



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE

**CORSO DI LAUREA TRIENNALE INTERFACOLTÀ IN BIOTECNOLOGIE
(CLASSE L-2)**

**CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEL DNA DI INSETTI VETTORI
DI MALATTIE INFETTIVE DEGLI ANIMALI**

Relatore:
Prof. Marco Pittau

Elaborato finale di:
Federico Lai

ANNO ACCADEMICO 2015/2016

INDICE.

1. Introduzione e scopo del lavoro svolto.	1
2. Procedimento, metodi e attrezzature utilizzate.	2
2.1. Selezione dei Culicoides dal pool di insetti.	2
2.2. Lisi dei tessuti.	3
2.3. Estrazione degli acidi nucleici.	3
2.4. Retrotrascrizione dell'RNA a cDNA.	4
2.5. Misurazione concentrazione campioni.	5
2.6. PCR PanCulicoides.	6
2.7. Corsa elettroforetica degli amplificati.	6
2.8. Nested PCR con primers per BTV.	8
3. Conclusioni.	9
4. Bibliografia.	9
5. Ringraziamenti.	10

1. INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO SVOLTO.

Il lavoro svolto presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria, settore “Malattie infettive”, dell’Università degli studi di Sassari, ha avuto lo scopo di mettere a punto un processo di screening che riguarda caratterizzazione e monitoraggio del DNA di Culicoides, attraverso tecniche sperimentali di estrazione, amplificazione e visualizzazione del prodotto amplificato.

I Culicoides spp. sono dei piccoli insetti dell’ordine dei ditteri, le cui dimensioni raramente superano i 3 mm di lunghezza, caratterizzati da delle ali maculate a chiazze. Le femmine di questa specie sono ematofaghe, ossia si nutrono di sangue di animali domestici da allevamento come ovini, equini e bovini.

Questi insetti giocano un importante ruolo come vettori di agenti patogeni infettivi quali il virus della lingua blu (BTV, blue tongue virus), peste equina (African horse sickness virus), malattia emorragica e il virus di Schmallenberg (SBV).



Illustrazione 1: Culicoides spp. e particolae di avvenuta ematofagia.

Per il campionamento ci siamo serviti di diverse trappole presenti su tutto il territorio sardo; nel biennio 2015-2016 ne sono state posizionate circa 150 distribuite fra le quattro provincie. Il campione oggetto di questo lavoro è composto da 48 raccolte di insetti prelevati da altrettante trappole scelte in maniera del tutto casuale.

Delle diverse patologie, due sono quelle su cui si riversa maggior interesse per quanto riguarda la situazione nel territorio sardo; il virus di Shmallenberg (SBV) e il virus della lingua blu (BTV), il quale è arrivato nella nostra terra con diversi sierotipi (1,2,4,8,16).

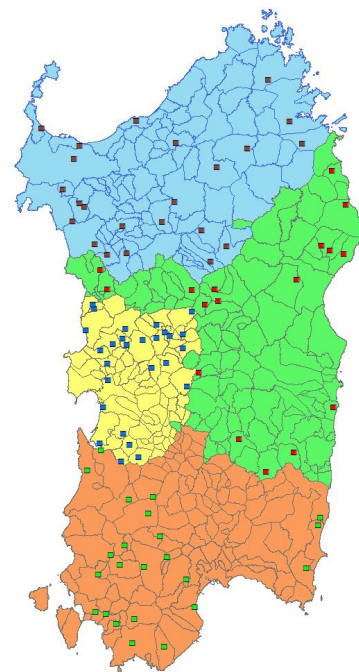


Illustrazione 2: Posizione delle trappole nel territorio.

Provincia

N° trappole

Località

Provincia	N° trappole	Località
CA	8	Carbonia, Domus de Maria, Iglesias, Nurri, Santadi, Siliqua, Villamassargia.
SS	15	Bono, Budoni, Burgos, Castelsardo, Olmedo, Oschiri, Ozieri, Perfugas, Putifigari, Romana, Sassari.
OR	12	Ardauli, Bosa, Cuglieri, Ghilarza, Narbolia, Norbello, Paulilatino, Samugheo, Tresnuraghes,
NU	13	Bolotana, Fonni, Irgoli, Orosei, Ortueri, Ottana, Perdasdefogu, Sarule.

Tabella 1: Provenienza territoriale dei campioni utilizzati.

2. PROCEDIMENTO, METODI E ATTREZZATURE UTILIZZATE.

2.1. Selezione dei Culicoides dal pool di insetti.

Tutto ha inizio con la preparazione dei campioni di insetti provenienti dalle trappole distribuite nel territorio. Al laboratorio gli insetti raccolti arrivano in tubi Falcon da 50 ml immersi in etanolo 75% (per garantire una conservazione ottimale a basse temperature), accuratamente etichettati con codice aziendale di provenienza o dati dell'operatore che ha eseguito la raccolta con data e luogo del prelievo.

Il processo di selezione dei Culicoides a partire dal pool di insetti avviene manualmente servendosi di una pipetta da 1000 µl con puntale sbeccato per favorire l'ingresso degli insetti e con un accurata analisi di riconoscimento visivo. Maggiore attenzione è stata rivolta agli insetti che presentavano una colorazione rossastra, segno di avvenuta emofagia.

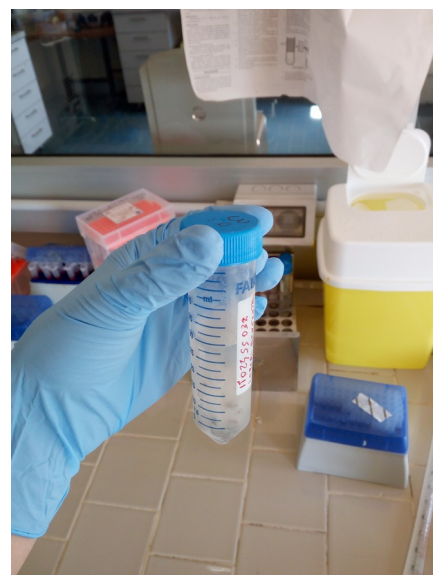


Illustrazione 3: Falcon con insetti immersi in etanolo 75%.

Gli insetti estratti dal pool vengono trasferiti in tubetti da 1,5 ml dai quali viene tolto l'etanolo per essere sostituito dal TRIzol, un reagente particolare che contiene fenolo e cloroformio necessari per la corretta estrazione degli acidi nucleici e per la loro preservazione durante la lisi dei tessuti.

2.2. Lisi dei tessuti.

Alla sospensione di insetti nel TRIzol, all'interno dei tubini eppendorf, vengono aggiunte 2 sfere di acciaio inossidabile da 1-2 mm di diametro. I campioni vengono posizionati sul macchinario "TissueLyser" che svolge un'azione meccanica agitando i campioni ad una frequenza di 30 Hz (ossia 30 oscillazioni al secondo). Le sfere di metallo agiscono in modo tale da disintegrare i tessuti dell'insetto, mentre il TRIzol conserva l'integrità degli acidi nucleici.

2.3. Estrazione degli acidi nucleici.

Vengono prelevati 115µl di estratto di lisi per la procedura di purificazione degli acidi nucleici attraverso la tecnica MagMAX total Nucleic Acid Isolation Kit.

La preparazione del processo prevede l'utilizzo di una particolare piastra "microtitre" che poi andrà inserita nel macchinario. La piastra presenta 96 pozzetti disposti lungo file orizzontali e colonne verticali corrispondenti a lettere e numeri; il macchinario svolge un processo automatico nel quale attraverso un pettine metallico provvisto di 12 denti che si carica elettromagneticamente, fa passare il campione in ogni fila della piastra ed interagisce con ciò che essa contiene.

Nella prima fila (A) si dispongono i 115 µl di estratto accompagnati da 10µl di una particolare resina carica positivamente che interagisce sia con i pettini magnetici che con le cariche negative degli acidi nucleici e li trattiene nei successivi passaggi di lavaggio e purificazione.

Nelle successive quattro file (B,C,D ed E) si dispongono 150µl di soluzione di lavaggio di due tipi differenti, con lo scopo di eliminare ogni altra impurità mentre la resina tiene salda gli acidi nucleici.

Nella sesta fila (F), poniamo 50 µl di acqua mq nella quale andrà a disporsi il campione di acidi nucleici purificato al termine del processo automatico svolto dal macchinario, che dura circa 20 minuti.



Illustrazione 4: Piastra "microtitre" MagMax utilizzata per l'estrazione degli acidi nucleici.

Vengono aggiunti successivamente 65µl di isopropanolo per la precipitazione.

50 µl di campione purificato vengono prelevati e posti in tubini eppendorf da 500µl accuratamente numerati ed etichettati.

Per ottimizzare il lavoro i 50 µl di acidi nucleici purificati vengono aliquotati in due quote da 25 µl ciascuna. Una quota (così com'è) verrà utilizzata per la PCR con primers per *Culicoides* spp., mentre l'altra quota (dopo aver proceduto con la retro-trascrizione) verrà utilizzata per cercare cDNA di Blue Tongue Virus.

2.4. Retro-trascrizione dell'RNA a cDNA.

Prima di questo passaggio è necessario trattare i campioni con DNAsi per degradare il DNA in modo da ottenere solamente un campione di RNA puro.

Per un target di amplificazione ottimale, è opportuno procedere con la retro-trascrizione dell'RNA in cDNA (DNA complementare). Come ben sappiamo, il cDNA comprende i geni che sono oggetto di trascrizione (retro-trascrizione dell'RNA messaggero) e quindi quelli che effettivamente codificano per determinate proteine, insieme al prodotto di retro-trascrizione degli altri RNA (t ed r), tra i quali si spera di trovare quelli del BTV.

Servendoci dell' "Affinity Script Multiple Temperature cDNA Syntesis Kit" Invitrogen®, andiamo a preparare i campioni nel seguente modo:

1) (per ogni campione) aggiungere in ordine:

- 5 µl di campione total RNA

- 7,7 µl di Rnase free water (acqua libera da contaminanti quali RNAsi che potrebbero degradare l'RNA)

- 3 µl di random primers

per un volume totale di 15,7 µl.

2) Incubare per 5 minuti a 65°C nel termociclatore, e lasciare poi raffreddare a temperatura ambiente per 10 minuti.

3) (per ogni campione) aggiungere in ordine:

- 2 µl di Affinity RT Script buffer (buffer di reazione incluso nel kit)

- 0,8 μ l di dNTPs (miscela di nucleotidi tri-fosfato 25 mM ciascuno, necessari per la polimerizzazione del cDNA)
- 0,5 μ l di Rnase Block Ribonuclease Inhibitor (inibitori della ribonucleasi)
- 1 μ l di Affinity Script Multiple Temperature RT (l'enzima retrotrascrittasi)

Per ottimizzare i tempi di lavoro è consigliato preparare una mix di tali 3 reagenti e aggiungere un volume di 2,3 μ l ad ogni campione per un volume finale di 20 μ l.

4) Incubare per 10 minuti a 25°C.

5) Mixare in maniera delicata e successivamente incubare per 60 minuti a 42°C (fase di annealing o appaiamento dei primers).

6) Terminiamo la reazione incubando il tutto per 15 minuti a 70°C (fase di polimerizzazione o allungamento).

7) Conservare il prodotto della reazione di sintesi del cDNA in ghiaccio.

2.5. Misurazione concentrazione campioni.

Una volta avvenuto il processo di retro-trascrizione dell'RNA a cDNA è opportuno effettuare delle misurazioni delle concentrazioni del prodotto in modo da poter riscontrare eventuali anomalie di procedimento. È utile conoscere la concentrazione di cDNA di ogni campione anche per poter impostare il passaggio successivo (amplificazione del target tramite PCR), che necessiterà di una diluizione ottimale del campione in analisi.

È stata svolta una serie di misurazioni per tutti i 48 campioni dapprima con uno spettrofotometro tradizionale; utilizzando quindi una cuvetta trasparente nella quale va inserito il campione, la quale concentrazione viene misurata in base all'assorbanza, ossia la quantità di luce (a 260 nm per gli acidi nucleici) che la sostanza in analisi riesce ad assorbire, secondo la legge di Lambert-Beer.

Successivamente, per verificare la correttezza e l'attendibilità dei dati, approfittando del nuovo macchinario a disposizione, sono state ripetute le misurazioni servendoci del Nanodrop un particolare macchinario che permette di misurare la concentrazione del campione semplicemente appoggiando una goccia di 2 μ l sul sensore, riducendo notevolmente i tempi morti di attesa dello spettrofotometro tradizionale e ottimizzando i tempi di lavoro.

Le concentrazioni di cDNA dei 48 campioni si sono rivelate uniformi intorno al valore di 1900-2000 ng/μl.

Attraverso una semplice formula che mette in relazione concentrazione iniziale (Ci), concentrazione finale (Cf), volume iniziale (Vi) e volume finale (Vf) sarà possibile ottenere una diluizione ottimale per procedere con la PCR.

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

2.6. PCR PanCulicoides.

Il nostro metodo di screening come primo obiettivo si pone quello di andare a verificare se effettivamente abbiamo a che fare con genoma di Culicoides spp. prelevato dal pool di insetti delle varie trappole. Per fare ciò ci avvaliamo di una PCR (Polymerase Chain Reaction) che utilizza dei primers universali per Culicoides che vanno a riconoscere una determinata porzione del genoma di tali insetti lunga 520 bp, la quale codifica per la subunità 1 dell'enzima ossidasi del complesso del citocromo mitocondriale (COI).

Si procede preparando i campioni in tubini da 500 μl con la seguente procedura:

(per ciascun campione aggiungere in ordine):

- 38,75 μl di free Dnase H2O
- 5 μl di coral-load buffer (un particolare buffer che presenta una colorazione di tonalità rossa)
- 1 μl di dNTPs
- 1 μl di primer Forward (C1 J 1718)
- 1 μl di primer Reverse (C1 N 2191)
- 0,25 μl di Taq polimerasi
- 3 μl di campione

Per un volume totale di 50 μl.

Ovviamente per ottimizzare i tempi di lavoro si procede preparando una Mix in base al numero dei campioni con tutti i reagenti (eccetto il campione di DNA).

2.7. Corsa elettroforetica degli amplificati.

I campioni vengono fatti correre in un gel di agarosio all' 1,5%.

Per la preparazione del gel viene utilizzato:

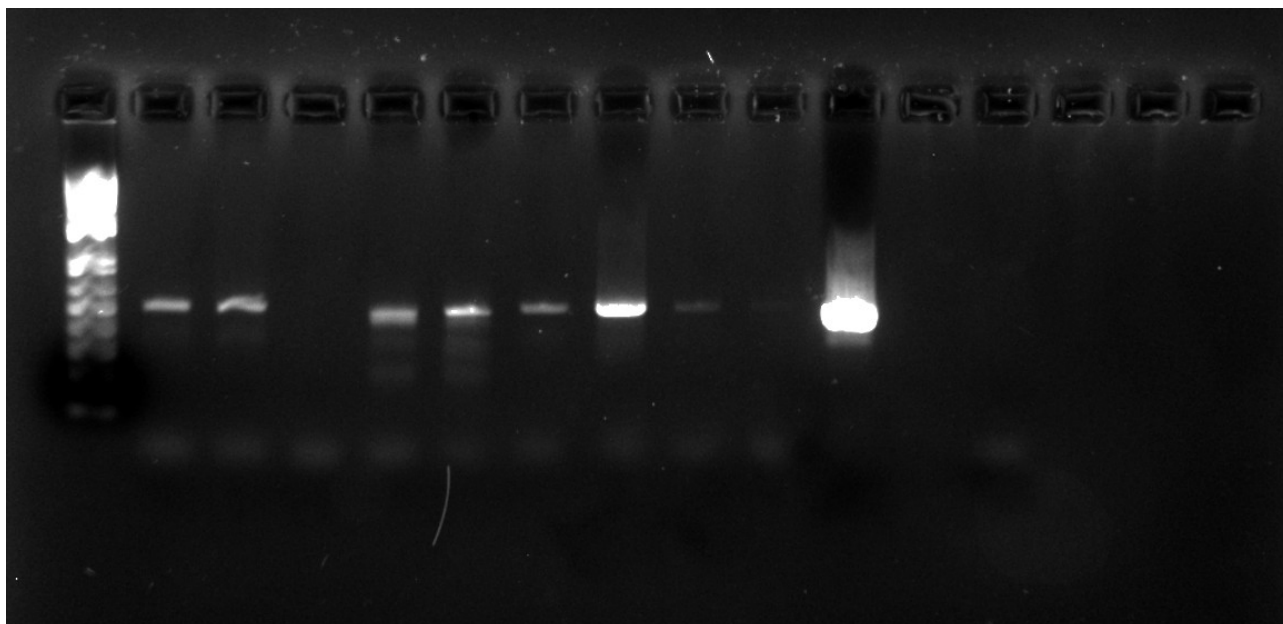
- agarosio in polvere (0,9g)
- buffer TAE con diluizione 50X (60 ml)
- fluorescenza gel-Red (6µl).

Vengono posizionati 10 µl di campione in ogni pozzetto e nel primo il marker di corsa da 100bp. Una volta collegati gli elettrodi si avvia la corsa per 30 min a 80-100 V.

La visualizzazione ultravioletta delle bande all'altezza delle 520 bp ci dimostrerà se effettivamente avremo amplificato DNA di *Culicoides* spp. a partire dal pool di insetti.

Nel passaggio successivo andremo a preparare delle PCR con dei primers universali per Blue Tongue Virus per monitorare l'eventuale presenza di cDNA virale.

Per ragioni che riguardano tempistiche di procedimento e costi dei reagenti, si è deciso di non effettuare le analisi descritte su tutti e 48 i campioni ma si è arrivati alla conclusione di selezionare un gruppo ristretto di campioni da analizzare (10 campioni) che provengono da delle zone della Sardegna ritenute più a rischio per quanto riguarda la presenza di eventuali focolai del virus. Queste zone sono localizzate nella regione meridionale del territorio (provincia di Cagliari, con "Domus de Maria" come comune di riferimento), e in una porzione di territorio determinata da una linea diagonale immaginaria che va dal sud della Corsica alla zona di Orosei-Budoni nella costa est della Sardegna.



*Illustrazione 5: Corsa elettroforetica degli amplificati in gel di agarosio 1,5%. Le bande all'altezza delle 520 bp dimostrano che è stato effettivamente amplificato DNA di *Culicoides* spp.*

2.8. Nested PCR con primers per BTV.

Per questa parte del lavoro si utilizza una tipologia particolare di PCR: la Nested PCR.

Questo processo ha lo scopo di ridurre appaiamenti in regioni di DNA non corrette derivati dall'utilizzo di primers universali.

Si adoperano due set differenti di primers: dapprima due “esterni” che amplificano una determinata regione target del DNA in analisi; successivamente si utilizzano altri due primers “interni” ai precedenti che amplificano una regione più corta all'interno di quella amplificata precedentemente.

Nested polymerase chain reaction (PCR)

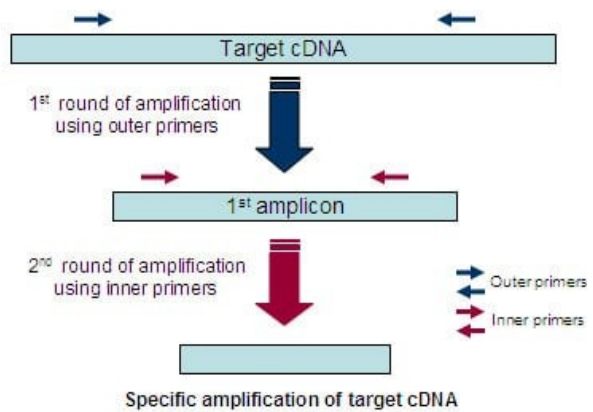


Illustrazione 6: Schema riepilogativo della Nested PCR.

Il set di primers utilizzato ha come target di amplificazione il segmento 5 del genoma del Blue Tongue Virus. Questa regione di DNA (altamente conservata in quasi tutti e 26 suoi sierotipi) codifica per una proteina non strutturale chiamata NS1.

1) Primo ciclo con primers “esterni”:

FW: GTT-CTC-TAG-TTG-GCA-ACC-ACC

RV: AGG-CCA-GAC-TGT-TTC-CCG-AT

Target genomico: circa 260 bp.

2) Secondo ciclo con primers “interni”:

nFW: GCA-GCA-TTT-TGA-GAG-AGC-GA

nRV: CCC-GAT-CAT-ACA-TTG-CTT-CCT

Target genomico: 101 bp.

La preparazione della PCR con primers per BTV avviene in maniera analoga alla precedente.

Viene preparata una “master mix” con le quantità di reagenti necessarie moltiplicate per il numero di campioni in analisi; nel nostro caso 11 (10 campioni più il negativo).

(per ogni campione viene aggiunto in ordine):

- H₂O: 11,8 µl

- Coral-load buffer: 5 µl

- dNTPs: 1 µl

- Primer F: 0,6 µl
- Primer R: 0,6 µl
- Taq polimerasi: 1 µl

5 µl di campione vengono aggiunti successivamente per un totale di 25 µl.

Il secondo ciclo di PCR si svolge in maniera quasi identica a differenza esclusiva del diverso tipo di primers utilizzati, e di conseguenza della variazione di alcuni gradi per quanto riguarda le temperature dei diversi passaggi del processo. Ovviamente come “campione” per il secondo ciclo si utilizzano gli amplificati del primo ciclo.

3. CONCLUSIONI.

I campioni degli amplificati della PCR per Blue Tongue Virus, una volta fatti correre e visualizzati, sono risultati **negativi**.

Nonostante ciò possa sembrare un risultato sfavorevole per quanto riguarda l'esperienza di laboratorio, tuttavia si dimostra rassicurante per quanto riguarda la tutela sanitaria degli allevamenti presi in esame e del territorio circostante. In caso contrario infatti si sarebbe dovuta avviare una procedura di isolamento e lotta al virus che avrebbe creato numerosi disagi dal punto di vista economico e causato danni agli allevatori dovuti alla possibile perdita di numerosi animali.

Il metodo di screening messo a punto durante questa esperienza presenta enorme versatilità; è utilizzabile infatti per qualsiasi vettore di malattie infettive e per l'individuazione di svariati tipi di patogeni.

4. BIBLIOGRAFIA.

- Lehmann et al. Parasites & Vectors 2012. PCR identification of Culicoides biting midges (Diptera, Ceratopogonidae) of the Obsoletus complex including putative vectors of bluetongue and Schmallenberg viruses; Kathrin Lehmann, Doreen Werner, Bernd Hoffmann and Helge Kampen.
- Mellor, J. Boorman, M. Baylis. Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. Ann. Rev. Entomol., 45 (2000), pp. 307–340.
- Molecular detection of Culicoides spp. and Culicoides imicola, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. 2004 May-Jun;35(3):325-37.

5. RINGRAZIAMENTI.

Vorrei ringraziare in primis il professor Marco Pittau che ha accettato l'incarico di dirigere il mio lavoro ed ha svolto il suo insegnamento con estrema professionalità e con la giusta dose di simpatia che ha reso questo percorso di tirocinio e tesi un vero piacere; le dottoresse Tania Carta e Roberta Lecis per avermi guidato con pazienza e dedizione durante i diversi passaggi ed avermi insegnato le diverse tecniche in maniera veramente professionale; il professor Alberto Alberti, Bernardo Chessa e Manlio Fadda per la supervisione e il materiale a supporto fornito; il resto dello staff del laboratorio di Malattie infettive degli animali della facoltà di veterinaria che hanno collaborato e che mi hanno sostenuto con avvisi e consigli preziosi.

Grazie di cuore a tutti.