

Ricerca Corrente IZS SA 01/06
Responsabile Dr.ssa Tola Sebastiana
Scadenza del progetto 31/03/2010

**Diagnosi di Echinococcosi Cistica: allestimento di kit
ELISA basati su proteine native e/o ricombinanti**

Relazione finale (30/10/2010)

Dott.ssa Scilla Mastrandrea	Responsabile U.O.n° 1
Dott.ssa Sebastiana Tola	Responsabile U.O.n° 2

Ricerca finanziata dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali; Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti

Indice generale ed elenco

Introduzione	pag	5
Materiali e metodi	pag	9
Risultati	pag	17
Discussione	pag	25
Bibliografia	pag	26
Allegato 1- Attività collaterali	pag	28
Allegato 2- Consenso informato	pag	29
Allegato 3- Divulgazione dei risultati	pag	30
Allegato 4- Divulgazione dello screening	pag	31
Allegato 5- Report degli esami effettuati	pag	32

Elenco dei collaboratori

U.O. n°1

- Dr.ssa Mastrandrea Scilla- coordinamento e prelievo**
- Dr.ssa Sanna Giovanna- ricerca e analisi di laboratorio**

U.O.n°2

- Dr.ssa Tola Sebastiana – coordinamento**
- Dr.ssa Longheu Carla- ricerca e analisi di laboratorio**
- Dr.ssa Corona Lucia - ricerca e analisi di laboratorio**
- Dr. Onni Toniangelo - ricerca e analisi di laboratorio**

Sintesi



Idatidosi o echinococcosi cistica (CE) è una zoonosi causata dagli stadi larvali del cestode *Echinococcus granulosus*. In questo studio, si è proceduto all'analisi e all'elaborazione statistica dei dati, raccolti attraverso le schede di dimissione ospedaliera, dei pazienti dimessi con diagnosi di Echinococcosi cistica nella Regione Sardegna negli anni 2001-2005.

I dati ottenuti confermano l'elevata prevalenza di echinococcosi umana in Sardegna e l'importanza di un programma di controllo continuo ed efficace.

In questo lavoro abbiamo raccolto 6.055 sieri provenienti da diversi gruppi di pazienti: gruppo A, 5.758 sieri dai centri trasfusionali della Sardegna (soggetti sani), gruppo B, 175 sieri da una categoria ad alto rischio, il gruppo C, 76 sieri di pazienti con storia clinica di echinococcosi cistica recente o passata e il gruppo D, 46 sieri raccolti dagli abitanti di Chiaramonti, un paese con un'alta incidenza di CE. Tutti i sieri sono stati analizzati mediante un test ELISA basato su antigeni purificati da liquido cistico ovino allo scopo di individuare gli anticorpi contro l'*Echinococcus granulosus*. I sieri positivi sono stati confermati mediante immunoblotting.

Summary

Hydatidosis or cystic echinococcosis (CE) is a zoonosis caused by infection with the larval stage of the cestode tapeworm *Echinococcus granulosus*. In this study, using hospital discharge records drawn from the regional data-base, we evaluated the prevalence rates of cystic echinococcosis from 2001 to 2005 in Sardinia. During this period, a total of 1082 discharges were recorded corresponding to a regional discharge rate of 0.00066 and a disease rate of 0.00047. These data confirm the high prevalence of human echinococcosis in Sardinia and state the importance of continuous and more effective control programme.

Furthermore, in this work we have collected 6055 sera from different patient groups: group A, 5758 sera from the Transfusion Centers of Sardinia (healthy patients); group B, 175 sera from a high-risk category; group C, 76 sera from patients with recent or past clinical history of cystic echinococcosis and group D, 46 sera collected from the inhabitants of Chiaramonti, a country with a high incidence of CE. All sera were analyzed by an ELISA assay based on antigens purified from ovine hydatid cyst fluid to detect antibodies against *Echinococcus granulosus*. Positive sera were confirmed by Western Blotting.

INTRODUZIONE

L'Echinococcosi/Idatidosi è una malattia parassitaria sostenuta da un cestode della famiglia *Taeniidae*, genere *Echinococcus*, il quale, per completare il suo ciclo vitale, ha necessità di passare per due ospiti: un carnivoro (cane, lupo, ecc.) ospite definitivo dove raggiunge lo stadio adulto, e un erbivoro od onnivoro (ruminante, suino, uomo) ospite intermedio, nel quale si sviluppa la forma larvale (idatide).

La parassitosi presente in tutta l'Italia è particolarmente diffusa in Sardegna dove il 16,19% dei cani risultano parassitati da *Echinococcus granulosus*. Ugualmente elevata la prevalenza dell'idatidosi negli animali in produzione zootecnica riferita al periodo 2000-2004: 52% negli ovini, 29% nei caprini, 8,9% nei bovini e 0,02% nei suini, con perdite valutate intorno a 27 miliardi annui (Desogus *et al.*, 2005).

La Sardegna risulta inoltre la regione che con 1059 casi di idatidosi umana operati dal 1974 al 1984 ha l'incidenza media annua più elevata dell'Italia (9,57‰) con un picco pari al 14,02‰ nella provincia di Nuoro (Gabriele *et al.*, 1990).

Non esistono, comunque, dati sistematici e aggiornati sulla diffusione dell'idatidosi in Italia, nonostante la denuncia sia obbligatoria. Le statistiche ufficiali parlano di circa 300 casi l'anno, ma in base a dati ufficiosi si può affermare che si verificano almeno 1000-1500 nuovi casi l'anno (Riganò & Siracusano, 1996).

CATEGORIE A RISCHIO

Gli animali possono trasmettere la malattia direttamente all'uomo: in questo caso sono interessati soprattutto i proprietari degli animali (pastori, allevatori di ovini, caprini, bovini, suini e di cani). Spesso però non è necessario stare a contatto con l'animale per ammalarsi, ma è sufficiente venire a contatto con cose e oggetti che, a loro volta sono stati contaminati dagli animali infetti; generalmente si tratta del terreno che viene inquinato dalle feci e così l'uomo può ammalarsi, ad esempio, ingerendo verdura cruda o frutta (fragole) dove possono annidarsi le uova.

L'infezione rappresenta inoltre un rischio biologico professionale in medicina veterinaria. E' importante sottolineare la particolare difficoltà esistente nel costruire uno schema razionale di prevenzione delle zoonosi professionali, poiché il problema affonda le sue radici in campo veterinario e manifesta i suoi effetti in campo medico. Fonte del pericolo sono gli animali e controllare la sanità animale rappresenta la prevenzione "alla fonte" del problema. In Italia, la diffusione della malattia, desumibile dalla notifica ufficiale dei casi, è sottostimata, poiché i dati pubblicati sono largamente in difetto (ospiti intermedi animali), del tutto inattendibili (uomo) o praticamente assenti (cani). E' necessario, inoltre, ricordare che negli animali non è facile avere dati esatti, sia perché le cisti molto piccole o non superficiali sfuggono facilmente all'ispezione veterinaria, sia perché la macellazione clandestina di animali recettivi (agnelli e capretti) è ancora oggi diffusa in alcune regioni italiane. Va inoltre ricordato che il D.L. 191/2006, in attuazione della Direttiva 2003/99/CE, pone l'Echinococcosi tra le zoonosi da sottoporre a sorveglianza. Infatti, l' art. 3, comma 1 della Direttiva comunitaria, obbliga gli Stati membri "...alla raccolta, all'analisi e alla tempestiva pubblicazione dei dati relativi all'incidenza di zoonosi, di agenti zoonotici e di resistenza agli antimicrobici ad essi correlata..". Pertanto l'echinococcosi cistica

rientra tra le malattie per le quali è previsto un riepilogo annuale da parte delle ASL al Ministero. Occorre però stabilire un flusso informativo continuo tra Ministero e ISTAT in modo da avere un aggiornamento e pubblicazione dei dati regionali. E' importante sottolineare che a causa dell'elevato numero di immigranti dall'Oriente e dall'Africa e dei cambiamenti presenti negli allevamenti e nei macelli, in Italia come nel resto del mondo, le zoonosi da cestodi sono attualmente considerate malattie parassitarie emergenti o riemergenti e che il controllo diventa sempre più difficile (Craig & Pawlowski, 2001).

COME VIENE EFFETTUATA LA DIAGNOSI

La sintomatologia dell'iatidiosi 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).

Dopo aver evidenziato la presenza di cisti mediante tecniche per immagine, o dopo che gli accertamenti clinici inducono a sospettare che possa trattarsi di iatidiosi, l'indagine immunologica è sempre e comunque indispensabile per effettuare la diagnostica definitiva. Successivamente, dopo trattamento farmacologico e/o chirurgico, il monitoraggio del paziente viene sempre eseguito ecograficamente e sierologicamente.

Pertanto una diagnosi precoce può procurare sostanziali miglioramenti nella qualità del trattamento clinico e farmacologico, e poiché devono essere eseguiti sia accertamenti clinici che strumentali e di laboratorio è indispensabile una stretta collaborazione tra il medico curante e gli specialisti.

L'echinococcosi cistica (EC) è una delle poche malattie parassitarie la cui diagnosi biologica sia basata sulla sierologia invece che sull'isolamento del parassita (diagnostica indiretta).

Tuttavia l'indagine sierologica nell'EC è ancora poco soddisfacente, perché la risposta anticorpale dell'ospite è poco prevedibile, con possibilità di falsi negativi, reazioni crociate con altre parassitosi (cisticercosi) e falsi positivi in caso di neoplasie.

La risposta anticorpale è influenzata dallo stadio evolutivo della cisti, con falsi negativi nelle cisti recenti o in fase involutiva (cisti solida o calcificata). Un'altra variabile in grado di influenzare la risposta anticorpale è la localizzazione della lesione; infatti cisti polmonari, spleniche e renali sono associate a titoli anticorpali piuttosto bassi o negativi (Craig, 1986; Wen *et al.*, 1994). Un test positivo in presenza di immagine ecografia suggestiva di cisti da echinococco autorizza a fare diagnosi, ma non fornisce informazioni sulla fase evolutiva della cisti. Così nel follow-up della malattia un test sierologico isolato, seppure a titolo elevato, è poco significativo; per un giudizio sulla risposta al trattamento sono più utili le variazioni del titolo anticorpale nel tempo e, specialmente nel lungo periodo (mesi, talvolta anni).

Le metodiche sierologiche disponibili per la diagnosi ed il follow-up dell'EC sono varie, ma la scelta dipende più spesso dalla disponibilità del test presso il laboratorio, piuttosto che dalla sua sensibilità e specificità, che dipendono dalla natura e dal grado di purezza dell'antigene utilizzato.

Test come la reazione di Casoni, iniezione intradermica di determinanti antigeniche di *E. granulosus*, hanno ormai solo un valore storico. 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). Un altro test con una buona specificità ma con una sensibilità non molto alta, anche se maggiore dell'IHA, è l'IgG ELISA, un po' più costoso del precedente e di esecuzione più complessa. La scarsa sensibilità è una caratteristica comune di test sierologici disponibili per l'EC e per ovviare a questo problema solitamente si utilizzano almeno due metodiche, accoppiate sia nella diagnosi che nel follow-up, che generalmente sono IHA ed IgG ELISA (Force *et al.*, 1992). Le metodiche di immunoblotting, che si basa sul riconoscimento di specifici antigeni del parassita, è molto sensibile ma il loro costo le rende però da riservare ai casi di diagnosi dubbia. A questo si aggiunge che non tutti gli ospedali sono dotati di personale specializzato e di apparecchiature specifiche in grado di effettuare tale tecnica.

Negli ultimi anni, a scopo diagnostico, sono state prodotte proteine ricombinanti e peptidi diagnostici allo scopo di 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).

ANTIGENI del LIQUIDO CISTICO

Il liquido cistico (HCF, hydatid cyst fluid) è una complessa miscela di glico e lipoproteine, 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 di EC 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 & 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 EC è preferibile purificare e utilizzare due lipoproteine dell'HCF: antigene B e antigene 5.

Antigene B (Oriol *et al.*, 1971)- E' una proteina 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) e induttore di apoptosi delle cellule immunitarie nei pazienti con malattia attiva (Riganò *et al.*, 2002).

Attualmente, la diagnosi mediante immunoblot dell'antigene B rappresenta il miglior sistema diagnostico di EC (Ortona *et al.*, 2000). Tuttavia va sempre tenuto presente che il 18% dei sieri di pazienti con EC 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)- E' 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 nelle 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'EC umana. Tuttavia nel 10-40% di pazienti affetti da EC e sottoposti ad intervento chirurgico non è stato possibile rivelare in ELISA anticorpi anti-Ag5 (Schantz & 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).

SCOPO DELLA RICERCA

A) Allestire e standardizzare un sistema diagnostico basato sull'utilizzo di antigeni estratti dal liquido cistico idatideo.

B) Utilizzare il sistema diagnostico per coadiuvare il medico nella diagnosi di Echinococcosi cistica, stabilendo una stretta collaborazione tra Sanità Pubblica umana e veterinaria

MATERIALI E METODI

Approvvigionamento di liquido cistico (U.O.n°2)

Abbiamo esaminato un centinaio 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, dopo l'aspirazione del liquido cistico, sono state prelevate le membrane proliferi e i protoscolici (Figure 1-2).



Figura 1- Organi infestati da *Echinococcus granulosus* (lato sinistro: polmone, lato destro : fegato) provenienti dal mattatoio di Bortigali



A



B

Figura 2- Prelievo del liquido cistico da un polmone fortemente infestato (foto A) e della membrana prolifera (foto B)

Di questi ultimi è stata valutata la vitalità attraverso l'esame a fresco al microscopio (Figura 3).

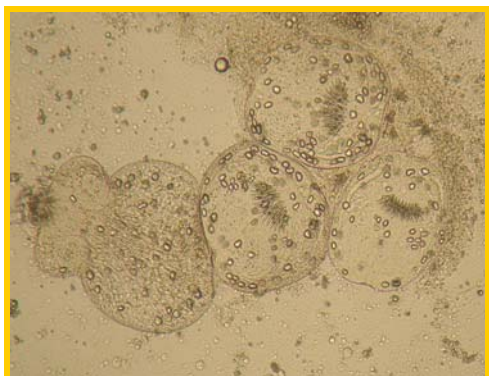


Figura 3 – Esame a fresco dei protoscolici

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

Cisti idatidee (U.O.n°2)

La cisti idatidea si presenta come una vescicola a pareti bianco-lattescenti costituita da 2 membrane concentriche: la membrana prolifera o germinativa (Figura 2), situata internamente e costituita da un sottile strato ricco di cellule; la membrana cuticolare, costituita da uno strato chitinoso di lamelle concentriche. L'intera idatide è avviluppata da una membrana connettivale di pertinenza dell'ospite detta avventizia, costituita da cellule istocitarie a palizzata. All'interno della cisti si trova il liquido cistico, una sostanza chiara ed incolore composta di acqua, proteine, sali minerali e batteriologicamente sterile (Figura 2). Grazie alla pressione di questo liquido la membrana prolifera rimane a contatto con la cuticolare pur senza contrarre alcuna aderenza. La membrana germinativa origina per gemmazione le vescicole prolifere, che possono contenere uno o diverse decine di protoscolici invaginati (200-250 μm). Queste vescicole possono staccarsi e rimanere in sospensione nel liquido, o anche rompersi e liberare gli scolici. I corpuscoli all'interno della cisti costituiscono la sabbia idatigena. Ogni cisti contiene in media 3-6cc di sabbia idatigena, che corrispondono a circa 2-3 milioni di protoscolici (Figura 3).

Preparazione degli antigeni dal liquido cistico (HCF) (U.O.n°2)

Il liquido cistico aspirato da diverse cisti fertili epatiche e polmonari (Figura 2) è stato riunito e conservato a -80°C fino al momento dell'uso. Gli antigeni B e 5 sono stati precipitati in presenza di buffer acetato 0.005 M, pH5 secondo la metodica descritta da Oriol *et al.* (1971). Gli antigeni 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 4 ml di PBS pH 7.2. La concentrazione dei due antigeni è stata determinata utilizzando il Kit DC protein assay reagent (Bio-Rad, Richmond, CA) secondo il protocollo della casa produttrice. Le aliquote contenenti gli antigeni B e 5 sono state conservate a -20°C o fatte correre nei gels di acrilamide/bis in condizioni denaturanti e non-denaturanti, come descritto successivamente.

SDS-PAGE (U.O.n°2)

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 acrilamide/bisacrilamide (Bio-Rad, 37.5: 1) al 10% e uno "stacking gel" al 4%. Aliquote di 5 µg di antigeni 5 e B sono state solubilizzate in 10 µl di loading buffer (diluizione 1:2) (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 5% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 10% glicerolo e 0.01% Bromophenol Blue), bollite per 2 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 (U.O.n°2)

I gels, dopo la corsa elettroforetica, sono stati tenuti per 30 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 2 ore a temperatura ambiente (t.a.) in PBS pH 7.4 contenente 5% di skim milk (Difco, Detroit, USA).

Le nitrocellulose sono stata poi messe ad incubare a temperatura ambiente (ta) per 1 ora con i sieri umani diluiti 1:100 in PBS-2% skim milk. Dopo 6 lavaggi di 10 min ciascuno con PBS-5% 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 uomo coniugate con perossidasi (Kirkegaard e Perry, Gaithersburg, Maryland) diluite in PBS-5% skim milk. Dopo 6 ulteriori lavaggi di 10 min ciascuno in PBS-5% skim milk, le membrane sono state messe a contatto con il substrato di sviluppo della perossidasi contenente 4-cloro-1-naftolo (IBI) e 30% di H₂O₂ (Sigma). Dopo lo sviluppo del colore, le nitrocellulose sono state lavate con H₂O distillata e asciugate all'aria.

Sieri umani: controllo positivo e negativo

La Dott.ssa Alessandra Siracusano dell' Istituto Superiore di Sanità ha gentilmente fornito un pool di sieri positivi, mentre i sieri negativi sono stati forniti dal team del laboratorio Ricerca e Sviluppo dell' Istituto Zooprofilattico della Sardegna

Sieri umani (UU.OO. 1 e 2)

Sono stati raccolti 6055 sieri umani appartenenti a diverse tipologie di popolazione

-**gruppo A**: un campione rappresentativo (n=5758) della popolazione adulta di donatori di sangue afferenti ai Centri Trasfusionali (CT) presenti nel territorio regionale sardo (Tabelle 1 e 2). Ai donatori è stato richiesto il consenso informato all' esecuzione dell' analisi (vedi Allegato 1)

-**gruppo B**: un campione rappresentativo (n=175) di lavoratori del settore zootecnico rappresentato dagli operatori ARA (veterinari e agronomi) (Tabella 3). Prima del prelievo i tecnici ARA hanno firmato il consenso informato

-**gruppo C**: pazienti (n=76) con storia clinica presente riferita ad echinococcosi cistica (presenza di cisti attive, transitorie e inattive) o passata (interventi chirurgici).

- **gruppo D**: abitanti del comune di Chiaramonti (n=46) che dall' analisi delle schede SDO aveva presentato un' alta incidenza di pazienti ricoverati per idatidosi. Prima dei prelievi gli abitanti di Chiaramonti hanno firmato il consenso informato.

ELISA (UU.OO. 1 e 2)

Tutti i sieri sono stati esaminati in ELISA. Piastre di polistirene a 96 pozzetti sono state sensibilizzate con 5µg/ml di antigene purificato in tampone carbonato/bicarbonato pH 9.6 a 4°C per 18 ore. Dopo vari lavaggi con PBS contenente Tween 20 (washing buffer), la piastra è stata saturata mediante incubazione per 1 ora a 37°C con washing buffer + 1% BSA (blocking buffer). Dopo vari lavaggi, la piastra è stata incubata per 1 ora a 37°C con i sieri umani diluiti 1:100 in blocking buffer. Come controllo positivo è stato utilizzato il siero di un allevatore di 65 anni affetto da echinococcosi cistica confermata da controlli ecografici. Dopo ulteriori lavaggi, la piastra è stata incubata a 37°C per 1 ora con anti-human IgG coniugato con perossidasi diluito in blocking buffer (B.B.). La reazione è stata sviluppata con Buffer Citrato pH 5.0 + OPD + H₂O₂ e bloccata con H₂SO₄. La lettura spettrofotometrica delle piastre è stata fatta ad una lunghezza d' onda di 492 nm. I sieri positivi o dubbi sono stati analizzati in Immunoblotting.



Tabella 1- Localizzazione dei 13 centri trasfusionali (CT) della Regione Sardegna dai quali sono stati raccolti 5758 sierii

Centri Trasfusionali	Sieri raccolti
Alghero	162
Ozieri	151
Sassari	1009
Tempio	100
Sorgono	153
Oristano	442
San Gavino	181
Cagliari	846
Nuoro	1000
Olbia	300
Lanusei	410
Carbonia	546
Iglesias	458
Totale	5758

Tabella 2- Numero dei sieri raccolto nei 13 centri trasfusionali (CT) della Regione Sardegna .

Associazione Regionale Allevatori (ARA)	
Sassari	70
Oristano	18
Nuoro	40
Cagliari	47
Totale	175

Tabella 3- Sieri prelevati agli agronomi e veterinari delle 4 sedi dell'ARA Sardegna.

Ricerca delle IgE totali e delle sottoclassi IgG (U.O. n° 2)

I sieri risultati positivi all' IB sono stati sottoposti ad ulteriori determinazioni. Nell'ambito della classe IgG, è stata determinata la concentrazione delle 4 sottoclassi IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Si è valutata, inoltre, la concentrazione delle immunoglobuline E (human IgE) che hanno un ruolo determinante nelle reazioni allergiche. Piastre sensibilizzate con antigene purificato (vedi sopra) sono state incubate con i sieri dei pazienti affetti da echinococcosi cistica. Dopo i lavaggi, le piastre sono state ulteriormente incubate con gli anti-human IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (Sigma, diluiti 1:5000 in B.B.) e con l'anti-human IgE (Sigma, diluiti 1:10.000 in B.B.). La reazione è stata sviluppata con Buffer Citrato pH 5.0 + OPD + H₂O₂ e bloccata con H₂SO₄. La lettura spettrofotometrica delle piastre è stata fatta ad una lunghezza d'onda di 492 nm

Dosaggio delle citochine (U.O.n°2)

I sieri dei pazienti risultati positivi all' IB sono stati sottoposti ad ulteriori analisi. In particolare sono state analizzate le seguenti Interleuchine o citochine :

- Interleuchina 2 (human IL-2)
- Interleuchina 4 (human IL-4)
- Interleuchina 12 + p40 (human IL-12 +p40)
- Interferone gamma (human IFN- γ)
- Fattore di necrosi tumorale alfa (human TNF- α)

L'analisi quantitativa delle citochine presenti nei sieri dei pazienti è stata eseguita mediante l'utilizzo di piastre ELISA acquistate dalla Ditta BioSource International (Camarillo, CA) in accordo con il protocollo fornito dalla casa produttrice.

Analisi delle Schede di dimissione ospedaliera (SDO) (U.O. 1)

Le schede SDO della Regione Sardegna, relative ai ricoveri per E.C. effettuati negli anni 2001-2005, sono state fornite dall'Assessorato Igiene e Sanità della Regione Sardegna.

Per la selezione delle schede è stato utilizzato il codice di classificazione internazionale di malattia (ICD-9-CM) codice 122.0-9

Le schede sono state analizzate mediante elaborazione statistica e i dati sono stati stratificati in base:

età,

sexo,

Comune di nascita,

Comune di residenza,

Provincia di residenza,

Azienda addebitante,

ASL di residenza,

Presidio ospedaliero,
Data di ricovero e dimissione,
Reparto di ammissione e di dimissione,
Regime di ricovero,
Modalità di dimissione,
Numero giornate di ricovero,
Numero di accessi (successivi ricoveri)
Diagnosi principale e secondarie,
Tipo di intervento effettuato (chirurgico e/o medico)
Codice DRG,
Codice MDC
Tipo DRG
Importo degenza.

I dati raccolti sono stati utilizzati per la creazione di una mappa di rischio sulla base del numero dei ricoveri per E.C. riscontrati per anno.

I risultati sono stati utilizzati inoltre per:

- l' identificazione di un paese campione da sottoporre ad indagine sieroepidemiologica.;
- l' identificazione dei mattatoi e degli allevamenti dove effettuare la raccolta di materiale cistico e di campioni di sangue dagli animali parassitati

RISULTATI

Analisi delle Schede di dimissione ospedaliera (SDO) (U.O. 1)

Per avere una visione completa dell'epidemiologia recente nella Regione Sardegna, si è proceduto all'analisi e all'elaborazione statistica dei dati, raccolti attraverso le schede di dimissione ospedaliera, dei pazienti dimessi con diagnosi di Echinococcosi cistica nella Regione Sardegna negli anni 2001-2005.

Le schede SDO sono state fornite dall'Assessorato dell'Igiene, Sanità e Assistenza Sociale della Regione Sardegna al Centro di Riferimento Nazionale per l'Echinococcosi (CeNRE), con sede presso l'IZS della Sardegna di Sassari.

I dati sono stati elaborati per tasso di ricovero (numero di ricoveri ospedalieri/abitanti), provincia di residenza, sesso ed età dei pazienti ricoverati e codici di diagnosi per l'identificazione della localizzazione delle lesioni.

Per ogni provincia è stato valutato il comune di residenza dei pazienti e l'indice di malattia per comune, desunto dal numero di casi per numero di abitanti.

I dati sono suddivisi nelle 4 province sarde (SS, NU, OR, CA) precedenti all'istituzione delle altre 4 province: (Olbia-Tempio, Medio Campidano, Carbonia-Iglesias, Ogliastra) (Tabella 4)

La tabella 2 riassume anche il numero di ricoveri per 100.000 abitanti, sia nel territorio nazionale che nella regione Sardegna.

I dati elaborati consistono di 509 soggetti di cui 8 non residenti in Sardegna, distribuiti in 203 comuni, per un totale di 736 ricoveri; di questi, 227 (30,8%) risultano successivi al primo e sono imputabili sia a successivi accertamenti diagnostici che a interventi terapeutici. I 736 ricoveri interessano il 57,33% della popolazione maschile e il 42,67% della popolazione femminile. L'età media è 54,9 anni, la minima 7 e la massima 100. La fascia d'età più rappresentata risulta quella tra i 61-70 anni (20,79%) seguita dalle fasce di età 71-80 (19,15%) 51-60 (18,34%) e 41-50 (14,26%). La localizzazione epatica risulta maggiormente frequente, (76,9% dei ricoveri) rispetto alla localizzazione polmonare (7,3% dei ricoveri.) Un 15,8% dei ricoveri presenta una diagnosi di echinococcosi non specificata.

La provincia di Nuoro risulta quella con un più alto tasso di ricovero (n° di ricoveri /n° abitanti) pari a 0,00097 e indice di malattia (n° di malati/n° abitanti) di 0,00063, seguita nell'ordine dalle province di Oristano (0,00061 e 0,00043), Sassari (0,00048 e 0,00034) e Cagliari (0,00041 e 0,00029).

Sono stati selezionati i comuni che presentavano un numero di casi superiore a 4 e i comuni nei quali è stato rilevato un maggiore tasso di ricovero sono nell'ordine: **Orroli** (Ca), **Chiamonti** (SS), **Bitti e Orune** (Nu) mentre un maggiore indice di malattia è stato rilevato a Chiamonti, Orune, Orroli e Bitti.

Il paese di **Chiamonti**, con un tasso di ricovero di 0,00478 e un indice di malattia pari a 0,00265, in seguito a contatti con l'amministrazione comunale, è stato scelto come paese campione per eseguire un'indagine sierologia nella popolazione residente per la ricerca di anticorpi anti-echinococco mediante immunoblotting.

I dati SDO della regione Sardegna sono stati confrontati con i dati Nazionali (www.ministerosalute.it) (Tabella 5) espressi come N° dei ricoveri assoluti e il N° dei ricoveri/100000 abitanti: nel periodo 2001-2005 in Sardegna si è osservata una media di 8,2 ricoveri ogni 100.000 abitanti, nettamente superiore ai dati nazionali che sono di 2,1/100.000 abitanti

Provincia	Malati	Abitanti	Indice malattia	Ricoveri	Tasso ricovero
Totale	501	1367374	0,00037	726	0,00053
SS	129	380319	0,00034	184	0,00048
NU	129	205821	0,00063	199	0,00097
OR	43	99862	0,00043	61	0,00061
CA	200	681372	0,00029	282	0,00041

Tabella 4-Tasso di ricovero e indice di malattia suddivisi per provincia

Dati	2001	2002	2003	2004	2005	2001-2005	Media annua
Nazionali	1419 (2,47/10 ⁵)	1285 (2,24/10 ⁵)	1193 (2,08/10 ⁵)	1187 (2,07/10 ⁵)	1072 (1,87/10 ⁵)	6156	1231,2 (2,14/10 ⁵)
Sardegna	145 (8,85/10 ⁵)	151 (9,22/10 ⁵)	122 (7,44/10 ⁵)	144 (8,79/10 ⁵)	111 (6,77/10 ⁵)	673	134,6 (8,21/10 ⁵)

Tabella 5 -Riassuntiva per anno del N° dei ricoveri assoluti e il N° dei ricoveri/ 100000, in parentesi, abitanti nazionali e regione Sardegna

Utilizzo delle proteine totali estratte dal liquido cistico (U.O.n°2)

La corsa elettroforetica del liquido cistico, centrifugato per eliminare i protoscolici, ha evidenziato la presenza di circa 12 proteine di peso molecolare variabile approssimativamente da 5 a 120 kDa (Figura 4, pannello A)

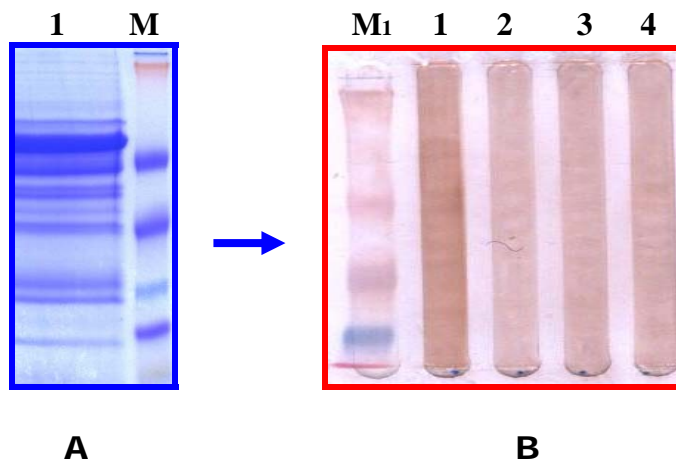


Figura 4- Caratterizzazione antigenica delle proteine totali del liquido cistico. **Pannello A**, Corsa elettroforetica su gel SDS-PAGE delle proteine totali del liquido cistico (linea 1). Linee M e M1, Marker caleidoscopico (Bio-Rad).

Pannello B, Determinazione dell'antigenicit  delle proteine totali del liquido cistico in WB mediante l'utilizzo di un pool di sieri positivi forniti dall'ISS (linea 1), di un siero di un allevatore operato di EC (linea 2), di un siero di un paziente con formazioni cistiche polmonari (linea 3) e di un siero negativo (linea 4).

L' IB con le proteine totali del liquido cistico   stato scartato perch  poco sensibile e leggibile. Dalle proteine totali si   passati alla purificazione e concentrazione degli antigeni B e 5. La stessa procedura di IB   stata applicata alle frazioni purificate a partire dal liquido cistico utilizzato in Figura 4. La corsa elettroforetica, in SDS-PAGE, delle frazioni proteiche precipitate con buffer acetato pH 5.0, ha evidenziato la presenza di un doppietto proteico di 60-65 kDa (Figura 5, pannello A). L'IB con i sieri analizzati in Figura 4, ha evidenziato una reattivit  marcata con il pool di sieri (1-diluizione 1:100; 2- diluizione 1:500; 3-diluizione 1:1000) e una reattivit  chiara con il siero prelevato da un allevatore operato di EC da circa 17 anni fa. Il siero del paziente con formazione cistica calcificata, cos  come i sieri controllo negativo,   risultato negativo (Figura 5, pannello B).

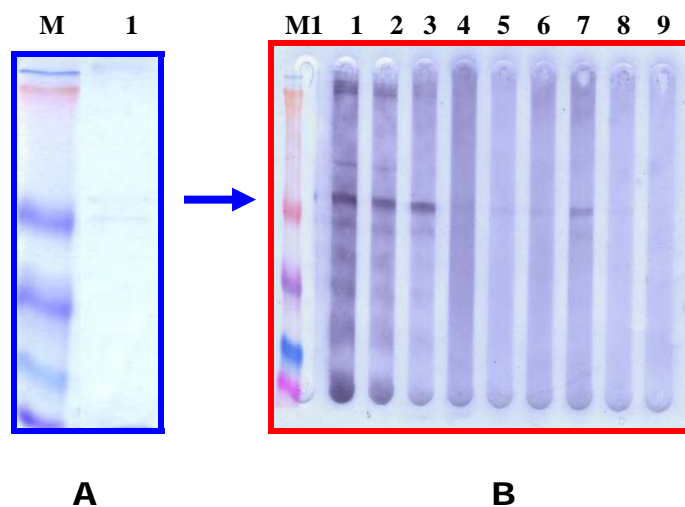


Figura 5- Caratterizzazione antigenica delle frazioni purificate dal liquido cistico. **Pannello A**, Corsa elettroforetica su gel SDS-PAGE delle proteine precipitate del liquido cistico (linea 1). Linee M e M1, Marker caleidoscopico (Bio-Rad).

Pannello B, Determinazione dell'antigenicit  delle frazioni purificate dal liquido cistico in WB mediante l'utilizzo di un pool di sieri provenienti da pazienti con EC (linee 1-3, diluizione 1:100; 1:500 e 1:1000), di un siero di un paziente operato circa 5 anni fa (linea 5), di un siero di un paziente con cisti epatica calcificata (linea 6), di un siero di un allevatore operato di EC (linea 7) e di sieri negativi (linee 4, 8-9). La standardizzazione del metodo di IB ha portato al risultato illustrato nella Figura 6.

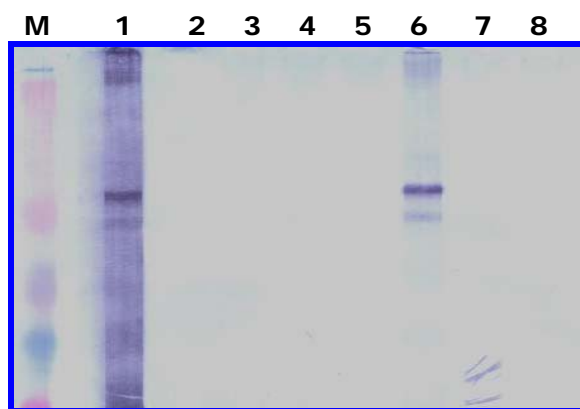


Figura 6- Standardizzazione dell'immunoblotting con sieri positivi (linee 1 e 6) e sieri negativi (linee 2-5 e 7-8) Linea M, marker caleidoscopico.

Gli antigeni purificati e concentrati sono stati utilizzati per allestire un test ELISA. Per il gruppo A, il test ELISA   stato utilizzato come test di screening (high-throughput screening) mentre l'IB come test di conferma per i sieri positivi (valori % di OD superiori al 60%) o dubbi (valori % di OD compresi tra 40 e il 60%) (Figura 10, pannello A). I sieri dubbi all'ELISA sono stati confermati tali solo se all'IB presentano reattivit  agli antigeni purificati alla diluizione 1:10 (Figura 7, pannello B).

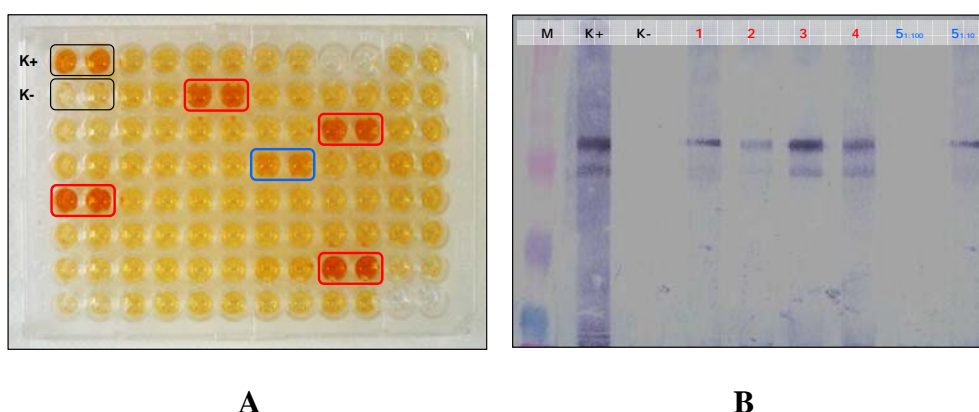


Figura 7- **Pannello A**: analisi mediante ELISA di 44 sieri umani. I pozzetti cerchiati in rosso indicano campioni positivi, quelli in blu campioni dubbi mentre i pozzetti non cerchiati indicano i campioni negativi. **Pannello B**: analisi mediante IB dei 4 sieri risultati positivi all'ELISA (linee 1-4) e del siero dubbio all'ELISA alle due diluizioni 1:100 e 1:10 (linee 5).

Per gli altri 3 gruppi, i sieri sono stati analizzati contemporaneamente con l'ELISA e l'IB. L'analisi e il confronto tra i due test ha prodotto i risultati riportati nella Tabella 6:

	Totale	Positivi	Dubbi	Negativi
Gruppo A	5758	4	6	5748
Gruppo B	175	0	3	172
Gruppo C	76	13	14	49
Gruppo D	46	0	3	43
Totali	6055	17	26	6012

Tabella 6 - Sieri analizzati: gruppo A - popolazione adulta di donatori di sangue afferenti ai Centri Trasfusionali (CT) presenti nel territorio regionale; gruppo B - lavoratori del settore zootecnico rappresentato dagli operatori ARA (veterinari e agronomi); gruppo C - pazienti con storia clinica presente o passata riferita a echinococcosi cistica e gruppo D- abitanti del paese di Chiamonti

I referti relativi ai sieri provenienti dai Centri trasfusionali sono stati inviati ai rispettivi responsabili con l'invito, nei casi di esito positivo o dubbio, a sottoporre i donatori ad ulteriore accertamento strumentale. Nel caso dei 3 sieri dubbi appartenenti al gruppo B, abbiamo contattato gli operatori ARA e ricostruito la loro storia anamnestica: tutti e tre avevano subito in giovane età un intervento chirurgico per l'asportazione di cisti epatiche. I 3 abitanti di Chiamonti (gruppo D), risultati dubbi all'IB, non avevano storie pregresse riconducibili a Idatidosi; pertanto nei referti

abbiamo suggerito la ripetizione del test dopo 6 mesi. I sieri appartenenti al gruppo C provenivano da pazienti ricoverati in vari ospedali della Sardegna. Per la maggior parte di essi si richiedeva l'IB per l'Echinococcosi cistica in presenza di sintomatologia generica come tosse o prurito. Per altri, la richiesta veniva inoltrata in seguito a rilevazione di cisti "di natura parassitaria" nelle ecografie. Per altri ancora, la richiesta veniva effettuata per seguire l'andamento anticorpale in pazienti sottoposti in precedenza ad asportazione chirurgica di cisti idatidee o a trattamento con farmaci antielmintici.

Pazienti positivi all'IB	IL-2	IL-4	IL-12	INF γ	TNF α
	pg/l	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
5353 Cagliari	neg	neg	81	15	neg
494 Nuoro	neg	neg	37	11	neg
132 Nuoro	neg	neg	100,5	15,4	neg
6904 Sassari	neg	neg	29,5	11	-
Pireddu	neg	neg	216	neg	12
Spano	neg	neg	538	neg	34,5
Canu	neg	neg	66,7	neg	neg
Tolu	neg	neg	168	neg	12
2 Uri	neg	neg	46,8	neg	29
3 Uri	neg	neg	124	neg	33
6 Uri	neg	neg	58,03	neg	13
Dore	neg	neg	39,07	neg	13,6
Sotgiu	neg	0,342	84,2	neg	13
Sanna V	neg	neg	81,4	neg	18
Sanna F	neg	neg	114,2	neg	neg
Ragaglia	neg	neg	35,6	neg	neg
K- (Bella)	neg	neg	82	neg	neg

Tabella 7- Analisi delle citochine (IL-2, IL-4, IL-12, INF- γ e TNF- α) nei sieri dei pazienti positivi all'IB.

L'analisi delle citochine (Tabella 7) nei sieri positivi all'IB non ha evidenziato un andamento comune a tutti i soggetti analizzati. Nel caso del paziente Spano (signore di 70 anni con sospetta recidiva polmonare a 10 anni dall'asportazione chirurgica di cisti epatiche e polmonari) si è rilevato un aumento notevole dell'IL-12 (citochina Th1), un valore percentuale delle IgG4 superiore alle IgG1 e un leggero aumento di IgE (Tabella 8). Questo quadro ha fatto supporre la presenza di cisti attive; supposizione confermata dall'analisi strumentale. Il Signor 3 Uri (uomo di 61 anni sottoposto a 4 interventi chirurgici per l'asportazione di cisti idatidee localizzate nel polmone e nel canale midollare) ha presentato solo un aumento delle IL-12 (Tabella 7) con valore di IgG1

leggermente superiore rispetto alle IgG4 e un valore di IgE non molto elevato (Tabella 8). Il Signore 6 Uri (uomo di 57 anni con due interventi per asportazione di cisti idatidee a localizzazione epatica) non ha presentato variazioni rilevanti nei valori di citochine. Al contrario i valori di IgG4 sono risultati nettamente maggiori delle IgG1 (Tabella 8)

Tabella 8- Analisi delle sottoclassi IgG e IgE						
Pazienti positivi	IgG totali	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgE
	%	%	%	%	%	%
5353Cagliari	128	16	22,3	52	29	98,6
494 Nuoro	127	37	35,7	42	30	90,7
132 Nuoro	143	28	52,1	37	59,5	85,7
6904 Sassari	170	98	111	79	78	160
Pireddu	45	5,3	5	4	41	42
Spano	118	24	40	54	79	101
Canu	103	12,5	28	30	16	73
Tolu	99	13,6	37	27	32	70
2 Uri	113	17	18	23	2	78
3 Uri	79	5,6	7,4	10	1,3	56,5
6 Uri	165	39,5	99,7	71	104	126
Pazienti dubbi	IgG totali	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgE
	%	%	%	%	%	%
Moni	100	0,9	16	neg	neg	56
Lunetta	6	0,6	2	neg	neg	19
20 Olbia	27	3	6,5	3	neg	65
168Carbonia	25	1,8	1,9	neg	neg	53
7247 Sassari	38	2	11	37	neg	79
6884 Sassari	39	neg	46	3	neg	51
27Cagliari	23	neg	6	38	neg	35
13 Oristano	4	0,3	6,5	neg	neg	14
55 Sassari	23	2,3	5,7	neg	neg	40

Caso clinico: allevatore di 46 anni, ricoverato per tosse e prurito persistente. All'analisi strumentale ha presentato un cisti polmonare di 15 cm di diametro con margine netto e forma ovulare. Il siero inviatoci dalla Clinica Chirurgica è risultato negativo al test di IB utilizzando l'antigene ovino; come negativi sono risultati i valori delle citochine e IgE. Il paziente è stato sottoposto ad intervento chirurgico e la cisti è

stata recapitata al nostro laboratorio. L'analisi di genotipizzazione dei protoscoli estratti dal liquido cistico, utilizzando il protocollo descritto da Corona *et al.* (2007), ha evidenziato il genotipo G1 (pecora-cane). Il liquido cistico è stato dializzato e l'antigene B, concentrato e purificato, è stato utilizzato per l'IB del paziente operato e degli altri sieri pervenuti. Nella Figura 8 è riportata l'analisi del siero del Paziente con l'antigene ovino dializzato, mentre nella Figura 9, l'IB del siero del Paziente con l'antigene umano dializzato. Il confronto permette di osservare la diversa reattività del siero del Paziente con cisti polmonare.

Corsa elettroforetica antigene ovino dializzato

M 1 2 3 4 5 6

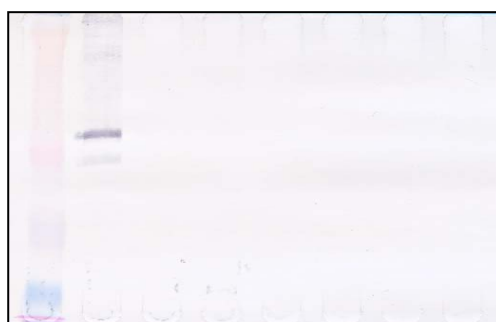


Figura 8- IB con antigene ovino dializzato. Linea 1, siero positivo di paziente con cisti epatiche. Linee 2-5, sieri negativi, Linea 6, Paziente con cisti polmonare

Corsa elettroforetica antigene umano dializzato

M 1 2 3 4 M

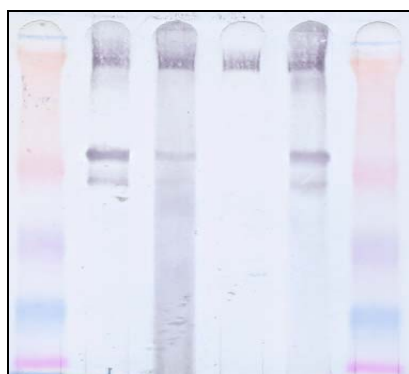


Figura 9- IB con antigene umano dializzato. Linee 1 e 4, sieri positivi di pazienti con cisti epatiche, Linea 2, Paziente con cisti polmonare, Linea 3, siero negativo

L'IB con antigene ovino estratto o da cisti epatiche o da cisti polmonari non ha evidenziato reattività con il siero del Paziente. Al contrario, il siero mostra reattività con l'antigene purificato dalle cisti umana. In entrambi i casi, il controllo positivo ha mostrato reattività anche se più marcata nel caso dell'antigene umano (Figura 9, linea 1).

Questo può far supporre che, in caso di localizzazione epatica, gli anticorpi riconoscano indistintamente l'antigene purificato da liquido cistico ovino e umano. Al contrario, nel paziente con localizzazione polmonare, gli anticorpi riconoscono solo gli antigeni umani. Interessante sarebbe analizzare mediante spettrometria i diversi antigeni purificati.

DISCUSSIONE

Dall'analisi delle SDO è emerso che nel periodo 2001-2005 in Sardegna si è avuta una media di 8,2 ricoveri ogni 100.000 abitanti, nettamente superiore ai dati nazionali che sono di 2,1/100.000 abitanti. Tali dati continuano a posizionare la Sardegna tra le regioni iperendemiche per l'Echinococcosi cistica.

I risultati dell'elaborazione delle schede SDO sono stati utilizzati dal Centro Nazionale di Riferimento per l'Echinococcosi/Idatidosi che opera a Sassari (<http://www.izs-sardegna>) per impostare una campagna di sensibilizzazione e di educazione sanitaria a partire da quei centri ove maggiore è l'indice di malattia nell'uomo. Tali centri sono: in provincia di Sassari, Chiaramonti (5 casi su 1882 abitanti); in provincia di Nuoro, Bitti (5 casi su 3445 abitanti) e Orune (6 casi su 2997 abitanti); in provincia di Cagliari, Orroli (5 casi su 2714 abitanti).

Con questa ricerca abbiamo messo a punto e applicato dei metodi sierologici per effettuare un'indagine epidemiologica su larga scala della popolazione sarda. Tali metodi sierologici saranno messi a disposizione del Centro Nazionale di Riferimento (CeNRE).

Su indicazione della dr.ssa Siracusano dell'ISS che lavora in un gruppo di ricerca designato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) al miglioramento delle tecniche sierologiche, abbiamo allestito un test di screening (ELISA) e un test di conferma (Immunoblotting) basato sull'antigene B dell'*Echinococcus granulosus* (Ortona *et al.*, 2000; Carmena *et al.*, 2006).

La combinazione dei due test e soprattutto la stretta collaborazione stabilita con i medici di base, i medici ospedalieri e i Sindaci dei Comuni più colpiti, ha portato all'analisi di oltre 6000 sieri, durante i due anni della ricerca corrente. La campagna di raccolta e analisi è proseguita anche al termine della ricerca; infatti al 04-10-2010, come si evince dall'Allegato n° 5, sono stati analizzati 7615 sieri.

Lo screening ha permesso di individuare sia nuovi casi che delle recidive in soggetti già sottoposti ad intervento chirurgico o a trattamento farmacologico ma privi di sintomatologia. In entrambe le condizioni abbiamo indirizzato il paziente sull'ulteriore percorso diagnostico strumentale da seguire previo parere del medico di base o ospedaliero. I test sierologici utilizzati hanno funzionato bene, con bande di reazione chiare e specifiche, nei soggetti con cisti a localizzazione epatica o multipla (epatica e

polmonare). Al contrario, nel paziente con cisti attiva di tipo CE1 a sola localizzazione polmonare, l'antigene B purificato dal liquido cistico ovino ha dato una risposta negativa "falso negativo". Nell'IB approntato con l'antigene B purificato dal liquido cistico umano si è osservata una banda di reazione anche nel paziente "falso negativo". Questo dato estremamente interessante potrebbe essere utilizzato in future ricerche per ridurre o eliminare i "falsi negativi".

A conclusione della ricerca è importante rimarcare due punti:

1- la necessità di stabilire o mantenere una stretta collaborazione con i medici di base e soprattutto con i medici ospedalieri. Il paziente affetto da Echinococcosi cistica va seguito per tutta la vita: l'analisi sierologica "a spot" dà delle informazioni estremamente limitate. L'Echinococcosi cistica è una malattia parassitaria con un complesso rapporto ospite-parassita, pertanto è indispensabile unire il quadro clinico agli accertamenti strumentali e sierologici.

2- la necessità di fare formazione continua sul ciclo dell'*Echinococcus granulosus* e sulle linee guida stabilite dal WHO ai medici ospedalieri, molti dei quali provenienti da regioni italiane con un'incidenza della malattia inferiore rispetto alla Sardegna.

BIBLIOGRAFIA

- 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.
- Corona L., Longheu C., Soru A., Mastrandrea S. e Tola S.** (2007). Caratterizzazione di ceppi di *Echinococcus granulosus* mediante PCR-RFLP. Atti del IX Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. pp. 49-50.
- Craig P.S.** (1986). Detection of specific circulating antigen, immune complexes and antibodies in human hydatidosis from Turkana (Kenya) and Great Britain, by enzyme-immunoassays. Parasite Immunol. 8: 171-188.
- Craig P.S., Pawlowski Z.S.** (2001). Cestode zoonoses: Echinococcosis and cysticercosis, an emergent and global problem. NATO Sciences Series. IOS press, vol. 341:1-265
- Desogus G., Boi G., Cotza A., Incollu F., Regali M., Scarano C., Steri G., Usai P., Varcasia A., Scala A., Garippa G.** (2005). Aggiornamenti epidemiologici sull'Echinococcosi cistica in Sardegna. Atti dell'Associazione Italiana Veterinari Igienisti, AIVI:141-145.
- 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. Microbio. Rev. 17: 107-135.
- Force L., Torres J.M. Carrello A., Busca J.** (1992). Evaluation of eight serological tests in the diagnosis of human echinococcosis and follow-up. Clin. Infect. Dis.15: 473-480.
- Gabriele F., Palmas C., Ecça A.R.** (1990). Analisi epidemiologica dei casi di idatidosi primitiva nell'uomo operati in Sardegna dal 1974 al 1984. Igiene Moderna 93:416-432.
- 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.
- 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.
- Matossian R.M., Alami S. Y., Salti I., Araj G.F.** (1976). Serum immunoglobulin levels in human hydatidosis. *Int. J. Parasitol.* 6: 367-371.
- 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.
- 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.
- Riganò R., Siracusano A.** (1996). Diagnosi immunologica dell' idatidosi. *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* 9 (3):1-5
- 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.
- 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.
- Schantz P.M., Gottstein B.** (1986). *Echinococcosis (hydatidosis)*, Vol 1. Academic Press Inc., Orlando, Florida.
- Shepherd J.C., 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.
- Wen H., Craig P.S.** (1994). Immunoglobulin G subclass responses in human cystic and alveolar echinococcosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51:741-748.
- WHO**, 2001. WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. WHO/OIE, Paris
- 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.
- Zhang W., Li J., McManus D.P.** (2003). Concepts in Immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(1): 18-36.

ALLEGATO 1-Attività collaterali

STESURA DEL METODO DI PROVA interno 08RS/07 “ Immunoblotting *Echinococcus granulosus*” ed emissione all’utenza del rapporto di prova

SEMINARI INTERNI ALL’ IZS della Sardegna

- Presentazione della Ricerca Corrente IZS SA 01/06 “Diagnosi di Echinococcosi Cistica: allestimento di kit ELISA basati su proteine native e/o ricombinanti” (Sassari, 13/12/2007)
- Presentazione stato di avanzamento della Ricerca Corrente IZS SA 01/06 (Sassari, 06/06/2008)
- **Scilla Mastrandrea** (Resp. U.O. n°1 della Ricerca Corrente IZS SA 01/06) ha tenuto la relazione “Aggiornamenti sull’epidemiologia dell’Echinococcosi umana in Sardegna” nell’ambito della giornata dedicata alle Parassitosi (Sassari, 23/02/2010)
- **Sebastiana Tola** (Resp. Ricerca Corrente IZS SA 01/06) ha tenuto la relazione “utilizzo di tecniche biomolecolari nella diagnosi e profilassi dell’Echinococcosi” nell’ambito della giornata dedicata alle Parassitosi (Sassari, 23/02/2010)

SEMINARI ESTERNI ALL’ IZS della Sardegna

- Presentazione della Ricerca Corrente IZS SA 01/06 e consegna dei rapporti di prova agli operatori ARA (Macomer, 13/06/2008)
- Presentazione della campagna di screening agli abitanti di Chiaramonti (14/03/2009)

CONGRESSI

Longheu C., Corona L., Mastrandrea S., Cillara G., Masala G. e Tola S. ”Diagnosi di Echinococcosi Cistica umana mediante ELISA e Immunoblotting” Atti del X Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. 2008, pp 76-77.

Tola S., Longheu C., Corona L., Pintus G.F., Marchisio A., Canu E., Pinna S., Gaspa L., Carru C., Deiana L. “Diagnosi di Echinococcosi cistica nei centenari della Sardegna” Atti della Società italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC)- Perfugas 4-6 giugno 2009

TESI SPECIALISTICA in Biotecnologie Molecolari

Dr.ssa Corona Lucia “ **Utilizzo di proteine native per la diagnosi di Echinococcosi cistica nell’uomo e negli ovini e produzione di proteine ricombinanti per la profilassi vaccinale**” Relatore Prof. Fiori Pier Luigi, Correlatore Dott.ssa Sebastiana Tola (14 Aprile 2008).

CONSENSO ALL'ESECUZIONE DEL TEST PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI ANTI-ECHINOCOCCO

L'echinococcosi è una malattia causata da un parassita, l'*Echinococcus granulosus*, che colpisce prevalentemente il cane e gli ovini e, nella forma cistica, anche l'uomo.

Nell'uomo la malattia è diffusa in tutto il mondo nelle zone dove sono presenti allevamenti di bestiame; in Italia la maggior incidenza si ha nelle regioni centrali e meridionali e in particolare in Sardegna.

La diagnosi si formula con esami di laboratorio (ricerca di anticorpi specifici) e con esami strumentali, utili ad evidenziare la presenza di cisti parassitarie: ecografia (fegato) e radiografia-stratificata (polmone).

Per effettuare uno studio sulla prevalenza di questa patologia nella popolazione generale della Sardegna ossia per conoscere quanto sia diffusa questa malattia nella nostra Regione, è necessario ricercare la presenza di anticorpi nel siero.

Per tale motivo chiediamo l'autorizzazione al prelievo di sangue e all'utilizzo del siero per la ricerca di anticorpi anti-Echinococco.

L'esame del siero verrà eseguito nei laboratori dell'Istituto Zooprofilattico della Sardegna dalla Dott.ssa Sebastiana Tola e dalla Dott.ssa Scilla Mastrandrea, referenti dello studio, nel pieno rispetto della vigente normativa sulla privacy (D.Lgs. 30/06/03, n° 196).

AUTORIZZAZIONE al prelievo di sangue venoso e all'esecuzione del test

NOME..... COGNOME.....

NATO/A a..... IL.....

RESIDENTE in.....

VIA.....

TELEFONO.....

FIRMA



Chiararamonti contro l'echinococcosi

Troppi i casi registrati: sarà il paese pilota con screening gratuito

CHIARAMONTI. Basterebbe seguire alcune semplici regole comportamentali e igieniche per scongiurare, eppure l'echinococcosi è una malattia ancora molto diffusa, soprattutto nelle zone dove sono presenti allevamenti di bestiame. Colpisce prevalentemente il cane e gli ovini ma, nella forma cistica, anche l'uomo. La Sardegna in particolare è la regione d'Italia in cui si registrano più casi.

La malattia colpisce cani e ovini ma anche l'uomo in forma cistica

La Sardegna di Sassari dalle dottoresse Sebastiana Toia e Scilla Mastanurra, referenti del Progetto di ricerca per la messa a punto di un test diagnostico, la dottoressa Scilla Mastanurra, medico del Centro di referenza, la dottoressa Sebastiana Toia, responsabile del Progetto di ricerca per la messa a punto di un test diagnostico, la dottoressa Scilla Mastanurra, medico del Centro di referenza, le dottoresse Lucia Corona e Carla Lori-glietti, ricercatrici, e il dottor Mauro Savio, medico veterinario della Asl n. 1.

Al termine della presentazione, chi lo autorizzerà, dopo aver firmato il consenso informato, sarà sottoposto a un prelievo di sangue gratuito e quindi all'analisi del suo campione di siero. Il lesame del siero verrà eseguito nei laboratori dell'Istituto Zooprofilattico del

PLAQUE



L'incontro in Comune dei responsabili del progetto pilota e il libretto informativo sull'echinococcosi

sottofondo che con una semplice analisi del siero, oltre che effettuare uno studio sulla prevalenza della patologia nella popolazione, è possibile fare una diagnosi precoce in soggetti che non hanno ancora sintomi. In previsione della realizzazione del progetto pilota per la determinazione di anticorpi anti-echinococcosi, nei giorni scorsi è già partita una campagna di

Letizia Villa

Secondo i dati ufficiali del ministero della Sanità relativi al 2003, infatti, nell'isola si registra la maggior quantità di casi rispetto al numero della popolazione: almeno 110 casi all'anno. Chiararamonti poi è il paese della provincia di Sassari in cui nel periodo tra il 2001 e il 2005 si è avuto il numero più alto di ricoveri per echinococcosi cistica. Seguono nell'isola Oristano, Bitti e Orune. Chiararamonti sarà il paese pilota, il primo e finora l'unico, di un progetto condotto dal Centro nazionale di referenza per l'echinococcosi istituito nel 2002 all'Istituto Zooprofilattico sperimentale della Sardegna con sede a Sassari. La popolazione che aderirà sarà sottoposta a uno screening gratuito per l'individuazione di anticorpi anti-echinococcosi. I medici del gruppo di ricerca ha incontrato il sindaco Giancarlo Cosca per definire le modali-

tope alfab antiech

zioni del circolo scuola al de

to che, a suo turno, gli M. e con

PIATTI GARI

informazione con incontri nella scuola di Chiararamonti e la distribuzione di libretti divulgativi contenenti semplici linee guida come non dare al cane visceri crudi di animali macellati, lavare sempre bene frutta e verdura prima di mangiarla, lavarsi le mani prima di portare alla bocca e prima di mangiare.

Chiaramonti, screening per l'echinococco

Comune pilota per la ricerca da parte del Centro nazionale di referenza

CHIARAMONTI. Con una cinquantina di prelievi di sangue, è iniziato sabato mattina lo screening gratuito della popolazione di Chiaramonti per la ricerca di anticorpi antiechinococco per rilevarne così l'incidenza e, allo stesso tempo, fare una diagnosi precoce in caso di esito positivo.

L'iniziativa rientra nel progetto di ricerca messo a punto dal Centro nazionale di referenza per l'echinococcosi dell'Istituto Zooprofilattico sperimentale della Sardegna con sede a Sassari e di cui Chiaramonti si pone come paese pilota. Il primo e finora unico centro sardo a essere sottoposto a questo tipo di monitoraggio.

La scelta è stata dettata dal triste primato che il paese detiene nella provincia di Sassari essendo quello in cui, nel periodo che va dal 2001 all'inizio del 2006, si è avuto il più alto numero di ricoveri per echinococcosi cistica, una malattia parassitaria denominata anche idatidosi e da cui, secondo i dati ufficiali del ministero della Sanità relativi al 2003, la Sardegna resta la regione d'Italia più colpita.

Il progetto, ideato in seguito all'emanazione del decreto legislativo n. 191 del 2006 che individua l'echinococcosi tra le zoonosi da sottoporre a sorveglianza assieme ad altre malattie quali la salmonellosi e la tubercolosi, ha quindi la duplice valenza di ricerca scientifica e di arma preventiva per una eventuale diagnosi precoce e, più a lungo termine, per poter debellare la malattia.

Lo staff di ricerca dell'Istituto zooprofilattico in questo è stato chiaro: per chi contrae l'echinococcosi cistica la terapia a cui sottoporsi può anche essere lunga, ma si tratta sempre di una malattia curabile e in cui l'elemento più importante e fondamentale resta la prevenzione, con il rispetto di alcune semplici norme.

Oltre ad aver effettuato i primi prelievi di sangue alle

Il logo e il sindaco durante il prelievo



persone che hanno aderito sabato, il gruppo di ricerca dell'Izs ha anche illustrato il progetto, spiegato come si contrae la malattia e come ci si può difendere.

Dopo il saluto del sindaco Giancarlo Cossu, la dottoressa Giovanna Masala, responsabile del Centro nazionale di referenza per l'echinococcosi dell'Izs, ha illustrato il ciclo della malattia con l'ausilio del libretto informativo distribuito nelle scuole di Chiaramonti nel corso delle lezioni di educazione sanitaria tenute in collaborazione con la Asl.

Il vero responsabile della

trasmissione della malattia è il cane, che può diventare «ospite definitivo» dopo essersi cibato di visceri di altri animali parassitati. Il cane contamina l'ambiente con le feci. La pecora che brucia l'erba o il bambino che mangia un frutto o un ortaggio non lavato possono ingerire le uova di echinococcosi disperse nell'ambiente e diventare «ospiti intermedi».

«Per interrompere questo ciclo basterebbe seguire poche semplici regole ed evitare abitudini scorrette — ha sottolineato la ricercatrice Giovanna Masala —: non macellare gli animali senza la pre-

senza di un veterinario, non abbandonare animali morti nelle campagne, non dare visceri crudi e preferibilmente neanche cotti ai cani, trattare questi ultimi con antiparassitari e sverminarli regolarmente, iscriverli all'anagrafe canina, lavare bene frutta e verdura prima di ingerirle, lavarsi bene le mani prima di mangiare».

La dottoressa Scilla Mastrandrea, medico del Centro di referenza, ha poi spiegato che «la cisti può crescere nel polmone o nel fegato della persona senza dare alcun sintomo finché non va a toccare altri organi, come i bronchi e quindi si avverte tosse, affanno».

Sul test diagnostico si è invece soffermata la dottoressa Sebastiana Tola. «L'esito finale che — ha affermato — potrà essere positivo, negativo o dubbio, si avrà dopo 10 giorni tramite un 'processo' chiamato dialisi che permette di isolare le proteine del parassita».

«Malattia sociale, incancrenita nella società sarda — ha definito l'echinococcosi il dottor Mauro Savioli, medico veterinario della Asl n. 1 che opera nel territorio —. Ma oggi abbiamo un'arma in più: la diagnosi precoce».

E quella di sabato mattina — lo hanno ribadito un po' tutti — non è stata che la prima di una serie di giornate dedicate allo screening della popolazione di Chiaramonti. Alle persone che già hanno effettuato il prelievo l'esito sarà spedito in busta chiusa a domicilio.

Chi non avesse potuto partecipare e volesse iscriversi ad altri eventuali incontri per un prelievo gratuito può farlo presente in Comune, comunicarlo al dottor Giuseppe Michienzi, vicesindaco con delega all'Igiene e sanità e medico condotto, o all'assessore Francesca Scanu, anche lei medico chirurgo.

Letizia Villa

Fatti una cinquantina di prelievi di sangue per la diagnosi precoce

Report Esami per Quesito, Tipo Quesito, Specie ed Esame

Laboratorio RICERCA E SVILUPPO

Esame : 8RS/07 - ECHINOCOCCUS GRANULOSUS IMMUNOBLOTTING

Quesito : Tutti

Intervallo Data Richiesta : Tutti

Tipo Quesito : Tutti

Intervallo Data Rapportazione : Tutti

Specie Animale : Tutte

Anno Riferimento : Diversi

Data Elaborazione : 04-10-2010

Quesito	Descrizione	Tipo Quesito	Specie	Esame	Eseguiti	Positivi	Dubbi	Negativi	Non Eseg.
ZOO	ZOONOSI	Non Piano	UOMO	08RS/07	23	3	2	18	0
n.d.		Non Piano	UOMO	08RS/07	2	1	0	1	0
ECHIN	IZS SA 01/06 RICERCA ECHINOCOCCO	Non Piano	UOMO	08RS/07	7590	42	83	7465	0
Totali :					7615	46	85	7484	0