

IDENTIFICAZIONE A LIVELLO DI SPECIE DI OOCISTI DI *Cryptosporidium* MEDIANTE PCR/RFLP

INDICE

1	SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	2
2	PRINCIPIO DEL METODO	2
3	BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI	3
4	DEFINIZIONI	3
5	APPARECCHIATURA DI PROVA	4
6	REATTIVI E MATERIALI	4
7	PROCEDIMENTO	6
	7.1 <i>Preparazione del campione di prova</i>	6
	7.2 <i>Esecuzione della prova</i>	7
8	ESPRESSIONE DEI RISULTATI	13
9	CARATTERISTICHE DEL METODO	14
10	MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE	14

1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente documento definisce un metodo di prova interno per determinare, mediante PCR/RLFP, la specie di appartenenza di protozoi del genere *Cryptosporidium*. Il metodo può essere applicato a feci di origine umana o animale, già diagnosticate positive per la presenza di oocisti di *Cryptosporidium*.

2 PRINCIPIO DEL METODO

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di acidi nucleici specifici dei quali si conoscono la sequenza nucleotidica iniziale e terminale (coppia di oligonucleotidi). Se una specie possiede una porzione di DNA caratteristica, per composizione e/o dimensione, è possibile scegliere una coppia di oligonucleotidi che permetta la sua amplificazione esclusivamente per quella specie. L'amplificazione PCR è caratterizzata da alta sensibilità e specificità. La nested-PCR è una variante della tecnica di PCR, serve per ottenere una maggiore sensibilità del metodo utilizzando in successione due distinte reazioni di amplificazione. Nella prima reazione di PCR si utilizza una coppia di primers esterni mentre nella seconda si utilizzano primers più interni rispetto al frammento di DNA da amplificare (DNA target).

Alla tecnica di PCR è possibile abbinare la tecnica di 'Restriction Length Fragment Polymorphism' (RLFP), ovvero l'analisi dei frammenti di restrizione. La tecnica permette di distinguere due frammenti di PCR mediante digestione enzimatica con una o più endonucleasi, enzimi in grado di tagliare il DNA a livello di brevi e specifiche sequenze oligonucleotidiche. In questo caso è possibile con una singola coppia di primer amplificare la stessa porzione di DNA da specie diverse e distinguerle successivamente in base alle dimensioni dei frammenti di DNA ottenuti dopo digestione enzimatica.

I protozoi parassiti del genere *Cryptosporidium* infettano tutti i vertebrati, compreso l'uomo, localizzandosi nell'intestino o nello stomaco. Lo stadio infettante e di resistenza, noto come oocisti, se ingerito dall'ospite, causa la patologia nota come criptosporidiosi. I parassiti del genere *Cryptosporidium* non possono essere identificati a livello di specie su base morfologica. Tuttavia, l'analisi genetica ha permesso di dimostrare l'esistenza di numerose specie all'interno del genere, e, allo stato attuale delle conoscenze, quelle considerate patogene per l'uomo includono *Cryptosporidium hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. muris*, *C. suis*, *C. andersoni*, *C. ubiquitum*, *C. cuniculus* e i genotipi 'monkey' e 'skunk'. Va precisato che la maggior parte dei casi di criptosporidiosi umana è da attribuirsi a due specie, ovvero *Cryptosporidium hominis* e *C. parvum*.

I metodi molecolari basati sulla PCR-RFLP hanno permesso di identificare a livello di specie le oocisti presenti in campioni fecali di origine umana ed animale.

Un metodo utilizzato frequentemente per la diagnostica molecolare si basa sull'amplificazione di un frammento del gene codificante per una proteina strutturale della parete della oocisti di *Cryptosporidium* (*Cryptosporidium* Oocyst Wall Prorein, COWP). La sensibilità del metodo di nested PCR è stata definita ed è in grado di evidenziare infezioni con <500 oocisti per grammo di feci (Pedraza-Diaz et al, 2001). I primers utilizzati per le due reazioni di PCR e la successiva caratterizzazione del frammento di amplificazione mediante digestione enzimatica permettono di identificare *Cryptosporidium* a livello di specie (Pedraza-Diaz et al, 2001, Spano et al, 1997).

Le dimensioni dei frammenti del gene COWP ottenuti con la prima e la seconda PCR sono rispettivamente di 769 e di 553 paia di basi, le specie di *Cryptosporidium* che mostrano amplificazione sono: *C. parvum*, *C. hominis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. andersoni*, *C. suis*, *C. ubiquitum* e il genotipo Horse.

In tabella A sono riportate le dimensioni dei frammenti, ottenuti mediante digestione enzimatica dei prodotti di amplificazione di 553 paia di basi del gene COWP, utilizzando gli enzimi di restrizione indicati.

Tabella A. Dimensione dei frammenti di digestione del gene COWP attesi (in coppie di basi) per ogni specie con differenti enzimi di restrizione.

	Frammenti di digestione dei prodotti di PCR del gene COWP	
Specie	Enzima di restrizione Rsa I	Enzima di restrizione Alu I
<i>C. parvum</i>	413, 106, 34	
<i>C. hominis</i>	284, 129, 106, 34	
<i>C. canis</i>	195, 106, 86, 71, 43, 34, 18	
<i>C. felis</i>	406, 86, 61	
<i>C. meleagridis</i>	372, 147, 34	
<i>C. andersoni</i>	327, 140, 86	
<i>C. suis</i>	266, 129, 106, 34, 18	424, 129
<i>C. ubiquitum</i>	266, 129, 106, 34, 18	324, 129, 100
Genotipo Horse	519, 34	

Utilizzando la tecnica PCR/RFLP, è possibile distinguere, sulla base del numero e della dimensione dei frammenti di digestione, ottenuti con l'enzima *Rsa I*, le specie *Cryptosporidium parvum*, *C. hominis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. andersoni*, e il genotipo Horse. Per distinguere la specie *C. suis* da *C. ubiquitum*, che presentano frammenti *Rsa I* in egual numero e di medesime dimensioni, è necessario ricorrere ad una digestione con l'enzima *Alu I*.

3 BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI

UNI EN ISO 22174: 2005. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca di microrganismi patogeni negli alimenti – requisiti generali e definizioni.

UNI EN ISO 20837:2006. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali Reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca dei microrganismi patogeni degli alimenti Requisiti per la preparazione del campione per la ricerca qualitativa.

UNI EN ISO 20838:2006. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali Reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca dei microrganismi patogeni degli alimenti Requisiti per l'amplificazione e la ricerca per metodi qualitativi.

Qiagen: QIAamp Fast DNA Stool Handbook.

Pedraza-Diaz, S., Amar, C., Nichols, G.L., McLauchlin, J. (2001) Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. Emerg Infect Dis 7, pp. 49-56.

Spano, S., Putignani, L., McLauchlin, J., Casemore, D.P., Crisanti, A. (1997) PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. FEMS Microbiol Lett 150, pp. 209-217.

Lynn, S.P., Cohen, L.K., Kaplan, S., Gardner, J.F. (1980) *Rsa I*, a new sequence-specific endonuclease activity from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. J. Bacteriol 142, pp. 380-383.

Yang, R.C., Van de Vorde, A., Fliers, W. (1976) Specific cleavage and physical mapping of simian virus 40 DNA by the restriction endonuclease of *Arthrobacter luteus*. Eur J Biochem 61, pp. 119-138.

Sato, S., Hutchison, C.A. III, Harris, J.I. (1977) A thermostable sequence-specific endonuclease from *Thermus aquaticus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, pp. 542-546

4 DEFINIZIONI

COWP (*Cryptosporidium* Oocyst Wall Protein), sequenza codificante una proteina strutturale,

componente della parete della oocisti.

Oligonucleotide, breve sequenza (15/30 basi nucleotidiche) utilizzata per amplificare un frammento specifico di DNA.

Set A, miscela di due oligonucleotidi che amplificano il frammento esterno del gene COWP delle singole specie o genotipo.

Set B, miscela di due oligonucleotidi che amplificano il frammento interno del gene COWP delle singole specie o genotipo.

Controllo positivo di estrazione, aliquote di campioni fecali contenenti oocisti di *C. parvum*, trattate nella stessa sessione di lavoro dei campioni in esame per verificare la corretta conduzione del protocollo di estrazione del DNA.

Controllo positivo di amplificazione, DNA genomico estratto da campioni fecali con oocisti di *C. parvum*. È utilizzato nelle sessioni di amplificazione per verificare l'efficienza del sistema PCR.

Controllo negativo di amplificazione, acqua grado reagente. È utilizzato negli esperimenti di amplificazione per verificare l'assenza di contaminazioni nella reazione PCR.

Enzimi di restrizione. Gli enzimi di restrizione sono enzimi di origine batterica che tagliano il DNA in punti specifici, diversi per ciascun enzima, permettendo così di frammentare il DNA in maniera precisa e riproducibile. Gli enzimi di restrizione tagliano sequenze specifiche del DNA, di lunghezza variabile da 4 a 8 basi e diverse per ciascun enzima. La concentrazione degli enzimi si esprime in unità enzimatiche (U) e, nel caso specifico delle endonucleasi di restrizione, 1 unità corrisponde alla quantità di enzima necessario a digerire completamente un microgrammo di DNA in 1 ora alla temperatura ottimale.

Inoltre, nel presente documento sono utilizzate le definizioni e la terminologia della norma UNI EN ISO 22174.

5 APPARECCHIATURA DI PROVA

- 5.1 Centrifuga da banco per provette da 1,5 mL, 10.000 x g
- 5.2 Congelatore, temperatura $\leq -15^{\circ}\text{C}$
- 5.3 Termoblocco vibrante a temperatura variabile da 25 a 100°C
- 5.4 Termociclatore per PCR
- 5.5 Frigorifero, 1 - 8°C
- 5.6 Qiaxcel, sistema di elettroforesi capillare
- 5.7 Sistema per elettroforesi orizzontale completo di accessori e alimentatore di corrente
- 5.8 Sistema per acquisizione di immagini
- 5.9 Micropipette (1-10 μL , 2-20 μL , 20-100 μL , 50-200 μL e 200-1000 μL)
- 5.10 Sistema di produzione di acqua di grado reagente
- 5.11 Agitatore Vortex
- 5.12 Bilancia analitica
- 5.13 Transilluminatore
- 5.14 Agitatore orbitante

6 REATTIVI E MATERIALI

- 6.1 **InhibitEX Buffer**. Reagente reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN. Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.2 **Proteinasi K**. Reagente reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN.

Conservare secondo le specifiche del produttore.

- 6.3 **Tampone di lisi.** Soluzione reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, e identificata dal produttore come soluzione 'AL'. Conservare a temperatura ambiente.
- 6.4 **Etanolo assoluto.** Reagente reperibile in commercio.
- 6.5 **Colonna di recupero.** Materiale reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN, e identificata dal produttore come QIAamp Mini Spin Columns.
- 6.6 **Tubo di raccolta.** Materiale reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN, e identificata dal produttore come Collection tubes (2 ml).
- 6.7 **Tamponi di lavaggio.** Soluzioni reperibili in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN. Preparare secondo le specifiche del produttore, identificare tale soluzione con la sigla 'AW1' e 'AW2'. Conservare a temperatura ambiente.
- 6.8 **Tampone di eluizione.** Soluzione reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN, e identificata dal produttore come Buffer ATE. Conservare a temperatura ambiente.
- 6.9 **PCR master mix.** Soluzione reperibile in commercio adatta alla conduzione di esperimenti di amplificazione PCR. Conservare secondo le specifiche del produttore. Nel caso si utilizzi una confezione di grandi volumi il prodotto viene dispensato in aliquote da 1-2 mL, e vengono mantenute le specifiche di conservazione della confezione di origine.
- 6.10 **Set A.** Miscela di oligonucleotidi (6.12) utilizzata per la PCR. La miscela è ottenuta combinando un pari volume degli oligonucleotidi BCOWPF ed BCOWPR (6.12) diluiti alla concentrazione di 20 pmol/μL con acqua grado reagente o MilliQ (6.23). La concentrazione finale corrisponde a 10 pmoli/μL di ciascun oligonucleotide. Aliquote di 100μL vengono preparate e conservate in congelatore (5.2) fino a un massimo di 10 anni.
- 6.11 **Set B.** Miscela di oligonucleotidi (6.12) utilizzata per la PCR. La miscela è ottenuta combinando un pari volume degli oligonucleotidi Cry9 ed Cry15 (6.12) diluiti alla concentrazione di 20 pmol/μL con acqua grado reagente o MilliQ (6.23). La concentrazione finale corrisponde a 10 pmoli/μL di ciascun oligonucleotide. Aliquote di 100μL vengono preparate e conservate in congelatore (5.2) fino a un massimo di 10 anni.
- 6.12 **Oligonucleotidi.** Preparazione commerciale (tabella B). Il prodotto liofilizzato viene ricostituito secondo le indicazioni del produttore ad una concentrazione di 100 pmoli/μL con acqua di grado analitico (5.10). L'avvenuta ricostituzione viene riportata con data e firma nel rapporto tecnico allegato agli oligonucleotidi dalla ditta produttrice. Conservare il prodotto liofilizzato in congelatore (5.2) fino a un massimo di 20 anni. Conservare il prodotto ricostituito in congelatore (5.2) fino ad un massimo di 10 anni.

Tabella B. Sequenza degli oligonucleotidi che compongono il set A (6.10) e il set B (6.11), relativi codici e sequenze nucleotidiche amplificate.

Sequenza oligonucleotidi	Codice	Sequenza amplificata
5'-CCGCTTCTCAACAACCATCTTGTCT 3' 5'-CGCACCTGTTCCCACTCAATGTAAACCC-3'	BCOWPF BCOWPR	COWP (primers esterni)
5'-GGAAGTAAATACAGGCATTATCTTG-3' 5'-GTAGATAATGGAAGAGATTGTG-3'	Cry9 Cry15	COWP (primers interni)

- 6.13 **Loading buffer,** prodotto commerciale che permette di eseguire l'elettroforesi di molecole di DNA. Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.14 **QIAxcel DNA High Resolution kit** - prodotto commerciale della Qiagen per l'uso con il QIAxcel (5.7). Include cartucce di separazione e soluzioni per la preparazione e per la corsa dei campioni da analizzare. Conservare i singoli componenti secondo le specifiche del produttore.

- 6.15 **Alignment markers** - da utilizzare con Qiaxcel (5.7), prodotti commerciali della Qiagen. Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.16 **DNA size markers** - da utilizzare con Qiaxcel (5.7), prodotti commerciali della Qiagen. Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.17 **Agarosio**, prodotto commerciale definito adatto alla conduzione di elettroforesi orizzontale per molecole di DNA. Conservare a temperatura ambiente fino a un massimo di 24 mesi.
- 6.18 **TAE soluzione 50x**, prodotto commerciale (2M Tris-acetato, 50mM EDTA, pH 8.2 - 8.4 a 25°C). Conservare a temperatura ambiente fino a un massimo di 24 mesi.
- 6.19 **TAE soluzione 1x**, preparazione di 1000 mL: prelevare 20 mL dalla soluzione 50x e portare il volume a 1.000 mL con acqua distillata. Preparare al momento dell'uso.
- 6.20 **Intercalante del DNA**, prodotto commerciale in grado di inserirsi nei filamenti di DNA. Utilizzato per visualizzare i prodotti di amplificazione su gel di agarosio.
- 6.21 **L50**, prodotto commerciale contenente molecole marcatrici di peso molecolare per DNA. Viene ritenuto idoneo ogni prodotto commerciale che contenga molecole multiple di 50 bp nel range 50-500 bp. Conservare in frigorifero (5.5) secondo le specifiche del produttore.
- 6.22 **L100**, prodotto commerciale contenente molecole marcatrici di peso molecolare per DNA. Viene ritenuto idoneo ogni prodotto commerciale che contenga molecole multiple di 100 bp nel range 100-1500 bp. Conservare in frigorifero (5.5) secondo le specifiche del produttore.
- 6.23 **Acqua grado reagente o Milli-Q**
- 6.24 **Campione fecale di riferimento**, feci contenenti oocisti di *C. parvum*. Conservare in frigorifero (5.5) fino ad un massimo di **10 anni**.
- 6.25 **DNA di riferimento**: DNA genomico estratto da campione fecale contenenti oocisti di *C. parvum*. Conservare in congelatore (5.2) fino ad un massimo di **10 anni**.
- 6.26 **Enzimi di restrizione Rsa I e Alu I**: enzimi reperibili in commercio adatti alla conduzione di esperimenti di digestione enzimatica del DNA (per esempio della New England Biolabs, Rsa I; Alu I). Conservare secondo le specifiche del produttore. La sequenza oligonucleotidica specifica riconosciuta da ciascun enzima è riportata in Tabella C.

Tabella C. Sequenza di DNA specifica riconosciuta da ciascun enzima di restrizione

Enzima di restrizione	Sequenza riconosciuta
Rsa I	5'...GT [↓] AC...3' 3'...CATG...5'
Alu I	5'...AGCT...3' 3'...TCGA...5'

- 6.27 **Tampone di restrizione**: Soluzione a pH e concentrazione salina nota reperibile in commercio adatta alla conduzione di esperimenti di digestione enzimatica del DNA e venduta unitamente ai rispettivi enzimi di restrizione. Conservare secondo le specifiche del produttore.

7 PROCEDIMENTO

7.1 Preparazione del campione di prova

Le feci pervenute e contenenti le oocisti di *Cryptosporidium* vengono controllate per la verifica del loro stato di conservazione. Le provette devono essere integre e non vi deve essere traccia di perdita del contenuto.

Qualora l'operatore non reputi che il campione di prova sia idoneo all'esecuzione del test, il test stesso non viene eseguito.

7.2 Esecuzione della prova

7.2.1 Estrazione del DNA dal campione fecale da sottoporre al test

Se non diversamente specificato, la procedura viene eseguita a temperatura ambiente.

Ogni sessione di prova prevede che un campione di riferimento (6.24) venga sottoposto alla procedura di estrazione ed identificato come 'controllo positivo di estrazione'.

Nota bene: la provetta contenente il materiale fecale di riferimento, conservato in etanolo al 50%, prevede un lavaggio con acqua grado reagente (6.21) a 5000 rpm per 5 minuti per eliminare l'etanolo. Al pellet vengono aggiunti 200 µL di acqua grado reagente (6.21) e si procede come indicato nel punto "b".

- a) Trasferire 200 µL di campione fecale in provette da 2 mL.
- b) Aggiungere 1 mL di InhibitEX buffer (6.1) e vortexare 1 minuto per omogeneizzare il campione.
- c) Incubare per 10 minuti a 95°C in termoblocco (5.3). Durante l'incubazione lasciare in agitazione a circa 1.400 oscillazioni al minuto.
- d) Centrifugare (5.1) per 1 minuto a 12.000 giri.
- e) Porre 25 µL di proteinasi K (6.2) in una provetta da 1,5 mL.
- f) Trasferire 600 µL del sopranatante (punto d) nella provetta contenente proteinasi K (punto e).
- g) Aggiungere 600 µL di tampone di lisi, buffer AL (6.3) e vortexare per 15 secondi.
- h) Incubare a 70°C per 10 minuti.
- i) Aggiungere 600 µL di etanolo assoluto e vortexare brevemente.
- j) Per ogni campione, posizionare una colonna di recupero (6.5) in una provetta di raccolta (6.6).
- k) Trasferire 600 µL di lisato (punto n) nella colonna di recupero (6.5) e centrifugare (5.1) per 1 minuto a 12.000 giri.
- l) Eliminare la provetta di raccolta (6.6) e posizionare la colonna di recupero (6.5) in una nuova provetta di raccolta (6.6).
- m) Ripetere i punti k-l altre due volte.
- n) Aggiungere 500 µL di tampone di lavaggio AW1 (6.7) alla colonna di recupero e centrifugare (5.1) per 1 minuto a 12.000 giri.
- o) Eliminare la provetta di raccolta (6.6) e posizionare la colonna di recupero (6.5) in una provetta di raccolta pulita (6.6).
- p) Aggiungere 500 µL di tampone di lavaggio AW2 (6.7) alla colonna di recupero e centrifugare (5.1) per 3 minuti a 12.000 giri.
- q) Trasferire la colonna di recupero (6.5) all'interno di una nuova provetta da 1.5 mL.
- r) Aggiungere 100 µL di tampone di eluizione ATE (6.8) alla colonna di recupero (6.5) ed incubare per 1-2 minuti.
- s) Centrifugare (5.1) per 1 minuto a 12.000 giri, eliminare la colonna di recupero (6.5), conservando la provetta contenenti il DNA estratto.
- t) Il DNA così preparato viene definito 'DNA/campione fecale' e conservato in congelatore (5.2). In tali condizioni può essere conservato fino a **10 anni**.

7.2.2 Amplificazione PCR

Dove non espressamente indicato mantenere le provette in ghiaccio, utilizzare puntali con barriera e indossare guanti monouso.

Ad ogni sessione è previsto l'utilizzo di un controllo positivo, ovvero DNA di riferimento (6.25), e di un controllo negativo, ovvero acqua (6.23), per verificare la corretta conduzione della reazione di amplificazione.

La seguente procedura prevede l'utilizzo di una PCR master mix a concentrazione 2x, in caso di concentrazione diversa modificare il protocollo secondo le specifiche del produttore.

- a) Scongelare: DNA/campioni fecali (7.2.1 punto t), PCR MasterMix (6.9), Set A (6.10) controllo

positivo di amplificazione (DNA di riferimento 6.25).

- b) Marcare con un numero progressivo una quantità adeguata di provette da PCR da 0,2 mL.
- c) Preparare un volume adeguato di miscela di amplificazione cumulativa. Calcolare i volumi sulla base della miscela di amplificazione del singolo campione (Tabella D) e del numero totale dei campioni da analizzare aumentato di 2 unità (1 per il controllo positivo e 1 per il controllo negativo di amplificazione).

Tabella D. Miscela di amplificazione del singolo campione: componenti e relativi volumi

2x PCR MasterMix (6.9)	25 µL
H ₂ O (6.23)	19 µL
Set A (6.10)	1 µL
Totale	45 µL

- d) Mescolare la miscela di amplificazione mediante vortex e se necessario centrifugare (5.1) al massimo dei giri per pochi secondi.
- e) Trasferire 45 µL della miscela di amplificazione cumulativa in ciascuna delle provette da PCR (punto 'b').
- f) Aggiungere in ogni provetta 5 µL di preparazione di DNA/campione fecale (7.2.1 punto t) da analizzare.
- g) Chiudere le provette, mescolare mediante vortex e centrifugare (5.1) al massimo dei giri per pochi secondi.
- h) Avviare il ciclo di amplificazione (tabella E) del termociclatore (5.4), aspettare che la temperatura raggiunga 94°C e, dopo avere messo in pausa lo strumento, inserire le provette nel blocco termico. Abbassare il coperchio e uscire dalla pausa.

Tabella E. Ciclo di amplificazione

Denaturazione iniziale #	3 min/94°C
Amplificazione	30 s/94°C 30 s/58°C 60 s/72°C
Numero di cicli	40
Estensione finale	7 min/72°C

La durata della denaturazione iniziale può variare, verificare le specifiche del produttore della PCR Master Mix

- i) Finita la fase di amplificazione centrifugare (5.1) le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- j) Lasciare le provette in ghiaccio o in frigorifero (5.5) fino al momento di procedere con la Nested PCR.

7.2.3 Nested PCR

- a) Marcare con un numero progressivo una quantità adeguata di provette da PCR da 0,2 mL.
- b) Preparare un volume adeguato di miscela di amplificazione cumulativa. Calcolare i volumi sulla base della miscela di amplificazione del singolo campione (Tabella F) e del numero totale dei campioni da analizzare aumentato di 1 unità (controllo negativo di amplificazione).

Tabella F. Miscela di amplificazione del singolo campione: componenti e relativi volumi

2x PCR MasterMix (6.9)	25 µL
H ₂ O (6.23)	19 µL
Set B (6.11)	1 µL
Totale	45 µL

- c) Mescolare la miscela di amplificazione mediante vortex e se necessario centrifugare (5.1) al massimo dei giri per pochi secondi.
- d) Trasferire 45 µL della miscela di amplificazione cumulativa in ciascuna delle provette da PCR (punto 'b').
- e) Aggiungere in ogni provetta 5 µL di prodotto ottenuto dalla prima reazione di PCR (7.2.2 punto l).
- f) Chiudere le provette, mescolare mediante vortex e centrifugare (5.1) al massimo dei giri per pochi secondi.
- g) Avviare il ciclo di amplificazione (tabella G) del termociclatore (5.4), aspettare che la temperatura raggiunga 94°C e, dopo avere messo in pausa lo strumento, inserire le provette nel blocco termico. Abbassare il coperchio e uscire dalla pausa.

Tabella G. Ciclo di amplificazione

Denaturazione iniziale #	3 min/94°C
Amplificazione	30 s/94°C 30 s/48°C 60 s/72°C
Numero di cicli	40
Estensione finale	7 min/72°C

La durata della denaturazione iniziale può variare, verificare le specifiche del produttore della PCR Master Mix

- h) Finita la fase di amplificazione (nested PCR) centrifugare (5.1) le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- i) Lasciare le provette in ghiaccio o in frigorifero (5.5) fino al momento dell'elettroforesi.

7.2.4 Visualizzazione dei risultati

L'analisi verrà condotta primariamente mediante elettroforesi capillare. Nel caso in cui il numero dei campioni da analizzare sia inferiore a 8, oppure lo strumento per l'elettroforesi capillare sia fuori servizio, si potrà procedere mediante elettroforesi su gel di agarosio.

- a) Accendere lo strumento Qiaxcel (5.6) ed il relativo software di gestione Qiaxcel ScreenGel sul PC collegato.
- b) Accedere al pannello "Process Profile"; indicare "DNA HighRes" alla voce "Cartridge Type"; indicare il profilo e l'Experiment Directory desiderati.
- c) Spostare il carrello porta provette in "posizione di accesso" selezionando la voce "Load Position" dal pannello "Status Information".
- d) Inserire nella posizione MARKER1 le 12 provette contenenti almeno 10 µL (volume minimo) di "Alignment Marker" (6.15) prescelto e riportare il carrello nella posizione iniziale selezionando la voce "Park Position" dal pannello "Status Information".
- e) Posizionare i campioni da analizzare (volume minimo 10 µL) per file complete da 12 a partire dalla riga "A". Qualora i campioni da analizzare non fossero in numero sufficiente a completare la fila da 12, aggiungere un opportuno numero di provette contenenti il QX DNA dilution buffer (volume minimo 10 µL) in dotazione con il QIAxcel DNA High Resolution kit (6.14).
- f) Per ogni round di analisi (che può comprendere fino ad un massimo di 8 corse da 12 campioni) includere una provetta contenente il DNA size marker (6.16).
- g) In "Run Parameters" impostare l'opzione 0M500 alla voce "Method"; selezionare le corse occupate da campioni sulla piastra virtuale nel pannello laterale "Sample Row Selection".
- h) In "Sample Selection" impostare i parametri di corsa come segue:
 - "Plate ID": inserire il codice del primo e dell'ultimo dei campioni presenti nella piastra.
 - "Alignment Marker": selezionare l'alignment marker (6.15) prescelto.

- i) In "Sample Information" lasciare in bianco o in alternativa inserire i nomi dei singoli campioni nelle caselle corrispondenti.
- j) In "Run Check" verificare che tutte le righe selezionate siano occupate da provette contenenti prodotti di PCR da analizzare o QX DNA dilution buffer e che il Marker di allineamento sia stato caricato, quindi spuntare le caselle apposite; infine selezionare "Run".
- k) Visualizzare le corse selezionando la modalità "Absolute migration time" dal menù "Image options" e processare i dati con il comando "Start analysis".
- l) Scorrere gli elettroferogrammi dei singoli campioni per verificare la presenza di picchi al di sopra della banda più alta del marker di allineamento (6.15).
- m) Stampare il risultato della corsa elettroforetica
- n) Chiudere il programma e spegnere lo strumento.

Se lo strumento Qiaxcel (5.6) è fuori servizio per un periodo prolungato procedere con elettroforesi su gel di agarosio seguendo il protocollo di seguito riportato:

- a) Assemblare l'apparato per elettroforesi (5.7) seguendo le raccomandazioni della ditta produttrice. Nella preparazione del gel utilizzare un pettine adeguato al numero di campioni in esame.
- b) Pesare (5.12) 2 g di agarosio (6.17) e versarlo in 100 mL di TAE 1x (6.19) preparato in un contenitore di vetro.
- c) Risospendere delicatamente la polvere mediante rotazione.
- d) Portare la sospensione di agarosio ad ebollizione per circa 30 sec. Se all'ispezione visiva la soluzione non appare omogenea continuare la fase di ebollizione per altri 30 sec.
- e) Reintegrare con acqua il volume perso durante l'ebollizione.
- f) Lasciare raffreddare la soluzione di agarosio.
- g) Prima che la soluzione cominci a solidificare aggiungere l'intercalante del DNA (6.20) secondo le specifiche del produttore.
- h) Agitare delicatamente per disperdere uniformemente l'intercalante del DNA e versare l'agarosio nel piatto per il gel preparato in precedenza (punto a).
- i) Aspettare che il gel si solidifichi; non meno di 30 minuti.
- j) Collocare il piatto contenente il gel nel sistema per elettroforesi.
- k) Coprire il gel con tampone TAE 1x (6.19).
- l) Caricare in ogni pozzetto 10 µL del prodotto di amplificazione (7.2.3 punto i) seguendo il numero progressivo di marcatura delle provette (7.2.3 punto a).
- m) Caricare il primo e l'ultimo pozzetto con 10 µL della soluzione L100 (6.22).
- n) Connettere l'apparato per elettroforesi con l'alimentatore (5.7) e impostare un valore di tensione di 10 v/cm di gel.
- o) Lasciare il gel sotto tensione per circa 30 minuti o fino a quando il colorante più veloce contenuto nel loading buffer non raggiunge 1 cm dal bordo del gel.
- p) Dopo 30 minuti, controllare sul transilluminatore UV (5.13) la separazione delle bande. La corsa elettroforetica è ritenuta sufficiente se è possibile distinguere facilmente tutte le bande del marcatore di pesi molecolari compresi tra 250 e 2000 bp. Se la separazione è insufficiente, lasciare il gel sotto tensione fino ad avere una separazione adeguata.
- q) A corsa conclusa trasferire il gel nel sistema di acquisizione di immagini (5.8) ed effettuare una stampa del risultato.

7.2.5 Interpretazione dei risultati delle amplificazioni nested PCR

Il test di amplificazione sarà ritenuto valido se:

- i) il controllo positivo di amplificazione mostra un prodotto di amplificazione di 553 coppie di basi;
- ii) il controllo negativo di amplificazione non mostra prodotti di amplificazione o eventualmente solo bande riferibili agli oligonucleotidi inutilizzati e/o a loro derivati (primer dimer).

iii) il controllo positivo di estrazione produce un prodotto di amplificazione di 553 coppie di basi.

Nell'analisi degli elettroferogrammi vengono prese in considerazione solo le bande che soddisfano i seguenti requisiti:

- 1) dimensioni superiori a 50 bp;
- 2) comprese all'interno delle due bande dell'Alignment marker (6.15);
- 3) intensità del picco di emissione superiore ad un valore soglia del 5%.

Nel caso siano presenti picchi di emissione sovrapposti viene preso in considerazione solo quello con valore maggiore, se i valori sono simili il campione viene scartato.

La dimensione del prodotto di amplificazione viene valutata nei seguenti modi:

- i) comparazione visiva della banda con i pesi molecolari del "DNA size marker" (6.16) e con i controlli positivi di estrazione ed amplificazione sul gel virtuale;
- ii) confronto tra le dimensioni della banda ottenuta calcolata dal software dello strumento con la dimensione attesa.

Le dimensioni delle bande di amplificazione evidenziate dall'elettroforesi su gel di agarosio vengono valutate per comparazione delle stesse con i pesi molecolari di riferimento DNA size marker (6.16) e con i controlli positivi di estrazione e amplificazione. La valutazione visiva viene ritenuta sufficiente ed adeguata.

Qualora un campione mostri bande differenti dal valore di 553 paia di basi, la successiva digestione enzimatica per l'identificazione a livello di specie non sarà eseguita, il risultato della prova viene espresso come "specie non determinabile"

Se un campione di prova non mostra amplificazione, DNA di riferimento (6.25) verrà aggiunto al DNA del campione di prova ed amplificato secondo quanto descritto nel paragrafo 7.2.6, allo scopo di escludere la presenza di inibitori.

Qualora non si osservi l'amplificazione del frammento specifico in corrispondenza del DNA di riferimento, si procederà ad una nuova estrazione del DNA a partire dal campione di prova. Se anche l'amplificazione del DNA nuovamente estratto dal campione di prova non genera una banda di amplificazione di 553 paia di basi, il risultato della prova sarà "specie non determinabile".

L'identificazione della specie viene effettuata in seguito a digestione enzimatica delle bande prodotte comparata con le dimensioni attese e riportate in tabella A.

7.2.6 Verifica della presenza di inibitori tramite PCR con DNA di riferimento

Dove non espressamente indicato le provette sono mantenute in ghiaccio o in un supporto refrigerante. Dove non espressamente indicato utilizzare puntali con barriera e indossare guanti monouso.

Ad ogni sessione è previsto l'utilizzo di un controllo positivo ovvero DNA di riferimento (6.25) per verificare la corretta conduzione della reazione di amplificazione.

La seguente procedura prevede l'utilizzo di una PCR master mix a concentrazione 2x, in caso di concentrazione diversa modificare il protocollo secondo le specifiche del produttore.

- a) Scongellare: DNA/campioni fecali (7.2.1 punto t), 2x PCR MasterMix (6.9), Set A (6.10), controllo positivo di amplificazione (DNA di riferimento 6.25).
- b) Marcare con un numero progressivo una quantità adeguata di provette da PCR da 0,2 µL.
- c) Preparare un volume adeguato di miscela di amplificazione cumulativa. Calcolare i volumi sulla base della miscela di amplificazione del singolo campione (tabella H) e del numero totale dei campioni da analizzare aumentato di 2 unità (1 per il controllo positivo, 1 per il controllo negativo di amplificazione).

Tabella H. Miscela di amplificazione del singolo campione: componenti e relativi volumi

2x PCR MasterMix (6.9)	25 µL
H ₂ O (6.23)	14 µL
Set A (6.10)	1 µL
DNA di riferimento (6.25)	5 µL
Totale	45 µL

- d) Mescolare la miscela di amplificazione mediante vortex e se necessario centrifugare (5.1) al massimo dei giri per pochi secondi.
- e) Trasferire 45 µL della miscela di amplificazione cumulativa (7.2.6 punto c) in ciascuna delle provette da PCR.
- f) Aggiungere in ogni provetta 5 µL del DNA/campione fecale (7.2.1 punto t) da analizzare.
- g) Chiudere le provette, e centrifugare (5.1) al massimo dei giri per pochi secondi.
- h) Avviare il ciclo di amplificazione del termociclatore (5.4) secondo il programma descritto in tabella E, al paragrafo 7.2.2. Aspettare che la temperatura raggiunga 95°C e dopo avere messo in pausa lo strumento, inserire le provette nel blocco termico. Abbassare il coperchio e uscire dalla pausa.
- i) Finita la fase di amplificazione centrifugare (5.1) le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- j) Lasciare le provette in ghiaccio o in frigorifero (5.5) fino al momento di procedere con la Nested PCR, paragrafo 7.2.3.

7.2.6.1 Visualizzazione dei risultati

Per la visualizzazione dei risultati, seguire la procedura descritta nel paragrafo 7.2.4.

7.2.6.2 Interpretazione dei risultati dell'amplificazione PCR per la verifica della presenza di inibitori.

Per l'interpretazione dei risultati, seguire la procedura descritta al punto 7.2.5.

Il test di amplificazione sarà ritenuto valido se:

- i) il controllo positivo di amplificazione mostra un prodotto di amplificazione di 553 paia di basi;
- ii) il controllo negativo di amplificazione non mostra prodotti di amplificazione o eventualmente solo bande riferibili agli oligonucleotidi inutilizzati e/o a loro derivati (primer dimers).

Qualora per il campione di prova si osservi l'amplificazione del frammento di 553 paia di basi, il campione verrà considerato privo di inibitori della PCR e ritenuto negativo per la presenza di DNA di *Cryptosporidium*, l'identificazione a livello di specie non sarà possibile, il risultato della prova verrà espresso come "specie non determinabile".

7.2.7 Digestione enzimatica con endonucleasi

Dove non espressamente indicato, le provette sono mantenute in ghiaccio.

Ad ogni sessione è prevista la digestione enzimatica con l'enzima di restrizione *Rsa I*. Inoltre viene utilizzato un controllo positivo, ovvero il prodotto di amplificazione del DNA di riferimento (6.25), per verificare la corretta conduzione della reazione di digestione.

L'enzima di restrizione *AluI* viene utilizzato solo nel caso in cui ci fosse bisogno di discriminare tra le specie *C. suis* e *C. ubiquitum* in quanto la sola digestione enzimatica con *Rsa I* genera frammenti di eguale peso molecolare nelle due specie (vedi tabella A).

La seguente procedura prevede l'utilizzo di enzimi di restrizione (6.26) concentrati 10 U/µL e tamponi di restrizione concentrati 10x (6.27). In caso di concentrazione diversa, modificare il protocollo secondo le specifiche del produttore.

- a) Scongellare i prodotti di nested PCR (7.2.3 punto i) ed il tampone di restrizione 10x (6.27). Mantenere in ghiaccio l'enzima di restrizione (6.26)

- b) Marcare con un numero progressivo una quantità adeguata di provette da 0,2 mL.
- c) Preparare un volume adeguato di miscela di digestione cumulativa. Calcolare i volumi sulla base della miscela di digestione del singolo campione (tabella I) e del numero totale dei campioni da analizzare comprensivo del controllo positivo.

Tabella I. Miscela di digestione del singolo campione: componenti e relativi volumi

10x tampone di restrizione (6.27)	2 µL
Enzima di restrizione (6.26)	10U (1 µL)
Prodotti di PCR (7.2.3 punto i)	10 µL
H ₂ O	7 µL
Totale	20 µL

- d) Mescolare ciascuna miscela di digestione mediante vortex e, se necessario, centrifugare (5.1) al massimo dei giri per pochi secondi.
- e) Trasferire 10 µL della miscela di digestione cumulativa (7.2.7 punto c) in ciascuna delle provette da 0,2 mL.
- f) Aggiungere in ogni provetta 10 µL di prodotto di nested PCR (7.2.3 punto i) da analizzare.
- g) Chiudere le provette, mescolare mediante vortex e centrifugare (5.1) al massimo dei giri per pochi secondi.
- h) Incubare i campioni a 37°C per 4h nel termoblocco (5.3) senza agitazione.
- i) Finita l'incubazione, centrifugare (5.1) le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- j) Lasciare le provette in ghiaccio o in frigorifero (5.5) fino al momento dell'elettroforesi.

7.2.7.1 Visualizzazione dei risultati

Per la visualizzazione dei risultati, seguire la procedura descritta nel paragrafo 7.2.4.

7.2.7.2 Interpretazione dei risultati della digestione enzimatica

L'interpretazione dei risultati è effettuata come riportato nel paragrafo 7.2.5.

Qualora un campione mostri una banda non attesa, l'identificazione a livello di specie non sarà possibile.

Le dimensioni delle bande di digestione evidenziate dall'elettroforesi vengono valutate per comparazione delle stesse con i pesi molecolari di riferimento, DNA size marker (6.16) nel caso di elettroforesi capillare o L50 (6.21) nel caso di elettroforesi orizzontale e con il controllo di digestione. Considerato che le differenze tra le specie sono visivamente apprezzabili (vedi tabella A) la valutazione visiva viene ritenuta sufficiente ed adeguata.

Il test di amplificazione sarà ritenuto valido se il controllo positivo di digestione mostra un profilo di bande di digestione in accordo con la tabella A.

L'identificazione della specie viene effettuata confrontando le dimensioni dei frammenti prodotti dalle singole digestioni del campione di prova con la tabella A.

Qualora un campione mostri una banda non attesa, l'identificazione a livello di specie non sarà possibile e il risultato della prova verrà espresso come "specie non determinabile".

8 ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Esprimere i risultati nel rapporto di prova secondo le seguenti modalità:

Se il profilo delle bande di digestione con Rsa I è 413, 106, 34bp, allora il campione è identificato come *C. parvum*.

Se il profilo delle bande di digestione con Rsa I è 284, 129, 106, 34bp, allora il campione è identificato come *C. hominis*.

Se il profilo delle bande di digestione con Rsa I è 372, 147, 34bp, allora il campione è identificato

come *C. meleagridis*.

Se il profilo delle bande di digestione con Rsa I è 406, 86, 61bp, allora il campione è identificato come *C. felis*.

Se il profilo delle bande di digestione con Rsa I è 195, 106, 86, 71, 43, 34bp, 18bp allora il campione è identificato come *C. canis*.

Se il profilo delle bande di digestione con Rsa I è 327, 140, 86bp, allora il campione è identificato come *C. andersoni*.

Se il profilo delle bande di digestione con Rsa I è 519, 34bp, allora il campione è identificato come genotipo *horse*.

Se il profilo delle bande di digestione con Rsa I è 266, 129, 106, 34, 18bp e il profilo delle bande di digestione con Alu I è 424, 129bp, allora il campione è identificato come *C. suis*.

Se il profilo delle bande di digestione con Rsa I è 266, 129, 106, 34, 18bp e il profilo delle bande di digestione con Alu I è 324, 129, 100pb, allora il campione è identificato come *C. ubiquitum*.

Qualora il test risulti valido ed il campione analizzato mostri bande di digestione non classificabili tra quelle presenti in tabella A, l'identificazione della specie viene definita 'impossibile' e il risultato della prova sarà espresso come "specie non determinabile".

9 CARATTERISTICHE DEL METODO

Il presente metodo è stato caratterizzato in termini di specificità e ripetibilità. I risultati sono stati utilizzati per confermare che il metodo è adatto allo scopo previsto e sono riportati nel relativo fascicolo di validazione, al quale si rimanda.

10 MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE

Il presente metodo di prova può essere eseguito solo da personale autorizzato.

I dispositivi individuali di protezione sono rappresentati da guanti monouso e camice.

Per il comportamento generale da adottare da parte degli operatori, sia per la manipolazione che per la gestione dei rifiuti, fare riferimento ai manuali emessi dal *Servizio di Prevenzione e Sicurezza del Lavoro* dell'Istituto, a disposizione del personale dei laboratori e visionabili sul sito: <https://lfintranet.iss.it/web/quest/spp-sistema-di-gestione-della-salute-e-sicurezza>