

IDENTIFICAZIONE DI DNA DI *Toxoplasma gondii* IN MATRICI VEGETALI MEDIANTE LAMP

INDICE

1	SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	2
2	PRINCIPIO DEL METODO	2
3	BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI	3
4	DEFINIZIONI	4
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>	6
8	ESPRESSIONE DEI RISULTATI	10
9	CARATTERISTICHE DEL METODO	10
10	MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE	10

1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente documento definisce un metodo di prova interno per determinare mediante LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), la presenza di DNA di *Toxoplasma gondii* in matrici vegetali. Il metodo può essere applicato a vegetali a foglia verde.

2 PRINCIPIO DEL METODO

La LAMP è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di acidi nucleici specifici dei quali si conosca la sequenza nucleotidica. Se una specie possiede una porzione di DNA caratteristica per sequenza nucleotidica, è possibile progettare da 4 a 6 differenti oligonucleotidi (primers) che riconoscono 6 o 8 brevi porzioni di DNA. La combinazione dei suddetti primers permette quindi l'amplificazione esclusiva del DNA della specie di interesse. La reazione procede grazie ad una particolare DNA polimerasi che, abbinando la normale attività di sintesi del DNA con quella di dislocazione della catena dell'acido nucleico, permette l'amplificazione della sequenza di interesse a temperatura costante (62-65°C) sotto forma di ripetizioni concatenate (di numero crescente) della sequenza bersaglio. La LAMP è caratterizzata da una maggiore sensibilità e specificità rispetto alla PCR convenzionale, permettendo di identificare anche piccole tracce di DNA esogeno all'interno di una matrice.

Toxoplasma gondii è un protozoo che infetta tutti gli animali a sangue caldo (mammiferi o uccelli), compreso l'uomo. Nei felini, ospiti definitivi, si compie la fase sessuata del ciclo del parassita che viene rilasciato nelle feci sotto forma di oocisti. A seguito dell'ingestione delle oocisti da parte di mammiferi o uccelli, ospiti intermedi, il parassita raggiunge vari tessuti dell'ospite (in special modo muscoli e cervello), nei quali la forma asessuata del protozoo (tachizoita) va incontro a numerose repliche e alla formazione di cisti tissutali contenenti da decine a migliaia di parassiti (bradizoiti). Quando i felini ingeriscono carni infette, oppure oocisti, il ciclo ricomincia. L'infezione nell'uomo, toxoplasmosi, può essere acquisita sia per consumo di carne cruda o poco cotta proveniente da animali con cisti tissutali, sia mediante ingestione delle oocisti che contaminano gli alimenti (frutta, verdura, acqua). La toxoplasmosi nei soggetti normoergici è generalmente asintomatica; nei soggetti immunodepressi invece, può causare encefaliti, polmoniti, miocarditi, epatiti e corioretiniti. Se l'infezione viene acquisita in gravidanza, il parassita può essere trasmesso al feto causando gravi patologie fetali, fino all'aborto o danni permanenti che si possono sviluppare nell'età adulta.

Utilizzando la tecnica LAMP è possibile evidenziare in modo univoco la presenza di DNA di *Toxoplasma gondii* in campioni vegetali mediante l'amplificazione di una sequenza di 529 paia di basi (bp) altamente specifica e ripetuta fino a 300 volte nel genoma del parassita. Una miscela di 6 oligonucleotidi (Tabella A) permette l'amplificazione specifica della sequenza di 529 bp. L'avvenuta amplificazione può essere evidenziata mediante visualizzazione in elettroforesi su gel d'agarosio di un profilo a scaletta (ladder) di frammenti di amplificazione.

Tabella A - Sequenza degli oligonucleotidi che compongono il LAMP Primers Mix (6.13) e relativi codici.

Sequenza oligonucleotidi	Codice
5'-TGGTTGGAAGCGACGAGAGTTCCAGGAAAAGCAGCCAAG -3'	BIP
5'-TCCTCACCTCGCCTTCATCTAGGACTACAGACGCGATGC -3'	FIP
5'-CCACAGAAGGGACAGAAGTC -3'	F3
5'-TCCGGTGTCTCTTTTCCAC -3'	B3
5'-TCCAAGACGGCTGGAGGAG -3'	LF
5'-CGGAGAGGGAGAAGATGTTTCC -3'	LB

3 BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI

Jones JL, Dubey JP. Foodborne toxoplasmosis. Clin Infect Dis. 2012 Sep;55(6):845-51.

Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int J Parasitol. 2000 Jan;30(1):69-75.

El-Nawawi FA, Tawfik MA, Shaapan RM. Methods for inactivation of *Toxoplasma gondii* cysts in meat and tissues of experimentally infected sheep. Foodborne Pathog Dis. 2008 Oct;5(5):687-90.

Zhang H, Thekisoe OM, Aboge GO, Kyan H, Yamagishi J, Inoue N, Nishikawa Y, Zakimi S, Xuan X. *Toxoplasma gondii*: sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. Exp Parasitol. 2009 May;122(1):47-50.

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.

Berger-Schoch AE, Herrmann DC, Schares G, Müller N, Bernet D, Gottstein B, Frey CF. Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in feline faeces (oocysts) and meat from sheep, cattle and pigs in Switzerland. Vet Parasitol. 2011 May 11;177(3-4):290-7.

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.

ISO/FDI 20837:2006(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Requirements for sample preparation for qualitative detection.

ISO/FDI 20838:2006(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Requirements for amplification and detection for qualitative methods.

ISO 18744:2016(E). Microbiology of the food chain — Detection and enumeration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in fresh leafy green vegetables and berry fruits.

Laura F. Lalonde, Alvin A. Gajadhar. Optimization and validation of methods for isolation and realtime PCR identification of protozoan oocysts on leafy green vegetables and berry fruits. Food and Waterborne Parasitology 2016, 2: 1–7.

Lass A., Pietkiewicz H., Szostakowska B., Myjak P. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012, 31:1101–1108

4 DEFINIZIONI

529 bp, sequenza non codificante di 529 nucleotidi presente fino a 200-300 copie solo nel genoma di *Toxoplasma gondii*.

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

LAMP Mix, miscela di 6 oligonucleotidi che amplificano in modo specifico la sequenza 529 bp.

DNA di riferimento, DNA genomico purificato da tachizoiti di *Toxoplasma gondii*.

Controllo positivo di estrazione, sedimento di lattughino (900 μ l \pm 50 μ l) contenente 100 \pm 10 oocisti di *Toxoplasma gondii*, trattate nella stessa sessione di lavoro dei campioni in esame per verificare la corretta conduzione del protocollo di estrazione del DNA.

DNA campione, preparazione di DNA estratto da singolo campione.

Controllo positivo di amplificazione, DNA genomico purificato da tachizoiti di *Toxoplasma gondii*. E' utilizzato nelle sessioni di amplificazione del DNA campione per verificare il corretto funzionamento della reazione LAMP.

Controllo negativo di amplificazione, acqua grado reagente. E' utilizzato nelle sessioni di amplificazione del DNA campione per verificare il corretto funzionamento della reazione LAMP.

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

5 APPARECCHIATURA DI PROVA

- 5.1 Sistema di produzione di acqua di grado analitico (18M \square /cm)
- 5.2 Bilancia tecnica, risoluzione 0,1 g
- 5.3 pH-metro, scostamento massimo risoluzione \pm 0,3 pH
- 5.4 Omogeneizzatore da laboratorio a pale per sacchetti
- 5.5 Centrifuga preparativa refrigerata per provette da 50 mL, 7.500 x g
- 5.6 Congelatore, temperatura \leq -15°C
- 5.7 Omogeneizzatore vibrante da banco per provette (tipo, FastPrep Instrument)
- 5.8 Centrifuga da banco per provette da 1,5 mL, 10.000 x g
- 5.9 Termoblocco vibrante a temperatura variabile da 25 a 100°C
- 5.10 Agitatore a ruota per provette
- 5.11 Frigorifero, 1 - 8°C
- 5.12 Termociclatore per PCR
- 5.13 Sistema per elettroforesi orizzontale completo di accessori e alimentatore di corrente
- 5.14 Transilluminatore UV
- 5.15 Sistema per acquisizione di immagini
- 5.16 Micropipette (volumi variabili 1-1000 μ L)
- 5.17 Vortex

6 REATTIVI E MATERIALI

- 6.1 **Tampone Glicina**. Soluzione contenente sodio fosfato 1 M Glicina (C₂H₅NO₂) pH 5,5. Il tampone di incubazione viene preparato al momento dell'uso, nelle quantità appropriate all'esecuzione della prova, a partire da glicina in polvere reperibile in commercio.
Glicina 75 g

Acqua distillata e deionizzata fino 1000 mL

Aggiungere i componenti sopra specificati in circa 800 mL di acqua distillata e deionizzata. Mescolare mediante agitatore magnetico fino a completa dissoluzione. Controllare il pH (5,5 \pm 0,2) e portare a volume.

La soluzione è conservata a 1 \div 8°C fino a 1 mese. Il reagente glicina è conservato secondo le specifiche del produttore.

- 6.2 **Buste per omogeneizzatore.** Buste da 400 ml per omogeneizzatore a pale con filtro. Materiale reperibile in commercio (tipo, Bag BA6041/STR strainer per 400 Stomacher, Seward).
- 6.3 **Supporto per buste da omogeneizzazione.** Materiale reperibile in commercio.
- 6.4 **Tampone di risospensione.** Soluzione contenente sodio fosfato reperibile in commercio (tipo Sodium Phosphate Buffer, FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals). La soluzione è conservata secondo le specifiche del produttore.
- 6.5 **Tampone di omogeneizzazione.** Soluzione reperibile in commercio (tipo Tampone MT, FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals). Conservare a temperatura ambiente.
- 6.6 **Provetta per la lisi.** Provetta con tappo a vite e contenente biglie di varie dimensioni (tipo, Lysis Matrix E tube, FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals) reperibili in commercio.
- 6.7 **Tampone di lisi.** Soluzione reperibile in commercio (tipo Tampone PPS, FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals). Conservare a temperatura ambiente.
- 6.8 **Resina di Silice.** Soluzione reperibile in commercio (tipo Binding Matrix, FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals). Conservare a temperatura ambiente.
- 6.9 **Colonna di recupero.** Materiale reperibile in commercio (tipo FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals, ed identificata dal produttore come "SPIN filter").
- 6.10 **Tampone di lavaggio.** Soluzioni reperibili in commercio (tipo FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals). Preparare secondo le specifiche del produttore, identificare tale soluzione con la sigla 'SEWS-N'. Conservare a temperatura ambiente
- 6.11 **Provetta di raccolta.** Provetta da 2 mL reperibile in commercio (tipo FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals, ed identificata dal produttore come "catch tube").
- 6.12 **Tampone di eluizione.** Soluzione reperibile in commercio (tipo, FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals, e identificata dal produttore come DES). Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.13 **Provette da 0,2 mL, 1,5 mL, 2mL; 15 mL, 50 mL.** Materiale reperibile in commercio adatto per biologia molecolare.
- 6.14 **LAMP tampone di reazione 2X.** Soluzione composta dalla miscelazione di singoli componenti reperibili in commercio: 10X ThermoPol DF (detergent-free) e 100 mM MgSO₄; 5M Betaine; 100% Tween 20 (per 1 ml di tampone di reazione 2X i componenti sono miscelati come segue: 320 μ l di betaina 5M, 200 μ l di 10X ThermoPol DF; 120 μ l di MgSO₄ 100mM, 2 μ l di Tween 20 100% e 358 μ l di acqua di grado analitico). Aliquotare la miscela e conservare in congelatore a -20 °C (5.6) per un massimo di 24 mesi.
- 6.15 **Deossinucleotidi trifosfato (dNTP) mix.** Preparazione commerciale di deossinucleotidi trifosfato (100 mM) ciascuno alla concentrazione di 25 μ mol, per reazioni di amplificazione. Conservare il prodotto in congelatore (5.6) a -20 °C.
- 6.16 **Bst DNA polymerase (Large Fragment).** La Bst DNA polymerase è un enzima reperibile in commercio adatto alla conduzione di esperimenti di amplificazione LAMP. Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.17 **Oligonucleotidi.** Preparazione commerciale. Il prodotto liofilizzato viene ricostituito secondo le indicazioni del produttore ad una concentrazione di 100 pmoli/ μ L con acqua di grado analitico (5.1). L'avvenuta ricostituzione viene riportata con data e firma nel rapporto tecnico allegato agli oligonucleotidi dalla ditta produttrice. Conservare il prodotto liofilizzato in congelatore (5.6) fino a un massimo di 5 anni. Conservare il prodotto ricostituito in congelatore (5.6) fino ad un massimo di 24 mesi.
- 6.18 **LAMP Primers Mix.** Miscela di oligonucleotidi utilizzata per la LAMP. La miscela è ottenuta combinando un idoneo volume degli oligonucleotidi riportati in Tabella A in acqua di grado

analitico (5.1) affinché la concentrazione finale corrisponda a: 40 pmol/μL per BIP e FIP, 5 pmol/μL per F3 e B3, 20 pmol/μL di LF e LB. Aliquote di 100μL vengono preparate e conservate in congelatore (5.6) fino a un massimo di 24 mesi.

- 6.19 **Loading buffer 6x.** Prodotto commerciale che permette di eseguire l'elettroforesi di molecole di DNA. Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.20 **Agarosio.** Prodotto commerciale definito adatto alla conduzione di elettroforesi per molecole di DNA. Conservare a temperatura ambiente.
- 6.21 **TAE soluzione 50x.** Prodotto commerciale (2M Tris-acetato, 50mM EDTA, pH 8.2–8.4 a 25°C). Conservare a temperatura ambiente.
- 6.22 **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.
- 6.23 **Bromuro di etidio** Soluzione, prodotto commerciale 10 mg/L. Soluzione di lavoro: diluire 1:100.000 (per 100 mL di soluzione aggiungere 1 μL). Conservare a temperatura ambiente in bottiglia.
NOTA: Il bromuro di etidio è potenzialmente mutageno, carcinogeno e teratogenico, trattare con cautela tutte le soluzioni che contengono questa sostanza indossando guanti monouso.
- 6.24 **L1000.** Prodotto commerciale contenente molecole marcatrici di peso molecolare per DNA. Viene ritenuto idoneo ogni prodotto commerciale che contenga molecole multiple nell'intervallo 250-10.000 bp. Conservare in frigorifero (5.11) secondo le specifiche del produttore.
- 6.25 **Acqua grado reagente o Milli-Q,** resistività $\geq 18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$.
- 6.26 **Campione di riferimento.** Sedimento di lattughino (900 μL ± 50 μL) contenente 100 ± 10 oocisti di *Toxoplasma gondii*, trattate nella stessa sessione di lavoro dei campioni in esame per verificare la corretta conduzione del protocollo di estrazione del DNA. Conservare in congelatore (5.6) fino ad un massimo di 5 anni.
- 6.27 **DNA di riferimento.** DNA genomico purificato da tachizoiti di *Toxoplasma gondii* (10ng/μL). Conservare in congelatore (5.6) fino ad un massimo di 5 anni.

7 PROCEDIMENTO

7.1 Preparazione del campione di prova

Il campione pervenuto (50 g ± 2g in sacchetti sigillati), viene controllato per la verifica dell'integrità del contenitore, assicurandosi che non vi sia traccia di perdita del contenuto.

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

I campioni vengono quindi posti in frigorifero (5.11) per un max di 3 giorni prima di procedere all'esecuzione della prova.

7.2 Esecuzione della prova

7.2.1 Recupero delle oocisti dal campione da sottoporre al test

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

Prima di cominciare la procedura, preparare un volume sufficiente di Tampone Glicina (6.1).

- Trasferire il campione in una busta per omogeneizzatore (6.2) e marcarlo con un numero progressivo.
- Porre la busta sull'apposito supporto (6.3).
- Aggiungere 200 ml di Tampone Glicina (6.1).
- Richiudere la busta per omogeneizzatore (6.2) piegandone il bordo superiore.
- Inserire la busta per omogeneizzatore (6.2) nell'omogeneizzatore a pale (5.4).
- Omogeneizzare il campione per 30 sec. a 300 rpm.

- g) Ripetere il punto (e).
- h) Rimuovere con attenzione la busta dall'omogeneizzatore e porla nell'apposito supporto (6.3).
- i) Preparare 4 provette da 50 ml (6.13) per ciascun campione di prova e marcarle con il numero corrispondente.
- j) Trasferire l'omogenato nelle provette da 50 ml (6.13), assicurandosi che il materiale vegetale sia trattenuto all'interno del filtro. Strizzare la busta per omogeneizzatore (6.2) ed il filtro assicurandosi che tutto l'omogenato sia recuperato. Assicurarsi che la soluzione sia distribuita in egual volume tra le 4 provette.
- k) Centrifugare (5.5) le provette a 2500 x g a 4°C per 10 min.
- l) Recuperare le provette dalla centrifuga (5.5), eliminare il soprannatante, lasciando 1-2 ml di soluzione facendo attenzione a non smuovere il sedimento. Se il sedimento non è visibile fare ancor più attenzione.
- m) Risospendere il sedimento, riunire i sedimenti risospesi per ciascun campione di prova in un'unica provetta.
- n) Aggiungere 10 ml di tampone glicina (6.1) alla busta per omogeneizzatore (6.2), risciacquarla manipolando delicatamente la busta dall'esterno e recuperare il lavaggio nella provetta da 50 ml (6.12) del punto m.
- o) Centrifugare (5.5) le provette a 2500 x g a 4°C per 10 min.
- p) Recuperare le provette dalla centrifuga (5.5), eliminare il soprannatante, lasciando 1-2 ml di soluzione facendo attenzione a non smuovere il sedimento. Se il sedimento non è visibile fare ancor più attenzione.
- q) Ripetere dal punto "n" al punto "p"
- r) Aggiungere 50 ml di acqua grado reagente o Milli-Q (6.25).
- s) Centrifugare la provetta (5.5) a 2500 x g a 4°C per 10 min.
- t) Recuperare le provette dalla centrifuga, eliminare il soprannatante, lasciando 1-2 ml di soluzione facendo attenzione a non smuovere il sedimento. Se il sedimento non è visibile fare ancor più attenzione.
- u) Trasferire il sedimento risospeso in una provetta da 2 ml (6.13) opportunamente numerata.
- v) Centrifugare la provetta (5.8) a 2500 x g per 10 min.
- w) Recuperare le provette dalla centrifuga, eliminare tutto il soprannatante, facendo attenzione a non smuovere il sedimento. Se il sedimento non è visibile fare ancor più attenzione.
- x) Risospendere il sedimento in 900 ml di tampone di risospensione (6.4). I campioni vengono quindi posti in congelatore (5.6) per almeno 48h prima di procedere all'esecuzione della prova. In tali condizioni il campione può essere conservato per 5 anni prima dell'estrazione.

7.2.2 Estrazione del DNA da campione 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 (6.26) venga sottoposto alla procedura di estrazione ed identificato come "controllo positivo di estrazione".

- a) Scongela a temperatura ambiente le provette contenenti il campione di riferimento (6.26) ed il/i campione/i di prova.
- b) Aggiungere 125 µL di tampone di omogeneizzazione al campione (6.5).
- c) Trasferire il campione in provetta per la lisi (6.6).
- d) Omogenizzare il campione mediante omogeneizzatore vibrante da banco (5.7) a velocità 6 per 40 sec.
- e) Ripetere il punto "d".
- f) Centrifugare (5.8) la provetta a 12.000 rpm per 10 minuti.
- g) Trasferire la fase liquida in una nuova provetta da 2 mL (6.13) opportunamente numerata.
- h) Aggiungere 250 µL di tampone di lisi (6.7) e miscelare invertendo la provetta per 10 volte.
- i) Centrifugare (5.8) la provetta a 12.000 rpm per 5 minuti.

- j) Trasferire il sopranatante in una nuova provetta da 2 mL (6.13) opportunamente numerata.
- k) Agitare su vortex per 30 sec la resina di silice (6.8).
- l) Aggiungere 1 mL di resina di silice (6.8) alla provetta con il campione e miscelare in agitatore a ruota (5.10) per 2 min.
- m) Collocare la provetta in porta-provette per 3 min. per permettere la sedimentazione della resina di silice (6.8).
- n) Rimuovere delicatamente 500 µL di sopranatante facendo attenzione a non disturbare la resina di silice (6.8).
- o) Risospendere con la micropipetta (5.16) la resina di silice (6.8) con il sopranatante rimasto.
- p) Trasferire 500 µL della miscela in una colonna di recupero alloggiata in provetta di raccolta (6.9) opportunamente numerata.
- q) Centrifugare (5.8) la provetta con la colonna di recupero a 12.000 rpm per 1 minuto.
- r) Vuotare la provetta di raccolta.
- s) Ripetere i punti da "p" ad "r" fino al completo trasferimento di tutta la resina di silice (6.8) nella colonna di recupero (6.9).
- t) Aggiungere 500 µL tampone di lavaggio (6.10) alla colonna di recupero (6.9) e delicatamente risospendere la resina con la micropipetta (5.16).
- u) Centrifugare (5.8) la provetta con la colonna di recupero (6.9) a 12.000 rpm per 1 minuto.
- v) Vuotare la provetta di raccolta.
- w) Centrifugare (5.8) la provetta con la colonna di recupero (6.9) a 12.000 rpm per 2 minuti.
- x) Trasferire la colonna di recupero (6.9) in una nuova provetta di raccolta (6.11) opportunamente numerata.
- y) Lasciare asciugare all'aria per 5 min.
- z) Risospendere delicatamente la resina in 100 µL di tampone di eluizione (6.12) con la micropipetta (5.16).
- aa) Incubare a 55°C (±3°C) per 5 min in termoblocco (5.9).
- bb) Centrifugare (5.8) a 12.000 rpm per 1 minuto, eliminare la colonna di recupero (6.9), conservare la provetta (6.11) contenente il DNA.
- cc) Il DNA così preparato viene definito 'DNA/campione' e conservato in congelatore (5.6). In tali condizioni può essere conservato fino a 5 anni.

7.2.3 Amplificazione LAMP

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 (6.27), e di un controllo negativo, ovvero acqua (6.25), per verificare la corretta conduzione della reazione di amplificazione.

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

- a) Scongellare: DNA/campione, LAMP tampone di reazione 2X (6.14), Deossinucleotidi trifosfato (dNTP) mix (6.15), LAMP Primers Mix (6.18), Bst DNA polymerase (6.16), controllo positivo di amplificazione (DNA di riferimento 6.27); DNA/campione
- b) Marcare con un numero progressivo una quantità adeguata di provette da 0,2 µL (6.13).
- c) Preparare un volume adeguato di miscela di amplificazione cumulativa. Calcolare i volumi sulla base della miscela di amplificazione del singolo campione (Tabella B) e del numero totale dei campioni da analizzare aumentato di 3 unità (1 per il controllo positivo, 1 per il controllo negativo di amplificazione ed 1 per una reazione addizionale).

Tabella B – miscela di amplificazione del singolo campione: componenti e relativi volumi

LAMP tampone di reazione 2X (6.14)	12.5 µL
LAMP Primers Mix (6.18)	6 µL
Bst DNA polymerase (6.16)	1 µL
Deossinucleotidi trifosfato (dNTP) mix (6.15)	1.4 µL
H ₂ O (6.25)	0.1 µL
Totale	21 µL

- d) Mescolare la miscela di amplificazione mediante vortex (5.17) e se necessario centrifugare (5.8) al massimo dei giri per pochi secondi.
- e) Trasferire 21 µL della miscela di amplificazione cumulativa in ciascuna delle provette da PCR (punto “b”).
- f) Aggiungere in ogni provetta 4 µL di preparazione di DNA/campione da analizzare, o 2 µL di DNA di riferimento (6.27) più 2 µL di H₂O (6.25).
- g) Chiudere le provette.
- h) Avviare il ciclo di amplificazione (Tabella C) del termociclatore (5.12), aspettare che la temperatura raggiunga 63°C e, dopo avere messo in pausa lo strumento, inserire le provette nel blocco termico. Abbassare il coperchio e uscire dalla pausa.

Tabella C – ciclo di amplificazione

Amplificazione	120 min/63°C
Inattivazione	2 min/80°C

- i) Finita la fase di amplificazione centrifugare (5.8) le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- l) Lasciare le provette in ghiaccio o in frigorifero (5.11).

7.2.4 Visualizzazione ed interpretazione dei risultati

Il risultato viene valutato mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

- a) Aggiungere 5 µL di loading buffer 6x (6.19).
- b) Lasciare le provette in ghiaccio o in frigorifero (5.11) fino al momento dell'elettroforesi.
- c) Assemblare l'apparato per elettroforesi (5.13) seguendo le indicazioni della ditta produttrice. Nella preparazione del gel utilizzare un pettine adeguato al numero di campioni in esame.
- d) Pesare (5.2) 1,5 g di agarosio (6.20) e versarlo in 100 mL di TAE 1x (6.22) preparato in un contenitore di vetro.
- e) Pesare (5.2) la soluzione.
- f) Risospendere delicatamente la polvere mediante rotazione.
- g) 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.
- h) Reintegrare con acqua il volume perso durante l'ebollizione.
- i) Lasciare raffreddare la soluzione di agarosio.
- j) Prima che la soluzione cominci a solidificare aggiungere 1 µL di soluzione di bromuro di etidio (6.23).
- k) Agitare delicatamente per disperdere uniformemente il bromuro di etidio e versare l'agarosio nel piatto per il gel preparato in precedenza (punto c).
- l) Aspettare che il gel solidifichi non meno di 30 minuti.

- m) Collocare il piatto contenente il gel nel sistema per elettroforesi.
- n) Coprire il gel con tampone TAE 1x (6.22).
- o) Caricare in ogni pozzetto 15 µL del prodotto di amplificazione (punto 7.2.3“l”) seguendo il numero progressivo di marcatura delle provette (punto 7.2.3 “b”).
- p) Caricare il primo pozzetto con 10 µL della soluzione L1000 (6.24).
- q) Connettere l'apparato per elettroforesi con l'alimentatore e impostare un valore di tensione di 10 v/cm di gel.
- r) Lasciare il gel sotto tensione per circa 30 minuti o fino a quando il colorante più veloce contenuto nel loading buffer (6.19) non raggiunga 1 cm dal bordo del gel.
- s) Dopo 30 minuti, controllare sul transilluminatore UV (5.14) 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 2.000 bp. Se la separazione è insufficiente, lasciare il gel sotto tensione fino ad avere una separazione adeguata.
- t) A corsa conclusa trasferire il gel nel sistema di acquisizione di immagini (5.15) ed effettuare una stampa del risultato.

Il profilo delle bande di amplificazione evidenziate dall'elettroforesi viene valutato per comparazione delle stesse con i pesi molecolari di riferimento L1000 (6.24) e con i controlli positivi di estrazione e amplificazione. La valutazione visiva viene ritenuta sufficiente ed adeguata.

Il test di amplificazione è ritenuto valido se:

- i. il controllo positivo di amplificazione mostra un profilo a scaletta (ladder) di frammenti di amplificazione;
- 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 mostra un profilo a scaletta (ladder) di frammenti di amplificazione.

8 ESPRESSIONE DEI RISULTATI

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

Se il prodotto di amplificazione produce un profilo a scaletta (ladder) di frammenti, allora il campione è identificato come **POSITIVO** per la presenza di DNA di *Toxoplasma gondii*.

Qualora il test risulti valido, il campione analizzato sarà ritenuto **NEGATIVO** sia che non mostri alcuna amplificazione sia che mostri un profilo di amplificazione non confrontabile con i controlli positivi.

In caso di risultato **NEGATIVO** non è possibile escludere comunque la presenza di DNA di *Toxoplasma gondii* nella matrice in quanto la quantità di DNA del parassita potrebbe essere inferiore al limite di sensibilità del metodo.

9 CARATTERISTICHE DEL METODO

Il presente metodo è stato valutato per sensibilità, 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.



Laboratorio Europeo di Riferimento per i Parassiti

Dipartimento di Malattie Infettive
Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette
Istituto Superiore di Sanità



Per il comportamento generale da adottare da parte degli operatori fare riferimento ai manuali emessi dal Servizio di Prevenzione e Sicurezza del Lavoro dell'Istituto a disposizione del personale dei laboratori e anche visionabili sul sito <http://intranet.iss.it/prev/index.php?lang=1&anno=2020&tipo=13> (*Manuale per gli operatori che lavorano nei laboratori a carattere chimico e biologico; Manuale operativo per la gestione dei rifiuti prodotti all'interno dell'ISS*).