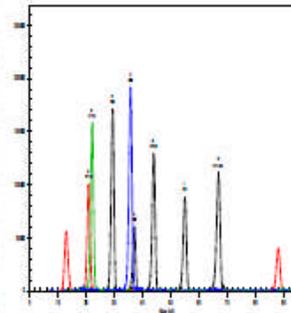


«PIANO DI SELEZIONE GENETICA PER LA
RESISTENZA ALLE ENCEFALOPATIE
SPONGIFORMI NEGLI OVINI:
ASPETTI APPLICATIVI»

Baggiovara (MO) 25 settembre 2014



La determinazione del genotipo:
attività di laboratorio e criticità



Elena Carra

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia
e dell'Emilia Romagna (Sezione di Modena)*



Argomenti trattati

- *La determinazione del genotipo*
- *L'organizzazione dell'attività analitica*
- *Metodo in uso in IZSLER*
- *Criticità*





La Scrapie



Malattia neurodegenerativa letale

Assenza di risposta immunitaria o
infiammatoria

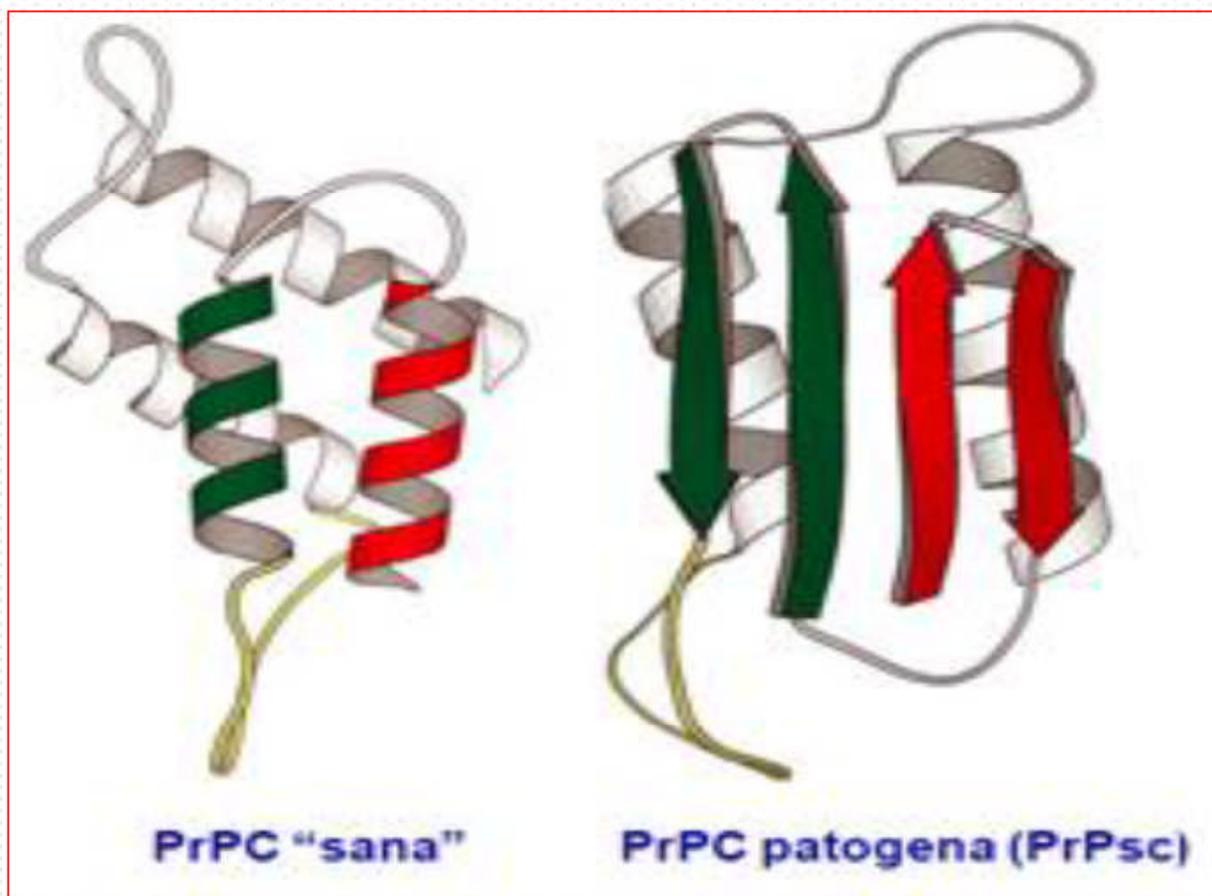
Impossibilità di diagnosi in vita

TSE o malattie da PRIONI

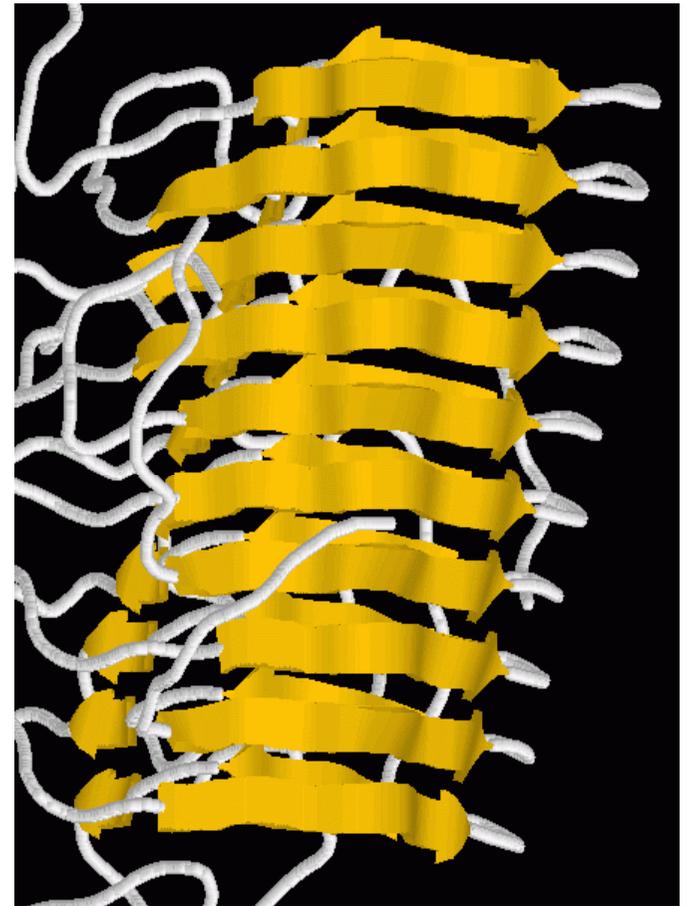
Forma classica e atipica



L'agente eziologico: Prione



Isoforma della normale
Elevata resistenza a
trattamenti chimici e fisici



SCARPIE PATOGENESI

L'inoculazione o l'ingestione di sospensioni
contenenti prioni è

in grado di indurre la comparsa della patologia in
soggetti normali,

i quali a loro volta

diventano

sorgente di possibile

infezione.



La trasmissibilità dei prioni è un fenomeno che richiede la cooperazione di Prp^c codificata dall'ospite con Prp^{sc} esogena.....

La sequenza della Prp^{sc} è sempre quella della Prp^c codificata dalle cellule dell'animale ospite e non la Prp^{sc} utilizzata nell'inoculo iniziale e questo indica che.....

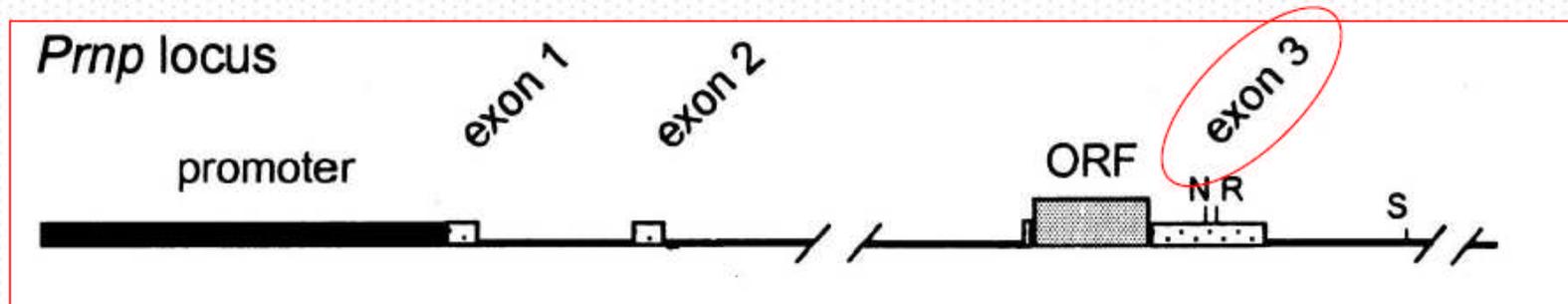
La trasmissibilità dei prioni è un fenomeno che richiede la cooperazione di Prp^c codificata dall'ospite con Prp^{sc} esogena





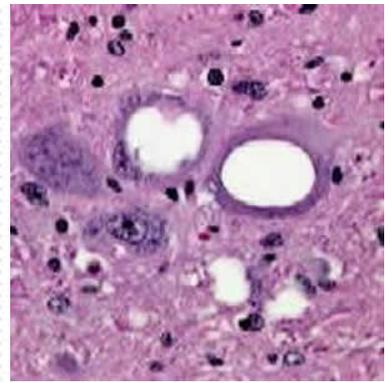
Negli ovini: Predisposizione genetica alla Scrapie

gene codificante la PrP (256 aa), nel cromosoma 13



PRNP: gene POLIMORFICO





Mutazioni in singola base (SNPs)

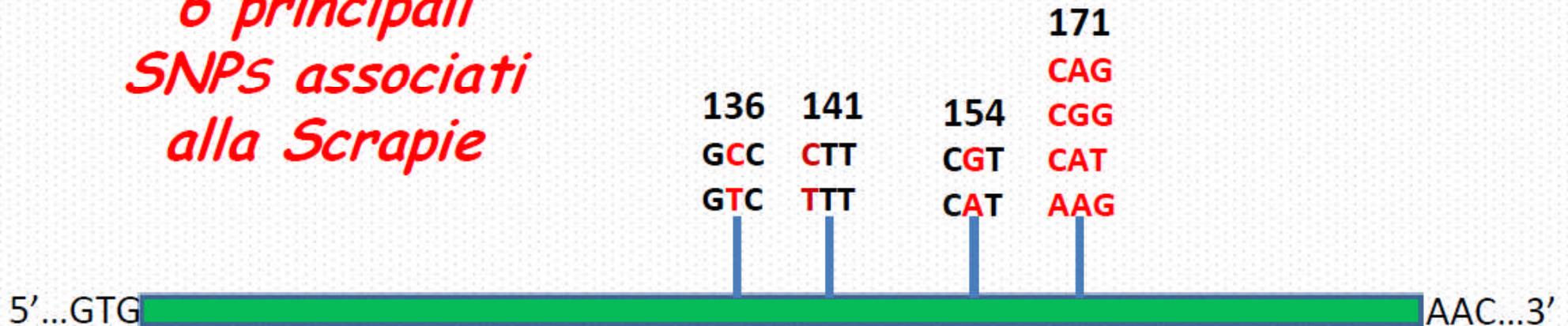
5'...GTG  AAC...3'

Polimorfismi nel gene della PrP ovina (noti > di 30)

Tripletta di nucleotidi = codone

A un codone corrisponde un AA secondo il codice genetico universale

**6 principali
SNPs associati
alla Scrapie**



Presenza di diverse forme (alleli) del gene $\Rightarrow \neq AA$



Determinare il profilo allelico o genotipo

Polimorfismi principali

codone	aminoacido			
136	A (ALANINA)	V (VALINA)	-	
154	R (ARGININA)	H (ISTIDINA)	-	
171	R (ARGININA)	Q (GLUTAMMINA)	H (ISTIDINA)	K (LISINA)
141	L (LEUCINA)	F (FENILALANINA)		



GENOTIPO

PROFILO ALLELICO DELLA PRP

..... 136 ... 154 171.....

136	154	171	141
A	R	Q	L / F
A	R	R	
A	H	Q	
A	R	H	
V	R	Q	
A	R	K	

Variazioni genetiche presenti nel genoma ovino e che influenzano la suscettibilità alla scrapie

CODONE	AA	AA	AA
136	<i>ALANINA (A) resistente</i>	<i>VALINA (V) Sensibile</i>	
154	<i>ARGININA (R) resistente</i>	<i>ISTIDINA (H) sensibile</i>	
171	<i>ARGININA (R) resistente</i>	<i>GLUTAMMINA (Q) sensibile</i>	<i>ISTIDINA (H) sensibile</i>

Tabella 2. Genotipi resistenti e genotipi suscettibili alla scrapie

Alleli pecora	Alleli montone		
	VRQ	ARQ	ARR
VRQ	VRQ/VRQ	ARQ/VRQ	ARR/VRQ
ARQ	VRQ/ARQ	ARQ/ARQ	ARR/ARQ
ARR	VRQ/ARR	ARQ/ARR	ARR/ARR

Tabella 3. Classi di riproduttori in base alla suscettibilità di sviluppare la scrapie

Classe riproduttori	Genotipi	Note
I Classe	ARR/ARR	Genotipo resistente
II Classe	ARR/AHQ ARR/ARQ ARR/ARH	Genotipo semiresistente
III Classe	ARQ/ARQ ARQ/AHQ ARQ/ARH ARH/AHQ AHQ/AHQ ARH/ARH	Genotipi sensibili o rari
Divieto d'impiego	VRQ/ARQ VRQ/AHQ VRQ/ARH ARR/VRQ VRQ/VRQ	Portatori allele VRQ

TRASMISSIONE: ADULTI TRA 2 E 5 ANNI

ORIZZONTALE: + FREQUENTE

- 1) INTRODUZIONE NEL GREGGE DI SOGGETTI INFETTI
- 2) DIFFUSIONE ATTRAVERSO IL LATTE E LA PLACENTA

VERTICALE: ASSUNZIONE DI COLOSTRO DA PARTE DI AGNELLI NATI DA MADRI INFETTE OPPURE PER VIA DIAPLACENTARE

ATTENZIONE AI PASCOLI CONTAMINATI DA PLACENTE E CARCASSE IN DECOMPOSIZIONE: IL PRIONE ADERISCE AL SUOLO E MANTIENE LA CAPACITA' DI INFETTARE.



Determinazione del genotipo

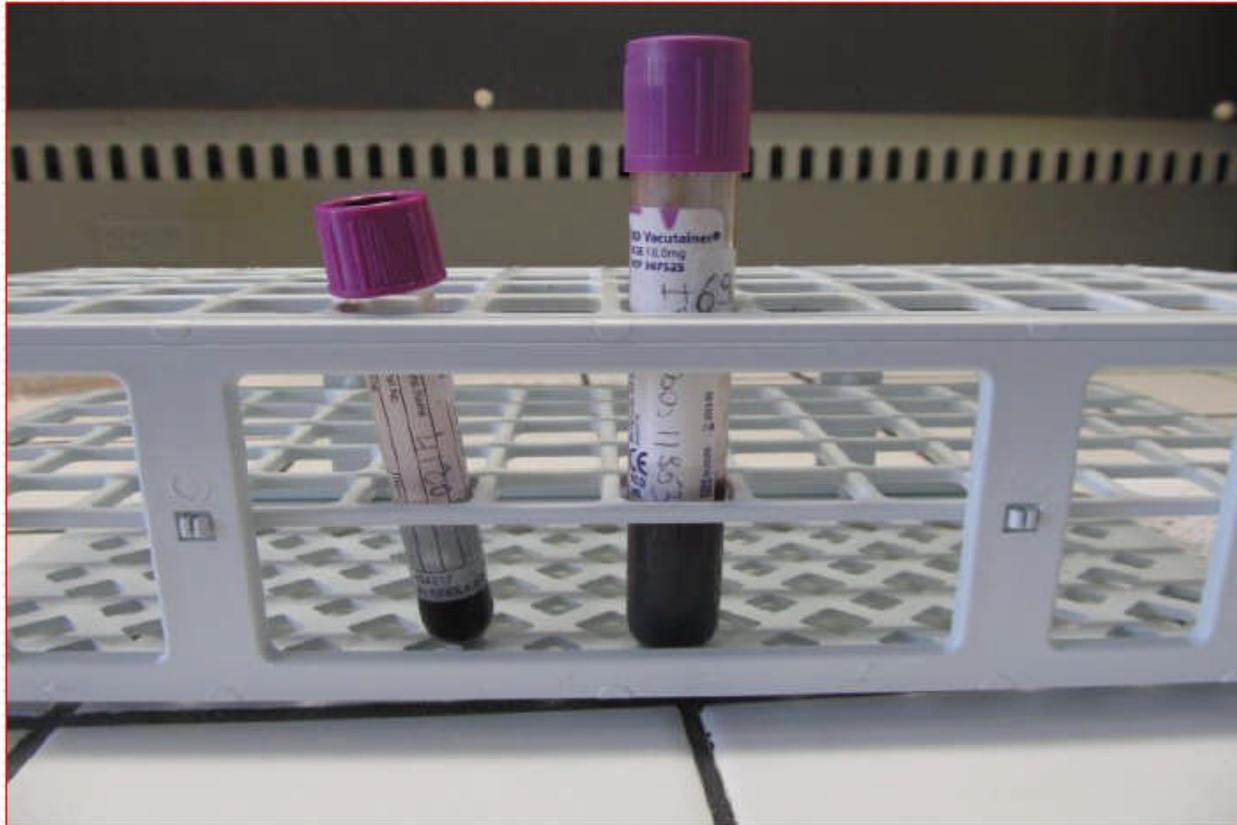
Sequenza nucleotidica \implies *aa* \longrightarrow *genotipo*

- ✓ *Sequenziamento diretto*
- ✓ *Pirosequenziamento*
- ✓ *PCR Real Time (sonde MGB o sonde FRET +RFLP)*
- ✓ *Primer Extension (IZSLER)*





I campioni



- campioni di sangue intero in EDTA
- conservati a -20°C



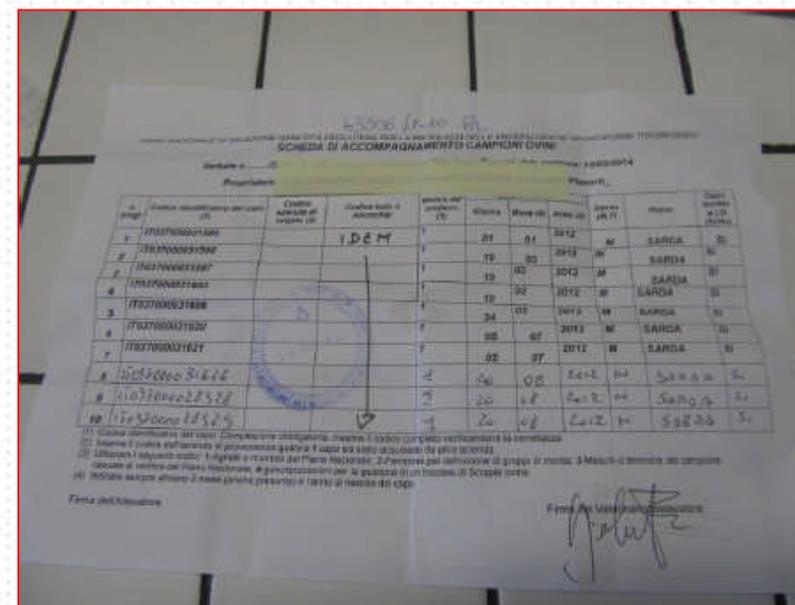
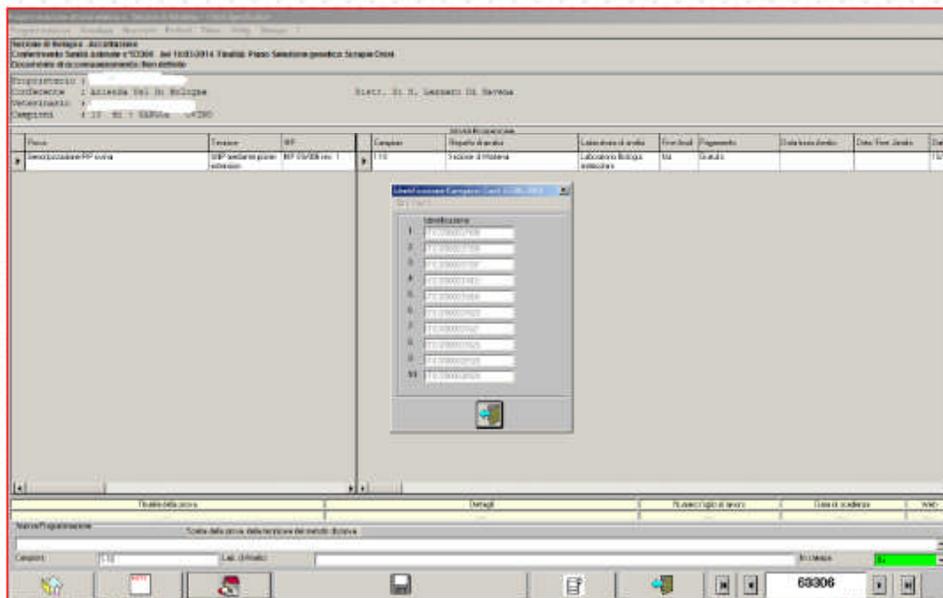
Accettazione dei campioni



Verifica identificazione dei campioni con verbale di accompagnamento



Accettazione dei campioni



- Registrazione dei campioni in Darwin
- Attribuzione di un numero di conferimento





www.montecarlo.com



Stoccaggio dei campioni

I.Z.S.L.E.R. Doc. corr. Foglio di lavoro genotipizzazione ovina mediante Primer Extension IO MO-022 H rev.

FOGLIO DI LAVORO GENOTIPIZZAZIONE OVINA MEDIANTE *PRIMER EXTENTION* - estrazioni

Preso in carico	riestr.	campioni (Danz./prog)	data	metodo estrazione	operat. estr.	destinazione DNA (piastra/c)
25/1/14	□	48428 (5)	4/3/14	Hamilton	gfb	160304-1
4/2/14	□	55343 (32)	4/3/14	" "	gfb	140504-1
11/3/14	□	63306/4/14				
18/03/14	□	69494 (4)				
	□					



- Compilazione foglio di lavoro del laboratorio
- Stoccaggio dei campioni in attesa dell'inizio analisi



MP IZSLER - Primer Extension

- Determinazione indiretta degli alleli nelle 6 posizioni di SNPs (codoni: 136; 141, 154; 171)
- Un'unica reazione per indagare contemporaneamente i 6 siti polimorfici
- **6 fasi successive + analisi dei risultati**
- In automazione con robot Hamilton
- Separazione capillare con sequenziatore automatico + software per analisi di frammenti





MP IZSLER

1 Estrazione del DNA da sangue intero (in EDTA)

2 Amplificazione di una regione del gene PRNP in PCR

3 Rimozione enzimatica dell'eccesso di primers e dNTPs di PCR

4 Reazione di primer extension

5 Rimozione enzimatica dell'eccesso di ddNTPs di "primer extension "

6 Separazione capillare per evidenziare i frammenti ottenuti

Analisi del risultato e determinazione del genotipo



Estrazione del DNA



Kit del commercio, tutti i passaggi in piastre monouso da 96 campioni

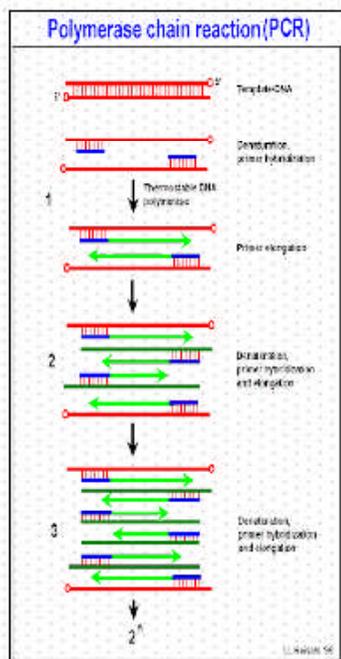


Estrazione del DNA in automazione





Amplificazione regione PRNP



DNA estratto

Amplificazione in PCR di una regione dell 'PRNP di 345bp



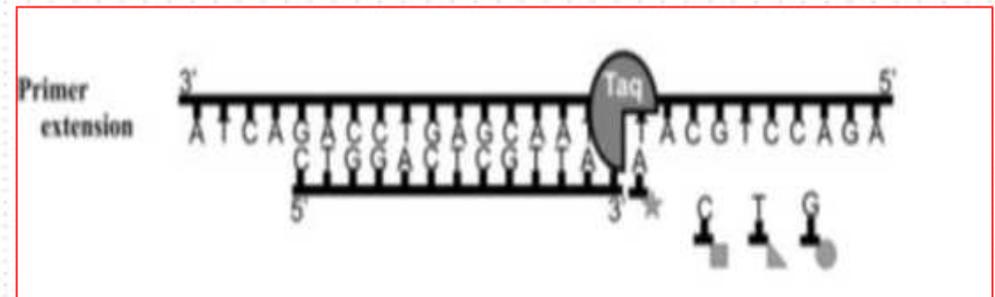


Primer Extension: la reazione

DNA amplificato stampo

6 primers di dimensioni \neq

ddNTP (A, C, G, T)
terminatori marcati con
fluorofori



Popolazione di 6 primers estesi di 1 sola base complementare a quella sul
filamento stampo

Frammenti fluorescenti con colori diversi



Primer Extension: la separazione capillare

Popolazione 6 frammenti FLUORESCENTI

- ✓ Separabili sulla base delle dimensioni dal più corto al più lungo
- ✓ In presenza di un Size Standard
- ✓ Sequenziatore automatico + software per analisi di Frammenti



Frammenti separati dal più corto al più lungo

171 II	154	136	171 III	141	171 I
-----------	-----	-----	------------	-----	----------

26

32

38

45

54

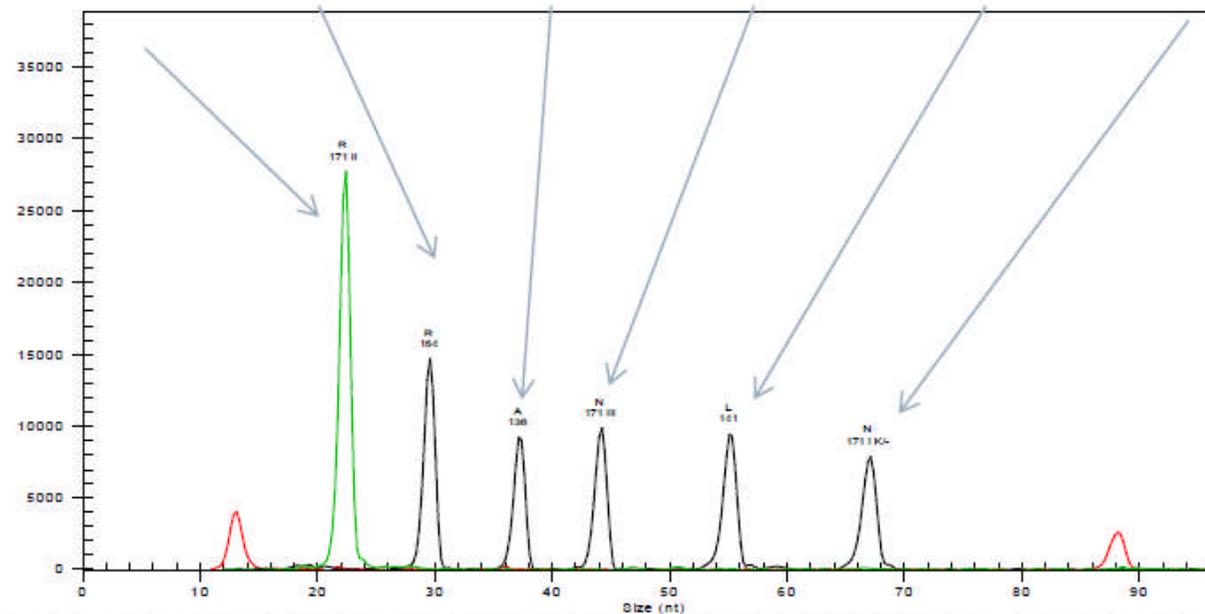
64

→ (nt)

Primer Extension: l'analisi del profilo



171 II	154	136	171 III	141	171 I
-----------	-----	-----	------------	-----	----------



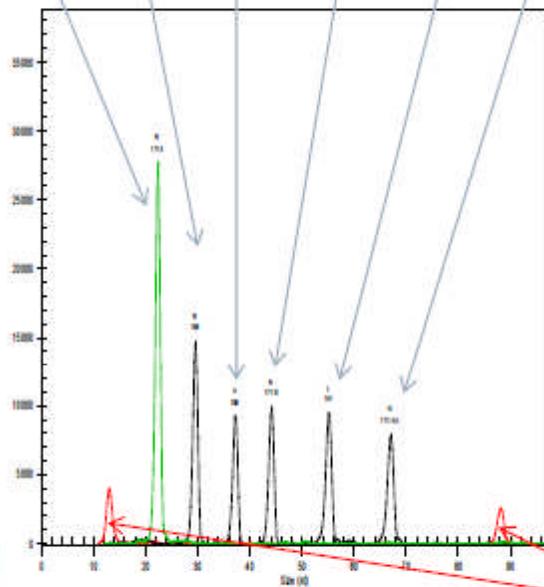
ARR/ARR

In base al colore dei picchi ottenuti in omo / o eterozigosi si ricava il ddNTP che è stato incorporato \implies codone \implies aa corrispondente



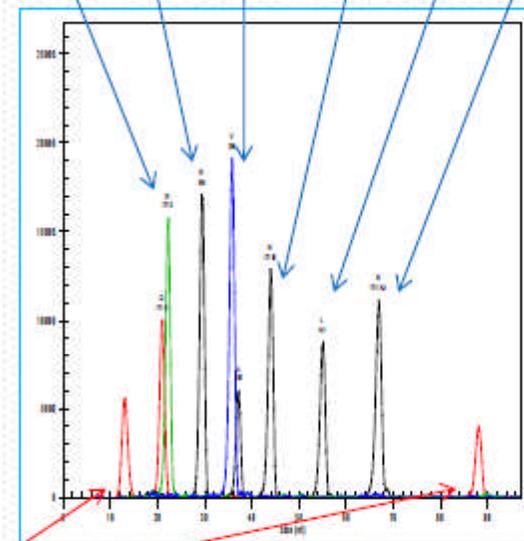
Primer Extension: risultato

171 II	154	136	171 III	141	171 I
-----------	-----	-----	------------	-----	----------



ARR/ARR

171 II	154	136	171 III	141	171 I
-----------	-----	-----	------------	-----	----------



ARR/VRQ

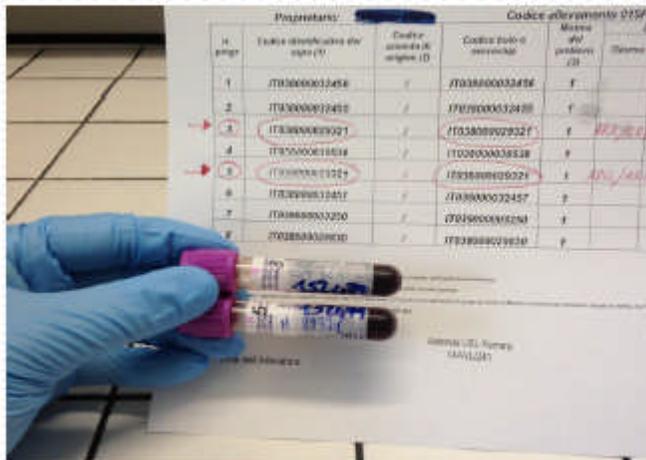
SS

Criticità del metodo e Misure messe in atto a scopo preventivo



? Identificazione dei campioni dal prelievo alla refertazione dell'esito

- Controllo dei campioni in fase di registrazione, presa in carico, messa in analisi e refertazione dei campioni
- Automazione



n. progr	Codice identificativo del capo (1)	Codice azienda di origine (2)	Codice bolo o microchip	Motivo del prelievo (3)	Giorno	Mese (4)
1	IT038000032456	/	IT038000032456	1		
2	IT038000032455	/	IT038000032455	1		
3	IT038000029321	/	IT038000029321	1		
4	IT038000039538	/	IT038000039538	1		
5	IT038000029831	/	IT038000029831	1		
6	IT038000032457	/	IT038000032457	1		
7	IT039000003250	/	IT039000003250	1		
8	IT038000029830	/	IT038000029830	1		

NB: IL PRESENTE VERBALE A PARZIALE RETTIFICA DEL PRECEDENTE INVIATO

*Criticità del metodo e Misure messe
in atto a scopo preventivo*



? Facilità di
approvvigionamento di
reagenti e materiali



Predisposizioni di ordini aperti con i fornitori,
disponibilità di piccole scorte

*Criticità del metodo e Misure messe
in atto a scopo preventivo*



? Funzionamento dei reagenti, kit e materiali impiegati nell'analisi al fine di ottenere dei profili di chiara interpretazione:

corretto funzionamento dei controlli

- ✓ Automazione
- ✓ Inserimento di controlli di processo (C- e C+) ad ogni serie di campioni in esame
- ✓ Partecipazione a prove inter-laboratorio
- ✓ Ripetizione dell'analisi fino al superamento di ogni dubbio interpretativo

*Criticità del metodo e Misure messe
in atto a scopo preventivo*



? Formazione del personale
dall'analisi all'interpretazione e
refertazione del risultato



- ✓ Qualificazioni e
mantenimenti annuali del
personale formato
- ✓ Doppia lettura del risultato
- ✓ Doppio controllo dell'esito
inserito in Darwin



Grazie !!!!!