

P-1.1 METODOLOGIE INNOVATIVE PER LA DIAGNOSI DI PROZOI EMATICI [S. GABRIELLI]

Borsista FILAS: Giovanni Luigi MILARDI, Laurea in Scienze Biologiche.

Data di attivazione della borsa di studio (6 mesi): maggio 2016.

Obiettivo generale: Riduzione del rischio di trasfusione di protozoi ematici (Apicomplexa)

Obiettivi specifici: 1: Sviluppo di protocolli RT-PCR multiplex per la diagnosi rapida e quantitativa di Apicomplexa ematici. Obiettivo specifico 2: Sviluppo di un test immunocromatografico per la diagnosi di *Babesia divergens* nell'uomo.

La trasmissione di patogeni attraverso il trapianto di organi e la trasfusione di emocomponenti rappresenta una delle principali complicanze correlate a tali pratiche ospedaliere. In Italia la legislazione attuale (DMS 2.11.2015)(GU Serie Generale n.300 del 28-12-2015 - Suppl. Ordinario n. 69) prevede lo screening obbligatorio prima della donazione limitato solo ad alcuni patogeni, oppure controlli ad hoc se in anamnesi sono riportati fattori di rischio (viaggi in aree endemiche, patologie etc.). Tuttavia, la possibilità di trasmissione esiste per tutti i parassiti che possono essere presenti nel sangue/organo del donatore durante una fase asintomatica d'infezione, se tali patogeni possono sopravvivere ai processi di preparazione e conservazione degli emoderivati/organi e, soprattutto, se la specie è in grado di riprodursi anche nel nuovo ospite determinando infezione e malattia. I protozoi ematici dei generi Plasmodium, Babesia e Toxoplasma appartenenti al Phylum degli Apicomplexa soddisfano questi criteri e in letteratura sono riportati numerosi casi di trasmissione di questi patogeni attraverso trasfusione o trapianti (Smith & Wright-Kanuth. Clin Lab Sci. 2003;16(4):239-45). Scopo di questa linea di intervento è quello di sviluppare tools diagnostici innovati, rapidi, specifici e altamente sensibili che permettano di rilevare questi protozoi in tempi rapidi e anche in casi di basse parassitemie perché altamente sensibili. Infatti, il saggio in RT-PCR proposto in questo progetto, potrebbe consentire la diagnosi simultanea dei tre parassiti nello stesso campione di sangue, con un notevole risparmio economico e di tempo, parametro fondamentale nello screening degli emocomponenti (le sacche di sangue devono essere congelate entro poche ore dal prelievo). Nel caso del test ICT per *B. divergens*, questo si potrebbe proporre come il primo dispositivo diagnostico validato in Italia in grado di riconoscere antigeni di Babesia specie-specifici. Attualmente la diagnosi di questo parassita può essere effettuata mediante microscopia, metodica molto economica, poco sensibile nel caso di basse parassitemie, che richiede un personale esperto e necessita di una appropriata strumentazione, oppure mediante PCR, con notevoli costi dei reagenti, della strumentazione, personale molto esperto e tempi più lunghi di risposta. Il commercio offre solo test IFI di uso veterinario che valutano la risposta immunitaria nei confronti di specie di Babesia circolanti tra gli animali, mentre non esiste nessun test sierologico che permetta la ricerca di anticorpi verso *B. divergens* che è la specie maggiormente riscontrata nell'uomo di Europa (Homer MJ, Persing DH. Human babesiosis. In: Goodman JL, Dennis DT, Sonenshine DE, editors. Tick-borne diseases of humans. Washington: ASM Press; 2005. p. 343-60).

Risultati del I anno di ricerca nell'ambito del progetto:

Obiettivo 1: Durante questo primo anno è stato definito lo schema operativo di questa linea di intervento che prevedeva l'arruolamento di una popolazione di donatori afferenti UOC di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, ai quale prelevare una campione di sangue intero. Dal momento che il progetto coinvolgeva una popolazione di pazienti è stato inoltrato il protocollo di studio al Comitato Etico del Policlinico Umberto per la sua approvazione. Sono stati arruolati 234 donatori italiani e stranieri, purché residenti in Italia da più di 6 anni. Nella popolazione sono stati inclusi anche donatori che avevano viaggiato in aree endemiche per malaria, ammessi alla donazione dopo 6 mesi dal rientro. Sono stati inoltre reperiti campioni positivi delle 3 specie (coltura in vitro per Babesia, sangue microscopicamente positivo per Plasmodium e feci di gatto microscopicamente positive per oocisti di Toxoplasma) da utilizzare come controlli nella messa a punto del protocollo. E' stato estratto il DNA dal sangue intero di 72/234 donatori ed è stato amplificato mediante protocolli di PCR precedentemente standardizzati per le 3 specie di parassiti, così da selezionare una sotto-popolazione di pazienti positivi sui quali effettuare la messa a punto del protocollo. Tra questi sono risultati positivi solo 7 campioni per Toxoplasma gondii, mentre nessun 31

campione è risultato positivo per Plasmodium e Babesia. Basandoci sulla letteratura abbiamo quindi scelto il target da amplificare ovvero una porzione del 18S rRNA (circa 1000 bp) che è ampiamente utilizzato per la diagnosi di questi parassiti sia in PCR convenzionale che in PCR quantitativa (Herwaldt et al., 2003. Emerg Infect Dis.;9(8):942-8.). Abbiamo quindi disegnato dei primers interni in alcune porzioni comuni ai 3 parassiti così da amplificare frammenti tra 120 e 250bp e li abbiamo testati prima in PCR convenzionale (per stabilire la giusta Temperatura di annealing) e poi in PCR RT tipo SYBR (GoTaq qPCR Master Mix -Promega). I risultati ottenuti sono stati in parte soddisfacenti perché sia i controlli positivi che i donatori precedentemente analizzati sono risultati positivi e gli ampliconi sono stati correttamente sequenziati, ma il saggio è risultato poco specifico in quanto sono stati amplificati anche campioni di sangue nei quali non erano presenti i 3 parassiti e un campione di DNA estratto da feci umane.

Obiettivo 2: In una precedente ricerca, è stato sviluppato un test WB per la diagnosi di *Babesia divergens* basato su due antigeni metabolici (di 33 e 37KDa), che mostravano una elevata specificità e una buona sensibilità (Gabrielli et al., 2012. Vector Borne Zoonotic Dis.;12(2):106-10). In questo primo anno è stata valutata la sensibilità e la specificità di ogni singolo antigene testando in WB, oltre a sieri controllo di gerbilli e vitelli infettati sperimentalmente, sieri di bovini affetti da specie affine a *B.divergens* e di pazienti potenzialmente esposti al parassita per la loro attività professionale (allevatori N=80). L'antigene di 37KDa ha mostrato una specificità maggiore perché è risultato positivo solo nei sieri dei controlli positivi mentre quello di 33KDa anche in alcuni sieri positivi a *B. bovis*. E' risultato anche molto sensibile perché ha reagito nel caso di due sieri di allevatori, che riportavano in anamnesi un morso da zecca e quindi probabilmente positivi. Quindi l'antigene di 37KDa si è dimostrato il più idoneo per la diagnosi di *B.divergens* e sarà quindi utilizzato per il kit immunocromatografico.

Attività previste per il II anno del progetto:

Obiettivo 1: Data la bassa specificità mostrata dal saggio sperimentato finora, sarà allestito un protocollo di PCR Real Time TaqMan in grado di amplificare contemporaneamente 3 target diversi specifici per ogni parassita in esame. Quindi sarà prima effettuata una ricerca bibliografica così da selezionare i protocolli più idonei (con alta sensibilità e specificità) e poi saranno disegnate le sonde e saranno effettuate le prove del protocollo sui campioni controllo e sui donatori. Questo obiettivo sarà perseguito con l'ausilio della GeneSig, altamente specializzata nella realizzazione di Kit diagnostici in RT PCR, che potrebbe anche effettuare la validazione finale del kit.

Obiettivo 2: Si cercherà di intraprendere una collaborazione con una ditta specializzata in produzione di dispositivi diagnostici così da trasferire i risultati ottenuti e sperimentare, insieme ai proponenti del progetto, un kit immunocromatografico basato sull'antigene di 37KDa.