IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Caratterizzazione molecolare dell'isolato *T. equiperdum* responsabile dei focolai di morbo coitale maligno del 2011 in Italia

Ilaria Pascucci, Cesare Cammà, Andrea Di Provvido, Marco Di Domenico, Maurilia Marcacci, Achim Schnaufer.

I risultati della ricerca corrente condotta dall'IZSAM. Anno 2017.
Teramo, 14 giugno 2018

TITOLO del progetto: adattamento al sangue di animali da laboratorio di un ceppo di campo di *T. equiperdum* e sua caratterizzazione molecolare.

Codice progetto : IZSAM0213

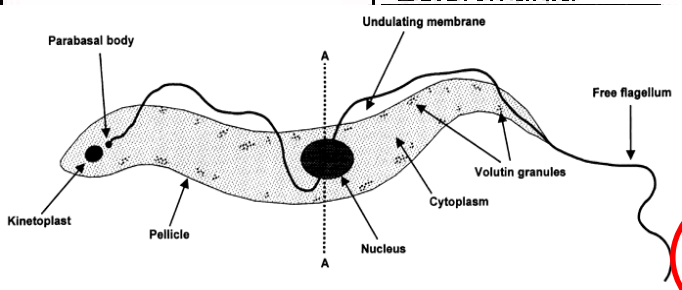
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

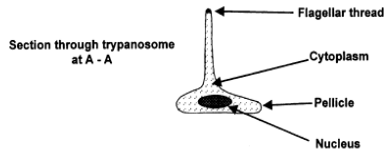
• Obiettivi

- ✓ Obiettivo: Amplificare ed adattare l'isolato italiano di *T. equiperdum* al sangue di animali da laboratorio.
- ✓ Obiettivo: Effettuare analisi di tipo molecolare anche mediante NGS sul ceppo purificato

Subgenere *Trypanozoon*

Family	Genus	Section	Subgenus	Species	Subspecies
Trypanosomatidae	Trypanosoma	Stercoraria	Megatrypanum	T. theileri	
				T. melophagium	
			Herpetosoma	T. lewisi	
				T. musculi	
				T. microti	
			Schizotrypanum	T. cruzi	
				T. dionisii	
		Salivaria	Tejeraia	T. rangeli	
	Crithidia		Duttonella	T. uniforme	
	Leptomonas			T. vivax	
	Herpetomonas		Nannomonas	T. congolense	
	Blastocrithida			T. simiae	
	Phytomonas		Pycnomonas	T. suis	
	Leishmania		Trypanozoon	**T. evansi**	
				T. equiperdum	
				T. brucei	**T.b. brucei**
					T.b. gambiense
					T.b. rhodesiense





Perchè

- ✓ **Pochi ceppi disponibili gran parte correlati con *T.evansi*, tanto da metterne in dubbio la stessa attribuzione di specie pochi corredati con dati clinici ed epidemiologici.**
- ✓ **Necessità di materiale concentrato e purificato per la produzione di diagnostici e da permettere l'esecuzione di prove di caratterizzazione molecolare anche mediante metodi innovativi come la next generation sequencing (NGS).**
- ✓ **Definire la classificazione di *T.equiperdum* e definirne l'evoluzione all'interno del sottogenere Trypanozoon, ma anche di sviluppare metodi diagnostici innovativi e performanti.**
- ✓ **Dati bibliografici scarsi e datati su metodi di isolamento assenza di protocolli sperimentali univoci**

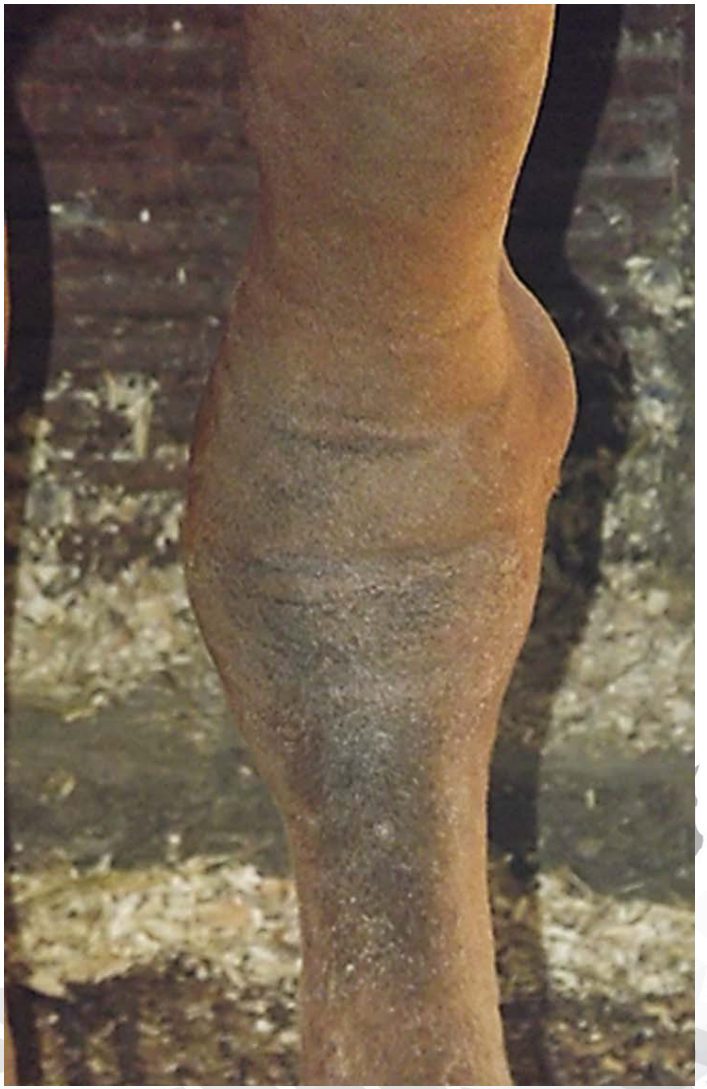
Morbo Coitale Maligno 2011

Region	Province	Equids		
		Present	*Positive*	*With symptoms*
Sicilia	Catania	5	1	0
Sicilia	Catania	27	1	1
Campania	Napoli	3	1	0
Campania	Napoli	8	2	0
Campania	Napoli	17	5	5
Campania	Caserta	59	9	1
Puglia	Bari	49	1	1
		168	**20**	**8**

I campioni

Secrezione mammaria microscopicamente positiva, per l'inoculo animali

Fluido articolare positivo all'osservazione microscopica, per l'inoculo animali



Lesione cutanea a dollaro d'argento, per la caratterizzazione genetica

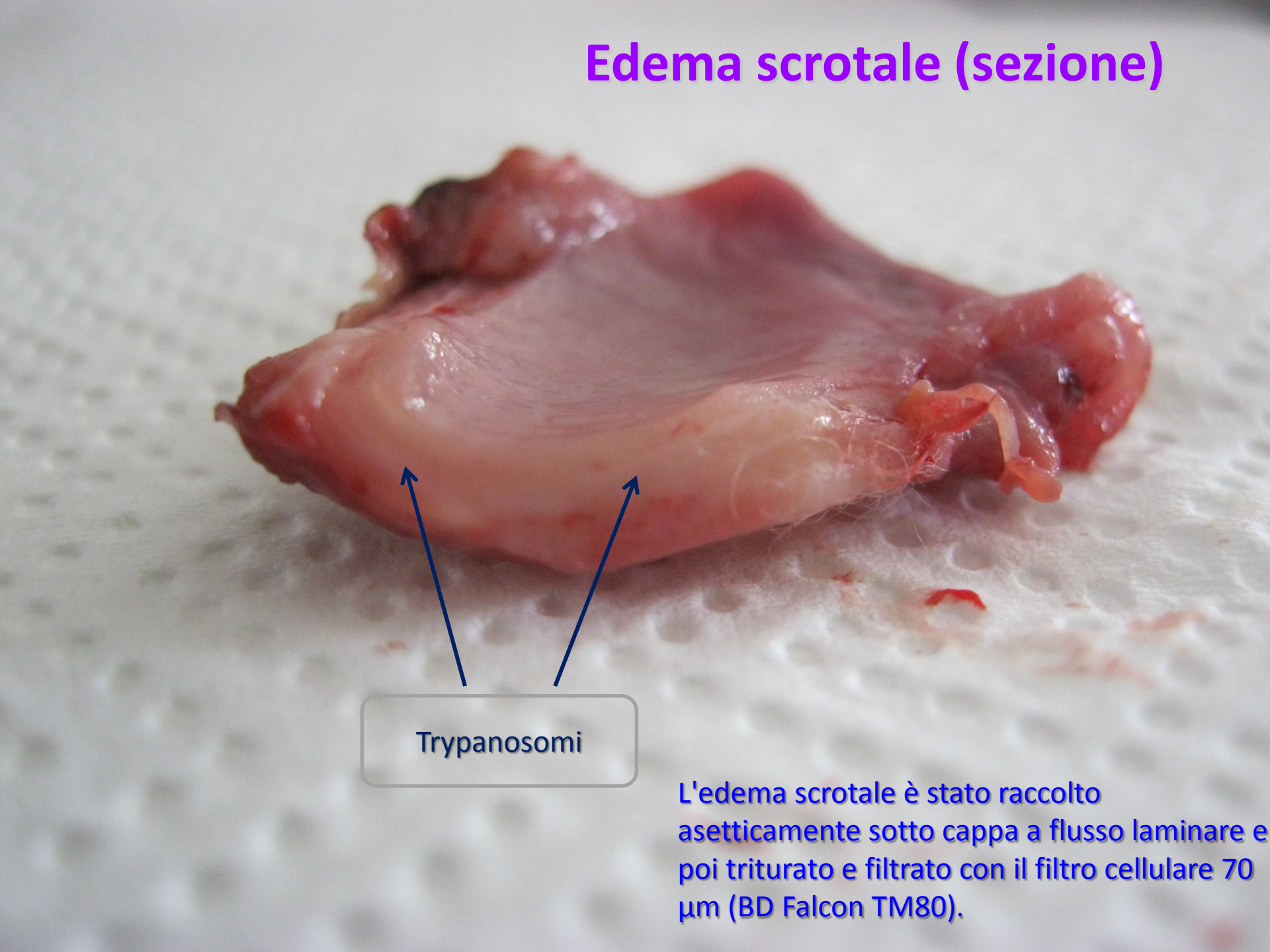
Isolamento of *T. equiperdum*

- Un'aliquota di 0,5 ml di ciascun campione positivo è stata inoculata per via intraperitoneale in un topi CD1 femmina e 1 ml in ratti Wistar.
- Inoltre, **due conigli bianchi maschi New Zeland sono stati inoculati per via intrascrotale con 1 ml di secrezione mammaria e 1 con 1 ml di liquido articolare**.
- Tutti i topi e i ratti inoculati controllati mediante RealTime PCR ogni 2 giorni non hanno mostrato parassitemia fino a 90 giorni per i topi e a 150 giorni per i ratti.

Isolamento of *T. equiperdum*

- ✓ **Venti giorni** dopo l'inoculazione tutti i conigli hanno mostrato necrosi cutanea ed edema scrotale.

Edema scrotale (sezione)



L'edema scrotale è stato raccolto asetticamente sotto cappa a flusso laminare e poi triturato e filtrato con il filtro cellulare 70 µm (BD Falcon TM80).

Omogenato di scroto

L'omogenato è stato poi diluito con 5 ml di PBS sterile con l'aggiunta dell'1% di glucosio e una goccia della sospensione è stata utilizzata per l'esame al microscopio ottico che ha mostrato la presenza di tripanosomi vivi

Tryps nell'omogenato di scroto

I parassiti sono stati contati usando una camera Burker e gli omogenati hanno mostrato fino a 10^4 parassiti / ml.

In caso di presenza di parassiti vivi, l'omogenato è stato aliquotato e conservato in azoto liquido dopo l'aggiunta del 10% di glicerolo come crioprotettivo.

Protocollo

Aliquota di omogenato

Prelievo di sangue per RealTime PCR giornaliero x tutto il periodo

Inoculo intrascrotale nel coniglio dopo circa 10 gg

Orchite parassitaria

Castrazione chirurgica e prelievo edema scrotale

Omogeneizzazione mediante tagliuzzamento dell'edema con soluzione fisiologica e test con RealTime PCR stoccaggio di aliquote di omogenato positivo in Azoto liquido e/o inoculo di circa 2 ml I.P. o EV in ratti e/o1 ml I.S. x scroto in coniglio

Orchite con sovrainfezione batterica

Castrazione chirurgica e prelievo materiale scrotale per RealTime PCR. Prelievo di sangue per RealTime PCR

Real Time PCR positiva da sangue inoculo 1ml di sangue I.S. x scroto in coniglio

In ogni momento se RealTime PCR da sangue evidenzia una parassitemia persistente di almeno 10^3 - 10^4

Salasso del coniglio per raccolta sangue

Tentativi di adattamento ai roditori

- **Inoculum:** Omogenato di scroto di coniglio (5 x 10^2/ml)
- Animali topi CD1 1 ml e 2 ml in ratti Wistar.

- **Via di inoculo :** intraperitoneale ed endovenosa

Alcune gocce di sangue sono state controllate per verificare la presenza della parassitemia mediante RealTime PCR ed esame microscopico ogni 2 giorni **fino al 120 giorni post inoculo**.

Nessuno degli animali ha mai mostrato parassitemia

Tentativi di adattamento ai roditori

- Un tentativo di adattamento al topo è stato effettuato mediante inoculo delle matrici di scroto di conigli **contemporanea somministrazione di paracetamolo per via orale**

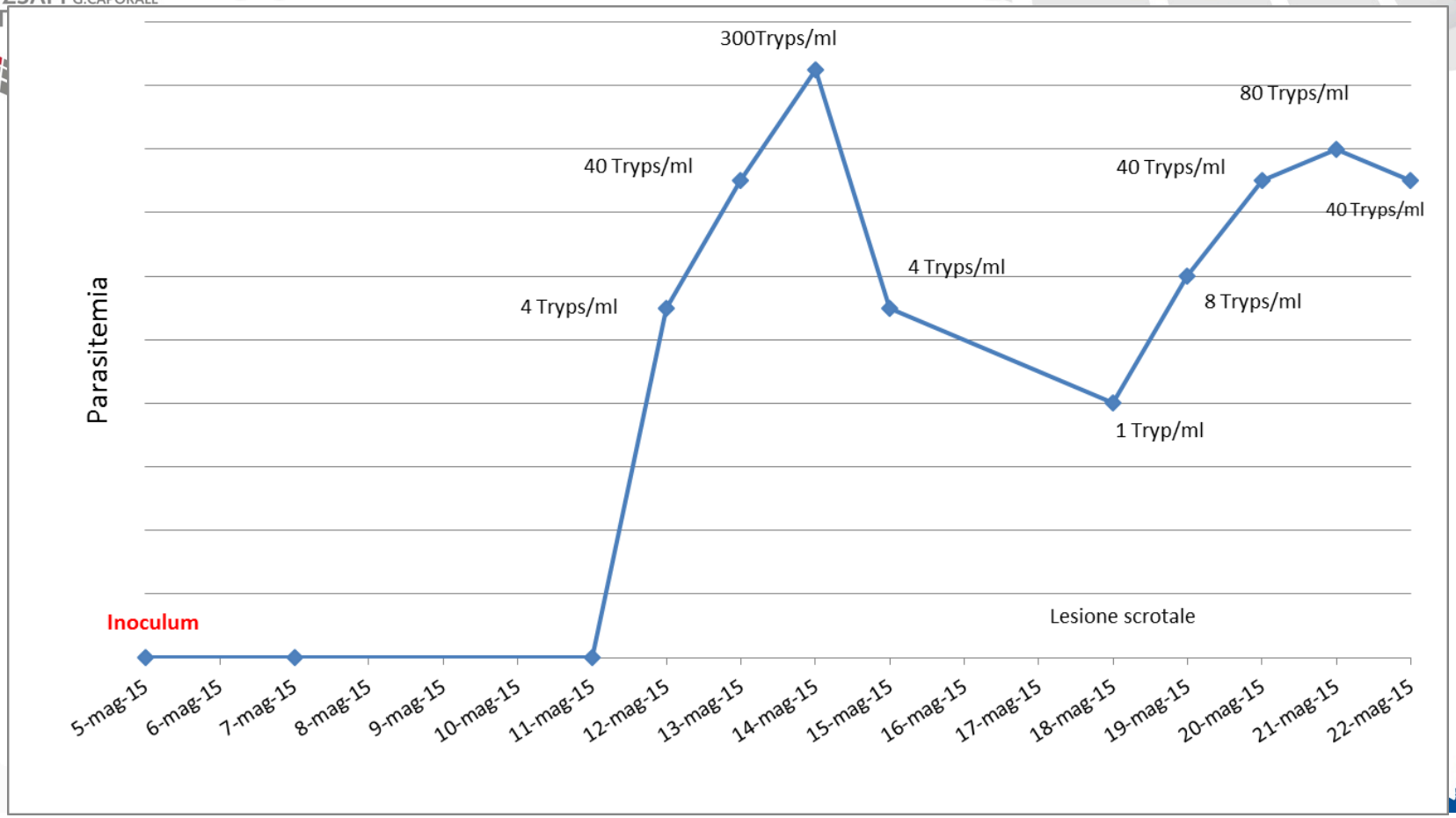
- **Tale prova è stata effettuata con lo scopo di abbassare la temperatura di 1,5 gradi, ipotizzando che nel tropismo del parassita verso i tessuti esterni dell'apparato genitale possa giocare un ruolo importante la temperatura corporea più bassa a cui si trovano i tessuti stessi.**

- ***Le prove non hanno dato l'esito sperato, le differenze di temperatura tra i gruppi trattati e quello non trattato non erano significative.***

Tentativi di adattamento ai roditori

- Il progetto sperimentale redatto secondo l'allegato 4 della legge 116/1992 ed inviato al Ministero il 18 marzo 2014 prevedeva l'utilizzo di 20 conigli 30 ratti e 60 topi, ma, considerato i risultati, i numeri dei roditori sono stati ridotti a poche unità.

Trypanosoma nel sangue dei conigli



I conigli inoculati sono stati monitorati giornalmente con RealTime PCR (LOD= 0,1tryp/ml) per evidenziare l'eventuale sviluppo di parassitemia e valutarne l'entità.

Lo sviluppo di parassitemia è stato non costante che ha presentato livelli variabili hanno raggiunto in un caso il picco massimo di 300 parassiti/ml a circa 9 giorni

Trypanosoma nel sangue dei conigli

- Il carattere transitorio ed imprevedibile dei picchi di parassitemia **non ha reso possibile la raccolta e la successiva concentrazione dei parassiti partendo da sangue di coniglio**.

In nessun caso , infatti, sono state mai raggiunte le concentrazioni nel circolo sanguigno comprese tra 10^{*5} tripanosomi/ml e 10^{*6} tripanosomi/ ml, concentrazioni alle quali normalmente si esegue l'inoculo ai fini della propagazione del parassita nel sangue di roditori.

Prove di purificazione

Inoltre sono state eseguite prove di purificazione partendo dall'omogenato di scroto di coniglio che non hanno dato risultati positivi.

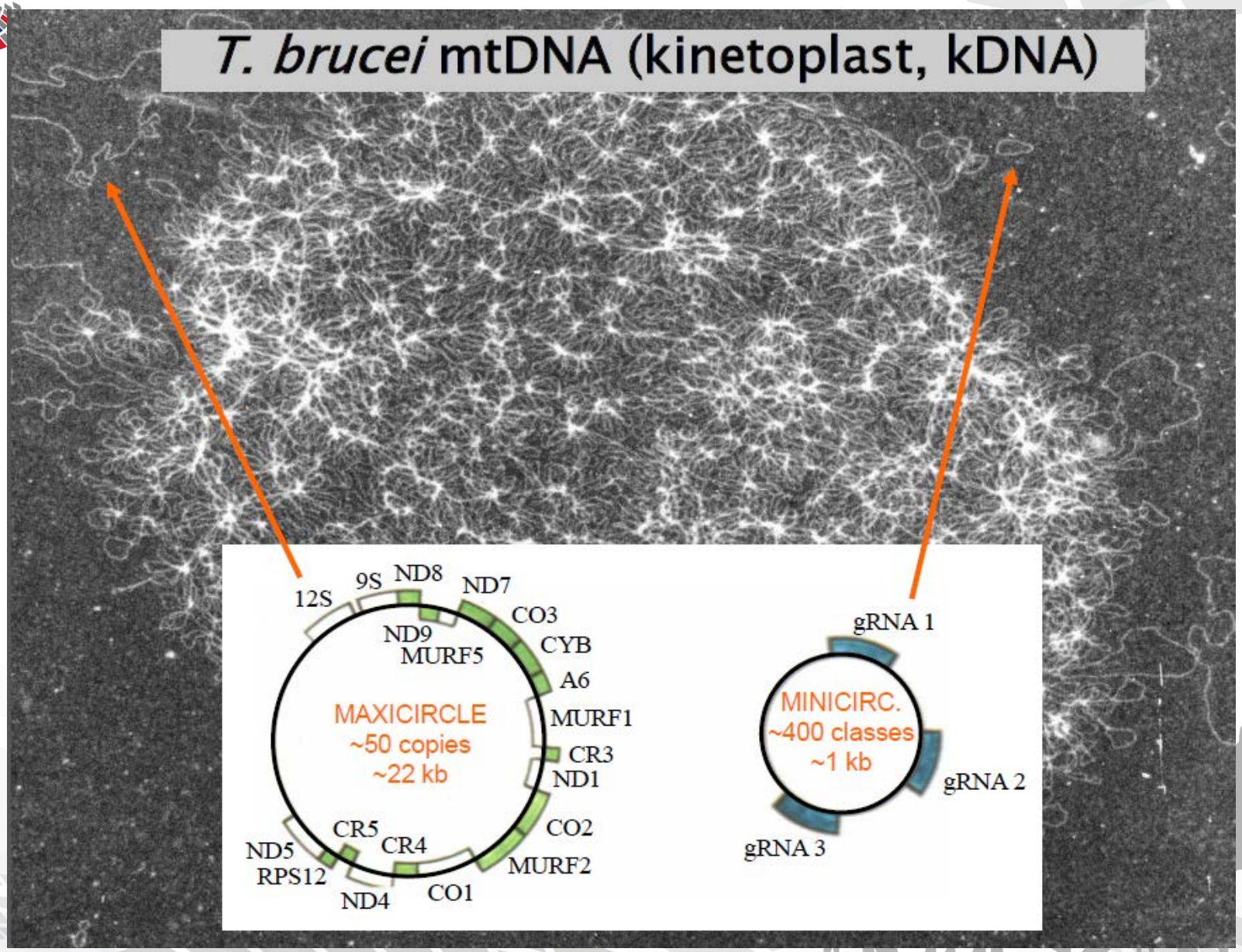
Studi di caratterizzazione genetica

Nonostante non sia stato disponibile, materiale purificato e ad elevata concentrazione è stato possibile eseguire studi di tipizzazione genetica:

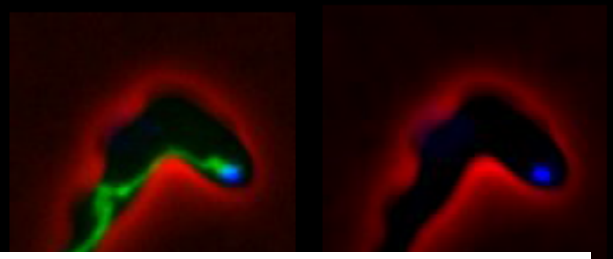
Sono stati utilizzati i seguenti campioni:

- aliquote di omogenato di scroto di coniglio inoculato,
- alcuni campioni biologici provenienti dai focolai di MCM del 2011 che presentavano il segnale più alto alla RealTime PCR .

Trypanosoma Kinetoplast DNA



T. evansi and *T. equiperdum* are 'dyskinetoplastic'



Development of dyskinetoplastidy

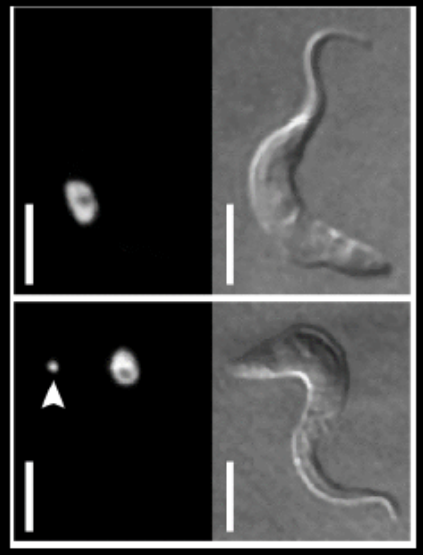
Mutations in ATPase subunit gamma obviate the need for functional kDNA (Dean *et al.* 2013)

Loss of functional kDNA results in loss of tsetse infectivity

mitochondrion

mtDNA = kinetoplast

- essential (Schnaufer *et al.*, 2001)
- important target for anti-trypanosomatid drugs (Gould & Schnaufer, 2014)



'akinetoplastic' ($kDNA^0$)
= complete loss of the kinetoplast

'dyskinetoplastic' ($kDNA^-$)
= dysfunctional kinetoplast

Bloodstream *T. brucei* $kDNA^0$ are viable in presence of certain mutations in ATPase subunit gamma (Dean *et al.*, 2013)