniche a cui questa metodica si ispira: l'alta capacità risolutiva dell'elettroforesi e la sensibilità delle tecniche immunochimiche. Certamente, essendo costosa in termini di tempo e di denaro e richiedendo personale qualificato ed esperto, non è agevolmente eseguibile per un utilizzo di routine; tuttavia, per l'alta specificità, non presentando problemi di falsi positivi e negativi, può costituire una metodica di conferma nei casi dubbi, per esempio affiancandola al test di screening ELISA .

Allo scopo di confrontare i risultati ottenuti con l' ELISA "Home made" tutti i campioni positivi sono stati analizzati con due kit del commercio.

I risultati ottenuti hanno evidenziato la presenza di una alta correlazione lineare positiva statisticamente significativa fra il test ELISA "Home Made" ed il test DRG ed una regolare correlazione lineare positiva statisticamente significativa fra il test ELISA "Home Made" ed il test Euroimmun.

Il test "Home made" è risultato di semplice e veloce esecuzione, necessita di ulteriori prove con un numero maggiore di sieri per completare la fase di validazione, ma è sicuramente ipotizzabile un suo utilizzo nella diagnostica di routine in tempi brevi.

Poiché un pronto intervento riduce notevolmente il rischio di evoluzione

sfavorevole nell'uomo, una diagnosi, non solo clinica ma anche basata su metodi immunologici, si rivela un fattore fondamentale. La diagnosi clinica di E.C., soprattutto nelle sue manifestazioni atipiche, richiede attrezzature sofisticate, costose e personale altamente specializzato, in grado di identificare e caratterizzare le lesioni mediante tecniche di immagine che, oltre alla radiografia tradizionale, comprendono l'ultrasonografia, la tomografia computerizzata e la risonanza magnetica nucleare. Le immagini che si ottengono mediante l'utilizzo di queste apparecchiature, tuttavia, possono non essere sufficientemente discriminanti nei confronti di altre lesioni "occupanti spazio" o non idonee a fornire informazione riguardo la specie interessata o la "vitalità" della lesione. La diagnosi definitiva deve quindi basarsi anche sullo sviluppo di metodiche immunologiche che permettano la determinazione degli anticorpi specifici nel siero e la loro titolazione e/o la determinazione dell'antigene circolante.

A tutt'oggi la diagnosi di E.C. negli ospiti intermedi avviene esclusivamente al macello durante la visita ispettiva post-mortem. Così come richiesto nel report scientifico dell'EFSA (N° EFSA-Q-2009-01071) che propone l'implementazione e lo sviluppo, tra le altre procedure ed interventi, di metodi diagnostici sierologici più sensibili da impiegare per il monitoraggio "in vita" degli ospiti intermedi infestati, l'impiego anche in ambito veterinario di metodiche immunologiche come quelle oggetto del nostro studio, consentirà il monitoraggio di animali vivi e potrà essere utilizzato per la relativa certificazione sanitaria nella compra-vendita e negli scambi commerciali tra paesi UE ed extra UE.

Infatti i test sino ad ora sperimentati non hanno fornito risultati soddisfacenti in

quanto caratterizzati da una scarsa specificità e sensibilità. Inoltre tale sistema diagnostico dal punto di vista epidemiologico consentirà di avere informazioni più precise sulla reale diffusione dell' E.C. negli allevamenti, in modo da elaborare programmi di sorveglianza e controllo più mirati, consentendo il loro utilizzo anche nell'ambito di indagini epidemiologiche conoscitive per valutare eventuali interventi di profilassi da adottare.

BIBLIOGRAFIA

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

Battelli G., 2004. Socio-economic impact of cystic echinococcosis and of its control; some data and consideration. Parassitologia; 46: 359-62.

Bauer C., Dausches A., Stoye M., 1986. Effect of a combination of fenbendazole and triclabendazole on naturally acquired helminth infections of sheep. Dtsch Tierarztl Wochenschr.; 93(9): 456-8.

Bortoletti G., 2007. Cystic echinococcosis in the human liver. Mappe parassitologiche 9. Series Editor Giuseppe Cingoli.

Bowles J., McManus D.P., 1992. Rapid discrimination of *Echinococcus granulosus* species and strains using polymerase chain reaction-based RFLP method. Molecular and Biochemical Parasitology, 57 (1993) 231-240.

Capron A., Vernes A., Biguet J., 1967. Le diagnostic immuno-electrophoretique de l'hydatidose. In: Le Kyste Hydatique du foie. SIMEP, Lyon, pp. 27-40.

Carmena D., Benito A., Eraso E., 2006. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: an update. Acta Tropica 98: 74-86.

Casarosa C.G., 1985. Parassitologia degli animali domestici. Edizioni Medico Scientifiche.

Chemale G., Ferreira H.B., Barrett J., Brophy P.M., Zaha A., 2005. *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding properties. Biochim Biophys Acta.;1747(2):189-94.

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

Craig P.S., McManus D.P., Lightowers M.W., Chabalgoity J.A., Garcia H.H., Gavidia C.M., Gilman R.H., Gonzalez A.E., Lorca M., Naquira C., Nieto A., Schantz P.M., 2007. Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infect Dis* 7: 385-394.

Craig P.S., Rogan M.T., Allan J.C., 1996. Detection, screening and community epidemiology of taeniid cestode zoonoses: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. *Adv Parasitol*; 38: 169-250.

Di Felice G., Pini C., Afferni C., Vicari G., 1986. Purification and partial characterization of the major antigen of *Echinococcus granulosus* (antigen 5) with monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol* 20: 107-135.

Eckert J., Deplazes P., 2004. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 107-135.

Eckert J., Deplazes P., Traig P.S., Gemmel M.A., Gottstein B., Heath D., Jenkins D.J., Kamiya M., Lightowers M., 2001. Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment. In Eckert J., Gemmel M.A., Meslin F., Pawloski X.Z. (eds.), *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in humans and animals: A Public Health Problem of global concern*. World Organization for animal health, Parigi:72-99.

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

Euzeby J., 1968. Larval echinococcosis, a major zoonosis. *Epidemiologic, etiologic and prophylactic study*. *Maroc Med.*; 48(518): 643-60.

Falcon B., Chamekt M., Dissous C., Capron A., 1991. Molecular cloning of an *Echinococcus granulosus* protein expressing an immunogenic epitope of antigen 5. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45: 233-240.

Garlaschelli A.L., Brunetti E., Maiocchi L., Filice C., 2004. Ecografia e sierologia nella diagnosi e follow-up dell'echinococcosi cistica addominale. *Giornale Italiano di Ecografia*; 7(4):343-348.

Gemmell M.A., Lawson J.R., Roberts M.G., 1986b. Control of echinococcosis/hydatidosis. *Bull. WHO*; 64: 333-339

Gemmel M.A., Roberts M.G., 1995. Modelling *Echinococcus* life cycles. In *Echinococcus* and hydatid diseases (R.C.A. Thompson & A.L. Lymbery, eds.) CAB International, Wallingford, Oxon: 333-354.

Giorgetti M., Massaro D., 2007. Ricerca e percorsi di analisi dati con SPSS, Pearson Editore (pag. 122).

Heath D.D., Lawrence S.B., 1991. Daily egg-producton of dogs infected with *Echinococcus granulosus*. *Archives de la Hidatidosis*; 30: 321-8.

Hermann M., Eckert J., Howald B., Strickler E. and Gottstein B., 1988. Clinisch Manifeste Echinokokkose Bei Einem Pferd. *Pferdeheilkunde*; 4:263-267.

Ito A., 2002. Collaboration for the control of cysticercosis/echinococcosis in Vietnam. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.*; 33 Suppl 3: 83-5.

Lahmar S., Chéhida F.B., Pétavy A.F., Hammou A., Lahmar J., Ghannay A., Gharbi H.A., Sarciron M.E., 2007. Ultrasonographic screening for cystic echinococcosis in sheep in Tunisia. *Vet Parasitol*; 143 (1): 42-9.

Lavikainen A., Lehtinen M.J., Meri T., Hirvela-Koski V., Meri S., 2003. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*;127 (3): 207-15.

Laws G.F., 1968. Physical factors influencing survival of Taeniid eggs. *Exp. Parasitol.*; 22: 227-239.

Lightowers M.W., Gottstein B., 1995. Echinococcosis/hydatidosis. Antigens, immunological and molecular diagnosis. *In* Echinococcosis and hydatid disease (R.C.A. Thompson & A.L. Lymbery, eds). CAB International, Wallingford, Oxon, 355-410.

Lightowers M.W., Liu D., Haralambous A., Rickard M.D., 1989. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37:171-182.

Maddison S.E., Slemenda S.B., Schantz P.M., Fried J.A., Wilson M., Tsang V.C.W., 1989. A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 40: 377-383.

Mantovani A., Lasagna E., 2004. Notes on cystic echinococcosis in the Mediterranean. *Parassitologia*; 46 (4): 359-62

Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, cap.1.1.4./5, World Organisation for Animal Health (OIE), 2009

Maravilla P., Thompson R.C.A., Palacios-Ruiz J.A., Estcourt A., Ramirez-Solis E., Mondragon-de-la-Pena C., Moreno-Moller M., Cardenas-Mejia A., Mata-Miranda P., Aguirre-Alcantara M.T., Bonilla-Rodriguez C., Flisser A., 2004. *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico. *Acta Trop*; 92(3): 231-6.

Marcato P.S., 2002. Anatomia ed istologia patologica speciale dei mammiferi domestici. Edagricole

Matossian R.M., Alami S. Y., Salti I., Araj G.F. (1976). Serum immunoglobulin levels in human hydatidosis. *Int. J. Parasitol.* 6: 367-371.

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

McManus D.P., 2003. *Echinococcus*. Lancet 2003; Vol 362: 1265-304.

Menghebat L., Jiang L., Chai J., 1993. A retrospective survey for surgical cases of cystic echinococcosis in the Xinjiang Uygur autonomous region, PCR, 1951-90. In Compendium on cystic echinococcosis with special reference to the Xinjiang Uygur autonomous region, the peoples Republic of Cina (F.L. Andersen, J. Chai & F. Liu, eds). Brigham Young University, Print Services, Provo, Utah,: 135-145.

Morseth D.J.,1965. Ultrastructure of developing taeniid embriophores and associated structures. Experimental Parasitology; 16: 207-216

Nakao M., Mc Manus D.P., Schantz P.M., Craig P.S., Ito A., 2007. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. Parasitology 134: 713-722.

Nour NB, Nuñez S, Frei E, Gorcii M, Müller N, Gianinazzi C, Mekki M, Nouri A, Babba H, Gottstein B., 2007. Post-surgical follow-up (by ELISA and immunoblotting) of cured versus non-cured cystic echinococcosis in young patients. Parasitology. 2008 Jan;135(Pt 1):105-14. Epub Sep 4.

Oriol R., Williams J.F., Perez Esandi M.V., Oriol C., 1971. Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. Am. J. Trop. Med Hyg. 20:569-574.

Orlando D.F., 1997. Evolution of the programme for the control of hydatidosis in Uruguay. Arch. Int. Hydatid; 32: 69-72.

Ortona E., Riganò R., Buttari B., Delunardo F., Ioppolo S., Margutti P., Profumo E., Teggi A., Vaccari S., Siracusano A., 2003. An update on immunodiagnosis of cystic echinococcosis. Acta Trop.;85(2):165-71.

Ortona E., Riganò R., Margutti P., Notargiacomo S., Ioppolo S., Vaccai S., Barca S., Buttari B., Profumo E., Teggi A., Siracusano A., 2000. Native and recombinant antigens in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. Parasite Immunol. 22:553-559.

Pawlowski I., Eckert J., Vuitton D., 2001. Echinococcosis in humans: clinical aspects diagnosis and treatment. In: Eckert J., Gemmel M., Meslin F-X, Pawlowski Z., eds. WHOI/OIE Manual on echinococcosis in humans and animals: A public health problem of global concern. Paris: World Organization for Animal Health: 20-71.

Poglayen G., Baldelli R., Battelli G., 2007. Zoonoses and information of the public: considerations on the role of media, with special reference to Italy. Proceeding book of 22nd International Congress of Hydatidology & International Symposium on Zoonoses, PO19, Atene, 15-19 May.

Poretti D., Felleisen E., Grimm F., Pfister M., Teuscher F., Zuercher C., Reichen J., Gottstein B., 1999. Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60(2):193-8.

Rausch R.L., 1995. Life cycle patterns and geographic distribution of *Echinococcus* species. In *Echinococcus* and Hydatid disease (R.C.A. Thompson & A.L. Lymbery, eds). CAB International, Wallingford, Oxon: 88-134.

Rausch R.L., 1975. Taeniidae. In: McCulloch W.F. and Schurrenberger P.F. (eds), *Diseases Transmitted from Animals to Man*. Thomas, Springfield, Illinois: 678-707.

Rausch R. L., Bernstein J. J., 1972. *Echinococcus vogeli* sp. n. (Cestoda: Taeniidae) from the bush dog, *Speothos venaticus* (Lund). *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie* 23: 25-34.

Rausch R.L., Wilson J.F., McMahon B.J., O’Gorman M.A., 1986. Consequences of continuous mebendazole therapy in alveolar hydatid disease with a summary of a ten-year clinical trial. *Ann Trop Med Parasitol.*; 80(4): 403-19.

Relazione finale della ricerca finalizzata 2003 del Ministero della Salute.

Riganò R., Ioppolo S., Ortona E., Margutti P., Profumo E., Ali M.D., Vico B., Siracusano A., 2002. Long-term serological evaluation of patients with cystic echinococcosis treated with benzimidazole carbamates. *Clin. Exp. Immunol.* 129: 485-492.

Riganò R., Profumo E., Bruschi F., Carulli G., Azzara A., Ioppolo S., Buttari B., Ortona E., Margutti P., Teggi A., Siracusano A., 2001. Modulation of immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defences. *Infect. Immun* 69:288-296.

Rinder H., Rausch RL., Takchashi K., Kopp H., Thomschke A., Loscher T., 1997 Limited range of genetic variation in *Echinococcus multilocularis*. *J Parasitol.*; 83(6): 1045-50.

Roneus O., Christensson D., Nilsson N.G., 1982. The longevity of hydatid cysts in horses. *Vet Parasitol.*; 11(2-3):149-54.

Sakamoto T., 1981. Electron microscopical observations on the eggs of *Echinococcus multilocularis*. *Memoirs of the faculty of Agriculture of Kagoshima University*; 17: 165-174.

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

Schantz P.M., Chai J., Craig P.S., Eckert J., Jenkins D.J., MacPherson C.N., Thakur A., 1995. Epidemiology and control of hydatid disease. In: Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (Eds.), *Echinococcus* and hydatid disease. CAB International, Wallingford, Oxon: 233—331.

Schantz P.M., Gottstein B., 1986. Echinococcosis (hydatidosis), Vol 1. Academic Press Inc., Orlando, Florida.

Shepherd JC., Aitken A., McManus D.P., 1991. A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44: 81-90.

Shepherd JC, McManus DP., 1987. Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol Biochem Parasitol. Sep*; 25(2):143-54.

Siracusano A., Bruschi F., 2006. Cystic echinococcosis: progress and limits in epidemiology and immunodiagnosis. *Parassitologia*; 48(1-2): 65-6.

Siracusano A., Riganò R., Ortona E., Profumo E., Margutti P., Buttari B., Delunardo F., Teggi A., 2008. Immunomodulatory mechanism during *Echinococcus granulosus* infection. *Experimental Parasitology* 119: 483-489.

Siracusano A., Teggi A., Ortona E., 2009. Human cystic echinococcosis: old problems and new perspectives. *Interdiscip Perspect Infect Dis.*;2009:474368. Epub 2009 Nov 1.

Smyth J.D., 1964. The biology of the hydatid organism. *Advances in Parasitology*; 2: 169-219.

Smyth J.D., Davies Z., 1974. Occurrence of physiological strains of *Echinococcus granulosus* demonstrated by in vitro culture of protoscoleces from sheep and horse hydatid cysts. *Int J Parasitol.*; 4(4): 443-5.

Šnábel V., D'Amelio S., Mathiopoulos K., Turcekova L., Dubinsky P., 2000. Molecular evidence for the presence of a G7 genotype of *Echinococcus granulosus* in Slovakia. *J Helminthol.*; 74(2): 177-81.

Swiderski Z., 1982. *Echinococcus granulosus*: embryonic envelope formation. *Proceedings of the 10th International Congress of Electron Microscopy*; 3: 513.

Thompson R.C.A., 1977. Hydatidosis in Great Britain. *Helminthological Abstracts Series A*; 46: 837-61.

Thompson R.C.A., 2008. Biology and speciation of *Echinococcus*. *Australian Veterinary Journal* Volume 55 Issue 3, Pages 93 – 98

Thompson R.C.A., McManus D.P., 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends in Parasitology*; 18(10): 452-457

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

Thompson, R.C.A., Lymberly A.J., 1995. The geographic distribution of hydatid infection in cattle in Western Australia. *Aust Vet J.*; 72(11): 430-432.

Thompson R.C.A., McManus D.P., 2001. Aetiology: parasites and life cycles. In manual on Echinococcosis in human and animals a Public health problem of Global Concern (Eckert, J. et al), pp 1-19, World Organisation for Animal health (OIE).

Thompson R.C.A., Smyth J.D., 1975. Equine hydatidosis: a review of the current status in Great Britain and the results of an epidemiological survey. *Veterinary Parasitology*; 1: 107-27.

Torgerson P.R., Carmona C., Bonifacino R., 2000. Estimating the economic effects of cystic echinococcosis: Uruguay, a developing country with upper-middle income. *Ann Trop Med Parasitol*; 94(7):703-13.

Torgerson P.R., Dowling P.M., Abo-Shehada M.N., 2001. Estimating the economic effects of cystic echinococcosis. Part 3: Jordan, a developing country with lower-middle income. *Ann Trop Med Parasitol*; 95 (6): 595-603.

Torgerson P.R., Shaikenov B.S, Rysmukhambetova A.T., Ussenbayev A.E., Abdybekova A.M., Burtisurnov K.K., 2001. Modelling the transmission dynamics of *Echinococcus granulosus* in dogs in rural Kazakhstan. *Parasitology*; 126 (5): 417-24.

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

Yarzabal L.A., Bout D.T., Naquita F.R., Capron A.R., 1977. Further observations on the specificity of antigen 5 of *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol.* 63:495-499.

WHO, 2001. WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. WHO/OIE, Paris.

Zhang W., McManus D.P., 2006. Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 47 (1): 24-41.

Zhang W., Li J., McManus D.P., 2003. Concepts in Immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(1): 18-36.

Vorrei ringraziare tutti coloro che con il loro aiuto hanno contribuito allo svolgimento di questo lavoro:

in particolare il relatore, Prof. Piero Cappuccinelli per il grande supporto scientifico

la dottoressa Giovanna Masala per avermi dato la possibilità di fare questo bellissimo lavoro

il gruppo del CeNRE, Gabriella Masu, Toni Piseddu, Diego Brundu per avermi aiutato nelle difficoltà pratiche che ogni giorno si presentavano durante questi tre anni

le dottoresse Daniela Pagnozzi, Maria Filippa Addis e Grazia Biossa per il contributo scientifico

i colleghi dei laboratori di Sierologia Speciale e Protozoologia dell' IZS Sassari per il loro supporto morale.