

P2.3 - QUANTIFICAZIONE MOLECOLARE DEL SERBATOIO INFETTIVO PER LA TRASMISSIONE DELLA MALARIA DALL'UOMO AL VETTORE TRAMITE REAL TIME QPCR [D. MODIANO]

Borsista FILAS: da reclutare entro marzo 2017.

L'agente eziologico della malaria umana *Plasmodium falciparum* è responsabile di più di 200 milioni di casi clinici e 400000 decessi ogni anno soltanto nelle regioni Africane (WHO, 2015). La presenza dello stadio di gametocita di *P. falciparum* nel sangue periferico è fondamentale per la trasmissione della malaria dall'uomo alla zanzara.

L'identificazione e la quantificazione del parassita malarico nel sangue periferico vengono comunemente effettuate mediante ricerca microscopica diretta, una metodica economica e al tempo stesso molto valida per la diagnosi di routine. Per quantificare il serbatoio gametocitico umano, al fine di valutare il rischio di trasmissione della malaria dall'uomo al vettore, la microscopia diretta si è rivelata non essere uno strumento altrettanto efficace; studi recenti hanno infatti dimostrato che il limite di sensibilità della microscopia (LOD ≥ 4 parassiti/ μ l) è inferiore alla densità minima richiesta per l'infezione della zanzara, cioè 1 gametocita/ μ l.

Un altro aspetto fondamentale per valutare il rischio di trasmissione della malaria è la quantificazione differenziale dei gametociti femminili e maschili per la determinazione della sex-ratio, un parametro importante per il completamento del ciclo del parassita all'interno del vettore.

Obiettivo del progetto è quello di sviluppare saggi in Real Time PCR (SybrGreen) innovativi, economici e più sensibili rispetto al microscopio, per la quantificazione totale e differenziale (rapporto maschi/femmine) del serbatoio gametocitico nell'ospite umano.

Materiale e Metodi

I campioni di sangue intero (N=500) utilizzati nell'ambito di questo progetto sono stati raccolti nel 2013 a Soumouso, un villaggio rurale del Burkina Faso. L'estrazione dell'RNA è stata eseguita nel laboratorio di Biologia Molecolare della Sezione di Parassitologia del Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, utilizzando il TRIzol® Reagents (Ambion) secondo il protocollo di estrazione manuale fornito dal Kit.

I marcatori gametocita specifici, utilizzati nelle Real Time PCR (SybrGreen) sono stati scelti sulla base dei risultati di studi di trascrittomico e proteomico presenti in letteratura: Pfs25 (ookinete surface antigen precursor) e GK (glycerol kinase), espressi prevalentemente nei gametociti femminili, e P230p (6-cysteine protein) e Pf13 (meiosis-specific nuclear structural protein 1), espressi prevalentemente in quelli maschili (Schneider et al. 2015; Lasonder et al. 2016). I saggi Real Time SybrGreen disegnati per i quattro marcatori sono stati testati su un sottocampione di 50 persone.

Uno dei punti di forza dei saggi da noi sviluppati consiste nell'utilizzo di un gene endogeno per normalizzare i risultati ottenuti per i diversi marcatori, in maniera tale da prendere in considerazione la variabilità (qualità/quantità) delle diverse preparazioni di RNA, associata all'estrazione manuale. Il gene endogeno selezionato (18S umano) è stato scelto dopo aver testato, su un sottocampione di 20 individui, una serie di candidati presenti in letteratura.

Risultati

Il confronto tra i risultati ottenuti con i saggi molecolari da noi sviluppati e le letture microscopiche ha rivelato, per tutti i marcatori analizzati, una maggiore sensibilità rispetto al microscopio. Dal punto di vista quantitativo la normalizzazione con il gene endogeno umano 18S ha migliorato la correlazione tra la densità gametocitica stimata al microscopio e quella in Real Time PCR (coefficiente di correlazione 0,13 vs 0,42).

La quantificazione del trascritto pfs25 è stata effettuata sul campione totale (N=500) in Real Time con un saggio Taqman (Schneider e collaboratori, 2015) e il confronto dei risultati ottenuti per lo stesso marcatore (pfs25), sul sottocampione di 50 individui, ha messo in evidenza una maggiore sensibilità del saggio in SybrGreen da noi messo a punto rispetto al saggio Taqman (limite di quantificazione 10 copie/ μ l vs 100copie/ μ l). Il saggio in SybrGreen sviluppato per il marcatore GK sembra essere una valida alternativa a quelli su pfs25 (Taqman e SybrGreen) per la quantificazione dei gametociti femminili (limite di

quantificazione 10copie/ μ l). Per quanto riguarda la quantificazione della componente di gametociti maschili stiamo lavorando sul marcatore Pf13 e già dai primi risultati ottenuti su colture separate di gametociti maschili e femminili sembrerebbe essere più promettente (Ct maschi vs femmine: 29; 33) rispetto a pfs230p (Ct maschi vs femmine: 28; 29).

Il prossimo obiettivo è quello di continuare a lavorare su colture separate di gametociti maschili e femminili di *P. falciparum* per convertire il numero di copie trascritto/ μ l in numero di gametociti / μ l e definire il rapporto maschi/femmine.

I saggi sviluppati potranno essere ottimizzati in collaborazione con aziende che operano nel campo delle biotecnologie per permetterne la commercializzazione e quindi l'utilizzo su larga scala.