

LAMP:

un nuovo metodo per il rilevamento di
Legionella pneumophila in campioni ambientali

Jenny Kaeser

Lavoro di diploma

Formazione Tecnico in Analisi Biomediche

Scuola Superiore Medico Tecnica, Locarno

Lavoro svolto presso:

Centro Nazionale Svizzero di Referenza per la Legionella,

Istituto Cantonale di Microbiologia, Bellinzona

Responsabili:

Dr.ssa Simona Casati e Dr.ssa Valeria Gaia

INDICE

Abbreviazioni	pag. 4
Riassunto/Abstract	pag. 5
1. Introduzione	pag. 6
1.1 <i>Legionella</i>	pag. 6
1.2 Legionellosi	pag. 7
1.2.1 Cenni epidemiologici	pag. 8
1.3 Presentazione dei metodi scelti per lo screening	pag. 9
1.3.1 Coltura batterica	pag. 9
1.3.2 FISH	pag. 9
1.3.3 Ricerca dell'antigene	pag. 10
1.3.4 LAMP	pag. 10
1.4 Scopo	pag. 14
2. Materiali e metodi	pag. 15
2.1 Campioni	pag. 15
2.2 Coltura Batterica	pag. 16
2.2.1 Campioni	pag. 16
2.2.2 Materiale e reagenti	pag. 16
2.2.3 Procedura	pag. 17
2.2.4 Interpretazione dei risultati	pag. 18
2.3 FISH	pag. 19
2.3.1 Campioni	pag. 19
2.3.2 Materiale e reagenti	pag. 19
2.3.3 Procedura	pag. 20
2.3.4 Interpretazione dei risultati	pag. 22
2.4 Ricerca dell'antigene	pag. 22
2.4.1 Campioni	pag. 23
2.4.2 Materiale e reagenti	pag. 23
2.4.3 Procedura	pag. 23
2.4.4 Interpretazione dei risultati	pag. 24
2.5 LAMP	pag. 24

2.5.1 Estrazione	pag. 24
2.5.2 Mix di reazione	pag. 24
2.5.3 Purificazione	pag. 29
2.5.4 Gel	pag. 30
2.5.5 Sensibilità e specificità	pag. 32
3. Risultati	pag. 34
3.1 FISH	pag. 34
3.2 LAMP	pag. 35
3.2.1 Mix di reazione	pag. 35
3.2.2 Purificazione	pag. 37
3.2.3 Protocollo	pag. 37
3.2.4 Descrizione di alcune prove importanti	pag. 39
3.2.5 Confronto tra metodi LAMP e ELISA vs coltura	pag. 44
3.2.6 Risultati dei campioni dello screening LAMP vs Coltura	pag. 44
4. Discussione	pag. 48
4.1 FISH	pag. 48
4.2 LAMP	pag. 49
4.2.1 Mix di reazione	pag. 49
4.2.2 Protocollo	pag. 50
4.2.3 Descrizione di alcune prove importanti	pag. 50
4.2.4 Confronto tra metodi	pag. 51
4.2.5 Costo e tempo necessari per i metodi confrontati	pag. 52
4.2.6 Problematiche riscontrate	pag. 53
4.2.7 Applicazioni future	pag. 54
5. Conclusioni	pag. 55
6. Ringraziamenti	pag. 56
7. Bibliografia	pag. 57
8. Allegati	pag. 59
8.1 Allegato 1	pag. 59
8.2 Allegato 2	pag. 59
8.3 Allegato 3	pag. 60
8.4 Allegato 4	pag. 60
8.5 Allegato 5	pag. 61
8.6 Allegato 6	pag. 62

Abbreviazioni

ICM	Istituto Cantonale di Microbiologia
CNR	Centro Nazionale di Referenza per <i>Legionella</i>
UFSP	Ufficio Federale della Sanità Pubblica
Lpn	<i>Legionella pneumophila</i>
Lsp	<i>Legionella species</i>
DNA	Acido DesossiriboNucleico
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
PCR	Polymerase Chain Reaction
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FIP	Forward Inner Primer
BIP	Backward Inner Primer
FL	Forward Loop
BL	Backward Loop
GVPC	Glycine-Vancomycin-Polymixin B-Cycloheximide
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract
UFC	Unità Formanti Colonie
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
PAGE	Soluzione salina di PAGE
PBS	Phosphate Buffered Saline
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid monohydrate
HNB	Hydroxy Naphthol Blue
TBE	Tris-borate-EDTA Buffer

Riassunto

Le legionelle sono batteri ubiquitari che vivono nell'ambiente idrico (fiumi, laghi, acque termali) e nel suolo in associazione con dei protozoi (amebe e ciliati). Possono causare la malattia del legionario (o legionellosi), la cui manifestazione principale è un'infezione polmonare. L'infezione viene trasmessa per inalazione di aerosol contenenti delle legionelle o per microaspirazione di acqua contaminata. Per questo motivo è molto importante tenere sotto controllo i sistemi idrici che possono generare aerosol per evitare la trasmissione della *Legionella*. Attualmente il metodo di rilevamento di *L. pneumophila* nei campioni ambientali (water) è la coltura batterica (gold standard), presso l'ICM. Tuttavia questo metodo ha dei tempi molto lunghi ed il risultato si ottiene solo dopo 5 giorni.

Lo scopo di questo lavoro è quello di trovare un metodo rapido, affidabile e di costo limitato per lo screening di *Legionella* in un grande numero di campioni ambientali. Per questo motivo è stato messo a punto un nuovo metodo chiamato LAMP (loop mediated isothermal amplification) ed è stato confrontato con 3 metodi di detezione per valutare il migliore. I metodi messi a confronto sono: LAMP, la coltura batterica, l'ibridazione fluorescente in situ (FISH) e la ricerca dell'antigene della *Legionella* (ELISA). Si è riusciti a mettere a punto un protocollo funzionante e riproducibile per la LAMP. Con il confronto si è dimostrato che il metodo migliore rimane la coltura batterica in quanto ha una sensibilità migliore rispetto alla LAMP. Riuscendo ad aumentare la sensibilità e la specificità della LAMP, questo metodo potrebbe essere introdotto come metodo di rilevamento per la *L. pneumophila* nei campioni ambientali, per discriminare i risultati negativi.

Abstract

Legionella are ubiquitous bacteria found in most natural water sources (rivers, lakes, hot springs) and on land in association with protozoa (amoebae and ciliates). They can cause legionnaire's disease (or Legionellosis), whose main consequence is a lung infection. This disease can be acquired by inhalation of aerosols or by microaspiration water containing *Legionella*. Therefore it is very important to monitor water systems generating aerosols in order to prevent *Legionella* transmission. Currently the method of detection at Cantonal Institute of Microbiology of *L. pneumophila* in environmental samples (water) is bacteria culture (gold standard). However, it requires long time of work and the result can be obtained only after 5 days.

The aim of this work was to find a fast, reliable and low cost method for *Legionella* screening in a large number of environmental samples. For this purpose, a new method called loop mediated isothermal amplification (LAMP) was studied and improved and 3 methods of detection were compared in order to find the best. The methods compared are LAMP, bacteria culture, fluorescent in situ hybridization (FISH) and the detection of *Legionella* antigen (ELISA). A functional and reproducible protocol for the LAMP was successfully developed. The comparison of the different methods shows that the best method remains the bacterial culture it has better sensitivity than LAMP. If in the future the sensitivity and specificity of the LAMP can be increased, this method could be introduced as detection method of the *L. pneumophila* in environmental samples, to discriminate between negative results.