



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA SARDEGNA "G. Pegreffi"**

DIPARTIMENTO *PRODUZIONI*
LABORATORIO di **RICERCA e SVILUPPO**

Ricerca Corrente IZS SA 04/00: Relazione finale

“Epidemiologia molecolare dell’Echinococcus granulosus nella specie ovina e produzione di proteine ricombinanti a scopo vaccinale”

Responsabile: Dott.ssa Sebastiana Tola

Gli obiettivi indicati nel progetto e riguardanti l’U.O. n° 1 erano i seguenti:

- 1) Estrarre il DNA da almeno 50 differenti idatidi ovine
- 2) Amplificare mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) utilizzando specifici primers delle sequenze riportate in banca-dati. Sequenziare gli ampliconi ottenuti e analizzarli con programmi on-line. Digerire gli ampliconi con gli enzimi di restrizione presenti in ogni sequenza.
- 3) Fare una cDNA dell’*Echinococcus granulosus* e amplificare in ORF (Open Reading Frame) il gene codificante la proteina EG95
- 4) Inserire in *Escherichia coli* il gene codificante per la EG95 per ottenere una proteina di fusione
- 5) Purificare ed analizzare la proteina ricombinante
- 6) Produrre in agnello anticorpi anti-proteina ricombinante

- 7) Somministrare ad un campione di pecore non infestate la proteina ricombinante adiuvata. Analizzare la risposta immunitaria mediante immunoblotting

Gli obiettivi riguardanti l'U.O. n° 2 erano:

- 1) Prelievo di organi ed idatidi e valutazione della vitalità delle cisti
- 2) Classificazione morfometrica dei protoscolici
- 3) Individuare un gruppo di pecore non infestate mediante analisi ecografica
- 4) Cura e mantenimento delle pecore vaccinate

Premessa

L'Echinococcosi rappresenta un importante problema di sanità pubblica in numerose aree del mondo e assume fra l'altro particolare rilevanza nel bacino del Mediterraneo, dove è considerata una delle principali parassitosi degli animali in produzione zootecnica e riveste un notevole significato sociale per l'alta diffusione nell'uomo (Eckert et al., 2001). L'Echinococcosi continua ad imperversare infatti in quelle regioni geografiche in cui il binomio ovino-cane è ancora ben rappresentato. E' infatti ormai ampiamente associato 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 in alcuni distretti geografici colpiti da questa infestazione. Tutto questo si perpetua ormai da tempo immemorabile, nonostante nei suoi confronti si siano spesso concentrati gli sforzi di varie categorie (veterinari, medici, politici) per cercare di arginare una parassitosi che varie cause (sociali, economiche e politiche), hanno reso il suo controllo od eradicazione non sempre possibile. E' il caso ad esempio della Sardegna, in cui l'Echinococcosi/Idatidosi seppure da sempre "massivamente presente", ancora oggi costituisce un problema sanitario per il patrimonio zootecnico e per l'uomo di primario interesse. In quest'isola, ad oltre dieci anni dall'ultima campagna di eradicazione dell'Echinococcosi/Idatidosi, si registrano ancora negli ovini delle prevalenze allarmanti, come documentato da Scala et al. (2001). Inoltre, eccezion fatta per un lavoro effettuato sugli ovini (Idini et al., 2000), mancano ancora dati sull'esistenza e

distribuzione dei ceppi di *Echinococcus granulosus* eventualmente circolanti sul territorio.

Pertanto col presente lavoro si intende 1) fornire degli aggiornamenti sull'epidemiologia dell'infestazione negli ovini attraverso il controllo degli animali macellati in diversi mattatoi dell'isola; 2) procedere alla tipizzazione biomolecolare dei protoscolici e 3) produrre una proteina ricombinante a scopo vaccinale.

Prima di procedere con la descrizione del lavoro effettuato durante la ricerca ho ritenuto doveroso fare un capitolo separato dedicato all'epidemiologia dell'Echinococcosi cistica in Italia per inquadrare il contesto nel quale tale ricerca si è inserita.

Epidemiologia dell'Echinococcosi cistica in Italia

In Italia il quadro epidemiologico riferito all'Echinococcosi presenta notevoli lacune e in alcuni distretti le informazioni relative alla prevalenza e diffusione risultano abbastanza datate. Nel nord Italia, le informazioni epidemiologiche sull'Echinococcosi risultano decisamente carenti in quanto generalmente si tratta di soli dati di prevalenza rilevata ai macelli e di dati sulle ospedalizzazioni. Sono peraltro assenti informazioni sulla diffusione dell'echinococcosi canina. In Emilia-Romagna, regione della Valle Padana dove viene praticato l'allevamento intensivo e dove il rischio di infestazione è considerato basso, la presenza di idatidi negli animali macellati non sembra superare, nel periodo 1996-1999, complessivamente l'1% (Faggioli et al., 2001), mentre l'incidenza annuale delle persone ospedalizzate residenti nella regione risulta inferiore ad 1 per 100.000 abitanti (Battelli et al., 2001).

Nel nord Italia è stato inoltre segnalato *E. multilocularis* nella volpe rossa (Manfredi et al 2002) e recenti indagini hanno dimostrato un aumento delle prevalenze d'infestazione negli ospiti definitivi e l'estensione dell'areale di diffusione di questo cestode (Lucius e Bilger 1995, Deplazes e Eckert 2001). In Abruzzo l'evoluzione della parassitosi, negli animali e in particolare negli ovini e nei caprini, non appare uniforme nel corso degli anni. Infatti i dati relativi al periodo 1972-1984 indicano nella specie ovina una prevalenza del 10,6% (Gargiulo et al., 1987) che, in un rapporto più aggiornato, risulta salire al 32,14% (Tieri e Gatti, 1995). Sulla base di questi dati si evince che il tasso di infestazione medio provinciale degli ovini e caprini adulti appare di quasi tre volte maggiore del dato del quinquennio precedente e nettamente più alto anche dei tassi medi regionali degli ovini e dei caprini del periodo 1985-1989 (Schiavo et al., 1992). Alcuni dati sono disponibili relativamente ai bovini, equini e suini nei quali si indicano prevalenze generiche comprese tra 4 e 6% (Tieri e Gatti, 1995). Inoltre le uniche indagini epidemiologiche negli ospiti definitivi sono quelle effettuate dall'IZS di Teramo che evidenziano una prevalenza generica per i cestodi pari al 4% (Di Ventura et al., 1995).

Indagini epidemiologiche eseguite in Campania su bovini, ovini, caprini, suini ed equini in 26 macelli delle province di Avellino e Salerno hanno permesso di rilevare una prevalenza media inferiore al 5%. Tuttavia in alcuni distretti sono state riscontrate negli ovini e nei bovini prevalenze comprese tra il 16 e 21% (Cringoli et al., 1998). Per quanto riguarda la diffusione nell'ospite definitivo, l'unico lavoro, peraltro datato, è quello di Capurso et al. (1968) che documenta nei cani della città di Napoli e di alcuni

comuni della provincia una prevalenza dell' 1% su 500 cani sottoposti ad esame necroscopico. In questa regione, come nel resto del territorio Italiano non sono mai stati realizzati indagini epidemiologiche sulla Echinococcosi del bufalo, specie ampiamente presente sul territorio locale. Risultano frammentarie e parzialmente datate le indagini epidemiologiche condotte in Puglia regione, dove nella specie ovina sono state rilevate prevalenze massime variabili: 6,2% (Schiavo et al., 1979), 4,88% (Puccini e Tassi 1983), 5,88% (Schiavo e Pansini , 1996) 14% in provincia di Lecce negli anni 1978-87. Numericamente superiori risultano le indagini sulla parassitosi condotte in Sicilia, dove l'allevamento estensivo degli ovini rappresenta in termini numerici il secondo in Italia dopo la Sardegna. Le prime ricerche nell'isola risalgono a Bertocchi (1951) che rileva prevalenze del 6-10% nei bovini e 2,08 % nel cane in provincia di Palermo. Lo stesso autore nel decennio 1940-1950 riporta il dato di 689 interventi per idatidosi umana (stima reale x10). Lavori successivi fotografano una realtà ancora più grave con prevalenze dell'11,13% in bovini, 43,22% in ovini, 2,85 % in caprini e 4,71 % in suini (Panebianco e Sciutteri, 1955; Gallo e De Girolamo, 1960; Nobile et al., 1993; Magliarditi e Niutta, 1995; Virga e Giannetto, 1996; Virga e Giannetto, 1998; Poglayen et al., 2001; Scala et al., 2001; Poglayen et al., 2002). Infine Virga et al. (1994) rilevano, nel periodo 1989-1991 un'incidenza regionale di echinococcosi cistica umana pari a 3,2 casi per 100.000 abitanti/anno. Le indagini condotte nell'isola, pur non permettendo di avere di un quadro esaustivo della situazione, evidenziano una situazione a rischio per l'uomo e per gli animali domestici, soprattutto negli ambienti rurali dove persistono condizioni di arretratezza sociale e zootecnica favorevoli alla diffusione

dell'Echinococcosi. Diversamente dalle altre regione italiane, in Sardegna lo studio dell'Echinococcosi è sempre stata affrontata in modo organico e l'isola ha da sempre costituito un modello ideale per lo studio della parassitosi. Basti infatti pensare da un lato all'elevata consistenza del patrimonio ovino e caprino (3.130.000 ovini, 250.000 caprini), con una filiera produttiva all'avanguardia che ha trascinato in un processo evolutivo l'intero comparto. Dall'altro l'elevato numero di cani (150.000) (Cannas et al, 1990), le modalità di gestione dell'allevamento (brado, semibrado), le macellazioni clandestine e le condizioni socioeconomiche e culturali degli allevatori hanno consentito la persistenza di elevati tassi di prevalenza dell'echinococcosi negli ovini (86,9 %), nei caprini (23,74%) e nel cane (16,2%) (Arru et al. 1990). Inoltre, nonostante nell'isola siano state condotte ben tre campagne finalizzate all'eradicazione della parassitosi (1960, 1978, 1987) (Arru et al., 1999), dati recenti evidenziano prevalenze ancora elevate negli ovini (75,6%) (Scala et al., 2001) e un'incidenza media annuale nell'uomo compresa fra 15 e 8 casi chirurgici ogni 100.000 abitanti (Conchedda et al., 1997). L'assenza di ulteriori indagini non consente invece di quantificare a tutt'oggi la reale diffusione di *E. granulosus* nel cane. Al di là delle ricerche condotte nelle singole regioni e precedentemente riportate l'unica indagine che consente di disporre di un quadro complessivo della diffusione dell'echinococcosi su tutto il territorio nazionale è quella condotta da Romboli et al. (1980). Risulta pertanto evidente che allo stato attuale, con le eccezioni precedentemente evidenziate, mancano in Italia studi epidemiologici aggiornati e approfondimenti diagnostici, anche alla luce delle nuove acquisizioni della ricerca.

Sono peraltro assenti lavori sulla caratterizzazione molecolare mentre le indagini sulla fertilità delle cisti, e quindi del loro reale potere infestante, si riferiscono quasi esclusivamente alla Sardegna (Arru et al., 1990, Scala et al., 2001).

Materiali e metodi

Per questo lavoro, abbiamo esaminato un migliaio di 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 capo, riscontrato positivo all'infestazione, sono stati valutati il numero, la localizzazione e il tipo di idatidi secondo la seguente classificazione: fertili, acefalocisti, caseose e calcificate. Al fine di valutare la fertilità di tali formazioni, sono state prelevate le membrane proliferi e i protoscolici (Figura 1 e 2).



Fig.1- Prelievo della membrana prolifera da una cisti polmonare



Fig. 2- Prelievo del liquido idatideo da una cisti epatica.

Di questi ultimi è stata valutata la vitalità attraverso l'esame a fresco allo stereomicroscopio e con colorazione con coloranti vitali (rosso neutro 0.5%). Si è tenuto

conto della conformazione, dei movimenti e dell'evidenziazione delle cellule a fiamma vibratili.

Estrazione del DNA.

Il contenuto di 54 idatidi epatiche (Figura 3B), 38 polmonari (Figura 3A) e 1 splenica è stato centrifugato a 8,000 rpm per 15 min. Il pellet contenente i protoscolici è stato risospeso in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) addizionato con SDS e proteinase K. Dopo 1 ora di incubazione a 50 °C, il DNA è stato estratto mediante due passaggi in fenolo-cloroformio e una precipitazione in etanolo, secondo la metodica descritta da Ausubel et al. (1992). La concentrazione del DNA è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica a 260 e 280 nm (Sambrook et al., 1989).

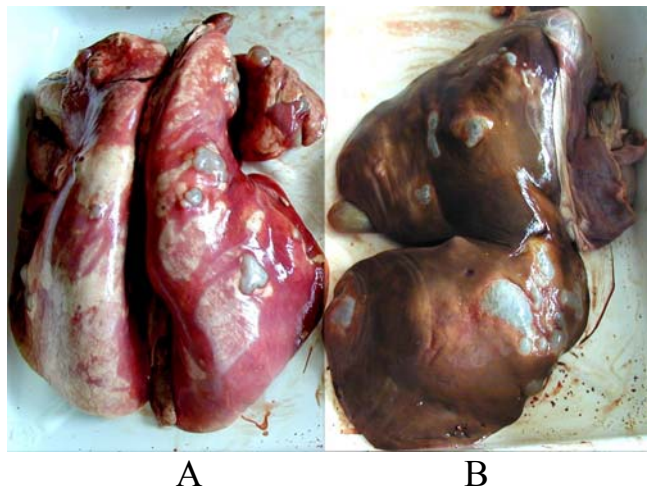


Fig.3- Polmone (pannello A) e fegato (pannello B) di pecore infestate da *Echinococcus granulosus*.

Primers e PCR

I primers utilizzati in questo lavoro sono stati tratti da sequenze riportate in banca-dati (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>).

In particolare sono stati utilizzati i primers che amplificano una porzione del 12S rRNA (numero di accesso: AB031350), i primers per il gene ETS1 (external transcribed spacer, n° di accesso:U26429)(Picon et al., 1996), i primers per il gene CO1 (cytochrome c oxidase, subunit 1, n° di accesso:AB033407), i primers per il gene ND1 (NADH dehydrogenase subunit 1, n° di accesso: AJ237638)((Bowles & McManus,1993) e i primers per il gene codificante la proteina EG95 (n° di accesso: X90928).

Un μl di ciascun campione di DNA è stato utilizzato in 25 μl di una reazione standard di PCR costituita da:

- 2.5 μl di buffer 10X (Roche);
- da 1.5 a 2 mM di MgCl_2 ;
- 1 μl di reverse e forward primer per ciascun gene alla concentrazione di 25 pmoli/ μl ;
- 0.5 μl di 1.25 mM dNTP;
- 0.3 μl di 5 U/ μl Taq polymerase (Roche);
- tot μl di H_2O fino ad un volume finale di 25 μl .

Le reazioni di PCR sono state effettuate in un Thermal Cycler 9700 dell'Applied Biosystems utilizzando i seguenti parametri:

denaturazione iniziale a 95 °C per 5 minuti

30-40 cicli di:

- denaturazione per 1 minuto a 95 °C;
- annealing per 1 minuto;
- estensione per 1 minuto;

Estensione finale a 72°C per 10 min.

Gli ampliconi sono stati fatti correre a 100 V in un gel di agarosio all'1%, colorati con bromuro di etidio e visualizzati sotto i raggi ultravioletti dell'apparecchio ImageMaster dell'Amersham.

PCR-RFLP (Restriction fragment lenght polymorphism).

Gli ampliconi ottenuti con i primers per il gene EG95 sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI*, *Sau3A*, *HindIII*, *BamHI*, *SpeI*, *AluI*, *BglI* e *ClaI* (Roche) per 12 ore e alla temperatura indicata dal produttore. I polimorfismi di restrizione sono stati analizzati in un gel di agarosio al 3% (costituito da due parti di agarosio e una parte di agarosio low-melting) in TAE 1X.

Sequenza nucleotidica dell'amplicone EG95.

L'amplicone ottenuto con la coppia di primers del gene codificante per la proteina EG95 e il DNA template dei protoscolici, è stato purificato e concentrato mediante l'utilizzo di microconcentratori (Microcon PCR, Millipore). Il DNA così ottenuto è stato sequenziato) in entrambe le direzioni mediante metodo di Sanger (dideoxy chain terminator method) utilizzando il sequenziatore ALFexpress (Amersham). Il confronto delle sequenze ottenute con quelle riportate in banca-dati è stata fatta mediante l'utilizzo di programmi on-line, in particolare con ALIGN (<http://vega.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>).

Estrazione degli mRNA

L'estrazione degli mRNA (poli A+) è stata fatta mediante il Kit MagNA Pure LC mRNA isolation (Roche) che sfrutta l'utilizzo di particelle magnetiche. 220 mg di protoscolici, raschiati dalle membrane proliferi, sono stati lavati con PBS pH 7.2 e processati secondo il protocollo riportato nel Kit. La determinazione della concentrazione degli mRNA è stata fatta allo spettrofotometro a 260 e 280 nm. Aliquote contenenti 1 µg di poli A+ mRNA sono state retrotrascritte utilizzando l'enzima AMV reverse transcriptase (InVitrogen).

Clonaggio ed espressione dell'EG95 in cellule procariotiche mediante il vettore pQE-30 (Qiagen)

Una porzione del gene EG95 è stata clonata all'interno del vettore di espressione pQE-30 (Qiagen), modificando la sequenza iniziale e finale del gene in modo da inserire due siti di restrizione compatibili con il plasmide (i siti di restrizione inseriti sono stati *BamHI* e *KpnI*).

Per fare questo è stata eseguita una PCR utilizzando due primers modificati contenenti appunto i due siti di restrizione non presenti nella sequenza originale.

I primers sono stati denominati EG95cod-F ed EG95cod-R. Essi amplificano una regione del gene corrispondente a 610-bp. L'amplificato ottenuto è stato prima purificato con il Kit CONCERT Gel Extraction System della GIBCO e poi digerito con gli enzimi *BamHI* e *KpnI*.

Contemporaneamente si è digerito il plasmide pQE-30 con gli stessi enzimi. Dopo una valutazione quantitativa della “ratio” tra l’inserto e il vettore si è proceduto con l’aggiunta di un μl di T4-Ligase(Roche) a temperatura ambiente per 10 min.

Un’aliquota di 10 μl di trasformazione è stata inserita in *Escherichia coli* DH5 α competenti (Invitrogen), contenenti il plasmide modulatore a basso numero di copie denominato pREP4.

Le colonie positive sono state selezionate su piastre di Luria agar contenenti ampicillina (50 $\mu\text{g/ml}$) e kanamicina (12.5 $\mu\text{g/ml}$). Tra tutte le colonie positive sono state selezionate 4 colonie per ciascun frammento per le quali si è proceduto all’induzione.

Ogni colonia è stata fatta crescere per 18 ore (o/n) in Luria Broth (LB) contenente gli antibiotici ampicillina e kanamicina. Il giorno successivo si è proceduto al rilancio in 50 ml di brodo LB senza antibiotici fino alla fase logaritmica di crescita di 0.45 O.D.; stimata allo spettrofotometro alla lunghezza d’onda di 600 nm.

Raggiunta tale fase di crescita, sono state prese tre aliquote di 5 ml nelle quali si sono aggiunti 10 μl di IPTG 1M. Le colture sono state ulteriormente incubate a 37°C rispettivamente per 60', 90' e 120'.

Ultimata la fase di induzione, le colture batteriche sono state centrifugate a 5000 rpm per 10 min a 4°C e risospese in 310 μl di PBS pH 7.2.

Un’ aliquota di 6 μl è stata fatta bollire per 5 min in loading buffer (2% SDS, 5% 2- β -mercaptoetanol, 10% glicerolo, 62.5 mM Tris), fatta correre in un gel di polyacrilamide al 12 % ed infine analizzata mediante immunoblotting.

Purificazione e identificazione delle proteine espresse

Dopo l'analisi dei campioni indotti mediante immunoblotting, l'attenzione è stata riposta sul clone contenente il frammento da 610 bp di *E. granulosus*. Per la purificazione della proteina di espressione è stata utilizzata una brodocoltura di 100 ml indotta per 3 ore con 2mM di IPTG.

La brodocoltura è stata poi centrifugata a 5000 rpm per 15 min ed il pellet risospeso in 1 ml di lysis buffer B (8 M urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl; pH 8.0). Questa soluzione è stata incubata per 2 h a temperatura ambiente in leggera agitazione. Subito dopo è stata centrifugata a 12.000 rpm e il surnatante è stato fatto passare attraverso colonne di affinità al nickel (Ni-NTA Spin, Qiagen).

La concentrazione della proteina di fusione con le 6 istidine è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica a 750 nm con l'utilizzo del Kit DC-protein assay della Bio-Rad.

Estrazione delle proteine

I protoscolici provenienti dalle singole cisti epatiche o polmonari sono stati pellettati a 12,000 rpm per 30 min, lavati 2 volte con phosphate buffer saline (PBS, 0.1 M phosphate, 0.33 M NaCl, pH 7.2) e infine risospesi in un ml di PBS pH 7.2. La concentrazione delle proteine totali delle sospensioni lavate è stata determinata utilizzando il Kit DC protein assay reagent (Bio-Rad, Richmond, CA) secondo il protocollo della casa produttrice.

SDS-PAGE

L'SDS-PAGE è stato effettuato secondo la metodica descritta da Laemmli (1970). Le corse elettroforetiche sono state effettuate utilizzando l'apparecchio Mini Protean II Cell (Bio-Rad). I gels sono stati preparati in modo da avere un "separating gel" ad una concentrazione finale di acrylamide/bisacrylamide (Bio-Rad, 37.5: 1) al 12% e uno "stacking gel" al 4%. Aliquote di 20 µg di proteine, provenienti dai protoscolici lavati e concentrati, sono stati solubilizzate in 20 µl di loading buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanolo, 10% glicerolo e 0.01% Bromophenol Blue), bollite per 5 min e raffreddate a 20 °C.

I campioni sono stati fatti correre in un Vertical Stab Gel Apparatus (Bio-Rad) contenente 800 ml di running buffer (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS; pH 8.3) a 200 Volts per 1 ora. La mobilità elettroforetica delle proteine dei campioni è stata valutata in relazione alla mobilità elettroforetica degli standards molecolari utilizzati, costituiti da una miscela di proteine con peso molecolare compreso tra 14.4 e 97.4 kDa (Bio-Rad) e contrassegnate con colori differenti. I gels di SDS-PAGE, dopo la corsa elettroforetica, sono stati colorati con una soluzione allo 0.25% di Blue Comassie R 250 (Sigma) in 25% di isopropanolo (Sigma) e 10% di acido acetico (Carlo Erba) o processate per l'immunoblotting.

Immunoblotting

I gels, dopo la corsa elettroforetica, sono stati tenuti per 15 min in 300 ml di transfer buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina, 20% metanolo) e

successivamente le proteine trasferite su membrane di nitrocellulosa da 0.45 μm (Sigma) mediante un SemiDry Apparatus (Bio-Rad) a 15 Volts per 1 ora. La bontà del trasferimento è stata stimata utilizzando le proteine standard del marker caleidoscopico come punto di riferimento. Dopo l' Western blotting, le nitrocellulose sono state incubate per un' ora a temperatura ambiente (t.a.) in PBS pH 7.4 contenente 2% di skim milk (Difco, Detroit, USA).

Le nitrocellulose sono stata poi messe ad incubare a 37 °C per 1 ora con un siero, provenienti da un ariete provvisto di una cisti epatica uniloculare fertile evidenziata con l'ecografo e con dei sieri provenienti da pecore infestate, diluiti 1:100 in PBS-2% skim milk. Dopo 4 lavaggi di 10 min ciascuno con PBS-2% skim milk a t.a. ed in leggera agitazione, le membrane sono state incubate a 37 °C per 1 ora con immunoglobuline anti-IgG di pecora coniugate con fosfatasi (Kirkegaard e Perry, Gaithersburg, Maryland) diluite in PBS-2% skim milk. Dopo 4 ulteriori lavaggi di 10 min ciascuno in PBS-2% skim milk, le membrane sono state messe a contatto con il substrato di sviluppo della fosfatasi contenente NBT (Nitroblue Tetrazolium, Promega) e BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate, Promega). Dopo lo sviluppo del colore, le nitrocellulose sono state lavate con H₂O distillata e asciugate all'aria.

Produzione di anticorpi anti-proteina ricombinante.

Per determinare l'immunogenicità della proteina ricombinante, abbiamo utilizzato un agnello di razza *sarda* di 40 giorni di età. L'agnello è stato sottoposto a visita clinica preliminare mentre, per escludere presenza di anticorpi anti-proteina ricombinante, abbiamo analizzato il siero mediante immunoblotting. Prima di iniziare il

protocollo di immunizzazione, l'animale è stato sottoposto a trattamento antiparassitario e ad un periodo di acclimatemento di 15 giorni. Durante le fase di acclimatemento e immunizzazione l' agnello è stato stabulato presso un paddock della Facoltà di Medicina Veterinaria di Sassari. Il paddock e le attrezzature ivi inserite rispondono al DLgs 116 del 27/gennaio 97 riguardante " Attuazione della direttiva n° 86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali od altri fini scientifici".

Protocollo di immunizzazione

Il protocollo di immunizzazione è stato così articolato:

- un inoculo sottocute di 0.4 ml di antigene (proteina purificata emulsionata in rapporto 1:1 con adiuvante completo di Freund);
- un inoculo sottocute, dopo tre settimane, di 0.4 ml di antigene (proteina purificata emulsionata in rapporto 1:1 con adiuvante incompleto di Freund);
- un inoculo intramuscolo, dopo otto giorni, di 0.2 ml di antigene (solo proteina purificata).

Dopo una settimana dall'ultimo inoculo si è proceduto a salassare l' agnello. Il sangue è stato sierato ed il siero stoccato a -20°C.

Risultati

Analisi delle cisti ovine

L'indagine condotta sugli ovini ha consentito di rilevare una prevalenza totale all'infestazione per Echinococcosi cistica del 67,6% con una fertilità del 11,2%. L'Abbondanza (numero Idatidi/ animali esaminati) è risultata di 5,4; mentre l'Intensità Media (numero Idatidi / animali positivi) è stata di 8,0.

La Provincia di Nuoro si è confermata il distretto in cui si rileva la prevalenza più alta all'infestazione (85,9%) e i livelli di fertilità delle Idatidi più elevati (17,5%). In Provincia di Sassari i livelli di infestazione hanno mostrato un lieve calo rispetto agli ultimi rilievi effettuati; infatti la prevalenza si è portata dal 75,6% nel 2001 (Scala *et al*, 2001) al 59,8% attuale, mentre il tasso di fertilità è risultato pressochè costante (8,6%). La differenza fra le prevalenze e la fertilità delle due Provincie messe a confronto è risultata in entrambi i casi statisticamente significativa al Test del χ^2 ($P < 0,001$).

Analisi degli ampliconi

Dal contenuto 54 idatidi epatiche, 38 polmonari e 1 splenica, è stato estratto il DNA che, dopo lettura spettrofotometrica, è stato diluito alla concentrazione di 250 ng/ μ l. Un μ l di ciascun campione è stato utilizzato per la reazione di polimerizzazione a catena (PCR) insieme alle coppie dei primers riportati nella Tabella n° 1.

Ogni porzione genica, delimitata dai rispettivi primers, è stata evidenziata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio e colorazione con bromuro di etidio.

L'ampiezza degli ampliconi in paia di basi (base pair, bp) è stata stimata confrontando l'altezza dei campioni con le bande di un marker molecolare a grandezza nota.

Gene	Primers	Ampliconi
<i>12S rRNA</i>	5'-TGGTTAATTCCGATAACGAACGAG-3' 5'-TCTAAGAAGTAAGCATTTCGCGCC-3'	304 bp
<i>ETS1</i>	5'-GATGGTGAAGAAGCTTGTTTTTA-3' 5'-CACAAAAGGCCACCATCGTAAC-3'	450 bp
<i>CO1</i>	5'-CGAGTGTTAATGTTAGTGATCCGGTT-3' 5'-AAAAGCAGAACAAAAATTACGATCGA-3'	332 bp
<i>ND1</i>	5'-TGATAGTTTTGGTTGTGGTGTATTCG-3' 5'-AATTATACCCACAACAGCATAAAGCG-3'	251 bp
<i>EG95</i>	5'-TGGACAACCTCACTATCGGCGA-3' 5'-GAATACAAAACCAGCGATTGCG-3'	421 bp

Tabella 1- Geni e primers utilizzati nel lavoro

12 S rRNA (Gene mitocondriale per la subunità 12 ribosomiale)

I primers forward e reverse utilizzati in questo lavoro delimitano una porzione genica di 304 bp (Figura 4, linea 2). L'estensione della PCR a tutti i 93 campioni di DNA ha evidenziato una uniformità di amplificazione.

ETS1 (Ribosomal RNA promoter / External transcribed spacer 1)

I primers per il gene ETS 1 dell'*Echinococcus granulosus* (Picon et al., 1996) hanno amplificato una banda di 450 bp (Figura 4, linea 1). L'estensione della PCR a tutti i 93 campioni di DNA non ha evidenziato differenze tra gli ampliconi (Figura 5).

CO1 (Citocromo ossidasi, Subunità 1)

I primers forward e reverse per il CO1 amplificano una porzione genica di 332 bp (Figura 6). L'estensione della PCR a tutti i 93 campioni di DNA non ha evidenziato differenze di grandezza negli ampliconi ottenuti.

ND1 (NADH deidrogenasi, subunità 1)

I primers per il gene ND1 dell'*Echinococcus granulosus* (Bowles & McManus, 1993) hanno amplificato una banda di 251 bp (Figura 7). L'estensione della PCR a tutti i 93 campioni di DNA non ha evidenziato differenze tra gli ampliconi.

EG95

La proteina codificata dal gene EG95 è stata utilizzata dai ricercatori australiani per produrre un vaccino innocuo ed efficace (Woollard et al., 1998; Lightowers et al., 1999). I primers ricavati dalla sequenza del gene EG95 riportata in banca-dati avrebbero dovuto amplificare una porzione di DNA di 421 bp. L'amplicone ottenuto è stato di 650 bp (Figura 4, linea 3). Tale amplicone è stato sequenziato presso la Ditta MWG Biotech

e la sequenza ottenuta confrontata con quella riportata in banca-dati. Le due sequenze sono sovrapponibili eccetto che per un tratto di introne presente nel nostro campione di DNA e non considerato nella sequenza riportata in banca-dati. Tale sequenza riporta solo l'mRNA, privo pertanto delle porzioni introniche. L'amplicato di 650 bp è stato sottoposto a digestione enzimatica con *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI*, *Sau3A*, *HindIII*, *BamHI*, *SpeI*, *AluI*, *BglI* e *ClaI* per confermare la sequenza nucleotica fornita dalla Ditta MWG. Solo gli enzimi *PstI* e *Sau3A* digeriscono l'amplicone. La PCR e la PCR-RFLP sono state applicate a tutti i 93 campioni di DNA, fornendo anche in questo caso un' uniformità di risultato (Figura 8).

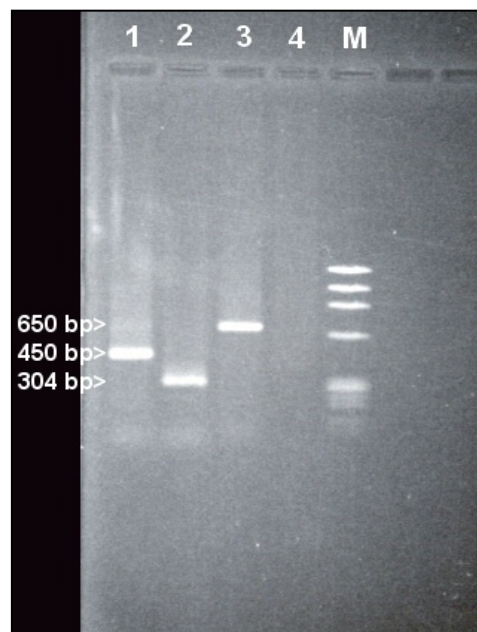


Fig. 4 - Corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.5% dei prodotti di PCR ottenuti utilizzando i primers per il gene ETS1 (linea 1), 12 S (linea 2) e EG95 (linea 3). La linea 4 rappresenta il controllo negativo, mentre M è il marker IX della Roche.

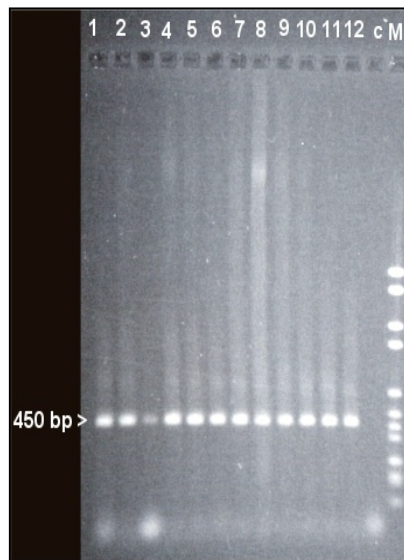


Fig. 5 - Corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.5% di prodotti di PCR ottenuti utilizzando il DNA di 12 ceppi di *Echinococcus granulosus* e i primers per il gene ETS1 (linee 1-12). Il controllo negativo è indicato con c e il marker VI (Roche) con M.

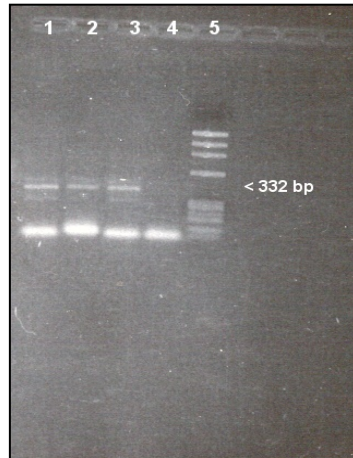


Fig. 6 - Corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.5% di prodotti di PCR ottenuti utilizzando il DNA di 3 ceppi di *Echinococcus granulosus* e i primers per il gene CO1 (linee 1-3). Il controllo negativo è indicato con 4 e il marker VI (Roche) con 5.

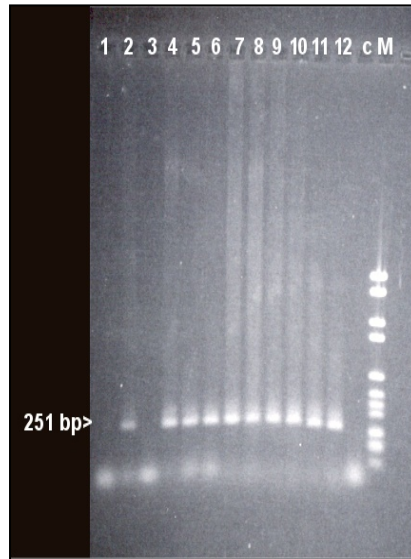


Fig. 7 - Corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.5% di prodotti di PCR ottenuti utilizzando il DNA di 12 ceppi di *Echinococcus granulosus* e i primers per il gene ND1 (linee 1-12). Il controllo negativo è indicato con c e il marker VI (Roche) con M.

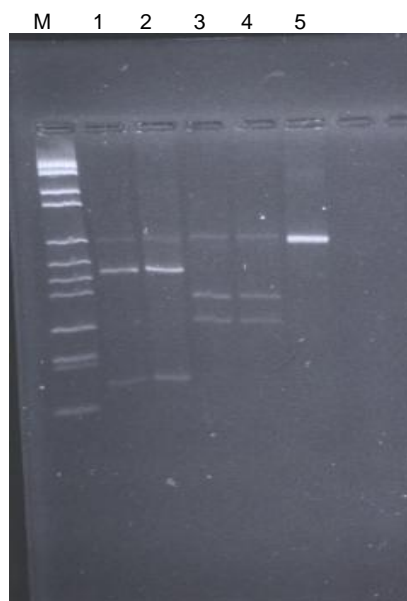


Fig. 8 - Corsa elettroforetica su gel di agarosio all'3% di prodotti di PCR ottenuti utilizzando il DNA di 4 ceppi di *Echinococcus granulosus* e i primers per il gene Eg95. Gli ampliconi sono stati digeriti con l'enzima PstI (1-2) e con l'enzima *Sau3A* (3-4). L'amplicone non digerito è indicato con 5 e il marker VI (Roche) con M.

La presenza di una porzione intronica nell'amplificato da 650 bp, ci ha indotto a lavorare non con il DNA ma bensì con l'mRNA. Per avere la certezza che durante l'estrazione degli mRNA non ci fossimo trascinati inquinamento da DNA, abbiamo aggiunto alla soluzione di lisi la DNase. I messaggeri sono stati retro-trascritti in cDNA e su questi abbiamo impostato una PCR specifica utilizzando i primers per il gene EG95. L'amplificato ottenuto è stato sequenziato. Anche l'amplicone derivato da cDNA ha presentato lo stesso introne da 214 bp. Il frammento contenente l'introne è stato clonato in pQE e inserito all'interno degli E. coli DH5 α . Dopo 3 ore d'induzione con IPTG, la brodocoltura è stata denaturata con 8M urea e la proteina di Echinococco, purificata con le colonne di affinità al nichel (Figura 9A). La presenza del tag di 6 istidine in posizione N-terminale della proteina EG95 è stata valutata con l'anticorpo anti-(His)6 prodotto in topo (Figura 9B).

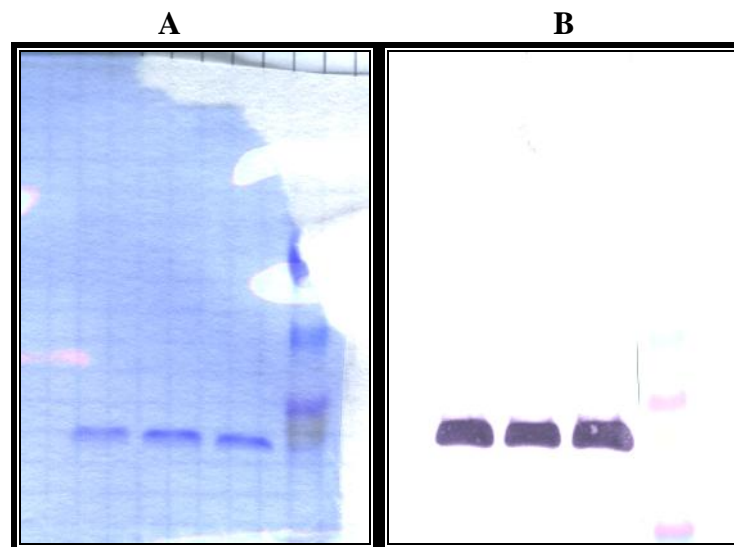


Fig. 9- Pannello A: SDS-PAGE della proteina ricombinante EG95 in 3 frazioni eluite dalla colonna di affinità. Pannello B: immunoblotting dei campioni del pannello A con anticorpo anti-His6.

La proteina ricombinante, somministrata ad un agnello di razza sarda di un mese e mezzo, ha indotto una forte risposta anticorpale (Figura 10).

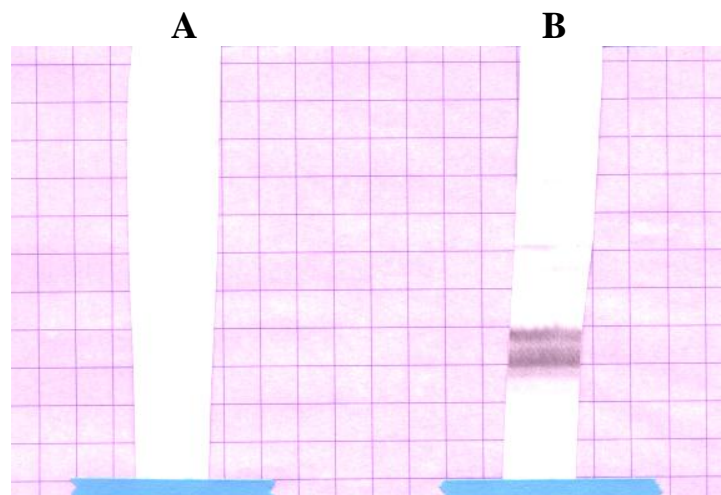


Fig. 10- Pannello A: immunoblotting con proteine totali di *E.granulosus* e siero dell'agnello prima della somministrazione della proteina ricombinante. Pannello B: Immunoblotting con il siero dell'agnello immunizzato

Considerazioni

La presente indagine ha consentito di rilevare negli ovini una situazione epidemiologica non omogenea nei territori considerati.

La Provincia di Nuoro si conferma un distretto in cui il Cestode esercita un'alta pressione parassitaria, riscontrandosi prevalenze ancora molto elevate accompagnate da livelli di fertilità preoccupanti.

Differente invece il “trend” delle parassitosi negli ovini allevati in provincia di Sassari, in cui si evidenzia un decremento dei principali parametri epidemiologici (prevalenza, fertilità, etc.), probabilmente da mettere in relazione anche ad un'aumentata sensibilità degli allevatori che con un più attento *management*, una più razionale alimentazione e l'utilizzo di trattamenti antiparassitari periodici contro i Nematodi con Benzimidazolici, molecole attive anche contro le forme larvali di *Echinococcus granulosus* e che favoriscono, in virtù della loro attività contro i nematodi gastrointestinali e broncopolmonari, una più efficace risposta immunitaria degli ovini contro le idatidi, rispetto ai piccoli ruminanti allevati in provincia di Nuoro.

E' quindi ipotizzabile il fatto che in questa provincia, consuetudini più arcaiche legate all'allevamento ovino (uso di pascoli demaniali, transumanza, etc.) siano maggiormente “radicate” e che queste consentano soprattutto nel Nuorese l'estrinsecarsi in tutta la sua “virulenza” del problema Echinococcosi.

Risultati dell'indagine epidemiologica biomolecolare

Attraverso la digestione enzimatica degli ampliconi ottenuti in PCR (RFLP) secondo la recente metodica messa a punto da Gonzales et al. (2003), è stato possibile

determinare che il ceppo di *Echinococcus granulosus* attualmente circolante negli ovini è il G1 (Ceppo dell'ovino), così come già evidenziato da Idini et al. nel 2000. La diagnosi mediante RFLP-PCR è stata confermata dal sequenziamento del gene mitocondriale ND1 (NADH deidrogenasi), secondo il protocollo di Bowles e McManus (1993).

Produzione di una proteina ricombinante

A partire dai protoscolici di cisti epatiche e polmonari abbiamo isolato e retrotrascritto gli mRNA. Dal cDNA abbiamo amplificato il gene EG95. Tale gene sequenziato ha continuato a presentare un introne. La proteina ricombinante derivata da tale frammento ha indotto nella pecora trattata una forte risposta anticorpale. Occorrerebbe nel prossimo futuro confrontare le sequenze derivate dai protoscolici con quelle derivate dalle oncosfere per confermare le differenze con le sequenze riportate in banca dati. Inoltre, se tali differenze dovessero essere confermate, sarebbe necessario somministrare il vaccino ricombinante ad un campione di pecore e procedere con l'infestazione sperimentale.

Bibliografia essenziale

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., e Struhl, K. (eds). (1993). Current protocols in molecular biology. Wiley Interscience, New York, N.Y.

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

Bowles J, Blair D., e McManus D.P. (1994). Molecular genetic characterization of the cervid strain ('northern form') of *Echinococcus granulosus*. Parasitology 109: 215-221.

Carol H., Nieto A. (1998). A mucosal IgA response, but no systemic antibody response, is evoked by intranasal immunisation of dogs with *Echinococcus granulosus* surface antigens iscoms. Vet. Immunol. Immunopathol. 65(1):29-41.

Craig P.S. (1997). *Echinococcus granulosus*: immunodiagnosis and vaccination, a perspective. Parassitologia 39(4) :345-347

Gabriele F., Palmas C., Ecça A.R. (1990). Analisi epidemiologica dei casi di idatidiosi primitiva nell'uomo operati in Sardegna dal 1974 al 1984. Igiene Moderna 93:416-432.

Gabriele F., Arru E., Firinu A., Palmas S., Bortoletti G. (1992). Valutazione della gravità dell'idatidiosi nell'ovino nelle diverse provincie della Sardegna. Parassitologia 34(1):178-179.

Gabriele F., Bortoletti G., Conchedda M., Palmas C., Arca A.R. (1997). Epidemiology of hydatid disease in the Mediterranean basin with special reference to Italy. Parassitologia 39: 47-52.

- Garippa G., Masala S., Biddau M., Leori G., Arru E. (1998). New data on chemoprophylaxis of ovine hydatidosis. *Parasitologia* 40: 1
- Heath D.D., Lawrence S.B. (1976). *Echinococcus granulosus*: development in vitro from oncosphere to immature hydatid cyst. *Parasitology* 73:417-23.
- Heath D.D., Lawrence S.B. (1996). Antigenic polypeptides of *Echinococcus granulosus* oncospheres and definition of protective molecules. *Parasite Immunology* 18:347-357.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Idini G., Rocca S., Crobeddu S., Nieddu M., Daga C., Grippa G., Leori G., Tola S. (2000). Analisi di 29 ceppi di *Echinococcus granulosus* mediante Polymerase Chain Reaction. XIV Congresso Nazionale SIPAOC: 33-36
- Lightowlers M.W., Lawrence S.B., Gauci C.G. Young J., Ralston M.J. Maas D., Heath D.D. (1996). Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunology* 18: 457-462.
- Lightowlers M.W., Jensen O., Fernandez E., Iriarte J.A. Woollard D.J., Gauci C.G., Jenkins D.J., Heath D.D. (1999). Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. *International Journal for Parasitology* 29: 531-534.
- Picon M., Gutell R.R., Ehrlich R., Zaha A. (1996). Characterization of a flatworm ribosomal RNA-encoding gene: promoter sequence and small subunit rRNA secondary structure. *Gene* 171(2) 215-220.

- Sambrook J., Fritsch E. F., e Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Scala A., Bitti P.L., Fadda M., Pilia A., Varcasia A. (1999). I trattamenti antiparassitari negli allevamenti ovini in Sardegna. VII Congress Fe.Me.S.P.Rum: 267-272
- Scala A., Uras P., Pintori A., poglayen G., Giannetto S., Brianti E., Grippa G. (2001). Epidemiological updating on Hydatidosis in sheep in insular Italy. XX International Congress of Hydatilology, Vol. 34: 33
- Smith D.B., Johnson K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67:31-40.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Woollard D.J., Gauci C.G., Heath D.D., Lightowlers M.W. (1998). Epitope specification and antibody responses to the EG95 hydatid vaccine. *Parasite Immunology* 20:535-540