Zeitschrift: Bollettino della Società ticinese di scienze naturali

Herausgeber: Società ticinese di scienze naturali

Band: 97 (2009)

Artikel: Difillobotriois (zoonosi causata da parassiti del gener Diphyllobothrium, Cobbold 1858) : applicazione di metodi molecolari a scopo diagnostico

Autor: Stähli, Sebastiana / Peduzzi, raffaele / Wicht, Barbara

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-1003133

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 22.12.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Difillobotriosi (zoonosi causata da parassiti del genere *Diphyllobothrium*, Cobbold 1858): applicazione di metodi molecolari a scopo diagnostico

Sebastiana Stähli[1], Raffaele Peduzzi[2], Barbara Wicht[2,3]

[1] Liceo cantonale di Locarno, via Chiesa 15a, CH - 6600 Locarno, *sebi@global.educanet2.ch*
[2] Université de Genève, Laboratoire d'écologie microbienne, Quai Ernest-Ansermet 30, CH - 1211 Ginevra
[3] Istituto cantonale di microbiologia, via Mirasole 22a, CH - 6500 Bellinzona

Riassunto: La difillobotriosi, zoonosi causata da elminti appartenenti al genere *Diphyllobothrium* (Cestoda: Diphyllobothriidea), ha registrato negli ultimi anni una netta recrudescenza nell'area subalpina. La diagnosi dei campioni di uova e delle proglottidi isolate dai pazienti è di norma effettuata secondo criteri morfologici, sebbene essi non permettano di stabilire con certezza l'identità del parassita responsabile dell'infezione. Il recente impiego di metodi molecolari ha rivoluzionato la diagnostica e risulta attualmente l'unico mezzo per discriminare le 15 diverse specie di *Diphyllobothrium* patogene per l'uomo. La corretta identificazione di tali parassiti è fondamentale da un punto di vista medico ed epidemiologico. In questo studio sono state messe a confronto tecniche convenzionali e molecolari per la determinazione di campioni isolati da pazienti svizzeri. Le analisi sono state svolte presso l'Istituto cantonale di microbiologia (Bellinzona), nell'ambito di un lavoro di maturità in biologia (Liceo di Locarno).

Human diphyllobothriosis (zoonosis caused by parasites of the genus *Diphyllobothrium*, Cobbold 1858): use of molecular methods in the diagnostics

Abstract: Human diphyllobothriosis, a zoonosis caused by tapeworms of the genus *Diphyllobothrium* (Cestoda: Diphyllobothriidea), has shown a recent comeback in the subalpine area. The diagnosis of egg samples and proglottids shed by patients is usually carried out on the basis of morphological characters, although they do not allow assessing the identity of the parasite responsible for the infection. The use of molecular methods revolutionized the diagnostics and is now considered to be the most reliable way to distinguish among the 15 species of *Diphyllobothrium* pathogen for humans. The correct identification of such parasites is fundamental from both medical and epidemiological perspectives. In this study, conventional and molecular techniques were compared for the determination of clinical samples isolated from Swiss patients. Analyses were carried out at the Cantonal institute of microbiology (Bellinzona) as the part of a diploma assay in biology (Liceo of Locarno).

Keywords: *Diphyllobothrium*, molecular analysis, emerging infections, food-borne zoonosis

INTRODUZIONE

La difillobotriosi è una zoonosi assai diffusa, dovuta a parassiti del genere *Diphyllobothrium* (Cestoda: Diphyllobothriidea), più comunemente chiamati botriocefali. Si stima che nel mondo le persone affette siano 20 milioni (CHAI *et al.*, 2005). La malattia è conosciuta soprattutto in Europa del nord e dell'est, America, Corea e Giappone, ma recentemente è comparsa in Paesi dove non era mai stata riportata, come India, Malesia, Taiwan, Indonesia e in Medio Oriente (DICK, 2007). Negli ultimi anni, alcuni studi hanno evidenziato un importante fenomeno di recrudescenza della difillobotriosi nella regione subalpina, in particolare nell'area attorno al Lago Lemano e nella regione insubrica (DUPOUY-CAMET & PEDUZZI, 2004; PEDUZZI, 1990; PEDUZZI, 1992).

In Europa, la specie più diffusa è *Diphyllobothrium latum*. Gli ospiti definitivi dello stadio adulto di questo parassita sono i mammiferi ittiofagi e in particolare l'uomo, nell'intestino del quale esso si attacca grazie alle botrie (una sorta di ventose) situate sulla testa (scolice). L'elminta può crescere fino a una lunghezza che supera i 10 metri e, una volta maturo, è in grado di rilasciare ogni giorno fino a un milione di uova per ospite (VON BONSDORFF, 1977). Il ciclo vitale di *D. latum* si svolge in acqua dolce e comprende diversi ospiti intermediari: un copepode (Copepoda: Calanoida e Cyclopoida) e uno o più pesci. Nella regione subalpina le specie ittiche suscettibili sono il pesce persico (*Perca fluviatilis*), il luccio (*Esox lucius*), la bottatrice (*Lota lota*) e il salmerino (*Salvelinus alpinus*). Recentemente, in Francia e in Svizzera sono stati riporta-

ti anche casi clinici dovuti a botriocefali di origine esotica, come *D. nihonkaiense* e *D. dendriticum* (PAUGAM *et al.*, 2008; SHIMIZU *et al.*, 2008; WICHT *et al.*, 2007; WICHT *et al.*, 2008; YÉRA *et al.*, 2006). La causa di tali infezioni è da ricondurre soprattutto ai nuovi comportamenti alimentari legati al consumo di pesce crudo d'importazione (sushi, tartare, carpaccio, ecc.).

L'identificazione dei campioni clinici di *Diphyllobothrium* effettuata di routine nei laboratori di analisi mediche si basa sull'osservazione delle uova presenti nel materiale fecale e/o dei segmenti del cestode adulto (proglottidi). Per quanto riguarda la contaminazione del pesce, si mettono in evidenza le larve nel filetto. Tuttavia, l'analisi di tipo convenzionale non permette di distinguere le 15 specie patogene per l'uomo, che presentano caratteristiche estremamente simili a livello morfologico. Le analisi molecolari costituiscono attualmente l'unico metodo per l'identificazione delle diverse specie di *Diphyllobothrium* isolate da pazienti e da altri ospiti definitivi o intermediari (JUSTINE, 1998). In particolare, le sequenze di DNA dei geni ribosomali (18S rRNA e 28S rRNA) e di alcuni geni mitocondriali (citocroma c ossidasi subunità 1 o cox1, e NADH3) sono risultati utili per la determinazione inter- e intra-specifica delle specie patogene (NICOULAUD, 2005).

In questo articolo sono riportati i risultati dell'applicazione di tecniche molecolari per la diagnosi di campioni clinici di difillobotriosi. Le analisi sono state effettuate presso l'Istituto cantonale di microbiologia di Bellinzona, nell'ambito di un lavoro di maturità in biologia svolto al Liceo di Locarno, beneficiando del lavoro di preparazione di una tesi di dottorato (WICHT, 2008).

MATERIALI E METODI

Nello studio sono stati analizzati 11 campioni fecali contenenti uova e proglottidi, isolati da pazienti svizzeri e forniti da laboratori privati (tab. 1).

Analisi parassitologica

Le uova contenute nei campioni fecali sono state concentrate tramite la tecnica standard NaCl-etere, adottata in routine dai laboratori di analisi mediche (RIDLEY & HAWGOOD, 1956), senza l'impiego di formalina - un conservante che danneggia il DNA e può inibire alcune reazioni chimiche durante le analisi molecolari. L'identificazione dei parassiti a livello di genere è stata effettuata tramite l'osservazione al microscopio del sedimento (ingrandimenti 100× e 400×): le uova di *Diphyllobothrium* sono di forma ellittica e hanno una taglia compresa tra 40–60×50–85 µm; l'opercolo caratteristico le differenzia da quelle della maggior parte degli altri parassiti (GARCIA, 1997; fig. 1).

Le proglottidi dei cestodi adulti sono state osservate al binoculare (ingrandimento 16×). Nessun segmento era provvisto di scolice. A differenza dei segmenti di tenia (*Taenia* spp.), quelli di botriocefalo sono più larghi che lunghi (2–4×10–12 mm) e hanno al centro un utero a forma di rosetta; il poro genitale è situato anch'esso in posizione centrale (GARCIA, 1997; fig. 1).

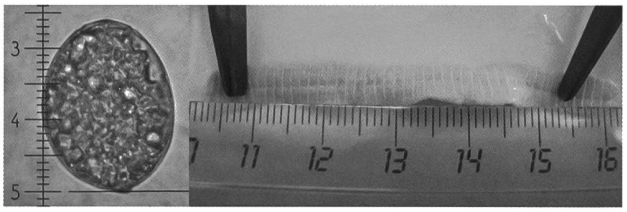

Fig. 1 - Uovo (sinistra; scala: 1 unità = 2 µm) e proglottidi (destra) di *Diphyllobothrium latum*.

Analisi molecolare

L'estrazione di DNA da uova (30–40 µl di sedimento concentrato, precedentemente sonicato) e proglottidi (2 segmenti) è stata effettuata secondo le istruzioni del «Tissue Protocol» del kit QIAamp DNA Minikit (Qiagen, Hombrechtikon). Il DNA è stato sospeso in 2×200 µl d'acqua sterile milliQ e conservato a 4°C.

Sono poi stati amplificati i geni 18S rRNA e cox1, utilizzando rispettivamente le coppie di *primers* 91 e 81 (MARIAUX, 1998), e JB3 e JB4.5 (BOWLES *et al.*, 1992). La reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata svolta utilizzando il kit Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Hombrechtikon), con il ciclo termico seguente: 5 min. 94°C; 40× (30 sec. 94°C, 40 sec. 45°C, 1 min. 72°C); 10 min. 72°C; conservazione a 4 °C.

ID	Campione	Data del prelievo	Età del paziente	Sesso	Domicilio	Sintomi	Consumo di pesce crudo
20	proglottidi	31.08.2006	30	F	Vésenaz (GE)	crampi	no
27	uova	13.10.2006	63	F	Bubendorf (BL)	coliche,diarrea	sì
28	uova	18.10.2006	41	M	Chambésy (GE)	nd	nd
29	uova	27.10.2006	13	F	Blonay (GE)	nessuno	no
30	uova	30.10.2006	41	M	Ginevra (GE)	nd	nd
31	uova	01.11.2006	37	M	Montreux (VD)	nessuno	sushi
32	uova	23.11.2006	44	M	Chiasso (TI)	diarrea; malessere	sushi
33	proglottidi	10.12.2006	53	M	Vevey (VD)	nd	nd
34	proglottidi	23.01.2007	51	F	Losanna (VD)	nd	nd
35	proglottidi	29.01.2007	56	F	Corsier (GE)	nd	nd
36	proglottidi	10.04.2007	58	F	Sion (VS)	nd	nd

Tab. 1 - Campioni di *Diphyllobothrium* spp. analizzati nello studio. ID: identificativo; nd: nessun dato.

Il risultato dell'amplificazione è stato verificato tramite elettroforesi, caricando 10 µl di ogni campione su un gel d'agarosio (0.8%) contenente bromuro d'etidio. La migrazione si è protratta per 45 min. circa a 120 V.
I campioni positivi sono stati purificati con il kit NucleoSpin® Extract II (Macherey Nagel, Oensingen), seguendo il protocollo per la purificazione diretta dei prodotti della PCR. La loro quantificazione è stata effettuata con il metodo PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagent and Kit (Invitrogen, Basilea) in un fluorimetro TD-700 (Turner Design, Witec AG, Littau). La concentrazione di amplicon è stata calcolata applicando la formula:

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

I geni amplificati sono stati sequenziati con gli stessi *primers* impiegati per la PCR, utilizzando il kit ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Rotkreuz), a partire da 50 ng (18S rRNA) e 10 ng (cox1) di DNA.
I prodotti della reazione di sequenza sono stati purificati tramite osmosi, depositando la soluzione su filtri circolari di nitrocellulosa 0.025 µm (Millipore, Zugo) in capsule di Petri contenenti TE a pH 8. Dopo 2 ore sono stati prelevati 8 µl di soluzione rimasta sul filtro, a cui sono stati aggiunti 12 µl di Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, Rotkreuz). Infine, i campioni sono stati caricati in un sequenziatore a capillare automatico (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer; Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim).
Le analisi bioinformatiche e l'allineamento delle sequenze sono stati condotti mediante i programmi EditSeq™ (DNASTAR Inc., Madison, USA) e MEGA v. 3.0 (KUMAR *et al.*, 2004). Gli alberi filogenetici sono stati costruiti utilizzando il metodo Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987), con un «bootstrap test» su 500 replicati considerato significativo se n >50. Le sequenze del gene 18S rRNA, non essendo sufficientemente lunghe per ottenerne la sequenza completa (oltre 2000 pb) a causa del posizionamento dei *primers*, sono state combinate in un concatamero. Le sequenze di referenza di *Diphyllobothrium* spp. e degli outgroups (*Ligula colymbi* e *Schistocephalus solidus*: Cestoda: Diphyllobothriidea; *Taenia solium*: Cestoda: Taeniidea) sono state scaricate dalla banca dati pubblica GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html).

RISULTATI

L'analisi parassitologica morfologica ha permesso di verificare che tutti i campioni di parassiti appartenevano al genere *Diphyllobothrium*. A causa della variabilità delle misure di uova e proglottidi non è stato tuttavia possibile risalire alla specie (ANDERSEN & GIBSON, 1989).
Le analisi genetiche hanno permesso di determinare l'identità di 9 campioni su 11. I campioni numero 20, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36 hanno mostrato un'identità pari al 100% con la sequenza di referenza della specie *D. latum*, sia per le sequenze del gene 18S rRNA (1887 pb; numero di accesso GenBank DQ316793; fig. 2) che per quelle del gene cox1 (358 pb; numero di accesso GenBank AY972073). Non è stato possibile identificare geneticamente i campioni numero 28 e 29, a causa della mancata amplificazione del loro DNA.

DISCUSSIONE

Mentre i caratteri morfologici richiedono una vasta conoscenza della sistematica e permettono di determinare i parassiti del gruppo *Diphyllobothrium* solo a livello di genere, le analisi molecolari si sono confermate come uno strumento valido e facilmente utilizzabile per la discriminazione di specie.
Il gene 18S rRNA si è rivelato nel nostro caso un obiettivo idoneo per l'identificazione dei campioni appartenenti alla specie *D. latum*, sebbene la sua sequenza non sia sufficientemente informativa per discriminare altre specie di botriocefali (ad esempio, *D. ditremum* e *D. dendriticum*

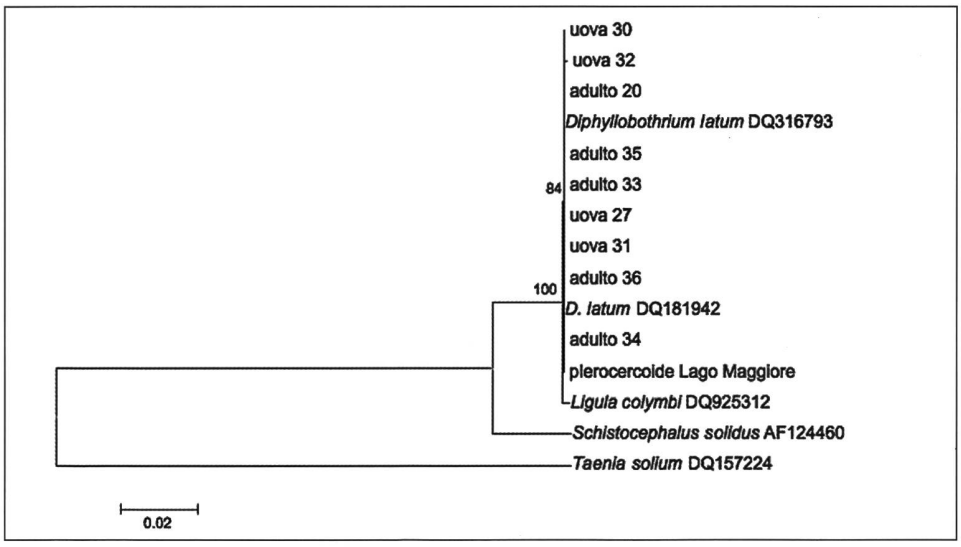

Fig. 2 – Albero filogenetico (concatamero) per il gene 18S rRNA (1887 pb, metodo Neighbor-Joining, parametri Kimura-2; valori significativi di «bootstrap test» riportati ai nodi). I campioni 20, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36 sono identificati come *D. latum*.

hanno sequenze identiche; NICOULAUD, 2005). La sequenza del gene mitocondriale cox1 ha permesso di confermare i risultati delle analisi del DNA nucleare e, secondo recenti studi, costituisce un obiettivo migliore per distinguere un gran numero di specie (YÉRA *et al.*, 2008). Nel nostro studio non sono state evidenziate differenze intra-specifiche tra i campioni e non è stata riscontrata alcuna variabilità rispetto alle sequenze di referenza reperibili in banca dati. La specie *D. latum* sembra costituire un ceppo evolutivamente molto conservato, forse in relazione al suo elevato adattamento all'organismo umano.

La recrudescenza della difillobotriosi nella regione insubrica e nella Svizzera romanda, verosimilmente legata a nuovi comportamenti alimentari, unita al ritrovamento di *D. dendriticum* e *D. nihonkaiense* contratti localmente da pazienti svizzeri, sottolineano l'importanza della corretta identificazione delle specie patogene, che ne permette il monitoraggio costante e fornisce informazioni sulla loro distribuzione e sulle fonti d'infezione. Un paziente affetto da difillobotriosi è in grado di contaminare in breve tempo nuovi ambienti attraverso il rilascio di un gran numero di uova, causando l'infestazione di varie specie ittiche e aumentando il rischio per la popolazione. Inoltre, considerando le esigenze ecologiche dei cestodi alloctoni citati e la disponibilità degli ospiti intermediari necessari per l'instaurazione del loro ciclo vitale, la questione sulla loro potenziale capacità di colonizzare i laghi situati alle nostre latitudini rimane aperta (WICHT *et al.*, 2008).

L'uso di tecniche molecolari appare dunque di primaria importanza per l'identificazione del parassita, per il suo monitoraggio, e per stimare i rischi legati al consumo di un determinato prodotto ittico. Per poter impiegare tali tecniche in modo ottimale è importante disporre di campioni conservati correttamente, ossia in alcool e non in soluzioni contenenti formalina. L'uso di questa sostanza, spesso utilizzata come prassi dai medici e dal personale impiegato nei laboratori di analisi, potrebbe costituire la causa della mancata amplificazione del DNA di due campioni considerati in questo studio. Vi è dunque la necessità di informare gli operatori attivi nel settore sanitario riguardo alle corrette metodologie da adottare per l'analisi molecolare dei campioni parassitologici. Attualmente, l'analisi genetica degli elminti del genere *Diphyllobothrium* è possibile solo tramite PCR e sequenza, procedure che richiedono una disponibilità di tempo che spesso i laboratori di routine non hanno. Sono in corso ulteriori ricerche che mirano a mettere a punto un kit molecolare rapido e altrettanto affidabile per l'identificazione delle specie patogene di questi parassiti.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori desiderano ringraziare i pazienti, i medici e i laboratori Unilabs SA che hanno collaborato allo studio. Un sentito ringraziamento a Nadia Ruggeri-Bernardi e ad Annapaola Caminada (Istituto cantonale di microbiologia, Bellinzona) per l'assistenza tecnica, e alla prof. Francesca Palli per la sua collaborazione.

BIBLIOGRAFIA

ANDERSEN K. & GIBSON D. I. 1989. A key to three species of larval *Diphyllobothrium* Cobbold, 1858 (Cestoda: Pseudophyllidea) occurring in European and North American freshwater fishes. Systematic Parasitology 13, 3–9.

BOWLES J., BLAIR D. & MCMANUS D. P. 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. Molecular and Biochemical Parasitology 54, 165–173.

CHAI J. Y., MURRELL K. D. & LYMBERY A. J. 2005. Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. International Journal for Parasitology 35, 1233–1254.

DICK T. 2007. Diphyllobothriasis: the *Diphyllobothrium latum* human infection conundrum and reconciliation with a worldwide zoonosis. London: Springer London, U.K.

DUPOUY-CAMET J. & PEDUZZI R. 2004. Current situation of human diphyllobothriasis in Europe. Eurosurveillance 9, 31–35.

GARCIA L. S. 1997. Diagnostic medical parasitology. ASM Press: Washington, DC.

JUSTINE J. L. 1998. Systématique des grands groupes de Plathelminthes parasites: quoi de neuf? Bulletin de la Société française de parasitologie 16, 34–52.

KUMUR S., TAMURA K. & NEI M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 5, 150–163.

MARIAUX J. 1998. A molecular phylogeny of the Eucestoda. The Journal of Parasitology 84, 114–124.

NICOULAUD J. 2005. Génotypage des isolats de *Diphyllobothrium*: mise au point et application phylogénétique. Thèse. Université Paris VI - Pierre et Marie Curie.

PAUGAM A., YÉRA H., POIRIER P., LEBUISSON A. & DUPOUY-CAMET J. 2008 - in press. Bothriocéphalose à *Diphyllobothrium nihonkaiense*: un nouveau risque lié à la consommation de saumon. Presse Médicale.

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. 1992. Risorgenza di parassitosi nel contesto regionale lacustre nel Canton Ticino. Bollettino della Società Ticinese di Scienze Naturali 80, 15–20.

RIDLEY D. S. & HAWGOOD B. C. 1956. The value of formol-ether concentration of faecal cysts and ova. British Medical Journal 9, 74.

SAITOU N. & NEI M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4, 406–425.

SHIMIZU H., KAWAKATSU H., SHIMIZU T., YAMADA M., TEGOSHI T., UCHIKAWA R. & ARIZONO N. 2008. Diphyllobothriasis nihonkaiense: possibly acquired in Switzerland from imported pacific salmon. Internal Medicine 47, 1359–1362.

VON BONSDORFF B. 1977. Diphyllobothriasis in man. Academic Press: New York, U.S.A.

WICHT B., DE MARVAL F. & PEDUZZI R. 2007. *Diphyllobothrium nihonkaiense* (Yamane *et al.*, 1986) in Switzerland: first molecular evidence and case reports. Parasitology International 56, 195–199.

WICHT B., DE MARVAL F., GOTTSTEIN B. & PEDUZZI R. 2008. Imported diphyllobothriasis in Switzerland: molecular evidence of *Diphyllobothrium dendriticum* (Nitsch, 1824). Parasitology Research 102, 201–204.

WICHT B. 2008. Ecology, epidemiology and molecular identification of the genus Diphyllobothrium Cobbold, 1858 in the sub-alpine lakes region. Tesi. Université de Genève.

YÉRA H., ESTRAN C., DELAUNAY P., GARI-TOUSAINT M., DUPOUY-CAMET J. & MARTY P. 2006. Putative *Diphyllobothrium nihonkaiense* acquired from a Pacific salmon (*Oncorhynchus keta*) eaten in France: genomic identification and case report. Parasitology International 55, 45–49.

YÉRA H., NICOULAUD J. & DUPOUY-CAMET J. 2008. Use of nuclear and mitochondrial DNA PCR and sequencing for molecular identification of *Diphyllobothrium* isolates potentially infective for humans. Parasite 15, 402–407.