

LA PCR NELLA DIAGNOSTICA DELLE MALATTIE INFETTIVE

genetic solutions

Genefast
genetic solutions

Soluzioni biotecnologiche e genetiche applicate alla diagnostica molecolare veterinaria e all'industria alimentare.

Data: Gennaio 2006

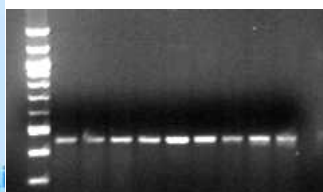
Anno 1, Numero 1

COS'E' LA PCR

La PCR o reazione a catena della polimerasi è una tecnica che consente di amplificare esponenzialmente gli acidi nucleici in modo tale da consentirne l'individuazione. Nella diagnostica delle malattie infettive la PCR permette di individuare con estrema specificità e sensibilità gli acidi nucleici (DNA o RNA) di un microrganismo sia che esso sia un virus, un batterio, un fungo, un parassita o un protozoo. Il vantaggio sostanziale della PCR è di rilevare i microrganismi patogeni con una sensibilità di migliaia di volte superiore ad altre tecniche. Il primo passo è l'estrazione degli acidi nucleici dalla matrice disponibile. Gli

acidi nucleici possono essere estratti da pressoché qualsiasi matrice biologica: sangue, plasma, tessuti, feci, urine, liquido cerebrospinale. Nella metodica PCR tradizionale si utilizzano due sonde oligonucleotidiche specifiche per la sequenza genetica del microrganismo di interesse. La provetta contenente l'acido nucleico è inserita all'interno di uno strumento detto termociclatore che sottopone gli acidi nucleici a circa 40 cicli di aumenti e diminuzioni controllati della temperatura. Ad ogni ciclo le sonde individuano la sequenza target, se presente, e vi si legano in modo univoco, consentendo la replicazione del

materiale nucleico. Al termine dei 40 cicli una singola copia di acido nucleico è amplificata 10^{12} volte. L'amplificato è, infine, visualizzato dopo elettroforesi e colorazione con una sostanza fluorescente.



Campioni positivi per Toxoplasma. La banda bianca rappresenta milioni di copie del DNA del parassita ottenuto mediante amplificazione PCR del DNA estratto da pochi tachizoiti di Toxoplasma presenti nel sangue di un gatto.

Genefast
Via della Pace 33/a
41050 Castelnuovo Rangone
Modena
Tel.: +39 59 536710
Fax: +39 59 536710
www.genefast.com
E-mail: info@genefast.com

VANTAGGI E SVANTAGGI DELLA PCR

- VANTAGGI**
- consente di fare diagnosi certa perché individua il DNA o RNA del patogeno
 - sensibilità elevata
 - specificità elevata
 - tempi di risposta rapidi
 - monitoraggio del carico infettante
 - individuazione di diversi patogeni contemporaneamente
- SVANTAGGI**
- tecnica complessa
 - competenze specialistiche
 - costi elevati della strumentazione
 - la presenza di DNA/RNA non implica la vitalità del microorganismo
 - rispetto alla sierologia non consente di rilevare un contatto pregresso

LE TECNICHE PCR

Non tutte le PCR sono uguali. Per evidenziare virus a RNA come il virus del cimurro, l'RNA virale deve prima essere retrotrascritto in DNA e poi amplificato (cd. Reverse Transcriptase PCR o RT-PCR). Per incrementare ulteriormente sensibilità e specificità è possibile utilizzare una PCR in due fasi. La prima fase amplifica per 40 cicli un primo frammento il quale viene nuovamente sottoposto ad amplificazione con una seconda coppia di sonde oligonucleotidiche che riconoscono sequenze genetiche interne al primo amplificato. Il secondo

amplificato è poi visualizzato su gel. Questa tecnica si chiama Nested PCR e garantisce le massime sensibilità e specificità. In alcuni casi, l'amplificazione può essere monitorata in tempo reale durante il processo di amplificazione, utilizzando speciali termociclatori (Real time PCR). In quest'ultimo caso è anche possibile misurare la quantità di TARGET presente nel campione di origine. Real Time PCR

