

**Sebastiana Stähli 4F**

***Identificazione molecolare di campioni clinici di botriocefalo  
(Diphyllobothrium Cobbold 1858)***



Lavoro di maturità di biologia  
Liceo cantonale di Locarno  
2007-2008  
Docente responsabile: Prof. Francesca Palli

## SOMMARIO

RINGRAZIAMENTI	4
PREMESSA	4
1. INTRODUZIONE	5
1.1 Parassiti più frequenti nella pratica analitica quotidiana in Ticino	5
1.2 <i>Diphyllobothrium latum</i>	6
1.2.1 Tassonomia	6
1.2.2 Ciclo vitale	6
1.2.3 Identificazione	7
1.2.4 Clinica	8
1.2.5 Diagnostica	8
1.2.6 Trattamento	8
1.2.7 Prevenzione	9
1.2.8 Epidemiologia	9
• <i>Lago Maggiore</i>	9
• <i>Lago di Como</i>	10
• <i>Altri laghi insubrici</i>	11
• <i>Laghi della Svizzera francese</i>	11
• <i>Haute-Savoie</i>	12
• <i>Europa</i>	13
1.3 Specie esotiche e problemi di identificazione	14

2. MATERIALI E METODI	
2.1 Analisi parassitologia	16
2.2 Analisi molecolari	16
2.2.1 Estrazione del DNA	17
2.2.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)	19
2.2.3 Purificazione dei prodotti PCR	21
2.2.4 Quantificazione dei prodotti PCR	22
2.2.5 Reazione di sequenza	22
2.2.6 Purificazione	23
2.2.7 Lettura e analisi della sequenza	23
3. RISULTATI	
3.1 Analisi parassitologica	25
3.2 Analisi molecolari	25
3.2.1 PCR	25
3.2.2 Purificazione e quantificazione prodotti PCR	25
3.2.3 Lettura e analisi della sequenza	26
4. DISCUSSIONE	28
5. BIBLIOGRAFIA	29

## **RINGRAZIAMENTI**

I miei ringraziamenti vanno prima di tutto alla professoressa Francesca Palli che mi ha seguito nel corso di questo anno, mi ha aiutato nei momenti di bisogno fornendomi utili consigli e correggendomi quando necessario. In secondo luogo ringrazio tutto l'Istituto Cantonale di Microbiologia di Bellinzona (ICM), il Dr. Raffaele Peduzzi e il direttore Dr. Orlando Petrini per avermi permesso di svolgere la parte pratica del mio lavoro. Ma soprattutto i miei più grandi ringraziamenti vanno a Barbara Wicht che mi ha seguito durante tutto il tempo passato in laboratorio e fino all'ultimo mi ha aiutata nella stesura di questo lavoro scientifico: è stata davvero indispensabile.

Infine i miei ringraziamenti vanno alla mia famiglia, che mi ha sostenuta e incoraggiata incessantemente e mi ha inoltre aiutato nella correzione del lavoro.

## **PREMESSA**

Ho scelto di svolgere il mio lavoro di maturità nell'ambito della biologia in quanto è una materia non soltanto teorica, ma anche pratica, che permette di compiere esperimenti ed analisi in laboratorio. Per questo motivo il tema scelto non è stato casuale, ho deciso infatti di occuparmi della parassitosi più frequente nei pesci di acqua dolce. Si tratta della difillobotriosi, malattia causata dall'elminta *Diphyllobothrium latum* che, oltre ad infettare i pesci, può anche infettare l'uomo. Come lo era per me, questa parassitosi è poco conosciuta dalla gente, anche se è da molto tempo presente nella zona in cui viviamo, la Regione Insubrica in cui è compreso il Ticino e caratterizzata da laghi (Maggiore, di Lugano, di Como,...).

Grazie al tema scelto e alle conoscenze della professoressa Palli, mi è stata data la possibilità di svolgere una parte pratica all'ICM, analizzando dei campioni provenienti da pazienti infetti. Ho potuto così vedere da vicino il lavoro svolto in un laboratorio, conoscere le tecniche e le analisi più comunemente utilizzate e anche compiere degli esperimenti personalmente, con il prezioso aiuto di Barbara Wicht, che mi ha seguita per tutto il tempo trascorso in laboratorio.

Il mio lavoro è dunque strutturato in due parti. La prima è una parte più teorica, svolta al Liceo di Locarno, con la lettura di articoli che descrivono la situazione della parassitosi in varie zone della Svizzera e dell'Europa. La seconda è invece una descrizione delle esperienze compiute in laboratorio con la spiegazione di tutti i procedimenti adottati e dei risultati ottenuti. Con i risultati ottenuti è stato possibile costruire, mediante appositi programmi informatici, degli alberi filogenetici che mettono in evidenza le differenze a livello di specie e a livello di individui (all'interno di una stessa specie). Come tutti gli esseri viventi, anche i parassiti sono soggetti a mutazioni, fatto che secondo la teoria di Darwin sta alla base dell'evoluzione delle specie. Gli alberi filogenetici permettono di valutare proprio il grado di queste mutazioni. Dal punto di vista epidemiologico, l'analisi genetica è importante per stabilire con certezza l'identità e di conseguenza la provenienza dei parassiti, sia per fornire al paziente la cura adeguata, sia per determinare il grado di diffusione e colonizzazione dei parassiti nell'ambiente.

## 1. INTRODUZIONE

La difillobotriosi (parassitosi dovuta a elminti del genere *Diphyllobothrium*) è la zoonosi da cestode più diffusa nel mondo: le persone colpite si stimano essere circa 9 milioni (Crompton, 1999). Negli ultimi anni la malattia è comparsa in nuovi paesi, dove prima non era mai stata registrata (Santos & Faro, 2005; Torres *et al.*, 2004). Alcuni studi hanno permesso di notare un'importante risorgenza della parassitosi in Europa (Dupouy-Camet & Peduzzi, 2004). Nei paesi della regione subalpina e transalpina, la difillobotriosi dovuta alla specie *Diphyllobothrium latum* si credeva ormai scomparsa. Tuttavia, studi effettuati in diverse zone della regione subalpina (Svizzera, Italia, Francia), hanno mostrato che questa parassitosi non è scomparsa del tutto, al contrario si è notata una certa risorgenza soprattutto per quanto riguarda i casi umani (Bonini *et al.*, 1998; Golay & Mariaux, 1995; Peduzzi, 1990; Peduzzi & Boucher-Rodoni, 2001; Wicht *et al.*, 2006). Con l'aumento di casi umani diagnosticati sono stati effettuati dei controlli sugli ospiti intermediari del parassita, in particolare su alcune specie di pesci d'acqua dolce, al fine di correlarne il tasso di infestazione con l'aumento di casi clinici. Molto probabilmente la risorgenza della difillobotriosi è dovuta alle nuove abitudini alimentari. Nell'introduzione sono illustrati il quadro epidemiologico per i parassiti umani più frequenti diagnosticati in Ticino, la descrizione del parassita *D. latum*, ed il quadro epidemiologico nella regione subalpina e in Europa, con i dati specifici per alcuni paesi. È inoltre descritta l'identificazione di altre specie di *Diphyllobothrium*, di origine esotica – oltre all'aumento di casi dovuti a *D. latum* si sta infatti verificando anche un aumento di casi dovuti a parassiti importanti, come *Diphyllobothrium nihonkaiense* e *Diphyllobothrium dendriticum* (Wicht *et al.*, 2007a; Wicht *et al.*, 2008a). In conclusione, è riassunto un bilancio complessivo della situazione epidemiologica attuale della difillobotriosi.

### 1.1 Parassiti più frequenti nella pratica analitica quotidiana in Ticino

In Ticino sono diverse le specie di parassiti che infettano l'uomo. Alcune statistiche sulle analisi parassitologiche sono state condotte dall'Istituto cantonale batteriosierologico (ICB) di Lugano, oggi conosciuto come Istituto cantonale di microbiologia (ICM) la cui sede è stata trasferita a Bellinzona, per fornire dati riguardo alle specie più frequenti di parassiti e di uova d'elminti in campioni provenienti dal Ticino.

L'esame per individuare ed identificare eventuali protozoi e uova d'elminti viene di norma effettuato su campioni di feci ricevute in laboratorio, mescolati in 10 ml di SAF (acetato di sodio, acido acetico, formalina) che ne permette la conservazione per lungo tempo. Sulle 16383 analisi compiute all'ICB nel periodo 1991-1998 si è riscontrata una positività di 1386 analisi, ossia dell'8.46%. La percentuale di casi positivi in periodi annuali variava dal 5.81% al 12.7% (negli anni 1991-1992). Si sono poi distinte due categorie di parassiti: le specie di protozoi e le specie di elminti. Nel periodo in cui sono state effettuate le analisi, 1142 sono state trovate positive a specie di protozoi e più precisamente si è constatato che *Blastocystis* era il genere più frequente. Più della metà delle analisi positive con protozoi erano dovute alla presenza di *Blastocystis hominis*. Questo organismo non sempre è considerato come patogeno, può però essere associato a diarrea acquosa. È situato nel tubo digerente ed evidenzia dunque un'irritazione colica. Sempre a partire dai risultati ottenuti dal laboratorio si nota che anche il numero di casi di *Entamoeba histolytica* era considerevole.

Alcuni pazienti erano infestati da più parassiti, associazioni di uova di elminti con protozoi.

Nel periodo 1982-1998 sono stati riscontrati 456 casi di elmintiasi, tra cui la specie più frequente individuata è stata *Trichuris trichiura* (Triocefalo), seguita dal genere *Taenia* di cui non sono state differenziate le varie specie. La differenziazione tra *Taenia saginata* e *Taenia solium* è infatti possibile solo esaminando la morfologia delle proglottidi mature e non a partire dalle uova.

L'elmintiasi d'importazione più frequente è risultata essere l'anchilostomiasi. Un altro punto importante messo in evidenza è stata la recrudescenza della difillobotriosi (*Diphyllbothrium latum*), con 31 casi documentati. Sono stati di conseguenza analizzati dei campioni di persico, pesce ospite del parassita, il cui grado d'infestazione nel lago Maggiore è risultato del 10%.

In conclusione, si può dunque prevedere che la domanda d'analisi parassitologica in Ticino tenderà ad aumentare. Questa tendenza è dovuta a diversi fattori: malattie d'importazione a causa di frequenti viaggi in paesi tropicali, l'accoglienza di rifugiati provenienti da paesi con parassitosi endemiche, il cambiamento di abitudini alimentari, più specificamente l'aumento del consumo di alimenti crudi (ad es. il consumo di pesce crudo), l'immunodepressione sempre più frequente, ossia l'indebolimento delle difese naturali, che favorisce l'attecchimento dei parassiti (Peduzzi & De Rossa, 2001).

## 1.2 *Diphyllbothrium latum* Linnaeus, 1758

### 1.2.1 Tassonomia

La classificazione attuale vede *D. latum* compreso nel Phylum dei Platyhelminthes, Classe Cestoda, Ordine Pseudophyllidea, Famiglia Diphyllbothriidae (Brabec *et al.*, 2006).

### 1.2.2 Ciclo vitale

Il ciclo vitale del *D. latum* comprende almeno due ospiti intermedi (un copepode e uno o più pesci), e un ospite definitivo (che possono essere l'uomo oppure altri mammiferi piscivori, come cani, gatti o volpi). Lo svolgimento del ciclo vitale è illustrato nella Fig 1.1. Le uova immature vengono espulse tramite le feci da pazienti infetti (1). Se queste raggiungono l'acqua e trovano condizioni ideali di temperatura (tra 16°C e 20°C), luminosità e ossigenazione, in 7-20 giorni maturano (si forma l'embrione) (2). Dalle uova escono poi i coracidi (3), che vengono ingeriti da copepodi, piccoli crostacei acquatici, nella cavità corporea dei quali il coracidio si sviluppa in larva procercoide (4). Sono circa 40 le specie di copepodi che possono fungere da primi ospiti intermedi. Per l'ulteriore evoluzione allo stadio di larva plerocercoide (piccolo verme di 5-15 mm) è necessario che il copepode diventi preda di un pesce, il secondo ospite intermedio (5). Una volta ingerita, la larva procercoide, migra nella muscolatura del pesce, dove può rimanere inattiva per diversi mesi, ma può infestare nuovamente dei pesci carnivori (6). Tra i pesci ospiti del parassita vi sono luccio (*Esox lucius*), trota (*Salmo trutta*), salmone (*Salmo salar*), pesce persico (*Perca fluviatilis*), bottatrice (*Lota lota*), salmerino (*Salvelinus* sp). Per quanto riguarda la Svizzera, sono soprattutto il persico, la bottatrice e il luccio a essere suscettibili di infestazione. Il rilevamento in zona muscolare delle larve è dovuto all'ingestione dei copepodi infettati dalla larva procercoide che è molto mobile, mentre il rilevamento nella cavità peri-viscerale è dovuto all'ingestione di pesci contenenti una larva plerocercoide poco mobile. È nello stadio plerocercoide che la larva rappresenta la forma infestante per l'ospite definitivo (7). La larva plerocercoide può attaccarsi all'intestino e completare il suo sviluppo in parassita adulto (8). Cresce dai 5 ai 20 cm al giorno e le proglottidi rilasciano le prime uova immature dopo 2-6 settimane dall'infestazione (9).

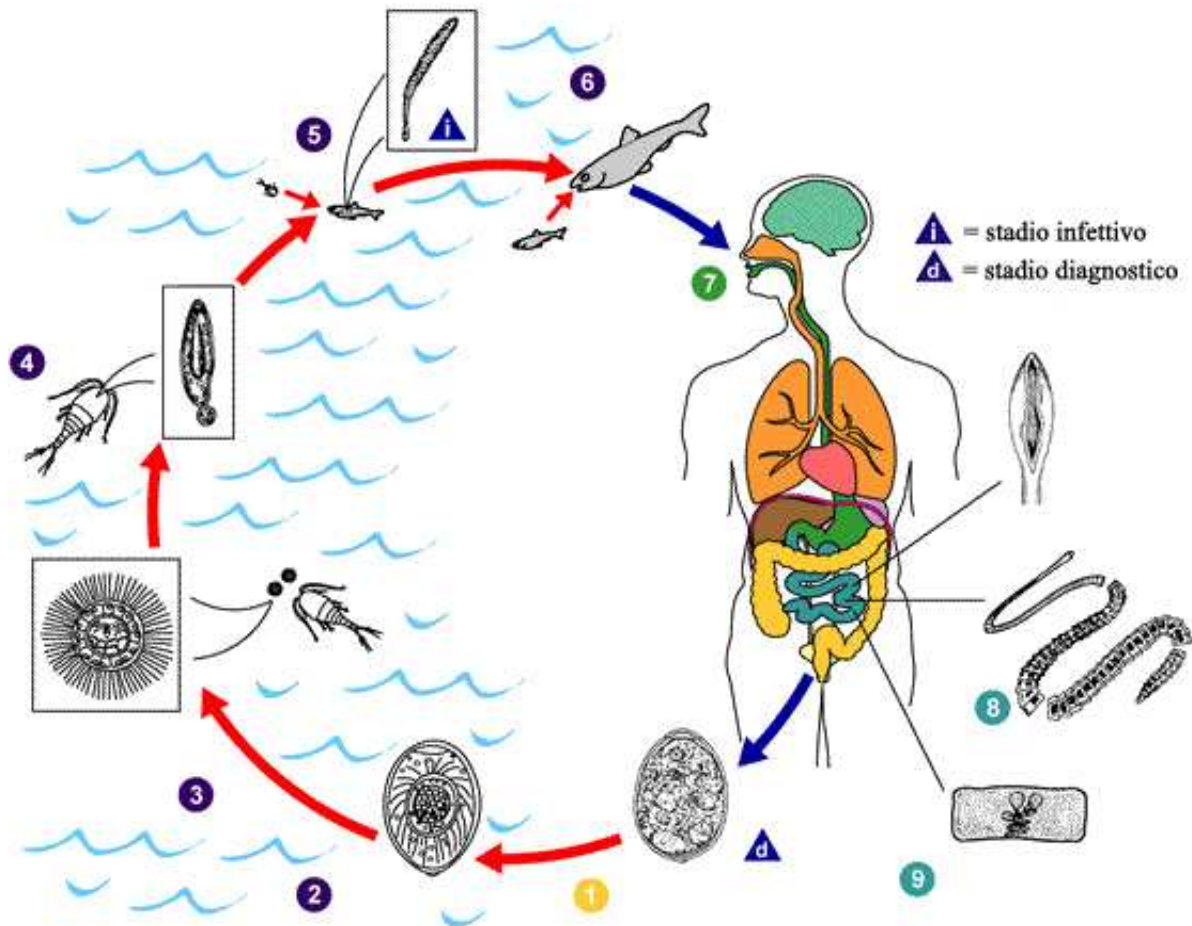


Fig. 1.1: Ciclo vitale di *Diphyllobothrium latum*.

### 1.2.3 Identificazione

La testa dei parassiti del genere *Diphyllobothrium* è a forma di mandorla e, a differenza delle tenie, non ha uncini né ventose. Il nome del genere deriva appunto dalla testa, che assomiglia a due foglie messe insieme. Essa non è quasi mai presente quando vengono espulse le proglottidi.



Fig. 1.2: Uova di *D. latum*.

L'identificazione avviene, oltre che tramite la testa, tramite le uova che sono molto caratteristiche: per la forma ellittica e per l'opercolo che possiedono (Fig. 1.2 e 1.3). La loro grandezza varia da 40x60 a 50x85 µm. Questi caratteri le rendono facilmente identificabili. I segmenti (proglottidi) sono più larghi che lunghi: la lunghezza varia tra i 2 e i 4 mm, mentre la larghezza tra i 10 e i 12 mm. In ogni segmento è presente un utero a forma di rosetta in posizione centrale, a differenza delle tenie in cui è laterale (Fig. 1.4). Il botriocefalo è il più lungo parassita conosciuto nell'uomo e può raggiungere i 10 (eccezionalmente 20) m di lunghezza. Questi criteri morfologici, però non sono sufficienti per la

determinazione delle numerose specie di *Diphyllobothrium* (delle circa 50 specie conosciute, 15 sono patogene per l'uomo), ma soltanto per l'identificazione del genere. Per identificare con certezza la specie sono necessarie delle analisi genetiche e molecolari.

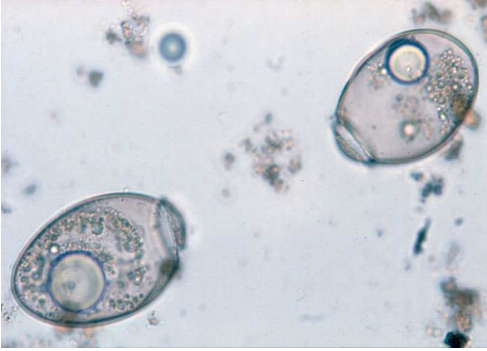


Fig. 1.3: Uova di *D. latum*.

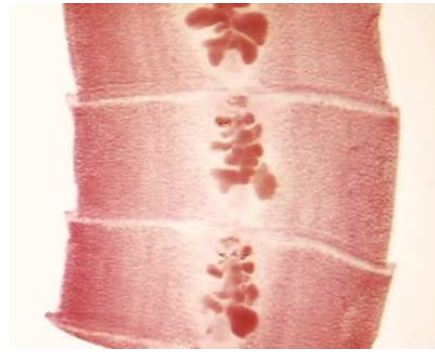


Fig. 1.4: Proglottidi di *D. latum*.

#### 1.2.4 Clinica

I sintomi della difillobotriosi possono essere dovuti alle sostanze tossiche prodotte dal parassita oppure dall'azione meccanica che esso esercita sull'intestino. Possono manifestarsi stitichezza alternata a diarrea, nausea e vomito, dolori colici, mancanza di appetito o appetito esagerato, dimagrimento, disturbi nervosi come mal di testa, insonnia e se l'infestazione dura da molto tempo può portare ad un'anemia megaloblastica (spoliazione di vitamina B12). Una persona malata non necessariamente presenta dei sintomi: circa la metà dei pazienti non ne manifesta affatto. Spesso i malati si accorgono del parassita in seguito al rilascio di proglottidi nelle feci, sottoforma di "nastri" biancastri di alcuni centimetri, talvolta di 1-2 m di lunghezza.

#### 1.2.5 Diagnostica

- Anemia megaloblastica: deficit costante di vitamina B12. Ciò è dovuto all'assenza della mucoproteina che assorbe la vitamina B12. Il botriocefalo agisce appunto su questa mucoproteina impedendo che svolga il suo compito, provocando così una mancanza della proteina.
- Presenza di proglottidi nelle feci: macroscopiche
- Presenza di uova nelle feci: osservazione al microscopio dopo preparazione parassitologia del campione
- Analisi genetica

#### 1.2.6 Trattamento

I due principi attivi che si trovano attualmente in commercio sono praziquantel e niclosamide, che agiscono con grande efficacia direttamente sul parassita,

Il praziquantel è commercializzato con il nome Biltricide®: provoca una rapida immobilizzazione del parassita e in seguito una vacuolizzazione. Gli effetti collaterali quali nausea, vomito, dolori addominali, sono passeggeri.

La niclosamide è commercializzata con il nome Trédémine® o Yomesan®: esercita la sua funzione a livello del metabolismo energetico e inibisce l'assorbimento di glucosio. Il medicamento è indicato per il trattamento di cestodi adulti, come *Taenia saginata*, *T. solium* e *Diphyllobothrium latum*. Non provoca effetti collaterali importanti.

L'anemia megaloblastica può venire curata con un'iniezione di vitamina B12 direttamente nel sangue, così da poterla assorbire. Una volta eliminato il parassita, l'anemia si risolve spontaneamente.



### 1.2.7 Prevenzione

Il trattamento dei soggetti infestati, con i principi attivi descritti sopra, ed una corretta educazione sanitaria costituiscono i comportamenti da adottare per evitare le contaminazioni. Come già detto le larve plerocercoidi rappresentano lo stadio infettivo per gli ospiti definitivi. È dunque molto importante cuocere bene il pesce, almeno per 5 minuti a 55°C oppure congelarlo a -10°C per 24 ore minimo, e 72 h per i pesci di grosse dimensioni (Feachem *et al.*, 1983). In Svizzera è in vigore una legge Federale, l'“Ordinanza sui requisiti igienici delle derrate alimentari”, che prevede che i ristoratori che servono pesce crudo sono obbligati a servirlo solo se precedentemente congelato.

### 1.2.8 Epidemiologia

Come già accennato, la difillobotriosi è la parassitosi più diffusa nel mondo e negli ultimi anni è comparsa in nuovi paesi dove prima non era mai stata registrata. In Europa, e in particolare nei paesi della regione insubrica e transalpina, la zoonosi imputata a *D. latum* ha registrato un importante fenomeno di risorgenza. Studi effettuati in diversi laghi di questa zona (in Svizzera, Italia e Francia), hanno mostrato che questa parassitosi non è scomparsa del tutto, al contrario, i casi clinici sono aumentati. A causa dell'aumento di casi umani diagnosticati, sono stati effettuati dei controlli sui pesci che vivono in questi laghi, al fine di correlare l'aumento di casi clinici con il tasso d'infestazione del pesce. I risultati degli studi sul Lago Maggiore, il Lago di Como e altri laghi insubrici, i laghi della Svizzera francese, la regione della Haute-Savoie e in Europa sono presentati di seguito.

- **Lago Maggiore**

La difillobotriosi è una zoonosi che si credeva ormai scomparsa dai paesi situati vicino ai laghi transfrontalieri italo-svizzeri. Per lungo tempo infatti non erano più stati diagnosticati casi umani. Nella regione del Lago Maggiore si è però constatata da una ventina d'anni una recrudescenza, con 18 casi umani segnalati (Peduzzi, 1990). La ricerca delle uova per determinare l'infestazione da *D. latum* è stata effettuata dall'Istituto Cantonale di Microbiologia su campioni di feci umane. Le persone i cui campioni erano stati analizzati presentavano sintomi che facevano pensare alla presenza di un parassita. I metodi di analisi coprologica consistono nel cercare con il microscopio le uova del parassita sul sedimento di pazienti sintomatici. Sono così state messe in evidenza uova di *Diphyllobothrium* in 18 pazienti. La grande quantità di uova presente in ciascun sedimento dà un'idea di quante uova produce un botriocefalo in un giorno. Il tasso d'isolamento delle uova nei campioni ricevuti varia tra lo 0.3 e lo 0.4%. Si tratta di una frequenza relativamente alta, confrontata ai risultati ottenuti dal CDC di Atlanta (Centers for Disease Control and Prevention) che stimano la frequenza di ritrovamento del parassita allo 0.01%. Va però detto che questa parassitosi è ritenuta come una delle più rare negli Stati Uniti.

Il Ticino è situato in una regione geografica caratterizzata da due grandi laghi, il Lago Maggiore e il Lago di Lugano. Si è dunque confrontati con il consumo di pesce indigeno proveniente dai laghi ticinesi. I campioni giunti in laboratorio infatti provenivano da pazienti che risiedevano nella regione del Lago Maggiore e consumavano pesce indigeno. Questo ha permesso di identificare nel consumo di pesce crudo o insufficientemente cotto la causa della difillobotriosi. Spesso poi le persone infestate appartenevano alla stessa famiglia, fatto che può costituire la prova del grande potere infestante delle larve plerocercoidi.

I pazienti sono stati trattati con niclosamide, principio attivo che paralizza il parassita, così da permettere una disinfestazione veloce. Soltanto in un caso il controllo due mesi dopo il trattamento è risultato ancora positivo. Non si è però potuto stabilire se il paziente fosse stato curato in modo

sbagliato, oppure se si trattasse di una reinfestazione. Questa possibilità è plausibile, dato che si trattava di un pescatore amatore che mangiava il pesce pescato dal lago.

In seguito sono stati analizzati anche i pesci di lago, ispezionandone la muscolatura, sede della larva e parte solitamente consumata dall'uomo. Il controllo avveniva tramite la filettatura del pesce. Da diverse zone del lago sono stati pescati dei pesci persici da analizzare per cercare un'eventuale infestazione da botriocefalo. Sono stati esaminati 117 campioni, provenienti dal territorio svizzero del Lago Maggiore: 29 da Rivapiana-Muralto, 15 dalle Bolle di Magadino, 11 da San Nazzaro, 12 da Ranzo, 22 dalla foce del Ticino e della Verzasca, 28 da Vira Gambarogno. Dal territorio italiano sono stati prelevati 161 campioni: 15 campioni da Arona e da Stresa, 16 da Baveno e da Verbania, 80 da Laveno e 50 da Angera. Complessivamente dal Lago Maggiore sono stati analizzati 309 pesci persici (Bonini *et al.*, 1998).

In totale (in territorio italiano e svizzero) sono state ritrovate 24 larve plerocercoidi di *D. latum*, il che corrisponde a una percentuale di infestazione media del 7,8%. Non in tutte le località monitorate sono però state trovate larve. A Ranzo e a San Nazzaro (CH) erano assenti, così come a Baveno (I). I gradi di infestazione nel territorio svizzero variavano da un minimo di 6,7% delle Bolle di Magadino ad un massimo di 13,8% di Rivapiana-Muralto, per un valore medio di 9,4%. In territorio italiano le percentuali variavano da un minimo del 2% di Angera, ad un massimo del 20% di Stresa, per un valore medio di 6,8%.

Il territorio italiano ha una percentuale di infestazione massima molto più alta del territorio svizzero ed ha una percentuale minima più bassa. I valori medi invece sono minori per il territorio italiano (Bonini *et al.*, 1998).

In territorio svizzero la percentuale media era più alta che in Italia, i gradi di infestazione in ogni località però divergevano meno dalla media rispetto al territorio italiano, in cui sembra ci fossero zone molto infestate e zone poco infestate (Bonini *et al.*, 1998). Dal 1993 al 1996 inoltre il tasso di pesci infetti pescati nel lago è aumentato dal 3% al 7,8% (Peduzzi & Boucher-Rodoni, 2001).

Sulla base dei risultati ottenuti è possibile affermare che il ciclo del botriocefalo è nuovamente attivo nelle differenti fasi fino all'infestazione dell'uomo come ospite definitivo. La difillobotriosi sembrava sradicata, molto rari ed irregolari erano i casi umani segnalati. L'ultimo caso nella regione subalpina italo-svizzera risaliva al 1970. L'evoluzione verso il debellamento della parassitosi nel resto della Svizzera sembra essere confermata dai laboratori d'analisi che non segnalano casi d'infestazione umana da lungo tempo. Nel Lago Maggiore è possibile che il mantenimento del ciclo sia dovuto agli animali domestici come cani e gatti che, come l'uomo, possono fungere da ospiti definitivi.

- **Lago di Como**

Come per il Lago Maggiore, nemmeno nel lago di Como (Lario) la difillobotriosi è mai sparita completamente. Nella zona sono stati scoperti 6 nuovi casi umani tra settembre del 1998 e dicembre del 1999 (Terramocci *et al.*, 2001). I pazienti avevano un'età media di 39 anni e mezzo, tre di questi vivevano a Como o nei pressi della città, gli altri tre avevano visitato la zona durante le vacanze. Due dei pazienti non presentavano sintomi, altri quattro avevano dolori addominali e diarrea. Le diagnosi di quattro pazienti sono state effettuate con l'identificazione al microscopio delle uova opercolate. Per gli altri due pazienti sono state esaminate le proglottidi espulse spontaneamente. Tutti i soggetti, in cui era stata riscontrata la difillobotriosi, sono stati curati con una dose (2 g) di niclosamide (Yomesan®, Bayer). Il trattamento è stato efficace, i controlli effettuati dopo 1 mese e dopo 6 mesi, infatti, non hanno più evidenziato la presenza di *D. latum*. I sintomi sono scomparsi un paio di giorni dopo l'assunzione del farmaco.

I casi di infezione autoctona dovuta a *D. latum* nel Lario possono essere un esempio della recrudescenza della parassitosi. Alcuni casi rimangono tuttavia nascosti per lungo tempo perché asintomatici. Anche in questo caso, è probabile che non sia soltanto l'uomo a mantenere il ciclo vitale del parassita, ma anche gli animali domestici.

I casi scoperti costituiscono i primi riportati nel Nord Italia da 10 anni a questa parte, e tutti appartengono alla zona del Lago di Como. Alcune ricerche effettuate sui pesci persici hanno dimostrato che la larva plerocercoidale è oggi presente nel 30% circa degli individui (Gustinelli *et al.*, 2007).

Per evitare l'aumentare dei casi e di conseguenza mantenere il benessere della popolazione sarebbe dunque necessaria una collaborazione tra i servizi di sanità pubblica e i veterinari, così da poter controllare la difillobotriosi e migliorare la qualità delle acque dei laghi e dei fiumi (in Italia spesso vi sono pochi depuratori) e della vita dei pesci.

- ***Altri laghi insubrici***

Anche per altri laghi insubrici la situazione è comparabile alla situazione del Lago Maggiore e del Lago di Como. Per poter avere un quadro complessivo della situazione della difillobotriosi nella zona subalpina e dei risultati più completi e precisi, la ricerca è stata estesa ai laghi di Lugano, di Mergozzo, di Varese e d'Orta, le cui acque sono collegate a quelle del Lago Maggiore (Bonini *et al.*, 1998). Per il territorio svizzero, oltre allo studio effettuato sul lago Maggiore descritto nel paragrafo precedente, si sono analizzati ancora 119 persici pescati in 7 differenti località del Lago di Lugano. Dal Lago di Mergozzo sono stati prelevati 50 campioni di persico, dal Lago di Varese 35 e dal Lago d'Orta 15. Come di consueto le larve di *D. latum* sono state ricercate filettando il pesce. I risultati riguardanti il Lago di Lugano sono stati negativi: in nessun campione analizzato sono state ritrovate larve plerocercoidali. La stessa situazione si è verificata nei laghi di Varese e di Mergozzo, dove in tutti i pesci esaminati non sono state riscontrate larve. Nel Lago di Varese la parassitosi risultava assente già da ricerche condotte negli anni '80, mentre per il Lago di Mergozzo non sono mai stati segnalati casi di difillobotriosi. Si può dunque dire quasi con certezza che il parassita non fosse presente in questi tre laghi, ipotizzando l'assenza di portatori rivieraschi produttori di uova. Per quanto riguarda il Lago d'Orta, sono invece state ritrovate 5 larve su 15 campioni esaminati. Il valore medio di infestazione del lago è quindi del 33.3%. È una percentuale veramente molto alta, anche se i campioni esaminati sono statisticamente pochi e per poterla confermare occorrerebbero molte più analisi. Da notare è il fatto che nel Lago d'Orta è proibita la pesca professionale in seguito al ripopolamento del lago. La localizzazione delle larve è avvenuta soprattutto nel tessuto muscolare del filetto dorsale dei persici; sono però state ritrovate anche alcune larve nella cavità celomatica.

- ***Laghi della Svizzera francese***

Per comparare la situazione subalpina alla situazione presente nel resto della Svizzera e della regione confinante con la Francia (Haute-Savoie), la ricerca è stata estesa ai laghi della Svizzera francese. Lo studio è stato condotto una decina d'anni fa, per determinare se *D. latum* fosse ancora presente in quattro laghi romandi: i laghi di Neuchâtel, Biemme, Morat e Ginevra (Golay & Mariaux, 1995). Così come per il Lago Maggiore, anche tali laghi sono conosciuti come bacini dove il parassita è presente da molto tempo.

Parallelamente, un'inchiesta medica è stata effettuata nei laboratori di analisi e negli ospedali nei cantoni di Friburgo, Neuchâtel, Berna e Vaud. Nei casi positivi al botriocefalo sono state richieste informazioni che potessero condurre all'origine dell'infestazione. Tre categorie di infestazione sono state stabilite: le contaminazioni indigene molto probabili, le contaminazioni indigene possibili e le contaminazioni straniere. Con contaminazione straniera s'intende un'infezione contratta all'estero o con parassiti non presenti nella regione (ad esempio *D. nihonkaiense*). Le 18 risposte ottenute tra laboratori e ospedali raggruppano 73 casi di difillobotriosi tra il 1980 e il 1994, la media dei casi è di 13 all'anno tra il 1990 e il 1994. Solo in 43 di questi casi si sono potute ottenere informazioni che hanno permesso di classificare 21 casi nella categoria delle contaminazioni indigene molto probabili, 13 nella categoria delle contaminazioni indigene possibili, 3 casi in quella delle

contaminazioni straniere e 3 casi di origine indeterminata. Da notare che su 21 casi classificati nella prima categoria, ben 13 provengono dal Lago Lemano.

Dopo l'inchiesta medica sono stati analizzati esemplari di varie specie ittiche alla ricerca di larve plerocercoidi. 217 i persici controllati, 27 i lucci e 34 le bottatrici. 4 persici e 2 lucci provenienti dai laghi di Bienne e di Morat contenevano una larva in zona muscolare. Nessuna bottatrice, specie talvolta descritta come l'ospite intermedio principale, è stata ritrovata parassitata, probabilmente perché non beneficia di una grande attrazione culinaria, ciò che ha permesso di rendere non più così importante il suo ruolo nel mantenimento del ciclo.

Il ciclo di *D. latum* è risultato dunque ancora attivo nei laghi di Bienne, Morat e Lemano, mentre per il lago di Neuchâtel nessun pesce è stato ritrovato infestato e nessun caso umano di difillobotriosi è stato segnalato con provenienza sicura da questa regione (per la quale, tuttavia, i campioni e i dati ricevuti sono stati troppo esigui per poter classificare con certezza il lago come libero dal parassita).

La maggior parte dei casi proveniva dal lago Lemano. Si possono ipotizzare due motivi per cui questa regione fosse – e sia tuttora – la più infestata della Svizzera romanda. Il primo motivo è che la metà delle rive del Lemano si trovano in territorio francese, dove le stazioni di depurazione delle acque sono meno sviluppate che in Svizzera. Ciò può quindi portare ad un mantenimento più facile del ciclo del parassita (indicatore di contaminazione fecale). Il secondo motivo è che la densità della popolazione e il numero di ristoranti ai bordi del Lemano sono molto più alti che non sulle rive dei laghi di Bienne, Morat o Neuchâtel.

In seguito ai risultati ottenuti nello studio sono state effettuate delle ipotesi sul mantenimento del parassita nei 4 laghi romandi. La prima ipotesi, più accreditata, è quella che l'uomo sia l'ospite-riserva del parassita, in quanto unico ospite definitivo provato nella regione. E il fatto che la parassitosi sia più frequente nelle zone in cui le acque non sono depurate, rafforza questa ipotesi. Inoltre, i laghi circondati da foreste (o, più in generale, dove non vi è presenza umana) sono spesso incontaminati. Un esempio molto chiaro è quello del Lago Lemano e del Lago Maggiore, dove le rive francesi e italiane sono molto meno depurate che quelle svizzere e il numero di casi umani è molto più alto che non in altri laghi. La seconda ipotesi formulata è che la volpe (*Vulpes vulpes*), funga da principale ospite definitivo (unico animale selvatico potenzialmente suscettibile d'infezione in Svizzera). Tuttavia, il suo ruolo nel mantenere attivo il ciclo è sempre stato messo in discussione ed in effetti il mantenimento non può avvenire unicamente grazie a questa specie. Bisognerebbe che i rari pesci consumati dalla volpe siano infetti e che le feci dell'animale siano rilasciate in zone rivierasche: è veramente poco possibile che entrambe le condizioni si realizzino contemporaneamente. Il ruolo epidemiologico svolto dalla volpe non può essere completamente escluso, ma rimane molto ridotto. La terza ipotesi formulata riguarda gli animali domestici come ospiti definitivi. Gli animali domestici mantengono attivo il ciclo del *D. latum* soltanto se vengono nutriti dall'uomo con resti di pesci infetti. Come nel caso della volpe, sussistono comunque troppe condizioni per credere che siano unicamente gli animali domestici a mantenere il parassita nei nostri laghi.

Questo studio ha dunque permesso di dimostrare che *D. latum* è ancora presente in Svizzera. La sua presenza è certa nei laghi Lemano, di Bienne e di Morat e resta da chiarire nel Lago di Neuchâtel. La bottatrice sembra aver perso il ruolo che aveva in passato nel mantenimento del ciclo e l'uomo sembra attualmente l'ospite definitivo principale implicato nel mantenimento del parassita in Svizzera.

- **Haute-Savoie**

Anche in Francia, come in tutte le regioni subalpine dell'Europa, si considerava la difillobotriosi ormai scomparsa, ma nuovi casi umani sono stati segnalati in Svizzera (18 sulle rive del Lago Maggiore dal 1990 e 73 nei laghi della Svizzera romanda). Nel 1996 un caso è stato segnalato anche nella regione dell'Haute-Savoie (St-Julien-en-Genevois). Così un'inchiesta, con l'intenzione

di stabilire l'incidenza della parassitosi, è stata condotta in tutti i laboratori del dipartimento; ai 50 laboratori presenti sul territorio è stato chiesto il numero di casi di difillobotriosi diagnosticati tra il 1993 e il 2000 (Desvois *et al.*, 2001).

Nel periodo considerato, 22 sono stati i casi identificati, per 13 dei quali è conosciuto il metodo di diagnosi: presenza di sole proglottidi in 6 casi, presenza di sole uova in 3 casi e presenza di proglottidi e uova in 4 casi. 20 casi provenivano da laboratori situati sulle rive del Lago Lemano, mentre uno da Cluses e uno da Meyhet, presso Annecy. In 5 casi i pazienti avevano mangiato pesce pescato nel Lemano, come il pesce persico (*Perca fluviatilis*) o il salmerino (*Salvelinus alpinus*); un paziente invece non aveva consumato pesce indigeno, ma 4 settimane prima, in un viaggio in Bielorussia, aveva mangiato salmone e altri pesci crudi. Il caso è stato dunque verosimilmente importato. Dal punto di vista clinico l'infestazione si è manifestata con dolori addominali e diarrea, in 4 casi su 5 con un'iper-eosinofilia. Non è stata segnalata alcuna anemia.

La parassitosi, come già dimostrato nello studio effettuato nei laghi della Svizzera romanda, è presente nel Lemano ma sembra essere assente dal Lago d'Annecy. I casi osservati sono in media 2 o 3 all'anno, con un picco di 7 casi nel 1998. A partire dai risultati sembra che l'infestazione da *D. latum* sia riapparsa a causa dei nuovi comportamenti alimentari e dal fatto che le stazioni di depurazione delle acque non sono sufficienti per interrompere il ciclo.

- **Europa**

Nel 2004 è stato condotto uno studio a livello europeo, per determinare la situazione epidemiologica della difillobotriosi in Europa (Dupouy-Camet & Peduzzi, 2004). Un'inchiesta è stata svolta in 25 paesi dell'Unione Europea con l'eccezione di Cipro e Malta e con l'aggiunta di Svizzera, Ungheria, Jugoslavia e Croazia. Dove possibile è stata analizzata la situazione negli ultimi 20 anni.

Dai risultati si sono distinte tre tipi di aree epidemiologiche in Europa: le zone in cui la parassitosi è frequente o relativamente frequente, le zone in cui i casi osservati sono piuttosto rari oppure sono stati importati e le zone in cui la parassitosi non è stata osservata.

In Finlandia 20 casi sono riportati ogni anno, con una percentuale di pazienti che varia tra lo 0.3% e il 3.8%. In Svezia si registrano dai 10 ai 50 casi all'anno, ma la nazione che rimane pur sempre con un grandissimo numero di casi è l'Estonia, che nel 1997 ne ha registrati 440, malgrado siano diminuiti dai 715 del 1990. Come già dimostrato dalle ricerche descritte sopra, i laghi della regione franco-svizzera e italo-svizzera registrano un grande numero di casi, soprattutto nelle regioni del Lago Lemano e del Lago Maggiore. La prevalenza del pesce infestato concerne solamente i laghi alpini della Svizzera e dell'Italia che mostrano un'importante infestazione dei pesci persici e dei lucci. In altre nazioni europee i casi diagnosticati sono sempre meno. In Romania, nonostante il trattamento delle acque della foce del Danubio, dei casi clinici continuano ad essere riportati. Abbastanza numerose sono anche le infezioni segnalate in Polonia e Lituania. A Vienna 5 casi sono stati scoperti tra il 1991 e il 2003. In Spagna sono stati 2, con un caso dovuto al consumo di salmone importato dall'estero (nazione sconosciuta). In Grecia i casi riportati sono stati 3, in Slovacchia e in Norvegia l'infezione è risultata invece poco frequente. In Danimarca, Croazia, Belgio, Gran Bretagna, Olanda, Jugoslavia, Macedonia, Ungheria e Germania non sono stati riportati casi umani (Fig. 1.5). Anche i casi importati svolgono un ruolo nel mantenere attivo il ciclo.

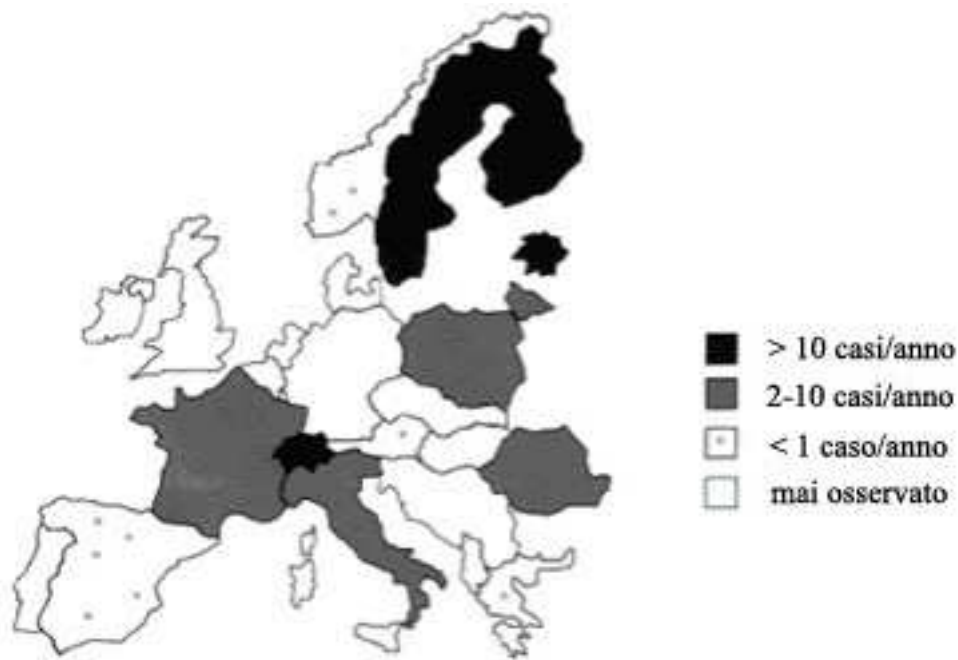


Fig. 1.5: Cartina che illustra la situazione della difillobotriosi nelle nazioni europee.

I risultati ottenuti mostrano che la difillobotriosi è ancora presente in Europa, ma che nelle nazioni Scandinave e Balcaniche, rispetto a inchieste precedenti, è in diminuzione. Nei laghi alpini sono stati registrati oltre 200 casi, con una percentuale di pesci infestati che variano tra il 3.7% e il 33%. Comparare l'incidenza della malattia nei vari paesi comunque è difficile, perché bisogna conoscere il numero di persone esposte per poter calcolare il rischio d'infezione. Per questo motivo non si può dire con esattezza quale delle nazioni europee sia la più colpita dalla malattia; le nazioni subalpine sono sicuramente molto a rischio, essendo in una regione caratterizzata da laghi.

### 1.3 Specie esotiche e problemi di identificazione

In Svizzera, Francia e nel resto dell'Europa non è stato diagnosticato unicamente *D. latum*, ma sono stati identificati anche casi clinici dovuti a botriocefali esotici, come *D. nihonkaiense* e *D. dendriticum*. Una ricerca effettuata in Svizzera presso l'ICM tra novembre 2004 e agosto 2006 (Wicht *et al.*, 2007a) ha identificato 2 *D. nihonkaiense* su 22 campioni di casi umani, provenienti da vari cantoni. Già in seguito alle procedure standard (osservazione delle proglottidi e/o delle uova al microscopio) 2 campioni erano stati segnalati come potenziali specie esotiche, considerando le misure di uova e proglottidi, diverse dagli standard. Le uova di *D. nihonkaiense* sono infatti leggermente più piccole rispetto a quelle di *D. latum*. Per affermare però con certezza di che specie si trattasse, è stato necessario effettuare le analisi genetiche che hanno confermato le ipotesi formulate. In un altro caso, nel settembre 2006, all'ICM è stato identificato un *D. dendriticum* tramite osservazione al microscopio e analisi genetiche (Wicht *et al.*, 2008). Questi ritrovamenti di specie esotiche sono dovuti alle nuove abitudini alimentari, quali sushi e tartare di pesci importati (ad esempio il salmone). Il rischio esistente è che le specie esotiche di botriocefalo, delle quali gli ospiti intermediari sono presenti nei nostri laghi, possano sopravvivere e mantenere il loro ciclo in Svizzera (Wicht *et al.*, 2007b) (Fig. 1.6).

Fase del ciclo vitale	Condizioni per le specie esotiche	Condizioni presenti in Svizzera
Contaminazione delle acque da parte dell'ospite definitivo	Uova indenni agli impianti di depurazione acque	Presente (1-5% delle uova passano indenni la depurazione)
Presenza dei primi ospiti intermediari	<u><i>D. nihonkaiense</i></u> : ?	<u><i>D. nihonkaiense</i></u> : ?
	<u><i>D. dendriticum</i></u> : <i>Cyclops</i> spp, <i>Eudiaptomus</i> spp	<u><i>D. dendriticum</i></u> : <i>Cyclops</i> spp, <i>Eudiaptomus</i> spp
Presenza dei secondi ospiti intermediari	<u><i>D. nihonkaiense</i></u> : <i>Oncorhynchus masou</i> , <i>O. keta</i> , <i>O. gorbuscha</i>	<u><i>D. nihonkaiense</i></u> : <i>O. masou</i> , <i>O. keta</i> e <i>O. gorbuscha</i> assenti; altre sp genere <i>Oncorhynchus</i> presenti
	<u><i>D. dendriticum</i></u> : <i>O. mykiss</i> , <i>Salmo trutta</i> , <i>Esox lucius</i> , <i>Lota lota</i> , <i>Coregonus</i> spp	<u><i>D. dendriticum</i></u> : <i>O. mykiss</i> , <i>Salmo trutta</i> , <i>Esox lucius</i> , <i>Lota lota</i> , <i>Coregonus</i> spp
Presenza degli ospiti definitivi	<u><i>D. nihonkaiense</i></u> : -mammiferi marini -Uomo, cane, gatto, volpe; -?	<u><i>D. nihonkaiense</i></u> : -assenti -2 pazienti contaminati da pesci importati; -?
	<u><i>D. dendriticum</i></u> : -Uomo, cane, gatto, ratto?;  -gabbiani ( <i>Larus</i> spp); altri uccelli?	<u><i>D. dendriticum</i></u> : -1 paziente contaminato da pesce importato; - <i>Larus argentatus</i> (N delle Alpi) e <i>Larus michaelis</i> (S delle Alpi) presenti

Fig. 1.6: Tabella che riassume le condizioni necessarie all'instaurazione del ciclo da parte di specie esotiche di *Diphyllbothrium* (*D. nihonkaiense* e *D. dendriticum*) in Svizzera. Da: (Wicht *et al.*, 2007c) (adattato).

In seguito alla diffusione di questi parassiti esotici le analisi genetiche e biomolecolari risultano essere l'unico metodo per una diagnosi certa delle diverse specie di *Diphyllbothrium* provenienti sia da campioni di pazienti, sia da pesci. Le analisi al microscopio non sono sufficienti per poter fare con sicurezza questa distinzione.

## 2. MATERIALI E METODI

Per la parte pratica in laboratorio abbiamo voluto analizzare dei campioni di *Diphyllobothrium* sp isolati da pazienti umani (proglottidi e uova presenti nelle feci), per determinare la specie del parassita mediante l'analisi della sequenza di alcuni geni discriminanti. Confrontando le sequenze ottenute con delle sequenze di referenza, disponibili nelle banche-dati online, è possibile creare degli alberi filogenetici che comprendono tutti i campioni e mettono in evidenza le differenze e le somiglianze.

### 2.1 Analisi parassitologica

I campioni pervenuti in laboratorio sono di origine clinica. Si trattava di pazienti svizzeri provenienti da diversi cantoni. Per prima cosa si sono osservati al microscopio questi campioni. Una prima identificazione, molto insicura, è già possibile a partire dall'osservazione delle uova o delle proglottidi.

I campioni analizzati non erano stati conservati in SAF (metodo classico) bensì erano nativi (senza aggiunta di conservanti) o conservati in alcool (etanolo 70%). Il SAF è una soluzione che fissa e concentra i parassiti nelle feci. Serve sia per le uova di elminti, sia per i protozoi. Formula per 1000 ml di soluzione: 15 g di acetato di sodio, 20 ml di acido acetico glaciale, 40 ml di formalina 40%, 925 ml di acqua. Il problema è che il SAF rompe il DNA, impedendone così l'estrazione e tutte le reazioni successive per l'identificazione del campione.

La metodologia per l'analisi parassitologica di campioni coprologici (feci) è la seguente:

- Agitare la sospensione (vortex) e versarla in una provetta in vetro filtrandola attraverso un colino.
- Prima di gettare il contenuto del colino controllare che non ci siano proglottidi di tenia o di botriocefalo.
- Centrifugare per 3 min a 850 g.
- Aspirare il sovrantante, lasciando un sedimento di 1 ml. Se il sedimento supera tale volume aggiungere ancora una volta del SAF e ripetere la centrifugazione.
- Aggiungere al sedimento 7 ml di NaCl e mescolare con un'ansa o con il vortex.
- Aggiungere 3 ml di etere, chiudere ermeticamente la provetta con un tappo e agitare bene.
- Centrifugare per 3 min a 850 g.
- Aspirare con la pompa i 3 strati superiori lasciando un po' di liquido sul sedimento.
- Esaminare il sedimento con l'obiettivo 10x (uova d'elminti).

### 2.2 Analisi molecolari

Come già detto prima, l'analisi parassitologica al microscopio non è sufficiente per poter identificare la specie e il genere del parassita, anzi, spesse volte non si riesce affatto a ipotizzare con che genere di parassita si ha a che fare. Per questo è stato necessario effettuare delle analisi molecolari, che consistono per prima cosa nell'estrazione di DNA dalle uova o dalle proglottidi. Dopo l'estrazione si sono amplificati i geni necessari per poi poterli sequenziare. Una volta ottenuta la sequenza la si è confrontata con le banche-dati online per l'identificazione.



Gli 11 campioni clinici analizzati sono descritti nella tabella 2.1:

N°rif	Data prelievo	Data nascita	Sesso	Domicilio	Sintomi	Consumo di pesce crudo
20 (progl)	31.08.2006	19.03.1976	F	Vésenaz (GE)	crampi;proglottidi	no, solo cotto
27 (uova)	13.10.2006	28.06.1943	F	Bubendorf (BL)	coliche,diarrea	sì
28 (uova)	18.10.2006	30.08.1965	M	Chambésy (GE)	nd	nd
29 (uova)	27.10.2006	18.06.1993	F	Blonay (GE)	nessuno; proglottidi	no
30 (uova)	30.10.2006	07.04.1965	M	Genève (GE)	nd	nd
31 (uova)	01.11.2006	22.12.1969	M	Montreux (VD)	nessuno; proglottidi	sì
32 (uova)	23.11.2006	04.01.1962	M	Chiasso (TI)	diarrea;malessere	sushi+cotto
33 (progl)	10.12.2006	20.10.1953	M	Vevey (VD)	nd	nd
34 (progl)	23.01.2007	15.05.1956	F	Lausanne (VD)	nd	nd
35 (progl)	29.01.2007	26.10.1951	F	Corsier (GE)	nd	nd
36 (progl)	10.04.2007	13.10.1949	F	Sion (VS)	nd	nd

Tabella 2.1: Campioni analizzati nello studio.

### 2.2.1 Estrazione del DNA

Il procedimento di estrazione del DNA varia a seconda del campione (proglottidi o uova).

#### Protocollo estrazione DNA da proglottidi:

- Tagliare ca. 2 segmenti di un verme adulto
- Lavarlo con PBS (tampone fosfato) per togliere eventuali residui d'alcool, che potrebbe inibire le reazioni successive
- Miscelare (vortex) e centrifugare 2 min 5000 rpm (2600 g)
- Spezzettare i segmenti con un bisturi sterile monouso
- Seguire istruzioni del protocollo "Tissue protocol" (Minikit QIAGEN)

#### Protocollo estrazione DNA da uova:

- Prendere ca. 30-40 µl di materiale (sospensione concentrata da un campione di feci) e metterlo in un eppendorf da 1.5 ml
- Aggiungere 1 ml di TE 1x pH=8, mescolare (vortex) per 15 sec, centrifugare a 850 g per 2 min
- Levare il sovrnatante e lasciare il sedimento (le uova)
- Aggiungere 1 ml di TE 1x pH=8, mescolare (vortex) per 15 sec, centrifugare a 850 g per 2 min
- Levare il sovrnatante e lasciare il sedimento (le uova)
- Seguire il primo punto del protocollo "Tissue protocol" del Minikit QIAGEN:

1. Tagliare 25 mg di tessuto in piccoli pezzi, metterlo in un eppendorf da 1.5 ml e aggiungere 180 ml di buffer ATL.

È importante tagliare in piccoli pezzi il tessuto così da ridurre il tempo di lisi. La quantità di DNA dipenderà dalla quantità e dal tipo di tessuto trattato. 1 mg di tessuto darà ca. 0.2-1.2 µg di DNA.

Gli eppendorf da 2 ml sono migliori per la lisi.

- Sottoporre 3 volte il campione a ultrasuoni a media intensità per 10 sec
- Seguire il resto del protocollo "Tissue protocol" (Minikit QIAGEN):

2. Aggiungere 20 µl di proteinasi K, mescolare (vortex) e incubare nell'agitatore a 56°C finché la lisi non è avvenuta completamente.

Nota: Il tempo di lisi varia a dipendenza del tessuto trattato. Generalmente è completa in 1-3 ore. È possibile lasciare agire la proteina K per tutta la notte, non influenza la preparazione. È raccomandato mescolare regolarmente la soluzione durante l'incubazione.

3. Centrifugare brevemente l'eppendorf per rimuovere le gocce rimaste sul coperchio. Aggiungere 200 µl di buffer AL, mescolare (vortex) per 15 s e incubare a 70°C per 10 min. Centrifugare brevemente l'eppendorf per rimuovere le gocce rimaste sul coperchio.

Nota: È essenziale che il campione e il buffer AL siano mescolati bene per avere una soluzione omogenea. Un precipitato bianco potrebbe formarsi all'aggiunta del buffer AL, che nella maggior parte dei casi si dissolve nell'incubazione a 70°C. Il precipitato non interferisce con la procedura QIAamp o con altre applicazioni successive.

4. Aggiungere 200 µl di etanolo (96-100%) al campione e mescolare (vortex) per 15 s. Dopo aver mescolato, centrifugare brevemente per rimuovere le gocce dal coperchio.

Nota: È essenziale che il buffer AL e l'etanolo siano mescolati bene per ottenere una soluzione omogenea. Un precipitato bianco potrebbe formarsi con l'aggiunta dell'etanolo. È molto importante caricare tutto il precipitato nella colonnina (QIAamp Spin Column). Il precipitato non interferisce con la procedura QIAamp o con altre applicazioni successive.

5. Applicare attentamente la miscela con il precipitato nella colonnina QIAamp Spin Column (inserita in un eppendorf da 2) senza bagnare il bordo. Chiudere il coperchio e centrifugare a 6000 g per 1 min. Mettere la QIAamp Spin Column in un nuovo eppendorf da 2 ml e gettare l'eppendorf sottostante contenente il filtrato.

Nota: Chiudere ogni colonnina per evitare che si formi dell'aria durante la centrifugazione. È molto importante mettere tutto il precipitato nella QIAamp Spin Column. La centrifugazione è eseguita a 6000 g in modo da ridurre il rumore: centrifugare a massima velocità non influisce sulla quantità o sulla purezza del DNA che si otterrà. Se la soluzione non è passata completamente attraverso la membrana, centrifugare ancora una volta ad una velocità maggiore, finché tutta la soluzione sia filtrata.

6. Aprire con cautela la colonnina e aggiungere 500 µl di buffer AW1 senza bagnare il bordo. Chiudere il coperchio e centrifugare a 6000 g per 1 min. mettere la colonnina in un nuovo eppendorf da 2 ml e gettare l'eppendorf sottostante contenente il filtrato.

7. Aprire con cautela la colonnina e aggiungere 500 µl di buffer AW2 senza bagnare il bordo. Chiudere il coperchio e centrifugare alla massima velocità (20'000 g) per 3 min. Per eliminare ogni residuo di tampone AW2 (che potrebbe causare dei problemi nelle applicazioni successive) continuare con lo step 7a, prima di effettuare lo step 8.

7a. (Raccomandato): Mettere la colonnina in un nuovo eppendorf da 2 ml e gettare l'eppendorf sottostante contenente il filtrato..Centrifugare a 20'000 g per 1 min.

8. Mettere la colonnina in un nuovo eppendorf da 1.5 ml e gettare l'eppendorf sottostante contenente il filtrato. Aprire con cautela la colonnina e aggiungere 200 µl di buffer AE o di acqua distillata. Incubare a temperatura ambiente per 1 min e in seguito centrifugare a 6'000 g per 1 min.

9. Ripetere lo step 8.

Nota: Incubare per 5 min la colonnina riempita con il buffer AE o con acqua distillata, prima di centrifugare, generalmente aumenta la quantità di DNA.

Ripetere una terza volta lo step 8 con l'aggiunta di 200 µl di buffer AE aumenta la quantità di DNA del 15%.

Per conservare il DNA a lungo termine è raccomandata la diluizione in buffer AE, da conservare a -20°C, perché in acqua è soggetto a idrolisi acida.

Le quantità di DNA ottenute dipenderanno dalla quantità e dal tipo di tessuto trattato. 25 mg di tessuto danno approssimativamente 10-30 µg di DNA in 400 µl di acqua (25-75 ng/µl).

### 2.2.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR è una reazione di amplificazione, ci permette infatti di amplificare la quantità di DNA ottenuta con l'estrazione (Atlas, 1994). Solitamente non si amplifica tutto il DNA, ma soltanto i geni che ci interessano. Questo è possibile utilizzando dei primers specifici, che, attaccandosi al gene da amplificare, costituiscono il punto di partenza della DNA polimerasi.

Nella PCR le fasi fondamentali sono tre:

1. Denaturazione: divisione della doppia elica di DNA.
2. Annealing: punto in cui i primer si attaccano.
3. Extension: la DNA polimerasi inizia a riscrivere il filamento complementare delle due eliche, a partire da dove si sono fissati i primers, attaccando le basi azotate libere nella soluzione.

La temperatura di annealing è molto importante, infatti se troppo bassa, il primer, punto di partenza della DNA polimerasi, potrebbe attaccarsi a dei segmenti genici simili al gene da amplificare, ma a cui non siamo interessati, rischiando così di perderne la specificità. Per non compromettere tutta la reazione di amplificazione è dunque necessario avere una temperatura adeguata.

I geni amplificati sono stati un gene presente nel DNA nucleare (codificante per l'unità ribosomale 18S - 18S rRNA) e un gene presente nel DNA mitocondriale (codificante per l'enzima citocromo c ossidasi subunità I - COI). Il kit utilizzato è il Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland). La scelta del gene 18S rRNA è legata al suo utilizzo quale metodo classico per la classificazione tassonomica degli eucarioti. Tuttavia, le sequenze di questo gene non sono sempre sufficienti per una distinzione a livello specifico (specie diverse possono avere sequenze simili). Per questo motivo si è preferito sequenziare anche il gene COI. I geni mitocondriali presentano infatti diversi vantaggi, utili per l'identificazione delle specie. Innanzitutto il DNA mitocondriale evolve più rapidamente del DNA nucleare; è più piccolo del DNA nucleare; è presente in più copie nelle singole cellule; la sequenza completa del DNA mitocondriale è nota per molti organismi; e contiene geni a diversi tassi di mutazione, che lo rendono utile per analisi sia inter- che intra-specifiche. È insomma una sorta di "carta d'identità" dell'organismo. La sequenza del gene COI è delimitata da sequenze molto conservate, che sono dunque facili da isolare e verificare (in altri termini, i primers sono "robusti").

I primers utilizzati per amplificare il gene 18S rRNA sono Mariaux 91 (Forward) e Mariaux 81 (Reverse) (Mariaux, 1998) (Fig 2.2). Per il gene COI i primer sono JB3 (Forward) e JB4,5 (Reverse) (Bowles *et al.*, 1992; Bowles & McManus, 1994; Garey & Wolstenholme, 1989).

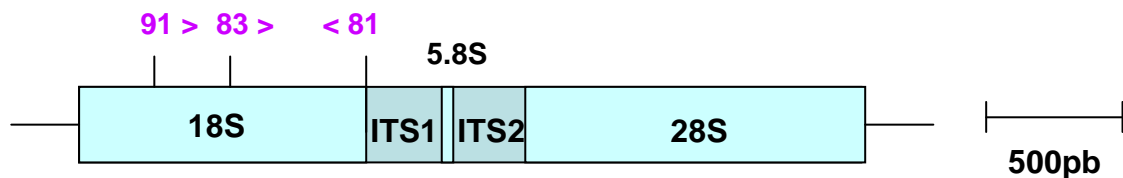


Fig. 2.2: Posizione dei primers utilizzati per l'amplificazione del gene 18S rRNA.

#### Protocollo Taq PCR Master Mix Kit:

Il kit contiene Taq DNA polimerasi, 2 colonnine QIAGEN PCR, 3 mM MgCl<sub>2</sub> e 400 μM di ogni dNTP.

Per eseguire il protocollo è necessario preparare le miscele in un luogo diverso da dove viene effettuata l'estrazione di DNA, questo per evitare delle eventuali contaminazioni del campione da amplificare.

1. Scongellare i primers.

Nota: Mescolarli bene prima di usarli e in seguito ricongelarli.

2. Mescolare (vortex) il Taq PCR Master Mix e aggiungerne 25 µl in ogni eppendorf.

Nota: È importante mescolare il Taq PCR Master Mix per evitare differenze di concentrazione. 25 µl di soluzione Master Mix sono necessari per un'amplificazione con 50 µl di volume finale. Inoltre bisognerebbe includere un controllo negativo (senza DNA) per verificare che i campioni non siano stati contaminati.

3. Aggiungere 1.5 µl di primer Forward [10µM] e 1.5 µl di primer Reverse [10µM].

4. Aggiungere 10 µl di DNA ( $\leq 1$  µg/reazione) di campione in ogni colonnina.

5. Aggiungere acqua sterile fino a raggiungere un volume totale di 50 µl.

6. Programmare il cycler, ossia stabilire il numero di cicli che si vogliono effettuare e le temperature nelle varie fasi.

7. Mettere le colonnine nel termocycler e cominciare il programma.

Per l'amplificazione di due geni diversi nello stesso tempo, è stato necessario trovare delle temperature di annealing che andassero bene per entrambi. Ciclo misto per 18S rRNA e COI:

- 5' 94°C denaturazione iniziale
- 40x (30" 94°C – 40" 45°C annealing – 1' 72°C extension)
- 10' 72°C
- conservazione a 4 °C

Nella tabella 2.3 è riassunta la procedura di preparazione dei campioni.

Campione	MasterMix (µl)	Primer F (µl)	Primer R (µl)	DNA (µl)	H2O (µl)
28S	25	1.5 Mar91	1.5 Mar81	10 campione#28	12
29S	25	1.5 Mar91	1.5 Mar81	10 campione#29	12
30S	25	1.5 Mar91	1.5 Mar81	10 campione#30	12
31S	25	1.5 Mar91	1.5 Mar81	10 campione#31	12
36S	25	1.5 Mar91	1.5 Mar81	10 campione#36	12
28C	25	1.5 JB3	1.5 JB4.5	10 campione#28	12
29C	25	1.5 JB3	1.5 JB4.5	10 campione#29	12
30C	25	1.5 JB3	1.5 JB4.5	10 campione#30	12
31C	25	1.5 JB3	1.5 JB4.5	10 campione#31	12
36C	25	1.5 JB3	1.5 JB4.5	10 campione#36	12
26C	25	1.5 JB3	1.5 JB4.5	10 campione#26	12
27C	25	1.5 JB3	1.5 JB4.5	10 campione#27	12
32C	25	1.5 JB3	1.5 JB4.5	10 campione#32	12

Tabella 2.3: Preparazione dei campioni secondo protocollo del Taq PCR Master Mix Kit.

#### Elettroforesi:

Quando la PCR è terminata bisogna effettuare un controllo per verificare che l'amplificazione sia avvenuta correttamente e che i campioni non siano stati contaminati. Questo controllo viene fatto su gel d'agarosio [0.8%], tramite l'elettroforesi. È stato utilizzato un peso molecolare 50 bp, come scala di riferimento per stimare la lunghezza degli amplificati ottenuti.

Preparazione del peso molecolare:

- 7  $\mu$ l di massa molecolare (50bp)
- 3  $\mu$ l di loading buffer (quantità standard), che serve per mantenere sul fondo dei pozzetti il campione
- 3  $\mu$ l di acqua sterile\*

Preparazione dei campioni amplificati:

- 10  $\mu$ l di campione
- 3  $\mu$ l di loading buffer (quantità standard)
- 3  $\mu$ l di acqua sterile\*

\* il volume d'acqua varia a dipendenza della quantità di campione messa in ogni pozzetto, deve parificare il volume in tutti i pozzetti fino a un volume totale di 13  $\mu$ l

Preparazione del gel d'agarosio [0.8%]:

- 100 ml di TBE + 0.8g di agarosio (scaldare la soluzione fino a completo scioglimento dell'agarosio)
- 3.5  $\mu$ l di bromuro di etidio per colorare il DNA (aggiungere solo quando la soluzione è diventata tiepida)
- Versare il gel tiepido nel supporto e immergervi un pettine con 16 pozzetti, nei quali verranno caricati i campioni di DNA e il peso molecolare; lasciar solidificare.

Immergere il gel d'agarosio [0.8%] solido nella vaschetta per elettroforesi, in una soluzione di TBE (Tris-borate/EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)) e levare il pettine. Caricare in ogni pozzetto un campione di DNA amplificato e in un pozzetto centrale il peso molecolare. Far migrare a 150 V per 2-3 min e in seguito diminuire a 120 V per circa 45 min (il tempo di migrazione è indicativo).

### 2.2.3 Purificazione dei prodotti PCR

Dalla fotografia dell'elettroforesi, a dipendenza dunque dalla dimensione delle bande che si sono ottenute, si decide in che quantità (volume) di soluzione sospendere il DNA per purificarlo dai nucleotidi (dNTP) e altre sostanze usate nella PCR.

È stato utilizzato il Kit NucleoSpin (Macherey Nagel), seguendo il protocollo per la purificazione diretta dei prodotti della PCR:

1. Aggiungere 10  $\mu$ l di TE 1x al campione.
2. Mescolare 1 volume del campione (50  $\mu$ l) con 2 volumi del buffer NT (100  $\mu$ l).
3. Fissare il DNA:  
Mettere una colonnina NucleoSpin® Extract II (contenente un filtro) in una colonnina da 2 ml NucleoSpin® Collecting Tube (sottotubo) e caricare il campione.  
Centrifugare per 1 min a 11'000 g, gettare via il filtrato e mettere la colonnina con il filtro nel sottotubo.
4. Lavaggio della membrana:  
Aggiungere 600  $\mu$ l di buffer NT3. Centrifugare per 1 min a 11'000 g, gettare via il filtrato e rimettere la colonnina nel sottotubo.
5. Asciugare la membrana:  
Centrifugare 2 min a 11'000 g per rimuovere quantitativamente il buffer NT3. Assicurarsi che la colonnina con il filtro non entri in contatto con il liquido filtrato mentre lo si rimuove dal sottotubo.

#### 6. Risospendere il DNA:

Mettere la colonnina NucleoSpin® Extract II in un eppendorf da 1.5 ml. Aggiungere 15-50 µl di buffer NE (secondo intensità del campione amplificato, visualizzato sul gel d'agarosio) e incubare a temperatura ambiente per 1 min per aumentare la quantità di DNA. Centrifugare per 1 min a 11'000 g. Gettare la colonnina e conservare il filtrato (prodotto PCR purificato) nell'eppendorf a 4 °C.

#### 2.2.4 Quantificazione dei prodotti PCR

Per utilizzare la quantità giusta di DNA per la reazione di sequenza che si vuole eseguire, il prodotto PCR purificato è stato quantificato con il metodo PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagent and Kit (Molecular Probes Inc.). Questo reagente particolare è un colorante fosforescente che permette una quantificazione molto precisa (fino a 25 pg/ml) e con una minima interferenza da parte dell'RNA, DNA o di altri agenti contaminanti. Il range di linearità si situa, per ogni concentrazione di reagente aggiunta, tra 0 e >750 ng/ml. Con un fluorimetro è possibile quantificare l'emissione (in 4 direzioni) a 520 nm, dopo eccitazione a 480 nm. Il protocollo seguito è il seguente:

- In una provetta mescolare 2.5 µl di campione da quantificare con 497.5 µl TE 1x e 500 µl di soluzione 1:200 TE 1x-PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagent (497.5 µl TE 1x + 2.5 µl PicoGreen)
- Lasciare la provetta per 2 min completamente al buio
- Versare il contenuto in una cuvetta (10x10 m, cammino ottico 12.5 mm, PLASTIBRAND®) e caricarla nel fluorimetro (TD-700 Fluorometer)

La concentrazione del DNA viene espressa in ng/ml. Per poter calcolare la concentrazione iniziale di campione si è dovuto tenere conto delle diluizioni applicando la formula seguente:

$$[ng/\mu l] = \frac{[ng/ml] \times 2 \times 100}{1000}$$

Questo ha permesso di calcolare la quantità di campione necessaria (in µl) da aggiungere alla reazione di sequenza, descritta di seguito.

#### 2.2.5 Reazione di sequenza

Il sequenziamento dei geni amplificati permette di stabilire le basi azotate che li compongono. È stato utilizzato il protocollo del kit ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Le reazioni di sequenza sono state così preparate:

- 3 µl Ready Reaction Premix
- 1.5 µl Big Dye Sequencing Buffer
- 2.4 µl primer Forward o Reverse [1 µM]
- x µl di campione, secondo il calcolo di quantificazione
- acqua sterile, fino a raggiungere un volume totale di 15 µl

Ciclo standard utilizzato: 96°C 1' / 25x (96°C 10" - 50°C 5" - 60°C 4') / 4°C ∞

## 2.2.6 Purificazione

I prodotti della reazione di sequenza devono essere purificati prima di caricarli nel sequenziatore, per evitare errori nella lettura dei nucleotidi (residui di ddNTPs e primers). Si è purificata la soluzione (15 µl) tramite osmosi, depositandola su dei filtri circolari Millipore 0.025 µm (Millipore) in capsule di Petri contenenti TE pH 8. Dopo 2 h i primers, i ddNTPs e gli altri residui sono passati nel TE sottostante. Si sono prelevati 8 µl di liquido rimasto sul filtro e si sono posti in tubi 0.5 ml (Genetic Analyzer Sample Tubes, Applied Biosystems). Sono stati aggiunti 12 µl di Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems) per evitare il prosciugamento del prodotto della reazione di sequenza. I tubi sono stati finalmente caricati nel sequenziatore a capillare automatico (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer, Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim, Suisse).

## 2.2.7 Lettura e analisi della sequenza

Il sequenziatore automatico (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer, Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim, Suisse; Fig. 2.4) separa i frammenti e, attraverso un laser, legge in successione le terminazioni “2’-3’ didéoxy” (ddNTPs) marcate con 4 fluorofori differenti (corrispondenti alle basi azotate A, C, T, G). Questo tipo di apparecchio può sequenziare automaticamente dei polinucleotidi da 500 a 800 nucleotidi (frammenti lunghi). La sequenza è inviata direttamente al computer per le analisi bioinformatiche (elettroferogramma, Fig 2.4) e l’analisi filogenetica.

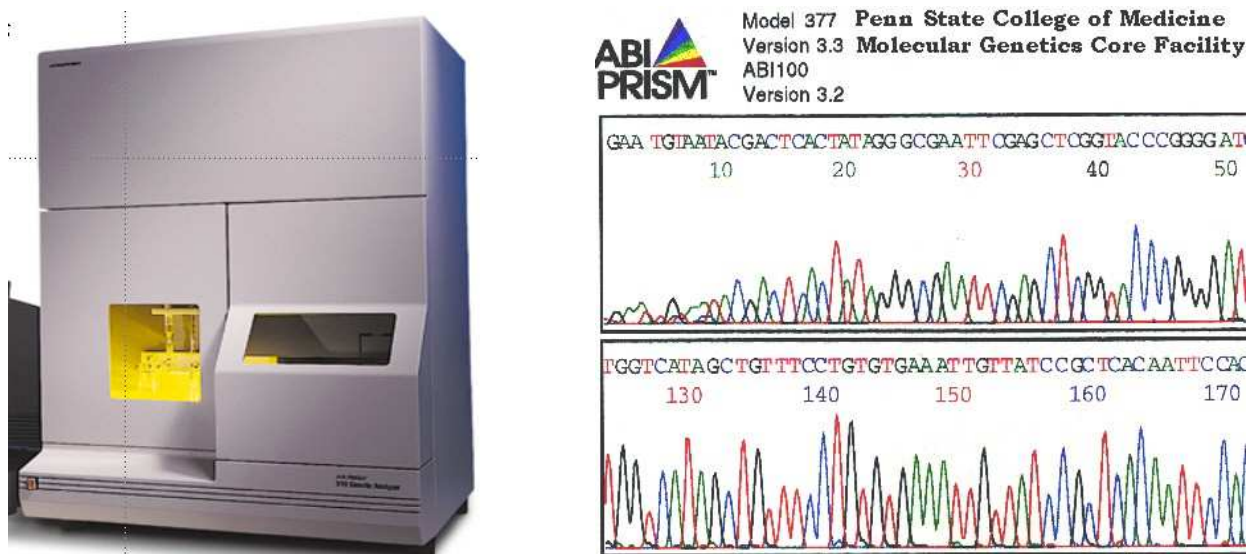


Fig. 2.4: Sequenziatore ABI PRISM® 310 (sinistra) ed elettroferogramma (destra).

Il sequenziamento automatico ci restituisce un grafico in cui sono riportati i picchi registrati dal laser. Essendo ogni ddNTP marcato con un dye ad emissione differente, per ogni posizione avremo quattro picchi di cui uno, se la sequenza è bella, sarà molto più intenso degli altri. Il computer che analizza il grafico va a leggere i vari picchi, genera il grafico detto elettroferogramma e da esso crea direttamente il file della sequenza. Non sempre però, per vari motivi, due picchi hanno intensità confrontabili e nella sequenza troveremo una N che indica l’incertezza. Per altrettanti motivi è possibile che alcuni picchi siano più larghi del dovuto e il computer può registrare due nucleotidi uguali di seguito quando in realtà che n’è soltanto uno. Quello che bisogna fare prima di poter passare all’analisi bioinformatica, è controllare manualmente tutta la sequenza scritta e correggere eventuali errori.

Il file ottenuto può essere ora esportato dal computer collegato al sequenziatore e analizzato. I software che sono stati utilizzati per le correzioni e le analisi sono stati due:

- **EditSeq™ (DNASTAR Inc.):** le funzioni principali utilizzate in questo programma prevedono la creazione di file di sequenza eliminando il problema della spaziatura dei caratteri esistente in altri editor di testo “normali”. Alla sequenza è accompagnata la numerazione delle basi che permette di ritrovare siti specifici molto velocemente. Oltre alla creazione di sequenze il programma deve essere utilizzato per importare i file di sequenza. In questo modo è possibile correggerli e tagliare le parti non utilizzabili (solitamente all’inizio e alla fine della sequenza). Il formato in cui i file sono salvati è compatibile con altri programmi bioinformatici.

- **Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 3.0** (Kumar *et al.*, 2004): il software MEGA3 è un programma che permette non solo di allineare tra di loro le sequenze, correggerle, tagliarle, ecc., ma anche, da un allineamento multiplo, di ottenere direttamente un albero filogenetico di cui possono essere impostati i parametri. Importandovi una sequenza è possibile anche confrontarla direttamente con le sequenze presenti nei database (Blast) per analizzare le eventuali omologie e stabilirne l’identità. MEGA3 permette anche di passare da una sequenza nucleotidica a quella proteica.

Per costruire gli alberi filogenetici (Figg. 3.3 e 3.4) è stato utilizzato il metodo Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987).



### 3. RISULTATI

#### 3.1 Analisi parassitologica

L'osservazione al binoculare (proglottidi) e al microscopio (ingrandimento 400x e 1000x, uova) ha confermato la diagnosi dei campioni come parassiti appartenenti al genere *Diphyllbothrium* sp.

#### 3.2 Analisi molecolari

##### 3.2.1 PCR

La Fig. 3.1 mostrache sia il gene 18S, sia il gene COI dei campioni no 30, 31 e 36 sono stati amplificati con successo. Si notano infatti tre bande intense alla stessa altezza per il 18S e altre tre bande ad una altezza diversa dalle tre precedenti, ma uguale tra loro per il COI. Anche i geni dei campioni no 26, 27 e 32 sono stati amplificati, anche se la minore intensità delle bande indica che la quantità di materiale è minore. Per i campioni no 28 e 29 invece non è presente nessuna banda né per il gene 18S, né per il gene COI. Questo ci fa pensare che non è stato un problema di PCR, ma che il problema è stata l'estrazione del DNA, che probabilmente non è avvenuta correttamente. L'intensità delle bande ci dà anche un'idea sulla concentrazione del DNA, l'intensità di una banda è direttamente proporzionale alla concentrazione del DNA, minore intensità corrisponde quindi a minore concentrazione.

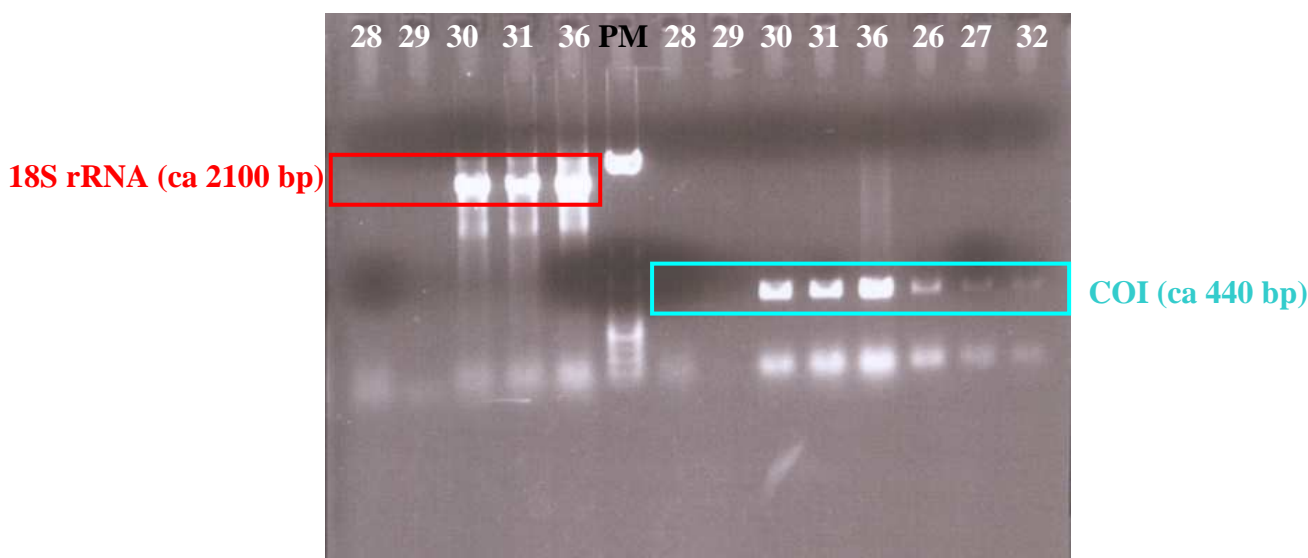


Fig 3.1: Amplificati dei geni 18S rRNA e COI, visualizzati su gel d'agarosio tramite elettroforesi.

##### 3.2.2 Purificazione e quantificazione prodotti PCR

La concentrazione di DNA quantificato è stata calcolata in ng/μl (v. formula capitolo 2.2.4); la quantità di DNA da utilizzare nella reazione di sequenza è stata calcolata basandosi sulla quantità di DNA minima standard necessaria, fornita dalla ditta produttrice del kit ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit: 50 ng per i geni lunghi oltre 2000 paia di basi (come il gene 18S rRNA) e 10 ng per i geni di lunghezza compresa tra 200 e 500 paia di basi (come il gene COI). I risultati sono riassunti nella tabella 3.2.

Campione	[DNA] (ng/ml)	[DNA] (ng/μl)	DNA necessario per reaz. seq. (ng)	DNA da utilizzare per reaz. Seq. (μl)
30S	101	40.4	50	1.2
31S	93	37.2	50	1.3
36S	157	62.8	50	0.8
30C	42	16.8	10	0.6
31C	36	14.4	10	0.7
36C	54	21.6	10	0.5
26C	18	7.2	10	1.4
27C	10	4	10	2.5
32C	5	2	10	5

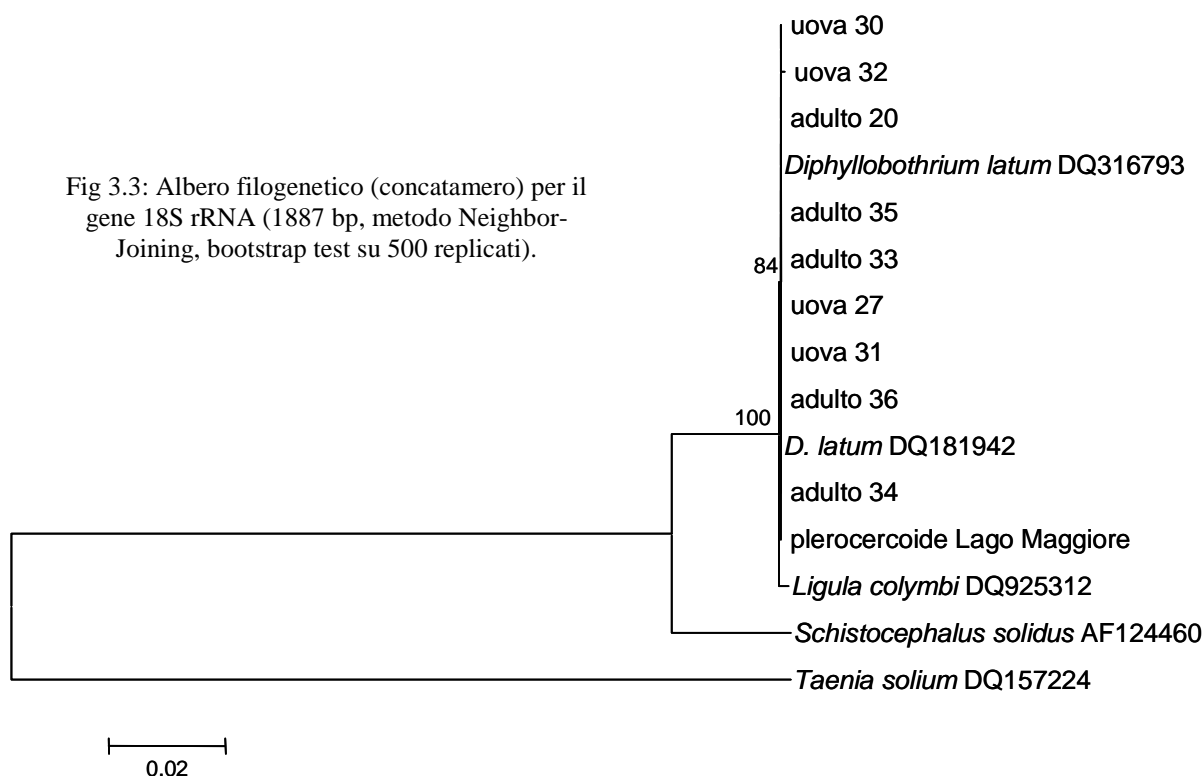
Tabella 3.2: Calcolo della quantità di DNA (amplicon) da utilizzare per la reazione di sequenza.

### 3.2.3 Lettura e analisi della sequenza

I risultati ottenuti sono stati soddisfacenti. Con l'utilizzo della banca dati si sono potute identificare le sequenze no 26, 27, 31, 31, 32 e 36. Tutti i campioni appartenevano alla specie *D. latum*. Mentre le sequenze no 28 e 29, come previsto dopo il controllo tramite elettroforesi su gel d'agarosio, non sono state identificate.

Con le sequenze ottenute per i due geni analizzati sono stati costruiti due alberi filogenetici diversi. Il primo riguardante il gene 18S rRNA e il secondo riguardante il gene della citocroma ossidasi subunità 1 (COI). Per quanto riguarda il primo albero si è dovuto costruire un concatamero, ossia si è dovuto mettere insieme la prima parte e l'ultima parte del gene. Il gene 18S rRNA infatti è molto lungo e con la PCR non si riesce ad amplificarlo tutto con solamente due primers (Reverse e Forward), ma sarebbero necessari altri due primers a metà del gene - denominati Mar 83 e Mar 84 (Mariaux, 1998). Per l'identificazione della specie è però sufficiente utilizzare i primers Mar 81 e 91. Per l'albero filogenetico del COI non è stato necessario effettuare questa operazione, essendo il gene sufficientemente corto per essere "letto" sia in andata sia in ritorno con i primers JB3 e JB4,5.

Fig 3.3: Albero filogenetico (concatamero) per il gene 18S rRNA (1887 bp, metodo Neighbor-Joining, bootstrap test su 500 replicati).



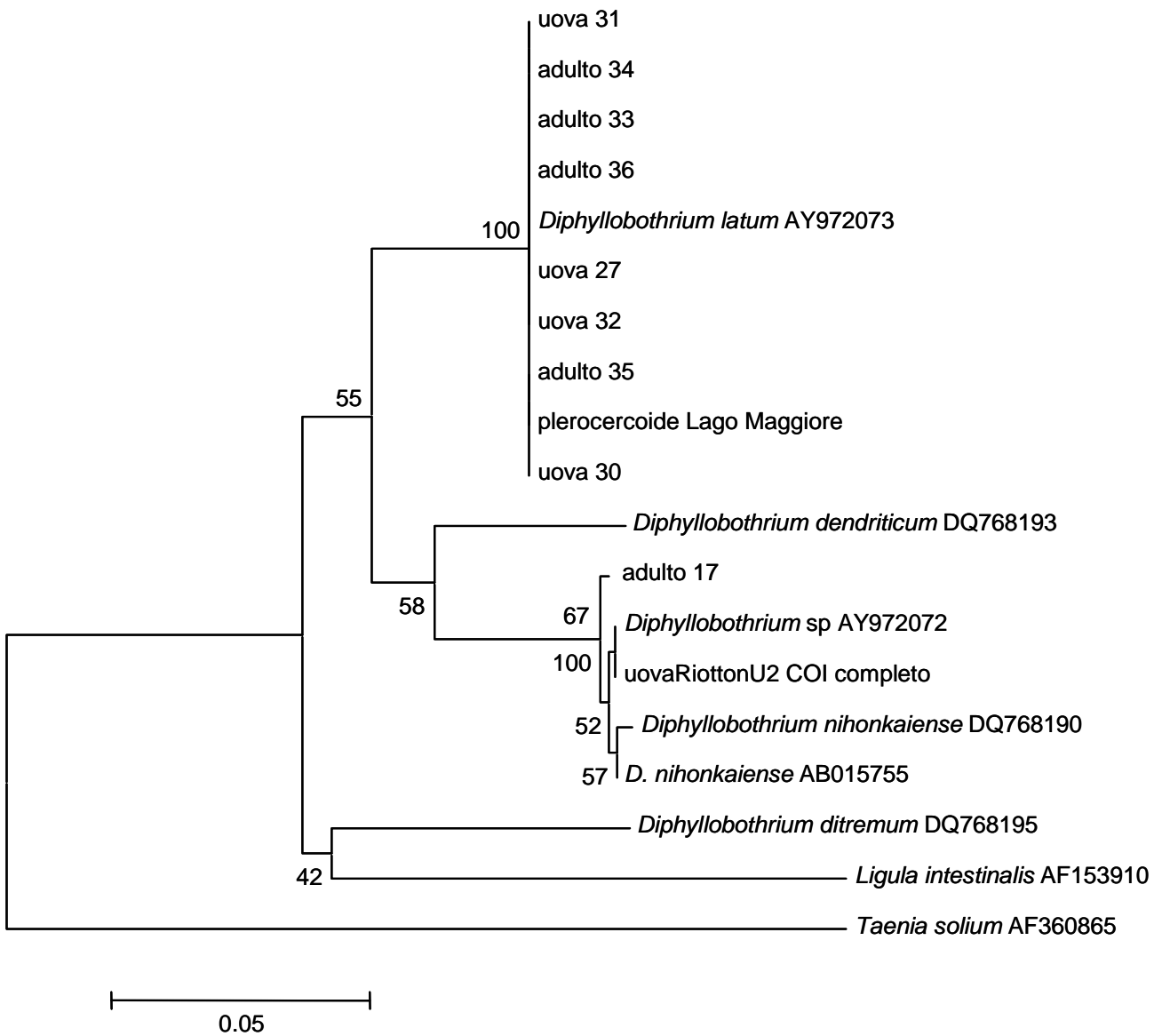


Fig 3.4: Albero filogenetico per il gene COI (358 bp, metodo Neighbor-Joining, bootstrap test su 500 replicati).

#### 4. DISCUSSIONE

Le analisi genetiche effettuate su campioni clinici provenienti da pazienti svizzeri hanno permesso di determinare l'identità di parassiti, precedentemente diagnosticati come *Diphyllbothrium* sp. a livello morfologico (metodi classici dei laboratori di analisi mediche). Il gene 18S rRNA si è rivelato ben scelto per una prima identificazione a livello di specie. L'analisi delle sequenze di questo gene non sono tuttavia sufficientemente informative per identificare tutte le specie di botriocefali (ad esempio, specie diverse come *D. ditremum* e *D. dendriticum* hanno sequenze 18S rRNA identiche). La sequenza del gene mitocondriale della citocroma c ossidasi subunità I (COI) ha permesso di confermare i risultati dell'analisi del DNA nucleare. Gli alberi filogenetici mostrano che 9 campioni clinici analizzati su 11 hanno un'identità pari al 100% con la specie *D. latum*. Non sono state evidenziate differenze intra-specifiche tra un campione e l'altro e la specie sembra costituire un ceppo evolutivamente molto conservato. Non esiste praticamente alcuna variabilità né nelle sequenze di geni nucleari (18S rRNA), né in quelle di geni mitocondriali (COI), rispetto alle sequenze di riferimento. I risultati ottenuti sono stati soddisfacenti, poiché su 11 campioni analizzati soltanto due non sono stati identificati. Questo ci fa pensare che questi ultimi siano stati conservati in qualche sostanza inibitrice per le reazioni eseguite (ad esempio la formalina).

Dal punto di vista ecologico la difillobotriosi è una parassitosi non soltanto presente, ma anche in risorgenza nel Lago Maggiore, così come nella regione Insubrica e nella Svizzera romanda. Secondo le anamnesi dei pazienti, la recrudescenza di *D. latum* è verosimilmente legata a nuovi comportamenti alimentari. È infatti possibile constatare in molti ristoranti della regione l'offerta di piatti a base di pesce crudo, affumicato o insufficientemente cotto (sushi, tartare, carapccio). Il conseguente incremento dell'infestazione, porta la prova che solamente la cottura del pesce garantisce una protezione totale per la popolazione rivierasca. Gli impianti di depurazione delle acque sono certamente necessari ed impediscono che la parassitosi si sviluppi oltremodo, però non costituiscono una misura sufficiente per interrompere il ciclo del parassita, poiché non è possibile purificare completamente l'acqua. La percentuale della carica parassitaria abbattuta varia tra il 95 e il 99%. In laghi dove questi impianti sono carenti, ad esempio sulle sponde italiane del Lago Maggiore o dalla parte francese del Lemano, il tasso di difillobotriosi nel pesce è molto alto. A livello di prevenzione, è quindi molto importante consumare pesce cotto per almeno 5 minuti a 55°C o congelarlo a -10°C per un minimo di 24 ore (72 h per i pesci di grosse dimensioni), prima di consumarlo crudo.

Le analisi molecolari si dimostrano necessarie per la corretta determinazione dei parassiti, mentre i metodi di diagnosi morfologica non sono sufficienti. È importante conoscere esattamente da quale specie sia affetto un paziente, perché questo rende possibile risalire al pesce che è stato consumato (locale oppure d'importazione). Soltanto in questo modo è possibile monitorare la situazione dei diversi parassiti e stimare i rischi legati al consumo di un determinato prodotto ittico. Un paziente infetto da botriocefali esotici (come *D. dendriticum* e *D. nihonkaiense*) potrebbe infatti introdurre le uova in nuovi ambienti, causando l'infestazione di nuove specie di pesce e aumentando il rischio per la popolazione..

## 5. BIBLIOGRAFIA

**Atlas, R. M., Bej, A. K. (1994).** Polymerase Chain Reaction. In *Methods for general and molecular bacteriology*, pp. 418–435. Edited by R. G. E. M. P. Gerhardt, W. A. Wood and N. R. Krieg. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

**Bonini, P., Montorfani, S., Peduzzi, R. & Renon, P. (1998).** Situazione della plerocercosi nei laghi insubrici italo-svizzeri. *Obiettivi & documenti veterinari* **4**, 65-71.

**Bouchet F., Petrequin P., Paicheler, J. C. et Dommelier S. (1995).** First palaeoparasitological approach of the neolithic site of Chalais (Jura, France). *Bull Soc Path Ex.* **88**(5):265-8.

**Bowles, J., Blair, D. & McManus, D. P. (1992).** Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol* **54**, 165-173.

**Bowles, J. & McManus, D. P. (1994).** Genetic Characterization of the Asian Taenia, a Newly Described Taeniid Cestode of Humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **50**, 33.

**Brabec, J., Kuchta, R. & Scholz, T. (2006).** Paraphyly of the Pseudophyllidea (Platyhelminthes: Cestoda): Circumscription of monophyletic clades based on phylogenetic analysis of ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology* **36**, 1535-1541.

**Braun, M. (1881-1883).** Zur Frage des Zwischenwirthes von *Bothriocephalus latus* Brems. *Zool Angew.* **4**:593-597, **5**:39-43, **5**:194-196, **6**:97-99.

**Carvalho Gonçalves, M. L., Araújo, A. et Ferreira, L. F. (2003).** Human intestinal parasites in the past: new findings and a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **98** (Suppl. 1):103-18.

**Desvois, L., Gregory, A., Ancelle, T. & Dupouy-Camet, J. (2001).** Enquête sur l'incidence de la bothriocéphalose en Haute-Savoie (1993-2000). *Bull Epidemiol Hebd* **45**, 211-213.

**Dupouy-Camet, J. & Peduzzi, R. (2004).** Current situation of human diphyllbothriasis in Europe. *Euro Surveill* **9**, 31-35.

**Feachem, R., Bradley, D., Garelick, H. & Mara, D. (1983).** *Diphyllobothrium* and diphyllbothriasis in Sanitation and disease: Health aspects of excreta and wastewater management. World Bank report, 1983; N 11616: 407-411.

**Garey, J. R. & Wolstenholme, D. R. (1989).** Platyhelminth mitochondrial DNA: Evidence for early evolutionary origin of a tRNA ser AGN that contains a dihydrouridine arm replacement loop, and of serine-specifying AGA and AGG codons. *Journal of Molecular Evolution* **28**, 374-387.

**Golay, M. & Mariaux, J. (1995).** Situation de *Diphyllobothrium latum*, L., 1758, dans quatre lacs du plateau suisse. *Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles* **118**, 79-86.

**Gustinelli, A., Invernizzi, S., Kuchta, R. & Fioravanti, M. L. (2007).** Fish-borne parasitic zoonoses : recrudescence of diphyllbothriasis in Como lake, Northern Italy. In *International Symposium of Fish Parasites*. Viterbo.

**Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004).** MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**, 150-163.

**Janicki, C. et Rosen, F. (1917).** Le cycle évolutif du *Dibothriocephalus latus* L. Recherches expérimentales et observations. *Bull Soc Neuchateloise Sci Nat.* **13**:19-53.

**Mariaux, J. (1998).** A Molecular Phylogeny of the Eucestoda. *The Journal of Parasitology* **84**, 114-124.

**Moschen, L. (1882).** A proposito della diffusione del *Bothriocephalus latus* Brem. In Italia. *Gazzetta Medica Italiana - Province Venete*, Anno XXV. **19**,2-10.

**Parona, E. (1886).** Il *Bothriocephalus latus* in Lombardia. *Rendiconti della Regia Istituto Lombardo*. Serie II, **19**(14):1-10.

**Peduzzi, R. (1990).** Résurgence de la bothriocéphalose (parasitose à *Diphyllobothrium latum*) dans la région du lac Majeur. *Médecine et Maladies Infectieuses* **20**, 493-497.

**Peduzzi, R. & Boucher-Rodoni, R. (2001).** Resurgence of human bothriocephalosis (*Diphyllobothrium latum*) in the subalpine lake region. *J Limnol* **60**, 41-44.

**Peduzzi, R. & De Rossa, R. (2001).** I parassiti più frequenti nella pratica analitica quotidiana. In *Labmed*, pp. 15-18.

**Railo, J. E. (1998).** Herman Diedrich Sporing (1701-1747), Professor der Medizin in Turku (1728-1747). *Hippokrates* (Helsinki). **15**:19-43.

**Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.

**Santos, F. L. N. & Faro, L. B. (2005).** The first confirmed case of *Diphyllobothrium latum* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **100**, 685-686.

**Terramocci, R., Pagani, L., Brunati, P., Gatti, S., Bernuzzi, A. M. & Scaglia, M. (2001).** Reappearance of Human Diphyllobothriasis in a Limited Area of Lake Como, Italy. *Infection* **29**, 93-95.

**Torres, P., Cuevas, C., Tang, M. & other authors (2004).** Introduced and Native Fishes as Infection Foci of *Diphyllobothrium* spp. in Humans and Dogs from Two Localities at Lake Panguipulli in Southern Chile. *Comparative Parasitology* **71**, 111-117.

**Wicht, B., Tonolla, M., Riccardi, N., Giussani, G., Nicoulaud, J., Dupouy-Camet, J. & R., P. (2006).** Monitoring and molecular characterization of *Diphyllobothrium latum* in intermediate hosts of the Lago Maggiore and other Swiss lakes. In *ICOPA XI - 11th International Congress of Parasitology XI*. Glasgow (UK).

**Wicht, B., de Marval, F. & Peduzzi, R. (2007a).** *Diphyllobothrium nihonkaiense* (Yamane et al., 1986) in Switzerland: First molecular evidence and case reports. *Parasitology International* **56**, 195-199.

**Wicht, B., Ruggeri, N., de Marval, F., Riccardi, N., Tonolla, M., Demarta, A. & R., P. (2007b).** Monitoring and molecular characterization of *Diphyllobothrium* spp. in the subalpine lake region. In *Congrès de la Société Suisse de Microbiologie*. Interlaken, Switzerland.

**Wicht, B., de Marval, F., Gottstein, B. & Peduzzi, R. (2007c).** Evidence of imported diphyllobothriasis (*Diphyllobothrium nihonkaiense* and *D. dendriticum*) in Switzerland. In *1st Three Countries Joint Meeting, Physiopathology of Intracellular Parasitic Diseases*. Strasbourg (France).

**Wicht, B., de Marval, F., Gottstein, B. & Peduzzi, R. (2008).** Imported diphyllobothriasis in Switzerland: molecular evidence of *Diphyllobothrium dendriticum* (Nitsch, 1824). *Parasitol Res* **102**, 201-204.