

Utilizzo di un sistema di coltura *in vitro* per rilevare ceppi di *Theileria equi* da equidi infetti e/o serbatoio

B. Bonfini, G. Semproni & G. Savini

Riassunto

Una tecnica di coltura di eritrociti di cavallo, che in parte modifica quella originariamente sviluppata da Holman, è stata utilizzata per rilevare la presenza di ceppi di *Theileria equi* in 12 campioni di sangue di cavallo e 2 di mulo. In base ai dati anamnestici raccolti ed ai risultati delle analisi di laboratorio, gli animali sono stati ripartiti in 4 gruppi: i muli e 2 cavalli sono stati considerati infetti ed inclusi nel gruppo "infezione recente", 4 cavalli con storie di infezioni riscontrate in passato sono stati inseriti nel gruppo "infezione remota", 4 animali sottoposti a trattamento terapeutico anti-theileria hanno formato il gruppo "animali trattati". Del quarto ed ultimo gruppo hanno fatto parte due cavalli con anamnesi muta. Dai 14 animali testati, sono stati isolati ed adattati *in vitro* 10 ceppi di *T. equi*: nove di questi originavano da campioni di cavallo e 1 da sangue di mulo. È la prima volta che un ceppo di *T. equi* isolato da un mulo è stato adattato in colture eritrocitarie. Tutti i ceppi isolati da cavallo hanno mostrato crescita e adattamento con picchi di parassitemia superiori al 10%. I ceppi stabilizzati per più di dieci subcolture, quando congelati e rimessi in coltura, si sono riadattati dopo un periodo di quiescenza di 8 giorni. Il metodo utilizzato in questo studio si è mostrato efficace per coltivare e replicare *in vitro* ceppi selvaggi

di *T. equi* provenienti da cavalli e muli. La tecnica ha inoltre identificato come soggetti portatori di infezione, animali risultati negativi all'esame microscopico, alla immunofluorescenza indiretta ed alla fissazione del complemento.

Parole chiave

Cavallo, colture *in vitro*, esame microscopico, fissazione del complemento, immunofluorescenza, mulo, *Theileria equi*.

Introduzione

La Theileriosi equina è una infezione delle cellule ematiche trasmessa da varie specie di zecche e sostenuta da *Theileria equi* (4), un protozoo molto diffuso in grado di infettare il 90% della popolazione mondiale di equidi (18). Trasmessa naturalmente da zecche dei generi *Hyalomma*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus* (6), *T. equi* ha, nel suo ciclo nell'ospite vertebrato, una fase schizogonica pre-eritrocitaria nei linfociti che porta alla formazione di macroschizonti e di microschizonti. Questi ultimi contengono un gran numero di merozoiti che lisano le cellule ospiti e penetrano nei globuli rossi (19). Il ciclo intraeritrocitario include la formazione di trofozoiti, merozoiti e forme in divisione: i trofozoiti hanno diametro inferiore a 3 μm e possono assumere forme diverse all'interno delle

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise "G. Caporale", Campo Boario, 64100 Teramo, Italia

emazie; i merozoiti, per lo più piriformi, possono trovarsi a coppie o a gruppi di quattro nell'eritrocita, formando la "croce di Malta" caratteristica di *T. equi*.

I test microscopici e sierologici comunemente utilizzati per la diagnosi di theileriosi hanno caratteristiche di sensibilità e specificità non soddisfacenti (21). L'esame microscopico risulta generalmente positivo nella fase acuta della malattia, ma una bassa parassitemia, riscontrabile anche in caso di sintomatologia acuta, può non essere rilevata (1). Le metodiche più utilizzate nella diagnosi sierologica per la ricerca di anticorpi anti *T. equi* sono la fissazione del complemento (FDC) e l'immunofluorescenza indiretta. Quest'ultimo è il test più frequentemente impiegato, essendo capace di evidenziare titoli anticorpali più precocemente e per periodi più lunghi rispetto alla FDC: esso, infatti, è in grado di evidenziare anticorpi da 3 giorni dopo l'infezione fino a 4 anni in assenza di reinfezione (2).

La possibilità di produrre antigeni ricombinanti e monoclonali *ad hoc*, ha permesso lo sviluppo di test immunoenzimatici molto sensibili e specifici. L'ELISA competitiva è attualmente il test ufficiale per la movimentazione dei cavalli (13). Tale metodica è in grado di rilevare anticorpi dopo solo due giorni dall'infezione con elevati livelli di specificità e sensibilità. Le nuove acquisizioni nel campo della biotecnologia hanno permesso lo sviluppo di tecniche molecolari di facile utilizzo e rapida esecuzione. L'impiego di sonde a DNA assicura alta specificità e sensibilità rilevando infezioni ematiche in animali con ridottissime percentuali di parassitemia (16); un ulteriore incremento della sensibilità e della specificità può essere ottenuto sfruttando la capacità della reazione a catena della polimerasi (PCR) di amplificare una prestabilita sequenza di acido nucleico (4). Queste caratteristiche fanno della PCR un'eccellente tecnica diagnostica, che però richiede un considerevole impegno

economico (15).

In questo studio è stata messa a punto una tecnica di coltura continua *in vitro* adatta per la crescita di *T. equi* ed è stata valutata la sua capacità diagnostica, correlandola con le altre prove utilizzate di routine.

Materiali e metodi

Animali ed esami di laboratorio

Campioni di sangue e siero, prelevati dalla vena giugulare di 12 cavalli e 2 muli, sono stati testati per theileriosi equina. Il sangue con anticoagulante è stato strisciato e fissato su vetrino e la presenza di *T. equi* è stata esaminata mediante colorazione di Giemsa (10%) (5). Nei campioni positivi è stata quindi calcolata la parassitemia con metodo convenzionale (7). Sui campioni di siero l'esame per la ricerca di anticorpi anti *T. equi* è stato effettuato utilizzando le metodiche di fissazione del complemento (8) e immunofluorescenza indiretta (11, 12).

Culture *in vitro*

Il sangue di tutti gli animali è stato messo in coltura. I campioni sono stati lavati tre volte mediante diluizione in tampone fosfato (PBS, pH 7.2) e centrifugazione (800 g per 10 minuti).

Il medium completo utilizzato per la stabilizzazione e il mantenimento delle colture è stato preparato secondo quanto descritto da Holman *et al.* (10), sostituendo la gentamicina con l'Antibiotic antimycotic solution stabilised (Sigma, St. Louis, Missouri) ed eliminando l'AlbuMAX I.

Il supporto cellulare (globuli rossi non infetti) per le colture è stato ottenuto da un cavallo donatore risultato negativo alle prove sierologiche e microscopiche. I globuli rossi sono stati preparati così come indicato da Holman *et al.* (10).

Le colture di eritrociti sono state allestite in piastre per tessuto colture a 24 pozzetti ed incubate a 37°C in ambiente microaerofilo (3% O₂, 5% CO₂, 92% N₂), rimuovendo quotidianamente il terreno di coltura

e sostituendolo con terreno fresco precedentemente riscaldato a 37°C per 30 minuti (10).

La crescita dei parassiti e lo stato dei globuli rossi sono stati controllati a giorni alterni mediante esame microscopico, per un arco di tempo massimo di 55 giorni dall'inizio della coltura.

In base al livello di parassitemia e/o al grado di sofferenza dei globuli rossi sono state effettuate subcolture (10). Per valutare la possibilità di congelamento, stoccaggio e conservazione, un ceppo isolato ed adattato *in vitro* per più di 10 subcolture è stato congelato in azoto liquido impiegando come criopreservanti il Polivinilpirrolidone (PVP, Sigma) o il Dimetilsolfossido (DMSO, Sigma) al 10%, in accordo con quanto descritto da Palmer *et al.* (14). Per controllare la vitalità, dopo 30 giorni il contenuto di sei fiale di sangue infetto, tre congelate con PVP e tre con DMSO, è stato scongelato rapidamente ed è stato lavato due volte mediante

diluizione in PBS e centrifugazione (800 g per 10 minuti). Il sedimento ottenuto dalle fiale con lo stesso criopreservante è stato unito e risospeso in PBS. I due pools così formati sono stati quindi distribuiti nei pozzetti di una piastra per colture cellulari e successivamente trattati come nella fase precedente.

Risultati

Tests diagnostici sugli animali

In Tabella I sono riportati gli esiti dei campioni ematici di cavallo e di mulo esaminati microscopicamente e sierologicamente per *T. equi* prima dell'allestimento delle colture. In base ai dati anamnestici ed ai risultati delle analisi di laboratorio, gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi: nel gruppo "infezione recente" (gruppo 1) sono stati riuniti quegli animali che a quadri clinici evidenti, ovvero anemia, ittero ed emoglobinuria, associavano l'esame microscopico positivo e quello

Tabella I

Esito degli esami parassitologici e sierologici per *T. equi* su cavalli e muli

Gruppo	Anamnesi	Id. animale	Specie	Esame microscopico	Esame sierologico	Esito TC	Totale animali
1	Infezione recente	1	Cavallo	+	-	+	4
		2	Cavallo	+	-	+	
		3	Mulo	+	-	+	
		4	Mulo	+	-	-	
2	Infezione remota	5	Cavallo	-	+	+	4
		6	Cavallo	-	+	+	
		7	Cavallo	-	+	-	
		8	Cavallo	-	+	-	
3	Infezione remota trattata	9	Cavallo	-	-	+	4
		10	Cavallo	-	-	+	
		11	Cavallo	-	-	+	
		12	Cavallo	-	-	+	
4	Muta	13	Cavallo	+	+	+	2
		14	Cavallo	-	+	-	

TC colture di globuli rossi di cavallo

sierologico negativo; nel gruppo “infezione remota” (gruppo 2) sono stati inclusi animali clinicamente sani con esame microscopico negativo e sierologico positivo. Il terzo gruppo, “animali trattati” (gruppo 3), era formato da animali sani sottoposti in passato a trattamento anti-theileria e nei quali entrambi gli esami di laboratorio davano esito negativo. Nel quarto ed ultimo gruppo (gruppo 4) sono stati compresi 2 soggetti con anamnesi muta: di questi, uno risultava positivo a tutti i test diagnostici, mentre l’altro era negativo all’esame microscopico e positivo ai test sierologici.

Crescita *in vitro*

In 10 dei 14 campioni messi in coltura si è evidenziata la crescita e l’adattamento di *T. equi*. Tre ceppi si sono sviluppati dal sangue dei cavalli e di uno dei due muli del gruppo 1; colture positive si sono avute da due dei cavalli del gruppo 2, da tutti quelli appartenenti al gruppo 3 e dal cavallo del gruppo 4 con anamnesi muta e positivo a tutti i test di laboratorio (Tabella 1).

Prima di stabilizzarsi, tutti i ceppi isolati hanno evidenziato un periodo di quiescenza di due – quattro settimane. Nelle colture ottenute a partire da eritrociti dei due cavalli con infezione recente, il primo riscontro di crescita si è avuto dopo un

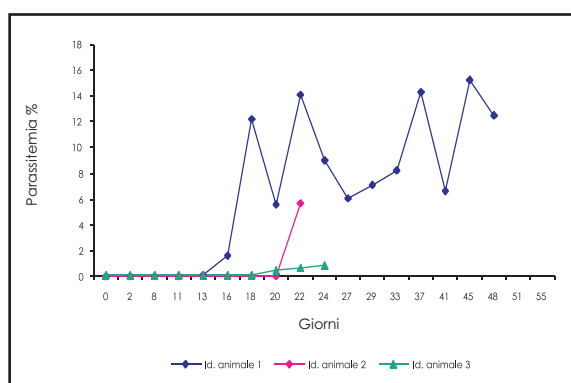


Figura 1
Crescita ed adattamento dei ceppi di *T. equi* isolati dal gruppo di animali con infezione recente nelle colture di globuli rossi di cavallo

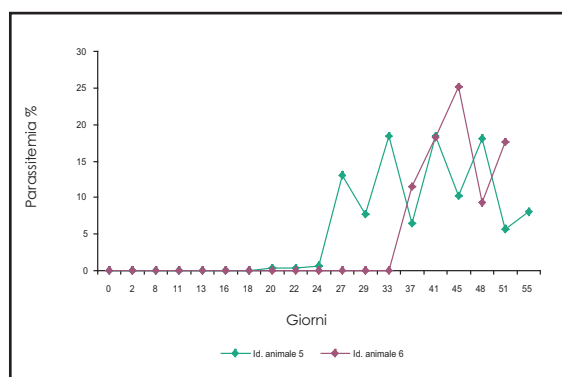


Figura 2
Crescita ed adattamento dei ceppi di *T. equi* isolati dal gruppo animali con infezione remota nelle colture di globuli rossi di cavallo

giorno e l’adattamento dopo 16 e 22 giorni. Il ceppo isolato dal mulo si è adattato dopo 20 giorni (Fig. 1). Quelli isolati da animali del gruppo 2 hanno dato il primo riscontro di crescita dopo dieci giorni dall’inizio delle colture e si sono stabilizzati dopo 27 e 37 giorni (Fig. 2). In tutte le colture degli eritrociti provenienti da animali trattati si è riscontrata crescita ed adattamento di *T. equi* dopo 11-37 giorni dall’inizio della coltura (Fig. 3). Dal cavallo con anamnesi muta, *T. equi* si è evidenziata dopo 8 giorni e il ceppo si è adattato

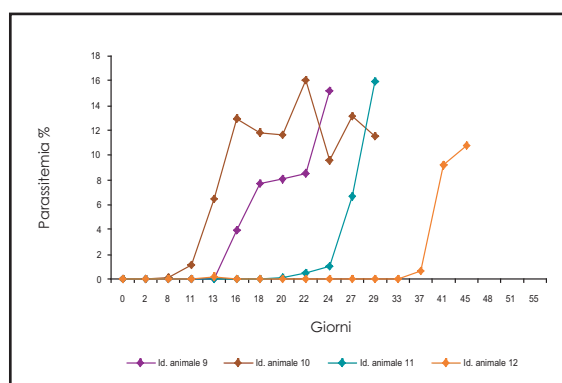


Figura 3
Crescita ed adattamento dei ceppi di *T. equi* isolati dal gruppo animali con infezione remota e trattata nelle colture di globuli rossi di cavallo

dopo 41 giorni (Fig. 4). A parte quello isolato dal mulo, tutti i ceppi di *T. equi* adattati hanno avuto picchi di parassitemia superiori al 10 % (Figg. 1-2-3-4).

Il ceppo congelato con PVP o DMSO si è riadattato in coltura dopo un periodo di quiescenza di 8 giorni, raggiungendo percentuali di parassitemia comprese tra il 10% e il 12% dopo 12 giorni (Fig. 5).

Discussione

La piroplasmosi equina può manifestarsi in forma iperacuta, acuta, subacuta e cronica. Le prime due sono caratterizzate da un quadro clinico grave, talvolta mortale, mentre le forme subacuta e cronica si presentano, di norma, in forma subdola e spesso inapparente. A questi casi subdoli ed alla conseguente formazione di permanenti serbatoi di infezione è legata la vasta diffusione della malattia nel mondo. L'Italia non sembra discostarsi da quanto osservato in altri Paesi: le poche indagini a carattere nazionale effettuate negli anni passati hanno infatti rilevato titoli anticorpali nei confronti di *T. equi* e/o *Babesia caballi* in quasi un terzo dei cavalli esaminati, con titoli da imputare per la quasi totalità alla prima che, delle due, è l'infezione

più grave (3, 17, 20). Ciononostante, ad una così elevata percentuale di animali infetti non fa seguito, in campo, un adeguato riscontro di segnalazioni cliniche. È logico pertanto supporre che in numerose aree del nostro Paese l'infezione da *T. equi* abbia un andamento endemico che, se da un lato protegge il cavallo dalle manifestazioni cliniche proprie della theileriosi equina, dall'altro non impedisce all'animale di infettarsi e diventarne serbatoio. Una situazione epidemiologica di questo tipo implica notevoli disagi soprattutto per l'allevamento sportivo: numerosi Paesi ancora oggi richiedono, per l'importazione, un certificato che dichiari la negatività sierologica per piroplasmosi equina, facendo di queste infezioni una delle maggiori cause d'impedimento alla movimentazione di cavalli. In un contesto simile, dove la forma più frequente di piroplasmosi equina è quella subclinica causata da *T. equi*, è facile intuire l'importanza di un corretto approccio diagnostico. Mentre nelle forme acute il sospetto clinico è facilmente confermato in laboratorio dalla evidenziazione del parassita nello striscio di sangue colorato con Giemsa, nelle forme subacute e/o croniche, all'assenza di sospetti diagnostici si abbinano frequentemente dati di laboratorio di

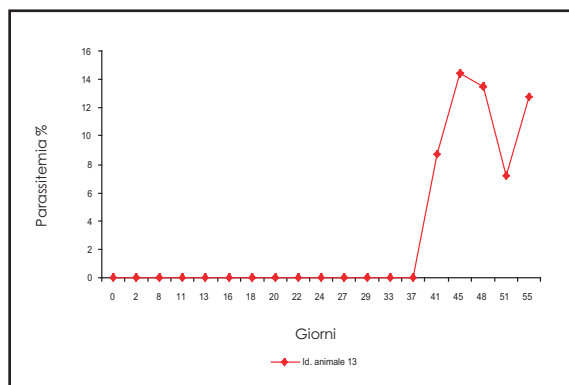


Figura 4
Crescita ed adattamento dei ceppi di *T. equi* isolati dal gruppo animali con anamnesi muta nelle colture di globuli rossi di cavallo

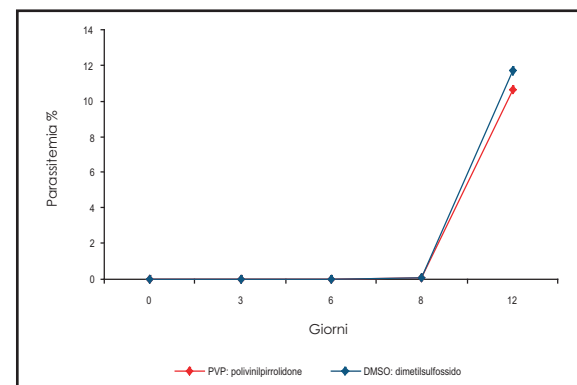


Figura 5
Crescita ed adattamento del ceppo di *T. equi* nelle colture di globuli rossi di cavallo dopo conservazione in azoto liquido

non facile interpretazione che rendono la diagnosi e/o la conferma complessa se non impossibile. Non di rado, in queste forme sia gli esami microscopici sia quelli sierologici sono caratterizzati da esito negativo, in particolare se si ha a che fare con animali trattati.

Uno degli obiettivi di questo lavoro era quello di adattare e valutare, nel contesto italiano, la tecnica per la stabilizzazione e il mantenimento delle colture di globuli rossi sviluppata da Holman (10) e modificata in alcuni componenti. Le colture eritrocitarie impiegate per isolare ceppi di *T. equi* ed identificare cavalli serbatoio d'infezione hanno dato, in situazioni facilmente diagnosticabili come infezioni recenti e/o croniche, risultati conformi a quelli ottenuti con i tradizionali metodi di laboratorio. Il dato più importante è l'aver consentito di rilevare animali infetti laddove gli esami microscopici e sierologici avevano dato esito negativo. In uno scenario epidemiologico come quello italiano, dove le forme subdole sono quelle più frequentemente riscontrate, l'impiego delle colture eritrocitarie nella theileriosi equina potrebbe pertanto costituire un supporto di notevole importanza diagnostica e non solo. La crescita di ceppi in coltura, infatti, oltre a dimostrare la presenza del parassita in un animale, è in grado di provarne la vitalità, proprietà questa che altri metodi diretti, magari più sensibili come la PCR, non possiedono. L'isolamento di un ceppo consente quindi, a differenza di qualsiasi altra prova diagnostica, di individuare con sicurezza gli animali serbatoio, dato fondamentale per controllare il diffondersi dell'infezione.

Oltre al suo peculiare andamento endemico, una delle principali cause della cospicua presenza di animali serbatoio di theileriosi è legata al fatto che, a tutt'oggi, non esiste ancora un trattamento terapeutico in grado di sterilizzare un animale infetto. La tecnica di coltura *in vitro* di globuli rossi di cavallo utilizzata in questo studio è stata

in grado di isolare *T. equi* anche dagli animali trattati. Questa capacità, oltre che confermare la difficoltà di sterilizzare il cavallo, potrebbe suggerire un suo possibile impiego nel controllare l'efficacia del trattamento.

Theileria equi è un protozoo in grado di infettare anche gli asini ed i muli. Le informazioni riguardo questi animali non sono molte e, a quanto ci risulta, è la prima volta che un ceppo di *T. equi* isolato da un mulo è stato adattato su colture eritrocitarie. Le percentuali di parassitemia più basse rispetto ai ceppi isolati dai cavalli, potrebbero dipendere dal fatto che la tecnica usata non impiegava globuli rossi di mulo.

In conclusione, il metodo utilizzato in questo studio si è mostrato efficace per coltivare e replicare *in vitro* ceppi selvaggi di *T. equi* provenienti da cavallo e mulo. Evidenziando parassiti in campioni negativi sia all'esame microscopico sia a quelli sierologici, tale metodo si è dimostrato capace di identificare soggetti portatori di infezione e di verificare l'efficacia di un trattamento. Esso può rappresentare inoltre un importante ausilio diagnostico da affiancare ai metodi di routine. La possibilità di coltivare ceppi di *Theileria equi in vitro* permette anche di preparare reagenti per test diagnostici senza l'uso di animali da esperimento (9) ed offre la possibilità di isolare e studiare in modo più approfondito ceppi nazionali di *T. equi* confrontandoli con quelli provenienti da altri paesi.

Bibliografia

1. Bose R., Jorgensen W.K., Dalgliesh R.J., Friedhoff K.T. & De Vos A.J. 1995. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet Parasitol*, **57**, 61-74.
2. Bruning A. 1996. Equine piroplasmiasis an update on diagnosis treatment and prevention. *Br Vet J*, **152**, 139-151.

3. Ceci L., Carelli G., Sasanelli M., Semproni G. & Rotolo P. 1994. Babesiosi equina: andamento stagionale dei parametri clinici, ematologici e sierologici. *Atti SIS Vet*, **48**, 1347-1351.
4. De Wall D.T. 1992. Equine piroplasmiasis: a review. *Br Vet J*, **148**, 6-14.
5. De Wall D.T. & Potgieter F.T. 1987. The transtadial transmission of *Babesia caballi* by *Rhipicephalus evertsi evertsi*. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**, 655-656.
6. Friedhoff K.T. 1988. Transmission of *Babesia*. In *Babesiosis of domestic animals and man* (M. Ristic, ed.). CRC Press, Florida, 23-52.
7. Giardina S. & Garcia F. 1990. Hemoparasitos: biologia y diagnostico. Manual de laboratorio. Coleccion cuadernos USB. *Serie biologia*, **1**, 123-124.
8. Holbrook A., Frerichs W.M. & Allen P.C. 1972. Laboratory diagnosis of equine piroplasmiasis. In *Proc. 3rd International Conference on equine infectious disease*, Paris, Vol. 3, 467.
9. Holman P.J., Frerichs W.M., Chieves L. & Wagner G.G. 1992. Culture confirmation of the carrier status of *Babesia caballi* infected horses. *J Clin Microbiol*, **31**, 698-701.
10. Holman P.J., Chieves L., Frerichs W.M., Olson D. & Wagner G.G. 1994. *Babesia equi* erythrocytic stage continuously cultured in an enriched medium. *J. Parasitol.*, **80**, 232-236.
11. Madden P.A. & Holbrook A.A. 1968. Equine piroplasmiasis: indirect fluorescent antibody test for *Babesia caballi*. *Am J Vet Res*, **29**, 117-123.
12. Morzaria S.P., Brocklesby D.W. & Harradine D.L. 1977. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for *Babesia major* and *Theileria mutans* in Britain. *Vet Rec*, **100**, 484-487.
13. Office International des Épizooties (OIE) 2004. Equine piroplasmiasis, Chapter 2.5.6. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th Ed. OIE, Paris, 698-706.
14. Palmer D.A., Buening G.M. & Carson C.A. 1982. Cryopreservation of *Babesia bovis* for *in vitro* cultivation. *Parasitology*, **84**, 567-572.
15. Poli G. & Cocilovo A. 1996. Microbiologia e immunologia veterinaria. *UTET*, 157-161, 202-205, 657-658, 730-733.
16. Posnett E.S, Fehrson J., De Waal D.T. & Ambrosio R.E. 1991. Detection of *B. equi* in infected horses and carrier animals using DNA probes. *Vet Parasitol*, **39**, 19-32.
17. Savini G., Battistini M.L., Scaramozzino P., Tittarelli M. & Molteni C. 1997. Le babesiosi equine. La situazione italiana. *SUMMA*, **14**, 35-40.
18. Schein E. 1988. Equine babesiosis. In *Babesiosis of domestic animals and man* (M. Ristic (ed.)). CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, 207-208.
19. Schein E., Rehbein G., Voigt W.P. & Zweggarth E. 1981. *Babesia equi* (Laveran 1901). 1: Development in horses and in lymphocyte culture. *Tropenmed Parasitol*, **32**, 223-227.
20. Semproni G., Turilli C. & Toraldo B. 1987. Indagine sierologica nei confronti di *B. equi* e *B. caballi* in cavalli di alcune regioni italiane. *Atti SISVet*, **41**, 1138.
21. Zweggarth E., Just M.C. & De Waal D.T. 1997. *In vitro* cultivation of *Babesia equi*: detection of carrier animals and isolation of parasites. *Onderstepoort J Vet Res*, **64**, 51-56.