

MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO PER STUDIARE LA COCCIDIOSI AVIARIA *IN VITRO*

Tugnoli B.¹, Sangiovanni M.², Ghiselli F.², Felici M.², Fiorentini L.³, Parigi M.³, Tosi G.³, Piva A.^{1,2}, Grilli E.^{2,4}, Massi P.³

¹ *Vetagro S.p.A., Via Porro, 2 – 42124 – Reggio Emilia (Italy)*

² *DIMEVET, Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 – 40064 – Ozzano dell'Emilia (BO), Italy*

³ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Forlì, Forlì (FC), Italy*

⁴ *Vetagro, Inc., 116 W. Jackson Blvd Suite #320, 60604 Chicago (IL), USA*

Summary

Coccidiosis is one of the most common parasitic disease of poultry worldwide, caused by protozoa belonging to the genus *Eimeria*, that damage the host's intestinal mucosa, leading to loss of production, zootechnical performance decrease and also mortality.

Aim of this study was to set up a method to recover multi-species *Eimeria* oocysts from field samples and to reproduce the parasitic infestation *in vitro* on a cell model.

Starting from field samples (feces, litters, and intestinal contents) a multi-step protocol has been developed for the collection of multi-species *Eimeria* oocysts, sporulation, recovery of sporozoites, and set-up of *in vitro* infestations using Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) cells, known to be receptive to *Eimeria*. Real Time PCR was used to identify *Eimeria* species in the initial oocysts samples, to verify sporozoites collection, and to detect MDBK cells infestation. In conclusion, the elaborated method allowed to recover several species of *Eimeria* from field samples and to reproduce *in vitro* infestation on a cell model. As future applications, this protocol can be exploited to perform *in vitro* screening tests to select bioactive substances with anticoccidial properties.

INTRODUZIONE

La coccidiosi è una delle più comuni ed economicamente più importanti patologie del settore avicolo, causata da protozoi appartenenti al genere *Eimeria*. Tale patologia intestinale è caratterizzata da una forte riduzione delle performance di crescita degli animali con un impatto economico stimato in 2.5-3 miliardi di dollari di perdite ogni anno. Inoltre, il danno alla mucosa intestinale causato da *Eimeria* spp è considerato il principale fattore predisponente dell'enterite necrotica causata da *C. perfringens*, largamente ritenuta una delle principali minacce per l'industria avicola globale (Quiroz-Castaneda & Dantan-Gonzalez, 2015; Timbermont et al., 2011).

Una corretta gestione dell'allevamento è fondamentale per il controllo della patologia, ma data la sua frequenza e la sua diffusione sono necessari una prevenzione ed un controllo di tipo farmacologico. Tali trattamenti prevedono l'utilizzo, sotto regolamentazione, di farmaci anticoccidici (coccidiostatici), solitamente alternati a programmi di vaccinazione nei periodi estivi (Quiroz-

Castaneda & Dantan-Gonzalez, 2015).

In particolare in Europa, l'intento è quello di cessare gradualmente l'utilizzo di coccidiostatici, per cui è di grande interesse lo sviluppo di prodotti alternativi da introdurre anche attraverso la dieta dell'animale. Lo studio della coccidiosi si basa principalmente su studi *in vivo* con animali sottoposti a challenge con *Eimeria*, mentre gli studi *in vitro* sono pochi a causa di una difficile standardizzazione del protocollo. Inoltre, per recuperare le oocisti da cui partire per eseguire la fase *in vitro*, solitamente viene utilizzato l'animale come incubatore. Dato l'interesse nello sviluppare nuove sostanze anticoccidiche e in accordo con i principi delle "3R" (Replacement, Reduction, Refinement), secondo cui i metodi alternativi *in vitro* sono da preferire, è opportuno elaborare un metodo *in vitro* che possa permettere test di screening di molecole bioattive per valutarne le proprietà anticoccidiche.

L'obiettivo di questo studio è l'elaborazione di un protocollo di recupero di oocisti di *Eimeria* da campioni di campo e la riproduzione dell'infestazione *in vitro* su un modello cellulare.

MATERIALI E METODI

La fase sperimentale di questo studio è stata svolta presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) – sezione di Forlì e presso il Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) - servizio Produzioni Animali e Sicurezza Alimentare" (SPASA) dell'Università di Bologna.

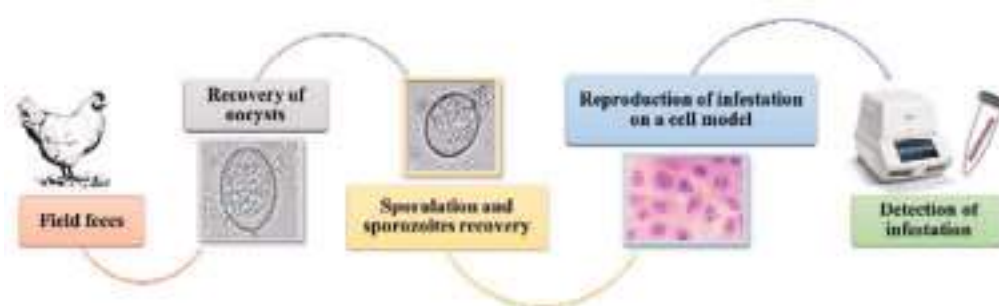


Figura 1 – Disegno sperimentale

In Figura 1 è presentato lo schema sperimentale: in breve, campioni di campo (feci, lettiere o contenuti intestinali) sono stati processati per recuperare le oocisti, su queste è stata messa a punto procedura per consentire la sporulazione e la raccolta degli sporozoi in grado di infestare le cellule di rene bovino (MDBK - Madin-Darby Bovine Kidney). Tale infestazione è stata monitorata con tecniche di biologia molecolare.

Il protocollo è stato elaborato dopo un'accurata ricerca bibliografica e, in particolare, la guida europea "*Biotechnology – Guidelines on techniques in coccidiosis research*" (Eckert et al., 1995) è stata utilizzata come riferimento in base al quale adattare i metodi.

Campionamento

Sono stati utilizzati campioni di feci, lettieri e contenuti intestinali conferiti presso l'IZSLER – sezione di Forlì nel periodo “aprile 2018-luglio 2019”, provenienti da animali con evidenti sintomi da coccidiosi.

Messa a punto del protocollo di raccolta oocisti, sporulazione e raccolta sporozoit

Il campione iniziale è stato omogenato, filtrato e lavato per allontanare i vari detriti. Le oocisti sono state recuperate aggiungendo una soluzione satura di sale che permette a queste di galleggiare sulla superficie del liquido, così da facilitarne il prelievo (flottazione). Per consentire la sporulazione, le oocisti sono state risospese in una soluzione di bicromato di K (2%) e lasciate a T ambiente (all'aria), con verifica dell'andamento della sporulazione settimanale, tramite visualizzazione e conta al microscopio con camera di Burkner delle oocisti totali e di quelle sporulate. Una volta raggiunto un livello di 70-80% di sporulazione, le oocisti sono state sterilizzate con ipoclorito di sodio poi, per il recupero degli sporozoit, è stato ricreato quanto avviene nell'apparato digerente dell'animale: prima è stata effettuata una rottura meccanica con biglie di vetro e omogeneizzatore Tissue Lyser (Qiagen) cui è seguita una digestione enzimatica utilizzando un cocktail di tripsina, sali biliari, pancreatina, MgCl₂ (excistazione). Gli sporozoit ottenuti sono stati poi utilizzati per le infestazioni delle cellule MDBK.

Prove di infestazione su cellule di rene bovino (MDBK)

Gli sporozoit ottenuti sono stati utilizzati per allestire delle infestazioni di cellule epiteliali di rene bovino (Madin-Darby Bovine Kidney - MDBK), comunemente utilizzate come cellule ospite per infestazioni da *Eimeria* (Tierney & Mulcahy, 2003). Come primo step, sono state fatte delle prove di semina delle MDBK in piastre 24-wells per individuare la concentrazione necessaria per ottenere un monostrato in semi-confluenza, adatto a ricevere l'infestazione con gli sporozoit. Inoltre, sono state fatte delle prove incubando le cellule con il medium di excistazione per verificare che eventuali residui non andassero ad alterare le cellule in termini di morfologia e proliferazione. Le MDBK sono state coltivate a 37 °C e 5% di CO₂ in un medium composto da DMEM con 1% L-glutamina, 10% FBS (siero fetale bovino), 1% penicillina (100 U/mL), 1% streptomicina (100 µg/mL) e 1% amfotericina B (0.25 µg/mL). Varie prove di infestazione sono state allestite con differenti concentrazioni sporozoit (10⁴-10⁵ per well) e diversi tempi di incubazione (24 o 48 h).

Analisi di biologia molecolare – Real Time PCR

La Real Time PCR è stata utilizzata come tecnica per identificare le specie di *Eimeria* presenti nei campioni iniziali di oocisti, per verificare la raccolta degli sporozoit dopo i passaggi di sporulazione ed excistazione e per monitorare l'infestazione delle cellule MDBK. Il DNA è stato estratto dai campioni di oocisti, sporozoit e cellule con il kit NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel) seguendo le istruzioni e, per quanto riguarda le oocisti, è stato aggiunto un pre-trattamento del campione per favorire la rottura della parete tramite shock termico. È stata utilizzata una reazione con sybr green e primers specie-specifici per la ricerca di 5 specie di *Eimeria*: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. tenella*. È

stato inoltre cercato anche il gene del citocromo B bovino (Cyt B) come controllo positivo della reazione condotta sulle cellule MDBK (Tabella 1).

Tabella 1 – Primers usati per la Real Time PCR

Specie	Gene	Sequenza primer (5'→3')	Prodotto (bp)	Accession nr.	Referenza
<i>E. acervulina</i>	ITS-1	F AACCTGACTGTGCAAGCATC R ATCATAGACAGCCGTGCCAG	166	AF026384	(Kawahara et al. 2008)
<i>E. brunetti</i>	ITS-1	F TTGCGTAAATAGAGCCCT R CATGCAGAAAACCTCCAAAAG	148	AF026383	(Kawahara et al. 2008)
<i>E. maxima</i>	ITS-1	F GTTGCGTAAATAGAGCCCTCT R ACCAATGCAGAACGCTCCAG	152	AF065094	(You 2014)
<i>E. necatrix</i>	ITS-1	F GCAGTCGTTCTTGGGTGT R TGCTCACGCCATACTAC	148	AF026385	(Kawahara et al. 2008)
<i>E. tenella</i>	ITS-1	F TGGAGGGGATTATGAGAGGA R CAAGCAGCATGTAACGGAGA	147	AF026388	(Kawahara et al. 2008)
<i>Bos Taurus</i>	Cyt B	F CGGAGTAATCCTTCTGCTCACAGT R GGATTGCTGATAAGAGGTTGGTG	116	D34635	(Dooley et al. 2004)

In breve, la reazione è stata allestita sul sistema CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad) in un volume finale di 10 µL (contenente 5 µL di iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix, 500 nM di forward e reverse primer e 2 µL di DNA per 10 ng totali). Il ciclo di amplificazione prevedeva: denaturazione a 95 °C per 3 minuti, 40 cicli a 95°C per 10 secondi e a 60 °C per 30 secondi (annealing ed extension), seguito da una curva di Melting per escludere la presenza di prodotti aspecifici.

RISULTATI

Messa a punto del protocollo di raccolta oocisti, sporulazione e raccolta sporozoiti
Complessivamente sono stati processati 31 campioni: 9 campioni di feci, 17 campioni di lettiera e 5 campioni di contenuto intestinale. Tali campioni hanno presentato una grande variabilità in termini di contenuto di oocisti, tempi di sporulazione e percentuale di sporulazione. In particolare:

- Campioni di feci (tot. 9): sporulazione di 50% ± 27% in 25 ± 13 giorni
- Campioni di lettiera (tot. 17): sporulazione di 40% ± 25% in 20 ± 9 giorni
- Campioni di contenuto intestinale (tot. 5): sporulazione di 60% ± 28% in 15 ± 5 giorni

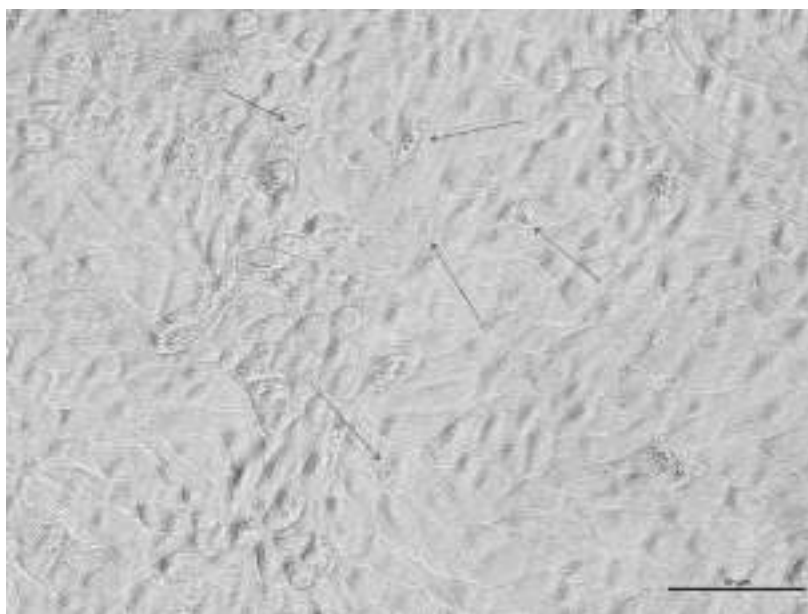
Per proseguire con i passaggi successivi, sono stati selezionati i campioni con un livello di sporulazione del 70-80%. Per permettere l'excistazione e il recupero degli sporozoiti, è stato messo a punto un doppio passaggio di rottura meccanica e

digestione enzimatica. Sono stati confrontati differenti metodi di omogeneizzazione (in termoblocco vs Tissue Lyser), differenti buffer (DPBS, H₂O distillata, buffer di lisi del kit Nucleospin), differenti biglie di vetro, differenti medium di digestione (enzimi, sali), tempi e temperature di incubazione (41°C vs 37°). Le condizioni migliori sono risultate: omogeneizzazione in H₂O distillata, con biglie di vetro (0.5 mm diametro), a T ambiente, in Tissue Lyser, seguita da digestione enzimatica a 39°C con un cocktail di tripsina, sali biliari, pancreatina e MgCl₂. In questo modo, è stato possibile ottenere sporozoi con un'efficienza del 90-95% rispetto al numero teorico calcolato.

Prove di infestazione su cellule di rene bovino (MDBK)

Le prime prove di coltura delle MDBK hanno permesso di individuare la densità di semina ottimale (10⁵ cellule/well di 24-w) per ottenere in 48 h uno monostrato al 75-80% di confluenza. Inoltre, le MDBK sono risultate tolleranti, in termini di morfologia e proliferazione, al medium di excistazione utilizzato per recuperare gli sporozoi. Le prove di infestazione hanno rivelato che gli sporozoi ottenuti come precedentemente descritto, inoculati ad una dose di 10⁵ sporozoi per well, sono stati in grado di penetrare nelle cellule MDBK come evidenziato dalla loro localizzazione intracellulare dopo 24 ore di infestazione (Figura 2).

Figura 2 – Infestazione di cellule epiteliali di rene bovino (MDBK) con sporozoi di *Eimeria* multi-specie.



Le frecce indicano gli sporozoi intracellulari dopo 24 ore di infestazione (ingrandimento 400X)

Analisi di biologia molecolare – Real Time PCR

Per validare la reazione di Real Time PCR è stata innanzitutto verificata l'efficienza di amplificazione dei primers per le varie specie di *Eimeria* e per il gene Citocromo B bovino, ottenendo dei valori soddisfacenti di 90-98%. È stato possibile estrarre con successo il DNA sia dalle oocisti (inserendo un iniziale pre-trattamento per lisare la parete), sia dagli sporozoitii, sia dalle cellule MDBK infestate. Nella maggior parte dei campioni sono state trovate *E. tenella*, *E. acervulina* ed *E. brunetti*; nelle prove di infestazione il DNA di *Eimeria* è stato trovato sia nelle oocisti iniziali, sia negli sporozoitii utilizzati come inoculo, sia nelle cellule MDBK post-infestazione indicando che la preparazione del campione di sporozoitii e l'infestazione sono avvenute con successo.

DISCUSSIONE

Questo studio si prefiggeva l'obiettivo di mettere a punto un protocollo di recupero di oocisti di *Eimeria* spp. da campioni di campo e la riproduzione dell'infestazione *in vitro* su un modello cellulare. Come riferimento è stata utilizzata la guida europea "*Biotechnology – Guidelines on techniques in coccidiosis research*", la quale si riferisce principalmente *E. tenella*, mentre tale metodo è stato adattato per più specie di *Eimeria*. Infatti, mentre i pochi studi *in vitro* sulla coccidiosi presenti in letteratura riproducono infestazioni mono-specie (soprattutto con *E. tenella* o *E. maxima*), in questo studio, partendo da un campione di campo, si è potuto riprodurre un'infestazione multi-specie, condizione appunto più simile alla realtà di campo. Per questo scopo, la Real Time PCR è stata utilizzata come tecnica di "detection" per identificare le specie di *Eimeria* nel campione iniziale di oocisti e negli sporozoitii recuperati col metodo elaborato, infine per verificare l'infestazione sul modello cellulare. Rispetto alla classica valutazione al microscopio, tale tecnica molecolare si è rivelata molto utile per poter discriminare tra le diverse specie di *Eimeria* e dare un'indicazione sulla loro capacità di infestare.

CONCLUSIONI

Nell'ottica della ricerca di strategie alternative ai farmaci coccidiostatici e nel rispetto dei principi delle "3R" inerenti al benessere animale e ad una sperimentazione animale etica, il protocollo messo a punto in questo studio potrà essere utilizzato per fare test di screening *in vitro* di molecole bioattive ad attività anticoccidica.

BIBLIOGRAFIA

1. Dooley JJ, Paine KE, Garrett SD and HM Brown (2004). Detection of Meat Species Using TaqMan Real-Time PCR Assays. *Meat Science* 68(3):431–438.
2. Eckert J, Braun R, Shirley MW and P Coudert (1995). *Biotechnology, Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research*. Luxembourg: European Commission.
3. Kawahara F, Taira K, Nagai S, Onaga H, Onuma M and T Nunoya (2008). Detection of five avian *Eimeria* species by species-specific real-time polymerase chain reaction assay. *Avian Dis.* 52(4):652-656.
4. Quiroz-Castaneda RE and E Dantan-Gonzalez. (2015). Control of Avian Coccidiosis: Future and Present Natural Alternatives. *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 430610, 11 pages.
5. Tierney J and G Mulcahy. (2003) Comparative Development of *Eimeria Tenella*

- (Apicomplexa) in Host Cells in Vitro. *Parasitology Research* 90(4): 301–304.
6. Timbermont L, Haesebrouck F, Ducatelle R and F Van Immerseel (2011). Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol.* 40(4):341-347.
 7. You MJ (2014). Detection of Four Important *Eimeria* Species by Multiplex PCR in a Single Assay. *Parasitology International* 63(3): 527–532.