



Laboratorio Europeo di Riferimento per i Parassiti

Dipartimento Malattie Infettive
Reparto Parassitosi Alimentari e Neglette

Istituto Superiore di Sanità



INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	2
2. GENERALITÀ	2
3. RIFERIMENTI	2
4. DEFINIZIONI	2
5. APPARECCHIATURE	2
6. REATTIVI	3
7. MODALITA' OPERATIVE	3
8. IMMUNOSOPPRESSIONE DEI TOPI	4
9. MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE	5

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Lo scopo della presente Procedura Operativa è quello di fornire un protocollo per l'infezione sperimentale ed il mantenimento in topo di isolati di *Trichinella* spp.

2. GENERALITÀ

Per mantenere l'isolato di *Trichinella* in vivo è necessario procedere con la soppressione degli animali infetti, il recupero delle larve dal tessuto muscolare striato e l'infezione di nuovi animali almeno una volta all'anno per ceppi adattati al topo o per ceppi isolati da animali naturalmente infetti da *T. spiralis* o *T. pseudospiralis*. Per le altre specie del genere *Trichinella* bisogna permettere al parassita di adattarsi al nuovo ospite mediante passaggi ogni 3 mesi per il primo anno, ogni 4 mesi il secondo anno, ogni sei mesi il terzo anno e una volta all'anno dal quarto anno in poi.

Le larve di *Trichinella* inoculate nel topo raggiungono la capacità infettante dopo 30-40 giorni dall'infezione, ma è opportuno aspettare almeno 60 giorni dall'inoculo per avere un più alto livello di resistenza delle larve alla digestione. Dopo tale termine gli animali possono essere sacrificati per recuperare le larve muscolari infettanti.

3. RIFERIMENTI

Reg. (UE) 2015/1375 10/08/2015 GU CE L 212/7 11/08/2015, All 1. cap. 1 e All 3

International *Trichinella* Reference Center. <http://www.iss.it/site/Trichinella/index.asp>

Pozio, E. 2007. Taxonomy, biology and epidemiology of *Trichinella* parasites. In, (Dupouy-Camet, J and Murrell, K.D. eds.), FAO/WHO/OIE Guidelines for the Surveillance, Management, Prevention and Control of Trichinellosis, Paris, pp. 1-35

4. DEFINIZIONI

Non applicabile.

5. APPARECCHIATURE

1. termometro 1-100 °C;
2. bilancia analitica;
3. microscopio stereoscopico con fonte luminosa proveniente dal basso e ad intensità regolabile (ingrandimento 15-20X);
4. frullatore o analogo sistema di triturazione del tessuto muscolare;
5. agitatore magnetico con piastra riscaldante;
6. setaccio, dimensione della maglia 180 µm, con maglie in acciaio inossidabile;
7. cilindri graduati in vetro, con capacità di 50 - 100 ml, o provette da centrifuga coniche da 50 ml;
8. beaker in vetro;
9. imbuti di separazione conici in vetro;

10. pipette di volumi diversi (1, 10 e 25 ml);
11. micropipette da 100 µl,
12. siringhe da 1ml e 2,5 ml;
13. ago da gavaggio;
14. ancoretta magnetica.

6. REATTIVI

1. Pepsina, concentrazione: 1:10.000 NF (US National Formulary), corrispondente a 1:12.500 BP (British Pharmacopoea), corrispondente a 2.000 FIP (Fédération Internationale de Pharmacie), oppure pepsina liquida stabilizzata con 660 EP (European Pharmacopoeia) unità/ml minimo;
2. Acido cloridrico 37% o 25%;

7. MODALITA' OPERATIVE

Nel caso il materiale di partenza sia costituito da tessuto muscolare infetto passare direttamente al punto c).

- a) Sopprimere i topi infetti mediante CO₂;
- b) Spellare ed eviscerare i topi;
- c) Preparare in un beaker di volume adeguato la soluzione digestiva aggiungendo nel seguente ordine: acqua di rubinetto preriscaldata a 46-48°C, acido cloridrico al 25% o al 37% e pepsina (in polvere o liquida) (per le dosi vedi Tabella 1).

Tabella 1. Dosi per soluzione digestiva.

Numero topi	Acqua	HCl 25% (37%)	Pepsina polvere (liquida)*
1	250 ml	2 ml (1,5 ml)	1,25 g (3,75 ml)
2	500 ml	4 ml (3 ml)	2,25 g (7,5 ml)
3-4	1 litro	8 ml (6 ml)	5 g (15 ml)
5-9	2 litri	16 ml (12 ml)	10 g (30 ml)
10-14	3 litri	24 ml (18 ml)	15 g (45 ml)
15-20	5 litri	40 ml (30 ml)	25 g (75 ml)

***1g di pepsina in polvere = 3ml di pepsina liquida**

- d) Sminuzzare le carcasse (incluse le ossa) o il tessuto in un frullatore aggiungendo un piccolo volume della soluzione digestiva per facilitare la triturazione dei tessuti;
- e) Versare il contenuto del frullatore nel beaker contenente la soluzione digestiva e l'ancoretta magnetica;
- f) Incubare a 44-46°C in agitazione per 30 minuti per le specie incapsulate (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. murreli*, *T. nelsoni*, *Trichinella* T6, *Trichinella* T8, *Trichinella* T9 e *Trichinella* T12), e 20 minuti per le specie non incapsulate (*T. pseudospiralis*, *T.*

- papuae* e *T. zimbabwensis*), coprendo il beaker con un foglio di alluminio per impedire la fuoriuscita del liquido;
- g) Versare il liquido di digestione attraverso il setaccio nell'imbuto di sedimentazione e lasciare depositare per 30 minuti;
 - h) Prelevare dall'imbuto 50 ml della soluzione usando un cilindro graduato od una provetta da centrifuga di volume adeguato (es. Falcon 50 ml);
 - i) Lasciare depositare le larve nel cilindro (provetta) per 10 minuti (il tempo di sedimentazione delle larve vitali è di circa 1 minuto per cm);
 - j) Aspirare 40 ml del surnatante con una pipetta (o pompa da vuoto) avendo l'accortezza di non avvicinarsi troppo al fondo del cilindro (provetta);
 - k) Aggiungere 10-40 ml di PBS a 37°C (il volume varia a seconda dalla dimensione del pellet di larve);
 - l) Se la soluzione è torbida ripetere le operazioni dal punto i) al punto k);
 - m) Per la conta delle larve, agitare la soluzione contenente le larve per sospenderle e prelevare immediatamente con una micropipetta 100 µl, contare le larve al microscopio stereoscopico su piastra Petri o su un vetrino porta oggetto. Per una maggiore accuratezza si consiglia di ripetere l'operazione di conta su tre aliquote;
 - n) Diluire o concentrare la soluzione contenente le larve fino ad ottenere una soluzione contenente 1.000 larve per ml e mantenerle a 37°C fino al momento dell'inoculo in topo; per ceppi di *Trichinella* appartenenti alle specie non incapsulate, i topi devono essere inoculati il prima possibile in quanto la vitalità delle larve decresce rapidamente; per le specie incapsulate infettare i topi entro 2-3 ore.
 - o) Il numero di larve per topo è influenzato: a) dal peso dell'animale, b) dal ceppo di topo, e c) dalla specie/genotipo di *Trichinella*. I topi devono essere inoculati per os con un ago da gavaggio di appropriate dimensioni montato su di una siringa da 1 – 2,5 ml. Somministrare non più di 0,5 ml per topo;
 - p) Per topi outbreed di almeno 20 g (per esempio Swiss CD1), inoculare una dose di 500 larve per animale. Le specie meglio adattate al topo sono *T. spiralis* e *T. pseudospiralis*. Per topi Balb/c di 20g, la dose deve essere ridotta a non più di 150 larve ed il ceppo deve essere passato ogni 6 mesi. Per altri ceppi di topo inbred o outbreed si consiglia di effettuare delle prove con dosi di 50 larve per topo. Non utilizzare topi giovani. Non utilizzare topi di sesso maschile in quanto l'aggressività li porta ad uccidersi tra loro quando stabulati per lunghi periodi di tempo.

8. IMMUNOSOPPRESSIONE DEI TOPI

Il protocollo di immunosoppressione dei topi con ciclofosfamide è richiesto per le specie a basso indice di capacità riproduttiva, come ad esempio *T. papuae*, *T. zimbabwensis* e *T. nativa*, ed in tutti quei casi in cui è richiesta una produzione di un elevato numero di larve.

Procedura: preparare la soluzione di ciclofosfamide sciogliendo 100 mg di ciclofosfamide in polvere in 5 ml di H₂O distillata. Il giorno dell'infezione con larve di *Trichinella*, inoculare ciascun topo nel peritoneo con 0,2 ml di soluzione.



Laboratorio Europeo di Riferimento per i Parassiti

*Dipartimento Malattie Infettive
Reparto Parassitosi Alimentari e Neglette*

Istituto Superiore di Sanità



9. MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE

I dispositivi individuali di protezione sono rappresentati da guanti monouso, camice e mascherina. Si raccomanda l'uso della pepsina liquida per ridurre il rischio di eventuali reazioni allergiche dovute all'inalazione di pepsina in polvere in soggetti sensibili.

Si raccomanda inoltre di preparare la soluzione di ciclofosfamide sotto cappa chimica data l'alta tossicità del reagente.