

Regione del Veneto - POR FESR 2014-2020

BANDO PER IL SOSTEGNO A PROGETTI DI RICERCA CHE PREVEDONO L'IMPIEGO DI RICERCATORI

ASSE 1 "RICERCA, SVILUPPO TECNOLOGICO E INNOVAZIONE"

Obiettivo specifico "Incremento dell'attività di innovazione delle imprese"

Azione 1.1.1 "Sostegno a progetti di ricerca alle imprese che prevedono l'impiego di ricercatori (dottori di ricerca e laureati magistrali con profili tecnico-scientifici) presso le imprese stesse"



- Prevalenza nella popolazione Europea tra 1-2%
- Persistenza a lungo nella vita
- Potenziale gravità della reazione avversa

Attualmente non esiste un'effettiva prevenzione o un trattamento approvato la sola strategia di prevenzione è evitare ciò che provoca la reazione

ALLERGIA ALLE ARACHIDI IgE mediata (AAR)

Studi effettuati su fratelli gemelli e famiglie hanno fornito prove convincenti che **fattori genetici** contribuiscono al manifestarsi dell' AAR, con un'ereditarietà stimata di ~80%

Si rende necessaria la presenza di un **test diagnostico** che sia in grado di determinare la predisposizione genetica all'AAR

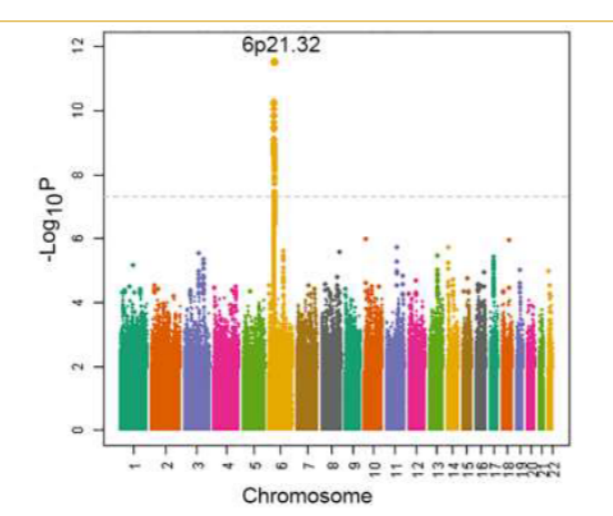
Progetto basato sullo studio della bibliografia (studi di GWA) che correla variazioni di un singolo nucleotide (SNP) in un gene come **HLA** (L242V) o **Filaggrina** (R501X e 2282del4) all'allergia alle arachidi.

STATO DELL'ARTE

HLA

Studio di Genome Wide Association per specifica associazione con AAR

40 SNP raggiungono la significatività all'interno del gene HLA di classe II nella regione del cromosoma 6p21.32



rs7192 (L242V) mostra una suggestiva associazione con AAR nella regione HLA-DRA

P=5,5x10⁻⁸
OR=1,7

Filaggrina

Analisi, in popolazioni Europee, di 71 pazienti con AAR comparate con i 1000 controlli non sensibilizzati alle arachidi

Genotypes and statistical tests	Patients (n)	Controls (n)
No <i>FLG</i> mutations detected (homozygous wild-type)	59	963
One wild-type and 1 <i>FLG</i> mutant allele (heterozygous)	10	37
Two <i>FLG</i> loss-of-function mutations (homozygous or compound heterozygous)	2	0
Total	71	1000
Proportion of individuals carrying <i>FLG</i> loss-of-function mutations (%)	16.9	3.7
Fisher exact test	P = 3,0 × 10 ⁻⁶	
OR (95% CI)	5.3 (2.8-10.2)	

SNP:
R501X (rs61816761) e 2282del4 (rs558269137)

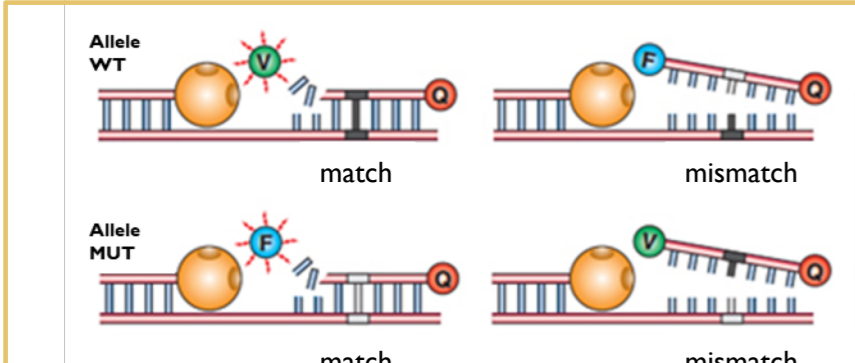
I più comuni nella popolazione caucasica

- Varianti loss-of-function (R501X e 2282del4) nel gene della filaggrina sono fortemente e significativamente associate all'allergia alle arachidi
- Le mutazioni della filaggrina sono un nuovo fattore di rischio per l'allergia alle arachidi IgE mediata, indicando un ruolo della disfunzione della barriera epiteliale nella patogenesi della malattia

TECNICA UTILIZZATA PER L'ANALISI DEI POLIMORFISMI:

DISCRIMINAZIONE ALLELICA IN REAL TIME

- Rileva variazioni di un singolo nucleotide (SNP) in una sequenza
- 1 coppia di primers e 2 probe per reazione permettono la genotipizzazione dello SNP



La discriminazione allelica misura il cambio di fluorescenza del fluoroforo associato alla sonda. Un detector fluorescente (FAM o VIC) si accoppia perfettamente all'allele Wildtype (WT) e l'altro detector (FAM o VIC) si accoppia perfettamente all'allele mutato (MUT).

Un sostanziale incremento	Indica:
Solo nella fluorescenza FAM o VIC	Omozigosi per l'allele WT o MUT
In entrambi i segnali di fluorescenza	Eterozigosi per l'allele WT e per l'allele MUT

COMPOSIZIONE KIT:

MIX 1: Peanut Hypersensitivity Predisposition Detection MIX1

- contenente:
- Detection MIX WT 1
 - Detection MIX MUT 1 e reagenti per amplificare rs7192 (L242V)

MIX 2: Peanut Hypersensitivity Predisposition Detection MIX2

- contenente:
- Detection MIX WT 2
 - Detection MIX MUT 2 e reagenti per amplificare rs61816761 (R501X)

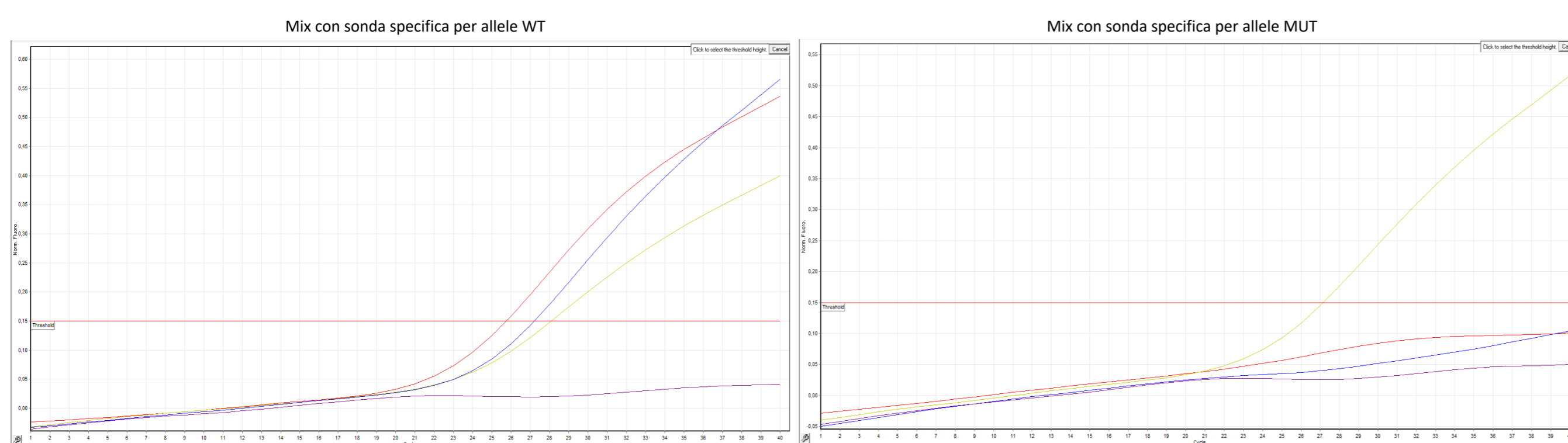
MIX 3: Peanut Hypersensitivity Predisposition Detection MIX3

- contenente:
- Detection MIX WT 3
 - Detection MIX MUT 3 e reagenti per amplificare rs558269137 (2282del4)

Stesso ciclo e quindi contemporanea amplificazione dello stesso campione in Real Time PCR

RISULTATI:

RISULTATO AMPLIFICAZIONE MIX: Peanut Hypersensitivity Predisposition Detection MIX1



RISULTATO MIX WT

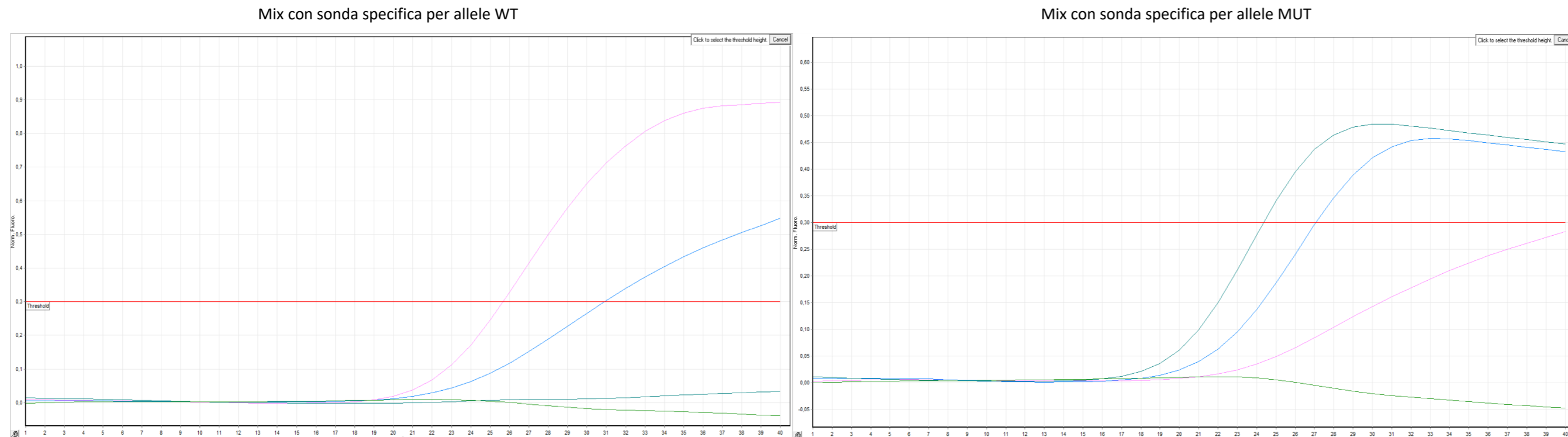
No.	Color	MIX Name	Type	Ct
1	Red	MIX Pean.HyperDETMIX1	campione A	25,76
2	Green	MIX Pean.HyperDETMIX1	campione Hbs777	28,09
3	Blue	MIX Pean.HyperDETMIX1	campione EM	27,23
4	Black	MIX Pean.HyperDETMIX1	Bianco di reazione	

RISULTATO MIX MUT

No.	Color	MIX Name	Type	Ct
1	Red	MIX Pean.HyperDETMIX1	campione A	
2	Green	MIX Pean.HyperDETMIX1	campione Hbs777	27,17
3	Blue	MIX Pean.HyperDETMIX1	campione EM	
4	Black	MIX Pean.HyperDETMIX1	Bianco di reazione	

- ANALISI DEI RISULTATI:**
- Campione 1 omozigote per allele WT
 - Campione 2 eterozigote
 - Campione 3 eterozigote per allele WT

RISULTATO AMPLIFICAZIONE MIX: Peanut Hypersensitivity Predisposition Detection MIX2



RISULTATO MIX WT

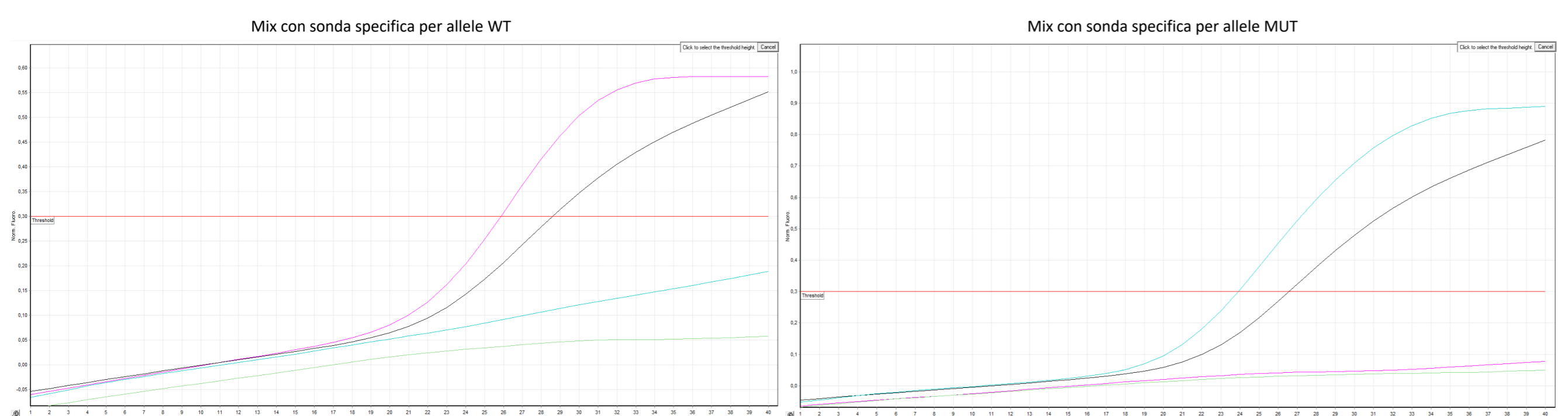
No.	Color	MIX Name	Type	Ct
5	Red	MIX Pean.HyperDETMIX2	campione A	25,87
6	Green	MIX Pean.HyperDETMIX2	campione HZ	30,91
7	Blue	MIX Pean.HyperDETMIX2	campione B	
9	Black	MIX Pean.HyperDETMIX2	Bianco di reazione	

RISULTATO MIX MUT

No.	Color	MIX Name	Type	Ct
5	Red	MIX Pean.HyperDETMIX2	campione A	
6	Green	MIX Pean.HyperDETMIX2	campione HZ	27,08
7	Blue	MIX Pean.HyperDETMIX2	campione B	24,35
9	Black	MIX Pean.HyperDETMIX2	Bianco di reazione	

- ANALISI DEI RISULTATI:**
- Campione 5 omozigote per allele WT
 - Campione 6 eterozigote
 - Campione 7 omozigote per allele MUT

RISULTATO AMPLIFICAZIONE MIX: Peanut Hypersensitivity Predisposition Detection MIX3



RISULTATO MIX WT

No.	Color	MIX Name	Type	Ct
10	Red	MIX Pean.HyperDETMIX3	campione A	25,87
11	Green	MIX Pean.HyperDETMIX3	campione HZ	28,59
12	Blue	MIX Pean.HyperDETMIX3	campione C	
14	Black	MIX Pean.HyperDETMIX3	Bianco di reazione	

RISULTATO MIX MUT

No.	Color	MIX Name	Type	Ct
10	Red	MIX Pean.HyperDETMIX3	campione A	
11	Green	MIX Pean.HyperDETMIX3	campione HZ	26,57
12	Blue	MIX Pean.HyperDETMIX3	campione C	23,91
14	Black	MIX Pean.HyperDETMIX3	Bianco di reazione	

- ANALISI DEI RISULTATI:**
- Campione 10 omozigote per allele WT
 - Campione 11 eterozigote
 - Campione 12 omozigote per allele MUT

CONCLUSIONI:

Il kit messo a punto permette di discriminare la presenza SNP, presenti all'interno del gene della filaggrina e di HLA, che sono stati associati alla predisposizione genetica dell'allergia alle arachidi. Il protocollo consente di analizzare un singolo campione con 3 diverse mix nella stessa analisi, rendendo la seduta di analisi di facile e veloce utilizzo. Inoltre l'uso della tecnica della Real-Time PCR, accoppiata al programma informatico che rilascia automaticamente il risultato della seduta, permetterebbe una rapida e precisa analisi dei polimorfismi garantendo un'alta sensibilità e specificità. Queste caratteristiche rendono questo kit interessante per diversi tipi di laboratori d'analisi e diagnostici italiani ed esteri. Al termine di questo progetto si è ottenuto un kit diagnostico in grado di valutare la predisposizione genetica all'allergia alle arachidi permettendo così di avere una diagnosi preventiva e di individuare all'interno di un gruppo familiare le persone predisposte al fine di intraprendere le più idonee misure preventive.