



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Malattie trasmesse da vettori: rickettsie ed altri batteri intracellulari negli animali e nell'uomo

Diagnostica e tipizzazione molecolare: estrazione del DNA, target molecolari, metodi PCR, purificazione e quantificazione DNA

Roma 7 Novembre 2017

Dr.ssa Laura Salvato

DO SIEROLOGIA IZSLT M.Aleandri

SEDE DI ROMA





Che cosa è la diagnostica molecolare

E' l'insieme delle tecniche di biologia molecolare che consentono la rilevazione, l'analisi, la manipolazione e l'amplificazione (PCR) degli acidi nucleici.

La disponibilità di una o più sequenze specifiche permette di identificare un determinato patogeno.





La diagnostica molecolare....

- ✓Alla fine degli anni 70 con l'invenzione di tecniche basate sulla ibridazione molecolare e sull'interazione antigene-anticorpo per lo studio delle proteine.
- ✓A metà degli anni ottanta è arrivata l'invenzione della PCR (**Kary Mullis**) che permette di amplificare e caratterizzare sequenze specifiche di DNA e RNA a livello nucleotidico
- ✓Nel 2001 si è completato il sequenziamento del genoma umano e grazie alla creazione delle banche dati in genomica e proteomica si sono ampliate le conoscenze della diagnostica molecolare.



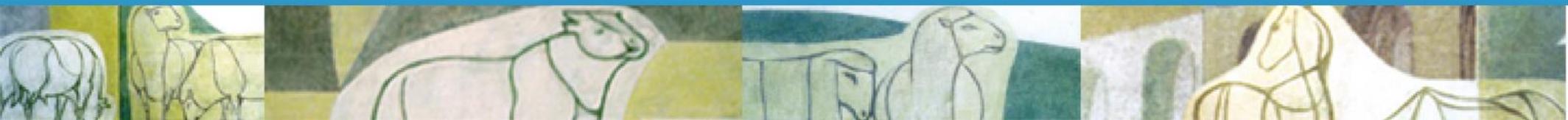


Utilizzo della diagnostica molecolare

Diagnosi di malattie ereditarie: I test genetici possono sia confermare la diagnosi clinica in un paziente affetto da una malattia ereditaria, sia identificare i portatori sani a rischio di prole affetta da una determinata patologia genetica.

Diagnosi malattie virali, batteriche e parassitarie: l'amplificazione di specifici target molecolari, mediante PCR, consente di analizzarne e caratterizzarne il genotipo specifico.

Test agroalimentari: utilizzati per la determinazione della presenza di OGM nei cibi, per l'individuazione di contaminazioni batteriche nelle sostanze alimentari.

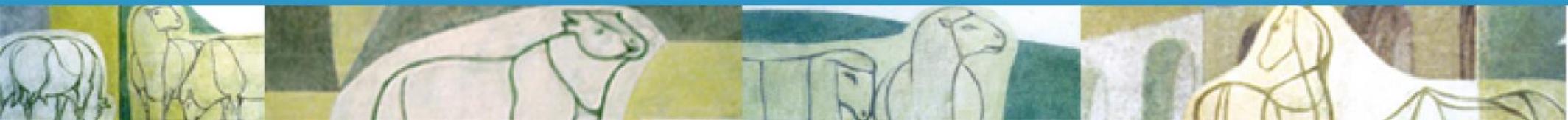




Utilizzo della diagnostica molecolare

Analisi filogenetica: è una tecnica avanzata per lo studio della storia evolutiva degli organismi viventi, basata sull'analisi della struttura del DNA e dell'RNA. Consente la costruzione di alberi filogenetici di organismi viventi con grande precisione.

Genotipizzazione: processo di definizione delle differenze nel corredo genetico di un individuo attraverso il sequenziamento del suo DNA e il confronto con sequenze di riferimento presenti nelle **banche dati** on line.





Metodi biomolecolari

PCR (end point e real time)

Sequenziamento genico

Rapidità di risposta

Sensibili

Specifici

Diagnosi diretta

Identificazione di specie





Ricerca DNA batterico di *Rickettsia spp.* e altri batteri intracellulari: matrici biologiche utilizzate.

sangue intero

buffy coat

biopsie cutanee/tamponi cutanei (escare)

organi (milza, fegato)

liquido cerebrospinale

liquido pleurico

zecche

Il metodo di estrazione da utilizzare dipende dalla matrice biologica



Estrazione dell'acido nucleico (DNA):

Lisi della cellula

Separazione

Precipitazione

Recupero dell'acido nucleico

Quantizzazione

Controllo di estrazione

Indipendentemente dalla tecnica di estrazione utilizzata, l'acido nucleico estratto deve essere “puro”, privo di sostanze inibenti.





Lisi cellulare

I metodi tradizionali di lisi si basano su trattamenti complessi che includono:

- digestione enzimatica
- tecniche meccaniche e digestione enzimatica
- solubilizzazione tramite detergente



Qualsiasi sia il metodo utilizzato e' necessario non alterare l'acido nucleico





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Metodo di estrazione enzimatico

Sangue

Buffy-coat

Midollo osseo

Ago aspirato linfonodale

Tamponi rettali

Tamponi oculari

Proteinasi K:

proteasi della famiglia delle subtilisine isolata dal fungo saprofito *Tritirachium album*: adatta per digestioni che avvengono in tempi brevi, alta e specifica attività che rimane stabile all'aumentare della temperatura e dei valori di pH e non è inibita dalla presenza dei chelanti degli ioni bivalenti come l'EDTA.

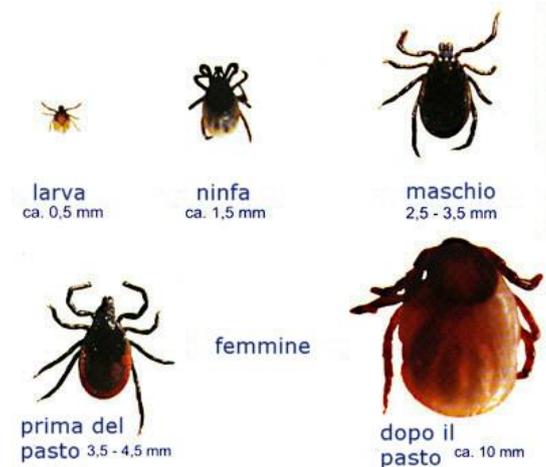


Metodo di estrazione: enzimatico/meccanico

Tessuti (intestino, milza, fegato, ecc..)

Feci

Zecche



Lysing Matrix D: biglie di silice con diametro che varia in base alla matrice da estrarre; provocano la rottura meccanica della parete cellulare

Fast Prep: omogeneizzatore che permette alle biglie di rompere la parete cellulare

Le zecche vengono lavorate: singolarmente in caso di esemplari adulti, in pool di massimo 10 esemplari se larve o ninfe



Separazione dell'acido nucleico

La separazione del DNA dai contaminanti può essere effettuata attraverso l'uso di:

- Solventi organici (fenolo-cloroformio)
- adsorbimento del DNA sulla superficie di una matrice di gel di silice in presenza di sali caotropici (ad es. ioduro di sodio – NaI); in commercio si trovano diversi kit di separazione basati su questo principio.
- Gli **agenti caotropici** sono una classe eterogenea di sostanze che, diminuendo le interazioni idrofobiche interne e riducendo contemporaneamente il numero di cluster di acqua che le circondano, destabilizzano l'organizzazione tridimensionale delle proteine

Il Kit da noi utilizzato è QIAamp DNA Mini Kit Blood (Qiagen)



Precipitazione

Per recuperare gli acidi nucleici in soluzione si utilizza:

- etanolo
- isopropanolo (per campioni che devono essere sequenziati)

L'etanolo rimuove il guscio di solvatazione e il DNA precipita perché non è più solubile



Recupero del DNA

Il recupero o eluizione del DNA avviene effettuando lavaggi con soluzioni tampone fornite dai kit che permettono il distacco dell'acido nucleico dalle colonnine di silice e la sua precipitazione sul fondo della provetta.

Differenti tipi di acido nucleico adsorbono più o meno bene alla matrice di silice, a seconda della forza ionica e del pH della soluzione. In ogni caso, l'acqua distillata o un tampone a bassa concentrazione salina sono in grado di eluire l'acido nucleico dalle particelle di silice.

Quantizzazione del DNA

La quantificazione del DNA si effettua con l'utilizzo del fotometro che fornisce indicazioni sulla quantità di acido nucleico estratto e sul suo grado di purezza.



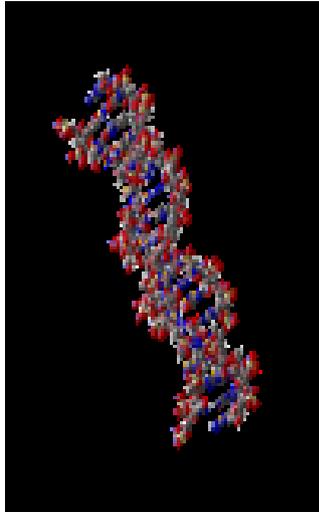
Controllo del DNA estratto

1. Lettura fotometrica (valutazione quantitativa)
2. Controllo interno di reazione
3. Elettroforesi su gel di agarosio (valutazione qualitativa)



1. Lettura fotometrica

estrazione del DNA



lettura al fotometro



valori di assorbanza attesi

A260 nm (Dna) = 0,1-1,0

A340 nm (torbidita) = 0,0

A280 nm (proteine) < 1,0

A230nm (carboidrati) < 1,0

lunghezza d'onda (λ)

260 nm → DNA

280 nm → proteine e fenoli

230 nm → residui di zuccheri, sali, solventi organici

340 nm → torbidità della soluzione.

rapporto A260 nm/A280 nm:

stima la purezza della soluzione di acidi nucleici

valore ottimale = 1,8

(range = 1,5 – 2,0)



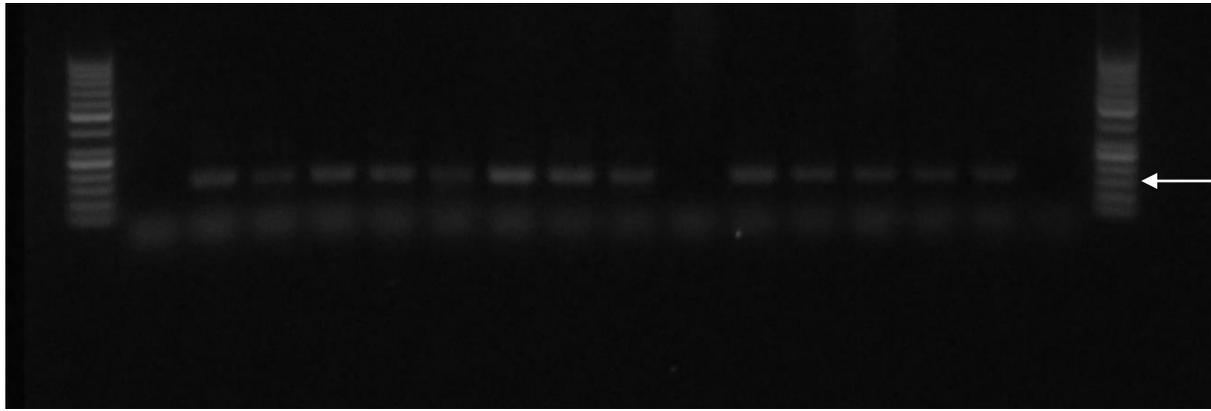


2. *controllo interno di reazione:* amplificazione della β -actina

- L'actina è una proteina di forma globulare che costituisce i microfilamenti delle cellule e i filamenti sottili delle cellule muscolari e che rappresenta il 5-10% di tutte le proteine delle cellule eucariotiche.
- Nei vertebrati esistono 3 isoforme di actina (α , β , γ) codificate da geni diversi. - La β -actina è l'isoforma presente nei microfilamenti del citoplasma ed è sempre presente nelle matrici biologiche prelevate da mammiferi.



amplificazione della β -actina



prodotto di amplificazione 146-250 bp
(dipende dalla specie)

- β -actin-Rev (TTGCTGATCCACATCTGCTG)
- β -actin-For (GACAGGATGCGAAAGGAGAT)
- PCR end-point
- sequenza genica conservata in tutte le cellule di mammifero

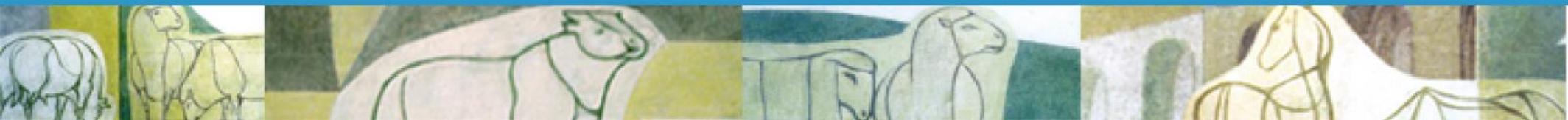
[CANCER RESEARCH 59, 3119-3127, July 1, 1999]

GD3 Ganglioside Antibody Augments Tumoricidal Capacity of Canine Blood Mononuclear Cells by Induction of Interleukin 12¹

Stuart C. Helfand,² Erin B. Dickerson, Keith L. Munson, and Marcia L. Padilla

School of Veterinary Medicine, Department of Medical Sciences [S. C. H., E. B. D., K. L. M., M. L. P.] and University of Wisconsin Comprehensive Cancer Center [S. C. H.], University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin 53706

Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati come primers sono state controllate su BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



Controllo del DNA estratto da zecche

28S rRNA

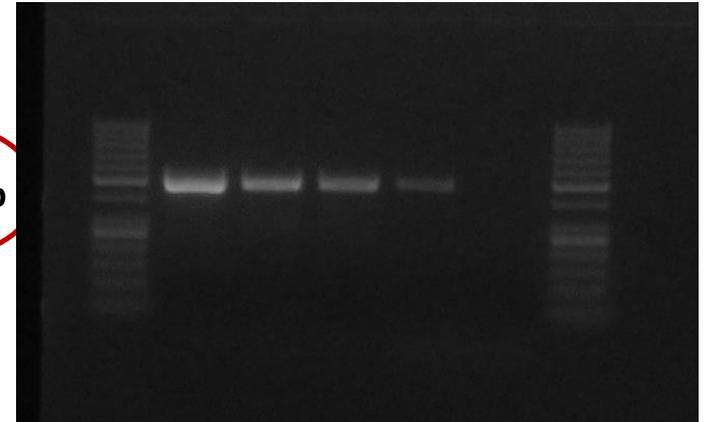
28SF

5'-GACTCTAGTCTGACTCTGTG-3'

28SR

5'-GCCACAAGCCAGTTATCCC-3'

450bp

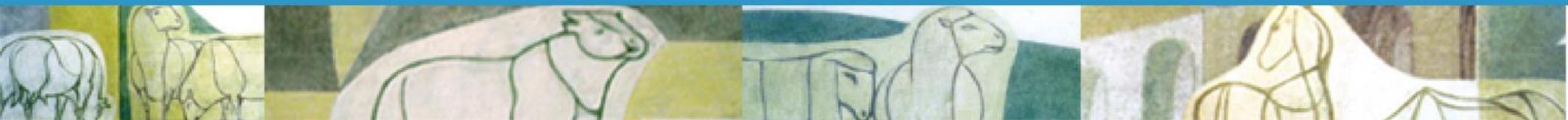


Vet Parasitol. 2003 Aug 14;115(4):343-8.

Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan.

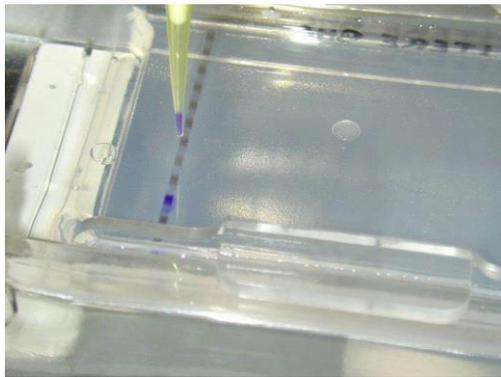
Inokuma H, [Beppu T](#), Okuda M, Shimada Y, Sakata Y.

Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan. inokuma@yamaguchi-u.ac.jp

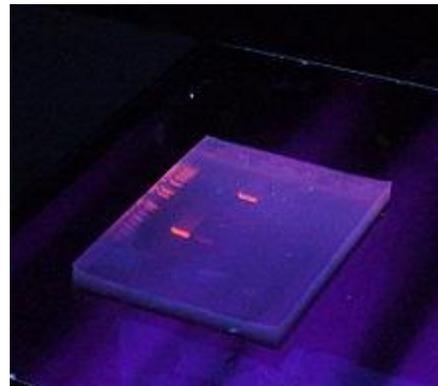


3. Elettroforesi del DNA estratto su gel di agarosio

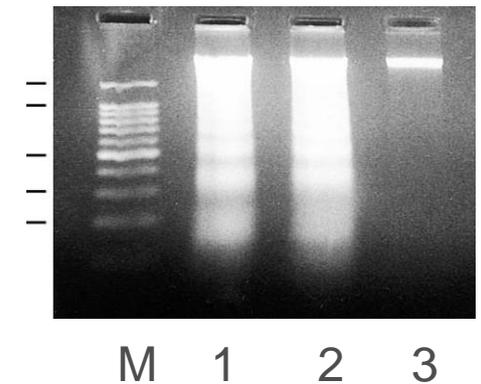
Caricamento del DNA su gel
di agarosio all`1%



Elettroforesi del DNA



Analisi del DNA



La qualità del DNA è verificata visualizzando al transilluminatore (raggi UV) la corsa elettroforetica di 10 μ l dell'acido nucleico estratto caricato su gel di agarosio al 1% in TAE 1X, colorato con GelRed Nucleic Acid Stain.





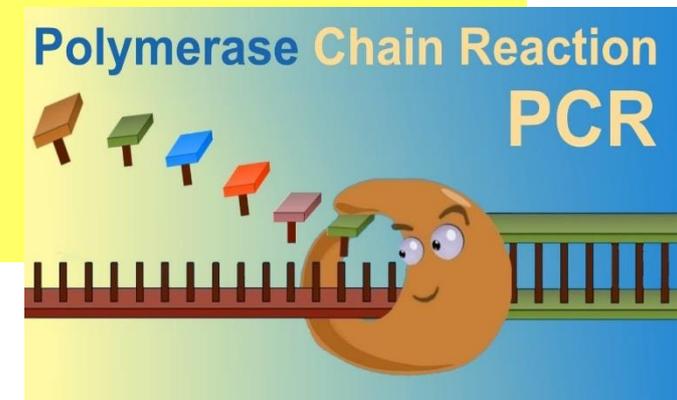
Controlli in PCR

- **Controllo negativo:** evidenzia i falsi positivi dovuti a contaminazione (master mix completa senza DNA stampo)
- **Controllo positivo:** evidenzia i falsi negativi verificando la funzionalità di tutti i reagenti e dell'apparecchiatura utilizzata per amplificare (master mix + campione in cui è contenuta la sequenza bersaglio)
- **Controllo interno di reazione:** evidenzia i risultati falsi negativi che possono essere dovuti a estrazione del DNA inadeguata o alla presenza di fattori di inibizione della PCR (amplificazione di una sequenza sicuramente presente nel campione di DNA estratto)



Obiettivo della PCR

Lo scopo è produrre *in vitro* grandi quantità di una specifica sequenza di DNA, necessaria per successive applicazioni, partendo da un filamento di DNA estremamente complesso.





Componenti di una reazione di PCR

Primers

Oligonucleotidi complementari a regioni dei filamenti opposti che fiancheggiano la sequenza DNA bersaglio

Deossiribonucleotidi trifosfati

Miscela equimolare di dATP, dTTP, dGTP, dCTP

Tampone contenente cloruro di magnesio

Lo ione Mg_2^+ è essenziale per il funzionamento dell'enzima

Enzima

Tradizionalmente viene usata la Taq polimerasi, enzima termostabile estratto dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*

Stampo

DNA a doppio filamento



Fasi di una PCR

1. DENATURAZIONE:

Il DNA viene denaturato mediante riscaldamento in provetta a ~ 92-95°C.

2. ANNEALING:

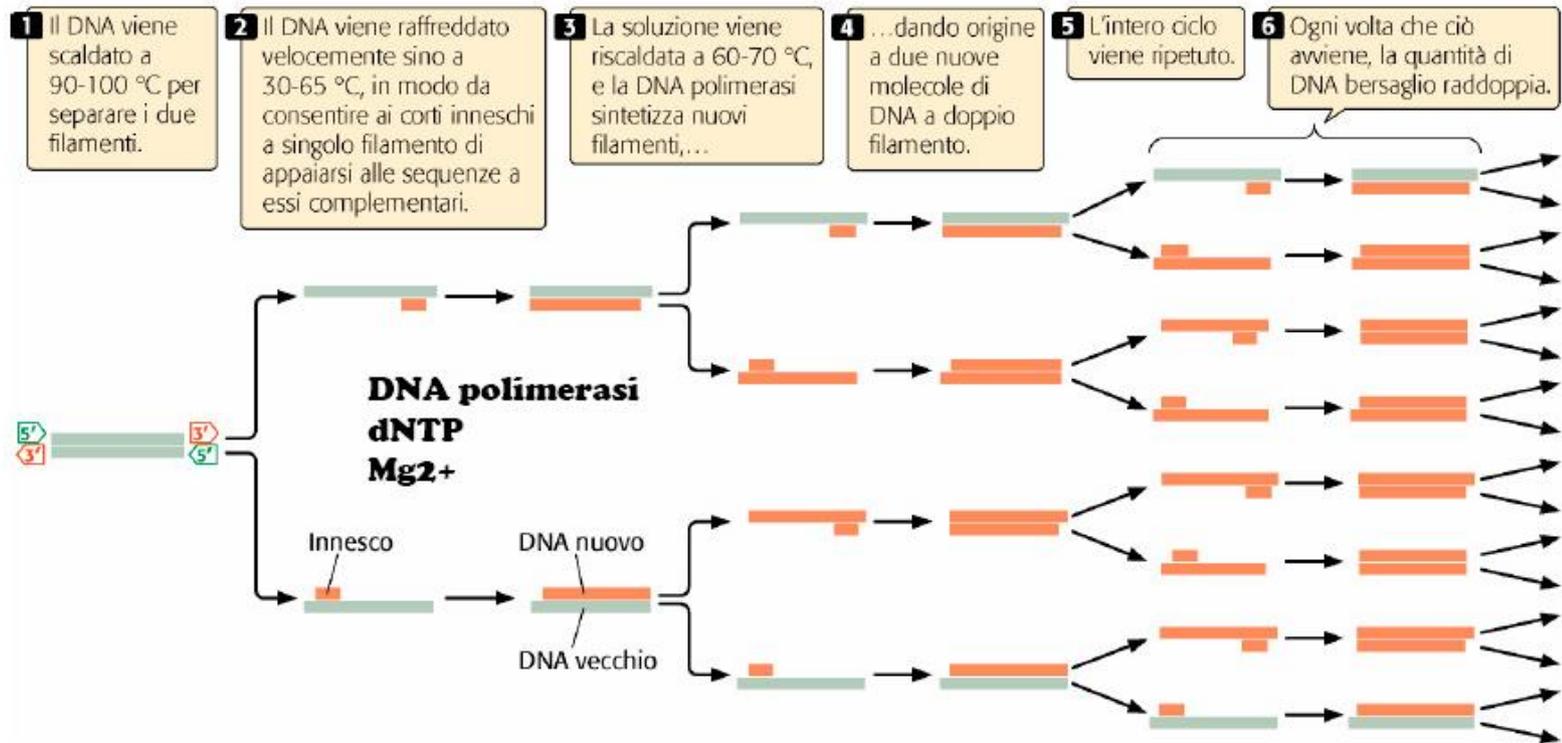
La miscela viene raffreddata (50-65°C) fino a raggiungere la temperatura che garantisce la specifica ibridazione dei primers alle regioni dello stampo ad essi complementari

3. ALLUNGAMENTO:

La temperatura della miscela viene portata a 68-72°C consentendo alla DNA polimerasi termostabile di sintetizzare il filamento complementare allo stampo a partire dall'innesco oligonucleotidico



Fasi di un'amplificazione tradizionale



Reazione **2ⁿ** dove n=numero di cicli

Il processo di duplicazione non procede “all’infinito”, esso è limitato da:

- **quantità dei primers**
- **attività della Taq polimerasi**





Alcune varianti delle PCR

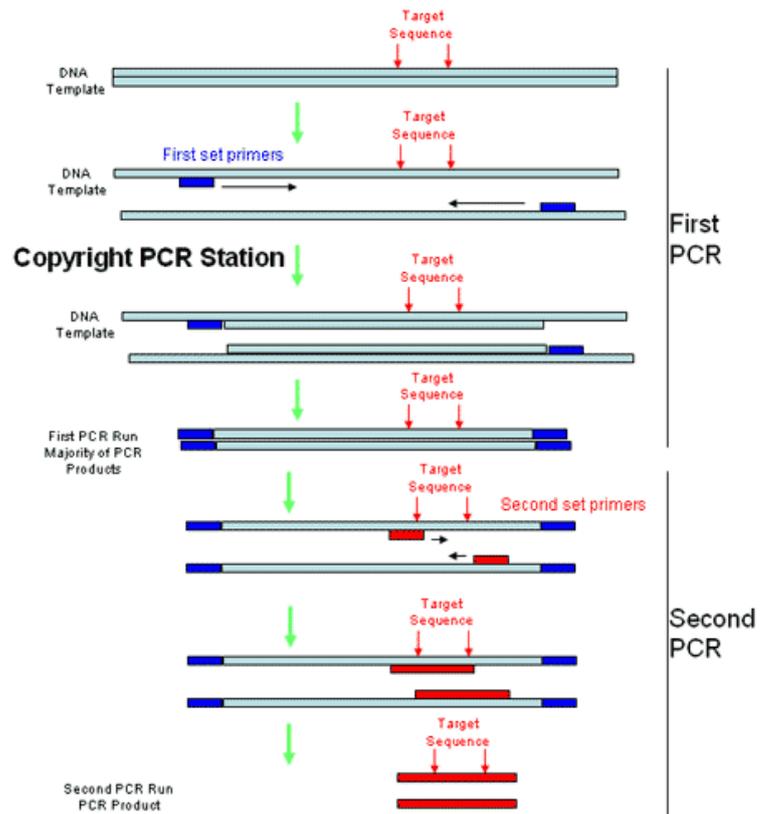
Standard: viene utilizzata una sola coppia di primer

Nested PCR: vengono utilizzate due coppie di primer in successione relativamente allo stesso segmento del gene di interesse

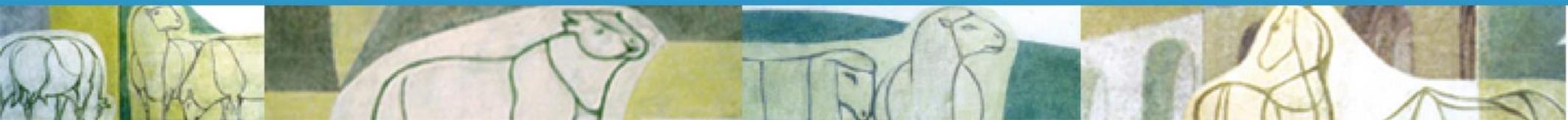
Multiplex: vengono utilizzate contemporaneamente più coppie di primer relativamente a diversi segmenti di uno o più geni di interesse

Real Time: consente di monitorare in tempo reale l'andamento di una reazione di amplificazione, basata sulla fluorescenza. L'emissione di fluorescenza è direttamente correlata alla quantità di DNA amplificato.





La **nested PCR** è una variante della tecnica di PCR che consiste nell'utilizzo di due coppie di primers, una esterna che genera un normale prodotto di PCR ed una coppia con primers all'interno del prodotto amplificato: se il prodotto di amplificazione fosse aspecifico la seconda PCR non andrebbe a buon fine.



Multiplex PCR

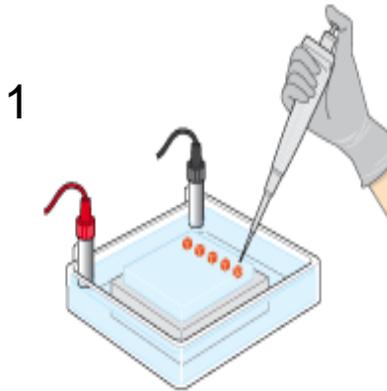
Consiste nell'utilizzo di diverse coppie di primers nella stessa reazione di amplificazione.

Pertanto risulterà possibile amplificare più frammenti di DNA nella stessa reazione di amplificazione.

Tale tecnica consente di amplificare nella stessa reazione più frammenti di geni caratteristici per una specie, oppure più frammenti specifici appartenenti a specie diverse.



Analisi del risultato



- Preparazione del gel di agarosio
- Corsa elettroforetica
- Visualizzazione al transilluminatore UV

Fornisce informazioni sulla presenza del frammento genico ricercato



Matrici per l'identificazione di *Rickettsia spp*:

- **zecche**
- sangue intero
- buffy coat
- **biopsie cutanee e di escare**
- tamponi cutanei (escare)
- **biopsie d'organo**
- liquido cerebrospinale
- liquido pleurico

in assenza di malattia avanzata o infezioni fulminanti, **nel sangue circolano un basso numero di rickettsie**

in mancanza di altre matrici, la PCR si può effettuare anche su siero, plasma, tessuti inclusi in paraffina o materiale fissato su vetrino

gestione dei campioni per la ricerca di rickettsie

TABLE 2. PRESERVATION AND STORAGE OF SAMPLES FOR DETECTION OF *RICKETTSIA* SPP.
 (AND FOR TICK IDENTIFICATION WHEN APPLICABLE)

<i>Specimen</i>	<i>Collection method</i>	<i>Time and transport temperature</i>	<i>Preservation</i>	<i>Microbiological assay</i>
Whole blood/buffy coat	EDTA or citrate tube (3–5 mL)	<24 h, 2–8°C >24 h, at least –20°C	>24 h, at least –20°C	PCR
Whole blood/buffy coat	Heparin tube (3–5 mL)	>24 h, dry ice	To process immediately or freeze –80°C	Culture
Serum/plasma	Serum separator tube/ anticoagulant tube	<24 h, 2–8°C	>24 h, at least –20°C	IFA/PCR
Other body fluids (CSF, pleural fluid) (not preferred specimens)	Sterile tube	<24 h, 2–8°C >24 h, at least –20°C	>24 h, at least –20°C To process immediately or freeze –80°C	PCR Culture
Skin or eschar biopsy and autopsy organ tissue	Sterile tube Tissue should be sent dry	>24 h, at least –20°C >24 h, dry ice	>24 h, at least –20°C To process immediately or freeze –80°C	PCR Culture
Eschar swab	Sterile tube. Swab should be sent dry	24–72 h, 2–8°C	2–8°C	PCR/culture
Tick	Tube	24–48 h, 2–8°C ^a >48 h, at least –20°C >48 h, 70%/absolute ethanol >48 h, dry ice	>48 h, at least –20°C >48 h, at least –20°C >48 h, 70%/absolute ethanol To process immediately or freeze –80°C	PCR/culture PCR/culture PCR PCR/culture
Formalin-fixed tissue paraffin-embedded tissue	Tube/cassette	Room temperature	Room temperature	PCR/IHC
Hemolymph	Slide	Immediately, Room temperature	Room temperature	PCR/stain

^aIf prevented from drying out, live ticks can be kept at 2–8°C for several days.

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; PCR, polymerase chain reaction; CSF, cerebrospinal fluid; IFA, indirect immunofluorescence assay; IHC, immunohistochemical assay.



Target utilizzati per l'identificazione di *Rickettsia spp*:

- gene 16S rRNA (*rrs*)
- 17-kDa protein (*htr*)
- citrate synthase (*gltA*)

Target utilizzati per l'identificazione delle rickettsie a livello di specie:

- Surface cell antigen (*sca*) autotransporter family:
 - outer membrane proteins *ompA* e *ompB*
 - surface cell antigens *sca4* e *sca1*



Target utilizzati per l'identificazione di *Rickettsia spp*:

Per affermare che una rickettsia da noi identificata appartiene a una determinata specie validata, depositata in banca dati, questa deve avere una similitudine \geq a quelle di seguito riportate in **almeno due** dei seguenti geni:

gene	% similitudine
<i>gltA</i>	99,9
<i>ompA</i>	98,8
<i>ompB</i>	99,2





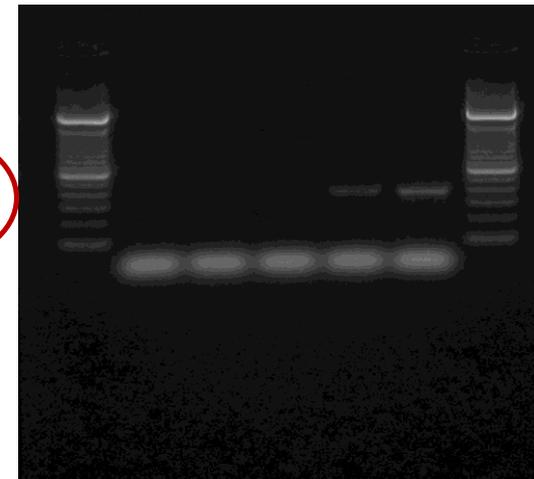
Rickettsia spp. glt A (Citrate syntethase)

gltA

RpCs 877p
5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA-3'

RpCs 1258n
5'-ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA-3'

381bp



JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Mar. 1991, p. 1576-1589
0021-9193/91/051576-14\$02.00/0
Copyright © 1991, American Society for Microbiology

Vol. 173, No. 5

Genotypic Identification of Rickettsiae and Estimation of Intraspecies Sequence Divergence for Portions of Two Rickettsial Genes

RUSSELL L. REGNERY,^{1*} CATHERINE L. SPRUILL,¹ AND BRIAN D. PLIKAYTIS²





l'identificazione di *Rickettsia* spp. prevede il confronto tra le sequenze di più geni

ompA

Rr190.70p

5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA-3'

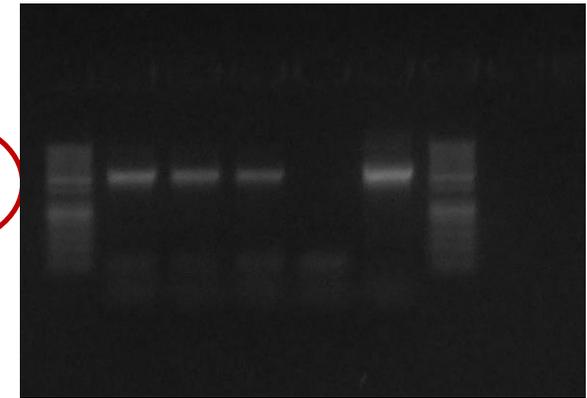
Rr190.701n

5'-GTTCCGTTAATGGCAGCATCT-3'

Rr190.602n

5'-AGTGCAGCATTGCTCCCCCT-3'

532bp



Cluster of Cases of Human *Rickettsia felis* Infection from Southern Europe (Spain) Diagnosed by PCR

José A. Oteo,* Aránzazu Portillo, Sonia Santibáñez, José R. Blanco,
Laura Pérez-Martínez, and Valvanera Ibarra

Área de Enfermedades Infecciosas, Complejo Hospitalario San Millán-San Pedro-de La Rioja, Hospital de La Rioja, Logroño, Spain

Received 20 February 2006/Returned for modification 29 March 2006/Accepted 3 May 2006





ompB

OmpB OF

5'-GTAACCGGAAGTAATCGTTTCGTAA-3'

OmpB OR

5'-GCTTTATAACCAGCTAAACCACC-3'

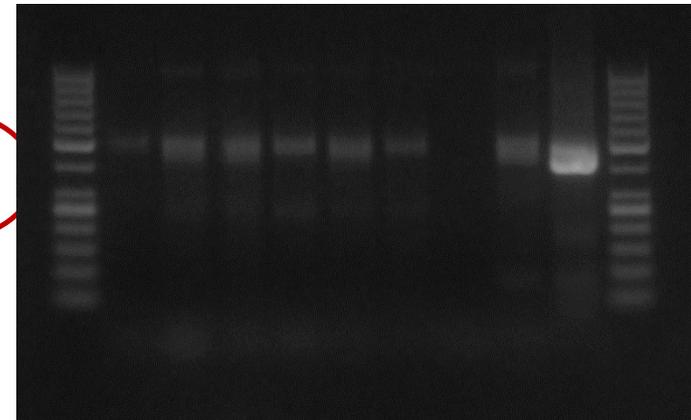
rOmpBSFG-IF

5'-GTTTAATACGTGCTGCTAACCAA-3'

rOmpBSFG-IR

5'-GGTTTGGCCCATATACCATAAG-3'

420bp



Spotted Fever Group and Typhus Group Rickettsioses in Humans, South Korea

Yeon-Joo Choi,*1 Won-Jong Jang,*1 Jong-Hyun Kim,* Ji-Sun Ryu,* Seung-Hyun Lee,* Kyung-Hee Park,* Hyung-Suk Paik,† Young-Sang Koh,‡ Myung-Sik Choi,§ and Ik-Sang Kim§



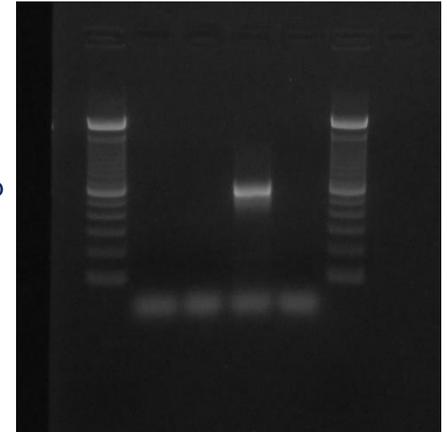


Anaplasma phagocytophilum – 16S rRNA

Trasmissione mediante puntura di una zecca,
prevalentemente Ixodes ricinus.

Matrice: sangue

546 bp



JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Feb. 2003, p. 717–722
0095-1137/03/\$08.00+0 DOI: 10.1128/JCM.41.2.717–722.2003

Vol. 41, No. 2

Comparison of PCR Assays for Detection of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*

Robert F. Massung* and Kimetha G. Slater

Primer pairs:

ge3a/ge10r

ge9f /ge2





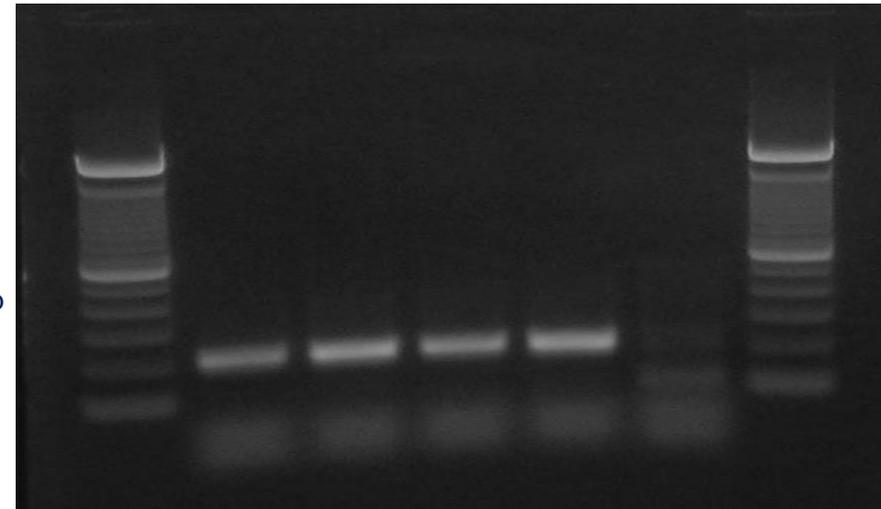
Coxiella burnetii - gene IS1111

REGIONE RIPETITIVA TRANSPOSON - LIKE

è un importante agente abortigeno

trasmissione mediante puntura di una
zecca

Matrici: su aborti organi di elezione sono milza,
fegato, polmone e placenta, tamponi genitali.



203 bp

STN (Single Tube Nested) primers pairs:
TRANS1/TRANS2

261F/463R



Available online at www.sciencedirect.com



Veterinary Microbiology 118 (2006) 101–106



www.elsevier.com/locate/vetmic

Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR

Antonio Parisi ^{a,*}, Rosa Fraccalvieri ^a, Mariassunta Cafiero ^a, Angela Miccolupo ^a,
Iolanda Padalino ^a, Cosimo Montagna ^a, Federico Capuano ^b, Roldano Sottili ^a





Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Veterinary Parasitology 115 (2003) 343–348

veterinary
parasitology

www.elsevier.com/locate/vetpar

Short communication

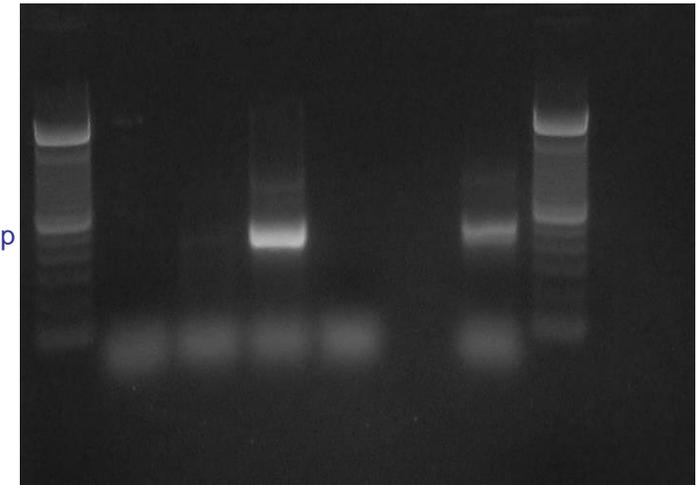
Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan

Hisashi Inokuma^{a,*}, Takeshi Beppu^a, Masaru Okuda^a,
Yojiro Shimada^b, Yoshimi Sakata^c

^a Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan

^b Nippon Zenyaku Kogyo Co. Ltd., Koriyama, Fukushima 963-0196, Japan

^c Merial Japan Ltd., Tokyo 100-0014, Japan



Primer (First) **fd1/EHR16SR**

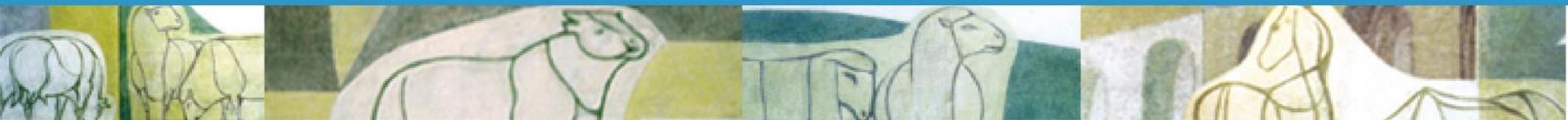
Primer (nested) **CANIS/GA1UR**

J Vet Med Sci. 2001 Jul;63(7):815-7.

Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan.

Inokuma H, Ohno K, Onishi T, Raoult D, Brouqui P.

Laboratory of Veterinary Internal Medicine, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yoshida, Japan.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Fasi preliminari del sequenziamento

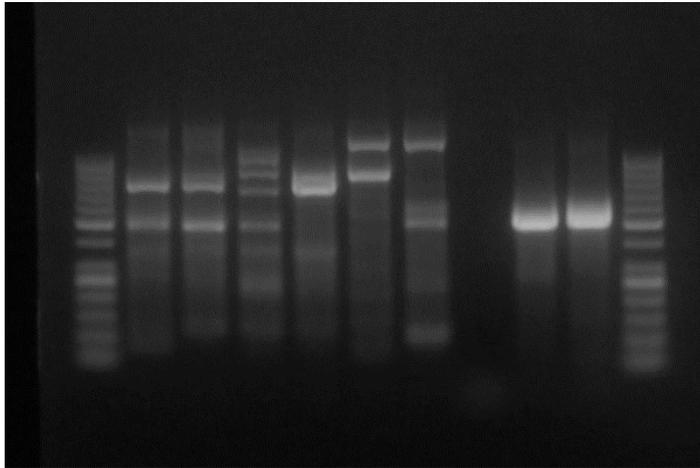


Al fine di identificare la sequenza genica presente nei campioni risultati positivi vengono eseguite vari step:

- Purificazione dei prodotti di PCR
- Quantificazione del DNA purificato
- Sequenziamento



Purificazione dei prodotti di PCR



Presenza di bande aspecifiche:

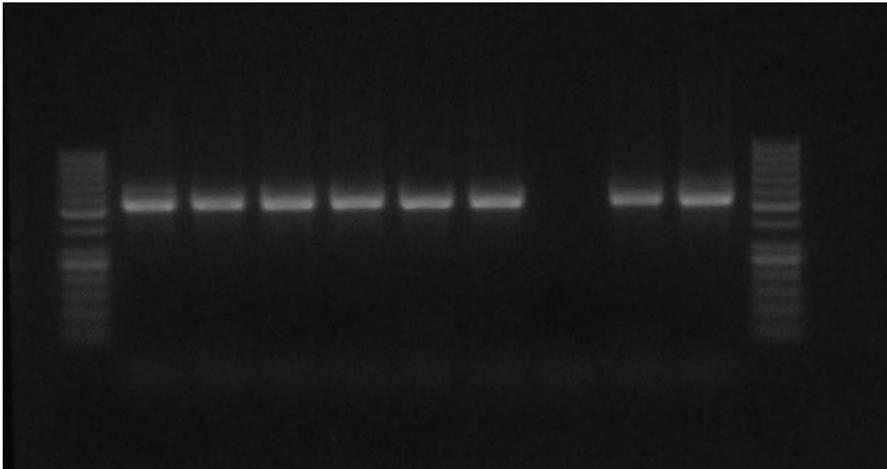
prevede un taglio in corrispondenza della banda di nostro interesse



Il gel di agarosio viene posto sul transilluminatore con i raggi UV accesi



Purificazione dei prodotti di PCR



Presenza di bande specifiche:
permette direttamente la purificazione



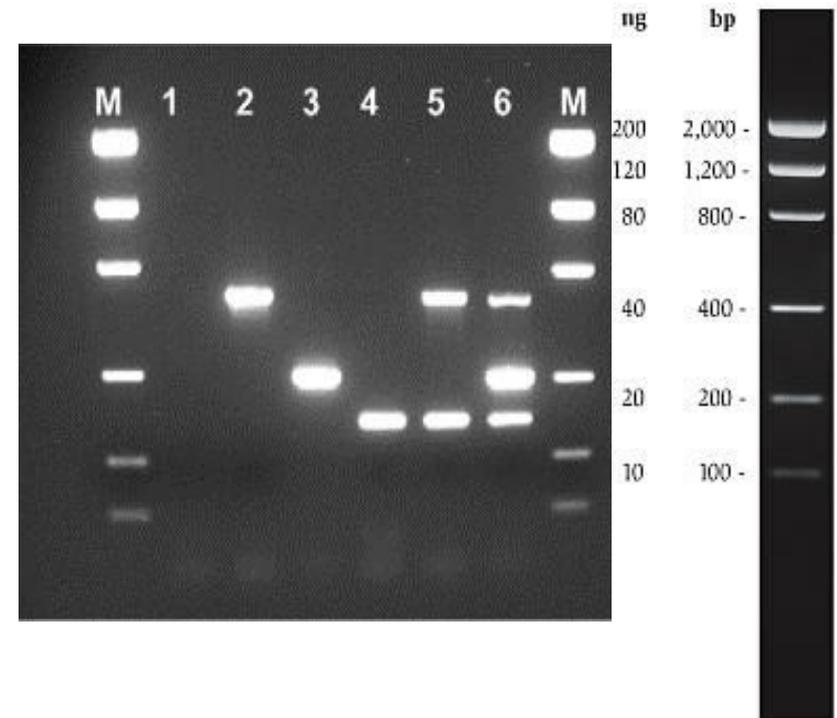
kit QIAquick Gel Extraction Kit Protocol
(Qiagen)



Quantificazione dei prodotti di PCR

La quantificazione si ottiene confrontando l'intensità della banda purificata del campione con quella dello standard Low Mass Ladder (Invitrogen) mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%.

Il low mass ladder è composto da una mistura equimolare di sei frammenti di DNA rispettivamente di 2000, 1200, 800, 400, 200 e 100 bp.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Grazie per l'attenzione

LAURA SALVATO - DO Sierologia IZSLT

