

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOSANITARIE

DIPARTIMENTO DI FISIOLOGIA GENERALE

---

TESI DI LAUREA SPERIMENTALE

## Effetto della dieta di esclusione sulla permeabilità intestinale in soggetti allergici ad *Anisakis simplex*

**Relatore:**

*Chiar.mo Prof. Claudio LIPPE*

**Correlatore:**

*Chiar.mo Prof. Lorenzo POLIMENO*

**Laureanda:**

*Simona SPADA*

---

ANNO ACCADEMICO 2006-2007

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>- 3 -</b>
<b>1.1. PREMESSA</b>	<b>- 3 -</b>
<b>1.2. INTESTINO TENUE</b>	<b>- 5 -</b>
1.2.1. DIFESA E INTESTINO	- 6 -
1.2.2. SISTEMA IMMUNITARIO E INTESTINO	- 7 -
<b>1.3. GIUNZIONI INTERCELLULARI</b>	<b>- 8 -</b>
<b>2. PERMEABILITA' INTESTINALE</b>	<b>- 10 -</b>
<b>2.1. PERMEABILITÀ E ASSORBIMENTO</b>	<b>- 10 -</b>
<b>2.2. TEST DI PERMEABILITÀ INTESTINALE</b>	<b>- 12 -</b>
2.1.1. SOSTANZE TESTER	- 14 -
<b>3. ANISAKIASI</b>	<b>- 16 -</b>
<b>3.1. AGENTE EZIOLOGICO</b>	<b>- 16 -</b>
3.1.1. CICLO BIOLOGICO	- 17 -
3.1.2. SERBATOIO DI INFEZIONE	- 19 -
<b>3.2. CARATTERISTICHE EPIDEMIOLOGICHE</b>	<b>- 20 -</b>
<b>3.3. PATOGENESI</b>	<b>- 21 -</b>
<b>3.4. DIAGNOSI</b>	<b>- 23 -</b>
<b>3.5. TERAPIA</b>	<b>- 24 -</b>
<b>3.6. PROFILASSI</b>	<b>- 25 -</b>
<b>4. SCOPO</b>	<b>- 26 -</b>
<b>5. MATERIALI E METODI</b>	<b>- 27 -</b>
<b>5.1. REAGENTI</b>	<b>- 27 -</b>
<b>5.2. PAZIENTI</b>	<b>- 27 -</b>
<b>5.3. TEST DI PERMEABILITÀ INTESTINALE</b>	<b>- 29 -</b>
5.3.1. SOLUZIONI DA BERE	- 31 -
5.3.2. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	- 31 -
<b>5.4. CROMATOGRAFIA</b>	<b>- 32 -</b>
5.4.1. HPLC	- 34 -
5.4.2. CALIBRAZIONE	- 37 -
5.4.3. ANALISI	- 40 -
<b>6. RISULTATI</b>	<b>- 44 -</b>
<b>7. CONCLUSIONI</b>	<b>- 46 -</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>- 48 -</b>

# 1. INTRODUZIONE

---

## 1.1. Premessa

Negli ultimi anni dilaga anche in Italia la moda culinaria del pesce crudo e con questa anche i rischi della parassitosi da *Anisakis simplex*: Anisakiasi.

L'infestazione ha una alta incidenza con notevole resistenza ad agenti chimici e fisici, tanto che la CEE ha emesso direttive (CEE 91/493) che disciplinano questo aspetto della produzione e commercializzazione della pesca(1).

L'infestazione umana si verifica per lo più per ingestione di pesci crudi o poco cotti, ma anche marinati, affumicati o salati e quindi soprattutto nei Paesi in cui si hanno tali abitudini alimentari: Giappone, Spagna, Olanda, Paesi sulle coste del Mare del Nord e dell'Atlantico(2).

Nel nostro Paese il problema è meno diffuso e ancora sottovalutato. Il Dipartimento della Sanità veterinaria e degli alimenti del Ministero della Salute ha ricevuto nel 2004 circa 50 notifiche di riscontri di *Anisakis* in prodotti della pesca importati soprattutto da Regno Unito e Paesi Scandinavi. Tuttavia non c'è un sistema informativo o un obbligo di denuncia tale per cui si possa fare una stima precisa dei casi.

Le larve di *Anisakis simplex* possono penetrare l'apparato digerente e produrre un aumento delle IgE con reazioni IgE mediate come orticaria, angioedema, anafilassi, asma, oltre ai diversi sintomi addominali che possono mimare altri disturbi gastrointestinali (3).

Nei precedenti lavori è stato dimostrato che:

- Le allergie alimentari sono tipicamente associate ad alterazione della permeabilità intestinale
- Soggetti con ipersensibilità ad *Anisakis* manifestano un indice di permeabilità significativamente aumentato rispetto ai soggetti di controllo.

In questo lavoro abbiamo valutato l'effetto della dieta di esclusione (priva di prodotti ittici crudi) sulla permeabilità intestinale in soggetti ipersensibili ad *Anisakis simplex*.

## 1.2. Intestino tenue

L'intestino tenue, che comprende il duodeno, il digiuno e l'ileo, è la sede principale di assorbimento dei prodotti della digestione.

La digestione inizia nello stomaco e si completa nell'intestino tenue, contemporaneamente ai processi di assorbimento.

La digestione e l'assorbimento sono favoriti dalla presenza di una enorme area di superficie che deriva da 4 fattori principali:

- la grande lunghezza dell'intestino tenue (4-6 m nell'uomo)
- la presenza di estroflessioni della mucosa e della sottomucosa a disposizione circolare chiamate pliche circolari che sono particolarmente numerose nel digiuno
- la presenza di numerose estroflessioni digitiformi della mucosa, i villi e di invaginazioni della mucosa in cripte, le cripte di Lieberkühn, tra le basi dei villi
- la presenza di numerosi microvilli sulla superficie degli enterociti, le cellule colonnari che rivestono i villi e le cripte.

Queste cellule sono responsabili dei processi di digestione e di assorbimento.

Una caratteristica importante dell'intestino tenue è la presenza di aggregati linfoidi ( $\approx 200$ ) di varie dimensioni all'interno della lamina propria, gli aggregati di maggiori dimensioni sono chiamati Placche del Peyer (4).

### **1.2.1. Difesa e intestino**

L'apparato gastrointestinale oltre alla funzione digestiva e assorbente ha anche il ruolo di difesa che viene realizzato con meccanismi immunologici e meccanismi non immunologici.

I componenti non immunologici della barriera intestinale possono essere di tipo meccanico come le giunzioni occludenti tra le cellule epiteliali, il rapido turnover cellulare e la motilità intestinale che contribuiscono alla rimozione di agenti microbici adesi o intrappolati a livello luminale.

Tra i componenti non immunologici rientra anche la difesa chimica esercitata dalla secrezione acida (il pH basso ha azione battericida), da enzimi digestivi che danneggiano la parete batterica e dal muco che riduce la capacità di adesione dei batteri ai recettori di superficie delle cellule epiteliali.

Anche la flora batterica intestinale, costituita da batteri aerobi ed anaerobi ha un importante ruolo nella difesa (5).

Nei componenti di difesa immunologici rientrano i linfociti intraepiteliali, le placche di Peyer, i linfonodi mesenterici e le IgA secretorie che agiscono a livello locale; i linfociti circolanti e le cellule di Kupffer epatiche che agiscono invece a livello sistemico.

## **1.2.2. Sistema immunitario e intestino**

Lo sviluppo e i meccanismi funzionali del sistema immunitario intestinale sono relativamente indipendenti da quelli dell'immunità sistemica (6) e l'interazione tra microrganismi e nutrienti a questo livello può influenzare gli innati meccanismi regolatori della funzione immunitaria intestinale, soprattutto nei primi anni di vita.

Il tessuto linfoide associato all'intestino (GALT: tessuto linfoide associato alla mucosa intestinale) è un organo linfatico secondario in grado di processare gli antigeni che interagiscono con la mucosa intestinale e, successivamente, di diffondere le reazioni immunitarie. Gli antigeni presenti nel lume intestinale sono portati nelle placche di Peyer dalle cellule M (microfold), localizzate tra gli enterociti nell'epitelio intestinale. Una volta all'interno di esse, gli antigeni interagiscono con le cellule-presentanti l'antigene (APC), che li presentano alle cellule B e T ancora immature situate nei centri germinativi e nelle regioni interfollicolari. Le cellule B e T attivate dagli antigeni stessi sono veicolate dapprima nei linfonodi regionali e, successivamente, attraverso il dotto toracico, immesse in circolo. Infine si differenziano in cellule mature effettrici e migrano nella lamina propria e nell'epitelio intestinale.

Per questo motivo si possono ritrovare nell'intestino tre principali popolazioni di linfociti (linfociti delle placche del Peyer, linfociti della lamina propria, linfociti intra epiteliali).

### 1.3. Giunzioni intercellulari

Le giunzioni intercellulari permettono agli epitelii di formare strati continui, saldi e possono servire come punti di trasferimento di metaboliti e di informazioni tra cellule.

Le giunzioni intercellulari possono essere suddivise, da un punto di vista funzionale, in tre categorie: giunzioni occludenti, aderenti e comunicanti (Fig.1,2).

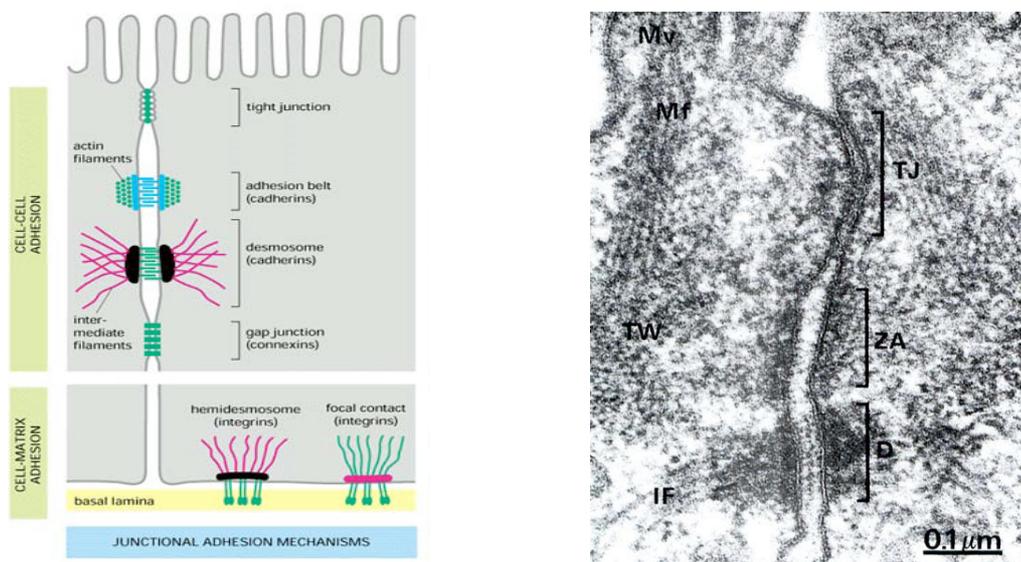
Le **giunzioni occludenti** (tight junctions) iniziano immediatamente sotto la superficie luminale dell'epitelio cilindrico semplice dove isolano gli spazi intercellulari dal lume. Ogni giunzione stretta forma una completa cintura o zonula che circonda la cellula chiamata *zonula occludens*. Le giunzioni strette impediscono anche la migrazione delle proteine libere di membrana da un dominio all'altro della superficie cellulare (4).

Le tight junctions costituiscono quindi una barriera selettiva che separa l'ambiente esterno all'organismo da quello interno (7) e in condizioni normali, permette il passaggio solo di piccole molecole (10 Å).

Le **giunzioni aderenti** uniscono strettamente le cellule epiteliali tra loro e il citoscheletro di una singola cellula ai citoscheletri delle cellule adiacenti, cooperando così alla formazione di una singola unità funzionale. Le giunzioni aderenti sono suddivisibili in due tipi morfologici. Al primo tipo appartengono le giunzioni che si trovano subito al di sotto delle giunzioni strette dell'epitelio cilindrico semplice. Tali giunzioni formano una banda continua, denominata *zonula adherens* intorno alla cellula, provvedendo un rinforzo strutturale alle giunzioni occludenti. Il secondo tipo è costituito da quelle giunzioni aderenti

che formano piccole aree circolari di adesione chiamate **desmosomi** (*macula adherens*); tali giunzioni sono disposti a contornare la circonferenza delle cellule colonnari sotto alla *zonula adherens*.

Le **giunzioni comunicanti** sono costituite da ampie zone dove le opposte membrane plasmatiche si affrontano lasciando un sottilissimo spazio. Ogni giunzione serrata contiene numerosi pori che permettono il passaggio di ioni carichi positivamente e di altre piccole molecole (dimensioni inferiori a 2 nm di diametro) dal citoplasma di una cellula all'altra. Tali canali servono così allo scambio di metaboliti e molecole capaci di regolare la crescita, lo sviluppo, il riconoscimento e la differenziazione cellulare. Ogni poro consiste di una minuta struttura tubulare chiamata *connessione* che attraversa lo spazio intercellulare (4, 7).



**FIG.1,2 GIUNZIONI INTERCELLULARI**

## 2. PERMEABILITA' INTESTINALE

---

### 2.1. Permeabilità e assorbimento

La permeabilità è una caratteristica fisiologica che si riferisce alle membrane. Una membrana è permeabile quando un soluto può attraversarla con un meccanismo di diffusione semplice (non mediato da carrier) (8).

La diffusione di un soluto attraverso una membrana dipende da tre elementi:

- caratteristiche della membrana (composizione, carica, spessore);
- caratteristiche del soluto (grandezza molecolare, forma, carica e solubilità);
- interazione con il solvente.

Per spiegare il passaggio transmucosale di molecole aventi dimensioni diverse si sono formulate varie teorie, tra queste, le principali sono quella della via transcellulare e quella della via paracellulare di Hollander.

**Via transcellulare.** Le sostanze permeano l'epitelio intestinale mediante pori acquosi presenti sulle membrane cellulari aventi diametri diversi, da ciò risulta che le molecole più grandi possono attraversare solo mediante i pori di diametro maggiore, mentre quelle più piccole sia attraverso questi ultimi che attraverso pori di diametro più piccolo.

**Via paracellulare.** Significativa è la teoria proposta da Hollander secondo la quale tutte le molecole permeano lo strato epiteliale per via paracellulare, attraverso le tight junctions. Tali giunzioni, inoltre, sarebbero più serrate a livello dei villi intestinali rispetto a quelle presenti a livello delle cripte.

Anatomicamente i villi sono più accessibili alle sostanze presenti nel lume rispetto alle cripte ma hanno tight junctions molto più serrate e selettive che

permettono il passaggio di molecole di dimensioni più piccole come il PEG o il Mannitolo (9,10,11). Le molecole più grandi come il Lattulosio passano attraverso le giunzioni delle cripte che sono di meno e più larghe, ma l'accesso anatomico è sfavorito, pertanto il recupero urinario del Mannitolo è maggiore rispetto al disaccaride. Questa teoria di Hollander è stata sostenuta da un recente studio condotto da Fihn et al (12).

La permeabilità della barriera epiteliale intestinale dipende dalla regolazione dei sistemi di giunzione intercellulari, in particolare delle zonule occludenti. Le giunzioni intercellulari sono strutture dinamiche che, in seguito a stimoli fisiopatologici e/o ambientali, sono soggette a mutamenti che ne dettano lo stato funzionale. Studi condotti su modelli animali, hanno dimostrato l'importanza della zonulina come ormone regolatore della permeabilità intestinale ed è stata dimostrata un'iperespressione nella mucosa di soggetti con problemi di malassorbimento (in particolare nei celiaci).

## 2.2. Test di permeabilità intestinale

La permeabilità intestinale (IP) è considerata un indice attendibile per valutare la funzione di barriera del piccolo intestino. I valori dell'IP dipendono dallo stato delle giunzioni serrate, strutture dinamiche diversamente regolate in condizioni fisiologiche, patologiche o in corso di trattamenti farmacologici (13).

Fin dal 1960 la funzione della barriera intestinale è stata studiata attraverso test di permeabilità intestinale in varie condizioni patologiche (14): enterite da radiazioni, dopo chemioterapia, diabete mellito tipo 1, sclerosi sistemica, morbo di Crohn, giardiasi, anoressia nervosa, tiroidite di Hashimoto, malattia celiaca (12).

La misura dell'escrezione urinaria di zuccheri non metabolizzati è stata ampiamente utilizzata come metodo non invasivo per valutare l'integrità della mucosa intestinale (16). Questo test viene solitamente condotto somministrando oralmente due zuccheri a differente peso molecolare e diverse vie d'assorbimento.

Monosaccaridi come mannitolo e L-ramnosio passano attraverso la via transcellulare, riflettendo il grado di assorbimento di piccole molecole (0,65 nm). Disaccaridi, inclusi lattulosio e cellobiosio, passano attraverso i complessi giunzionali intercellulari, riflettendo la permeabilità di molecole più grandi (0,93 nm). Le permeabilità di mono e disaccaridi sono comparati ed espressi come rapporto di escrezione urinaria: lattulosio/mannitolo o lattulosio/L-ramnosio .

Lattulosio e mannitolo rappresentano composti ideali per valutare il diverso assorbimento dello zucchero perché hanno un'affinità trascurabile verso il sistema di trasporto dei monosaccaridi, sono assorbiti passivamente e non sono metabolizzati prima dell'escrezione urinaria.(17)

Nei primi studi di permeabilità intestinale si utilizzava una sola sostanza tester, se ne misurava la concentrazione urinaria e si calcolava la percentuale di recupero rispetto alla dose ingerita. Tuttavia, i risultati non erano soddisfacenti perché l'escrezione urinaria poteva essere inficiata da diversi fattori pre-mucosali e post-mucosali.

I fattori pre-mucosali sono:

- ingestione incompleta della dose
- diluizione gastrica
- riempimento gastrico
- diluizione intestinale
- degradazione batterica
- idrolisi.

I fattori post-mucosali sono:

- metabolismo
- produzione endogena
- distribuzione tissutale
- funzione renale
- incompleta raccolta delle urine
- performance analitica.

Per ovviare a questi problemi Menzies (18) nel 1974, introdusse il principio dell'escrezione urinaria differenziata di più sostanze tester somministrate oralmente.

### **2.1.1. Sostanze tester**

Una sostanza utilizzata per l'esecuzione del test della permeabilità dovrebbe essere:

- solubile in acqua
- biochimicamente inerte
- non tossica
- non trasportata dall'epitelio con meccanismi facilitati o attivi
- non degradabile
- non assorbibile
- non metabolizzabile
- recuperabile e dosabile, dopo somministrazione orale o intravenosa, nei fluidi biologici come il sangue o le urine (18,19).

Le sostanze più utilizzate sono riportate di seguito, con relativi vantaggi e svantaggi:

- Cr-EDTA: l'acido etilendiamminico tetracetico marcato con cromo è una sostanza, fisiologicamente e biochimicamente inerte. Una soluzione contenente tale composto marcato radioattivamente viene somministrata per os in pazienti a digiuno dalla sera precedente all'esecuzione del test. Si procede alla raccolta delle urine delle 24 h e le sostanze sono misurate con appositi contatori di radioattività (18).

- PEG: il polietilenglicole è una miscela di polimeri di glicole etilenico, biochimicamente inerte e resistente agli enzimi batterici. Il dosaggio viene effettuato con tecniche cromatografiche (19). Al paziente viene data una soluzione contenente PEG da 0.05 a 10 gr. sciolti in acqua e si procede alla raccolta delle urine delle 6 h successive. Le analisi di laboratorio e i calcoli per l'interpretazione dei risultati sono piuttosto complessi ed inoltre esiste una grande variazione inter ed intra-individuale dopo assunzione orale nei soggetti controllo. Questi svantaggi rendono il test poco adatto all'uso clinico.
  
- PROTEINE: secondo l'esperienza clinica l'utilizzo delle proteine come molecole per il test è limitata ed inoltre la procedura e l'analisi di laboratorio sono complesse. Questo dipende dal fatto che proteine eterologhe non sono biochimicamente inerti e quindi possono stimolare la risposta immunitaria, ciò non darebbe risultati validi (9,11,19).
  
- ZUCCHERI: come markers della permeabilità intestinale ne sono stati proposti diversi tipi tra cui:
  - monosaccaridi: Mannitolo, Ramnosio, Xylosio, generalmente con un raggio < 0.5-0.6 nm.

Questi attraversano la barriera tramite diffusione semplice e il recupero nelle urine, nei soggetti sani, dopo 5 ore dalla somministrazione orale va dal 10 al 30 % .

  - disaccaridi : Lattulosio e Cellobiosio, Saccarosio e Lattosio, generalmente con raggio > 0.5-0.6 nm. Anche questi zuccheri permeano con diffusione semplice e il recupero nelle urine è generalmente inferiore all'1%.

### 3.1. Agente eziologico

L'anisakidosi è una parassitosi che può colpire l'uomo, causata da nematodi appartenenti alla famiglia degli Anisakidae, composta da quattro generi: *Anisakis*, *Pseudoteranova*, *Contracaecum* e *Hysterothylacium*. Di questi, i primi tre generi sono responsabili di zoonosi mentre il genere *Hysterothylacium* non è patogeno, data la termolabilità del parassita. La patologia causata dal genere *Anisakis* nell'uomo è detta anisakiasi.

Questo parassita si trova nella forma adulta nell'addome dei pesci, è visibile ad occhio nudo intorno ai visceri. Misura da 1 ai 3 cm, va dal colore bianco al rosato, è sottile e tende a presentarsi arrotolato su se stesso (Fig.3)

Una circolare del Ministero della Sanità del 1992, ancora in vigore, obbliga chi somministra pesce crudo o in salamoia (il limone e l'aceto non hanno alcun effetto sul parassita) ad utilizzare pesce congelato o a sottoporre a congelamento preventivo il pesce fresco da somministrare crudo. Infatti l'*Anisakis* e le sue larve muoiono se sottoposti a 60 gradi di temperatura, oppure dopo 96 ore a -15° C, 60 ore a -20° C, 12 ore a -30° C, 9 ore a -40° C.



FIG.3 ANISAKIS SIMPLEX

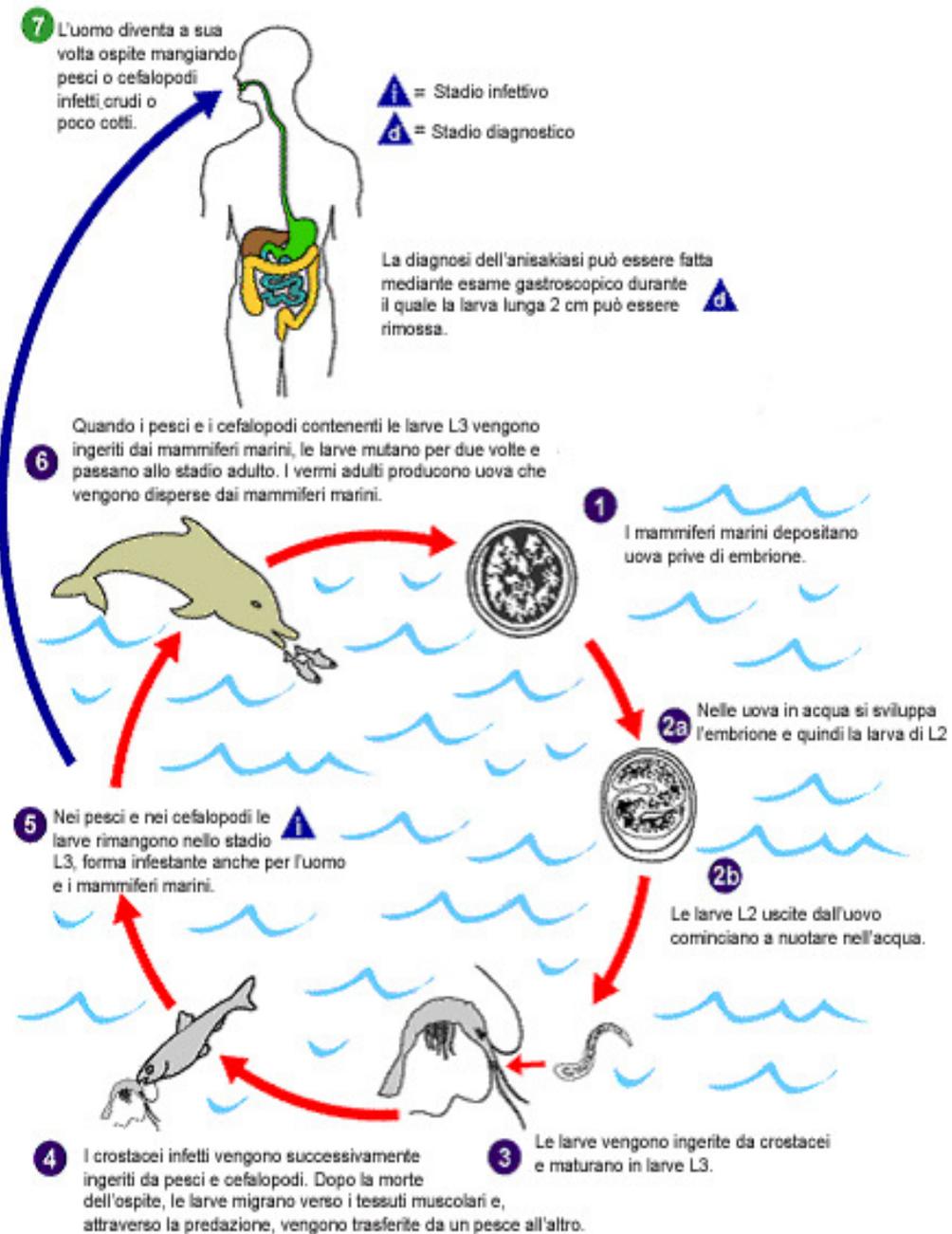
### **3.1.1. Ciclo biologico**

Nelle uova libere in acqua si sviluppa l'embrione, da cui si formano le larve di primo stadio che dopo una prima muta, diventano di secondo stadio, quindi, uscite dall'uovo, diventano larve libere in grado di nuotare. Se ingerite da crostacei, sviluppano a larve di terzo stadio, capaci di infettare pesci e cefalopodi dove migrano dall'intestino agli altri organi in cavità peritoneale e crescono fino a 3 centimetri di lunghezza. Alla morte dell'ospite infestato, le larve migrano verso i tessuti muscolari e, attraverso la predazione, le larve vengono trasferite da un pesce all'altro. Nei pesci e nei cefalopodi le larve rimangono di terzo stadio, forma infestante anche per l'uomo ed i mammiferi marini. Quando i pesci o i cefalopodi vengono ingeriti da mammiferi marini, le larve di terzo stadio mutano per due volte e diventano forme adulte.

Le femmine adulte producono uova che vengono disperse dai mammiferi marini.

I pesci di età maggiore sono più infestati, le larve possono sopravvivere nell'ospite per circa 3 anni (20).

## CICLO BIOLOGICO DI *ANISAKIS SIMPLEX*.



### **3.1.2. Serbatoio di infezione**

I prodotti ittici dei mari italiani più frequentemente parassitati sono: sardine, aringhe, acciughe, sgombri, gadidi, sparidi, lophidi, pesci S. Pietro, pesci sciabola (quasi sempre infestati), totani, calamari. Nei pesci le larve, che misurano da 15 a 30 mm, si localizzano sulle sierose di fegato, ovaio, stomaco ed intestino, dove tendono ad incistarsi ed assumere una caratteristica forma a spirale (Fig.4). Una pronta e completa eviscerazione permette l'allontanamento del parassita, che potrebbe migrare nelle masse muscolari del pesce.



**FIG.4. PESCE INFETTO DA A.S.**

### 3.2. Caratteristiche epidemiologiche

Il primo caso di anisakiasi umana fu diagnosticato in Olanda in un granuloma eosinofilo, e nel 1960, van Thiel stabilì la relazione tra la malattia umana e l'ingestione di aringa cruda infetta. Negli ultimi anni sono stati segnalati, anche in Italia, casi di ipersensibilità (21) ad As e questo in relazione, sia all'elevato consumo di pesce, sia alla disponibilità di test diagnostici di facile esecuzione (test cutanei e dosaggio delle IgE specifiche). Tuttavia non esistono attualmente dati certi né sull'incidenza né sulla prevalenza di questa allergia e dei sintomi caratteristici.

Autori giapponesi hanno riscontrato IgE specifiche verso As nel 33% di pazienti con dermatite atopica, nel 75% di pazienti con orticaria indotta da pesce e nel 10% dei controlli (22).

In Spagna la prevalenza delle IgE specifiche per As in pazienti con orticaria/angioedema è risultata del 36%, del 23% nei donatori sani e del 56% in bambini con IgE totali elevate (23).

Uno studio effettuato nel 2002 ha evidenziato i casi di anisakiasi avuti in Italia di cui (24):

- 6 pazienti ospedale di Bari
- 3 pazienti ospedale di Brindisi
- 2 pazienti ospedale di Campobasso.

Il Giappone è considerato un paese endemico, dal primo caso nel 1964 documenta ad oggi più di 12.000 casi (25).

La prevalenza della sensibilizzazione all'*Anisakis*, definita come la presenza di IgE verso specifici antigeni dell'*Anisakis*, nella popolazione generale mondiale, è relativamente alta, raggiungendo dal 5% al 33%.

### 3.3. Patogenesi

Nell'uomo l'infezione si trasmette attraverso l'ingestione di pesce crudo, poco cotto o in salamoia, e/o di cefalopodi contenenti le larve del parassita, ed è causa di una serie di manifestazioni cliniche conosciute con il nome di anisakiasi.

Il nematode aderisce e penetra nella mucosa, sottomucosa e muscolare del tratto gastroenterico provocando infiammazione o, nei casi più severi, perforando lo stomaco o la parete intestinale, migrando verso altri organi e tessuti. Una volta penetrato, il parassita attiva un processo flogistico di tipo Th2; le cellule T rilasciano citochine, come IL 4, che è implicata nella sintesi di IgE e IL 5, che induce un reclutamento ed un'attivazione selettiva di eosinofili, in accordo con le caratteristiche cliniche di malattia.

La gastrite acuta da *Anisakis*, descritta per la prima volta da Van Thiel nel 1962 (26), è l'entità clinica più frequente ed è provocata dalla penetrazione del nematode nella mucosa gastrica.

La sintomatologia è caratterizzata da dolore epigastrico, nausea e vomito, che solitamente compaiono dopo 12 ore dalla ingestione del pesce infetto. Se il parassita non viene rimosso, la gastrite può cronicizzare.

Sempre a carico dell'apparato gastroenterico sono stati osservati casi di ostruzione intestinale, appendicite ed ileite.

Negli ultimi anni sono stati descritti, soprattutto in paesi dove si consumano grandi quantità di pesce crudo come la Spagna, la Norvegia e il Giappone, casi di reazioni di ipersensibilità IgE-mediata ad As (27,28). I pazienti possono presentare, oltre ai sintomi addominali, manifestazioni allergiche quali orticaria e/o angioedema e perfino shock anafilattico.

In alcune casistiche sono state riportate manifestazioni a carico dell'apparato respiratorio, (29,30) rappresentate soprattutto da asma bronchiale e sintomi di tipo reumatico, caratterizzati prevalentemente da artromialgie diffuse (31).

La presenza di IgE specifiche per As è stata inoltre osservata in pazienti con dermatite atopica e con allergia alimentare, e in bambini con allergia ad inalanti e/o alimenti (32).

Quindi possiamo dire che i meccanismi di danno sono due:

1. Reazioni di ipersensibilità mediata da IgE dopo un primo contatto responsabili dei sintomi allergici come orticaria, angioedema fino a shock anafilattico nelle ore successive all'infezione.
2. Azione locale del parassita: la sintomatologia gastrointestinale dipende dalla dimensione e dalla sede di penetrazione del parassita nella mucosa del tubo digerente.

### 3.4. Diagnosi

La diagnosi di questa patologia deve essere sospettata dopo un'attenta valutazione anamnestica corredata, possibilmente, dall'osservazione diretta del nematode attraverso la gastroscopia.

La diagnosi di A. nella forma acuta è più semplice. I sintomi compaiono circa 12-24 ore dopo l'ingestione di pesce crudo e sono rappresentati da epigastralgia severa, nausea, vomito, diarrea, dolore addominale intenso spesso associati ad orticaria e/o angioedema. L'esame endoscopico ha un ruolo diagnostico e terapeutico perché può evidenziare il parassita e rimuoverlo con scomparsa della sintomatologia. Se il parassita non viene trovato, il sospetto diagnostico può essere confermato con l'esame sierologico (IgE specifiche anti As). La forma cronica è più difficile da riconoscere; la sintomatologia nella maggior parte dei casi è di tipo intestinale (diarrea, meteorismo, dolori addominali), attenuata, aspecifica, non si correla con il consumo di pesce. Non sempre la larva viene evidenziata perché il processo flogistico cronico degenera la larva. I test sierologici possono essere di aiuto nella diagnosi di questa forma, le IgE specifiche anti As sono quelle maggiormente utilizzate in quanto permangono positive nel tempo a differenza delle IgG e IgA.

Sebbene la diagnosi conclusiva e definitiva dovrebbe essere stabilita solo quando il nematode è osservato direttamente, la combinazione di dati clinici, sierologici, radiologici e istopatologici consistenti potrebbe essere considerata altamente specifica.

Quando la diagnosi è certa e quando esiste, in particolare nei casi di orticaria acuta e/o ricorrente (33), un rapporto di causa effetto, il paziente deve necessariamente eliminare il pesce dalla dieta.

### **3.5. Terapia**

Nel sospetto di malattia, il trattamento dell'Anisakis deve essere sempre medico, considerando la chirurgia quando la terapia è stata inefficace o esistano complicazioni che impongano la stessa.

Terapia farmacologica: Antibiotici, anticolinergici e corticosteroidi sono stati utilizzati occasionalmente nel trattamento di anisakiasi (34,35) senza un'evidente efficacia.

L'albendazolo è un derivato del benzimidazolo che è stato ampiamente utilizzato per trattare parassiti intestinali sin dal 1980, e sembra essere attivo anche contro l'Anisakis (36). Studi recenti hanno dimostrato che l'albendazolo, in vitro e a diversi valori di pH, è capace di uccidere le larve di As; pertanto questa molecola potrebbe essere impiegata nel trattamento clinico di anisakidosi nell'uomo (37).

Nelle forme acute gastriche l'esame endoscopico è considerato il trattamento di scelta in quanto ci consente di individuare e rimuovere la larva con risoluzione del quadro clinico. Nelle forme croniche l'escissione chirurgica è considerata il trattamento elettivo.

### 3.6. Profilassi

Dal punto di vista istituzionale, l'anisakidosi rientra nel gruppo di malattie per le quali sono stati stabiliti in Europa reti di sorveglianza sulla sicurezza alimentare con obbligo di denuncia (Regolamento CE n. 178/2002 del 28 gennaio 2002: sistema di allerta comunitaria). Queste reti permettono di agire sia ritirando i prodotti dal mercato che adottando le necessarie misure nei confronti degli impianti di produzione e informando la popolazione a rischio.

Poiché è noto che le larve permangono di norma nella cavità celomatica del pesce vivo e si trasferiscono in genere nel tessuto muscolare dopo la morte del pesce stesso, una pronta eviscerazione può rappresentare un importante intervento di prevenzione della parassitosi umana.

L'*Anisakis* è in grado di sopravvivere a trattamenti di affumicatura a freddo, a trattamenti di marinatura con basso tenore di sale e alle temperature di refrigerazione. Viene ucciso con temperature superiori a 60 °C per 10 minuti e dal congelamento (almeno 24 ore a - 20°C) .

## 4. SCOPO

---

Oggetto di studio sono stati pazienti che hanno effettuato le prove di ipersensibilità (RAST e SPT) risultando allergici ad *Anisakis simplex*. Gli stessi pazienti hanno eseguito anche il test di permeabilità (lattulosio e mannitolo), in alcuni casi i valori dell'indice di permeabilità sono risultati aumentati.

Scopo della tesi è valutare la permeabilità nei soggetti con IP alterato dopo essersi sottoposti a dieta di esclusione.

La dieta di esclusione prevede l'esclusione di prodotti ittici crudi (pesci e cefalopodi) e l'ingestione degli stessi solo se preventivamente cotti a temperature maggiori di 60 °C per almeno 10'. La dieta è stata seguita per un periodo variabile da 5 a 10 mesi.

## 5. MATERIALI E METODI

---

### 5.1. Reagenti

I carboidrati, lattulosio(95 %) e mannitolo, e NaOH sono stati forniti dalla SIGMA-Aldrich (Milano, Italia).

Il mannitolo e il lattulosio, rispettivamente monosaccaride e disaccaride, non vengono metabolizzati dall'organismo e sono eliminati per filtrazione glomerulare.

Sono preparate due soluzioni di NaOH a concentrazione differente, una a 25 mM che funge da eluente e l'altra a 200 mM che è utilizzata per la pulizia delle colonne cromatografiche.

### 5.2. Pazienti

Sono stati selezionati pazienti provenienti dall'ambulatorio di Allergologia, con diagnosi di ipersensibilità di *Anisakis simplex*.

I pazienti che manifestavano sintomi allergici sono stati sottoposti a:

- anamnesi: valutazione attenta di familiarità per allergie, sintomi e segni; tutti i pazienti selezionati riferiscono un consumo abituale o saltuario di pesce crudo.
- diagnosi di ipersensibilità ad *Anisakis simplex*: effettuata con test cutanei (SPT: skin prick test) confermata dalla positività delle IgE specifiche sieriche per As (RAST:radioallergabsorbent test).

Tutti i pazienti presentano positività ai test cutanei per As.

In un precedente lavoro, in questi pazienti, è stata valutata la permeabilità intestinale confrontandola con un gruppo di controllo. L'analisi ha evidenziato che il 23% dei pazienti ipersensibili ad As, presentavano un indice di permeabilità superiore alla norma.

In questo studio abbiamo invece valutato la permeabilità negli stessi soggetti dopo che hanno eliminato dalla dieta il pesce crudo.

### 5.3. Test di permeabilità intestinale

Il test di permeabilità intestinale è stato condotto somministrando per via orale ai pazienti 100 ml di una soluzione isosmolare contenente 15 ml di lattulosio (Normase 66,7 %) e 11 ml di mannitolo (18 %).

Dopo aver assunto la soluzione, i pazienti sono tenuti a:

- assumere acqua per aumentare il flusso urinario (dopo 2 ore dall'assunzione)
- osservare un regime di digiuno per tutta la durata del test
- raccogliere le urine delle 5 ore.

La diuresi totale viene registrata e 10 ml di campione di urine sono conservate a -20°C fino al momento dell'analisi.

Prima di eseguire la lettura dei campioni due aliquote di urine vengono diluite, nel seguente modo:

- diluizione 1/10 per la determinazione del lattulosio
- diluizione 1/100 per la determinazione del mannitolo.

Vengono quindi dosate le concentrazioni delle due sonde nelle urine raccolte ed il rapporto La/Ma che ne risulta costituisce l'indice della permeabilità intestinale.

Il test è eseguito mediante analisi combinata di cromatografia di scambio anionico (High Performance Anion Exchange Chromatography, HPAEC) e determinazione amperometrica pulsata (Pulsed Amperometric Detection, PAD), che permette una quantificazione diretta dei carboidrati non derivati. Ad un alto valore di pH, i carboidrati sono elettro-cataliticamente ossidati alla superficie dell'elettrodo in oro attraverso l'applicazione di un potenziale

positivo. L'amperometro rivela solo quei composti contenenti gruppi funzionali che vengono ossidati; i componenti cationici o neutri del campione sono eluiti dalla fase mobile (38).

Il campione di urina diluito è iniettato nello strumento attraverso una microsiringa, si utilizza un volume di urina molto ridotto, circa 200 µl.

L'indice di permeabilità viene espresso come rapporto di escrezione urinaria tra lattulosio e mannitolo (La/Ma) che in condizioni normali assume valori maggiori di 0 e inferiori o uguali a 4.

Poiché il mannitolo viene assorbito per via transcellulare attraversando le cellule della barriera intestinale, la sua escrezione urinaria può essere interpretata come marker della loro capacità assorbente.

Una diminuzione del recupero di Ma implica un conseguente aumento del rapporto La/Ma che è presente nelle malattie intestinali che compromettono i villi (celiachia, giardiasi, diarrea).

### **5.3.1. Soluzioni da bere**

Le soluzioni da somministrare al paziente prima di eseguire il test di permeabilità sono preparate sciogliendo 11 ml di mannitolo (18%) e 15 ml di lattulosio Normase (66,7%) in 100 ml di H<sub>2</sub>O bidistillata.

Tali soluzioni vengono conservate a -20°C per evitare l'aterazione degli zuccheri disciolti.

### **5.3.2. Preparazione dei campioni**

Il campione di urina viene conservato a -4°C fino all'esecuzione del test. Dopo aver registrato la diuresi totale si raccolgono 10 ml di campione in provetta.

Il campione da leggere viene diluito 1/10 per la determinazione del lattulosio e 1/100 per la determinazione del mannitolo.

## 5.4. Cromatografia

"Metodo usato primariamente per la separazione dei componenti di una miscela; i componenti vengono distribuiti tra due fasi una delle quali è fissa mentre l'altra è mobile. La fase stazionaria può essere un solido, o un liquido supportato su di un solido, o un gel. La fase stazionaria può essere impaccata in una colonna, sparsa come uno strato, o distribuita come un film. La definizione "letto cromatografico" è usata come termine generale per denotare una qualsiasi delle varie forme in cui può essere usata la fase stazionaria." (Definizione IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry).

Le singole specie sono trasportate dalla fase mobile e ritardate in funzione delle varie interazioni con la fase stazionaria.

I meccanismi di base che intervengono nella separazione sono riconducibili essenzialmente a fenomeni dovuti a:

- Assorbimento superficiale
- Solubilità relativa
- Carica
- Dimensioni

Una delle ragioni del successo della cromatografia risiede proprio nei molti diversi meccanismi che possono essere utilizzati per la separazione di specie con caratteristiche diverse. Essi vengono utilizzati per la principale classificazione della cromatografia:

- a scambio ionico
- di affinità
- di ripartizione

- di esclusione
- di adsorbimento.

Le tecniche di separazione cromatografica sono diverse:

- cromatografia su strato sottile
- cromatografia su carta
- cromatografia su colonna classica
- cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni.

Le separazioni cromatografiche su colonna si concludono con la registrazione di un cromatogramma cioè un tracciato che descrive l'andamento del segnale del rivelatore in funzione del tempo o del volume di eluente, a partire dall'istante in cui la miscela viene introdotta nella colonna.

Il tempo impiegato da ciascuna sostanza per eluire attraverso la colonna, misurato a partire dall'istante in cui la miscela viene introdotta nello strumento, rappresenta il tempo di ritenzione.

L'efficienza di una separazione cromatografica indica la capacità di fluire tutte le particelle di una data specie chimica con la stessa velocità, in modo da formare bande strette, che forniscano picchi molto stretti.

Il parametro più semplice con cui si esprime l'efficienza è la larghezza alla base del picco, che in genere è diversa per ogni specie chimica in un dato sistema cromatografico.

### 5.4.1.HPLC

L'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) rappresenta l'evoluzione strumentale della cromatografia in fase liquida su colonna classica.

E' una cromatografia ad elevate prestazioni perché in pochi minuti si effettuano separazioni di miscele anche molto complesse.

In HPLC il flusso della fase mobile ( un liquido a bassa viscosità) attraverso la colonna viene assicurato da un sistema di pompe che lavorano in sincronismo.

Dal cromatogramma si può effettuare l'analisi quantitativa della miscela calcolando l'area dei picchi che è direttamente proporzionale alla concentrazione della sostanza.

Per avere una elevata selettività ad ogni sostanza deve corrispondere un tempo di ritenzione sufficientemente diverso dalle altre.

L'HPLC consente di adottare tecniche di separazione diverse a patto di utilizzare i dispositivi, in particolare i rivelatori adatti:

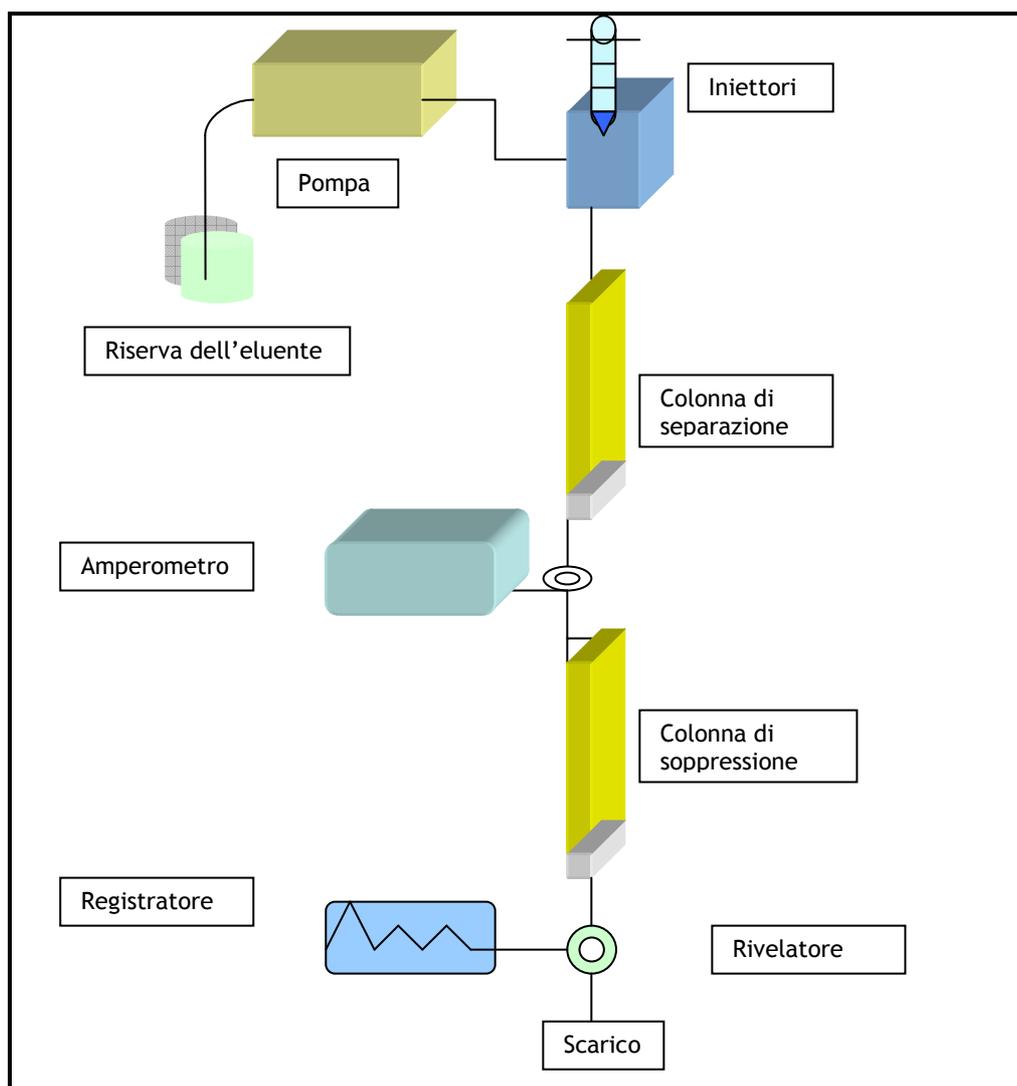
- cromatografia di adsorbimento (LSC: liquid-solid-chromatography)
- cromatografia di ripartizione (LLC: liquid-liquid chromatography)
- cromatografia su fase legata (BPC: bonded-phase chromatography)
- cromatografia di scambio ionico (IEC: ion-exchange chromatography)
- cromatografia di esclusione (EC: exclusion chromatography).

Per avere una buona separazione cromatografica è molto importante la scelta della fase mobile e della fase stazionaria (39).

Questa tecnica offre molti vantaggi:

- alta velocità e riproducibilità delle analisi grazie ad un apparato di pompaggio in grado di raggiungere pressioni molto elevate;
- alta capacità di risoluzione realizzata attraverso l'uso di fasi stazionarie altamente perfezionate;
- alta sensibilità e specificità ottenute con l'impiego di apparati di rivelazione estremamente sensibili.

## SCHEMA A BLOCCHI DI UN DISPOSITIVO PER IC AD ALTE PRESTAZIONI



### 5.4.2. Calibrazione

Prima di effettuare il dosaggio dei campioni è necessario eseguire la calibrazione dello strumento.

Si costruiscono delle curve di calibrazione attraverso la lettura di soluzioni a concentrazione nota di lattulosio e mannitolo.

Le soluzioni standard vengono preparate a partire da una soluzione madre contenente 50 mg dello zucchero corrispondente (La o Ma) in 500 ml di H<sub>2</sub>O bidistillata. Dalla soluzione madre si effettuano le varie diluizioni per ottenere soluzioni a concentrazione decrescente.

Le soluzioni standard per il mannitolo e lattulosio sono:

<u>Mannitolo</u>	<u>Lattulosio</u>
0,1 ppm	5 ppb
1 ppm	10 ppb
5 ppm	50 ppb
10 ppm	500 ppb

Il lattulosio viene espresso in ppb (parti per miliardo) a causa del basso recupero urinario.

La lettura delle soluzioni standard viene eseguita iniettando in colonna circa 200 µl per ogni soluzione preparata.

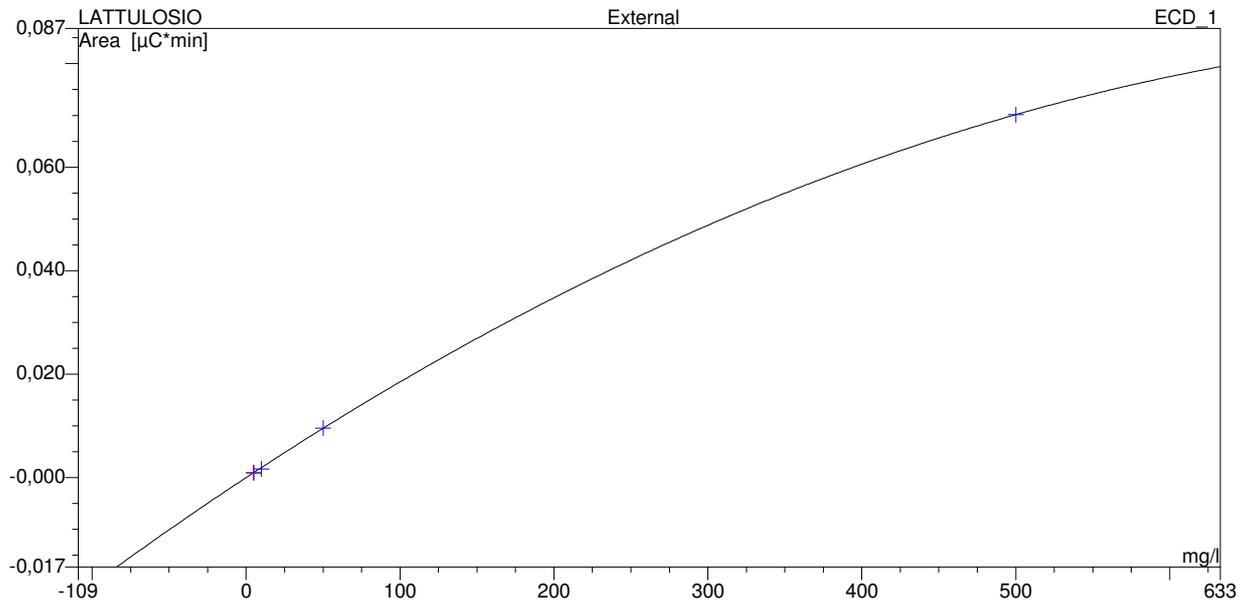
I picchi cromatografici degli standard del lattulosio si hanno in un tempo medio di 30 minuti che corrisponde al tempo di ritenzione del La. I 4 picchi ottenuti hanno un'area differente che è direttamente proporzionale alla concentrazione dello zucchero. Al primo picco di lattulosio corrisponde una concentrazione di 0,1 mg/L ai successivi rispettivamente, 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L.

I picchi cromatografici degli standard del mannitolo si hanno, invece, in un tempo medio di 3 minuti che corrisponde al tempo di ritenzione dello zucchero. Le concentrazioni di Ma ottenute dagli standard sono rispettivamente: 0,005 mg/L, 0,010 mg/L, 0,050 mg/L, 0,500 mg/L.

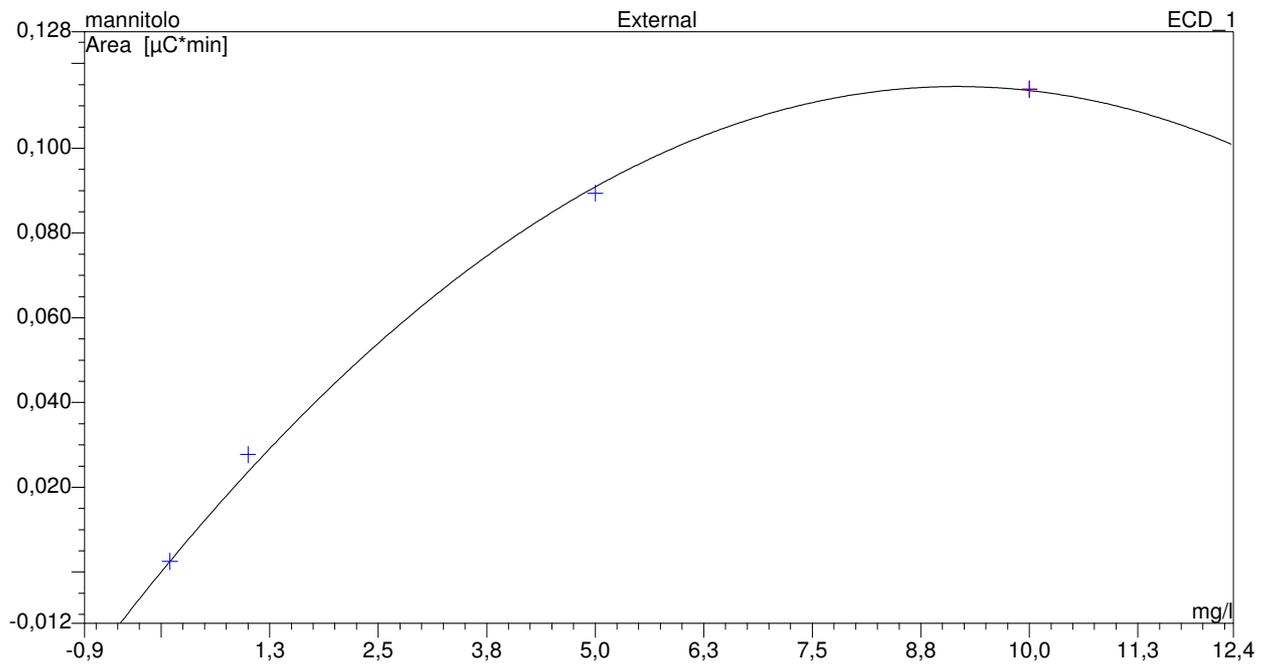
Ottenute le curve di calibrazione per interpolazione si calcola la concentrazione di escrezione urinaria nei nostri campioni.

## CURVE DI CALIBRAZIONE LATTULOSIO (A) E MANNITOLO (B)

A.



B.



### 5.4.3. Analisi

È stato utilizzato un cromatografo ionico DIONEX mod. DX 600 composto da:

- Sistema di pompaggio (DX-600 IP25 Isocratic Pump + LAN)
- Modulo di degassaggio (Eluent Organizer Set, 2L Plastic)
- Sistema di iniezione (LC Chromatography Organizer, PEEK, Front)
- Rilevatore elettrochimico (ED50 Electrochemical Detector with LAN)
- Cella elettrochimica con elettrodo in oro (ED50 Electrochemical Cell, Au)
- Colonna CarboPac PA10 Analytical collegata con CarboPac PA10 Guard.

Per l'analisi dei dati inoltre c'è un computer Optilex GX150 e il programma utilizzato è "Cromeleon".

È importante sottolineare la presenza, nella strumentazione, del rilevatore amperometrico che, rispetto al rifrattometro, presenta una più alta sensibilità; ciò consente l'iniezione di soluzioni molto diluite che determinano una minore contaminazione del sistema cromatografico ed una maggiore durata delle colonne cromatografiche.

Per ottenere un'elevata efficienza nella separazione è necessario che le particelle con le quali è impacchettata la colonna abbiano dimensioni piccolissime (5-10  $\mu\text{m}$ ), per questo motivo è indispensabile applicare un'elevata pressione per mantenere una buona velocità di flusso dell'eluente quindi un tempo d'analisi adeguato.

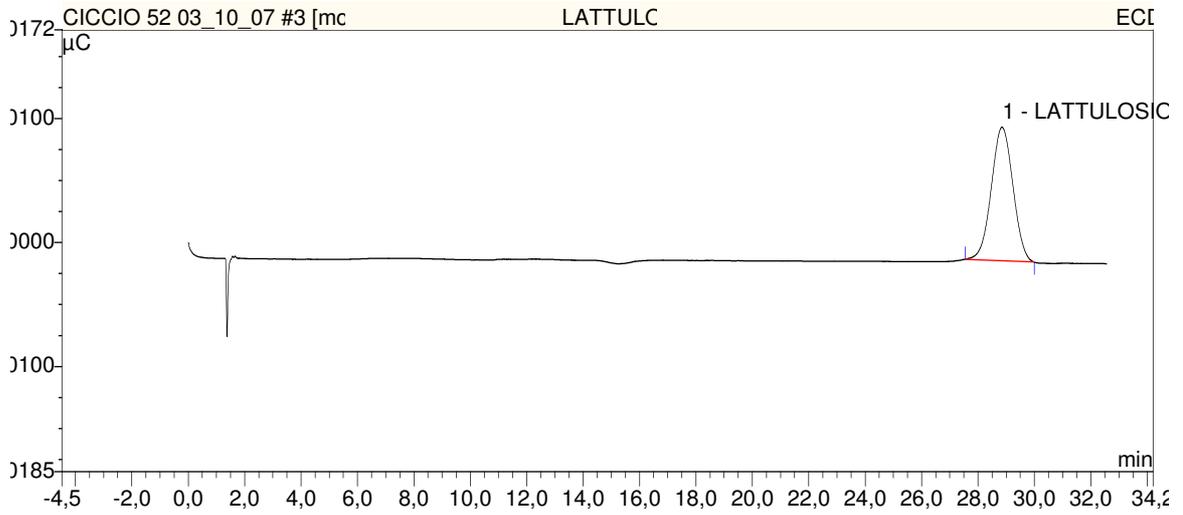
La pompa è programmata ad un flusso pari ad 1 ml/min.

#### Esecuzione del test:

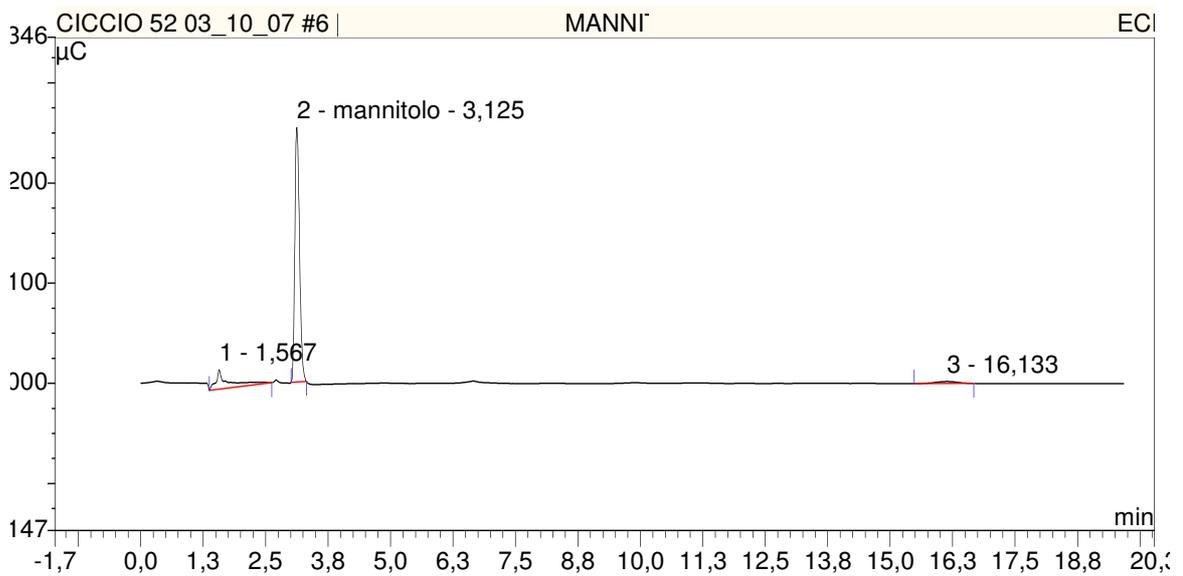
- si effettua il degassaggio con elio dell'eluente NaOH, per prevenire l'assorbimento di anidride carbonica e la successiva produzione di carbonati che potrebbero alterare i tempi di ritenzione degli zuccheri;
- l'eluente si lascia correre per circa 15 minuti in modo da mettere a punto lo strumento;
- vengono iniettati circa 200  $\mu$ l di campione diluito;
- alla fine della corsa cromatografica si eseguono i calcoli considerando le amounts di lattulosio e mannitolo forniti dallo strumento e la diuresi delle 5 ore.

## PICCHI CROMATOGRAFICI TIPICI DI LATTULOSIO (A) E MANNITOLO (B)

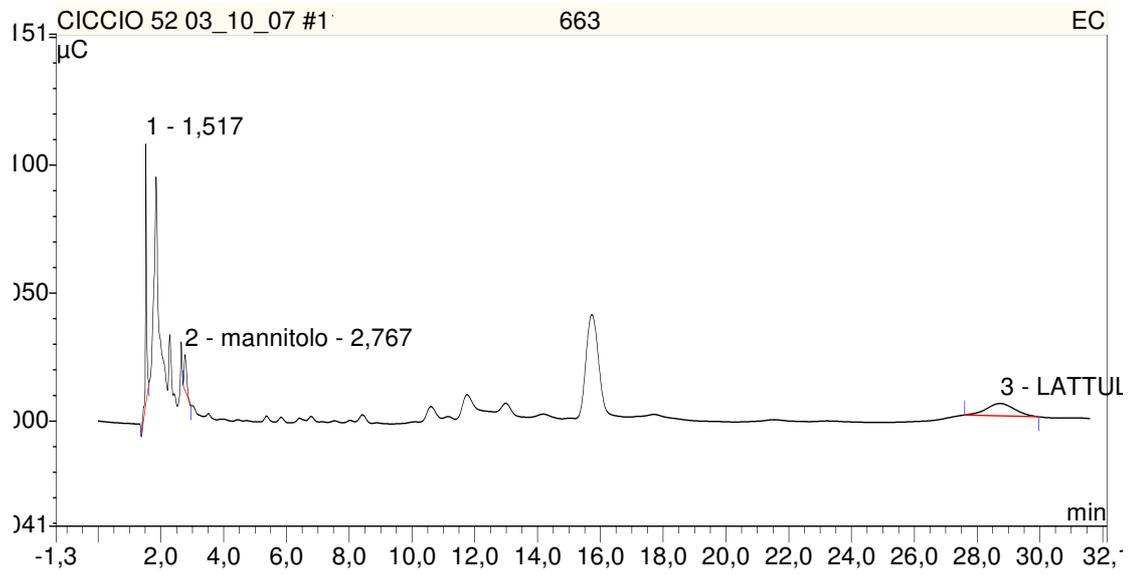
**A.**



**B.**



# CORSA CROMATOGRAFICA DI UN CAMPIONE



## 6. RISULTATI

---

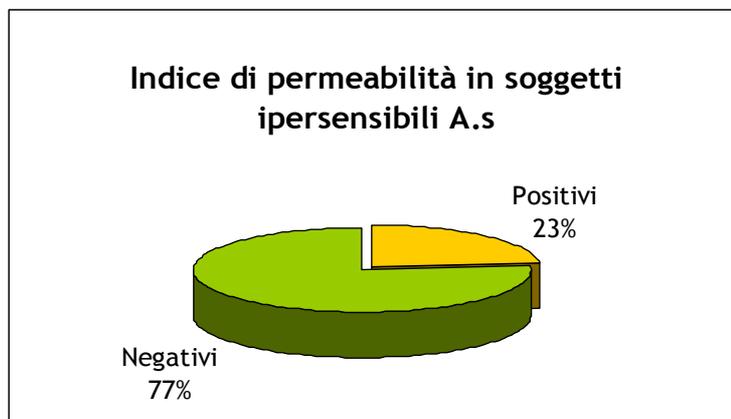
Il test di permeabilità è stato eseguito su 43 soggetti risultati ipersensibili all'*Anisakis simplex* (nel periodo tra gennaio e giugno 2007).

Si sono riscontrati i valori riportati in tabella.

IP alterato (gruppo A)	
1	8,3
2	7,10
3	5,27
4	4,30
5	4,94
6	63,63
7	4,20
8	9,57
9	23,16
10	27,66

IP normale (gruppo B)			
1	0,77	18	1,71
2	0,62	19	0,41
3	2,84	20	0,60
4	3,79	21	1,61
5	2,22	22	3,47
6	0,29	23	1,45
7	1,18	24	0,87
8	0,12	25	3,42
9	0,59	26	1,21
10	2,25	27	1,27
11	3,92	28	2,40
12	3,66	29	0,72
13	2,17	30	1,40
14	2,35	31	1,80
15	2,32	32	0,37
16	3,21	33	1,22
17	0,95		

L'analisi della tabella dimostra che 10 su 43 soggetti con ipersensibilità all'anisakis (il 23,2 % dei casi) presentano un indice di permeabilità superiore alla norma ( $0 < IP \leq 4$ ).



I pazienti risultati positivi al test si sono sottoposti a dieta di esclusione, eliminando i prodotti ittici crudi, per un periodo variabile di 5-10 mesi. Al termine di tale dieta sono stati richiamati a ripetere l'esame di permeabilità. Abbiamo ottenuto i seguenti risultati mostrati in tabella.

<b>Indice di Permeabilità La/Ma (gruppo A)</b>	
<b>Prima della dieta</b>	<b>Dopo la dieta</b>
8.30	1,21
7.10	0,67
5.27	2,21
4.30	0,90
4.94	1,85
63.63	3,76
4.20	0,13
9.57	3,20
23.16	3,37
27.66	3,80

## 7. CONCLUSIONI

---

I pazienti presi in esame, che manifestavano una ipersensibilità ad *Anisakis* e un indice di permeabilità (IP) alterato (maggiore di 4), hanno seguito una dieta di esclusione. La dieta prevedeva l'ingestione di prodotti ittici solo se preventivamente cotti ( $T > 60^{\circ}\text{C}$  per almeno 10') per un periodo da 5 a 10 mesi. La valutazione dell'IP dopo la dieta ha evidenziato un ritorno in tutti i pazienti suddetti (10/10) ai valori di normalità ( $0 < \text{IP} \leq 4$ ).

In accordo con i lavori precedenti possiamo concludere che:

1. le allergie alimentari sono tipicamente associate ad alterazione della permeabilità intestinale
2. soggetti con ipersensibilità ad *Anisakis* manifestano un indice di permeabilità significativamente aumentato rispetto ai soggetti controllo
3. una dieta priva di prodotti ittici crudi determina un ritorno ai valori di normalità dell'indice di permeabilità.

Si può ipotizzare che il contatto con antigeni di *Anisakis simplex* determini un'iperespressione della proteina dell'epitelio intestinale, la zonulina.

La zonulina è una proteina di recente identificazione, che modula reversibilmente le giunzioni serrate tra cellule contigue con conseguente variazione della permeabilità epiteliale (40).

Il gruppo di pazienti pervenuto nel nostro laboratorio rappresenta solo un piccolo campione, in realtà le complicanze legate a questa parassitosi sono molto più estese di quanto possa sembrare da una prima analisi. Pertanto è

necessario puntare ad una politica d'informazione mirata a correggere sbagliate abitudini alimentari e promuovere un'attenta prevenzione al consumo di pesce crudo.

Precedenti segnalazioni di granulomi eosinofili del tratto gastrointestinale ad eziologia ignota forse oggi sarebbero attribuibili ad Anisakiasi.

Ricordiamo che nel 2002 è stato emanato il Regolamento CE n 178 che inserisce l'anisakiasi tra le malattie per le quali è previsto un sistema di allerta comunitaria.

Alla luce delle recenti notizie relative a riscontro di larve di parassiti del genere *Anisakis simplex*, il Consiglio Superiore di Sanità ha fornito direttive per una uniforme e corretta applicazione su tutto il territorio nazionale dei controlli ispettivi nonché raccomandazioni rivolte a pescatori, operatori del settore alimentare, ristoratori e consumatori, al fine di prevenire i rischi per la salute.

Nel nostro studio i pazienti hanno adottato una dieta che prevedeva l'utilizzo di pesce e prodotti ittici cotti; si sta valutando anche l'effetto di diete che prevedano pesce preventivamente congelato e di diete in cui gli stessi prodotti vengano completamente allontanati.

E' stata osservata un'alta frequenza di sensibilizzazione tra i membri della famiglia di pazienti con anisakiasi (73%) comparata con la prevalenza nella popolazione normale proveniente dalla stessa area geografica (12%). Pertanto i prossimi studi saranno rivolti alla valutazione dell'IP anche dei familiari (dei soggetti fino ad ora oggetto di attenzione) che nonostante non manifestino disturbi gastrointestinali o reazioni allergiche, abbiano le stesse abitudini alimentari nel mangiare prodotti ittici crudi.

1. **Balletta A.**, Campanini N., Clemente M. *L' allergia ad Anisakis simplex.*
2. **Gomez B**, Tabar AI, Tunon T, Larrinaga B. *Eosinophilic gastroenteritis and Anisakis.* Allergy. 1998 Dec; 53(12):1148-54.
3. **Pellegrini M**, Occhini R, Tordini G, Vindigni C, Russo S, Marzocca G. *Acute abdomen due to small bowel anisakiasis.* Dig Liver Dis 2005;37:65-7
4. **Young B**, Heath J.W.-Wheater- *Istologia e anatomia microscopica* ;2001.
5. **Sarker SA**, Gyr K. *Non immunologic defense mechanism of the gut.* Gut 1992; 33:987-93.
6. **Kagnoff MF.** *Immunology of the intestinal tract.* Gastroenterology 105(5): 1275-80, 1993.
7. **Cremaschi D**, Esposito G. *Fisiologia generale.* Edi.Ermes, 1991.
8. **Bjarnason I**, MacPherson A, Hollander D. *Intestinal permeability: an overview.* Gastroenterology 1995;108:1566-81.
9. **Hollander D.** *The intestinal permeability barrier. A hypothesis as to its regulation and involvement in Crohn's disease.* Scand J Gastroenterology 1992;27:721-726.
10. **Marcial MA**, Carlson SL, Madara JL. *Partitioning of paracellular conductance along the ileal crypt-villus axis: a hypothesis based on structural analysis with detailed consideration of tight junctions structure-functions relationship.* J Membr Biol 1984;80:59-70.

11. Gumbiner B. *Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions*. Am J Physiol 1987;253:C749-C758.
12. Fihn BM, Sjoqvist A, Jodal M. *Permeability of the rat small intestinal epithelium along the villus-crypt axis: effects of glucose transport*. Gastroenterology 2000;119:1029-36.
13. Hollander D. *The intestinal permeability barrier*. Scand J Gastroenterol 1992; 27; 721-726.
14. Cobden I, Rothwell J, Axon ATR. *Intestinal permeability and screening tests for coeliac disease*. Gut 1980; 21:512-508.
15. Lifschiz CH, Shulman RJ. *Intestinal permeability test: are they clinically useful?* J Pediatr Gastroenterol Nutr 1990;10:283-7.
16. Cobden I, Hamilton I, Rothwell J, Axon ATR. *Cellobiose/mannitol test. Physiological properties of probe molecules and influence of extraneous factors*. Clin Chem Acta 1985;148:53-62.
17. Menzies IS, et al. *Absorption of intact oligosaccharide in health and in disease*. Biochemsoc trans 1974;2:1042-47.
18. Chadwick VS, Phillips SF, Hofman AF. *Measurement of intestinal permeability using low molecular weight polyethylene glycols (PEG 400). I: Chemical analysis and biological properties of PEG 400*. Gastroenterology 1977;73:241-246.
19. Bjarnason I, Peters TJ, Veall N. *A persistent defect in intestinal permeability in celiac disease demonstrated by a <sup>51</sup>Cr-labelled EDTA absorption test*. Lancet 1983;i.323-5.
20. Manfredi M.T., Genchi C. *Anisakis visto dal parassitologo*. Not. Allergol., 17:37,1998

21. Purello-D'Ambrosio F, Pastorello E, Gangemi S, Lombardo G, Ricciardi L, Fogliani O, et al. *Incidence of sensitivity to Anisakis simplex in a risk population of fishermen/fishmongers.* Ann All Asthma Immunol 2000;84:439-44.
22. Lindqvist A, Izezawa Z, Tabaka A, Yman L. *Seafood specific IgE in atopic dermatitis.* Ann Allergy 1993;70:58.
23. Buendia E. *Anisakis, anisakidosis, and allergy to Anisakis.* Allergy 1997;52:481-2.
24. Pampiglione et al. *Patology research and practice, 2002 (198), 429-434.*
25. Ishikura H, Kikuchi K, et al. *Anisakidae and anisakidosis. In progress in clinical parassitology 1993; vol III: 43-102.*
26. Van Thiel PH. *Anisakiasis (abstract).* Parasitology 1962;52:16-7.
27. Sugimachi K, Inokuchi K, Oonia T, Fujino T, Ishii Y. *Acute gastric anisakiasis. Analysis of 178 cases.* JAMA 1985;253:1012-3.
28. Audicana M, García M, del Pozo MD, Díez J, Muñoz D, Fernández E, et al. *Clinical manifestation of allergy to Anisakis simplex.* Allergy 2000;55(Suppl.59):28-33.
29. Estrada Rodriguez JL, Gozalo Reques F. *Sensitisation to Anisakis simplex: an unusual presentation.* Allergol Immunophatol 1997;25:95-7.
30. Scala E, Giani M, Pirrotta L, Guerra EC, Cadoni S, Girardelli CR, et al. *Occupational generalised urticaria and allergic airborne asthma due to Anisakis simplex.* Eur J Dermatol 2001;11:249-50.
31. Cuede E, Audiciana MT, García M, Anda A, Fernández de Corres L, Jiménez JC, et al. *Rheumatic manifestations in the course of*

- anaphylaxis caused by Anisakis simplex*. Clin Exp Rheumatol 1998;16:303-4.
32. Yamada M, Torii S. *Clinical evaluation of Pharmacia CAP System new food and inhalant allergens*. Paper Japanese Soc Allergol 1992.
33. Garcia-Bara MT, Matheu V, Zubeldia JM, Rubio M, Ordoqui E, Lopez-Saez MP. *Anisakis simplex-sensitized patients: should fish be excluded from their diet?* Ann Allergy Astham Immunol 2001;86:679-85.
34. Matsui T, Lida M, Murakami M, Kimura Y, Fujishima M, Yao Y, et al. *Intestinal anisakiasis: clinical and radiologic features*. Radiology 1985; 157:299-302.
35. Verhamme MA, Ramboer CH. *Anisakiasis caused by herring in vinegar: a little known medical problem*. Gut 1988;29:843-7.
36. Dziekonska-Rynko J, Rokicki J, Jablonowski Z. *Effects of ivermectin and albendazole against Anisakis simplex in vitro and in guinea pigs*. J Parasitol 2002;88:395-8.
37. Arias-Diaz J et al. *Efficacy of albendazole against Anisakis simplex larvae in vitro*. Digestive and liver Disease 38, 2006; 24-26.
38. Generoso M, De Rosa M, De Rosa R, De Magistris L, Secondulfo M, Fiandra R et al. *Cellobiose and lactulose coupled with mannitol using ion exchange chromatography with pulsed amperometric detection, are reliable probes for investigation of intestinal permeability*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2003; 783: 349-357.
39. Cozzi R, Protti P. *Analisi chimica: moderni metodi strumentali*. 1996- Zanichelli.

40. Thompson T. *Wheat starch, gliadin, and the gluten-free diet.* J Am Diet Assoc. 2001;101:1456-9