

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE VETERINARIE

Ciclo XXVII

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H4

Settore Scientifico disciplinare: VET/08

**LA DIAGNOSTICA MOLECOLARE NEL LABORATORIO DI PATOLOGIA
CLINICA VETERINARIA**

Presentata da: Dott.ssa Zambon Elisa

Coordinatore Dottorato

Prof. Carlo Tamanini

Relatore

Prof. Fabio Gentilini

Esame finale anno 2015

Sommario

INTRODUZIONE.....	4
CAPITOLO 1 – LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP): AMPLIFICAZIONE ISOTERMICA E SUO UTILIZZO COME POINT-OF-CARE TESTING (POCT)	5
1.1 INTRODUZIONE ALLA TECNICA “LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION” (LAMP)	5
1.2 PRINCIPIO DELLA LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION	6
1.3 LOOP PRIMER	9
1.4 DISEGNO DEI PRIMER	10
Temperatura di melting	11
Stabilità delle estremità dei primer	11
Contenuto di GC.....	12
Struttura secondaria	12
Distanza tra i primer.....	12
1.5 COMPOSIZIONE TIPICA DI UNA MIX DI REAZIONE LAMP	12
1.6 <i>Bst</i> DNA POLIMERASI E REVERSE TRANSCRIPTION LAMP (RT-LAMP)	13
1.7 METODI DI VISUALIZZAZIONE DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE.....	13
End-Point	13
REAL-time	15
1.8 APPLICAZIONI DELLA LAMP ed evoluzione dalla sua invenzione.....	16
1.9 ALTRE TECNICHE DI AMPLIFICAZIONE ISOTERMICA.....	18
1.9.1 Metodi basati sulla trascrizione dell’RNA	18
1.9.2 Metodi basati sulla replicazione del DNA attraverso l’utilizzo di un enzima che favorisce il legame dei primer.....	20
1.9.3 Metodi basati sullo strand-displacement del DNA di target lineari o circolari mediato da una polimerasi	23
1.9.4 Metodi basati sulla estensione con strand displacement ed un singolo evento di taglio del filamento.	24
1.10 OBIETTIVI E STRUTTURA DELLO STUDIO.....	27
1.11 UTILIZZO DELLA TECNICA LAMP PER LA DIAGNOSI DI MALATTIE INFETTIVE DEL CANE E DEL GATTO	28
1.11.1 EMOPLASMI FELINI	28
Introduzione	28
Materiali e metodi	29
Risultati.....	31
Discussione e conclusioni	33
1.11.2 PARVOVIRUS DEL CANE E DEL GATTO	34

Introduzione	34
Materiali e metodi	35
Risultati.....	36
Discussione e conclusioni	37
1.11.3 BABESIOSI.....	38
Introduzione	38
Materiali e metodi	40
Risultati.....	41
Discussione e conclusioni	41
1.11.4 TOXOPLASMA GONDII e NEOSPORA CANINUM.....	42
Introduzione	42
Materiali e metodi	44
Risultati.....	46
Discussione e conclusioni	47
1.11.5 LEPTOSPIRE PATOGENE	48
Introduzione	48
Materiali e metodi	49
Risultati.....	51
Discussione e conclusioni	52
1.12 UTILIZZO DELLA TECNICA LAMP PER LA DIAGNOSI DI MALATTIE INFETTIVE NEL CAVALLO	54
1.12.1 BABESIA CABALLI e THEILERIA EQUI	54
Introduzione	54
Materiali e metodi	55
Risultati.....	55
Discussione e conclusioni	56
1.13 UTILIZZO DELLA TECNICA LAMP PER LA DIAGNOSI DI MALATTIE GENETICHE NEL CANE	57
1.13.1 MALATTIA DI VON WILLEBRAND TIPO I NEL CANE (VWI)	57
Introduzione	57
Materiali e metodi	58
Risultati.....	59
Discussione e conclusioni	60
1.13.2 MIOPATIA CENTRONUCLEARE (CNM) DEL LABRADOR RETRIEVER	61
Introduzione	61
Materiali e metodi	62
Risultati.....	63

Discussione e conclusioni	64
1.14 UTILIZZO DELLA TECNICA LAMP NEL SETTORE AGROALIMENTARE	66
1.14.1 LISTERIA MONOCYTOGENES	66
Introduzione	66
Materiali e metodi	67
Risultati.....	68
Discussione e conclusioni	68
1.14.2 PSEUDOMONAS FLUORESCENS.....	70
Introduzione	70
Materiali e metodi	70
Risultati.....	71
Discussione e Conclusioni.....	72
1.15 MESSA A PUNTO DI UN METODO DI VISUALIZZAZIONE COLORIMETRICO DEI PRODOTTI OTTENUTI MEDIANTE AMPLIFICAZIONE ISOTERMICA	73
1.16 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	75
CAPITOLO 2 – STUDIO MOLECOLARE DI UN CASO DI DEFICIENZA PRIMITIVA DI MIELOPEROSSIDASI IN UN CANE	76
2.1 I GRANULOCITI NEUTROFILI	76
2.2 STRUTTURA DEI GRANULOCITI NEUTROFILI E BIOCHIMICA	76
2.2.1 Ultrastruttura dei neutrofili e tipologia e contenuto dei granuli	76
2.3 DISTRIBUZIONE DEI NEUTROFILI E LORO FUNZIONE.....	78
2.3.1 Meccanismi battericidi.....	79
2.4 MIELOPEROSSIDASI	81
2.4.1 Genetica e struttura della mieloperossidasi	81
2.4.2 Clonaggio e struttura del gene della mieloperossidasi umana	82
2.4.3 Funzioni fisiologiche della mieloperossidasi	83
2.5 CARENZA DI MIELOPEROSSIDASI.....	85
2.6 LA MIELOPEROSSIDASI NELL'ANALISI DI CITOCHIMICA AUTOMATICA (Advia 22120i)	87
2.6.1 Metodica della reazione citochimica della per ossidasi (Da: ADVIA (R) 2120 Hematology System Operator's Guide)	88
2.7 OBIETTIVI E STRUTTURA DELLO STUDIO.....	91
2.8 MATERIALI E METODI	91
2.9 RISULTATI.....	95
2.10 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	99
BIBLIOGRAFIA	100

INTRODUZIONE

La presente tesi di dottorato si sviluppa in due capitoli che descrivono i due argomenti principali del progetto di ricerca condotto in questi anni.

Il primo capitolo riguarda la tecnica LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*), una tecnica di amplificazione isotermica di recente invenzione (Notomi et al., 2000). Essa presenta notevoli vantaggi rispetto alle tradizionali PCR: non necessita di strumentazioni sofisticate e costose come i termociclatori, può essere eseguita da personale non specializzato, è una tecnica altamente sensibile e specifica, si basa infatti sul riconoscimento da parte di 6 primer di 8 regioni sulla sequenza target. Inoltre è molto tollerante agli inibitori.

Tutte queste caratteristiche fanno sì che essa possa essere utilizzata al di fuori dei laboratori diagnostici, come POCT (*Point of care testing*), con il vantaggio di non dover gestire la spedizione del campione, che in alcuni casi risulta complessa, e di avere in tempi molto brevi (60 minuti) risultati paragonabili a quelli ottenuti con la tradizionale PCR.

Sono state prese in considerazione malattie infettive sostenute da batteri che richiedono tempi molto lunghi per la coltivazione o che non sono addirittura coltivabili. Sono stati disegnati dei saggi per la diagnosi di patologie virali che necessitano di diagnosi tempestiva come il parvovirus. Altri test messi a punto riguardano malattie genetiche del cane, e due batteri d'interesse agro-alimentare, come *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas fluorescens*.

Tutte le prove di messa a punto e validazione sono state condotte con tecnica real-time per diminuire il rischio di cross-contaminazione pur riuscendo a comprendere in maniera approfondita l'andamento delle reazioni.

Infine è stato messo a punto un metodo di visualizzazione colorimetrico utilizzabile con tutti i saggi messi a punto, che svincola completamente la reazione LAMP dall'esecuzione in un laboratorio specializzato.

Il secondo capitolo riguarda lo studio dal punto di vista molecolare di un soggetto che presenta totale assenza di attività mieloperossidasi all'analisi di citochimica automatica (ADVIA® 2120 Hematology System).

Lo studio è stato condotto attraverso amplificazione PCR e confronto dei prodotti di PCR ottenuti dal soggetto patologico e da due soggetti con fenotipo wild-type tramite elettroforesi su gel d'agarosio. Si è poi provveduto all'isolamento e alla purificazione dei prodotti di PCR e sequenziamento degli stessi su sequenziatore automatico al fine di ricercare la mutazione responsabile della carenza di MPO nel soggetto indicato.

CAPITOLO 1 – LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP): AMPLIFICAZIONE ISOTERMICA E SUO UTILIZZO COME POINT-OF-CARE TESTING (POCT)

1.1 INTRODUZIONE ALLA TECNICA “LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION” (LAMP)

L'amplificazione in vitro degli acidi nucleici è una tecnica di fondamentale importanza per le biotecnologie e la biologia molecolare ed è attualmente una delle metodiche maggiormente utilizzate in numerosi campi, quali ricerca, diagnostica clinica, agricoltura, scienze forensi, epidemiologia e molti altri.

La reazione a catena della polimerasi (PCR – polymerase chain reaction) è il primo metodo di amplificazione nucleica a essere stato sviluppato ed è, ancora oggi, il più utilizzato per la diagnostica molecolare sin dalla sua invenzione (Mullis et al. 1986).

Tuttavia la PCR presenta diversi limiti:

- Costo: la PCR necessita per la sua esecuzione di strumentazioni avanzate e costose come il termociclatore.
- Rischio di contaminazioni.
- Sensibilità a inibitori e contaminanti: la PCR è una tecnica estremamente sensibile agli inibitori. Questo può rappresentare un limite rilevante nel caso le matrici di elezione per la ricerca ad esempio di agenti patogeni siano feci e urine.
- Personale specializzato: l'esecuzione della tecnica e l'interpretazione dei risultati richiedono l'intervento di personale di laboratorio specializzato.

I limiti sopra descritti hanno fatto sì che si sviluppassero metodiche alternative. Si tratta per la maggior parte di tecniche di amplificazione isotermica, ovvero di reazioni che avvengono ad un'unica temperatura e che si basano su reazioni auto-sostenenti. Una delle tecniche ad aver raggiunto un'elevata popolarità è la Loop-mediated isothermal amplification (LAMP).

I vantaggi sono molteplici:

- 1- La LAMP utilizza strumenti semplici e non eccessivamente costosi, non necessita infatti dell'utilizzo di un termociclatore (Notomi et al. 2000).
- 2- L'amplificazione e la visualizzazione del prodotto possono essere effettuate all'interno della stessa provetta e in un unico step.

- 3- L'efficienza dell'amplificazione LAMP è molto elevata (Parida et al. 2008).
- 4- L'amplificazione avviene rapidamente e, al contrario della PCR, senza bisogno della denaturazione iniziale del DNA (Negamine et al. 2001).
- 5- La LAMP è caratterizzata da un'elevata tolleranza agli inibitori (Francois et al. 2011).
- 6- La quantità di prodotto di amplificazione è cospicua e la visualizzazione del risultato può avvenire direttamente tramite turbidimetria (Mori et al. 2001).
- 7- Abbinata alla trascrizione inversa è in grado di riscontrare la presenza di un target RNA (Parida et al. 2004).
- 8- E' caratterizzata da un'elevata sensibilità (Notomi et al., 2000).

1.2 PRINCIPIO DELLA LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION

La loop-mediated isothermal amplification (LAMP) è un'amplificazione isotermica di acidi nucleici che si basa sull'attività di una polimerasi termostabile con attività di *strand displacement*, ricavata da *Bacillus stearothermophilus* (*Bst* polimerasi), e su 6 primer disegnati in modo peculiare, che riconoscono 8 regioni sul DNA target prescelto: regioni F3c, F2c e F1c in direzione 3' e regioni B1, B2 e B3 in direzione 5' (Figura 1).

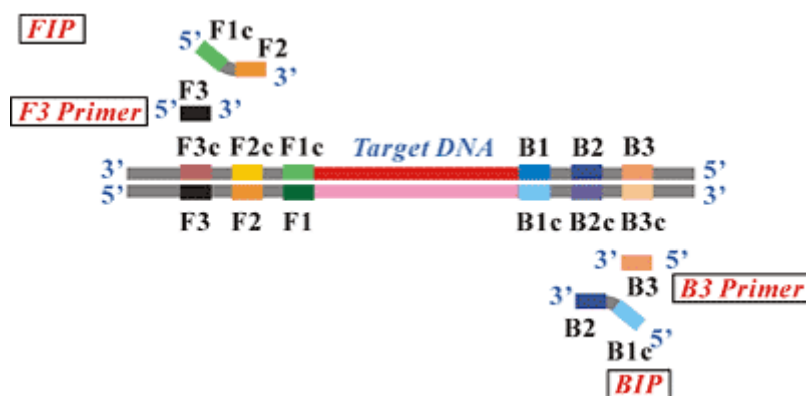


Figura 1. Disposizione dei primer LAMP. (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html>)

I primer FIP (Forward Inner Primer) e BIP (Backward Inner Primer) sono costituiti ognuno da due porzioni. Il primer FIP comprende la porzione F2, complementare alla regione F2c e la porzione F1c. Allo stesso modo, il primer BIP è costituito dalla porzione B2, complementare alla regione B2c e dalla porzione B1c.

I primer F3 (Forward Outer Primer) e B3 (Backward Outer Primer) sono disegnati sulla base delle regioni F3 e B3.

Le due coppie di primer, FIP-BIP e F3-B3, sono indispensabili per l'avvio dell'amplificazione.

STEP 1: Alla temperatura di 65°C il DNA è in una condizione di equilibrio dinamico per cui una frazione si trova sotto forma di DNA a doppio filamento, mentre la restante sotto forma di DNA a singolo filamento. Le porzioni F2 e B2 dei primer FIP e BIP possono aderire alle regioni F2c e B2c nei punti in cui il DNA, in quel momento, si trova sotto forma di singolo filamento. In questo modo viene dato il via all'azione della polimerasi (Figura 2).

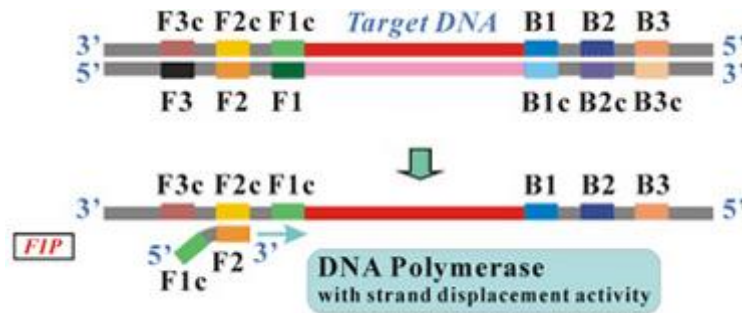


Figura 2: rappresentazione schematica dello STEP 1

STEP 2: A partire dalla porzione F2 del primer FIP la *Bst* polimerasi sintetizza un filamento complementare in direzione 3' – 5' (Figura 3).



Figura 3: rappresentazione schematica dello STEP 2

STEP 3: Il primer F3 aderisce alla regione F3c. La *Bst* polimerasi grazie alla sua attività di *strand displacement*, replica il filamento di DNA target e contemporaneamente scalfa il filamento precedentemente prodotto in seguito al legame del primer FIP (Figura 4).



Figura 4: rappresentazione schematica dello STEP 3

STEP 4: Terminati i tre step iniziali della reazione si assiste alla formazione di un doppio filamento complementare al template originale di DNA (Figura 5).



Figura 5: rappresentazione schematica dello STEP 4

STEP 5: Il filamento prodotto inizialmente dal legame del primer FIP, viene scalzato dalla *Bst* Polimerasi in seguito all'adesione del primer F3, sotto forma di singolo filamento. L'estremità 5' del filamento scalzato è composta da due regioni complementari (F1c e F1), intervallate dalla regione F2, per cui l'estremità si richiude su se stessa formando un'ansa (Figura 6).



Figura 6: rappresentazione schematica dello STEP 5

STEP 6: Il filamento ottenuto serve da template per l'azione dei primer Backward (BIP e B3). La porzione B2 del primer BIP si lega alla regione B2c e la polimerasi sintetizza un filamento complementare. Quando la polimerasi incontra l'ansa formatasi in precedenza sull'estremità 5' la linearizza grazie alla sua attività di *strand displacement*. In seguito il primer B3 si lega alla regione B3c e la polimerasi sintetizza un nuovo filamento a partire dall'estremità 3', scalzando il filamento precedentemente prodotto (Figura 7).

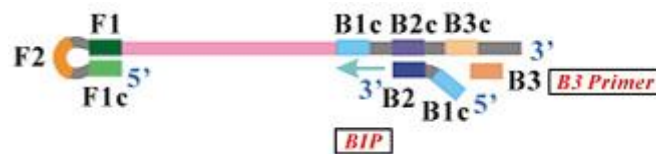


Figura 7: rappresentazione schematica dello STEP 6

STEP 7: Il risultato degli step precedenti è la formazione di un segmento di DNA a doppio filamento identico all'originale (Figura 8).



Figura 8: rappresentazione schematica dello STEP 7

STEP 8: Il filamento prodotto nello step 6 a partire dal legame con il primer BIP, e scalzato dalla polimerasi in seguito al legame del primer B3, ha alle estremità delle regioni complementari vicine (F1-F1c e B1-B1c) che si richiudono ad ansa formando una struttura a manubrio (Figura 9).



Figura 9: rappresentazione schematica dello STEP 8

STEP DI AMPLIFICAZIONE CICLICA (8-11)

Una volta formatasi la struttura di DNA a manubrio, ha inizio l'amplificazione ciclica. Grazie ai ripetuti legami dei primer FIP e BIP inizialmente e F3 e B3 a seguire, viene prodotta una sequenza di DNA composta da singoli segmenti identici al DNA target uniti tra di loro (Figura 10).

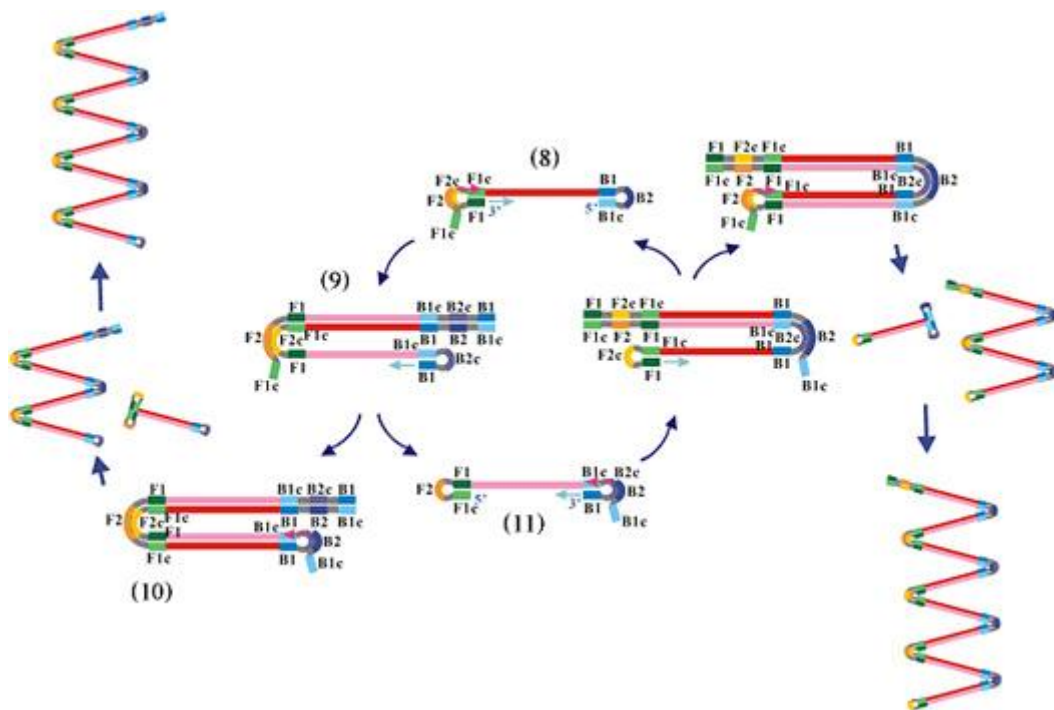


Figura 10: rappresentazione schematica degli STEP 8-11

1.3 LOOP PRIMER

Al fine di aumentare la velocità di amplificazione della LAMP possono essere introdotti nella mix di reazione due ulteriori primer, LF (Loop Forward Primer) e LB (Loop Backward Primer), che vengono utilizzati assieme ai quattro primer precedentemente descritti.

Il primer LF viene disegnato utilizzando la sequenza complementare della porzione di DNA compresa tra le regioni F1 e F2, mentre il primer LB utilizzando la sequenza complementare della porzione di DNA tra le regioni B1 e B2.

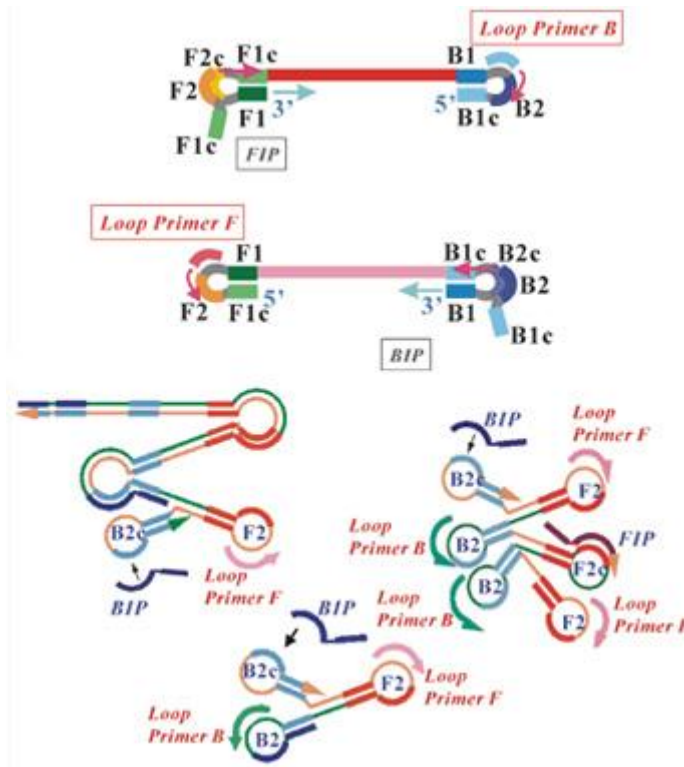


Figura 11: Rappresentazione dell'azione dei primer LOOP Forward e Backward (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/loop.html>)

I primer loop forniscono ulteriori siti di attacco alla polimerasi per la sintesi del DNA, accelerando sensibilmente la reazione ed aumentandone la sensibilità. Grazie all'utilizzo dei loop primer il tempo necessario al completamento dell'amplificazione è ridotto fino ad un terzo (Nagamine et al., 2002)

1.4 DISEGNO DEI PRIMER

Il disegno dei primer LAMP è complesso perché tiene conto di molte variabili termodinamiche. Esistono diversi software che possono essere impiegati per il disegno: PrimerExplorer (FUJITSU) LAMP Designer (Premier Biosoft), LAVA (NIBIB Point-of-Care Technologies Research Network Center), LAMP Designer (OptiGene) e altri.

PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp/e/>).

Attraverso l'utilizzo di una maschera il programma permette di caricare online la sequenza di DNA target e fornisce la possibilità di impostare diversi parametri per il disegno dei primer.

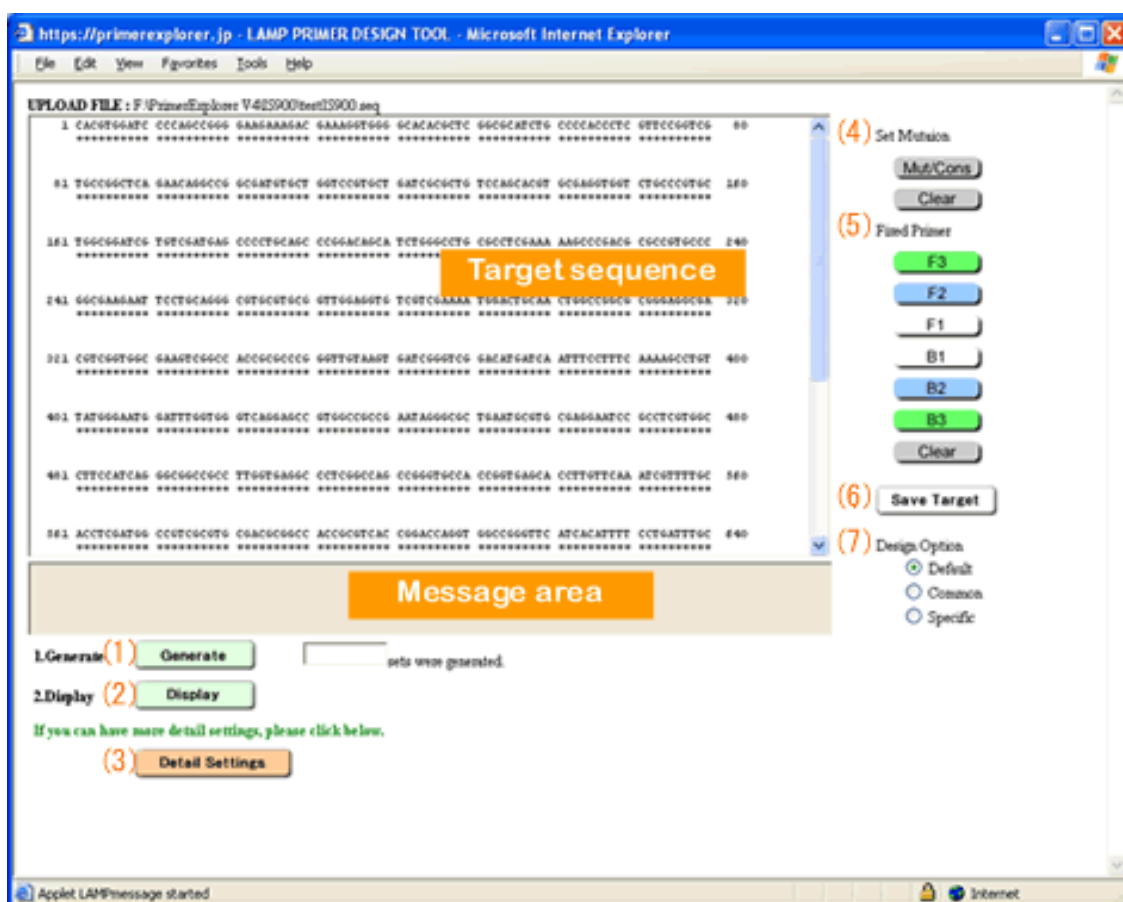


Figura 12: Il programma PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp/e/>)

I cinque parametri chiave per il corretto disegno delle sonde LAMP sono: temperatura di melting (T_m), stabilità delle estremità 3' e 5' di ogni primer, contenuto di GC, struttura secondaria e distanza tra i primer.

Temperatura di melting

La temperatura di melting (T_m) è la temperatura alla quale il 50% delle molecole si trova in forma di doppia elica stabile ed il restante 50% in forma di singola elica. La T_m è stimata utilizzando il *Nearest-Neighbor method*. Questo metodo è attualmente considerato il metodo di approssimazione che fornisce i valori più simili a quelli reali. La T_m stimata è influenzata dalle condizioni dell'esperimento stesso quali concentrazione dei sali e concentrazione dei primer, è preferibile quindi calcolarla impostando delle condizioni definite (concentrazione dei primer a 0.1 μM , concentrazione di Na^{++} a 50 mM, concentrazione di Mg^+ a 4 mM). La T_m per ogni regione deve essere circa di 65°C (64 - 66°C) per F1c e B1c, circa 60°C (59 - 61°C) per F2, B2, F3, e B3, e di circa 65°C (64 - 66°C) per i primer loop.

Stabilità delle estremità dei primer

Le estremità dei primer fungono da innesco per la sintesi del nuovo filamento di DNA da parte della DNA polimerasi e in quanto tali devono essere caratterizzate da un determinato grado di stabilità. Le estremità

3' di F2/B2, F3/B3, e LF/LB e le estremità 5' di F1c/B1c sono disegnate in modo che l'energia libera sia di -4 kcal/ mol o più bassa. L'estremità 5' della porzione F1c dopo amplificazione corrisponde all'estremità 3' della regione F1. La variazione di energia libera (ΔG) è la differenza tra l'energia libera dei prodotti e l'energia libera dei reagenti ed è quindi la misura della spontaneità della reazione. Se il ΔG è negativo, la reazione procede in modo spontaneo verso la formazione dei prodotti.

Contenuto di GC

I primer sono disegnati in modo che la percentuale di GC in essi contenuta sia compresa tra il 40 e il 65%.

Struttura secondaria

E' di fondamentale importanza, soprattutto per i primer FIP e BIP, che le sequenze siano disegnate in modo da non dar luogo alla formazione di strutture secondarie. Per prevenire la formazione di dimeri di primer è importante assicurarsi che le estremità 3' non siano complementari.

Distanza tra i primer

I primer sono disegnati in modo che la distanza tra l'estremità della regione F2 e l'estremità della regione B2 (la regione amplificata dalla LAMP) sia compresa tra 120 e 160 paia di basi. La distanza dall'estremità 5' della regione F2 e l'estremità 5' della regione F1 (la porzione che forma l'ansa durante la reazione) deve essere compresa tra 40 e 60 paia di basi. Inoltre la distanza tra la regione F2 e la regione F3 deve essere compresa tra 0 e 60 paia di basi.

1.5 COMPOSIZIONE TIPICA DI UNA MIX DI REAZIONE LAMP

La mix di reazione LAMP originale ha un volume di 25 μ l totali. Contiene 0.8 μ M di primer FIP e BIP, 0.2 μ M di primer F3 e B3, 400 μ M di ogni dNTP, 1M di betaina, 20 mM di Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM di KCl, 10 mM di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4mM di MgSO_4 , 0,1% di Triton X-100 e una quantità specifica di DNA target doppio filamento. La mix di reazione viene riscaldata a 95°C per 5 minuti e immediatamente trasferita in ghiaccio. In seguito vengono aggiunte 8 U di *Bst* DNA Polymerase large fragment. La mix è poi sottoposta ad incubazione a 65°C per 1h e riscaldata a 80°C per 10 minuti per terminare la reazione (Notomi et al., 2000).

E' possibile denaturare il template a 95°C per 10 minuti poi aggiungere la polimerasi oppure avviare direttamente la reazione senza denaturazione iniziale. Senza la denaturazione iniziale diminuisce la sensibilità della tecnica (Negamine et al. 2001).

1.6 *Bst* DNA POLIMERASI E REVERSE TRANSCRIPTION LAMP (RT-LAMP)

La *Bst* DNA Polimerasi è una porzione della DNA Polimerasi di *Bacillus stearothermophilus* che mantiene l'attività polimerasica in direzione 5'-3' ma manca dell'attività esonucleasica in direzione 5'-3'.

La *Bst* Polimerasi è allestita utilizzando un ceppo di *Escherichia coli* contenente un gene di fusione ottenuto unendo le sequenze codificanti per il dominio polimerasico del *Bacillus stearothermophilus*, ma in cui manca il dominio che conferisce alla polimerasi anche l'attività esonucleasica, e le sequenze codificanti per la Proteina legante il maltosio (maltose binding protein – MBP). Dopo la sintesi, la proteina di fusione è sottoposta ad una purificazione e la subunità MBP rimossa in vitro (www.neb.com).

La tecnica LAMP è applicabile anche sull'RNA attraverso l'utilizzo combinato di una trascrittasi inversa e della *Bst* DNA Polimerasi (Notomi et al., 2000, Parida et al., 2004).

1.7 METODI DI VISUALIZZAZIONE DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE

Sono stati descritti diversi metodi per la visualizzazione dei risultati di una amplificazione LAMP.

End-Point

Elettroforesi su gel di agarosio:

Il metodo più comune è rappresentato dall'elettroforesi su gel di agarosio. Nella preparazione del gel viene aggiunto un agente intercalante come l'etidio bromuro. Attraverso l'illuminazione con i raggi UV, il prodotto di una reazione LAMP presenta una corsa elettroforetica simile a quella di un ladder, in quanto i prodotti della reazione sono di diverse lunghezze e quindi migrano in maniera differente in base al peso molecolare (Figura 13 e 14).

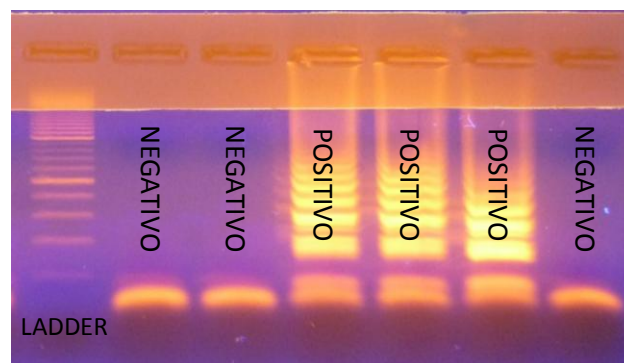


Figura 13: Esempio di una corsa elettroforetica su gel di agarosio.

Fluorofori

I fluorofori sono degli agenti intercalanti che emettono fluorescenza quando si vanno ad interporre tra le due eliche del DNA. Possono essere aggiunti direttamente nella mix di reazione e dal momento che non è necessario aprire il tubo per visualizzare i risultati, si riduce notevolmente il rischio di cross-contaminazione. Al termine della reazione il tubino viene esposto ai raggi UV e nel caso di avvenuta amplificazione (campioni positivi) si visualizzerà una fluorescenza superiore ai campioni negativi, dovuta alla maggior quantità di DNA presente al suo interno (Sun et al., 2006). Il SYBR Green I può essere aggiunto a concentrazioni maggiori anche a fine reazione per valutare il viraggio di colore da arancione a verde in caso di avvenuta reazione (Iwamoto et al., 2003) (Figure 15 e 16).

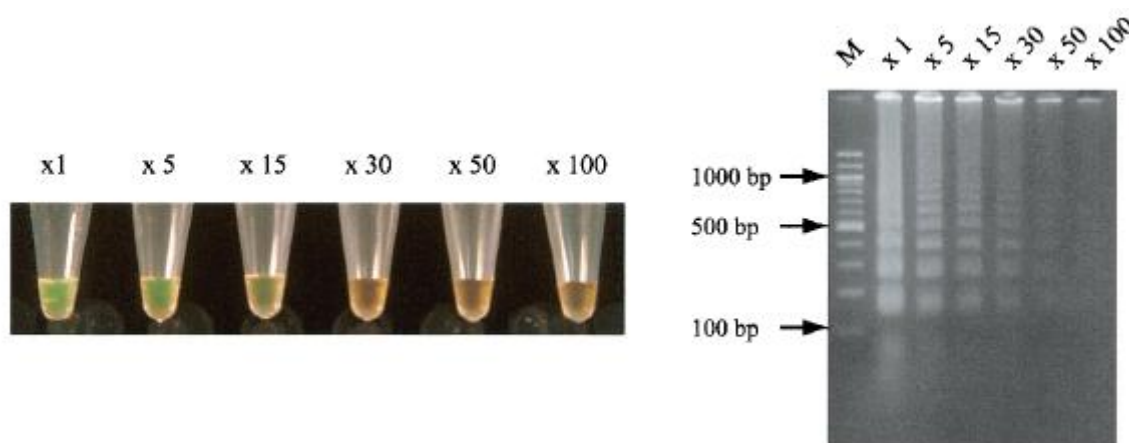


Figura 14 Sensibilità della ispezione visiva e dell'elettroforesi su gel dei prodotti di amplificazione LAMP. Il numero sopra ogni tubino e corsa elettroforetica, rappresenta la diluizione del prodotto LAMP: x1: nessuna diluizione, x5: diluizione 1 a 5 etc (Iwamoto et al., 2003).

Indicatori di ioni

La reazione LAMP produce un'elevata quantità di ione pirofosfato che si lega agli ioni Mg^{2+} presenti in soluzione, formando un prodotto insolubile: il magnesio pirofosfato. Dal momento che la concentrazione di Mg^{2+} diminuisce al progredire della reazione LAMP, la reazione può essere quantificata misurando la concentrazione di Mg^{2+} nella mix di reazione. Sulla base di questo fenomeno possono essere utilizzati degli indicatori di ioni metallici fluorescenti quali la calceina (Tomita et al., 2008), o colorimetrici, come il blu di idrossinaftolo (HNB) (Goto et al., 2009) (Figura 15).

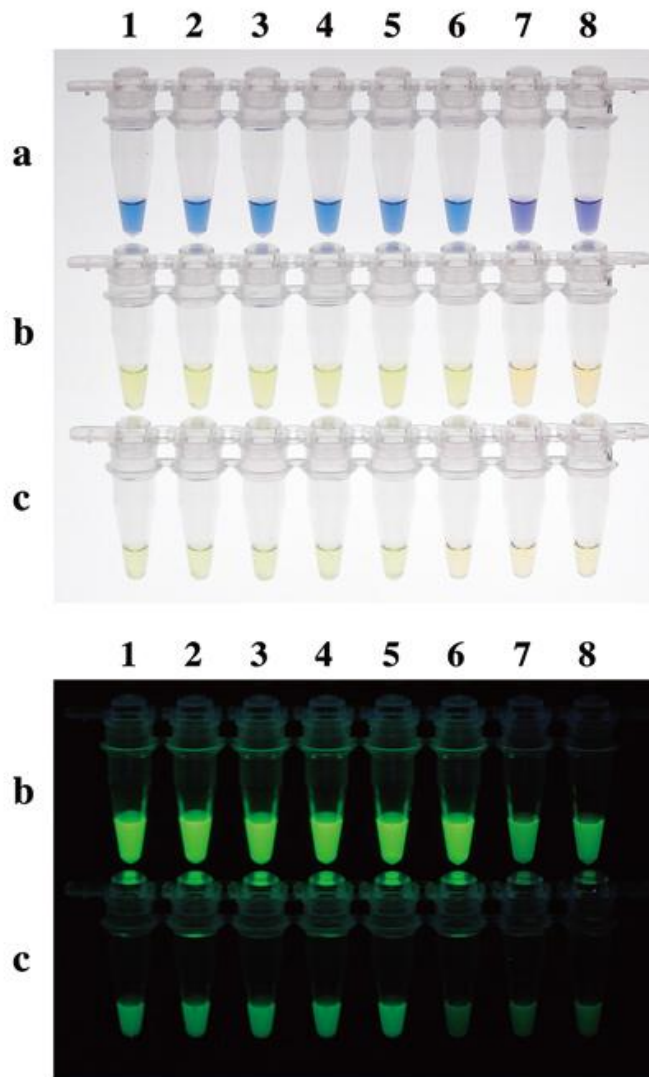


Figura 15 Confronto tra le sensibilità delle reazioni LAMP utilizzando diversi indicatori su diluizioni seriali di DNA A) Visualizzazione day-light a) HNB: il colore vira da violetto (reazione negativa) al blu cielo (reazione positiva) b) SYBR Green e c) calceina: il colore vira dall'arancione (reazione negativa) al giallo-verde (reazione positiva) B) Visualizzazione in seguito ad esposizione ai raggi UV b) SYBR Green e c) calceina: la spiccata fluorescenza indica una reazione positiva. Tubi da 1 a 7: diluizioni seriali di DNA su base 10. Tubo 8: controllo negativo (Goto et al., 2009)

REAL-time

I metodi di visualizzazione end-point sopracitati possono essere utilizzati anche in modalità real-time: SYBR Green I (Patel et al., 2013), Calceina (Mori et al., 2004).

1.8 APPLICAZIONI DELLA LAMP ed evoluzione dalla sua invenzione.

Alla luce dei vantaggi elencati, la LAMP si sta affermando come uno dei metodi più validi per la diagnosi rapida di malattie infettive nei laboratori o per la rilevazione di microorganismi patogeni negli alimenti (Yano et al. 2007). La tecnica LAMP è molto utile in caso di ricerca di patogeni che non crescono in coltura o che crescono in tempi troppo prolungati per poter effettuare una diagnosi tempestiva, come ad esempio i Mycobatteri o i Mycoplasmi. La LAMP è una tecnica semplice e valida per la diagnosi rapida delle malattie infettive nei laboratori clinici dei paesi in via di sviluppo perché richiede strumentazioni di laboratorio di base e quindi non costose.

Le principali applicazioni ad oggi sviluppate riguardano:

- Rilevazione di batteri patogeni: ad esempio *Escherichia coli* O157:H7 (Zhao et al., 2010; Zhao et al., 2013), *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare* (Iwamoto et al., 2003), *Salmonella* (Yang et al., 2015).
- Rilevazione di miceti: i tempi necessari all'individuazione della presenza di miceti si riducono notevolmente con l'utilizzo della tecnica LAMP, se confrontati con l'esame istopatologico o la coltura di materiale biologico (Niessen et al., 2014).
- Rilevazione di virus patogeni: la tecnica LAMP è ampiamente utilizzata per la rilevazione di virus a DNA e RNA, in alcuni casi superando la sensibilità della PCR. La LAMP è stata utilizzata con successo nella diagnosi di virus a RNA, con elevata efficienza, aggiungendo la trascrittasi inversa direttamente nella mix di reazione – West Nile, Influenza A virus H7N9, HIV-1 e 2 (Curtis et al., 2014; Liu et al., 2014; Parida et al., 2004, Zeng et al., 2014).
- Rilevazione di parassiti: protozoi quali *Trypanosoma* (Njiru, 2011), *Babesia*, *Cryptosporidium*, *Leishmania* (Karani et al., 2014).
- Rilevazione di *Mycoplasma* spp. Es *Mycoplasma pneumoniae* (Kakuya et al., 2014).
- Applicazione nella rilevazione di cellule tumorali metastatiche. (Muto et al., 2011; Hao et al., 2014).
- LAMP in SNP typing (Nakamura et al., 2007).
- Applicazione nell'identificazione di organismi OGM (Lee et al., 2009).

La tecnica LAMP ha mostrato un notevole sviluppo nel corso degli anni dalla sua invenzione nel 2000. Basti pensare che le voci bibliografiche riportate sul sito PUBMED utilizzando come parole chiave della ricerca “loop-mediated isothermal amplification” sono passate da 32 voci tra il 2000 e il 2004, a 275 voci tra il 2005 e il 2009, a 894 voci tra il 2011 e il 2014.



Figura 16 Rappresentazione grafica del numero di pubblicazioni presenti sul database PubMed utilizzando come parole chiave di ricerca “loop-mediated isothermal amplification” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=loop+mediated+isothermal+amplification>)

1.9 ALTRE TECNICHE DI AMPLIFICAZIONE ISOTERMICA

L'amplificazione isoterma consente di replicare gli acidi nucleici ad un'unica temperatura, permettendone l'utilizzo per le diagnosi POC, dal momento che non necessita di un termociclatore. Negli ultimi vent'anni sono state sviluppate diverse tecniche di amplificazione isoterma. Esse possono essere classificate in quattro categorie in base al tipo di meccanismo enzimatico. Di seguito verranno elencate e descritte le tecniche principali (Niemz et al., 2011; Yan et al., 2014; Li et al., 2015)

1.9.1 Metodi basati sulla trascrizione dell'RNA

Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)

La NASBA è una tecnica di amplificazione isoterma sviluppata per il rilevamento di target RNA, in cui si fa uso di un primer iniziale a cui è legata una sequenza promotore per l'RNA polimerasi. I dettagli della reazione sono riportati nella didascalia della Figura 17. La reazione è condotta ad una sola temperatura, normalmente di 41°C, in presenza sia di dNTPs che di NTPs. A 41°C il DNA genomico del microrganismo bersaglio rimane a doppio filamento e non costituisce un substrato per la reazione di amplificazione. Questo elimina la necessità di trattamenti con DNasi, che sono assolutamente necessari quando il rilevamento dell'RNA viene fatto con l'RT-PCR. La NASBA è in grado di riprodurre 10 milioni di copie del target in 1-2 ore. E' stata commercializzata e sono stati validati numerosissimi saggi per la ricerca di sequenza target RNA come ad esempio HIV, HCV, Cytomegalovirus umano etc (Guatelli et al., 1990; Compton, 1991; Yan et al, 2014; Li et al, 2015).

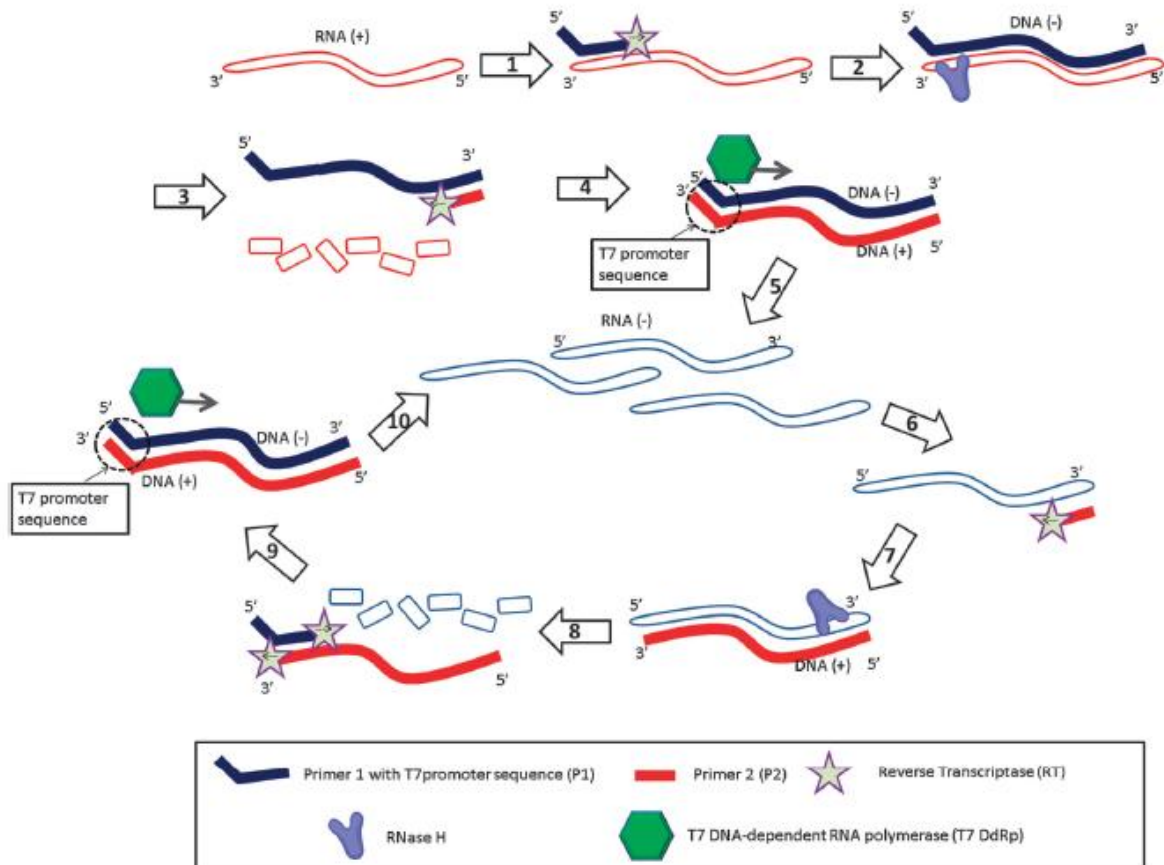


Figura 17 Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). Il primer-promotore si lega al filamento di RNA target, consentendo alla trascrittasi inversa di sintetizzare il singolo filamento complementare di DNA. In seguito il filamento originale di RNA viene degradato ad opera di una ribonucleasi, mentre il nuovo filamento di cDNA rimane intatto. A questo punto si aggiunge un secondo primer che si lega al cDNA, consentendo la sintesi del filamento complementare. Il DNA così ottenuto conterrà la sequenza promotore per la RNA polimerasi, che potrà trascriverlo in migliaia di copie di RNA complementare. RT = Trascrittasi Inversa, T7 DdRp = T7 RNA Polimerasi DNA-dipendente. Gli step 1-5 rappresentano la fase iniziale di amplificazione dell'RNA target originale (+) a RNA target (-). Gli step 6-10 raffigurano la fase di amplificazione dell'RNA (Yan et al., 2014).

Signal-mediated amplification of RNA technology (SMART)

La SMART è una tecnica basata sulla formazione di una struttura a tre vie (*three-way junction* – 3WJ). L'amplificazione ha inizio in seguito al legame di due sonde al target. Le due sonde sono parzialmente complementari l'una all'altra ma questa complementarità non è sufficiente per la loro associazione in assenza di template alle condizioni di reazione. In seguito al legame delle due sonde con il target viene prodotta una struttura 3WJ e una DNA polimerasi sintetizza un doppio filamento a partire dalla sonda più corta. La sonda più lunga contiene una sequenza promotore per la RNA polimerasi. Da un unico target DNA possono essere generate più copie di RNA (figura 18). Sono stati disegnati saggi per la rilevazione di *E. coli* con amplificazione anche a partire da campioni non preparati con tecniche sofisticate (Yan et al., 2014; Li et al., 2015).

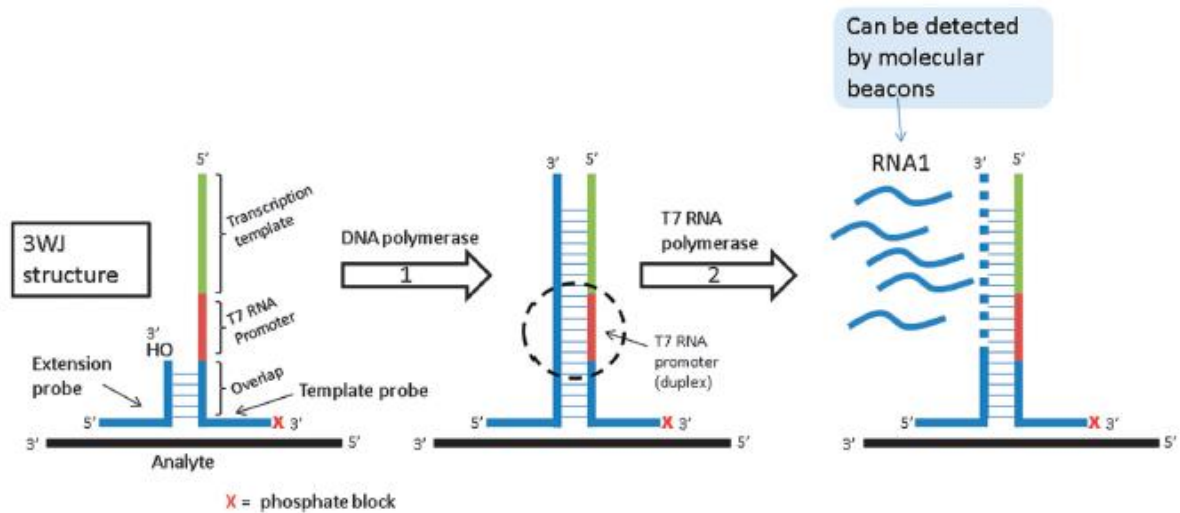


Figura 18 Signal mediated amplification of RNA technology (SMART). Le sonde sono disegnate in modo da legarsi a regioni fiancheggianti del target e successivamente tra di loro grazie ad una porzione complementare. Esse tuttavia non sono in grado di formare complessi stabili tra loro in assenza di target. In seguito alla formazione di una struttura a tre vie dovuta al legame delle sonde prima con il target e in seguito tra loro, la DNA polimerasi estende la sonda più breve. Terminata l'estensione la sequenza di DNA prodotta contiene una regione promotore per la T7 RNA polimerasi, che può essere utilizzata per eseguire copie di RNA multiple. L'RNA prodotto può essere visualizzato con diversi metodi (Yan et al., 2014).

1.9.2 Metodi basati sulla replicazione del DNA attraverso l'utilizzo di un enzima che favorisce il legame dei primer

Helicase-dependent amplification (HDA):

L'amplificazione elicasi-dipendente è una amplificazione isoterica che si basa su una polimerasi e che utilizza una elicasi per denaturare il DNA a doppio filamento anziché utilizzare le alte temperature. La reazione è descritta nella figura 19. L'intero processo avviene ad un'unica temperatura per cui non è necessario l'utilizzo di un termociclatore. La possibilità di utilizzare una elicasi termostabile consente di eseguire la reazione a 60°C aumentandone la sensibilità e la specificità ed eliminando la necessità di utilizzare altre proteine per far procedere la reazione. È stato sviluppato un complesso elicasi-polimerasi in grado di amplificare target fino a 1.5 kb. La specificità ottenuta utilizzando il complesso elicasi-polimerasi è simile a quella raggiunta utilizzando separatamente una DNA polimerasi e una elicasi. L'HDA può essere utilizzata per la ricerca di target a partire da matrici biologiche complesse (come lisati batterici o sangue) e può fornire concentrazioni finali di prodotto che sono milioni di volte quelle di partenza, per cui è stata adattata per la ricerca di numerosi target, come *Treponema denticola* o *Brugia malayi* (Yan et al., 2014).

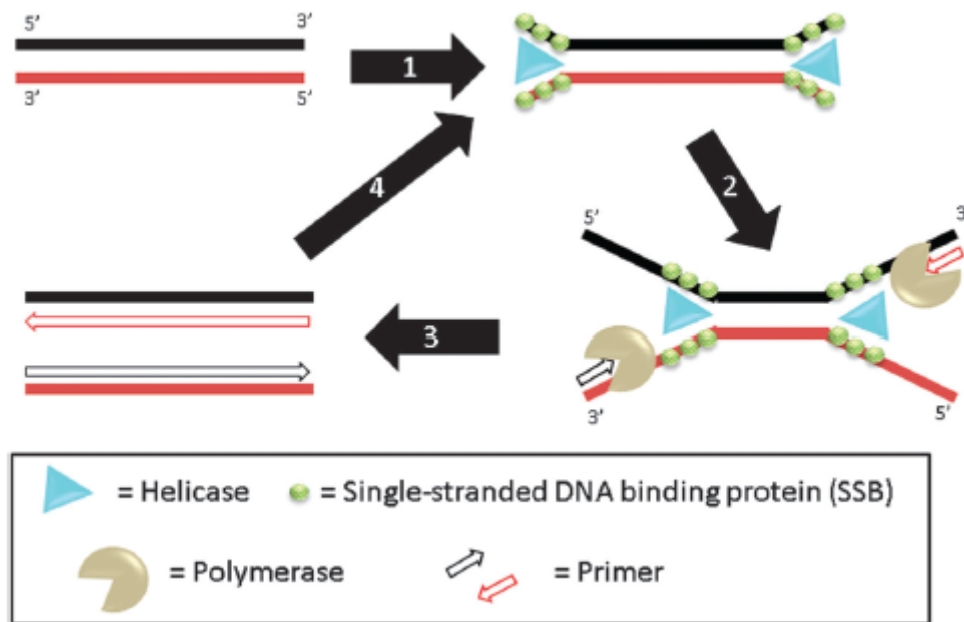


Figura 19 Helicase-dependent amplification (HDA). Durante il primo step, l'elicasi svolge il doppio filamento di DNA per dar luogo a regioni a singolo filamento. Questo processo è facilitato dalle SSB (*single-stranded DNA binding proteins*) e da proteine accessorie. I primer possono legarsi alle regioni a singolo filamento ed essere estesi dalla polimerasi (step 2 e 3). Il filamento così formatosi può essere nuovamente amplificato tramite gli step 1-3 (Step 4). (Yan et al., 2014).

Recombinase polymerase amplification (RPA):

La ricombinasi è una proteina in grado di catalizzare il processo di ibridazione tra piccoli primer oligonucleotidici e la regione target omologa. (figura 20). L'RPA è sensibile e rapida, ma può essere caratterizzata da un elevato rumore di fondo. Per migliorare questo aspetto può essere introdotto un sito di clivaggio su un primer, riconosciuto da una endonucleasi dell'*Escherichia coli* (Nfo). Il primer può essere utilizzato per l'estensione ad opera della DNA polimerasi solo in seguito al clivaggio da parte dell'endonucleasi che espone l'estremità 3'-OH. Il primer può essere inoltre marcato con un fluoroforo ed un quencher in modo che la reazione di clivaggio sia accompagnata da un aumento della fluorescenza. Il clivaggio ad opera della endonucleasi è utilizzato per ridurre il rumore di fondo (figura 21). Sono stati validati saggi RPA per tre marker genetici (apolipoproteina B, Regione determinante il Sesso sul cromosoma Y, e porfobilinogeno deaminasi). La reazione tuttavia è soggetta a condizioni molto stringenti e l'utilizzo di campioni grezzi può essere problematico (Yan et al., 2014).

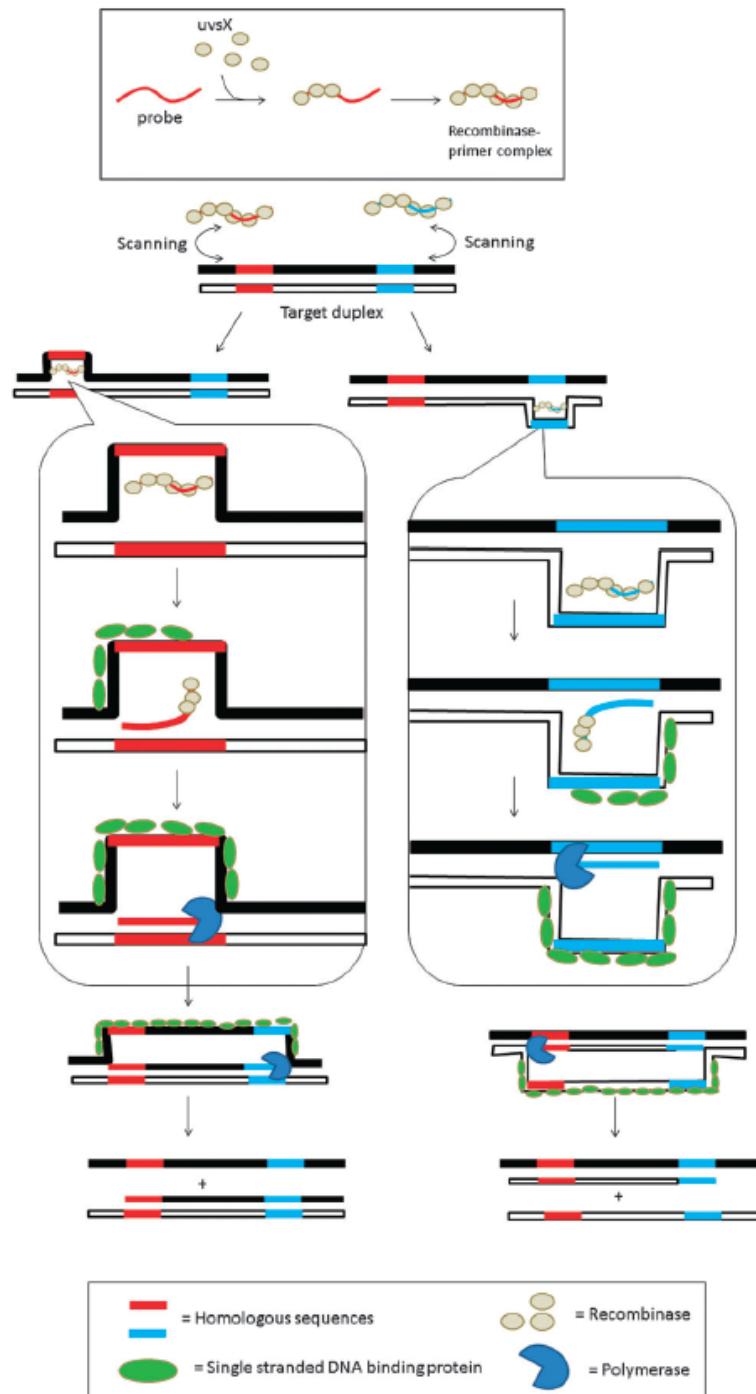


Figura 20 Durante la reazione RPA (Recombinase polymerase amplification), il complesso primer-ricombinasi dà il via al ciclo di amplificazione esaminando il template in cerca di sequenze omologhe. Una volta trovato il sito specifico, l'enzima apre la doppia elica permettendo l'attacco del primer alla sequenza target. Il processo è facilitato dalle SSB che si legano al DNA sotto forma di singolo filamento. Il primer è quindi esteso e il nuovo filamento prodotto scalza il filamento originale. La sequenza sintetizzata è in grado di agire da template per il ciclo successivo (viene quindi raggiunta un'amplificazione esponenziale) (Yan et al., 2014).

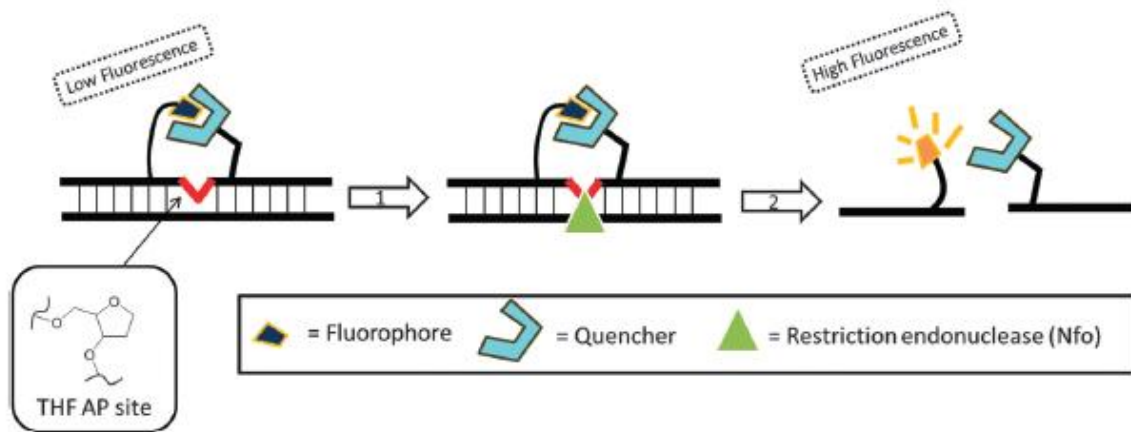


Figura 21 Dopo il clivaggio della sonda ad opera di una specifica endonucleasi (Nfo) viene emesso un segnale fluorescente. THF AP site = tetrahydrofuran abasic site. (Yan et al., 2014)

1.9.3 Metodi basati sullo strand-displacement del DNA di target lineari o circolari mediato da una polimerasi

Rolling circle amplification:

Il principio della *Rolling circle amplification* (RCA) si basa sulla capacità della DNA polimerasi di utilizzare templati circolari per produrre una lunga sequenza di DNA contenente diverse copie del DNA circolare d partenza (Figura 22). Questo metodo è stato utilizzato per identificare le mutazioni responsabili di alcune malattie genetiche come la mutazione G542x a carico del gene CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), la rilevazione di virus come quello di Epstein-Barr in campioni di linfoma umano, le mutazioni dei virus dell'influenza A H1N1 e H3N2, il circovirus suino di tipo 2 e batteri come la *Listeria monocytogenes*. Recentemente è stato sviluppato un saggio RCA basato sull'utilizzo di una *ligation* chimica per circularizzare la sonda.

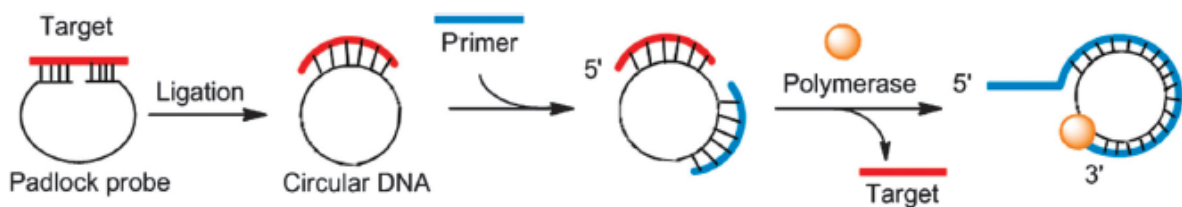


Figura 22 Rolling circle amplification. La RCA può essere abbinata all'utilizzo di una ligasi. Si utilizza una sonda lineare di DNA che viene circularizzata solo in seguito al legame con una sequenza di DNA o RNA specifica. Le due estremità della sonda sono unite dall'enzima DNA ligasi e ciò che ne risulta, una sonda circolare, è utilizzata come substrato dalla polimerasi per produrre una lunga sequenza di DNA che può essere rilevata in diversi modi (Yan et al., 2014).

La TR-RCA (*Target sequence recycled rolling circle amplification*) è basata sullo stesso principio ma non utilizza la ligasi come nella tecnica descritta precedentemente. Nella TR-RCA, il template di DNA circolare necessario per l'amplificazione è fornito già circolarizzato ma il sito di legame del primer è "sequestrato" in una porzione presente sotto forma a doppio filamento, per cui la sonda assume una struttura a manubrio. In seguito al legame con il target, la porzione di template a doppio filamento si apre, rendendo possibile l'*annealing del primer* e quindi l'avvio dell'amplificazione.

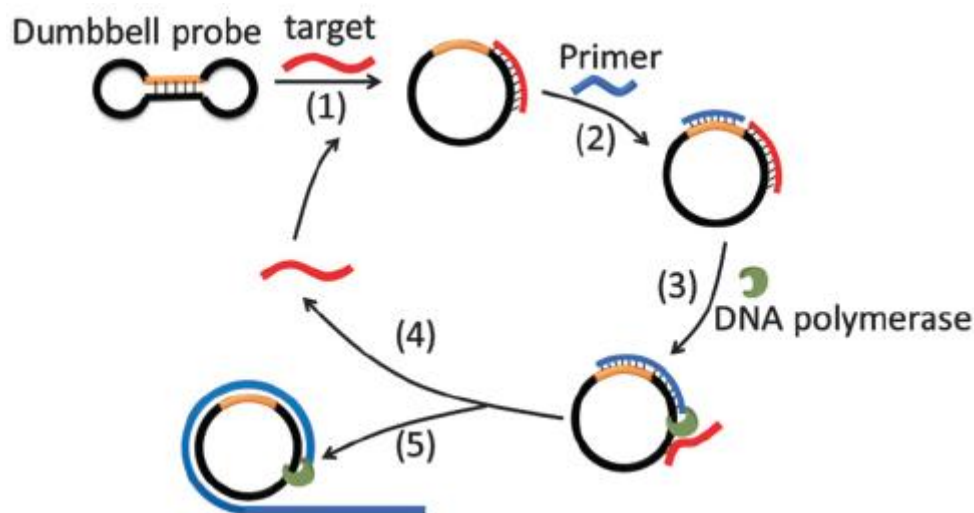


Figura 23: Target sequence recycled rolling circle amplification (TR-RCA). Il target si lega alla sonda a forma di manubrio e fa sì che questa si apra scoprendo il sito di legame del primer e dando il via alla amplificazione (Yan et al., 2014)

1.9.4 Metodi basati sulla estensione con strand displacement ed un singolo evento di taglio del filamento.

Strand displacement amplification (SDA)

Un altro metodo di amplificazione isoterma basato sull'utilizzo di una DNA polimerasi è la Strand Displacement Amplification. Nel metodo originale una sonda è composta da due porzioni: un sito di riconoscimento per l'endonucleasi HincII all'estremità 5' ed un segmento che contiene una sequenza complementare al target. All'interno della mix di reazione sono presenti dGTP, dCTP, dTTP e dATP(α S) (5'-O-L-thiotriphosphate che è resistente all'azione dell'endonucleasi). La DNA polimerasi può estendere il primer ed incorporare la dATP(α S). L'endonucleasi di restrizione HincII scinde la sonda a livello del sito di riconoscimento, ma non è in grado di tagliare il filamento complementare che contiene la deossi-adenosina trifosfato modificata. Il clivaggio ad opera della endonucleasi rivela l'estremità 3'-OH della sonda, che può essere estesa dalla polimerasi. Il filamento così generato contiene un sito di taglio per la HincII. Il clivaggio con conseguente estensione da parte della DNA polimerasi è ripetuto diverse volte dando luogo ad una

amplificazione isotermica a cascata. E' stata descritta una seconda generazione di SDA che utilizza 4 primer (B1, B2, S1 and S2) anzichè due.

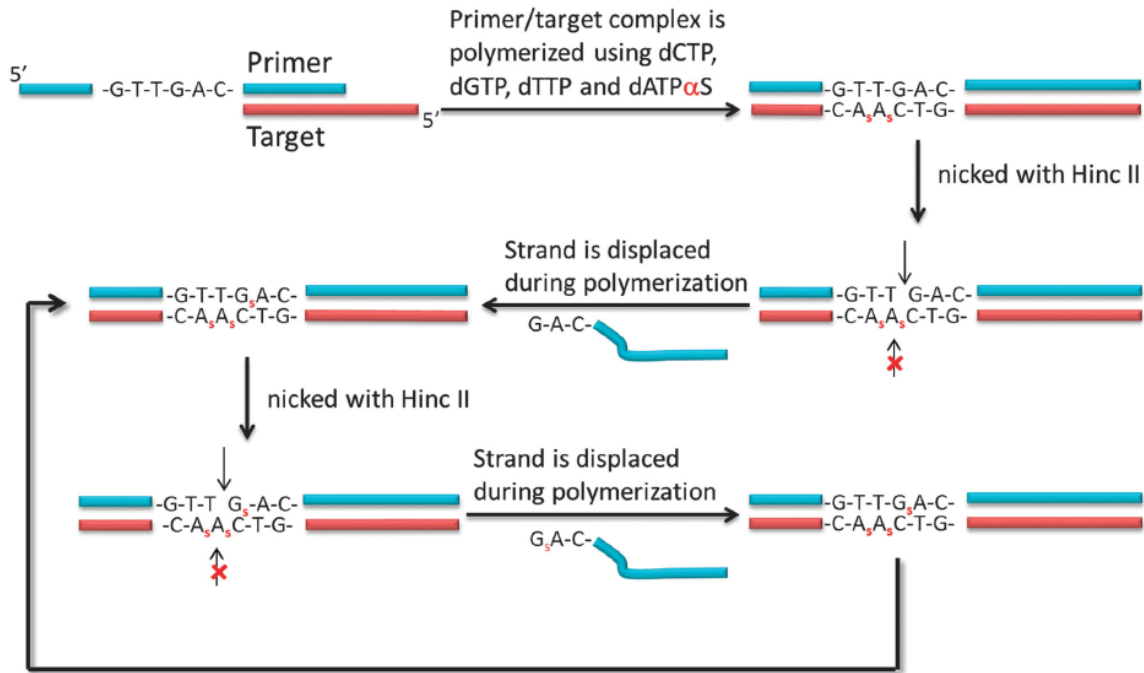


Figura 24 First-generation strand displacement amplification (SDA). Il primer contiene un sito di riconoscimento per l'endonucleasi HincII (5'-GTT//GAC-3') e la sequenza complementare al target. In seguito al legame, un nuovo filamento di DNA è sintetizzato dalla DNA polimerasi. Tuttavia il nuovo filamento contiene un tiofosfato modificato perché sono stati incorporati dATP(α S) presenti nella mix di reazione. Il primer originale è scisso dalla HincII ma non il nuovo filamento di DNA (Yan et al., 2014).

Tabella 1. Sintesi delle amplificazioni isotermitiche trattate (adattato da Yan et al., 2014)

Tecnica	Vantaggi	Svantaggi	Componenti	Applicazione
NASBA	Amplificazione di 10^7 volte in 2 h, kit commerciali disponibili	Non ideale per target DNA	2 primers, Trascrittasi inversa, RNasi H, RNA polimerasi, dNTP, rNTP	RNA genomico HIV-1, RNA virus epatite C, mRNA cytomegalovirus umano, 16S rRNA in diverse specie batteriche, RNA genomico di enterovirus etc
SDA	Amplificazione di 10^5 volte in 2 h	Meno efficient su target lunghi, richiesta preparazione del campione	4 primer, DNA polimerasi, endonucleasi HincII, dGTP, dCTP, dTTP, dATPaS	DNA genomico di <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
LAMP	Amplificazione di $\sim 10^8$ volte in meno di 1 h in presenza di sostanze interferenti	Disegno di primer complesso, non adatta a target brevi	4 primer, DNA polimerasi, dNTP	Patogeni virali, tra cui Dengue, Encefalite Giapponese, Chikungunya, West Nile, Severe acute respiratory syndrome (SARS), virus dell'influenza aviaria ad alta patogenicità (HPAI) H5N1 etc.
RCA	Il prodotto ssDNA rende questa tecnica compatibile con altre amplificazioni isotermitiche	La ligation su un target RNA può risultare problematica	1 sonda, ligasi, polimerasi e dNTP	Gene della fibrosi cistica, virus di Epstein-Barr, influenza A H1N1 e H3N2, circo virus suino tipo 2, <i>Listeria monocytogenes</i> etc.
SMART	Rilevazione di 50 pM di analita in ~ 4 h, tolleranza ai campioni grezzi	Procedimento a due step	2 sonde, DNA polimerasi, RNA polimerasi, dNTP, rNTP	DNA e rRNA di <i>E. coli</i> , DNA e mRNA di virus cianofagi marini
HDA	Amplificazione di 10^6 volte in 3 h, kit commerciali disponibili	Ottimizzazione del buffer complicata	2 primer, elicasi, SSB, DNA polimerasi, dNTP	<i>Treponema denticola</i> , <i>Brugia malayi</i> etc.
RPA	100 copie di analita rilevate in 1 h, selettiva	Condizioni di reazione stringenti	2 primer, ricombinasi, SSB, DNA polimerasi, Nfo, dNTP	<i>Bacillus subtilis</i>

1.10 OBIETTIVI E STRUTTURA DELLO STUDIO

Lo studio ha lo scopo di sviluppare e mettere a punto dei test diagnostici basati sulla tecnica LAMP (Loop-mediated isothermal amplification). Rispetto alle tecniche di amplificazione degli acidi nucleici tradizionali (PCR) la LAMP presenta diversi vantaggi, tra cui la possibilità, una volta validata, di essere eseguita senza l'utilizzo di strumentazioni costose e da personale non altamente specializzato.

L'intento della ricerca è stato quello di realizzare dei POCT (Point Of Care Testing) che rientrano nel gruppo dei test di Diagnostica decentrata. Per POCT si intende qualsiasi procedura analitica eseguita al di fuori del tradizionale laboratorio clinico centralizzato. I vantaggi di tipo organizzativo ed economico dell'applicazione del POCT sono molto importanti. La pratica del POCT, permette infatti di disporre, immediatamente sul campo, delle informazioni contenute in risultati di laboratorio, in modo tale da aiutare a prendere una decisione tempestiva senza dover allungare i tempi e affrontare le problematiche del trasporto del campione.

Molti patogeni verso cui si intende mettere a punto un saggio diagnostico hanno la caratteristica di essere difficilmente diagnosticabili con le metodiche tradizionali microbiologiche-colturali poiché richiedono lunghi tempi di isolamento e costi elevati; in alcuni casi non sono proprio coltivabili. Per tali motivi, sono tutti patogeni candidati ideali per il passaggio ad una diagnosi di tipo bio-molecolare.

Lo studio si è posto anche l'obiettivo di mettere a punto test per la diagnosi di alcune malattie genetiche.

1.11 UTILIZZO DELLA TECNICA LAMP PER LA DIAGNOSI DI MALATTIE INFETTIVE DEL CANE E DEL GATTO

1.11.1 EMOPLASMI FELINI

Introduzione

I micoplasmi emotropi felini (emoplasmi), precedentemente conosciuti con il nome di *Hemobartonella felis*, sono batteri che si vanno a localizzare sulla superficie degli eritrociti e possono indurre un'anemia emolitica in gatti e altri felidi.

Sono state descritte tre specie di emoplasmi felini: *Mycoplasma haemofelis* (*Mhf*), "*Candidatus Mycoplasma haemominutum*" (*CMhm*) e "*Candidatus Mycoplasma turicensis*" (*CMt*). Una quarta specie "*Candidatus Mycoplasma haematoparvum-like*" (*Mhp-like*) è stata recentemente descritta in due soggetti negli Stati Uniti (Skyles et al., 2007).

Le tre specie di maggiore importanza presentano differenti patogenicità, sebbene anche altri fattori influenzino il corso della malattia. *Mhf*, la cui infezione spesso esita in emolisi e grave anemia, risulta essere la specie più patogena. *CMhm* e *CMt* sono caratterizzati da minor patogenicità: spesso infezioni provocate da questi due batteri possono causare delle alterazioni a livello dei parametri eritrocitari, sebbene non sia normalmente indotta un'anemia clinicamente evidente. (Tasker et al., 2010). Le infezioni da emoplasmi risultano essere più severe in animali che presentano patologie concomitanti o stati di immunodeficienza. Infezioni da Retrovirus sembrano costituire un fattore predisponente alle infezioni e possono anche esse esacerbare la gravità della malattia (Harrus et al. 2002)

Lo stato di portatore a lungo-termine appare essere particolarmente comune in seguito ad infezione da *CMhm*, sebbene siano stati descritti alcuni casi di negativizzazione alla PCR con e senza trattamento antibiotico (Willi et al. 2006). I gatti infettati con *Mhf* possono spontaneamente eliminare l'infezione dal sangue periferico senza trattamento antibiotico e un comportamento analogo è stato riscontrato nei gatti infettati da *CMt*. E' chiaro come diventi difficoltoso predire lo stato di portatore a lungo-termine dal momento che esiste questa notevole variabilità. Negli animali che si sono infettati con una qualsiasi delle tre specie di emoplasma, esiste il rischio potenziale di una riattivazione, che può esitare nuovamente in malattia clinicamente evidente, sebbene la riattivazione dell'infezione non risulti essere comune una volta che l'infezione acuta è stata superata (Barker et al., 2013).

I micoplasmi non possono essere coltivati *in vitro*, e lo sviluppo di tecniche di amplificazione del DNA ha aumentato le possibilità di rilevare la presenza di infezioni sostenute da questi agenti.

Negli ultimi anni sono stati validati diversi saggi che utilizzano metodiche PCR tradizionali, real-time o Taqman® PCR. La maggior parte di essi utilizzano come target il gene rRNA 16S (16 ribosomal RNA gene). Dagli studi sono emerse diverse prevalenze che variano dal 14,5% al 43,43% (Jensen et al. 2001, Tasker et al. 2003, Skyes et al. 2007, Gentilini et al. 2009, Martinez-Diaz et al. 2013, Jenkins et al. 2013).

Tuttavia la PCR è una tecnica costosa e difficoltosa da condurre, se non all'interno di laboratori altamente specializzati.

Attraverso questo studio sono stati disegnati e validati in vitro e in campo tre saggi basati su tecnica LAMP per la ricerca dei tre micoplasmi emotropi ad oggi noti nella specie felina: *Mycoplasma haemofelis*, "*Candidatus Mycoplasma haemominutum*" e "*Candidatus Mycoplasma turicensis*".

Materiali e metodi

Standard di riferimento

Dal momento che i micoplasmi non possono essere coltivati in vitro, le prove di validazione sono state condotte clonando il gene 16S rRNA all'interno di un plasmide. Il gene 16S rRNA è stato amplificato utilizzando i primer universali: 27F_Universal 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAGF 3' e 1492R_Universal 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'. In seguito a corsa elettroforetica su gel d'agarosio, il prodotto ottenuto dalla PCR è stato purificato e clonato all'interno di un vettore PCR®4-TOPO® (Invitrogen) utilizzando cellule competenti Top 10 one shot. Per verificare la presenza dell'inserito è stata condotta una seconda PCR utilizzando i primer M13 forward e reverse. Infine il gene clonato è stato sequenziato con l'utilizzo di Big Dye Terminator v1.1 kit (Applied Biosystems) su sequenziatore automatico ABI Prism 310. I plasmidi sono stati poi linearizzati attraverso una endonucleasi (NcoI) (New England Biolabs, Euroclone, Milan, Italy), quantificati con il QuantiFluor dSDNA System (Promega) e diluiti serialmente.

Scelta del target e disegno dei primer LAMP

I primer sono stati disegnati con l'aiuto del programma online PrimerExplorer v 4.0 (Fujitsu) utilizzando come templatò una sequenza derivante dall'allineamento delle sequenze disponibili sul database GenBank del gene 16S rRNA di *CMhm*, *CMt* e *Mhf*. Le sonde sono state acquistate da Sigma-Aldrich. I primer FIP e BIP erano purificati con HPLC.

Reazione LAMP

La reazione LAMP è stata eseguita in una mix contenente: 2.5 µl di 10X ThermoPol Reaction Buffer (New England Biolabs), 4mM di MgSO₄, 1 mM di dNTPs (250 µM each), 8 U di *Bst* DNA polimerasi (New England Biolabs, MA, USA), 200 nM di F3 e B3, 500 nM di LF and LB, 1,4 µM di FIP e BIP (1,6 µM di FIP e BIP per cMhM), 1,0 M di betaina (Sigma-Aldrich) per cMt e cMhm, mentre sono stati utilizzati 1,8 M di betaina per Mhf. Per la valutazione real-time è stato aggiunto SYBR Safe all'1X di concentrazione finale. Infine sono stati aggiunti 5 µl di gDNA ed un volume di acqua per biologia molecolare fino a raggiungere un volume totale di 20 µl.

La mix di reazione è stata incubata a 65°C per 70 minuti e successivamente a 80°C per 10 minuti al fine di terminare la reazione.

Sensibilità e specificità

Al fine di valutare la sensibilità del saggio LAMP sono stati utilizzati degli standard plasmidici diluiti serialmente in base 10. Tutte le diluizioni sono state analizzate in duplicato. L'ultima diluizione a dare un risultato positivo è stata considerata il *limit of detection* (LOD) della reazione.

La specificità di ogni saggio è stata valutata sottoponendo ad analisi gli standard con concentrazioni più elevate dei due micoplasmi non specifici per la reazione. Ogni diluizione è stata sottoposta a reazione in duplicato.

Per valutare la sensibilità e la specificità del saggio LAMP è stato utilizzato anche il DNA genomico estratto da campioni di sangue in k₃EDTA derivanti da uno studio precedente (Gentilini et al., 2009). In totale erano stati raccolti 307 campioni di sangue intero, ottenuti da gatti visitati presso l'Ospedale Didattico Veterinario dell'Università di Bologna nel periodo dal 1 gennaio al 31 dicembre 2006. Dai campioni è stato estratto il DNA genomico utilizzando il kit d'estrazione NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel), secondo le istruzioni fornite dal produttore e in seguito il gDNA è stato stoccato a -20°C. Dei campioni esaminati, 66 sono risultati positivi alla PCR tradizionale, nested e Taqman® PCR, per almeno uno dei tre micoplasmi, come riportato nello studio precedente (Gentilini et al., 2009).

Tabella 2: Numero e percentuale (prevalenza) di gatti risultati positivi alla PCR per emoplasmi felini (Gentilini et al., 2009)

PCR/Infezione (n = 307)	Numero di gatti infetti	Prevalenza osservata (%)	95% IC
Semi-nested PCR	58	18.9	14.5 – 23.3
Real-time PCR			
<i>CMhm</i>	53	17.3	13.9 – 21.5
<i>Mhf</i>	18	5.9	3.2 – 8.5
<i>CMt</i>	4	1.3	0.0 – 2.6
<i>CMhm alone</i>	36	11.7	8.1 – 15.3
<i>Mhf alone</i>	4	1.3	0.0 – 2.6
<i>CMt alone</i>	1	0.3	0.0 – 1.0
<i>CMhm + Mhf</i>	14	4.6	2.2 – 6.9
<i>CMhm + CMt</i>	3	1.0	0.0 – 2.1
<i>Mhf + CMt</i>	0	0.0	
<i>CMhm + Mhf + CMt</i>	0	0.0	

Risultati

Sensibilità e specificità

La sensibilità in vitro raggiunta dai saggi LAMP è di 86,7 target/μl per *Mycoplasma haemofelis*, 62,5 target/μl per *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e 90,9 target/μl per *Candidatus Mycoplasma turicensis*, tutti amplificati entro i 60 minuti.

Alle stesse condizioni di reazione ogni saggio LAMP non amplifica gli altri due micoplasmi entro i 9×10^7 target/μl per *Mhf* e *CMt* ed entro i 6×10^7 target/μl per *CMhm*.

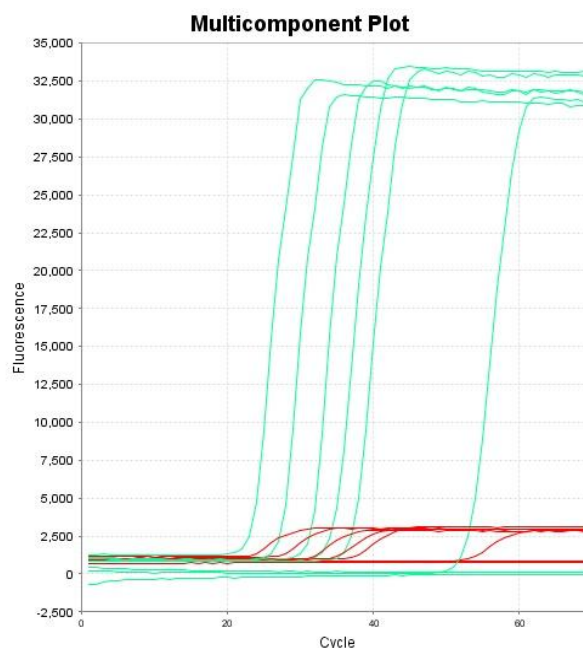


Figura 25: Analisi della sensibilità del saggio LAMP *cmhm* utilizzando gli standard plasmidici: sono state valutate 6 diluizioni in base dieci a partire da 6.3×10^6 target/μl

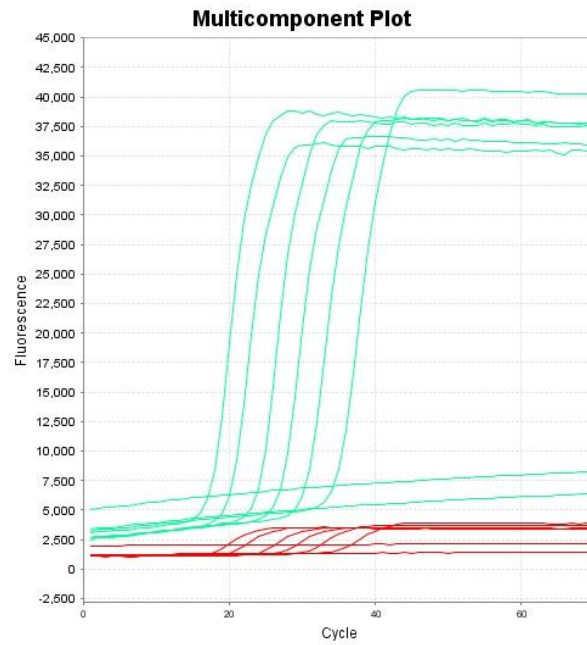


Figura 26: Analisi della sensibilità del saggio LAMP *Mhf* utilizzando gli standard plasmidici: sono state valutate 6 diluizioni in base dieci a partire da 8.7×10^6 target/ μ l

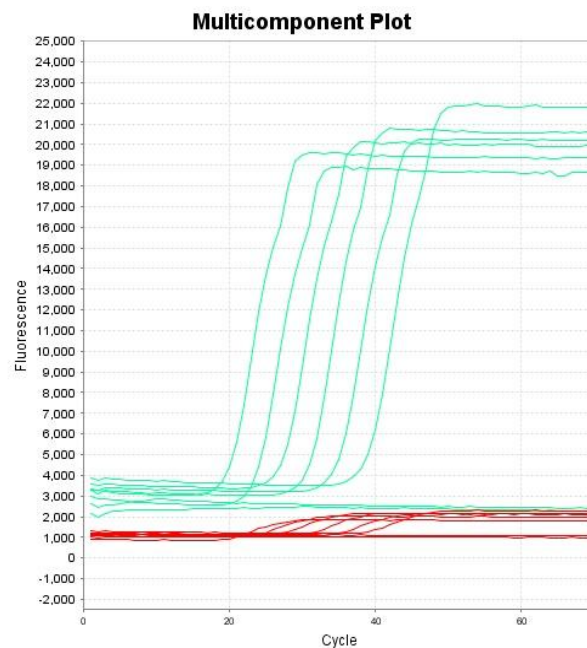


Figura 27: Analisi della sensibilità del saggio LAMP *cMt* utilizzando gli standard plasmidici: sono state valutate 6 diluizioni in base dieci a partire da 9.1×10^6 target/ μ l

Per valutare la sensibilità e la specificità della reazione sono stati utilizzati i gDNA derivanti da uno studio precedente sui micoplasmi (Gentilini et al., 2009).

Per le prove di campo con i tre saggi sono stati testati in totale n = 29 campioni negativi e N = 13 campioni positivi ad almeno uno dei tre micoplasmi. La sensibilità riscontrata è di 0.69, la specificità di 0.93 con un VPP di 0.82 ed un VPN di 0.87.

	Infetti	Sani
Positivi al test	9	2
Negativi al test	4	25

Discussione e conclusioni

Dai risultati ottenuti in vitro i tre saggi presentano una buona sensibilità paragonabile a PCR end point e inferiore a saggi real-time PCR. Occorre sottolineare che come dimostrato da alcuni autori e come abbiamo verificato nella nostra esperienza, l'introduzione dello step iniziale di denaturazione a 95°C incrementa la sensibilità analitica rendendola paragonabile a quella di real-time PCR.

Le prove di accuratezza con campioni di campo sono probabilmente influenzate dai risultati falsamente negativi a LAMP di alcuni campioni di gDNA utilizzati nello studio precedente (Gentilini et al., 2009) e che risultavano positivi con cicli di quantificazione molto elevati (poco target). Tali campioni erano stati sottoposti a numerosi cicli di congelamento e scongelamento con probabile degradazione della matrice. Meno probabile che il risultato sia influenzato dalla scarsa numerosità del target che risultava in ogni caso di alcuni logaritmi superiore al *limit of detection* del saggio. Infine assolutamente improbabile che i campioni siano risultati falsamente negativi per presenza di mismatch nelle sonde LAMP poiché i positivi erano stati sequenziati in precedenza e pertanto le sequenze erano note.

La tecnica LAMP offre il vantaggio di poter essere eseguita senza l'utilizzo di strumentazioni costose, come i termociclatori e il costo per ogni singola reazione è contenuto. Inoltre, la possibilità di liofilizzare la mix di reazione e la disponibilità di metodi di visualizzazione colorimetrici, la rendono facilmente adattabile a questa esigenza. In questo modo si potrebbe facilitare una diagnosi tempestiva e in campo.

1.11.2 PARVOVIRUS DEL CANE E DEL GATTO

Introduzione

Il parvovirus del cane (*Canine parvovirus* – CPV) è stato identificato nel 1978 come l'agente eziologico di una grave gastroenterite e miocardite epizootica nei cani caratterizzata da depressione, perdita di appetito, vomito e leucopenia. Il virus è stato denominato CPV-2 per distinguerlo dal parvovirus (CPV-1) conosciuto fino a quel momento, responsabile di morte neonatale nei cuccioli.

Il parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) è un piccolo virus a DNA monocatenario lineare, presente in singola copia, non dotato di envelope e appartenente al genere parvovirus della famiglia dei *Parvoviridae*.

Il genoma del CPV-2 è costituito da due ORFs (*Open Reading Frames*) principali, una codificante le due proteine non strutturali (NS1 e NS2) e l'altra codificante le due proteine del capsido (VP1 e VP2). È presente una terza proteina, VP3, prodotta da un processo proteolitico a partire da VP2. Sostituzioni aminoacidiche nella sequenza di VP2 sono state dimostrate essere alla base delle proprietà antigeniche del parvovirus canino (Mohan Raj et al., 2010)

Negli anni immediatamente successivi alla sua comparsa, sono state caratterizzate due nuove varianti antigeniche denominate CPV-2a e CPV-2b. Queste due varianti differiscono dal CPV-2 per almeno 5 o 6 aminoacidi della proteina VP2 del capsido. Un'ulteriore sostituzione di un aminoacido in posizione 297 (Ser → Ala) è stata osservata in entrambe le varianti 2a e 2b. Il residuo 297 è localizzato in un sito antigenico minore vicino all'epitopo B e la sua sostituzione può essere responsabile di variazioni antigeniche delle varianti di CPV. I parvovirus canini tipo 2a/2b che presentano questa mutazione a livello del residuo 297 sono stati denominati New CPV-2a/2b.

Infine un'ultima variante antigenica con sostituzione dell'aminoacido in posizione 426 (Asp → Glu) è stata segnalata per la prima volta in Italia e poi riportata anche in altri paesi. Quest'ultima variante è attualmente denominata CPV-2c (Mohan Raj et al., 2010).

La panleucopenia felina è una grave malattia infettiva del gatto causata dal virus della panleucopenia felina (*feline panleukopenia virus* - FPLV) che appartiene al gruppo dei parvovirus felini, assieme al parvovirus del cane tipo 2 (CPV-2). Una malattia causata dal FPLV nel gatto era conosciuta già all'inizio del ventesimo secolo, mentre il CPV-2 è apparso come patogeno nel cane solo negli ultimi anni '70. Pochi anni dopo la sua prima comparsa, il CPV-2 è stato completamente sostituito da due varianti antigeniche, CPV-2a e CPV-2b, che differiscono dalla variante originale per alcune sostituzioni aminoacidi che a carico delle proteine del capsido e per la capacità di infettare altre specie ospite, incluse cellule canine e feline in vitro e cani e gatti in vivo. Il CPV-2a e il CPV-2b sono stati infatti isolati in gatti sani o malati. Anche la terza variante (CPV-2c) è stata rilevata nel gatto. Inoltre sono state segnalati nel gatto casi di infezione simultanea da FPLV e CPV (Decaro et al., 2008).

Ad oggi lo screening per la presenza di parvovirus nelle feci di animali sospettati di aver contratto l'infezione sono eseguiti con test ELISA o saggi basati su emoagglutinazione (HA), ma queste tecniche risultano essere caratterizzate da una bassa sensibilità (Decaro et al., 2005). Con l'avvento della biologia molecolare, sono stati validati diversi saggi PCR per la diagnosi di parvovirosi, sia con metodica tradizionale (Hirasawa et al., 1994; Uwatoko et al., 1995) che real-time (Decaro et al., 2005; Elia et al., 2007, Kumar et al, 2010). Le tecniche PCR sono tuttavia poco applicabili nei casi in cui sia necessario ottenere un risultato tempestivo per la gestione dei pazienti infetti, in quanto possono essere eseguite solo in laboratori specializzati. Vi è ancora quindi la necessità di un test diagnostico che possa essere eseguito in campo e che abbia un'elevata sensibilità e specificità e una delle metodiche che meglio si adattano a questa esigenza è la Loop-mediated Isothermal Amplification.

Materiali e metodi

Scelta del target e disegno dei primer LAMP

I primer sono stati disegnati con l'aiuto del programma online PrimerExplorer v 4.0 (Fujitsu) utilizzando come template una sequenza derivante dall'allineamento delle sequenze disponibili sul database GenBank del gene VP2. Le sonde sono state acquistate da Sigma-Aldrich. I primer FIP e BIP erano purificati con HPLC.

Reazione LAMP

La reazione LAMP è stata eseguita in una mix contenente: 2.5 µl di 10X ThermoPol Reaction Buffer (New England BioLabs), 6mM di MgSO₄, 1 mM di dNTPs (250 µM each), 8 U di *Bst* DNA polimerasi (New England Biolabs, MA, USA), 200 nM di F3 e B3, 500 nM di LF and LB, 1,6 µM di FIP e BIP, 1.0 M di betaina (Sigma-Aldrich). Per la valutazione real-time è stato aggiunto SYBR Safe all'1X di concentrazione finale. Infine sono stati aggiunti 5 µl di gDNA ed un volume di acqua per biologia molecolare fino a raggiungere un volume totale di 20 µl.

La mix di reazione è stata incubata a 65°C per 70 minuti e successivamente a 80°C per 10 minuti al fine di terminare la reazione.

Standard di riferimento

Il gDNA di Parvovirus è stato ottenuto attraverso l'estrazione del gDNA da un ceppo vaccinale (gi|222355193) utilizzando il kit d'estrazione NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel), secondo le istruzioni fornite dal produttore. In seguito alla verifica del funzionamento del set di primer LAMP sul DNA estratto, è

stata eseguita una PCR utilizzando i primer F3 e B3. È stato ottenuto un prodotto di peso molecolare atteso, quindi si è proceduto alla purificazione e al clonaggio dello stesso all'interno di un vettore PCR 2.1-TOPO (Invitrogen) utilizzando cellule TOP10. È stata verificata la presenza dell'inserto ed infine il gene clonato è stato sequenziato con l'utilizzo di un Big Dye Terminator v1.1 kit (Applied Biosystems) su sequenziatore automatico ABI Prism 310. Il plasmide così ottenuto è stato poi linearizzato attraverso una endonucleasi (NcoI) (New England Biolabs, Euroclone, Milan, Italy), quantificato con il QuantiFluor dSDNA System (Promega) e diluito serialmente.

Sensibilità agli inibitori

Al fine di valutare la sensibilità della reazione agli inibitori lo stesso ceppo vaccinale di partenza è stato stemperato in 1 gr circa di feci e sottoposto a diversi metodi di purificazione ed estrazione del DNA.

Una parte di campione è stata sottoposta ad estrazione del gDNA utilizzando il kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel), secondo le istruzioni fornite dal produttore. Una seconda parte è stata posta su una FTA™ Card (Whatman) (Figura 28) ed il gDNA in essa contenuto è stato eluito secondo le istruzioni del fornitore. Infine una terza aliquota è stata impiegata per una lisi rapida con un buffer di lisi e la soluzione risultante diluita 1:10 e 1:100 ed utilizzata come template. Tutte le estrazioni e le prove sono state eseguite in duplicato.



Figura 28: FTA™ Cards (Whatman)

Risultati

Il saggio LAMP è in grado di amplificare il gDNA di parvovirus ottenuto dal ceppo vaccinale entro 60 minuti. La reazione viene inibita, mostrando una crescita ritardata, dalla presenza di inibitori in seguito alle purificazioni del gDNA utilizzando la FTA™ Elute Card (Whatman) e il buffer di lisi. Mentre la crescita non viene influenzata se il gDNA è purificato con il kit di estrazione.

Discussione e conclusioni

Il parvovirus (CPV-2) provoca gravi gastroenteriti negli animali molto giovani ed è un virus molto resistente nell'ambiente e alla azione dei detergenti e disinfettanti. Questo comporta spesso la necessità di arrivare ad una diagnosi il più rapidamente possibile anche per le problematiche legate alla gestione dei pazienti infettati da parvovirus, soprattutto laddove esista una convivenza di più animali.

Le tecniche di screening ad oggi disponibili per la diagnosi di parvovirosi si basano su metodica ELISA o sull'emoagglutinazione. Tuttavia questi test presentano una bassa sensibilità (Decaro et al., 2005). Una tecnica sicuramente più sensibile ma che non permette di arrivare ad una diagnosi in tempi brevi è la PCR. Esistono diversi test in letteratura validati sia nel cane che nel gatto (Hirasawa et al., 1994; Uwatoko et al., 1995; Decaro et al., 2005; Elia et al., 2007, Kumar et al, 2010). Per i limiti già descritti la PCR non si adatta alle tempistiche che necessita la gestione del paziente infetto da parvovirus. Una valida alternativa è rappresentata dalla tecnica LAMP. Essa è infatti in grado di amplificare il gDNA di parvovirus entro 60 minuti ed utilizzando un semplice termo blocco.

La LAMP come descritto in letteratura presenta una elevata tolleranza agli inibitori (Francois et al. 2011) e questo la rende maggiormente adattabile alle esigenze che richiede la diagnosi di Parvovirus. Nel nostro caso, tuttavia, metodi rapidi alternativi non sono stati sufficientemente efficaci nel rimuovere inibitori in quantità tale da rendere efficiente la reazione LAMP e soltanto con kit e protocolli specifici per la purificazione di DNA da feci è stato possibile ottenere l'amplificazione del target.

Non sono al momento state valutate la sensibilità e specificità del saggio LAMP per la ricerca di Parvovirus. In futuro oltre a terminare le prove di validazione in vitro, saranno effettuate prove di campo per confrontare la tecnica LAMP con altre metodiche sia molecolari (PCR) che non (ELISA, HA).

1.11.3 BABESIOSI

Introduzione

La babesiosi è causata da un protozoo del genere *Babesia*. La trasmissione avviene attraverso artropodi vettori e il parassita si localizza a livello dei globuli rossi. Sono state identificate più di cento specie di *Babesia*, ma nel cane prima dell'avvento della biologia molecolare, erano stati descritti solo un esemplare di piccola *Babesia* (*B. gibsoni*) e uno di grande *Babesia* (*B. canis*). Gli studi molecolari, negli ultimi anni, hanno permesso di identificare ulteriori specie di *Babesia*. In particolare sono state descritte tre differenti piccole *Babesie* e quattro specie di grandi *Babesie*.

Grandi Babesie del cane

Babesia canis canis e *Babesia canis rossii* sono le due specie che causano la maggior parte di problemi clinici rispettivamente in Europa e Sud Africa. Negli ultimi anni in letteratura sono stati pubblicati alcuni studi che riguardano casi clinici in cui era coinvolta *Babesia canis vogeli*.

Le tre sottospecie mostrano una notevole differenza per quanto riguarda i sintomi clinici, la distribuzione geografica e i vettori da cui sono trasmesse.

La babesiosi del Sud Africa è causata da *Babesia canis rossii* ed è trasmessa dalla zecca *Haemophysalis*. Questa specie è molto diffusa ed è la più virulenta delle tre.

In Europa ed Asia, la babesiosi è causata da *Babesia canis canis* ed il vettore è la zecca *Dermacentor*. Nelle aree endemiche della Francia, fino all'85% di oltre 500 cani testate, presentavano anticorpi contro la *Babesia*. Circa il 14% ha manifestato segni clinici, e la mortalità era di solo l'1.5%. Quando il paziente andava incontro a morte era per danni epatici e renali (Boozer et al., 2003).

Babesia canis vogeli è trasmessa da *Rhipicephalus sanguineus* e causa una malattia non grave negli Stati Uniti e nelle aree subtropicali.

I segni clinici della babesiosi possono variare da infezioni subcliniche a malattie iperacute fulminanti. Il decorso della patologia dipende dalla specie di *Babesia*, dalla risposta immunitaria e dall'età dell'ospite, dalla presenza di infezioni concomitanti e dall'eventuale esposizione avvenuta precedentemente al parassita. Sono state descritte forme iperacute, acute, croniche e subcliniche di babesiosi.

Babesia canis è in grado di causare diversi segni clinici. Oltre a forme subcliniche può provocare anemia, trombocitopenia, letargia, anoressia, splenomegalia, emoglobinuria, bilirubinuria, febbre e ittero. Nelle forme più gravi può essere accompagnata da insufficienza renale acuta, *acute respiratory distress syndrome* (ARDS), coagulazione intravasale disseminata (DIC), emoconcentrazione, ittero, epatopatie e una forma neurologica denominata babesiosi cerebrale.

Spesso la diagnosi di *Babesia canis* è posta sull'identificazione degli organismi alla lettura dello striscio ematico. Essi vengono più facilmente visualizzati con colorazione di Giemsa o di Field, piuttosto che con le colorazioni rapide. La diagnosi può essere complicata dal fatto che, anche nelle infezioni clinicamente evidenti, non sempre i parassiti vengono visualizzati negli strisci ematici e bassi livelli di parassiti in circolo sono frequenti.

Test sierologici e IFA sono spesso utilizzati ma presentano diversi limiti nelle aree endemiche, esiste la possibilità di cross-reazioni e risultano spesso negativi in animali molto giovani o nelle prime fasi delle infezioni. Gli anticorpi impiegano dagli 9 ai 10 giorni per essere presenti in circolo. Sono disponibili test ELISA e test basati sulla fissazione del complemento ma sono meno utilizzati.

Negli ultimi anni sono state sviluppate anche diversi saggi di biologia molecolare basati su metodica PCR. Una PCR nested che amplifica l'RNA ribosomiale (subunità piccola) è estremamente sensibile e in grado di rilevare una parassite mia dello 0.0001%. Un'altra PCR seminested è in grado di rilevare fino a 50 organismi/mL ed è in grado di discriminare la specie di *Babesia*.

Con l'avvento delle nuove tecniche di amplificazione isoterma, come la LAMP, è possibile ottenere la stessa sensibilità e specificità della PCR, con l'utilizzo di strumentazioni molto meno costose e quindi con la possibilità di effettuare i test al di fuori dei laboratori specializzati, diminuendo così i tempi di refertazione.

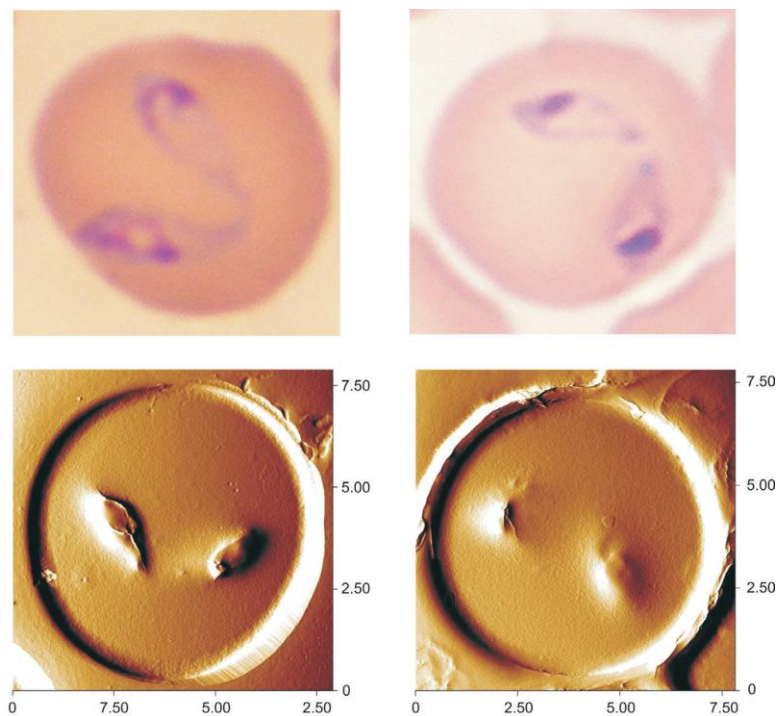


Figura 29: Morfologia di *Babesia canis* e *Babesia rossi*. Le due immagini in alto raffigurano *B. canis* (a sinistra) e *B. rossi* (a destra) in colture in vitro (colorazione con Giemsa). Le immagini in basso rappresentano invece eritrociti infettati da *B. canis* (a sinistra) e *B. rossi* (a destra) visti al microscopio a forza atomica (Schetters et al., 2009).

Materiali e metodi

Scelta del target e disegno dei primer LAMP

I primer sono stati disegnati con l'aiuto del programma online PrimerExplorer v 4.0 (Fujitsu) utilizzando come template una sequenza derivante dall'allineamento delle sequenze disponibili sul database GenBank del gene 18s rRNA 5. Le sonde sono state acquistate da Sigma-Aldrich. I primer FIP e BIP erano purificati con HPLC.

Reazione LAMP

La reazione LAMP è stata eseguita in una mix contenente: 2.5 µl di 10X ThermoPol Reaction Buffer (New England Biolabs), 6mM di MgSO₄, 1 mM di dNTPs (250 µM each), 8 U di *Bst* DNA polimerasi (New England Biolabs, MA, USA), 200 nM di F3 e B3, 500 nM di LF and LB, 1,6 µM di FIP e BIP, 1.0 M di betaina (Sigma-Aldrich). Per la valutazione real-time è stato aggiunto SYBR Safe all'1X di concentrazione finale. Infine sono stati aggiunti 5 µl di gDNA ed un volume di acqua per biologia molecolare fino a raggiungere un volume totale di 20 µl.

La mix di reazione è stata incubata a 65°C per 70 minuti e successivamente a 80°C per 10 minuti al fine di terminare la reazione.

Standard di riferimento

Il gDNA di *Babesia canis* ci è stato fornito da un laboratorio esterno che esegue analisi di biologia molecolare. In seguito alla verifica del funzionamento del set di primer LAMP sul DNA estratto, è stata eseguita una PCR utilizzando i primer Piroplasma for 5' ACTGCGAATGGCTCATTACAACA 3' e rev 5' GCACAAGCTGATGACTTGCGCATAC 3'. È stato ottenuto un prodotto di peso molecolare atteso, quindi si è proceduto alla purificazione e al clonaggio dello stesso all'interno di un vettore PCR 2.1-TOPO (Invitrogen) utilizzando cellule TOP10. È stata verificata la presenza dell'inserito ed infine il gene clonato è stato sequenziato con l'utilizzo di un Big Dye Terminator v1.1 kit (Applied Biosystems) su sequenziatore automatico ABI Prism 310. Il plasmide così ottenuto è stato poi linearizzato attraverso una endonucleasi (NcoI) (New England Biolabs, Euroclone, Milan, Italy), quantificato con il QuantiFluor dSDNA System (Promega) e diluito serialmente.

Risultati

Il saggio LAMP è in grado di amplificare il gDNA di *Babesia canis* entro 60 minuti.

E' stata effettuata una ulteriore prova aggiungendo una quantità nota di gDNA di *Babesia* in un campione di sangue intero in K_3EDTA di cane. Il campione è stato sottoposto ad estrazione del gDNA e testato con il saggio LAMP. L'amplificazione è stata paragonabile alle prove effettuate sul controllo positivo.

Discussione e conclusioni

La tecnica LAMP è semplice da eseguire anche se il personale non è altamente specializzato e senza la necessità di un termociclatore. La diagnosi di babesiosi viene spesso effettuata sulla visualizzazione del parassita alla lettura dello striscio ematico. Tuttavia frequentemente si riscontrano infezioni in cui la carica parassitaria è minima e non rilevabile allo striscio. In letteratura sono descritte diverse PCR in grado di rilevare il DNA di *Babesia*, utili in tutti quei casi in cui si voglia confermare o escludere la presenza di questo parassita. La LAMP presenta quindi diversi vantaggi. In letteratura è stato descritto un saggio LAMP in grado di rilevare il DNA di *Babesia canis*. Lo studio descrive una sensibilità elevata (25 pg gDNA), anche se inferiore a quella della PCR. Inoltre la visualizzazione dei risultati avviene tramite elettroforesi su gel di agarosio (Muller et al., 2010). Questa metodica di visualizzazione comporta elevati rischi di cross-contaminazione in quanto implica l'apertura della provetta di reazione e deve essere eseguita in un laboratorio per poter prevenire questa evenienza.

Il saggio LAMP messo a punto in questo studio ha il vantaggio di poter essere monitorato con metodica real-time che non comporta l'apertura della provetta. Inoltre, esiste la possibilità di aggiungere un colorante alla mix di reazione per permettere la lettura dei risultati anche senza la necessità di un termociclatore real-time.

Non sono al momento state valutate la sensibilità e specificità del saggio LAMP per la ricerca di *Babesia canis*. In futuro oltre a terminare le prove di validazione in vitro, saranno effettuate prove di campo per confrontare la tecnica LAMP con le metodiche molecolari tradizionali (PCR).

1.11.4 TOXOPLASMA GONDII e NEOSPORA CANINUM

Introduzione

Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii è un protozoo intracellulare diffuso in tutto il mondo e in grado di infettare diverse specie animali. L'infezione è spesso asintomatica, ma in alcuni casi può evolvere in forme gravi che possono portare alla morte sia gli animali che l'uomo. Le tre principali cause di infezioni sono: l'ingestione accidentale di oocisti escrete dal gatto, ospite definitivo, l'ingestione di tessuti di animali infetti e la trasmissione verticale (Dubey et al., 2007).

Le alterazioni sistemiche riscontrate nei cani e gatti con toxoplasmosi clinicamente evidenti sono variabili per gravità e tipologia. Nei neonati o nei cani e gatti giovani (ad esempio i gatti infettati per via transplacentare), la toxoplasmosi è spesso fulminante, disseminata e letale. Gli animali adulti possono mostrare diversi segni clinici, i più comuni sono anoressia, letargia, polmonite interstiziale, febbre, epatiti, segni gastroenterici, iperestesia da miosite e vari segni neurologici da infezione del sistema nervoso centrale (Davidson, 2000).

Una volta infettati, gli animali albergano le cisti nei tessuti per tutta la durata della loro vita, le quali negli adulti stimolano una risposta umorale a lungo termine.

Esistono diversi test sierologici per la rilevazione di anticorpi nella diagnosi di toxoplasmosi. Nessuno di questi test usato singolarmente è in grado di confermare definitivamente la diagnosi di toxoplasmosi. Il test tintoriale di Sabin Feldman è molto sensibile e specifico per la toxoplasmosi umana, ma non lo è nel gatto. Inoltre il test è estremamente tecnico e deve essere eseguito in laboratori diagnostici e prevede l'utilizzo di *T. gondii* vitali.

La immuno fluorescenza indiretta (IFA) è paragonabile al test tintoriale ma non utilizza l'antigene vivo. Essa può dare dei falsi positivi. L'IFA può essere adattata per rilevare le IgM, le IgG o le IgA.

Test ELISA per la ricerca di antigeni di *T. gondii*, sia liberi che legati agli immuno complessi sono stati studiati in gatti infettati naturalmente e sperimentalmente. I gatti che manifestano segni clinici e quelli con coinvolgimento oculare sono più predisposti ad avere immunocomplessi nel siero. Sebbene questi risultati possano avere un ruolo nel comprendere il decorso della malattia, il rilevamento di antigeni circolanti non conferma la diagnosi di toxoplasmosi.

La PCR può essere utilizzata per verificare la presenza di *T. gondii* in campioni biologici. La PCR è risultata essere più sensibile della prova biologica nel rilevare l'infezione in gatti infettati sperimentalmente. Essendo molto sensibile essa può identificare gli animali infetti ma non riesce a discriminare le infezioni acute da quelle croniche, subcliniche dovute alla presenza di cisti. La PCR è stata utilizzata per rilevare *T. gondii* nell'intestino e nell'umor acqueo in gatti infettati sperimentalmente. Nell'umor acqueo, il DNA è stato rilevato in maniera transitoria in seguito alla prima inoculazione e alla seconda inoculazione dei gatti

(Dubey et al., 2006). Nei gatti infettati naturalmente, non è stato possibile provare che la presenza di DNA di *Toxoplasma* alla PCR confermasse la diagnosi di toxoplasmosi nei gatti con segni clinici oculari (Powell et al., 2010).

In letteratura sono state descritte diverse PCR, sia nested che real-time, utilizzate per la diagnosi di toxoplasmosi. Lo studio di Montoya et al. del 2010, confronta due saggi PCR, uno nested e uno real-time su campioni provenienti da gatti infettati naturalmente (Costa et al., 2000; Lin et al., 2000), riscontrando una maggior sensibilità nella PCR nested, sebbene la sensibilità sia stata valutata in maniera esaustiva solamente in animali infettati sperimentalmente. Nello studio proposto da Duncanson et al. del 20, è stata invece validata una PCR nested che utilizza il gene SAG-1 come target. Altre PCR nested sono disegnate su una sequenza ripetitiva del gene B1 (Burg et al., 1989, Fuentes et al., 1996).

La diagnostica molecolare rappresenta quindi un concreto supporto per la diagnosi, in particolare se eseguito sui tessuti che si ritiene siano coinvolti dall'infezione, ad esempio liquido cefalo-rachidiano, umor acqueo e BAL.

Neospora caninum

Neospora caninum è un protozoo del *phylum Apicomplexa*. Molti dei casi di neosporosi prima del 1988, sono stati diagnosticati come *T. gondii*. Il cane e il coite sono gli ospiti definitivi ed eliminano le oocisti in seguito alla ingestione di tessuti infetti. Nei cani infettati naturalmente la principale modalità di trasmissione è quella transplacentare (Dubey et al., 2006), sebbene il consumo di carne fresca sia un elemento di rischio per l'infezione da *N. caninum* (Reichel et al., 2007).

Nei carnivori infettati i tachizoiti sono riscontrati dentro i macrofagi, i granulociti neutrofili, il liquido cerebrospinale (CSF) ed in altre cellule nervose e non. La disseminazione dei tachizoiti a diversi organi può accadere durante la fase acuta, con conseguente limitazione dell'infezione da parte del sistema immunitario ai tessuti nervosi e muscolari nei cani affetti dalla malattia cronica.

Dal momento che molti cani a cui era stata diagnosticata la toxoplasmosi prima del 1988, erano in realtà affetti da *N. caninum* la sintomatologia delle due malattie è molto simile, anche se in quest'ultima prevalgono i deficit neurologici e le alterazioni a livello muscolare.

La presenza di anticorpi anti *Neospora* può essere d'aiuto nel confermare la diagnosi di neosporosi. I test disponibili si basano su immunofluorescenza indiretta (IFA), ELISA e immunoprecipitazione (Dubey et al., 2006).

I cani tipicamente sieronegativi convertono nell'arco di due o tre settimane, tuttavia in alcuni casi il titolo anticorpale rimane comunque basso e la titolazione delle IgM non sono utili in caso di cuccioli infettati per via transplacentare. I titoli di IgG si innalzano 1-2 settimane dopo l'infezione. Inoltre i titoli di IgG rimangono elevati per anni in animali esposti all'infezione ma non sintomatici, non è stata fatta nessuna correlazione, infatti, tra i segni clinici e il titolo anticorpale.

Il riconoscimento delle oocisti di *N. caninum* nelle feci è poco sensibile dal momento che esse non sempre si ritrovano. Inoltre esse sono indistinguibili da altre specie appartenenti al *phylum Apicomplexa*.

La diagnosi può essere confermata con l'aiuto delle tecniche biomolecolari come la PCR. Esistono diversi saggi PCR validati in letteratura, di cui la maggior parte utilizza il gene NC5 come target (Hughes et al., 2005, Muller et al., 1996).

Materiali e metodi

Selezione dei campioni

Sono stati selezionati 47 campioni di liquido cerebrospinale (CSF) di casi clinici afferiti al Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna, con sintomatologia neurologica compatibile con le patologie oggetto dello studio e di cui si avevano aliquote di liquor stoccato su cui condurre la validazione "di campo" dei saggi point of care in parallelo all'esecuzione di PCR di controllo. In totale sono stati selezionati 47 soggetti, di cui 34 cani e 13 gatti. I soggetti selezionati sono stati inseriti in tre diversi gruppi per ogni patogeno: liquor infiammatori sospetti di *Toxoplasma* e/o *Neospora*, liquor infiammatori non sospetti e liquor normali.

Parallelamente sono stati raccolti altri 60 liquor provenienti da strutture private per ampliare il numero di casi su cui poter eseguire le prove di campo. Su questi liquor al momento non sono state ancora condotte analisi.

Uno dei 47 soggetti selezionati, provenienti dal Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna, era già risultato positivo alla PCR per *Neospora caninum*.

Scelta del target e disegno dei primer LAMP

I primer sono stati disegnati con l'aiuto del programma online PrimerExplorer v 4.0 (Fujitsu) utilizzando come templatò una sequenza derivante dall'allineamento delle sequenze disponibili sul database GenBank del gene SAG-1 per *T. gondii* e del gene NC5 per *N. caninum*. Le sonde sono state acquistate da Sigma-Aldrich. I primer FIP e BIP erano purificati con HPLC.

Reazione LAMP

La reazione LAMP è stata eseguita in una mix contenente: 2.5 µl di 10X ThermoPol Reaction Buffer (New England BioLabs), 6mM di MgSO₄, 2 mM di dNTPs (500 µM each), 8 U di *Bst* DNA polimerasi (New England Biolabs, MA, USA), 200 nM di F3 e B3, 500 nM di LF and LB, 1,6 µM di FIP e BIP, 1.0 M di betaina (Sigma-Aldrich). Per la valutazione real-time è stato aggiunto SYBR Safe all'1X di concentrazione finale. Infine sono

stati aggiunti 5 µl di gDNA ed un volume di acqua per biologia molecolare fino a raggiungere un volume totale di 20 µl.

La mix di reazione è stata incubata a 65°C per 70 minuti e successivamente a 80°C per 10 minuti al fine di terminare la reazione.

Standard di riferimento

Il gDNA di *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* ci è stato fornito da un laboratorio esterno che esegue analisi di biologia molecolare. In seguito alla verifica del funzionamento dei set di primer LAMP sul DNA di controllo estratto, è stata eseguita una PCR utilizzando i primer F_toxo_sag 5' GCACTGTTGTCCAGGGTTTT 3' e R_toxo_sag 5' ACCTGGAGTCACTTCGGAGA 3' per il clonaggio del gene SAG-1 di *T. gondii* e i primer F_nc5 5' GTGTTGCTCTGCTGACGTGT 3' e R_nc5 5' GTCCGCTTGCTCCCTATG 3' per il clonaggio del gene NC5 di *N. caninum*. Sono stati ottenuti due prodotti di peso molecolare atteso, quindi si è proceduto alla purificazione e al clonaggio degli stessi all'interno di vettori PCR 2.1-TOPO (Invitrogen) utilizzando cellule TOP10. È stata verificata la presenza degli inserti ed infine i geni clonati sono stati sequenziati con l'utilizzo di un Big Dye Terminator v1.1 kit (Applied Biosystems) su sequenziatore automatico ABI Prism 310. Il plasmide così ottenuto è stato poi linearizzato attraverso una endonucleasi (NcoI) (New England Biolabs, Euroclone, Milan, Italy), quantificato con il QuantiFluor dSDNA System (Promega) e diluito serialmente.

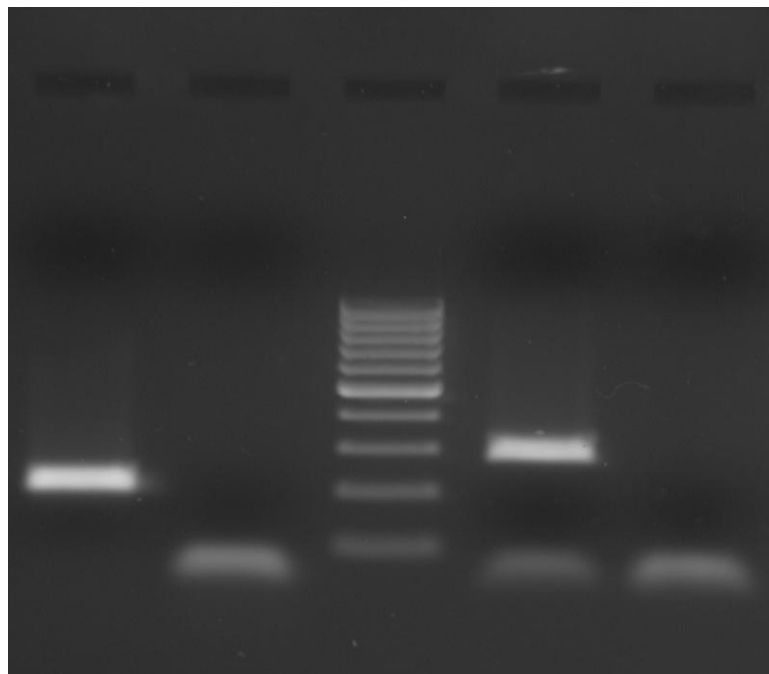


Figura 30 Prodotti di PCR utilizzati per il clonaggio dei geni SAG-1 di *Toxoplasma gondii* e NC5 di *Neospora caninum*

PCR Taqman® per *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*

Sugli stessi campioni, in parallelo alle analisi eseguite con metodica LAMP sono state condotte PCR Taqman per *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*.

Specificità

Sono state eseguite prove con metodica LAMP per verificare che il saggio LAMP per *T. gondii* non amplificasse anche il gDNA di *N. caninum* e viceversa.

Risultati

I saggi LAMP sono in grado di amplificare i gDNA di *T. gondii* e *N. caninum*. E' stato possibile rilevare il gDNA di *Neospora* nel soggetto in cui si era già riscontrato positività alla PCR. Il saggio LAMP per *T. gondii* non amplifica il gDNA di *N. caninum* e viceversa.

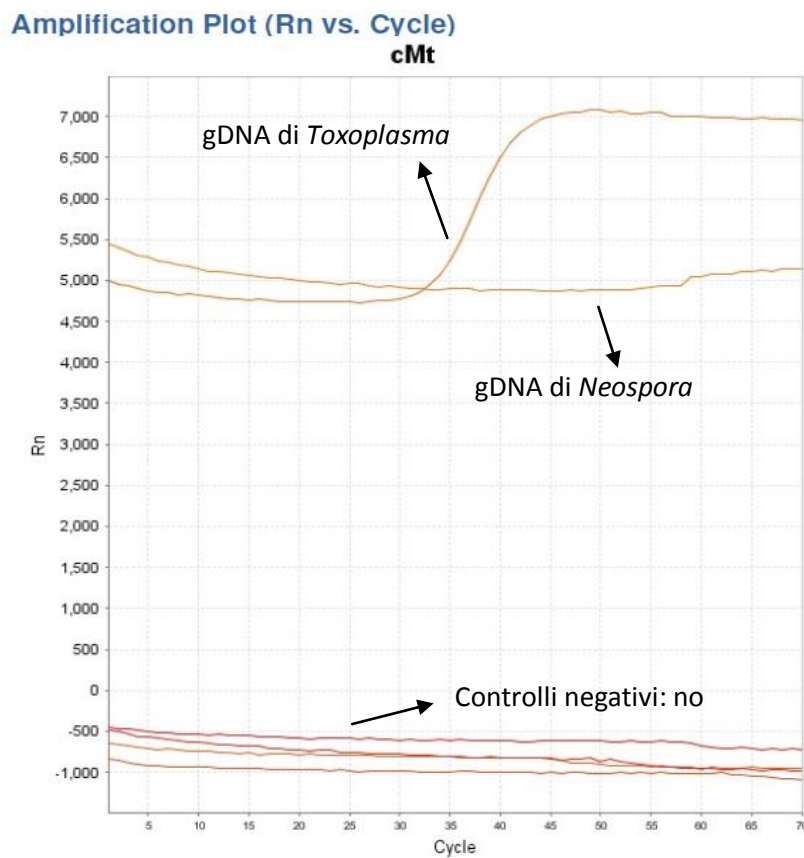


Figura 31: Amplification Plot della amplificazione isoterica per la ricerca di DNA di *Toxoplasma gondii*. Prova di specificità dei primer utilizzati su DNA genomico di *Toxoplasma gondii* e *Neospora Caninum*. Viene amplificato esclusivamente il DNA di *Toxoplasma*.

Discussione e conclusioni

La toxoplasmosi e la neosporosi sono due malattie parassitarie di importanza globale. La toxoplasmosi colpisce diverse specie ed è considerata una zoonosi, mentre la neosporosi è diventata una patologia di interesse sia per gli animali da compagnia, colpendo il cane, che per gli animali da reddito, provocando infatti aborti in diverse specie.

La diagnosi basata sul riconoscimento delle oocisti è complesso sia per *Toxoplasma* che per *Neospora*. Al momento non esistono in commercio test sierologici in grado di dare una diagnosi definitiva di toxoplasmosi e neosporosi. Inoltre lo sviluppo di anticorpi non è immediato e spesso è necessario attendere la sierconversione. Le tecniche PCR presentano il vantaggio di poter aiutare il clinico a fare una diagnosi in tempi più brevi. Con l'avvento della Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) è possibile accorciare ulteriormente questi tempi in quanto essa è una metodica isotermica eseguibile su un qualsiasi termoblocco.

Il saggio LAMP *Neospora* è in grado di rilevare il DNA genomico di neospora nei campioni di campo in cui era già stato rilevato il DNA attraverso la PCR.

1.11.5 LEPTOSPIRE PATOGENE

Introduzione

La leptospirosi è una zoonosi molto diffusa sostenuta da batteri patogeni appartenenti al genere *Leptospira*. La trasmissione all'uomo avviene attraverso il contatto con urine contaminate di animali che eliminano il batterio durante la fase acuta della malattia e nei mesi successivi alla risoluzione della sintomatologia clinica. Nei paesi in via di sviluppo è possibile la trasmissione indiretta attraverso acqua e suolo contaminato. Negli animali da compagnia è raccomandata la rilevazione del DNA nei fluidi corporei dei soggetti sia per fare diagnosi in caso di malattia acuta, sia per identificare i soggetti eliminatori nelle fasi croniche della malattia.

La diagnosi di *Leptospira* tramite l'utilizzo della tecnica PCR può essere eseguita solamente all'interno di laboratori altamente specializzati. Inoltre, esistono delle criticità legate alla conservazione del campione. Le leptospire nelle urine perdono la loro integrità in tempi brevi a causa del liquido in cui sono immerse. Il DNA in esse contenuto viene in questo modo liberato all'interno delle urine stesse ed è fortemente soggetto all'azione delle DNAasi. E' possibile rallentare questo processo conservando le urine a +4°C, condizione non sempre possibile durante la spedizione del campione. L'esecuzione di un test molecolare, senza la necessità di dover spedire il campione, è resa possibile dall'utilizzo della tecnica LAMP.

La tecnica LAMP non necessita di strumentazioni sofisticate e quindi costose. Sono stati già effettuati alcuni studi basati su saggi LAMP per la ricerca del DNA di *Leptospira* in umani e animali (Lin et al., 2009; Sonthayanon et al., 2011; Koizumi et al., 2012). Due di essi utilizzano come target il gene *16S rRNA* ed uno il gene *LipL41*. L'utilizzo del gene *LipL41* per la ricerca di *Leptospira* è stato valutato solo nei roditori. Da diversi studi è emerso che il gene target *16S rRNA* potrebbe non essere adeguato alla diagnosi di *Leptospira* in quanto i test PCR basati su questo gene risultano essere poco specifici (Stoddard et al., 2009; Villumsen et al., 2012)

Il saggio LAMP descritto da Koizumi et al. nel 2012, presenta un'elevatissima sensibilità (2 GE/reazione) ma per ottenerla è necessario denaturare il DNA a 95°C per due minuti, porre la mix in ghiaccio ed aggiungere in seguito la Bst polimerasi. Questa procedura aumenta esponenzialmente il rischio di cross-contaminazione per cui non è possibile eseguirla al di fuori di laboratori specializzati.

Negli ultimi anni è stata valutata l'adeguatezza di un altro target PCR, il gene *LipL32*. La *LipL32* è una proteina di superficie che è presente esclusivamente nelle leptospire patogene (Haake et al., 2000; Murray et al., 2012; Pinne et al., 2013).

Lo scopo di questo studio è stato quello di validare e confrontare due saggi LAMP, uno che utilizza come target il gene *LipL32* ed il secondo che ricerca il gene *16s rRNA* sia su standard di riferimento che su un gruppo di campioni di urine di cane.

Materiali e metodi

Raccolta dei campioni

Sono stati raccolti 184 campioni di urine di cani pervenuti al Laboratorio del Servizio di Patologia Clinica Veterinaria dell'Università di Bologna tra settembre e dicembre 2012. I campioni sono stati selezionati tra quelli sottoposti ad analisi delle urine, indipendentemente dal metodo di raccolta (minzione spontanea, cistocentesi o cateterismo), se, completate le analisi erano disponibili ulteriori 1,5 ml di urine. I campioni sono stati refrigerati per un massimo di 48 h prima dell'estrazione del DNA.

Preparazione del campione ed estrazione del DNA

Sono state apportate delle modifiche al protocollo descritto da Harkin et al., 2003. Si è provveduto a centrifugare 1 ml di urine a 1.200 x g per 10 minuti al fine di eliminare le cellule epiteliali, i leucociti e i cristalli eventualmente presenti. Il surnatante è stato sottoposto ad una seconda centrifugazione a 12.100 x g per 15 minuti. Dopo eliminazione del surnatante, il pellet è stato risospeso in 200 µl di PBS. Dalla soluzione è stato estratto il gDNA utilizzando il kit di estrazione NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel) secondo le istruzioni fornite dal produttore. Il gDNA è stato poi stoccato a -20°C.

Ceppi batterici utilizzati e standard di riferimento

Per le prove di validazione del saggio LAMP è stato utilizzato il DNA genomico estratto da colonie di *Leptospira pomona* e *Leptospira canicola*. Inoltre sono stati allestiti due standard clonando i due geni target, *LipL32* e *16S rRNA*, all'interno di plasmidi. I primer utilizzati per l'amplificazione del gene *LipL32* sono fwdclon_*LipL32* 5' TGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGC 3' e Revclon_*LipL32*: 5' TGAGTGGATCAGCGGGCTCACAC 3', mentre quelli utilizzati per l'amplificazione del gene *16s rRNA* sono 27F_Universal 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAGF 3' e 1492R_Universal 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'. I prodotti ottenuti dalle PCR sono stati purificati e clonati all'interno di vettori PCR 2.1-TOPO (Invitrogen) utilizzando cellule TOP10. Dopo aver verificato la presenza degli inserti i geni clonati sono stati sequenziati con l'utilizzo di un Big Dye Terminator v1.1 kit (Applied Biosystems) su sequenziatore automatico ABI Prism 310. I plasmidi sono stati poi linearizzati attraverso l'utilizzo di una endonucleasi (NcoI) (New England Biolabs, Euroclone, Milan, Italy), quantificati con il QuantiFluor dSDNA System (Promega) e diluiti serialmente.

Sia gli standard plasmidici che i gDNA sono stati quantificati utilizzando il QuantiFluor dsDNA System (Promega). I genomi equivalenti (GE) sono stati calcolati con la seguente formula: GE (o numero di copie plasmidi che) = [concentrazione misurata / peso molecolare calcolato] x 6,02 x 10²³.

Inoltre, al fine di valutare la capacità del saggio di rilevare la presenza di leptospire patogene nelle urine, sono stati utilizzati 20 ceppi inattivati appartenenti a diverse sierovarianti (riportati in Tabella 3).

Tabella 3

Sierogruppo	Sierovariante	Ceppo
<i>Australis</i>	<i>australis</i>	Ballico
<i>Australis</i>	<i>bratislava</i>	Riccio 2
<i>Australis</i>	<i>lora</i>	Riccio 37
<i>Autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>	Akiyami A
<i>Ballum</i>	<i>castellonis</i>	Castellon 3
<i>Bataviae</i>	<i>bataviae</i>	Pavia 1
<i>Canicola</i>	<i>canicola</i>	Alarik
<i>Grippotyphosa</i>	<i>grippotyphosa</i>	Moskva V
<i>Hebdomadis</i>	<i>hebdomadis</i>	Hebdomadis
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>	Bianchi I
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>copenhageni</i>	Wijenberg
<i>Javanica</i>	<i>poi</i>	Poi
<i>Mini</i>	<i>mini</i>	Sari
<i>Pomona</i>	<i>pomona</i>	Mezzano I
<i>Pyrogenes</i>	<i>zanoni</i>	Zanoni
<i>Sejroe</i>	<i>hardjo</i>	Hardjoprajitno
<i>Sejroe</i>	<i>hardjo</i>	Farina
<i>Sejroe</i>	<i>saxkoebing</i>	Mus24
<i>Sejroe</i>	<i>sejroe</i>	Topo 1
<i>Tarassovi</i>	<i>tarassovi</i>	Mitis Johnson

Sensibilità e specificità

La sensibilità del saggio è stata stabilita utilizzando diluizioni seriali del DNA genomico di *Leptospira pomona* e *Leptospira canicola* e dello standard plasmidico in cui sono stati clonati i geni *LipI32* e *16S rRNA*. Ogni diluizione è stata testata in cinque replicati e l'ultima diluizione a mostrare un risultato positivo è stata considerata il LOD della reazione.

Per valutare la specificità del saggio, esso è stato utilizzato con il gDNA purificato di cinque batteri che più comunemente risultano essere patogeni delle vie urinarie nel cane (tabella 4).

Tabella 4

Batterio	Ceppo	[DNA]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	169,8 ng/ml
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 13315	175,0 ng/ml
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	120,0 ng/ml
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	126,4 ng/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	56,12 ng/ml

Scelta del target e disegno dei primer LAMP

I primer sono stati disegnati con l'aiuto del programma PrimerExplorer v4.0 (Fujitsu) utilizzando come template una sequenza derivante dall'allineamento delle sequenze disponibili sul database GenBank del gene LipL32. Le sonde sono state acquistate da Sigma-Aldrich. I primer FIP e BIP erano purificati Reverse Phase.

Reazione LAMP

La reazione LAMP è stata eseguita in una mix contenente: 2.5 µl di 10X ThermoPol Reaction Buffer (New England BioLabs), 4mM di MgSO₄, 2 mM di dNTPs (250 µM each), 8 U di *Bst* DNA polimerasi (New England Biolabs, MA, USA), 200 nM di F3 e B3, 500 nM di LF and LB, 1,6 µM di FIP e BIP, 1,0 M di betaina (Sigma-Aldrich). Per la valutazione real-time è stato aggiunto SYBR Safe all'1X di concentrazione finale. Infine sono stati aggiunti 5 µl di gDNA ed un volume di acqua per biologia molecolare fino a raggiungere un volume totale di 20 µl.

La mix di reazione è stata incubata a 65°C per 70 minuti e successivamente a 80°C per 10 minuti al fine di terminare la reazione.

Risultati

Sensibilità

Utilizzando diluizioni seriali del gDNA di *Leptospira canicola* il saggio LAMP LipL32 è in grado di amplificare fino a 120 GE/reazione mostrando una positività in tutti e cinque i replicati, mentre il LOD è di 1.2×10^1 con una positività di due replicati su cinque. I risultati ottenuti sono paragonabili anche utilizzando il gDNA di *Leptospira pomona*.

Le prove sul saggio LAMP *16S rRNA* hanno mostrato un LOD ed una sensibilità ancora più elevata con la capacità di amplificare 1.2×10^1 in tutti e cinque i replicati.

Tutti i ceppi di *Leptospira* riportati in Tabella 3 hanno dato risultati positivi.

Specificità

Entrambi i saggi LAMP *LipL32* e *16S rRNA* non ha dato amplificazioni positive se utilizzato con i batteri della tabella 4 la cui concentrazione in GE era compresa tra 1.4×10^7 a 5.4×10^7 .

Campioni di campo

Dei 184 campioni di urine testati, un solo caso ha dato esito positivo utilizzando il saggio LAMP *LipL32*, con una prevalenza dello 0.5% (C.I 0.1 - 3.0%). Mentre 12 soggetti su 184 sono risultati positivi al saggio LAMP *16S rRNA*. Un unico caso è risultato positivo anche a due saggi PCR Taqman® che utilizzavano come target i geni *LipL32* e *16S rRNA*.

Discussione e conclusioni

Per la diagnosi di Leptospirosi la tecnica ad oggi considerata il gold standard è il MAT. Il MAT ricerca gli anticorpi contro le *Leptospire* ma è un test complicato da eseguire, controllare ed interpretare, e necessita di colture vitali di tutte le siero varianti (Lucchesi et al., 2004). Esso è quindi eseguibile solamente all'interno di un laboratorio. Inoltre gli anticorpi non sono rilevabile prima di 7 gg dalla comparsa dei sintomi.

Per ridurre le tempistiche di diagnosi di leptospirosi, sono state sviluppati diversi saggi basati su tecniche di biologia molecolare. Le leptospire nelle urine perdono la loro integrità in tempi brevi a causa del liquido in cui sono immerse. Il DNA in esse contenuto viene in questo modo liberato all'interno delle urine stesse ed è fortemente soggetto all'azione delle DNAasi già dopo 90 minuti.

Sono presenti numerosi saggi PCR sia con metodica tradizionale che real-time o che utilizzano sonde Taqman®. I vantaggi che offre la tecnica LAMP, se confrontata con la tradizionale PCR, sono quelli di non necessitare per la sua esecuzione di un termociclatore, con la possibilità di essere eseguita al di fuori di un laboratorio dedicato, di non avere costi elevati e di poter essere condotta anche da operatori non altamente specializzati.

In letteratura sono riportati quattro studi su saggi LAMP per la ricerca di leptospire patogene nelle urine. Tre di questi impiegano come target il gene *16S rRNA*, mentre uno ricerca la presenza del gene *LipL41* (Lin et al., 2009; Koizumi et al., 2012; Sonthayanon et al., 2011; Suwancharoen et al., 2012). Tuttavia ad oggi nessun test è stato validato nel cane.

In questo studio sono stati confrontati due target PCR di *Leptospira*: il gene *16S rRNA* e il gene *LipL32*. Recenti studi hanno messo in dubbio la specificità dei test PCR che si basano sul riconoscimento del gene *16S rRNA* (Stoddard et al., 2009; Villumsen et al., 2012). La *LipL32* è una proteina di superficie presente

esclusivamente nelle leptospire patogene (Haake et al., 2000; Murray et al., 2012; Pinne et al., 2013) e quindi può rappresentare un target adatto per l'allestimento di saggi biomolecolari.

La sensibilità ottenuta con i saggi LAMP è simile a quella propria dei saggi PCR, mentre la specificità varia in dipendenza del gene utilizzato come target. La LAMP può essere un test valido come test di screening laddove ci sia la necessità di una diagnosi tempestiva. Inoltre può essere effettuata al di fuori dei laboratori specializzati evitando così i problemi legati alla spedizione dei campioni.

1.12 UTILIZZO DELLA TECNICA LAMP PER LA DIAGNOSI DI MALATTIE INFETTIVE NEL CAVALLO

1.12.1 BABESIA CABALLI e THEILERIA EQUI

Introduzione

La piroplasmosi equina, causata da *Theileria equi* e da *Babesia caballi*, è una malattia protozoaria importante dal punto di vista economico per cavalli, asini, muli e zebre in regioni tropicali e non, inclusi Centro e Sud-America, Africa ed Europa (Xie et al 2013). Questi parassiti sono trasmessi dalle zecche del genere *Boophilus*, *Hyalomma*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus*. Al momento, solo USA, Canada, Giappone, UK e Australia sono considerate piroplasmosi-free e in questi stati vigono dei regolamenti per l'importazione di animali altamente restrittivi per prevenire l'introduzione di questi parassiti (Alhassan et al., 2007).

La sintomatologia provocata dall'infezione da *T. equi* è indistinguibile da quella provocata da *B. caballi*. La distinzione tra in due patogeni può essere importante per il trattamento e per il controllo della patologia (Xie et al., 2013)

In seguito alla rilevanza clinica sempre maggiore delle piroplasmosi sono stati condotti diversi studi con lo scopo di migliorare i test diagnostici attualmente disponibili. Sebbene la diagnosi definitiva venga posta sull'identificazione dei parassiti allo striscio ematico, queste tecniche presentano diversi limiti di sensibilità, soprattutto durante le infezioni croniche a causa della bassa carica parassitaria in circolo. Per questo motivo, sono stati sviluppati diversi test basati su metodica ELISA e su metodiche di biologia molecolare e sono state migliorate in questo modo sia la sensibilità che la specificità. I metodi che si basano su tecniche biomolecolari hanno il vantaggio di andare a ricercare un target DNA che rimane invariato durante l'intero ciclo vitale del parassita. Dal primo articolo pubblicato per la diagnosi di babesiosi (Fajrimal et al., 1992) sono seguiti centinaia lavori sulla rilevazione di questi organismi tramite tecnica PCR (Alhassan et al., 2007; Criado-Fornelio, 2007).

Tuttavia, questi saggi molecolari necessitano termociclatore ed altri strumenti costosi, che la rendono una tecnica non facilmente adattabile alla diagnosi di routine, specialmente nei paesi poveri di risorse. Recentemente, l'introduzione della loop mediated isothermal amplification (LAMP) ha fornito la possibilità di sviluppare saggi diagnostici rapidi, sensibili e senza l'utilizzo di strumentazioni costose. Per questo motivi la LAMP risulta una pratica alternativa alle tecniche di PCR tradizionali per lo screening e la diagnosi della piroplasmosi equina.

In questo studio è stato sviluppato un saggio LAMP per la diagnosi di *Theileria equi* e *Babesia caballi*.

Materiali e metodi

Scelta del target e disegno dei primer LAMP

I primer sono stati disegnati con l'aiuto del programma online PrimerExplorer v 4.0 (Fujitsu) utilizzando come template una sequenza derivante dall'allineamento delle sequenze disponibili sul database GenBank del gene 18s rRNA. Le sonde sono state acquistate da Sigma-Aldrich. I primer FIP e BIP erano purificati con HPLC.

Reazione LAMP

La reazione LAMP è stata eseguita in una mix contenente: 2.5 µl di 10X ThermoPol Reaction Buffer (New England BioLabs), 6mM di MgSO₄, 1 mM di dNTPs (250 µM each), 8 U di *Bst* DNA polimerasi (New England Biolabs, MA, USA), 200 nM di F3 e B3, 500 nM di LF and LB, 1,6 µM di FIP e BIP, 1.0 M di betaina (Sigma-Aldrich). Per la valutazione real-time è stato aggiunto SYBR Safe all'1X di concentrazione finale. Infine sono stati aggiunti 5 µl di gDNA ed un volume di acqua per biologia molecolare fino a raggiungere un volume totale di 20 µl.

La mix di reazione è stata incubata a 65°C per 70 minuti e successivamente a 80°C per 10 minuti al fine di terminare la reazione.

Standard di riferimento

Il gDNA di *Theileria equi* e *Babesia caballi* ci è stato fornito da un laboratorio esterno che esegue analisi di biologia molecolare. In seguito alla verifica del funzionamento del set di primer LAMP sui DNA estratti, è stata eseguita una PCR utilizzando i primer Piroplasma for 5' ACTGCGAATGGCTCATTACAACA 3' e rev 5' GCACAAGCTGATGACTTGCGCATAC 3'. Sono stati ottenuti dei prodotti di peso molecolare atteso, quindi si è proceduto alla purificazione e al clonaggio degli stessi all'interno di vettori PCR 2.1-TOPO (Invitrogen) utilizzando cellule TOP10. È stata verificata la presenza degli inserti ed infine i geni clonati sono stati sequenziati con l'utilizzo di un Big Dye Terminator v1.1 kit (Applied Biosystems) su sequenziatore automatico ABI Prism 310. I plasmidi così ottenuti sono stati poi linearizzati attraverso una endonucleasi (NcoI) (New England Biolabs, Euroclone, Milan, Italy), quantificati con il QuantiFluor dSDNA System (Promega) e diluiti serialmente.

Risultati

Alle condizioni di reazione descritte, il saggio LAMP messo a punto nello studio è in grado di amplificare correttamente il DNA genomico di *Babesia caballi* e *Theileria equi* nell'arco di 60 minuti.

Sono state eseguite delle prove impostando la temperatura di reazione da 63 a 65°C. Tutte le temperature hanno dato esito positivo della reazione in presenza del DNA target, ma a 65°C la reazione risulta essere più specifica.

Discussione e conclusioni

La diagnosi di piroplasmosi nel cavallo viene posta sulla base della rilevazione dei parassiti allo striscio ematico. Tuttavia la carica parassitaria presente può essere minima e l'esame microscopico risultare falsamente negativo.

Sono stati sviluppati diversi test sierologici, basati su IFA o ELISA. L'immuno fluorescenza indiretta presenta dei limiti legati alla dipendenza dall'operatore. Sono state messe a punto diversi saggi di biologia molecolare con metodica PCR (Alhassan et al., 2007; Criado-Fornelio, 2007) e LAMP. Quest'ultima ha il vantaggio di poter essere eseguita al di fuori dei laboratori specializzati. In letteratura sono presenti due studi di validazione di saggi LAMP. Sia lo studio di Alhassan e collaboratori del 2007 che quello di Xie ed al. del 2013 presentano lo svantaggio di dover visualizzare i risultati delle reazioni LAMP tramite elettroforesi su gel d'agarosio. Questa modalità espone ad un elevato rischio di cross contaminazione e deve essere eseguita in un laboratorio specializzato.

La messa a punto del test in questo studio è stata fatta con metodica real-time al fine di limitare il più possibile le contaminazioni. E' stato in seguito messo a punto un metodo di visualizzazione colorimetrico che è applicabile al saggio rendendolo eseguibile in qualsiasi ambiente con un termoblocco come unica strumentazione richiesta.

1.13 UTILIZZO DELLA TECNICA LAMP PER LA DIAGNOSI DI MALATTIE GENETICHE NEL CANE

1.13.1 MALATTIA DI VON WILLEBRAND TIPO I NEL CANE (VWI)

Introduzione

La malattia di Von Willebrand (VWD) è la più comune delle patologie ereditarie dell'emostasi nell'uomo e nel cane e patologie analoghe sono state riportate in diverse altre specie. La patologia causa degli effetti che sono diversi nelle diverse forme e che rendono complessa la diagnosi della malattia e il suo controllo.

La tendenza al sanguinamento della malattia di Von Willebrand è causata da alterazioni sia di tipo quantitativo che funzionali a carico del Fattore di Von Willebrand (VWF), una grande glicoproteina necessaria all'adesione piastrinica.

Le cellule endoteliali sono il sito maggiore di sintesi e stoccaggio del VWF. Le piastrine provvedono a produrne una seconda quota in alcune specie; tuttavia nel cane le piastrine contengono solo tracce di VWF. La vWd di tipo 1 è nella maggior parte delle razze canine, così come nell'uomo, la forma più frequente: si riscontra una carenza generalizzata, talvolta anche minima, del vWf, che però conserva la sua fisiologica struttura multimerica. Solitamente la concentrazione del vWf è minore del 50% rispetto ai valori fisiologici, ma il vWf che è presente ha una normale struttura e in vitro è in grado di sostenere il normale meccanismo di adesione piastrinica. Generalmente la gravità clinica è correlata alla riduzione della concentrazione plasmatica di vWf. La maggior parte dei cani con vWd di tipo 1 e tendenza alla diatesi emorragica, infatti, hanno concentrazioni plasmatiche di vWf minori del 20% (Brooks et al. 1992; Stokol et al. 1995).

Per quanto riguarda il Dobermann, Venta e collaboratori (2004) hanno identificato la mutazione responsabile dell'insorgenza della malattia di von Willebrand nell'ultima base dell'esone 43, ovvero nel nucleotide 7437. In particolare, la mutazione consiste nella sostituzione di un singolo nucleotide: se nella sequenza genetica fisiologica in posizione 7437 si trova una guanina, nella sequenza mutata si assiste alla presenza di una adenina (c.7437G>A).

Possono essere individuate, all'interno del tipo 1, due diverse modalità di trasmissione genetica. Per molto tempo si è creduto che fosse trasmessa in modo autosomico dominante a penetranza incompleta (Littlewood et al. 1987; Brooks 1992; Stokol & Parry 1993), mentre, dopo la caratterizzazione genica, si è verificato che ciò vale per la maggioranza delle razze canine, ma non per tutte: Dobermann, Manchester Terrier, Barboncino e Pembroke Welsh Corgi sarebbero interessate da una trasmissione autosomica recessiva (Johnson et al. 1988; Moser et al. 1996; Brewer 2000; Venta et al. 2000).

E' bene, tuttavia, ricordare che alcuni studi successivi hanno messo in dubbio tale modalità di trasmissione per il Dobermann, riproponendo un meccanismo di dominanza a penetranza incompleta (Riehl et al. 2000; Brooks et al. 2001). Come si può notare, dunque, non si è ancora giunti ad una conclusione inopinabile e definitiva.

GCCCATTATGTGTGGATGGGTGCTAAGTCCAGGAACCTTACTGGGTCTAAAGACTAGGGAACAGTTTTCTGTGTG
 ATATGGGAGGGAGTTAAATGCAATTAAGACAGCGATGAGCCTGGATTAAGGCCACCAAGTGAGTTATTCCTGAG
 CCTGTGGTCCAAGAAGGACTCACCAGCACACACCAG CAATGGCTCTCTAAGGCTGGTGGGCAAGGAAGGGAAG
 AGGGCAAAATCTCCTTCATAAGCATCCCTCCAGGTGGGCAGAGACCATGTTAGTTTTATGTACTGCTGTATTCTCA
 GCACCTAAAGCAAGTCCACACATAGTAGGCACTTACTTATTGTTTCAATGACTGGAATAAGTTTGCTCATGGAAA
 TCTTGTGTTTGTAGGTGTGTGCCACCGAGGCACCATCTACCTGTGGGCCAGTTCTGGGAGGAGGCCTGTGACG
 TGTGCACCTGCACGGACTTGGAGGACTCTGTGATGGGCCTGCGTGTGGCCAGTGCTCCAGAAGCCCTGTGAG
 GACAACTGCCTGTC **G>A** GTAAGGGGAGCAGAGGGGCTGGGCGCTGCCTGGAGCAGGCAAGGGAGAGAGT
 GGGGGAGTGGGGGTTCTGGGAAGGGGCAAGAGACCCCTTGAGTAATTTCTGGTTCAGGGCCAGAGATGAGGG
 GAAGGAGAGGACTGAGGTTGGGTGAAAGGCAGCATTAGGGGAGGATTGCTGTTCTATCTTTCTGTGAGTCTGTC
 CTTGGCCAATGGCCATGTCTGTTGTATGGTCTTGAGTCCAGAGGGCTGTGGAGTTGGTTTGAGCAGAAATTGGA
 TATAACACCTAGAAAGGAGACCTGATTTTTCCCATATCTTCTCCTCAGATATCACCTCAA CCTG CCCCTAGAAC

Figura 32: Mutazione responsabile della malattia di Von Willebrand tipo I nel Dobermann

Materiali e metodi

Disegno dei primer LAMP

I primer sono stati disegnati con l'aiuto del programma online PrimerExplorer v 4.0 (Fujitsu) utilizzando come template la sequenza relativa all'esone 43 presente sul database GenBank. Le sequenze dei primer sono riportate nella tabella 5. Le sonde sono state acquistate da Sigma-Aldrich. I primer FIP e BIP erano purificati con HPLC.

Tabella 5

Von Willebrand tipo I – allele wild type	
F3	CCAGTGCTCCAGAAGCC
B3	ACCTCAGTCCTCTCCTTCC
FIP	TTGCCTGCTCCAGGCAGCG-TGAGGACAACCTGCCTGTCC
BIP	GAGAGTGGGGGAGTGGGGGT-ATCTCTGGCCCTGAACCA
LF	AGCCCCTCTGCTCCCCTTA
LB	AGGGGCAAGAGACCCCTT
Von Willebrand tipo I – allele mutato	
F3	CCAGTGCTCCAGAAGCC
B3	ACCTCAGTCCTCTCCTTCC
FIP	TTGCCTGCTCCAGGCAGCG-GAGGACAACCTGCCTGTCA
BIP	GAGAGTGGGGGAGTGGGGGT-ATCTCTGGCCCTGAACCA
LF	AGCCCCTCTGCTCCCCTTA
LB	AGGGGCAAGAGACCCCTT

Reazione LAMP

La reazione LAMP è stata eseguita in una mix contenente: 2.5 µl di 10X ThermoPol Reaction Buffer (New England Biolabs), 6mM di MgSO₄, 1 mM di dNTPs (250 µM each), 8 U di *Bst* DNA polimerasi (New England Biolabs, MA, USA), 200 nM di F3 e B3, 500 nM di LF and LB, 1,6 µM di FIP e BIP, 1.0 M di betaina (Sigma-Aldrich). Per la valutazione real-time è stato aggiunto SYBR Safe all'1X di concentrazione finale. Infine sono stati aggiunti 5 µl di gDNA ed un volume di acqua per biologia molecolare fino a raggiungere un volume totale di 20 µl.

La mix di reazione è stata incubata a 65°C per 70 minuti e successivamente a 80°C per 10 minuti al fine di terminare la reazione.

Standard di riferimento

Per la verifica del funzionamento dei primer LAMP sono stati impiegati i campioni utilizzati in uno studio precedente (Gentilini et al., 2013). Sono stati selezionati 3 soggetti, uno portatore della mutazione (^{wt/mut}), uno omozigote con entrambi gli alleli mutati (^{mut/mut}) e un soggetto sani (^{wt/wt}).

Risultati

Entrambi i set di primer amplificano un prodotto. Si è deciso di mettere il nucleotide la cui sostituzione causa la malattia di Von Willebrand nell'ultima posizione del primer FIP in modo da rendere l'estremità del primer più instabile nel caso non riconoscesse l'esatta sequenza, aumentando in questo modo la specificità della reazione.

Nelle prove eseguite il set di primer specifico per l'allele wild-type amplifica anche l'allele mutato e viceversa.

Al fine di aumentare la specificità della reazione sono state utilizzate condizioni di reazione più stringenti per favorire la specificità del saggio, aumentando la betaina e diminuendo la concentrazione del primer FIP, ottenendo un miglioramento ma non una specificità sufficiente.

Inoltre sono stati disegnati dei primer FIP e BIP con dei mismatch volontariamente introdotti alle estremità dei primer per rendere più instabile il legame con la sequenza non specifica ma non sono stati ottenuti dei miglioramenti definitivi.

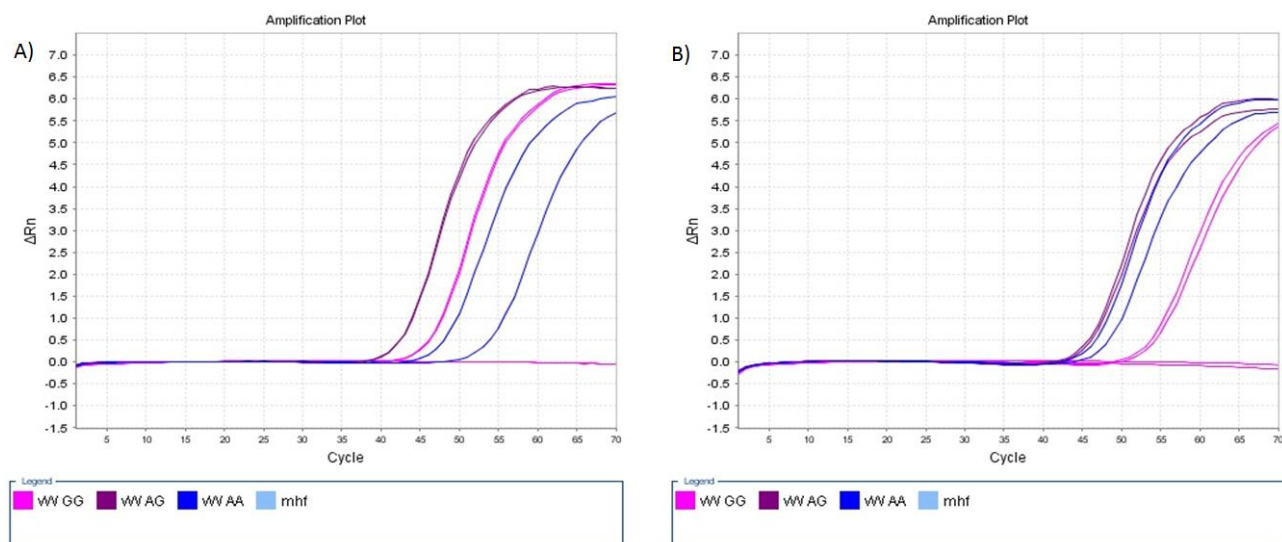


Figura 33: A) Amplification Plot della reazione allestita con i primer per l'amplificazione dell'allele wild-type. B) Amplification Plot della reazione allestita con i primer per l'amplificazione dell'allele mutato.

LEGENDA: vW GG: omozigote wt/wt; vW GA: eterozigote wt/mut; vW AA: omozigote mut/mut

Discussione e conclusioni

Uno degli obiettivi della nostra ricerca è stato quello di mettere a punto un saggio Point of Care per evidenziare la presenza/assenza della mutazione responsabile della malattia di Von Willebrand di tipo I (vWI) nel Dobermann.

Sono stati selezionati tre soggetti di controllo (omozigote wild-type, eterozigote wt/mut e omozigote mutato) di cui era già stato individuato precedentemente il genotipo tramite PCR tradizionale e successivo sequenziamento. Sono stati disegnati e successivamente acquistati due set di sonde per l'amplificazione isoterma rispettivamente dell'allele wild type e dell'allele mutato.

Dopo averli utilizzati per testare i soggetti di controllo selezionati precedentemente, abbiamo constatato che entrambi i set di sonde sono poco specifici in quanto i primer per l'allele wild-type amplificano anche l'allele mutato e viceversa. Ciò è probabilmente dovuto alla tipologia della mutazione responsabile di vWI (Single-nucleotide Polymorphism).

Purtroppo al momento non è stato possibile ottenere dei saggi sufficientemente specifici e in grado quindi di discriminare l'allele wild-type dall'allele mutato.

1.13.2 MIOPATIA CENTRONUCLEARE (CNM) DEL LABRADOR RETRIEVER

Introduzione

La miopatia centronucleare (CNM) è una miopatia ereditaria monogenica a trasmissione autosomica recessiva propria del labrador retriever.

Il quadro clinico è caratterizzato da debolezza muscolare, alterazioni della postura, tra cui ventroflexione del collo e schiena inarcata, alterazioni dell'andatura, come rigidità, passi corti e andatura a salti da coniglio, ridotta tolleranza all'esercizio e riduzione dei riflessi spinali sui quattro arti (Braund, 2003).

Prima dell'identificazione della mutazione, la diagnosi poteva essere posta su base clinica, elettromiografia ed istologica. Recentemente è stata individuata la mutazione: una sequenza SINE all'interno dell'esone 2 del gene della PTPLA, localizzato sul cromosoma 2, è responsabile della comparsa della malattia. Nel cane la PTPLA è intensamente espressa a livello di muscolo scheletrico. Per questo motivo, ad oggi, per porre una diagnosi eziologica definitiva è possibile ricorrere alle tecniche di biologia molecolare. In particolare, tramite tecnica PCR, si può riscontrare la presenza o meno dell'allele mutato a livello del gene PTPLA (Pelé et al., 2005).

Il gene della PTPLA è localizzato sul cromosoma 2, occupa più di 20 kb e comprende 7 esoni (Figura 31) Questa struttura è mantenuta anche nel gene ortologo umano e del topo. (Pelé et al., 2005).

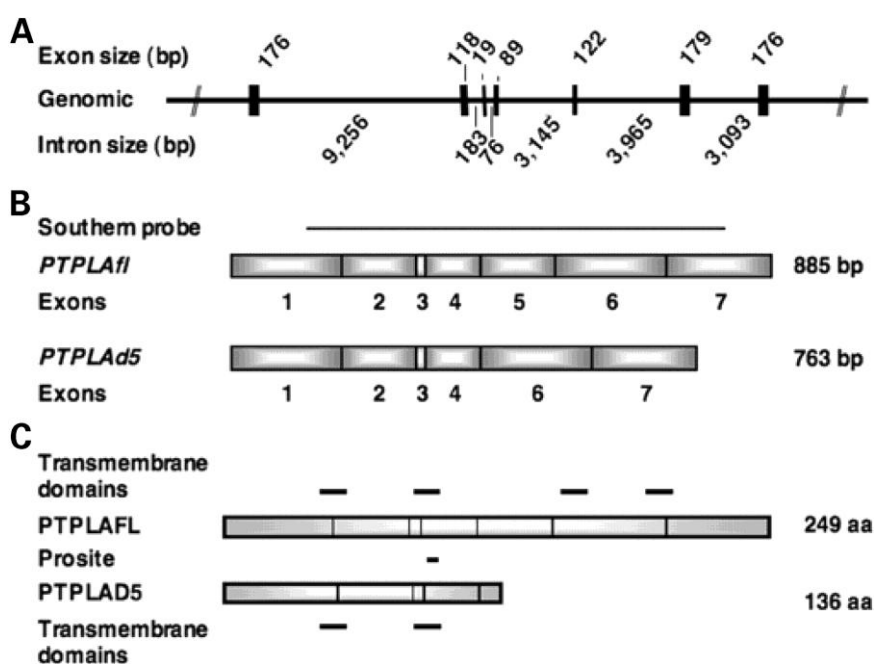


Figura 34: Il gene della PTPLA canina. (A) La struttura del gene è schematizzata come segue: i sette esoni sono indicati dalle linee verticali. La dimensione di ogni singolo esone ed introne è indicata rispettivamente sopra e sotto la linea orizzontale. (B) Nel muscolo scheletrico la PTPLA esiste in due isoforme differenziate tra loro per la presenza (PTPLAfl, full-length) o meno (PTPLAd5, exon 5-deleted isoform) delle esone 5. Ogni riquadro rappresenta un esone, il numero dei quali è indicato al di sotto. (C) Le

sequenze delle proteine PTPLAfl e della PTPLAd5 sono state dedotte dal corrispondente mRNA. I domini transmembranari predetti sono indicati sopra e sotto i disegni. La barra Prosite indica il presunto sito tirosin-fosfatasi-simile (Pelé et al., 2005).

Materiali e metodi

Disegno dei primer LAMP

I primer sono stati disegnati con l'aiuto del programma online PrimerExplorer v 4.0 (Fujitsu) utilizzando come template la sequenza relativa al gene PTPLA canino presente sul database GenBank. Le sequenze dei primer sono riportate nella tabella 6. Le sonde sono state acquistate da Sigma-Aldrich. I primer FIP e BIP erano purificati con HPLC.

Tabella 6

CNM – allele wild-type	
F3	TTCTAGCTATTGCCATGGTA
B3	CTGGATTGGTTTTATACTGTGA
FIP	GCAAGGCAAATGTCTGGAAAAATTCGTTTTTATATGGAAAAAGGAACAC
BIP	TGAGATAGTCCACTGTTTAATTGGGCATAAAGATTCTTGAGCTCACT
CNM – allele mutato	
F3	ACACAGATAGAGAGAGAGGCC
B3	CTATCTCAAGCAAGGCAAAT
FIP	GATCCTGGAGACCCGGGATTTTTAGAGACACAGGCAGAGG
BIP	CAGGGATCCCCACACAAATTTCTGGAAAAATTTAAGTGTCTTCTGA

Reazione LAMP

La reazione LAMP è stata eseguita in una mix contenente: 2.5 µl di 10X ThermoPol Reaction Buffer (New England BioLabs), 6mM di MgSO₄, 1 mM di dNTPs (250 µM each), 8 U di *Bst* DNA polimerasi (New England Biolabs, MA, USA), 200 nM di F3 e B3, 500 nM di LF and LB, 1,6 µM di FIP e BIP, 1.0 M di betaina (Sigma-Aldrich). Per la valutazione real-time è stato aggiunto SYBR Safe all'1X di concentrazione finale. Infine sono stati aggiunti 5 µl di gDNA ed un volume di acqua per biologia molecolare fino a raggiungere un volume totale di 20 µl.

La mix di reazione è stata incubata a 65°C per 70 minuti e successivamente a 80°C per 10 minuti al fine di terminare la reazione.

Standard di riferimento

Per la verifica del funzionamento dei primer LAMP sono stati impiegati i campioni utilizzati in uno studio precedente (Gentilini et al., 2011). Sono stati selezionati 3 soggetti, uno portatore della mutazione (^{wt/mut}), uno omozigote con entrambi gli alleli mutati (^{mut/mut}) e un soggetto sani (^{wt/wt}).

Risultati

Dalle prove condotte solo il set di primer disegnato per la ricerca del gene mutato risulta essere funzionante e specifico per l'allele mutato.

Al contrario sono stati acquistati altri set di primer specifici per l'allele wild-type oltre a quello riportato in tabella 6. Nessuno di questi è stato in grado di ottenere l'amplificazione del target.

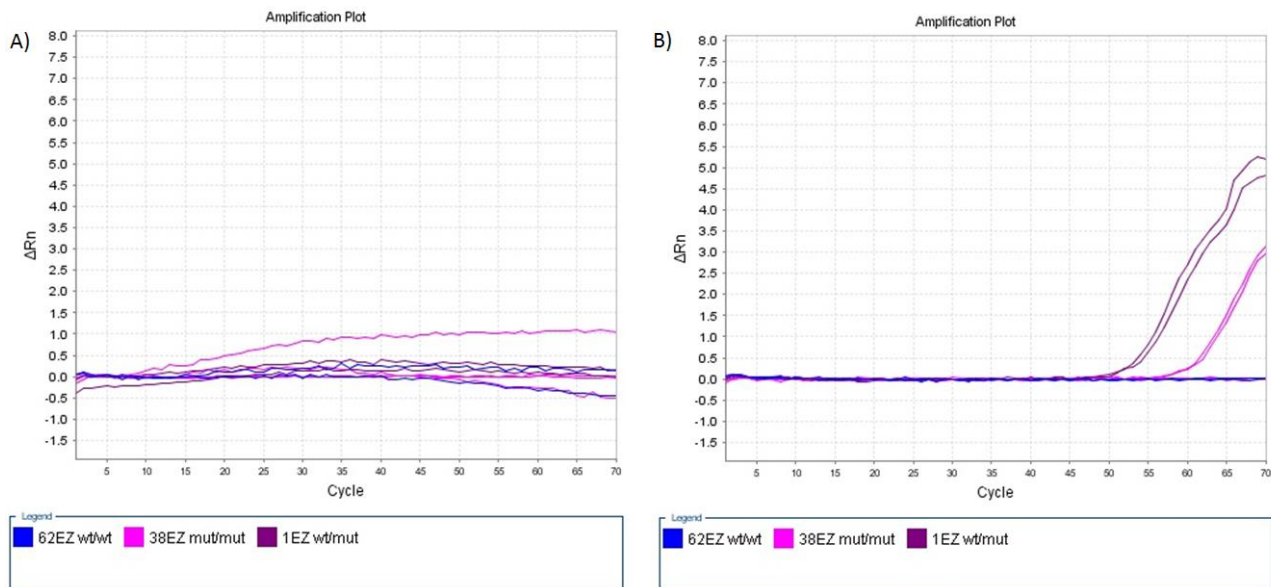


Figura 35: Saggio CNM.: A) Amplification Plot della reazione allestita con i primer per l'amplificazione dell'allele wt della CNM. B) Amplification Plot della reazione allestita con i primer per l'amplificazione dell'allele mutato.

Per studiare meglio la regione, si è deciso di procedere con il clonaggio del target all'interno di un plasmide. Per ottenere il prodotto di PCR da inserire nel plasmide è stato necessario utilizzare delle mix di reazione non standard in quanto il target si è rivelato essere molto complesso da amplificare (Figura 36). Dallo studio dei risultati ottenuti e delle sequenze presenti nei database, è emerso che, a monte della SINE descritta in letteratura come responsabile della patologia, è presente una regione con un'altissima omologia alla SINE stessa.

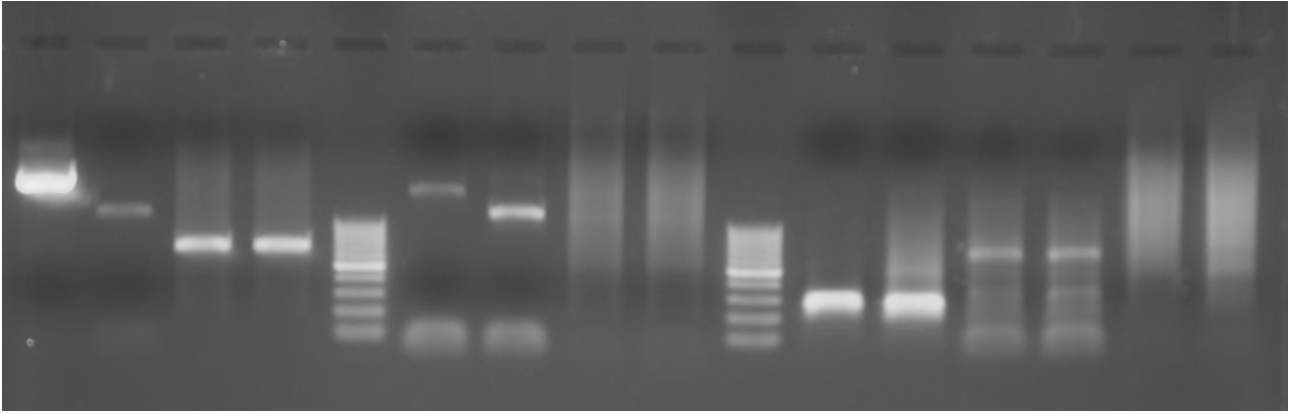


Figura 36: Nell'immagine sono rappresentati i prodotti delle PCR ottenute con diverse coppie di primer sul DNA di un soggetto sano e quello di un soggetto che presenta la mutazione responsabile di CNM in omozigosi. Per allestire le PCR sono state utilizzate mix standard e mix indicate per l'amplificazione di target complessi. Com'è possibile vedere dall'immagine (colonne 8, 9, 15, 16) con la mix standard non è stata possibile l'amplificazione dei target

Si è quindi optato per clonare nuovamente il target includendo una porzione di DNA più ampia che comprendesse anche la sequenza ad alta omologia con la SINE per evitare che le prove di validazione potessero fornire dei risultati non corrispondenti alle prove di campo effettuate nella seconda parte dell'attività di ricerca.

Al momento sono in corso i nuovi clonaggi della porzione di gene interessata.

Discussione e conclusioni

La miopatia centronucleare (CNM) è una miopatia ereditaria monogenica a trasmissione autosomica recessiva propria del labrador retriever.

Il quadro clinico della CNM è caratterizzato da debolezza muscolare (esacerbata dall'esercizio), alterazioni della postura, tra cui testa portata bassa con ventroflessione del collo e schiena inarcata, alterazioni dell'andatura, come rigidità, passi corti e bunny hopping, ridotta tolleranza all'esercizio, riduzione dei riflessi spinali sui quattro arti. (Braund, 2003).

Prima dell'identificazione della mutazione, la diagnosi poteva essere posta su base clinica, elettromiografia ed istologica (Metha et al., 1982).

Ad oggi, per porre una diagnosi eziologica definitiva è possibile ricorrere alle tecniche di biologia molecolare. In particolare tramite tecnica PCR, si può riscontrare la presenza o meno dell'allele mutato a livello del gene PTPLA, localizzato sul cromosoma 2 (Pelé et al., 2005).

Negli ultimi anni le nuove tecniche di amplificazione isoterma hanno mostrato un notevole sviluppo grazie al numero crescente di applicazioni studiate che ha dimostrato il loro potenziale come metodiche di diagnosi decentrata (POCT).

Uno degli obiettivi di questo studio è stato quello di mettere a punto un saggio LAMP per la ricerca della mutazione responsabile della miopatia centronucleare (CNM) del Labrador retriever. La possibilità infatti di esecuzione di questo test permette uno screening seriale dei riproduttori.

Al momento i set di primer disegnati sono stati in grado di identificare solamente la presenza dell'allele mutato.

Nonostante l'acquisto di diversi set di primer per la ricerca dell'allele wild-type, non siamo stati in grado di ottenere l'amplificazione di un prodotto. Abbiamo quindi cercato di comprendere se ci fosse un motivo alla base della difficoltà di amplificare questo target.

Da un approfondimento sulla struttura della sequenza di DNA che contiene la mutazione, è stata riscontrata, nelle immediate vicinanze della SINE che causa la patologia, la presenza di una regione con elevatissima omologia alla SINE stessa.

Per evitare dei risultati fuorvianti nelle prove di campo abbiamo scelto di ripetere i clonaggi del gene all'interno del plasmide comprendendo anche la regione con l'alta omologia con la SINE.

1.14 UTILIZZO DELLA TECNICA LAMP NEL SETTORE AGROALIMENTARE

1.14.1 LISTERIA MONOCYTOGENES

Introduzione

Listeria monocytogenes è un batterio Gram-Positivo, agente eziologico della listeriosi, infezione definita rara dall'Organizzazione Mondiale della Sanità rispetto ad altre malattie a trasmissione alimentare, ma il cui impatto mondiale in Sanità Pubblica è notevole per l'elevata mortalità e l'alto tasso di ospedalizzazione che la caratterizzano (Deng et al., 2010; Renier et al., 2011).

Da batterio essenzialmente saprofita esso può rivelarsi un pericoloso patogeno intracellulare opportunisto, in grado di colpire soggetti debilitati o con deficit del sistema immunitario. Tra le fasce di popolazione a rischio, oltre a donne in stato di gravidanza e neonati, rientrano anziani e soggetti sottoposti a trattamento con farmaci immunosoppressivi, tra cui quelli utilizzati nelle terapie antitumorali, categorie in costante crescita nei Paesi industrializzati. Nei soggetti immunocompetenti, l'infezione si presenta in forma lieve con febbre e/o sintomi gastrointestinali. Di conseguenza, le infezioni sub-cliniche spesso non vengono segnalate e la listeriosi umana viene diagnosticata quasi esclusivamente nelle manifestazioni di setticemia, meningite, meningoencefalite e aborto, rendendo estremamente difficile la stima del reale impatto dell'infezione nella popolazione (Sleator et al., 2009; Belessi et al., 2011).

Nei paesi occidentali, la malattia sta assumendo sempre più una dimensione problematica per la sanità pubblica, sia per la sua potenziale gravità che per il fatto che epidemie si sono manifestate anche in anni recenti nei nostri paesi, soprattutto in seguito alla distribuzione di cibo contaminato attraverso le grandi catene di ristorazione. Infatti, pur essendo un microrganismo asporigeno, è in grado di resistere a molteplici condizioni ambientali sfavorevoli, tra cui pH acido, alte concentrazioni di NaCl, basse temperature (refrigerazione), presenza di sostanze disinfettanti e altri parametri chimico-fisici che caratterizzano gli alimenti o che sono legati alle tecniche di produzione e conservazione degli stessi. Grazie anche alla capacità di produrre biofilm, che rendono difficile e a volte impossibile la decontaminazione delle superfici, rappresenta attualmente uno dei temi di maggior interesse per l'industria alimentare (Liu et al., 2007; Renier et al., 2011).

I metodi microbiologici sono stati di notevole utilità negli anni passati, ma presentano dei limiti evidenti legati alla crescita e al riconoscimento della colonia (Rossmann et al., 2011). Tra le tecniche di biologia molecolare che negli ultimi anni ha trovato larga applicazione nei laboratori di ricerca e di diagnostica, rientra la Real-Time PCR, metodica altamente sensibile ed accurata, che permette l'identificazione in tempo reale dei prodotti di amplificazione. Questo metodo è stato utilizzato per identificare e quantificare la presenza di *L. monocytogenes* negli alimenti e in campioni biologici in molti studi (Gasnov et al., 2005).

I limiti delle tecniche PCR tradizionali sono quelli di poter essere condotte solamente all'interno di un laboratorio specializzato. Con lo sviluppo delle tecniche di amplificazione isoterme degli acidi nucleici, come la LAMP, si è resa possibile l'identificazione del patogeno anche al di fuori dei laboratori, dal momento che queste tecniche non necessitano di strumentazioni sofisticate e nemmeno di personale tecnico altamente specializzato. In letteratura sono già stati validati alcuni saggi basati su tecnica LAMP per la ricerca di *L. monocytogenes* (Tang et al., 2011; Wang et al., 2011; Wang et al., 2012; Wu et al., 2014). Tuttavia questi saggi prevedono la visualizzazione del risultato tramite l'introduzione nella mix di reazione di calceina, che presenta costi relativamente elevati, tramite elettroforesi su gel di agarosio o aggiunta di SYBR Green dopo la reazione per visualizzazione colorimetrica, entrambi metodi che comportano un elevato rischio di cross-contaminazione.

Materiali e metodi

Standard di riferimento

Le prove di validazione sono state condotte clonando il gene *IAP p60* (*Invasion Associated Protein p60*) all'interno di un plasmide. Il gene *IAP p60* è stato amplificato utilizzando i primer Forward 5' AGCTGGGATTGCGGTAACAG 3' e reverse 5' ATACGCGACCGAAGCCAAC 3'. In seguito a corsa elettroforetica su gel d'agarosio, il prodotto ottenuto dalla PCR è stato purificato e clonato all'interno di un vettore PCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen) utilizzando cellule competenti Top 10 one shot. Per verificare la presenza dell'inserito è stata condotta una seconda PCR utilizzando i primer M13 forward e reverse. Infine il gene clonato è stato sequenziato con l'utilizzo di un Big Dye Terminator v1.1 kit (Applied Biosystems) su sequenziatore automatico ABI Prism 310. Il plasmide è stato poi linearizzato attraverso una endonucleasi (NcoI) (New England Biolabs, Euroclone, Milan, Italy), quantificato con uno spettrofotometro e diluito serialmente.

Scelta del target e disegno dei primer LAMP

I primer sono stati disegnati con l'aiuto del programma online PrimerExplorer v 4.0 (Fujitsu) utilizzando come template una sequenza derivante dall'allineamento delle sequenze disponibili sul database GenBank del gene *IAP p60* di *Listeria monocytogenes*. Le sonde sono state acquistate da Sigma-Aldrich. I primer FIP e BIP erano purificati con HPLC.

Reazione LAMP

La reazione LAMP è stata eseguita in una mix contenente: 2.5 µl di 10X ThermoPol Reaction Buffer (New England BioLabs), 4mM di MgSO₄, 1 mM di dNTPs (250 µM each), 8 U di *Bst* DNA polimerasi (New England Biolabs, MA, USA), 200 nM di F3 e B3, 500 nM di LF and LB, 1,4 µM di FIP e BIP, 1,0 M di betaina (Sigma-

Aldrich) per cMt e cMhm, mentre sono stati utilizzati 1,8 M di betaina per Mhf. Per la valutazione real-time è stato aggiunto SYBR Safe all'1X di concentrazione finale. Infine sono stati aggiunti 5 μ l di gDNA ed un volume di acqua per biologia molecolare fino a raggiungere un volume totale di 20 μ l.

La mix di reazione è stata incubata a 65°C per 70 minuti e successivamente a 80°C per 10 minuti al fine di terminare la reazione.

Sensibilità e specificità

Al fine di valutare la sensibilità del saggio LAMP sono stati utilizzati degli standard plasmidici diluiti serialmente in base 10. Tutte le diluizioni sono state analizzate in duplicato. L'ultima diluizione a dare un risultato positivo è stata considerata il *limit of detection* (LOD) della reazione.

Estrazione rapida

Sono stati allestiti tre diversi *lysis buffer* da utilizzare per la lisi rapida dei batteri in modo da rendere il saggio applicabile ancora più facilmente come POCT.

Nei diversi *lysis buffer* sono state utilizzate diverse combinazioni di NaCl, TrisHCl, EDTA, SDS e Triton X-100.

Risultati

La sensibilità in vitro raggiunta dal saggio LAMP è di 90,7 target/ μ l utilizzando diluizioni seriali di plasmide con all'interno il gene *lap p60*.

E' stata fatta una valutazione preliminare di alcuni *lysis buffer* che permettessero la digestione rapida dei batteri e il cui risultato potesse essere utilizzato direttamente come template nella mix di reazione.

Dalla prima valutazione uno dei buffer utilizzati sembra rendere il DNA genomico disponibile al suo impiego nella reazione. Abbiamo constatato che la diluizione 1:10 del lisato, risolve eventuali problemi di inibizione dovuti all'aggiunta di sostanze nella mix di reazione. La diluizione del lisato non comporta elevate differenze nell'amplificazione rispetto al gDNA standard, se non dovute all'effetto della diluizione stessa.

Discussione e conclusioni

L'identificazione di *Listeria monocytogenes* avviene tradizionalmente attraverso il riconoscimento delle colonie dopo colture microbiologiche. Questi metodi sono stati di notevole utilità negli anni passati, ma presentano dei limiti evidenti legati alla crescita e al riconoscimento della colonia (Rossmann et al., 2011).

Si è quindi assistito ad un utilizzo progressivamente maggiore delle metodiche di diagnostica molecolare. Prima con le tecniche di biologia molecolare classiche, come la PCR, e negli ultimi anni con delle nuove metodiche di amplificazione isotermica come la LAMP. Il vantaggio di queste ultime è la possibilità di essere eseguite al di fuori di laboratori specializzati.

In letteratura sono già stati validati alcuni saggi basati su tecnica LAMP per la ricerca di *L. monocytogenes* (Tang et al., 2011; Wang et al., 2011; Wang et al., 2012; Wu et al., 2014). Tuttavia questi saggi prevedono la visualizzazione del risultato tramite l'introduzione nella mix di reazione di calceina, che presenta costi relativamente elevati, tramite elettroforesi su gel di agarosio o aggiunta di SYBR Green dopo la reazione per visualizzazione colorimetrica, entrambi metodi che comportano un elevato rischio di cross-contaminazione.

Il saggio messo a punto in questo studio, oltre ad avere una buona sensibilità, è facilmente abbinabile ad un metodo di visualizzazione dei risultati colorimetrico. Questo facilita ancor più l'impiego di questa tecnica come POCT. Inoltre, è stato già constatato, anche se in maniera preliminare che è possibile effettuare una lisi rapida del campione ed utilizzare il lisato diluito come template nella reazione, senza diminuire di molto la sensibilità.

Sarà interessante completare le prove di lisi rapida sui *lysis buffer* al fine di ottenere un test eseguibile al di fuori dei laboratori specializzati dall'estrazione de gDNA alla lettura del risultato.

1.14.2 PSEUDOMONAS FLUORESCENS

Introduzione

I batteri del genere *Pseudomonas*, in particolare quelli appartenenti al gruppo *Pseudomonas fluorescens*, sono dei microorganismi di grande rilievo per quanto riguarda la contaminazione e alterazione degli alimenti. Essi secernono una vasta quantità di enzimi, quali proteasi, lipasi e lecitinasi, oltre a pigmenti di varia natura, che alterano irrimediabilmente le caratteristiche organolettiche del prodotto.

Per identificare e caratterizzare il genere è richiesta sia una conoscenza del fenotipo che del genotipo. Il genere *Pseudomonas* include batteri gram negativi aerobi, eterotrofi, metabolicamente molto versatili e in grado di contaminare un ampio spettro di alimenti (latticini, uova, pesce, carne e vegetali) e di determinarne il deterioramento. Alcune specie, tra cui *Pseudomonas fluorescens*, possono essere patogeni opportunistici per piante, animali ed esseri umani e, data la loro capacità di formare biofilm, risultano spesso resistenti a trattamenti con antibiotici ad ampio spettro.

Tradizionalmente l'identificazione e caratterizzazione di *Pseudomonas* viene condotta utilizzando test fenotipici classici come crescita su terreni specifici, reazioni enzimatiche ed analisi morfologica e microscopica. Questi metodi, oltre ad avere delle tempistiche molto lunghe, talvolta non permettono di effettuare identificazioni precise sul ceppo di appartenenza, soprattutto se fanno parte di specie eterogenee come *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. syringae* (Grimont et al., 1996).

Negli ultimi anni hanno preso sempre più piede le tecniche molecolari, grazie anche all'aumento delle prestazioni e all'abbassamento dei costi. Inoltre va considerato il fatto che le metodiche di microbiologia classica non danno sempre informazioni approfondite per quanto riguarda l'identificazione di specie, di ceppo o eventuali relazioni filogenetiche. Alcune nuove tecnologie, come l'amplificazione degli acidi nucleici hanno migliorato significativamente la specificità e la sensibilità dei test diagnostici, riducendo in modo significativo il tempo necessario per il rilevamento di patogeni microbici (Amann et al., 1995). Gli studi pubblicati in letteratura riguardano protocolli di PCR altamente specifici e che si basano, per la maggior parte sul rilevamento del gene 16S rRNA (Scarpellini et al., 2004).

Materiali e metodi

Standard di riferimento

Le prove di validazione sono state condotte clonando il gene *16S rRNA* di *Pseudomonas fluorescens* all'interno di un plasmide. Il gene è stato amplificato utilizzando i primer Forward 5' GGCTCAGATTGAACGCTGG 3' e reverse 5' GGCGGTGTGTACAAGGCC 3'. In seguito a corsa elettroforetica su

gel d'agarosio, il prodotto ottenuto dalla PCR è stato purificato e clonato all'interno di un vettore 2.1-TOPO (Invitrogen) utilizzando cellule TOP10. Per verificare la presenza dell'inserito è stata condotta una seconda PCR utilizzando i primer M13 forward e reverse. Infine il gene clonato è stato sequenziato con l'utilizzo di un Big Dye Terminator v1.1 kit (Applied Biosystems) su sequenziatore automatico ABI Prism 310. Il plasmide è stato poi linearizzato attraverso una endonucleasi (NcoI) (New England Biolabs, Euroclone, Milan, Italy), quantificato con uno spettrofotometro e diluito serialmente.

Scelta del target e disegno dei primer LAMP

I primer sono stati disegnati con l'aiuto del programma online PrimerExplorer v 4.0 (Fujitsu) utilizzando come template una sequenza derivante dall'allineamento delle sequenze disponibili sul database GenBank del gene *16s rRNA* di *Pseudomonas fluorescens*. Le sonde sono state acquistate da Sigma-Aldrich. I primer FIP e BIP erano purificati con HPLC.

Reazione LAMP

La reazione LAMP è stata eseguita in una mix contenente: 2.5 µl di 10X ThermoPol Reaction Buffer (New England BioLabs), 6mM di MgSO₄, 2 mM di dNTPs (500 µM each), 8 U di *Bst* DNA polimerasi (New England Biolabs, MA, USA), 200 nM di F3 e B3, 500 nM di LF and LB, 1,6 µM di FIP e BIP, 1.0 M di betaina (Sigma-Aldrich). Per la valutazione real-time è stato aggiunto SYBR Safe all'1X di concentrazione finale. Infine sono stati aggiunti 5 µl di gDNA ed un volume di acqua per biologia molecolare fino a raggiungere un volume totale di 20 µl.

La mix di reazione è stata incubata a 65°C per 70 minuti e successivamente a 80°C per 10 minuti al fine di terminare la reazione.

Risultati

Alle condizioni di reazione descritte, il saggio LAMP messo a punto nello studio è in grado di amplificare correttamente il DNA genomico di *Pseudomonas fluorescens* nell'arco di 60 minuti.

La messa a punto del saggio ha compreso delle prove impiegando diverse temperature di reazione. Tutte le temperature hanno dato esito positivo della reazione in presenza del DNA target, ma a 65°C la reazione risulta essere più specifica.

Discussione e Conclusioni

Come già descritto per la *Listeria monocytogenes*, anche il riconoscimento di *Pseudomonas fluorescens* si basa su tecniche microbiologiche. Negli ultimi anni, la ricerca ha portato allo sviluppo di tecniche molecolari che rendessero l'identificazione più agevole (non sempre il riconoscimento della colonia in coltura è immediato) e che presentassero un'elevata sensibilità e specificità.

L'esecuzione delle tecniche tradizionali di biologia molecolare, come la PCR, può avvenire unicamente in laboratori attrezzati per l'esecuzione di queste analisi. Esse infatti comportano l'utilizzo di strumentazioni sofisticate come cappe aspiranti e termociclatori. Inoltre è necessario avere degli ambienti dedicati poichè il rischio di cross-contaminazioni è elevato.

L'impiego delle nuove tecniche di amplificazione isoterma, come la LAMP permettono di avere la stessa sensibilità e specificità delle tecniche molecolari classiche, utilizzando un'unica provetta di reazione, senza la necessità di aprirla per valutare il risultato e senza l'utilizzo di strumentazioni avanzate. In questo modo si può evitare il rischio di cross-contaminazioni e si può avere una diagnosi tempestiva e accurata direttamente in campo.

In questo studio preliminare è stato disegnato un saggio in grado di amplificare il gDNA di *Pseudomonas fluorescens*. Vanno tuttavia implementate le prove di sensibilità e specificità al fine di validare la reazione sia in vitro che in campo.

1.15 MESSA A PUNTO DI UN METODO DI VISUALIZZAZIONE COLORIMETRICO DEI PRODOTTI OTTENUTI MEDIANTE AMPLIFICAZIONE ISOTERMICA

Negli ultimi anni, allo scopo di determinare la presenza di DNA amplificato mediante amplificazione isotermica, si è osservato che aggiungendo un colorante, il Blu di idrossinaftolo (HNB) alla miscela di reazione è possibile seguire colorimetricamente l'amplificazione dell'acido nucleico (Goto et al. 2009).

L'HNB è un indicatore per la titolazione di ioni metallici. A temperatura ambiente si presenta come un solido blu-violetto. Una volta sottratto lo ione metallico da titolare la soluzione si colora di azzurro.

La reazione LAMP produce un'elevata quantità di ione pirofosfato che si lega agli ioni Mg^{2+} presenti in soluzione, formando un prodotto insolubile: il magnesio pirofosfato. Dal momento che la concentrazione di Mg^{2+} diminuisce al progredire della reazione LAMP, la reazione può essere quantificata misurando la concentrazione di Mg^{2+} nella mix di reazione attraverso l'impiego dell'HNB.

Tuttavia, nelle condizioni standard di amplificazione isotermica descritte in letteratura, queste variazioni di tonalità sono difficilmente apprezzabili, soprattutto quando l'amplificazione è minima (campione debolmente positivo) e quando l'occhio che valuta non è esperto.

Modificando il protocollo descritto in letteratura, siamo stati in grado di aumentare il contrasto tra i tubi di reazione negativi e i tubi di reazione positivi (Turba et al, 2013) (Figura 37).



Figura 37

Per le prove di validazione il viraggio del colore è stato valutato utilizzando un termociclatore real-time ed impostando come canale di lettura il SYBR GREEN. In questo modo il termociclatore real-time è in grado di leggere in tempo reale il viraggio di colore da viola a blu dell'HNB, che si verifica nei campioni dove è presente il target. Come si può vedere dalla figura 38, la variazione di colore è maggiore nelle reazioni in cui è stato utilizzato il protocollo modificato.

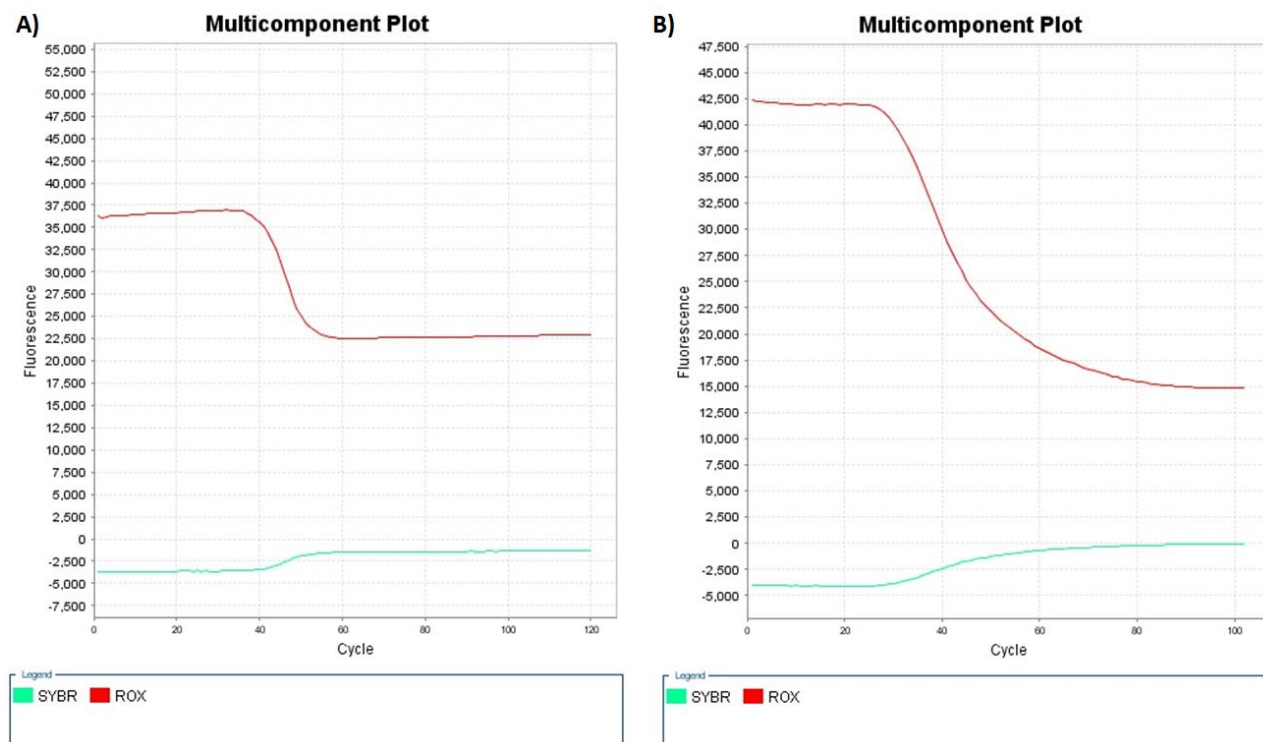


Figura 38: Amplification plot delle reazioni LAMP in cui era stato aggiunto l'HNB come indicatore per titolazione di ioni Mg^{2+} . A) Rappresentazione dell'amplificazione LAMP con mix di reazione contenente HNB secondo protocollo di Goto et al., 2009. B) Rappresentazione dell'amplificazione LAMP con mix di reazione contenente HNB secondo protocollo modificato (Turba et al., 2013)

1.16 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo scopo di questo studio è stato quello di mettere a punto e validare diversi saggi LAMP per la rilevazione sia di microrganismi o virus patogeni, sia di mutazioni responsabili di alcune malattie genetiche.

La tecnica LAMP è una tecnica molecolare di recente sviluppo (Notomi et al., 2000), ma negli ultimi anni ha mostrato un elevato interesse da parte dei ricercatori per i vantaggi che essa presenta. Si tratta infatti di una amplificazione isotermica e in quanto tale avviene ad un'unica temperatura. Questo permette di utilizzare un semplice termoblocco per l'esecuzione della reazione anziché un termociclatore come invece è necessario per la PCR.

La LAMP presenta anche altri vantaggi come l'elevata sensibilità. Essa risulta in molti casi paragonabile a quella di saggi eseguiti con tecnica PCR. La specificità della reazione non sempre è elevata. Nonostante la LAMP impieghi 6 primer che riconoscono 8 distinte regioni sul gene target, essa non sempre riesce a discriminare alcuni tipi di mutazione (SNP).

Esiste inoltre la possibilità di visualizzare i risultati in maniera colorimetrica. I metodi di visualizzazione dei risultati più utilizzati sono l'elettroforesi su gel d'agarosio, l'impiego di fluorofori intercalanti o di indicatori di ioni metallici.

Nel presente studio è stato messo a punto, su alcuni dei saggi presentati, un metodo di visualizzazione colorimetrico modificato rispetto ad uno già descritto in letteratura (Goto et al., 2009). Esso impiega un indicatore di ioni Mg^{2+} , il blu di idrossinaftolo (HNB). L'HNB va incontro ad un viraggio di colore in base alla concentrazione di ioni Mg^{2+} presenti in reazione. Mano a mano che avviene, l'amplificazione LAMP consuma il magnesio all'interno della provetta permettendo all'HNB di virare da viola-magenta a blu-azzurro. Con il metodo modificato è possibile apprezzare di più la differenza tra il colore di partenza e quello finale e questo è un punto a favore nel caso di lettura dei risultati da parte di personale non esperto.

La tecnica LAMP è facilmente adattabile a diversi tipi di matrice e dalle nostre prove abbiamo confermato quello che Francois et al. 2011 avevano già dimostrato nel loro studio, ovvero l'elevatissima tolleranza della LAMP agli inibitori. E' stato possibile infatti ottenere un'amplificazione a partire da DNA proveniente da urine o feci, anche senza purificare il DNA, cosa non possibile con la PCR.

Infine, esiste la possibilità di abbinare dei metodi di estrazione rapidi al fine di rendere l'intero processo eseguibile in un qualsiasi ambiente di campo.

Alla luce di questi vantaggi la tecnica LAMP risulta essere un'ottima metodica diagnostica, con sensibilità e specificità simili alla PCR, ma con molti meno limiti di quest'ultima.

CAPITOLO 2 – STUDIO MOLECOLARE DI UN CASO DI DEFICIENZA PRIMITIVA DI MIELOPEROSSIDASI IN UN CANE

Il processo che porta alla formazione dei granulociti viene definita granulocitopoiesi. Nei mammiferi adulti la granulocitopoiesi avviene primariamente a livello di midollo osseo, con l'estensione ad altri siti extramidollari in caso di aumentata richiesta o patologie del midollo osseo. (Radin et al., 2010). Le cellule ematopoietiche derivano da una cellula staminale pluripotente comune che dà origine ai precursori linfoidei e mieloidi (Sharkey et al., 2010).

2.1 I GRANULOCITI NEUTROFILI

I granulociti neutrofili (o leucociti polimorfonucleati neutrofili) rappresentano la prima difesa contro microorganismi patogeni, traumi tissutali o qualsiasi altro stimolo infiammatorio. La capacità dei neutrofili di fagocitare e combattere sistematicamente i batteri è dovuta alla presenza di numerosi recettori di membrana ed è conseguente a dei segnali trasmessi da specifici costituenti del citoplasma che si trovano all'interno di granuli. (Nabity et al., 2010a).

2.2 STRUTTURA DEI GRANULOCITI NEUTROFILI E BIOCHIMICA

2.2.1 Ultrastruttura dei neutrofili e tipologia e contenuto dei granuli

I neutrofili maturi, segmentati hanno un diametro di circa 10-12 μm . Scansioni al microscopio elettronico mostrano che sulla loro superficie sono presenti numerosi piccoli pseudopodi. Questo aumenta la superficie del neutrofilo, cruciale per la funzione fagocitica. I neutrofili maturi sono caratterizzati da un nucleo multilobato, con dei lobi distinti uniti da sottili fili di materiale nucleare, composto per la maggior parte da eterocromatina (indice di un basso grado di sintesi proteica), con una sottile banda di eucromatina al centro; il numero di lobi varia a seconda dell'età della cellula (Nabity et al., 2010a).

I neutrofili contengono diversi granuli che contribuiscono alla prima linea di difesa dell'organismo nei confronti di batteri, funghi, protozoi ed alcuni virus. Le varie tipologie granulari dei neutrofili costituiscono un'importante riserva non solo di proteine antimicrobiche, proteasi e componenti del burst respiratorio, ma anche di numerosi recettori di membrana per molecole di adesione endoteliale, proteine della matrice extracellulare e mediatori solubili dell'infiammazione. L'esocitosi finemente regolata, permette di prevenire la propagazione del danno ai tessuti circostanti.

Nei neutrofili a riposo, i compartimenti granulari si trovano dispersi nel citoplasma. In seguito all'attivazione da parte di stimoli solubili o fagocitabili, i granuli fondono con la membrana plasmatica e/o con il fagosoma rilasciando il loro contenuto.

Nell'uomo sono state identificate tre popolazioni principali di granuli: i primari (o azurofilici o mieloperossidasi-positivi), i secondari (specifici) e i terziari (o ricchi in gelatinasi). I granuli secondari e terziari sono perossidasi-negativi. Altre strutture simili sono le vescicole secretorie e i corpi multi laminari e multi vescicolari. Le vescicole secretorie, che contengono proteine plasmatiche, sono presumibilmente formate per endocitosi, per cui esse sono classificate come vescicole endocitiche piuttosto che come veri e propri granuli. I corpi multi laminari e multi vescicolari potrebbero essere dei precursori dei lisosomi residenti. Infatti, nei neutrofili non sono stati identificate delle strutture simili ai tipici lisosomi maturi.

I granuli sono prodotti per la maggior parte durante la maturazione dei neutrofili. I granuli primari sono i primi ad essere formati nello stadio di pro mielocita, mentre i granuli secondari sono prodotti durante gli stadi di mielocita e meta mielocita. I granuli terziari e le vescicole secretorie infine sembrano essere entrambi formati negli stadi di banda e neutrofilo segmentato (Nabity et al., 2010a).

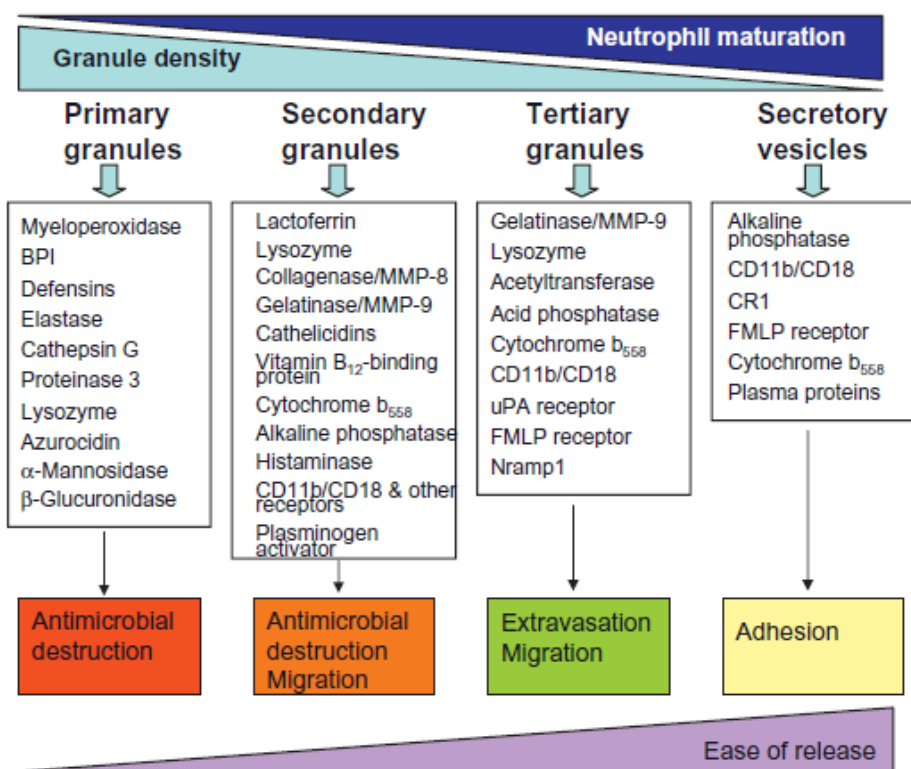


Figura 39: Granuli dei neutrofili, contenuto e loro funzione (Nabity et al., 2010a)

Nonostante vi siano molte proteine in comune tra i diversi granuli, esistono delle proteine che sono caratteristiche per ognuno. I granuli primari contengono la mieloperossidasi (MPO), una potente

emoproteina microbica coinvolta nei meccanismi ossigeno-dipendenti di distruzione dei microorganismi. Altre proteine tipiche che si possono trovare nei granuli primari includono le alfa-difensine, la proteina battericida permeabilizzante (BPI) e proteasi della serina come l'elastasi, la catepsina G e la proteinasi-3. Recentemente, nei granuli primari dei granulociti neutrofili umani è stata evidenziata la presenza di granzima B.

Molte delle proteine presenti nei granuli primari sono sintetizzate come proforme ma il propeptide viene rimosso durante la maturazione del granulo ed esse sono immagazzinate nella loro forma attiva.

Anche i granuli secondari contengono grandi quantità di sostanze antimicrobiche, in particolare lattoferrina, che risulta essere la proteina principale. Altre proteine contenute nei granuli secondari includono la hCAP-18 (una catelicidina), la fosfatasi alcalina e il lisozima. Essi contengono anche diversi enzimi in grado di degradare la matrice, come la collagenasi e una quantità ridotta di gelatinasi. La membrana dei granuli secondari è una fonte importante di citocromo b_{558} , un componente della NADPH-ossidasi. Gli enzimi dei granuli secondari sono immagazzinati sotto forma di proforme inattive e vengono attivati in seguito all'esocitosi.

I granuli terziari contengono una grande quantità di gelatinasi e solo una piccola quantità di lattoferrina. Essi contengono numerosi altri enzimi, tra cui il lisozima. La membrana dei granuli terziari contiene importanti recettori e proteine, compresa la proteina dei macrofagi associata alla resistenza naturale (Nrp1), che contribuisce a privare i microorganismi dei cationi divalenti.

Infine le vescicole secretorie contengono importanti recettori per l'extravasazione e la fagocitosi (CD11b, CD18, CR1, FMLP-receptor, CD14) oltre alla fosfatasi alcalina. La loro matrice contiene proteine plasmatiche, come l'albumina, mentre sono assenti enzimi antimicrobici (Nabity et al., 2010a).

2.3 DISTRIBUZIONE DEI NEUTROFILI E LORO FUNZIONE

I neutrofili circolano nel sangue solamente per qualche ora, esistono infatti due pool: quello circolante e il pool marginale. Negli animali sani, i neutrofili lasciano il circolo in maniera casuale, migrando principalmente nell'intestino, nei polmoni e a livello di cute. Questo processo è essenziale per prevenire infezioni batteriche. Quando il numero di neutrofili nel sangue si abbassa in maniera critica (inferiore a 500 neutrofili segmentati/ μ l), gli animali sono altamente sensibili alle infezioni batteriche. I neutrofili vengono reclutati dal sangue anche nei siti di infezione. Quando essi incontrano un microorganismo, lo fagocitano e cercano di distruggerlo (Nabity et al., 2010b).

2.3.1 Meccanismi battericidi

I meccanismi antimicrobici che avvengono all'interno del fagosoma maturo sono stati classificati in meccanismi ossigeno-indipendenti e meccanismi ossigeno-dipendenti. Tuttavia questi meccanismi interagiscono tra loro.

Meccanismi ossigeno-indipendenti

I meccanismi non ossidativi possono assumere un ruolo più importante nell'uccidere i microorganismi rispetto ai meccanismi ossidativi. I meccanismi battericidi non ossidativi sono presenti nei granuli primari secondari e terziari.

Le defensine sono una famiglia di peptidi antimicrobici di peso molecolare relativamente basso che sono state isolate dai neutrofilii di umani, ratti e conigli. Esse mostrano attività antimicrobica nei confronti di un ampio spettro di batteri, funghi, virus incapsulati e protozoi. Il loro effetto microbicida è dovuto alla formazione di pori multimerici attraverso la membrana. L'effetto citotossico di alcune defensine è potenziato dalla azione sinergica con un'altra proteina cationica, la BPI, che presenta una citotossicità specifica nei confronti dei batteri Gram-. Alcuni studi suggeriscono che l'interazione elettrostatica iniziale della BPI con i lipidi anionici batterici favorisca l'inserimento delle defensine che permeabilizzano la membrana attraverso la formazione di pori multimerici (Nabity et al., 2010b).

Meccanismi ossigeno-dipendenti

I meccanismi ossigeno-dipendenti sono localizzati a livello di granuli primari. Questi meccanismi sono innescati dal processo della fagocitosi o dalla perturbazione della membrana cellulare e sono dipendenti da una nicotinammide adenina di nucleotide fosfato ossidasi legata alla membrana. La NADPH ossidasi è un complesso multimerico composta da un centro redox ancorato alla membrana (il flavocitocromo b558) e da dai fattori citosolici p47-phox, p67-phox, p40-phox. Quando stimolata, i componenti citosolici vengono traslocati a livello di membrana. Sia l'assemblaggio del complesso della NADPH ossidasi, sia il flusso di elettroni dipendono dall'influenza di 3 proteine che legano il GTP.

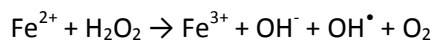
La fagocitosi dei microorganismi patogeni si accompagna ad un marcato aumento del consumo d'ossigeno nel cosiddetto burst respiratorio, seguito dalla formazione di prodotti di riduzione dello stesso (Reactive Oxygen Species, ROS). La produzione di ROS, essenziale per la difesa dell'organismo dalle infezioni batteriche e fungine, è sostenuta dall'attività della NADPH ossidasi.

In risposta ad uno stimolo infiammatorio, la NADPH ossidasi catalizza la riduzione della molecola di ossigeno ad anione superossido:



I neutrofili generano grandi quantità di anione superossido, che è rapidamente dismutato in perossido di idrogeno (H_2O_2).

Il perossido di idrogeno così formato è un intermedio ridotto dell'ossigeno moderatamente tossico; la sua concentrazione nei neutrofili è regolata da enzimi quali la catalasi (presente nei perossisomi) e le glutazione perossidasi (localizzate essenzialmente nel citoplasma). La tossicità del perossido di idrogeno è attribuibile alla sua capacità di generare il radicale idrossile (OH^\bullet) in presenza di cationi metallici quali il ferro, nella reazione di Fenton:



Il perossido di idrogeno può essere inoltre trasformato in acido ipocloroso (HOCl) nella reazione catalizzata dalla mieloperossidasi (MPO), in presenza di alogenuri, tra cui il più comune è il cloruro (Cl^-):



L'acido ipocloroso è una specie chimica dotata di una notevole capacità microbica: interagendo con i residui amminoacidici della parete batterica, esso forma cloramidi, molecole altamente instabili che si trasformano in aldeidi; queste ultime formano legami crociati tra le proteine, creando fori nella parete del microorganismo.

Infine il perossido di idrogeno interagisce con l'acido ipocloroso per produrre l'ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$). L'ossigeno singoletto è una forma di ossigeno estremamente reattiva che è in grado di attaccare i doppi legami.

Questi intermedi reattivi dell'ossigeno possono reagire con i grassi insaturi, con i legami del carbonio, con i gruppi sulfidrilici e amminici, con gli acidi nucleici, con i nucleotidi pirimidinici e con gli enzimi all'interno degli organismi.

I prodotti del burst respiratorio sono tossici sia per i microorganismi patogeni che per le cellule. Esistono molteplici meccanismi antiossidanti per proteggere le cellule dagli effetti dannosi di questi ossidanti. Questi meccanismi includono la superossido dismutasi citosolica, la glutazione per ossidasi, la glutazione reduttasi e la catalasi, tutti enzimi che convertono i radicali dell'ossigeno in acqua. Altri composti che possono contrastare l'attività dei radicali dell'ossigeno comprendono la vitamina E, la vitamina C, il selenio, la transferrina e la cisteina (Nabity et al., 2010b).

2.4 MIELOPEROSSIDASI

La sintesi di MPO inizia allo stadio di promielocita e termina all'inizio dello stadio di mielocita. La mieloperossidasi rappresenta circa il 5% delle proteine neutrofiliche totali ed è localizzata a concentrazioni elevate nei granuli azurofilici. La mieloperossidasi costituisce il 25% delle proteine granulari e, una volta rilasciata durante l'attivazione cellulare, raggiunge concentrazioni pari a circa 100mg/mL (1 mM) nel vacuolo di fagocitosi. Essa è responsabile della conversione del perossido d'idrogeno in specie tossiche dotate di maggiore potere antimicrobico.

In presenza di perossido di idrogeno (H_2O_2) la MPO catalizza l'ossidazione H_2O_2 -dipendente di svariati substrati; i suoi substrati preferenziali sono cloruro, fluoruro, bromuro e ioduro. I corrispondenti acidi alogenuri formati sono fortemente reattivi e letali per la maggior parte dei microorganismi. Dal momento che il cloruro nel citoplasma e nel fagosoma raggiunge le concentrazioni più elevate, è l'acido ipocloroso (HOCl) ad essere formato in maggiori quantità. L'HOCl è un forte agente ossidante che attacca un ampio spettro di molecole biologiche.

Tuttavia l'attività della mieloperossidasi è tipicamente più bassa negli animali se paragonata a quella dell'uomo, fatta eccezione per il cane e per i primati non-umani (Nabity et al., 2010a).

2.4.1 Genetica e struttura della mieloperossidasi

La mieloperossidasi è prodotta a partire da un unico gene di circa 11 kb, composto da 11 introni e 12 esoni e localizzato a livello del braccio lungo del cromosoma 17. L'iniziale traduzione genera una proteina di circa 80 kDa che, dopo rimozione proteolitica di un peptide segnale di 41 amminoacidi, subisce una N-glicosilazione con l'incorporazione di una catena ricca in residui di mannosio, per generare una apoproMPO enzimaticamente inattiva di circa 89-90 kDa. Questo precursore forma nel reticolo endoplasmatico un complesso con due proteine leganti il calcio, la calreticulina e la calnexina, che agiscono da chaperonine. Con l'inserimento di un gruppo eme la apoproMPO è convertita in proMPO enzimaticamente attiva. Questa subisce il clivaggio della pro-regione N-terminale di 125 amminoacidi, dando luogo ad una proteina di 72-75 kDa, che viene sottoposta ad un ulteriore clivaggio per dare origine ad una catena pesante di 467 amminoacidi, subunità α (57 kDa) e ad una catena leggera di 112 amminoacidi, subunità β (12 kDa) (Klebanoff et al., 2005).

La mieloperossidasi ha un peso molecolare di 144 kDa, è composta da due subunità, costituite ognuna da una catena leggera ed una catena pesante. Le catene pesanti delle due subunità sono connesse tra loro da un ponte disolfuro. Ogni subunità contiene una protoporfirina IX con un atomo di ferro in posizione centrale. Il sito del gruppo eme è costituito da entrambe le catene polipeptidiche. Entrambi i gruppi eme

presenti nell'MPO sono strutturalmente e funzionalmente identici. I gruppi eme che la caratterizzano presentano proprietà spettroscopiche che ne determinano il colore verde, tanto che l'enzima era stato inizialmente denominato verdoperoxidase (Klebanoff SJ., 2005) La mieloperossidasi è una proteina altamente cationica e la carica positiva sulla sua superficie è data per la maggior parte dai residui di arginina. La densità dei residui di arginina e lisina è maggiore a livello di porzione posteriore della proteina rispetto a quella anteriore, dove sono localizzati entrambi i canali per il substrato (Figura 40 A e B). In prossimità dell'apertura del canale si trova un residuo di istidina (Figura 40 C) (Arnhold et al., 2010).

La cristallografia a raggi X della MPO umana, ha rilevato tre legami covalenti tra il gruppo eme e l'apoproteina, due legami esterei (Asp94, Glu242) e un *sulfonium ion linkage* (Met243). Questo triplice legame del gruppo eme è unico se paragonato alle altre eme-proteine. Essi fanno sì che la struttura ad anello della porfirina risulti leggermente curva, caratteristica che è stata ipotizzata essere alla base dell'estrema reattività dell'enzima (Arnhold et al., 2010).

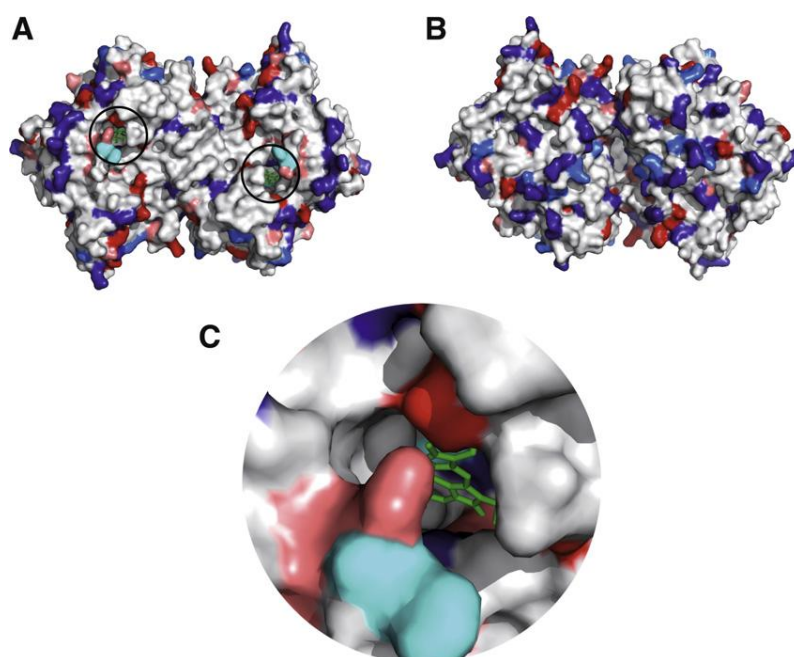


Figura 40: distribuzione delle cariche sulla superficie della mieloperossidasi umana. Gli aminoacidi con una carica positiva a pH neutro sono colorati in blu, mentre quelli con carica negativa sono colorati in rosso. A) La distribuzione delle cariche nella parte anteriore dell'enzima, con l'entrata dei due canali per il substrato all'eme centrale (verde), è abbastanza uniforme. B) Al contrario, le cariche positive dominano nella parte posteriore dell'enzima, soprattutto grazie alla presenza di numerosi residui di arginina e lisina. C) Entrata del canale per il substrato con il gruppo eme (verde) a maggiore ingrandimento. Le figure sono state costruite utilizzando le coordinate depositate nella Protein Data Bank (accession code 1cpx) attraverso l'utilizzo del software Pymol (versione 0.99) (Arnhold et al. , 2010)

2.4.2 Clonaggio e struttura del gene della mieloperossidasi umana

La Mieloperossidasi è stata isolata per la prima volta nel 1941 (Agnes, 1941) e la sua carenza è stata descritta già negli anni '70 (Salmon et al., 1970). Tuttavia il clonaggio del cDNA risale alla meta degli anni '80 quando diversi studiosi, contemporaneamente in diversi laboratori hanno descritto la caratterizzazione del cDNA della MPO umana (Chang et al., 1986; Johnson et al. 1987; Johnson et al., 1989; Weil et al., 1987;

Yamada et al., 1987). L'analisi del DNA genomico ha rilevato l'esistenza di un singolo gene di circa 14 kb composto da 11 introni e 12 esoni. Esso è stato localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17 (Morishita et al., 1987). La localizzazione del gene si trova in prossimità del punto d'interruzione per la traslocazione della leucemia promielocitica acuta. È stata ipotizzata la correlazione della localizzazione del gene MPO con lo sviluppo di questa patologia ma ad oggi non è stata ancora dimostrata (Chang et al., 1987)

2.4.3 Funzioni fisiologiche della mieloperossidasi

Siti potenziali per l'attività mieloperossidasi in vivo

Gli effetti della mieloperossidasi sono concreti in sede di accumulo dei granulociti neutrofili. Spesso, l'infiltrazione dei PMN nei tessuti infiammati è stimata attraverso la determinazione dell'attività della MPO. Durante l'attivazione dei neutrofili una parte della MPO può essere rilasciata nello spazio extracellulare. Anche i neutrofili che vanno incontro a necrosi liberano MPO. La MPO così liberata è in grado di svolgere la sua azione microbica (Arnhold et al., 2010).

La mieloperossidasi nei granuli azurofili dei granulociti neutrofili

Nei granuli azurofili dei neutrofili la mieloperossidasi e altre proteine cationiche sono sequestrate dai proteoglicani carichi negativamente, come il condroitin-4-solfato. Inoltre, in questi granuli è presente un basso pH. Entrambe le condizioni mantengono la maggior parte dei componenti dei granuli azurofili in una condizione di inattivazione. La MPO è immagazzinata sotto forma inattiva anche a causa della mancanza di perossido di idrogeno che funge da substrato.

In seguito alla fagocitosi batterica, i granuli azurofili rilasciano il loro contenuto all'interno dei fagosomi. Attraverso l'attivazione della NADPH ossidasi e grazie al flusso di ioni verso il fagosoma, le condizioni locali subiscono una considerevole variazione che favorisce l'attivazione della MPO e degli altri costituenti dei granuli azurofili. Nei fagosomi dei neutrofili appena formati, il pH sale inizialmente a 7.8 – 8.0 durante i tre minuti successivi alla fagocitosi, per poi scendere improvvisamente a circa 7.0 dopo 10-15 minuti ed ancora a 6.0 durante la successiva ora (Arnhold et al., 2010).

Coinvolgimento della MPO nell'uccisione dei microorganismi

Nei granulociti dell'uomo, il coinvolgimento della MPO nell'uccisione di batteri e funghi è stata dimostrata in diverse occasioni. In presenza di inibitori della MPO e nei neutrofili di soggetti con carenza di MPO è stata evidenziata una minor capacità di uccidere i microorganismi. Questi esperimenti hanno dimostrato che i meccanismi MPO-indipendenti sono anch'essi coinvolti nell'attività microbica.

Alcuni studi ipotizzano che la MPO sia coinvolta nell'attività modulatoria delle proteine rilasciate assieme ad essa all'interno dei fagosomi o nello spazio extracellulare. L'acido ipocloroso prodotto dalla MPO inattiva l'elastasi ed altri enzimi quali la catepsina . Per questo motivo, apparentemente la mieloperossidasi contribuisce a contenere l'attività microbica al fine di proteggere i tessuti pericellulari dalla proteolisi incontrollata (Arnhold et al., 2010).

Legame della mieloperossidasi alle proteine sieriche

In seguito al suo rilascio da parte dei granulociti neutrofili, la mieloperossidasi, altamente cationica è in grado di legarsi a diverse proteine sieriche acide. L'interazione elettrostatica sembra giocare un ruolo importante in questo legame. Come risultato dell'interazione si ha la modifica di alcuni siti funzionali di queste proteine e l'inibizione dell'attività stessa della MPO (Arnhold et al., 2010).

Interazione della mieloperossidasi con le cellule endoteliali

Il legame dell'MPO con le membrane endoteliali cariche negativamente è favorito dalla presenza di eparina o glicosaminoglicani contenenti eparan-solfato. L'interazione della MPO con l'albumina è essenziale per indurre il legame della MPO con l'endotelio (Arnhold et al., 2010).

Ruolo della mieloperossidasi nel reclutamento dei neutrofili

Il reclutamento dei granulociti neutrofili a livello di siti infiammatori inizia con l'adesione dei neutrofili all'endotelio infiammato. CD11b/CD18 sono importanti per l'adesione dei neutrofili all'endotelio prima della loro extravasazione. La mieloperossidasi si lega alle integrine e funge da chemoattrattore.

Il legame della MPO al CD11b/CD18 previene l'apoptosi del granulocita neutrofilo e prolunga il tempo di emivita della stesso attraverso l'attivazione di chinasi extracellulari e dell'Akt (o protein chinasi B). Tuttavia il segnale anti-apoptotico mediato dall'MPO è contrastato dalla 15-epi-lipossina A₄ (Arnhold et al., 2010).

Coinvolgimento della mieloperossidasi nell'induzione dell'apoptosi nei neutrofili

Mentre i mediatori pro-infiammatori generalmente allungano l'emivita dei neutrofili, vi sono altri meccanismi che, in contrasto, promuovono la loro apoptosi. Lo stress ossidativo e livelli elevati di TNF α sono pro-apoptotici per i neutrofili. La permeabilizzazione dei granuli azurofilo ai ROS (reactive oxygen species) prodotti durante l'attivazione cellulare costituisce un importante meccanismo che porta il PMN all'apoptosi durante la risposta immunitaria innata. I granuli azurofilo risultano permeabili ai ROS solo nelle cellule attivate che non fagocitano materiale. Al contrario, la fagocitosi di batteri da parte del neutrofilo non è accompagnata ad un'induzione precoce dell'apoptosi (Arnhold et al., 2010).

Il coinvolgimento della mieloperossidasi nell'induzione dell'apoptosi dei neutrofili è stata dimostrata in diversi studi. La co-attivazione dei PMN da parte del TNF α e del perossido di idrogeno induce l'apoptosi caratterizzata da frammentazione nucleare, attivazione delle caspasi-8 e -3 e riduzione dell'espressione delle proteine inibitrici FLICE. Queste alterazioni vengono arrestate dal pre-trattamento dei neutrofili con un inibitore della MPO (hydrazide 4-aminobenzoic) (Arnhold et al., 2010).

Ruolo della mieloperossidasi nell'interazione neutrofili-macrofagi

La mieloperossidasi non è presente sulla superficie dei PMN vitali. Risulta invece espressa sulla superficie dei neutrofili apoptotici e necrotici dove si trova in stretta associazione con la fosfotidilserina contenente epitopi. Le cellule non vitali vengono rapidamente rimosse dai macrofagi. In seguito alla fagocitosi, il pH nei fagosomi dei macrofagi scende rapidamente fino a 4. La NADPH ossidasi dei macrofagi produce grandi quantità di anioni radicali superossido e perossido di idrogeno. Entrambe le condizioni favoriscono una elevata attività della MPO fagocitata assieme alla cellula non più vitale. Lo scopo dell'attivazione dell'MPO in questo caso deve essere ancora ben chiarita (Arnhold et al., 2010).

Formazione delle clorammine lipofile

A pH acidi, l'interazione della MPO con la fosfotidilserina in presenza di concentrazioni rilevanti di ioni ammonio, dà luogo alla formazione di monocloramina, ossidante a basso peso molecolare. Questo composto essendo lipofilo, penetra facilmente le membrane biologiche. La monocloramina inibisce l'attivazione dell'NF κ B e della protein chinasi C così come l'espressione dei molecole di adesione in diverse tipologie cellulari. Le clorammine prodotte a partire dalla MPO sono in grado di dare un feedback negativo ai segnali pro-infiammatori dei macrofagi (Arnhold et al., 2010).

2.5 CARENZA DI MIELOPEROSSIDASI

La carenza di mieloperossidasi è stata considerata un'evenienza estremamente rara fino a pochi anni fa e fino al 1979 sono stati segnalati solo 17 casi nell'uomo. Tuttavia, grazie alle indagini di citochimica automatica attualmente disponibili, la carenza di MPO è ora più facilmente diagnosticabile. Alterazioni dell'MPO dei neutrofili da lievi a moderate sono state riportate in svariate patologie congenite o acquisite. Le carenze di MPO possono essere suddivise in primarie (o congenite) e in secondarie (o acquisite). Le principali alterazioni a livello ematologico e le caratteristiche cliniche sono riportate nella tabella 9.

Le carenze di MPO primarie hanno un'origine genetica, decorrono nella maggior parte dei casi con una variabilità di gradi di severità in diversi membri di una famiglia e riguardano sia la linea neutrofilica che monocitica. Nelle carenze primarie possono essere identificate mutazioni germinali, ma anche nelle

carenze secondarie è possibile riscontrare mutazioni somatiche del gene MPO. Gli eosinofili e i loro precursori a livello midollare non sono mai coinvolti in queste carenze poiché la perossidasi degli eosinofili è codificata a partire da un gene differente.

Le carenze secondarie di MPO possono essere riscontrate nei seguenti casi:

- Neoplasie ematologiche (soprattutto quelle che coinvolgono i processi maturativi della serie granulocitica): leucemia mieloide cronica, leucemia mieloide acuta, policitemia vera, mielofibrosi con metaplasia mieloide, sindromi mielodisplasiche.
- Neoplasie disseminate (apparentemente collegate alla somministrazione di farmaci citostatici)
- Farmaci (agenti citotossici, alcune associazioni di farmaci anti-infiammatori)
- Carezza di ferro
- Intossicazione da piombo
- Patologie trombotiche
- Trapianto renale
- Gravi malattie infettive
- Diabete mellito
- Lipofuscinosi neuronale
- Gestazione

La carezza di MPO in questi casi può essere transitoria e le terapie mirate alla cura delle patologie sottostanti di solito correggono il difetto enzimatico. Nella maggior parte dei pazienti che presentano le forme acquisite, la carezza di MPO è parziale ed è limitata ad una frazione della popolazione neutrofilica; tuttavia sono presenti anche cellule con attività mieloperossidasi conservata. Inoltre, nei pazienti con sindromi mielodisplasiche e in quelli affetti da disordini linfoproliferativi, la carezza di MPO è associata ad alterazioni degli antigeni di membrana e della funzione dei neutrofili. Anche nei soggetti con carezza di ferro è stata segnalata una carezza significativa dell'attività dell'MPO che può essere corretta con la terapia (Lanza, 1998).

Sebbene la mieloperossidasi sia coinvolta nell'uccisione di alcuni microrganismi patogeni, non è stata evidenziata la suscettibilità ad infezioni ricorrenti o severe nei soggetti che presentano carezza di attività mieloperossidasi. Gravi infezioni sono state documentate sporadicamente e la frequenza di questi casi rappresenta meno del 5% dei casi di carezza di MPO. Infezioni viscerali, soprattutto da *Candida* sono state osservate in alcuni soggetti che presentavano carezza di MPO in associazione al diabete mellito. Dati clinici e la dimostrazione che la capacità di debellare batteri e funghi è solo lievemente compromessa indicano l'esistenza di meccanismi MPO-indipendenti che sono particolarmente efficienti in quei soggetti che presentano una carezza di MPO.

Dal momento che i pazienti con carenza di MPO non sono soggetti ad infezioni, non sono raccomandate terapie di mantenimento con antibiotici. Nei pazienti affetti da diabete mellito è bene porre maggior cautela a causa dell'elevata tendenza a sviluppare infezioni locali o sistemiche.

E' stata riportata una correlazione tra la carenza di MPO e la probabilità di sviluppare neoplasie. Alcuni autori hanno dimostrato il coinvolgimento dell'MPO dei neutrofili nella mediazione della citotossicità delle cellule tumorali (Lanza, 1998).

Tabella 7: Analisi comparative delle caratteristiche cliniche ed ematologiche delle carenze di MPO primarie e secondarie (Lanza, 1998).

Caratteristiche cliniche ed ematologiche della carenza di MPO	Primarie	Secondarie
Ereditarietà	Si	No
Attività della MPO nelle cellule del sangue	Assente (bassa attività nelle carenze parziali di MPO)	Variabile da cellula a cellula (assente, moderata, elevata)
Attività della MPO nei precursori mieloidi del midollo osseo	Assente	Variabile da cellula a cellula
Variazione dell'attività dell'MPO	Assente (rilevabile in rari casi che sviluppano mutazioni del gene MPO addizionali)	Presente in tutti i casi (la carenza di MPO è ripristinata in seguito al successo delle terapie per le patologie alla base)
Patologie concomitanti	Possibili	Sempre
Tipologia di mutazione a carico del gene MPO	Mutazioni germinali	Mutazioni somatiche (?)
Attività perossidasi negli eosinofili	Presente	Presente (diminuita in alcuni casi)

2.6 LA MIELOPEROSSIDASI NELL'ANALISI DI CITOCHIMICA AUTOMATICA (Advia 22120i)

Nel canale della perossidasi, gli eritrociti (RBCs) vengono lisati e le cellule perossidasi-positive (neutrofili, eosinofili - ad eccezione del gatto - e monociti) sono discriminate da quelle perossidasi-negative (linfociti, rubriciti e basofili) grazie all'utilizzo dei reagenti della perossidasi. I risultati vengono visualizzati graficamente in un citogramma. In questo grafico la dimensione cellulare (asse y) è rapportata all'attività della perossidasi (asse x) e le impostazioni specie-specifiche vengono automaticamente applicate. Nel canale baso, i globuli rossi e le piastrine sono sottoposti a lisi e le membrane citoplasmatiche dei leucociti, ad eccezione dei basofili, vengono allontanate. Le cellule sono successivamente classificate in relazione alla loro dimensione e complessità nucleare (lobuli e densità nucleare). Valutando la lobularità e la densità

nucleare vengono fornite informazioni sul grado di maturazione di ogni nucleo leucocitario (Stirn et al., 2014).

2.6.1 Metodica della reazione citochimica della perossidasi (Da: ADVIA (R) 2120 Hematology System Operator's Guide)

Reazione citochimica

La reazione citochimica della perossidasi si sviluppa in tre step:

- Step 1 I globuli rossi sono lisati utilizzando il reagente Advia® 2120 PEROX 1 ad alte temperature nella camera di reazione.
- Step 2 I globuli bianchi sono fissati utilizzando il reagente Advia® 2120 PEROX 1
- Step 3 I globuli bianchi vengono successivamente colorati utilizzando i reagenti Advia® 2120 PEROX 2 e Advia® 2120 PEROX 3.

Le diverse tipologie di leucociti sono identificate in base alla dimensione e all'intensità di reazione con la perossidasi.

I neutrofili, gli eosinofili ed i monociti vengono colorati in base al loro livello di attività della perossidasi. Dal momento che i linfociti, i basofili e le *Large Unstained Cells* (LUC) non contengono perossidasi, queste tipologie cellulari non vengono colorate.

Il reagente ADVIA® 2120 PEROX 1 è il primo che viene aggiunto al campione di sangue intero nella camera di reazione riscaldata. La sua funzione è quella di lisare gli eritrociti e fissare i globuli bianchi. Dei tensioattivi (SDS – sodio dodici solfato e Brij-35), in combinazione allo stress termico, lisano i globuli rossi.

La formaldeide fissa invece le cellule della linea bianca. L'ambiente ipertonico può causare la loro coartazione, aumentando l'indice di rifrazione delle cellule ed accrescendo l'identificazione di linfociti "over noise"

I reagenti ADVIA® 2120 PEROX 2 e ADVIA® 2120 PEROX 3 vengono aggiunti in seguito nella camera di reazione.

Il 4-cloro-1-naftolo presente nel reagente PEROX 2 funge da substrato e permette al perossido di idrogeno del reagente PEROX 3 di formare dei precipitati scuri nei siti endogeni di attività perossidasi a livello dei granuli dei globuli bianchi come descritto nell'equazione seguente:

$H_2O_2 + 4\text{-cloro-1-naftolo} \rightarrow \text{perossidasi cellulare} \rightarrow \text{precipitati scuri all'interno delle cellule}$

Un volume costante della sospensione cellulare dalla camera di reazione passa attraverso la cella di lettura dove vengono misurati l'assorbimento della luce (correlato alla colorazione della perossidasi) e la diffrazione della luce frontale (correlata alla dimensione) di ogni globulo bianco.

La diffrazione e l'assorbimento dei segnali sono rilevati e amplificati elettronicamente.

Citogramma (scatterogramma) PEROX

Le cellule assorbono la luce proporzionalmente alla quantità di colorazione presente dopo la reazione con i reagenti PEROX, rappresentata sull'asse X. La diffrazione della luce a 2-3°C è invece proporzionale alla loro dimensione ed è riportata sull'asse Y.

Il citogramma identifica in base a soglie predefinite dei cluster cellulari rappresentati da:

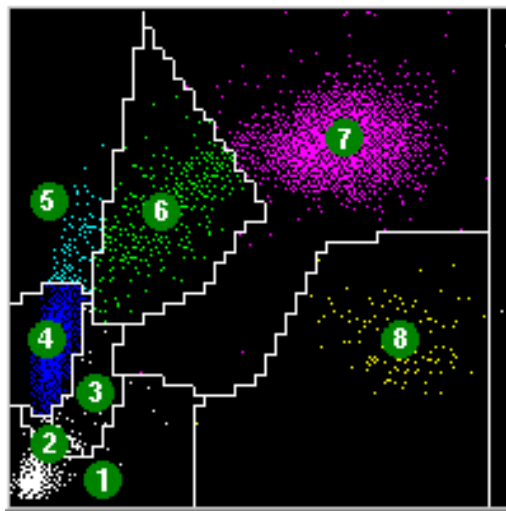


Figura 41: esempio di citogramma PEROX

Nella figura 28 è riportato un esempio di citogramma PEROX.

- 1 Rumore di fondo: Questa zona contiene le piastrine, e i detriti che vengono esclusi dalla conta dei bianchi totale (Total White Count - WBCP) e dalla conta differenziale.
- 2 Globuli rossi nucleati: Se presenti, essi appaiono in questa area a causa delle loro piccole dimensioni e della mancanza di attività perossidasi.
- 3 Aggregati piastrinici: se presenti, essi appaiono in questa area.
- 4 Linfociti e basofili: essi appaiono nella stessa area perché hanno dimensione simile e mancano di attività perossidasi.
- 5 *Large Unstained Cells*: quest'area contiene ad esempio linfociti atipici, blasti ed altre cellule anomale.
- 6 Monociti: essi presentano dimensioni medie ed una moderata attività perossidasi.
- 7 Neutrofili: i neutrofili sono cellule grandi con forte attività perossidasi.

- 8 Eosinofili: gli eosinofili sono le cellule, tra i globuli bianchi, con la maggiore attività perossidasi e sono di grandi dimensioni, come i neutrofili.

Myeloperoxidase deficiency (MPO-D, MO)

In caso di debole o mancante colorazione mieloperossidasi si ottengono scatterogrammi come quello indicato nella Figura 42

In questo caso, l'analizzatore identifica il campione con un segno associato all'allarme "possibile deficienza di mieloperossidasi".

Il campione che presenta questa allarme deve essere valutato microscopicamente per identificare la possibile causa dell'allarme tra le seguenti:

Cause correlate all'analizzatore

Problemi con il canale Perox dell'analizzatore

- Reagenti Perox esauriti i invecchiati
- Problemi nella fluidica del circuito perox (bolle d'aria, detriti, coaguli etc)
- Problemi correlati alla temperatura della camera di reazione perox
- Problemi correlati all'invecchiamento della lampada Perox

Cause correlate al campione

- Deficienza di Mieloperossidasi primitiva genetica
- Deficienza di Mieloperossidasi secondaria
 - Degranulazione di polimorfonucleati in corso ad esempio di Diabete mellito o CID
 - Leucemie linfoblastiche o sdifferenziate con marcata neutropenia

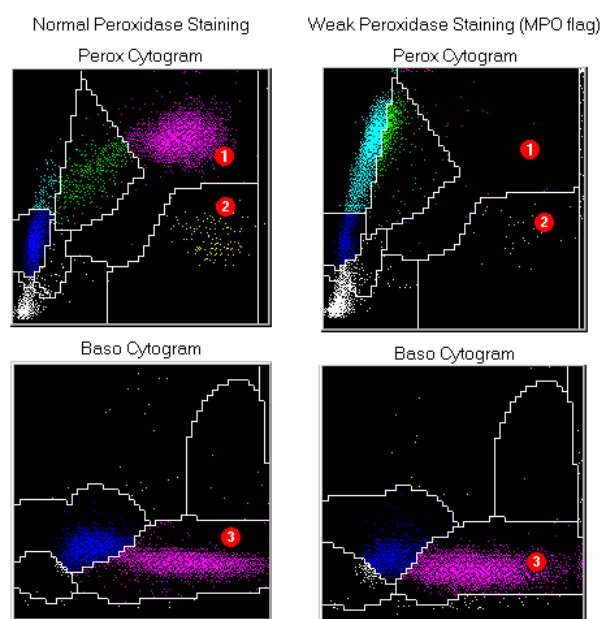


Figura 42

2.7 OBIETTIVI E STRUTTURA DELLO STUDIO

Il presente studio si pone l'obiettivo di studiare dal punto di vista molecolare un soggetto che presenta una totale carenza di mieloperossidasi (MPO) all'indagine di citochimica automatica (ADVIA® 2120 Hematology System).

Il gene che codifica per la MPO è stato sequenziato in un soggetto sano e nel soggetto malato utilizzando diverse coppie di primer che, combinate fra loro, davano come risultato l'amplificazione dell'intera sequenza del gene.

In seguito si è provveduto a sequenziare i prodotti di PCR così ottenuti per ricercare eventuali mutazioni a carico del gene MPO nel soggetto che presentava l'anomalia.

2.8 MATERIALI E METODI

Indagine di citochimica automatica del soggetto che presenta la carenza di MPO

E' stato analizzato il sangue intero in k₃EDTA di un cane segugio italiano, maschio, di 12 anni pervenuto ad un laboratorio esterno che utilizza per l'esame emocromocitometrico lo strumento ADVIA® 2120 Hematology System. Il citogramma PEROX di questo soggetto era indicativo di una carenza di MPO (Figure 43 e 44). L'indagine è stata ripetuta tre volte.

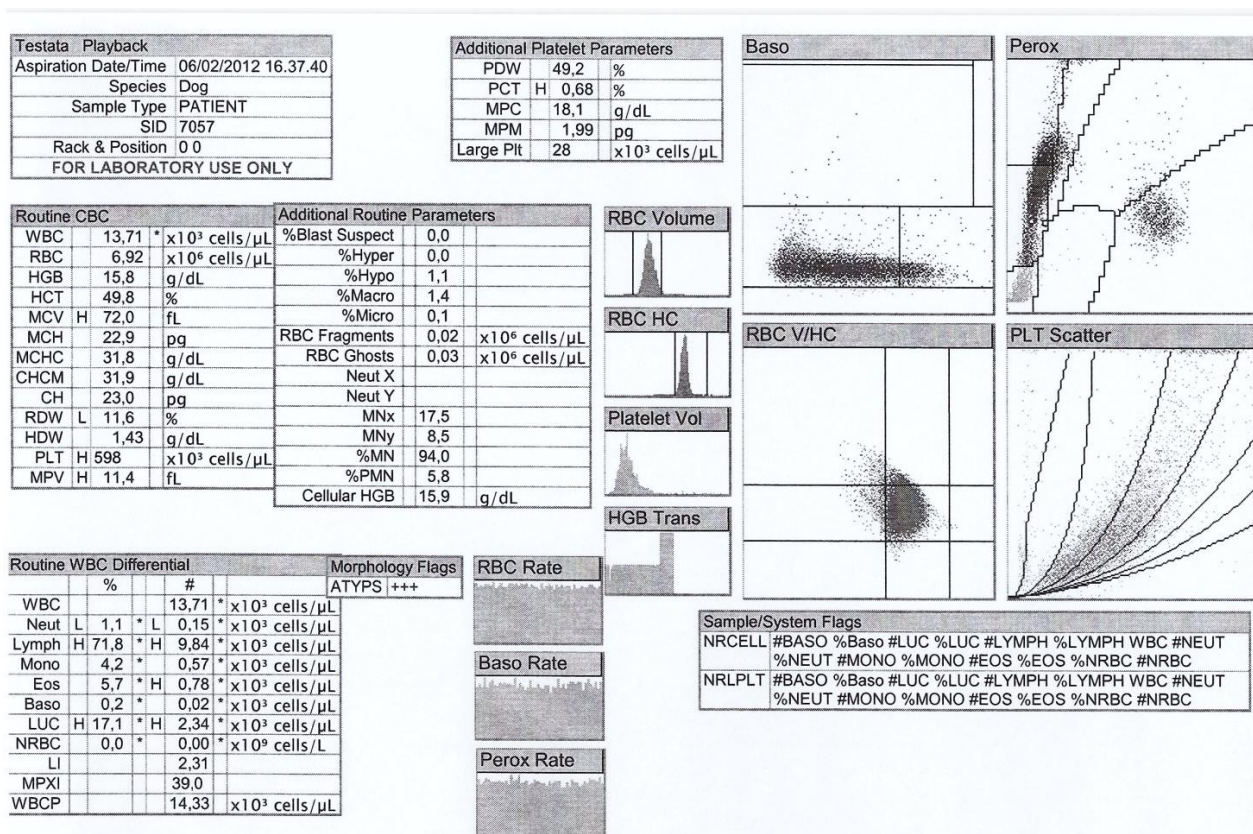


Figura 43: Risultati ottenuti dall'analisi di citochimica automatica con ADVIA® 2120 Hematology System sul soggetto patologico

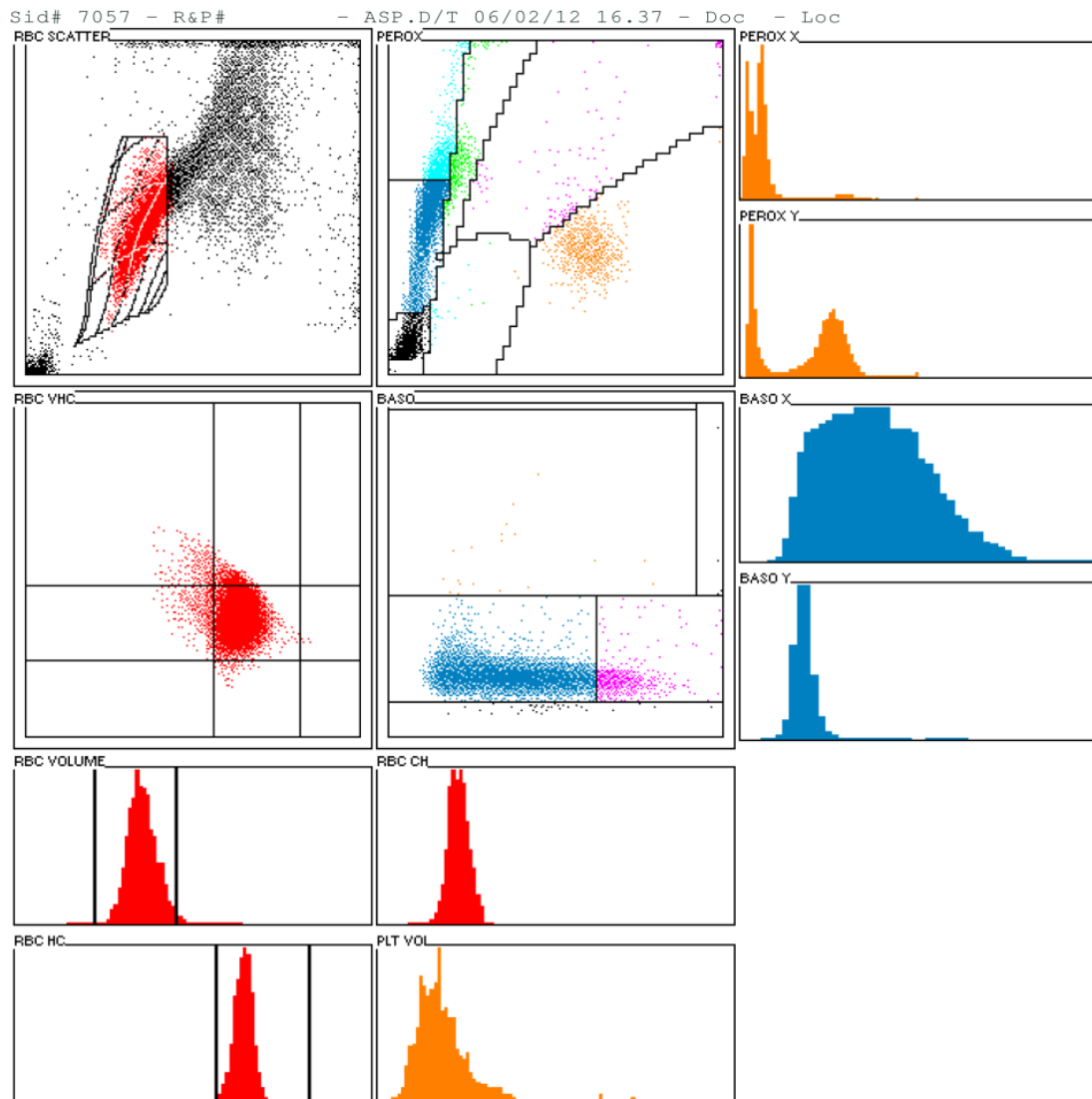


Figura 44: Citogrammi del soggetto patologico risultanti dall'analisi di citochimica automatica con ADVIA® 2120 Hematology System

Disegno dei primer

Le sonde sono state disegnate sulla base di una sequenza predetta del gene MPO presente sul database online GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

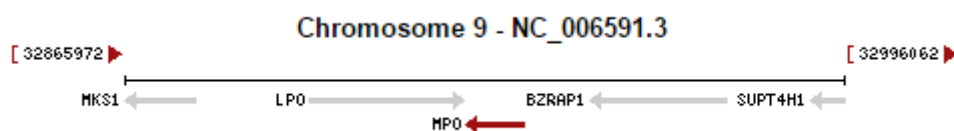


Figura 45: localizzazione del gene MPO sul cromosoma 9

I primer sono stati disegnati attraverso l'utilizzo del programma online Primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). Le sequenze dei primer sono

riportate in Tabella 10, mentre la figura 46 rappresenta i prodotti di PCR ottenuti con l'utilizzo delle diverse coppie di primer.

Tabella 8

Primer sequenziamento gene MPO			
For_MPO_2	TGCACTGTGCGCTCAGGACTT	Rev_MPO_822	ACTGATAGACGTGCACCGGGAC
For_MPO_314	TCAAGCAGCGGCTTCACAGTGG	Rev_MPO_677	AAGCGCACGATGGCGTTGGA
For_MPO_571	AGTACGAGGACGGCTTCTCGCT	Rev_MPO_1085	CCATTGTCGCTGAAGCGGGTGT
For_MPO_984	AGCATGGTGTACGGCAGCGA	Rev_MPO_1474	TGTGGCCATAGCGGAAGGCA
For_MPO_1419	TCGGTAGACCTCGCATCTCCA	Rev_MPO_1889	TCAATGTTGTCGGGCGTGCCA
For_MPO_1762	ACAATGCCTGGAGGCGCTTCTG	Rev_MPO_2179	GGTCCAATGCTGGGAGTGTGCT

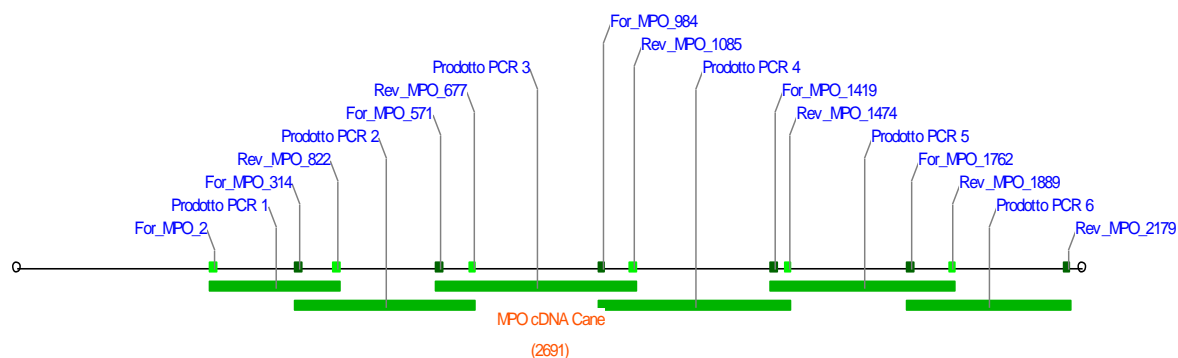


Figura 46: Rappresentazione della posizione dei primer e dei prodotti di PCR da essi ottenuti sulla sequenza del gene MPO

Purificazione dell'RNA totale

Per la purificazione dell'RNA totale è stato utilizzato il sistema "Nucleospin RNA II" (Macherey-Nagel), seguendo il protocollo della ditta produttrice. Analogamente al sistema utilizzato per l'estrazione del DNA anche questo metodo si basa sull'uso di colonne dotate di membrana a matrice silicea che, in presenza di alte concentrazioni di sali, lega selettivamente l'RNA. 200 µl di sangue intero in K_3EDTA appartenente al soggetto malato e a due soggetti sani sono stati risospesi in 350 µl di tampone di lisi RA1 in presenza di 3,5 µl di β -mercaptoetanolo. I campioni sono stati successivamente filtrati per ridurre la viscosità, addizionati di 350 µl di etanolo al 70%, trasferiti in una colonna per la purificazione dell'acido nucleico fornita dal sistema e centrifugati per favorire il legame tra acido nucleico e membrana a matrice silicea. Dopo un'incubazione di 15 minuti a temperatura ambiente con 90 µl di DNAsi per rimuovere ogni traccia di DNA contaminante, i campioni sono stati sottoposti ad un primo lavaggio utilizzando 200 µl di tampone RAII, seguito da due ulteriori lavaggi con 600 µl e 250 µl di tampone RA III. Infine, i campioni sono stati eluiti in 60 µl di acqua ultrapura priva di RNAsi.

Retrotrascrizione dell'RNA a cDNA

Per la retrotrascrizione è stato utilizzato il kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis (Fermentas). In base alla concentrazione, circa 4µg di ciascun campione di RNA è stato aggiunto ad una mix contenente 1 µl di Random Hexamer primer e acqua nucleasi-free per arrivare ad un volume finale di 12 µl. Successivamente, ad ogni tubo sono aggiunti 4µl di 5X Reaction Buffer, 2 µl di dNTP mix (10 mM), 1 µl di Ribolock™ Ribonuclease inibitore (20 u/µl) e 1 µl di trascrittasi inversa RevertAid™M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl) per un volume finale di 20 µl. Quindi i campioni sono stati incubati 5 minuti a 25°C e in seguito a 42°C per 60 min; la reazione è stata bloccata riscaldando la piastra a 70°C per 10 min. Il cDNA ottenuto è stato utilizzato per le successive reazioni di PCR.

Condizioni di PCR

Le reazioni di amplificazione sono state realizzate in un volume finale di 25 µl impiegando nella mix: 5 µl di 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 2 µl di MgCl₂ 25 mM, 2,5 µl di dNTPs 250 µM each, 1,25 µl di Primer Fw 5 mM, 1,25 µl di Primer Rev 5 mM, 0,2 µl di GoTaq® Hot Start Polymerase 5u/ µl, 2 µl di cDNA e acqua per biologia molecolare per arrivare ad un volume totale di 25 µl.

Le reazioni di amplificazione sono state realizzate in un Termociclatore Mastercycler eppgradient S (eppendorf®).

Il protocollo di PCR prevedeva:

Denaturazione a 95 °C x 2 min., 35 X (denaturazione a 94 ° C x 30 s – annealing a 57/58/60 °C x 30 s – estensione a 72 °C x 2,5 min.), estensione finale a 72 °C x 5 min.

I prodotti di amplificazione sono stati sottoposti a elettroforesi su gel d'agarosio all'1% e successivamente sono stati visualizzati mediante colorazione con etidio bromuro.

Purificazione e sequenziamento dei prodotti di PCR

La purificazione del prodotto è stata effettuata utilizzando un protocollo basato sulla precipitazione con etanolo e sodio acetato. Al prodotto dell'amplificazione è stato quindi aggiunto 1/10 del volume di sodio acetato 3 M, 2 volumi e mezzo d'etanolo assoluto freddo ed il tutto è stato incubato in ghiaccio per 30 minuti. Successivamente, è stata effettuata una centrifugazione a temperatura ambiente per 30 minuti a 11.000 x g. Eliminato il surnatante, al precipitato sono stati aggiunti 125 µl di etanolo al 70% a -20°C. Successivamente, dopo una centrifuga a 11.000 x g per 20-30 minuti a temperatura ambiente, è stato

eliminato il surnatante. Al precipitato sono stati aggiunti nuovamente 125 μ l di etanolo al 70% -20°C. Dopo una nuova centrifuga a 11.000 x g per 20-30 minuti a temperatura ambiente è stato eliminato il surnatante. Il precipitato, quindi è stato asciugato a temperatura ambiente per 20 minuti e risospeso in 20 μ l di formammide.

I prodotti della reazione di sequenziamento sono stati caricati sul capillare di un sequenziatore Abi Prism 310 Genetic Analyzer ed interpretati attraverso l'utilizzo del programma Sequence Scanner v. 1.0

2.9 RISULTATI

In seguito a corsa elettroforetica su gel d'agarosio, sono stati visualizzati i prodotti delle 6 PCR, relativi al soggetto malato (Figura 47) e ai due soggetti sani (Figura 48). Inizialmente è stato riscontrata una mancata amplificazione utilizzando la terza coppia di primer, risolto con il riacquisto dei primer stessi.

Dei due soggetti sani uno è stato escluso in seguito alla visualizzazione dei prodotti in quanto il cDNA era eccessivamente contaminato dal DNA genomico.

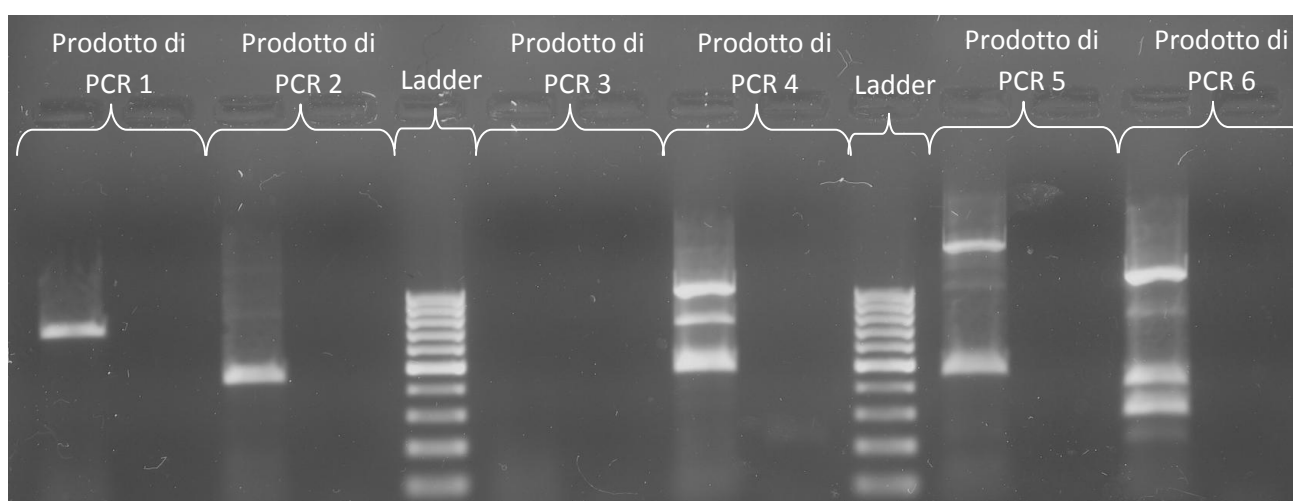
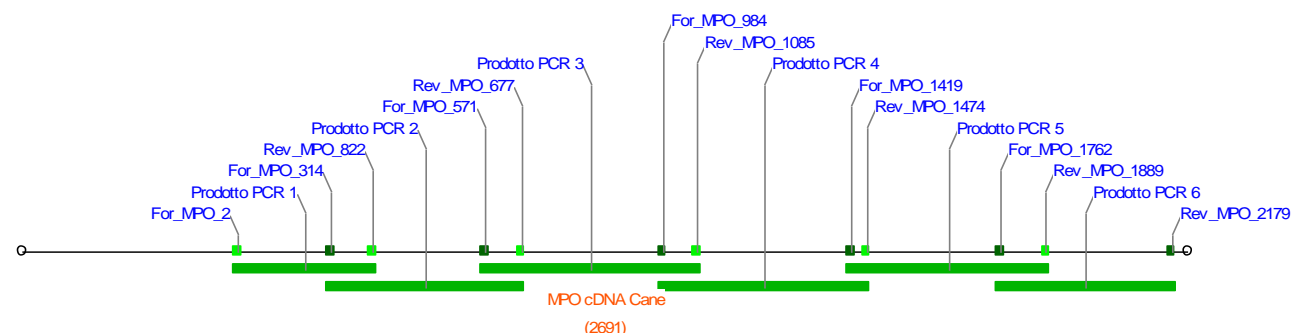


Figura 47: In alto: Rappresentazione schematica delle coppie di primer. In basso: corsa elettroforetica su gel di agarosio dei prodotti di PCR ottenuti utilizzando il cDNA del soggetto malato. La terza coppia di primer inizialmente non ha mostrato un'amplificazione, ma in seguito al riacquisto dei primer è stato possibile ottenere il prodotto.

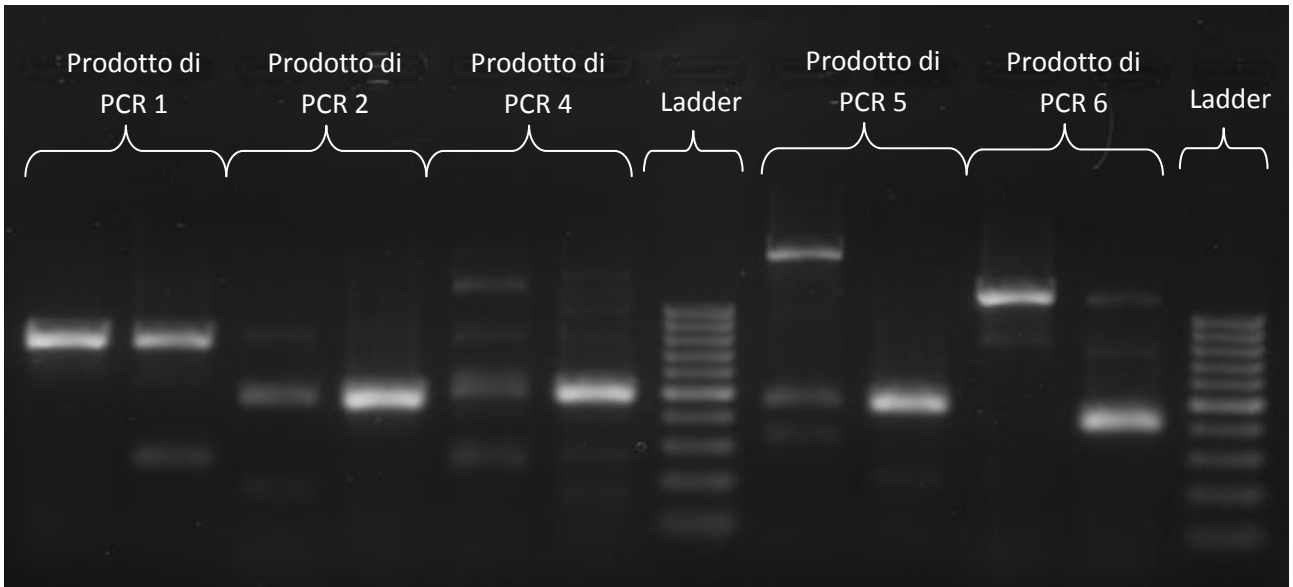


Figura 48: corsa elettroforetica su gel di agarosio dei prodotti di PCR ottenuti utilizzando il cDNA dei due soggetti sani. La terza coppia di primer è stata in questa prova esclusa in quanto non funzionante. Com'è possibile evincere dall'immagine uno dei due soggetti sani (la primacolonna di ogni prodotto di PCR) presentava una notevole contaminazione da parte del DNA genomico, visibile dalle numerose bande a peso molecolare elevato presenti.

Come'è visibile dalla figura 49 che mette a confronto le PCR ottenute sul soggetto sano e sul soggetto patologico è già possibile riscontrare delle differenze negli amplificati a partire dal 4° prodotto di PCR.

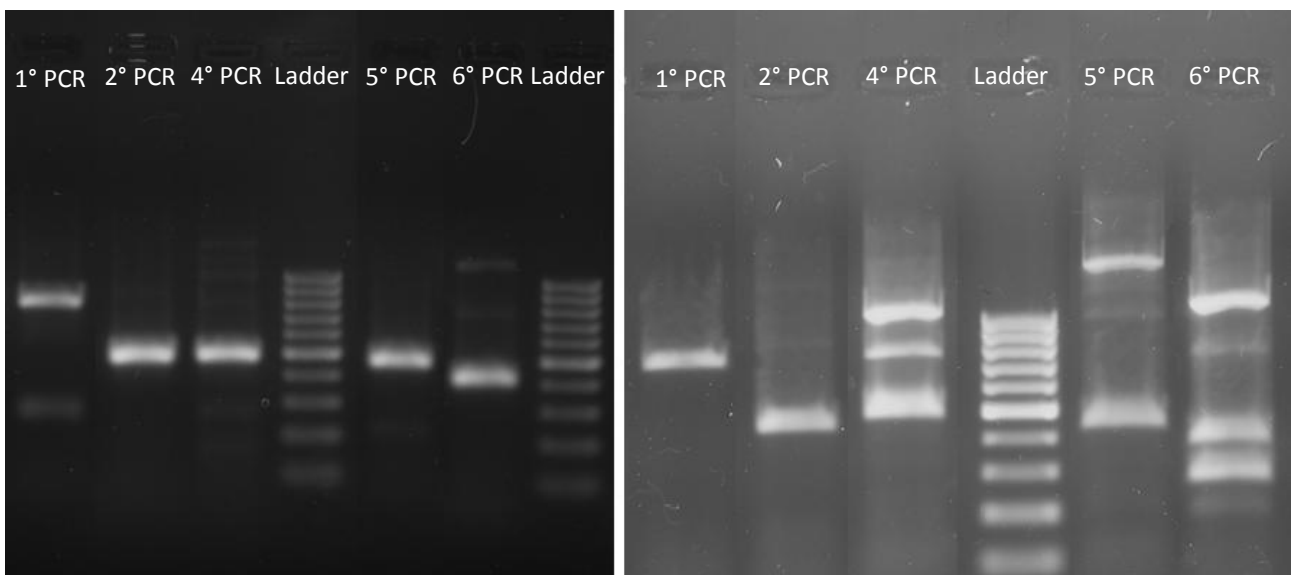


Figura 49: Confronto dei prodotti di PCR ottenuti sul soggetto sano e sul soggetto patologico.

Sono state effettuate in totale sei PCR con sei diverse coppie di primer per coprire tutto il gene predetto MPO . I sequenziamenti hanno consentito di assemblare l'intera porzione di gene MPO amplificabile con i primer da noi disegnati.

Dal confronto delle sequenza del soggetto sano e del soggetto malato è stata identificata una mutazione puntiforme determinante un codone di stop prematuro nel dominio perossidasi (Figura 51).

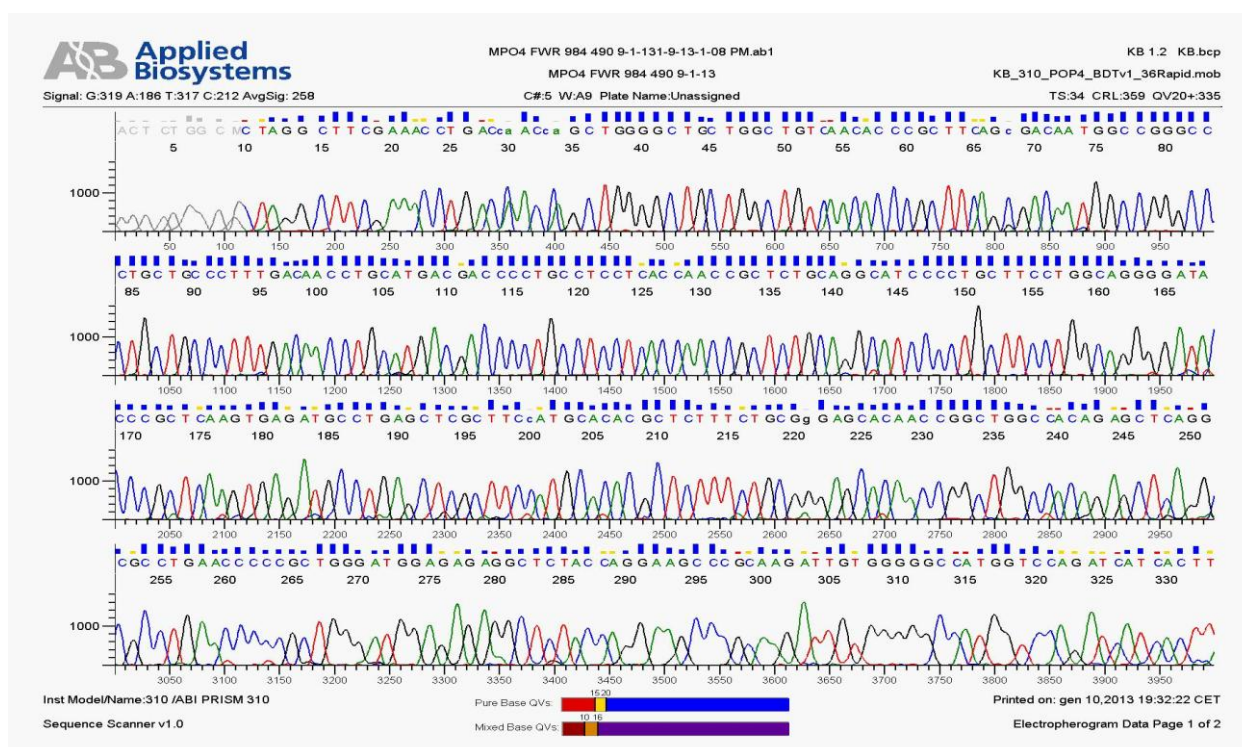


Figura 50 Frammento MPO4

Range 1: 1 to 1132 Graphics					▼ Next Match ▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
2085 bits(1129)	0.0	1131/1132(99%)	0/1132(0%)	Plus/Plus	
Query Sbjct	782 1	TGGCCACTAGGCTTCGAAACCTGACCAACCAGCTGGGGCTGCTGGCTGTCAACACCCGCT		841 60	
Query Sbjct	842 61	TCAGCGACAATGGCCGGGCCCTGCTGCCCTTTGACAACCTGCATGACGACCCCTGCCTCC		901 120	
Query Sbjct	902 121	TCACCAACCGCTCTGCAGGCATCCCCTGCTTCCTGGCAGGGGATACCCGCTCAAGTGAGA		961 180	
Query Sbjct	962 181	TGCCTGAGCTCGCTTCCATGCACACGCTCTTTCTGCGGGAGCACAACCGCTGGCCACAG		1021 240	
Query Sbjct	1022 241	AGCTCAGGCGCCTGAACCCCGCTGGGATGGAGAGAGGCTCTACCAGGAAGCCCGCAAGA		1081 300	
Query Sbjct	1082 301	TTGTGGGGCCATGGTCCAGATCATCACTTATCGGGACTACCTGCCCTGGTGTGGGAC		1141 360	
Query Sbjct	1142 361	CACTGGCCATGAGGAAGTACCTGCCGAGGTACCGCTCCTACAATGACTCGGTAGACCCCTC		1201 420	
Query Sbjct	1202 421	GCATCTCCAACGICTTTACCAATGCCTTCCGCTATGGCCACACCCTCATCCAACCTTTCA		1261 480	
Query Sbjct	1262 481	TGTTCCGCCTGGATAAACCGGTACCAGCCCATGGGGCCCAACCCCGCGTTCCTCAGCA		1321 540	
Query Sbjct	1322 541	GGGTCTTCTTCGCTACCTGGAGGGTAGTGCTGGAAGGTGGCATTGACCCCATCTGCGGG		1381 600	
Query Sbjct	1382 601	GCCTCATGGCCACCCCTGCCAAGCTGAATCGCCAGAACCAGATTGTGGTGGACGAGATCC		1441 660	
Query Sbjct	1442 661	GGGAGCGGCTGTTTGAGCAGGTCATGAGGATTGGGCTGGACCTGCCTGCCCTGAACATGC		1501 720	
Query Sbjct	1502 721	AGCGCAGCCGGGACCACGGCCTCCAGGGTACAATGCCTGGAGGCGCTTCTGCGGCCTCC		1561 780	
Query Sbjct	1562 781	CTCAGCCCAGCACTGTGGGTGAGCTGGCCACGGTGCTCAGGAACCTGGACCTGGCACAGA		1621 840	
Query Sbjct	1622 841	AGCTGATGCAGCAGTATGGCAGCCCCGACAACATTGACATCTGGATGGGTGGGGTGGCTG		1681 900	
Query Sbjct	1682 901	AGCCCTGGAGCCCAGAGGCCGTGTGGCCAGCTCCTCGCCTGCCTCATGGGACCCAGT		1741 960	
Query Sbjct	1742 961	TCCGGAAGCTCCGAGATGGTGACCGGTTTTGGTGGGAGAACAGAGGTGTGTTCAGCAGCC		1801 1020	
Query Sbjct	1802 1021	AGCAGCAGCAGGCGCTGGCCAGGATCTCCCTGCCCGAATCATCTGCGACAACACGGGCA		1861 1080	
Query Sbjct	1862 1081	TCACCACTGTGTCCAAAAACAACATCTTCATGTCCAACATGTTCCCTCGGGA		1913 1132	

Figura 51: In nero la sequenza del gene MPO del soggetto sano. Il nucleotide in rosso rappresenta la mutazione riscontrata nel soggetto patologico.

2.10 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La carenza di mieloperossidasi è stata considerata un'evenienza estremamente rara fino a pochi anni fa e fino al 1979 sono stati segnalati solo 17 casi nell'uomo. Tuttavia, grazie alle indagini di citochimica automatica attualmente disponibili, la carenza di MPO è ora più facilmente diagnosticabile.

Sebbene la mieloperossidasi sia coinvolta nell'uccisione di alcuni microrganismi patogeni, non è stata evidenziata la suscettibilità ad infezioni ricorrenti o severe nei soggetti che presentano carenza di attività mieloperossidasi. Dati clinici e la dimostrazione che la capacità di debellare batteri e funghi è solo lievemente compromessa indicano l'esistenza di meccanismi MPO-indipendenti che sono particolarmente efficienti in quei soggetti che presentano una carenza di MPO.

E' stata riportata una correlazione tra la carenza di MPO e la probabilità di sviluppare neoplasie. Alcuni autori hanno dimostrato il coinvolgimento dell'MPO dei neutrofili nella mediazione della citotossicità delle cellule tumorali (Lanza, 1998).

Dalle analisi biomolecolari effettuate sul soggetto che presentava carenza di MPO all'indagine di citochimica automatica con ADVIA® 2120 Hematology System è stata identificata una mutazione puntiforme determinante un codone di stop prematuro nel dominio perossidasi.

Tipi differenti di mutazioni possono indurre un codone di terminazione prematuro. In particolare le mutazioni nonsense generano un codone di stop prematuro sostituendo un codone codificante per un aminoacido con un codone di stop.

La maggior parte dei trascritti non senso viene riconosciuta ed è efficientemente degradata dalla cellula tramite una via nota come Nonsense Mediated mRNA Decay (NMD). Il meccanismo dell'NMD risulta traduzione dipendente; è infatti tramite un ciclo preliminare di traduzione che l'mRNA viene analizzato e l'eventuale presenza di un codone di stop anormale rilevata [Ishigaki et al., 2001];

Questo tipo di verifica permette di evitare conseguenze letali derivanti dalla produzione di un polipeptide tronco che potrebbe interferire con le funzioni vitali della cellula.

Per alcune mutazioni troncanti il processo di NMD può rendere difficoltosa l'analisi perché il trascritto viene degradato. In questo caso non sono stati riscontrati problemi di amplificazione dei prodotti, per cui l'RNA messaggero era presente in quantità sufficiente ad essere rilevato.

Al momento è stato sequenziato l'intero gene codificante per la MPO, fatta eccezione per una delle due regioni terminali del cDNA. Essa potrà essere amplificata attraverso la RACE PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends). La RACE è una procedura utilizzata per l'amplificazione di sequenze di cDNA, a partire da un template di mRNA, comprese tra un determinato sito noto all'interno della sequenza e una sequenza non conosciuta ad una delle due estremità.

BIBLIOGRAFIA

- Agner K. Verdoperoxidase. A ferment isolated from leukocytes. *Acta Chem Scand A*. 1941;2 Suppl. 8:1–62.
- Alhassan A, Govind Y, Tam NT, Thekiso OM, Yokoyama N, Inoue N, Igarashi I. “Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmiasis.” *Parasitol Res*. 2007 Apr;100(5):1165-8.
- Alhassan A, Thekiso OM, Yokoyama N, Inoue N, Motloang MY, Mbat PA, Yin H, Katayama Y, Anzai T, Sugimoto C, Igarashi I. “Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmiasis.” *Vet Parasitol*. 2007 Jan 31;143(2):155-60.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. “Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.” *Microbiol Rev*. 1995 Mar;59(1):143-69.
- Arnhold J, Flemmig J. “Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity.” *Arch Biochem Biophys*. 2010 Aug 1;500(1):92-106.
- Barker E, Tasker S. “Haemoplasmas: lessons learnt from cats.” *N Z Vet J*. 2013 Jul;61(4):184-92.
- Belessi CE, Gounadaki AS, Schvartzman S, Jordan K, Skandamis PN. “Evaluation of growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* growing on stainless steel surfaces, detached from biofilms or in suspension, in response to pH and NaCl.” *Int. J. Food Microbiol.*, 2011. 145:53-60
- Boozer AL, Macintire DK. “Canine babesiosis.” *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2003 Jul;33(4):885-904, viii
- Braund K.G. (2003). “Myopathic disorders” In Braund K.G. “Clinical neurology in small animals – Localization, Diagnosis and Treatment”. International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA. (www.ivis.org). Document No. B0221.0402.
- Brewer GJ. 2000. DNA studies in Dobermann von Willebrand’s disease; www.vetgen.com.
- Brooks M., Dodds WJ., Raymond SL. 1992. Epidemiologic features of von Willebrand’s disease in Dobermann Pinscher, Scottish Terrier and Shetland Sheepdogs: 260 cases (1984-1988). *J Am Vet Med Assoc*. 200: 1123-1127.
- Brooks M., Hollis NE., Foureman PA. et al. 2001. von Willebrand disease phenotype and von Willebrand factor marker genotype in Dobermann Pinscher. *Am J Vet Res*. 62: 364-369.
- Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. “Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction.” *J Clin Microbiol*. 1989 Aug;27(8):1787-92.
- Chang KS, Schroeder W, Siciliano MJ, et al. (1987) “The localization of the human myeloperoxidase gene is in close proximity to the translocation breakpoint in acute promyelocytic leukemia”. *Leukemia* 1:458–462.
- Chang KS, Trujillo JM, Cook RG, Stass SA (1986) “Humanmyeloperoxidase gene: molecular cloning and expression in leukemic cells”. *Blood* 68:1411–1414.

- Compton J. "Nucleic acid sequence-based amplification." *Nature*. 1991 Mar 7;350(6313):91-2.
- Costa, J.M., Pautas, C., Ernault, P., Foulet, F., Cordonnier, C., Bretagne, S., 2000. Realtime PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2929–2932.
- Criado-Fornelio A. "A review of nucleic-acid-based diagnostic tests for *Babesia* and *Theileria*, with emphasis on bovine piroplasms." *Parassitologia*. 2007 May;49 Suppl 1:39-44.
- Curtis KA, Niedzwiedz PL, Youngpairaj AS, Rudolph DL, Owen SM. "Real-Time Detection of HIV-2 by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification." *J Clin Microbiol*. 2014 Jul;52(7):2674-6.
- Davidson MG. "Toxoplasmosis." *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2000 Sep;30(5):1051-62.
- Decaro N, Elia G, Martella V, Desario C, Campolo M, Trani LD, Tarsitano E, Tempesta M, Buonavoglia C. "A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs." *Vet Microbiol*. 2005 Jan 5;105(1):19-28.
- Decaro N, Desario C, Lucente MS, Amorisco F, Campolo M, Elia G, Cavalli A, Martella V, Buonavoglia C. "Specific identification of feline panleukopenia virus and its rapid differentiation from canine parvoviruses using minor groove binder probes." *J Virol Methods*. 2008 Jan;147(1):67-71.
- Deng X, Phillippy AM, Li Z, Salzberg SL, Zhang W. "Probing the pan-genome of *Listeria monocytogenes*: new insights into intraspecific niche expansion and genomic diversification". *BMC Genomics*, 2010 Sep 16;11:500
- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. "Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*." *Clin Microbiol Rev*. 2007 Apr;20(2):323-67.
- Dubey JP, Lappin MR. "Toxoplasmosis and Neosporosis" In Greene C. G. (Ed): *Infectious diseases of the dog and the cat*. Third edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, USA; ch. 80:754-775
- Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G. "High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock." *Int J Parasitol*. 2001 Dec;31(14):1699-703.
- Elia G, Cavalli A, Desario C, Lorusso E, Lucente MS, Decaro N, Martella V, Buonavoglia C. "Detection of infectious canine parvovirus type 2 by mRNA real-time RT-PCR." *J Virol Methods*. 2007 Dec;146(1-2):202-8.
- Fahrimal Y, Goff WL, Jasmer DP. "Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA." *J Clin Microbiol*. 1992 Jun;30(6):1374-9.
- Francois P, Tangomo M, Hibbs J, Bonetti EJ, Boehme CC, Notomi T, Perkins MD, Schrenzel J. "Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications." *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011 Jun;62(1):41-8.
- Fuentes I, Rodriguez M, Domingo CJ, del Castillo F, Juncosa T, Alvar J. "Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR." *J Clin Microbiol*. 1996 Oct;34(10):2368-71.

Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. "Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review." *FEMS Microbiol Rev.* 2005 Nov;29(5):851-75.

Gentilini F, Novacco M, Turba ME, Willi B, Bacci ML, Hofmann-Lehmann R. "Use of combined conventional and real-time PCR to determine the epidemiology of feline haemoplasma infections in northern Italy." *J Feline Med Surg.* 2009 Apr;11(4):277-85.

Gentilini F, Zambon E, Gandini G, Rosati M, Spadari A, Romagnoli N, Turba ME, Gernone F. "Frequency of the allelic variant of the PTPLA gene responsible for centronuclear myopathy in Labrador Retriever dogs as assessed in Italy." *J Vet Diagn Invest.* 2011 Jan;23(1):124-6.

Gentilini F, Turba ME. "Two novel real-time PCR methods for genotyping the von Willebrand disease type I mutation in Doberman Pinscher dogs." *Vet J.* 2013 Aug;197(2):457-60.

González S, Geymonat JP, Hernández E, Marqués JM, Schelotto F, Varela G. "Usefulness of real-time PCR assay targeting lipL32 gene for diagnosis of human leptospirosis in Uruguay." *J Infect Dev Ctries.* 2013 Dec 15;7(12):941-5.

Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K. "Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue." *Biotechniques.* 2009 Mar;46(3):167-72.

Grimont PAD, Vancanneyt M, Lefevre M, Vandemeulebroecke K, Vauterin L, Brosch R, Kersters K, Grimont F (1996). "Ability of Biolog and Biotype-100 systems to reveal the taxonomic diversity of the pseudomonads." *Syst. Appl. Microbiol.* 19:510-527.

Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun.* 68:2276-2285.

Hao X, Liu Y, Li X, Kang H, Qu X, He J, Hu H, Huang Y, Liu B, Yu C. "An intra-operative RT-LAMP method allows rapid and reliable detection of sentinel lymph node metastasis in breast cancer patients." *Virchows Arch.* 2014 Nov 27.

Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT. "Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs." *J Am Vet Med Assoc.* 2003 May 1;222(9):1224-9.

Harrus S, Klement E, Aroch I, Stein T, Bark H, Lavy E, Mazaki-Tovi M, Baneth G. "Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections." *Vet Rec.* 2002 Jul 20;151(3):82-5.

Hirasawa T, Kaneshige T, Mikazuki K. "Sensitive detection of canine parvovirus DNA by the nested polymerase chain reaction." *Vet Microbiol.* 1994 Jul;41(1-2):135-45.

Hughes JM, Williams RH, Morley EK, Cook DA, Terry RS, Murphy RG, Smith JE, Hide G. "The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations." *Parasitology.* 2006 Jan;132(Pt 1):29-36.

- Ishigaki Y, Li X, Serin G, Maquat LE. "Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20." *Cell*. 2001 Sep 7;106(5):607-17.
- Iwamoto T1, Sonobe T, Hayashi K. "Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples." *J Clin Microbiol*. 2003 Jun;41(6):2616-22.
- Jenkins KS, Dittmer KE, Marshall JC, Tasker S. "Prevalence and risk factor analysis of feline haemoplasma infection in New Zealand domestic cats using a real-time PCR assay." *J Feline Med Surg*. 2013 Dec;15(12):1063-9.
- Jensen WA, Lappin MR, Kamkar S, Reagan WJ. "Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats." *Am J Vet Res*. 2001 Apr;62(4):604-8.
- Johnson KR, Nauseef WM, Care A, Wheelock MJ, Shane S, Koeffler HP, Selsted M, Miller C, Rovera G (1987): Characterization of cDNA clones for human myeloperoxidase: predicted amino acid sequence and evidence for multiple mRNA species. *Nucleic Acids Res* 15:2013–2028
- Johnson GS., Turrentine MA., Kraus KH. 1988. Canine von Willebrand's disease. A heterogeneous group of bleeding disorders. *Vet Clin North Amer, Small Anim Prac*. 1988. 18: 195-229.
- Johnson K, Gemperlein I, Hudson S, Shane S, Rovera G (1989): Complete nucleotide sequence of human myeloperoxidase gene. *Nucleic Acids Res* 17:7985–7986
- Kakuya F, Kinebuchi T, Fujiyasu H, Tanaka R, Kano H. "Genetic point-of-care diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection using LAMP assay." *Pediatr Int*. 2014 Aug;56(4):547-52.
- Karani M, Sotiriadou I, Plutzer J, Karanis P. "Bench-scale experiments for the development of a unified loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the in vitro diagnosis of *Leishmania* species' promastigotes." *Epidemiol Infect*. 2014 Aug;142(8):1671-7.
- Klebanoff SJ. "Myeloperoxidase: friend and foe." *J Leukoc Biol*. 2005 May;77(5):598-625.
- Koizumi N, Nakajima C, Harunari T, Tanikawa T, Tokiwa T, Uchimura E, Furuya T, Mingala CN, Villanueva MA, Ohnishi M, Suzuki Y. "A new loop-mediated isothermal amplification method for rapid, simple, and sensitive detection of *Leptospira* spp. in urine." *J Clin Microbiol*. 2012 Jun;50(6):2072-4.
- Kong QM, Lu SH, Tong QB, Lou D, Chen R, Zheng B, Kumagai T, Wen LY, Ohta N, Zhou XN. "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): early detection of *Toxoplasma gondii* infection in mice." *Parasit Vectors*. 2012 Jan 3;5:2.
- Kumar M, Nandi S. "Development of a SYBR Green based real-time PCR assay for detection and quantitation of canine parvovirus in faecal samples." *J Virol Methods*. 2010 Oct;169(1):198-201.
- Langoni H, Fornazari F1, da Silva RC1, Monti ET1, Villa FB. "Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs." *Braz J Microbiol*. 2014 Mar 10;44(4):1327-30.

- Lanza F. "Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency." *J Mol Med (Berl)*. 1998 Sep;76(10):676-81.
- Lee D, La Mura M, Allnutt TR, Powell W. "Detection of genetically modified organisms (GMOs) using isothermal amplification of target DNA sequences." *BMC Biotechnol*. 2009 Feb 2;9:7
- Li J, Macdonald J. "Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes." *Biosens Bioelectron*. 2015 Feb 15;64:196-211.
- Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. "Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*." *J Clin Microbiol*. 2000 Nov;38(11):4121-5.
- Lin X, Chen Y, Lu Y, Yan J, Yan J. "Application of a loop-mediated isothermal amplification method for the detection of pathogenic *Leptospira*." *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Mar;63(3):237-42.
- Littlewood JD., Herrtage ME., Gorman NT. et al. 1987. von Willebrand's disease in the United Kingdom. *Vet Rec*. 121: 463-468.
- Liu D, Lawrence ML, Austin FW, Ainsworth AJ. "A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*." *J Microbiol Methods*. 2007; 71(2):133-40
- Liu J, Nian QG, Li J, Hu Y, Li XF, Zhang Y, Deng YQ, Zhu SY, Zhu QY, Qin ED, Jiang T, Qin CF. "Development of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of novel avian influenza A (H7N9) virus." *BMC Microbiol*. 2014 Nov 14;14(1):271.
- Lucchesi PM, Arroyo GH, Etcheverría AI, Parma AE, Seijo AC. "Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR." *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004 Mar-Apr;37(2):131-4.
- Martínez-Díaz VL, Silvestre-Ferreira AC, Vilhena H, Pastor J, Francino O, Altet L. "Prevalence and co-infection of haemotropic mycoplasmas in Portuguese cats by real-time polymerase chain reaction." *J Feline Med Surg*. 2013 Oct;15(10):879-85.
- Mohan Raj J, Mukhopadhyay HK, Thanislass J, Antony PX, Pillai RM. "Isolation, molecular characterization and phylogenetic analysis of canine parvovirus." *Infect Genet Evol*. 2010 Dec;10(8):1237-41.
- Montoya A, Miró G, Blanco MA, Fuentes I. "Comparison of nested PCR and real-time PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in biological samples from naturally infected cats." *Res Vet Sci*. 2010 Oct;89(2):212-3.
- Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. "Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation." *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Nov 23;289(1):150-4.
- Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T. "Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA." *J Biochem Biophys Methods*. 2004 May 31;59(2):145-57.
- Morishita K, Kubota N, Asano S, Kaziro Y, Nagata S (1987): Molecular cloning and characterization of cDNA for human myeloperoxidase. *J Biol Chem* 262:3844-3851
- Moser J., Meyers KM., Russon RH. 1996a. Inheritance of von Willebrand's factor deficiency in Doberman Pinscher. *J Am Med Vet Assoc*. 209: 1103-1106.

- Müller N, Zimmermann V, Hentrich B, Gottstein B. "Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay." *J Clin Microbiol.* 1996 Nov;34(11):2850-2.
- Müller H, Aysul N, Liu Z, Salih DA, Karagenc T, Beyer D, Kullmann B, Ahmed JS, Seitzer U. "Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid diagnosis of *Babesia canis* infections." *Transbound Emerg Dis.* 2010 Apr;57(1-2):63-5.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. "Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 (1986): 263-273.
- Murray GL. 2013. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Vet. Microbiol.* 162:305-314.
- Muto Y, Matubara H, Tanizawa T, Nabeya Y, Kawahira H, Akai T, Hoshino I, Hayashi H. "Rapid diagnosis of micrometastasis of gastric cancer using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification." *Oncol Rep.* 2011 Oct;26(4):789-94.
- Nabity MB, Kumar Ramaiah S, Walcheck B. "Neutrophil Structure and Biochemistry", in Schalm's Veterinary Hematology, 6th Ed., Weiss DJ, Wardrop KJ, Eds), Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, 2010, 263-267.
- Nabity MB, Kumar Ramaiah S, Walcheck B. "Neutrophil Distribution and Function", in Schalm's Veterinary Hematology, 6th Ed., Weiss DJ, Wardrop KJ, Eds), Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, 2010, 268-274.
- Nagamine K., Watanabe K., Ohtsuka K., Hase T., & Notomi T. "Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template." *Clinical Chemistry* 47.9 (2001): 1742-1743.
- Nagamine K, Hase T, Notomi T. "Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers." *Mol Cell Probes.* 2002 Jun;16(3):223-9.
- Nakamura N, Ito K, Takahashi M, Hashimoto K, Kawamoto M, Yamanaka M, Taniguchi A, Kamatani N, Gemma N. "Detection of six single-nucleotide polymorphisms associated with rheumatoid arthritis by a loop-mediated isothermal amplification method and an electrochemical DNA chip." *Anal Chem.* 2007 Dec 15;79(24):9484-93.
- Niessen L. "Current state and future perspectives of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based diagnosis of filamentous fungi and yeasts." *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014 Dec 11.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. "Loop-mediated isothermal amplification of DNA." *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):E63.
- Njiru ZK. "Rapid and sensitive detection of human African trypanosomiasis by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick." *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011 Feb;69(2):205-9.
- Parida M, Posadas G, Inoue S, Hasebe F, Morita K. "Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus." *J Clin Microbiol.* 2004 Jan;42(1):257-63.
- Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, Morita K. "Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases." *Rev Med Virol.* 2008 Nov-Dec;18(6):407-21

- Patel JC, Oberstaller J, Xayavong M, Narayanan J, DeBarry JD, Srinivasamoorthy G, Villegas L, Escalante AA, DaSilva A, Peterson DS, Barnwell JW, Kissinger JC, Udhayakumar V, Lucchi NW. "Real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) for the species-specific identification of *Plasmodium vivax*." *PLoS One*. 2013;8(1):e54986
- Pelé M., Tired L., Kessler J.L., Blot S., Panthier J.J. (2005). "SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs". *Human Molecular Genetics*: 14(11): 1417-27.
- Pinne M, Haake DA. 2013. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: presentation of new data and reevaluation of previous studies. *PLoS One*. 8:e51025.
- Powell CC, McInnis CL, Fontenelle JP, Lappin MR. "Bartonella species, feline herpesvirus-1, and *Toxoplasma gondii* PCR assay results from blood and aqueous humor samples from 104 cats with naturally occurring endogenous uveitis." *J Feline Med Surg*. 2010 Dec;12(12)
- Radin MJ, Wellman ML. "Granulopoiesis", in Schalm's Veterinary Hematology, 6th Ed., Weiss DJ, Wardrop KJ, Eds, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, 2010, 43-49
- Reichel MP, Ellis JT, Dubey JP. "Neosporosis and hammondiosis in dogs." *J Small Anim Pract*. 2007 Jun;48(6):308-12.
- Renier S, Hébraud M, Desvaux M. "Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen." *Environ Microbiol*. 2011 Apr;13(4):835-50.
- Riehl J., Okura M., Mignot E. et al. 2000. Inheritance of von Willebrand's disease in a colony of Doberman Pinschers. *Am J Vet Res*. 61, n°2: 115-120.
- Rossmann P, Wagner M. "The challenge to quantify *Listeria monocytogenes*--a model leading to new aspects in molecular biological food pathogen detection." *J Appl Microbiol*. 2011 Mar;110(3):605-17.
- Salmon SE, Cline MJ, Schultz J, Lehrer RI. "Myeloperoxidase deficiency. Immunologic study of a genetic leukocyte defect." *N Engl J Med*. 1970 Jan 29;282(5):250-3.
- Scarpellini M, Franzetti L, Galli A. "Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Jul 15;236(2):257-60.
- Schettler TP, Moubri K, Cooke BM. "Comparison of *Babesia rossi* and *Babesia canis* isolates with emphasis on effects of vaccination with soluble parasite antigens: a review." *J S Afr Vet Assoc*. 2009 Jun;80(2):75-8.
- Sharkey LC, Hill S. "Structure of bone marrow", in Schalm's Veterinary Hematology, 6th Ed., Weiss DJ, Wardrop KJ, Eds), Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, 2010, 8-13.
- Skyles JE, Drazenovich NL, Ball LM, Leutenegger CM. "Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats." *J Vet Intern Med* 2007; 21: 685-93.

- Sleator RD, Watson D, Hill C, Gahan CG. The interaction between *Listeria monocytogenes* and the host gastrointestinal tract". *Microbiology*. 2009 Aug;155(Pt 8):2463-75.
- Sonthayanon P, Chierakul W, Wuthiekanun V, Thaipadungpanit J, Kalambaheti T, Boonsilp S, Amornchai P, Smythe LD, Limmathurotsakul D, Day NP, Peacock SJ. "Accuracy of loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of human leptospirosis in Thailand." *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Apr;84(4):614-20.
- Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. 2009. "Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene." *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 64:247-255.
- Stokol T., Parry BW. 1993. Canine von Willebrand's disease: a review. *Aust Vet Pract*. 23: 94-103
- Stokol T., Parry BW., Mansell PD. 1995. "Von Willebrand disease in Doberman dogs in Australia". *Aust Vet J*. 72: 257
- Sykes JE, Drazenovich NL, Ball LM, Leutenegger CM. "Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats." *J Vet Intern Med* 2007; 21: 685-93.
- Stirn M, Moritz A, Bauer N. "Rate of manual leukocyte differentials in dog, cat and horse blood samples using ADVIA 120 cytograms." *BMC Vet Res*. 2014 Jun 5;10:125.
- Sun ZF, Hu CQ, Ren CH, Shen Q. "Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification." *J Virol Methods*. 2006 Jan;131(1):41-6.
- Suwancharoen D, Kulchim C, Chirathaworn C, Yoshida S. Development of a novel primer combination to detect pathogenic *Leptospira* by loop-mediated isothermal amplification." *J Microbiol Methods*. 2012 Oct;91(1):171-3.
- Tang MJ, Zhou S, Zhang XY, Pu JH, Ge QL, Tang XJ, Gao YS. "Rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* by loop-mediated isothermal amplification." *Curr Microbiol*. 2011 Dec;63(6):511-6.
- Tasker S, Helps CR, Day MJ, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. "Use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemofelis* and "Candidatus *Mycoplasma haemominutum*" DNA." *J Clin Microbiol*. 2003 Jan;41(1):439-41.
- Tasker S. "Haemotropic Mycoplasmas: What's Their Real Significance in Cats?" *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2010 ;12: 369-381
- Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products." *Nat Protoc*. 2008;3(5):877-82.
- Turba Maria Elena; Zambon Elisa . Brevetto italiano ed esteseione internazionale a PCT: "METHOD FOR THE DETECTION OF NUCLEIC ACID SYNTHESIS AND/OR AMPLIFICATION" - Bibliographic data: CA2856663 (A1) — 2013-06-06 -Applicant(s): Genefast Srl
- Uwatoko K, Sunairi M, Nakajima M, Yamaura K. "Rapid method utilizing the polymerase chain reaction for detection of canine parvovirus in feces of diarrheic dogs." *Vet Microbiol*. 1995 Mar;43(4):315-23.

- Venta PJ., Li J., Yuzbasiyan-Gurkan V. et al. 2000. Mutation causing von Willebrand's disease in Scottish Terriers. *J Vet Intern Med.* 14: 10-19.
- Venta PJ., Brewer GJ. et al. 2004. DNA encoding canine von Willebrand factor and methods of use. United States Patent. Patent number: 6780583 B1.
- Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, Ahrens P, Jensen JS, Krogfelt KA. 2012. Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: pit-falls of in silico validation. *J. Microbiol. Methods.* 91:184-190.
- Wang D, Zhang G, Lu C, Deng R, Zhi A, Guo J, Zhao D, Xu Z. "Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk with loop-mediated isothermal amplification and chemosensor." *J Food Sci.* 2011 Nov-Dec;76(9):M611-5.
- Wang L, Li Y, Chu J, Xu Z, Zhong Q. "Development and application of a simple loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Listeria monocytogenes* strains." *Mol Biol Rep.* 2012 Jan;39(1):445-9.
- Weil SC, Rosner GL, Reid MS, et al. (1987): cDNA cloning of human myeloperoxidase: decrease in myeloperoxidase mRNA upon induction of HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2057–2061.
- Willi B, Boretti FS, Baumgartner C, Tasker S, Wenger B, Cattori V, Meli ML, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. "Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland." *J Clin Microbiol.* 2006 Mar;44(3):961-9.
- Wu R, Liu X, Guo B, Chen F, Wang X. "Development of double loop-mediated isothermal amplification to detect *Listeria monocytogenes* in food." *Curr Microbiol.* 2014 Dec;69(6):839-45.
- Xie J, Liu G, Tian Z, Luo J. "Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Theileria equi*." *Acta Trop.* 2013 Sep;127(3):245-50.
- Yamada M, Hur SJ, Hashinaka K, et al. (1987): Isolation and characterization of a cDNA coding for human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys* 255:147–155
- Yan L, Zhou J, Zheng Y, Gamson AS, Roembke BT, Nakayama S, Sintim HO. "Isothermal amplified detection of DNA and RNA." *Mol Biosyst.* 2014 May;10(5):970-1003.
- Yang Q, Wang F, Jones KL, Meng J, Prinyawiwatkul W, Ge B. "Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for the rapid, reliable, and robust detection of *Salmonella* in produce" *Food Microbiol.* 2015 Apr;46:485-93.
- Yano A, Ishimaru R, Hujikata R. "Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* by Loop-Mediated Isothermal Amplification." *J Microbiol Methods.* 2007 Feb;68(2):414-20.
- Zeng Y, Zhang X, Nie K, Ding X, Ring BZ, Xu L, Dai L, Li X, Ren W, Shi L, Ma X. "Rapid quantitative detection of Human immunodeficiency virus type 1 by a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay." *Gene.* 2014 May 15;541(2):123-8.

Zhao X, Li Y, Wang L, You L, Xu Z, Li L, He X, Liu Y, Wang J, Yang L. "Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection Escherichia coli O157 strains from food samples." *Mol Biol Rep*. 2010 Jun;37(5):2183-8

Zhao X, Wang J, Forghani F, Park JH, Park MS, Seo KH, Oh DH. "Rapid detection of viable Escherichia coli O157 by coupling propidium monoazide with loop-mediated isothermal amplification." *J Microbiol Biotechnol*. 2013 Dec;23(12):1708-16.