



Corso integrato di microbiologia  
ATTIVITA' PROFESSIONALIZZANTI  
Docente M.R.Iovene  
Indirizzo mail : [mariarosaria.iovene@unina2.it](mailto:mariarosaria.iovene@unina2.it)

Le indagini microbiologiche rappresentano gli strumenti più appropriati non solo per verificare l'eventuale intervento eziologico di un agente infettante nell'affezione clinicamente accertata ma anche in caso positivo, evidenziarne la natura (batterica, virale, fungina, protozoaria) e l'identità.

# La diagnosi di laboratorio può essere :

- **Diretta** : dimostrazione nel materiale patologico dell'agente patogeno (o di suoi costituenti, antigeni e acidi nucleici, o di suoi prodotti metabolici e tossici);
- **Indiretta** : dimostrazione nel paziente di un movimento immunitario nei riguardi dell'agente infettante.

# TEST DIAGNOSTICI

DIRETTI

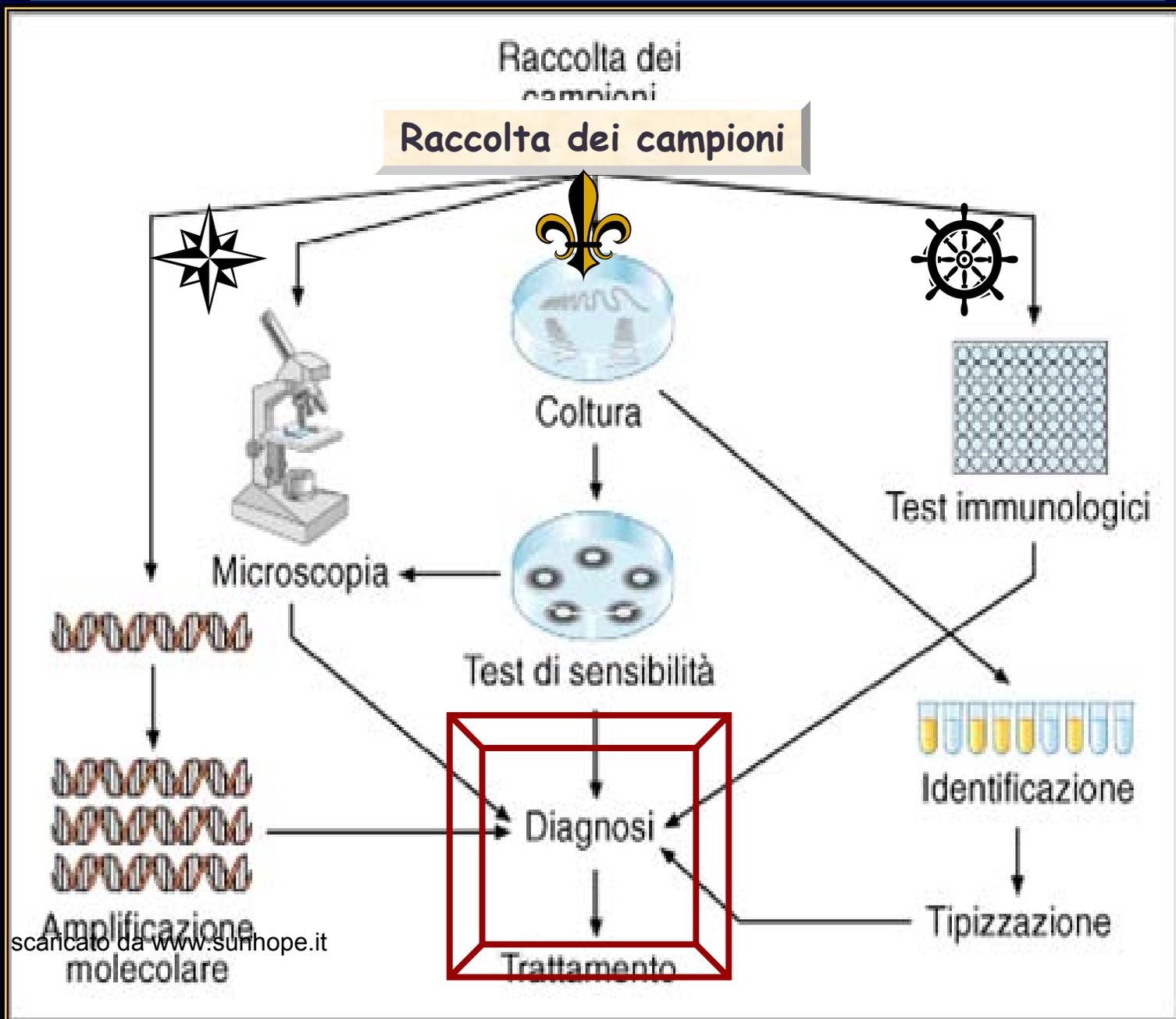
Microscopia ottica  
Microscopia a fluorescenza  
Microscopia elettronica

Indagini colturali  
Saggi molecolari  
Ricerca Ag microbici

INDIRETTI

Ricerca anticorpale

# ORGANIGRAMMA DELLA DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA



# Test diagnostici diretti

Nonostante il tempo necessario per la crescita del microrganismo e la complessità delle metodiche, l'isolamento dell'agente eziologico mediante coltura in terreni artificiali, rappresenta la procedura diagnostica più attendibile

**Sono di fondamentale importanza:**

- le modalità ed i tempi della raccolta del campione,
- l'utilizzazione di adeguati terreni di trasporto e di coltura.

Ricordare che una tecnica di prelievo inadeguata può determinare l'inquinamento del campione e che l'antibioticoterapia in atto o recente può determinare la negatività della coltura o ritardare la crescita del microrganismo.

Isolato l'agente eziologico in coltura pura, viene identificato per permettere la classificazione in genere e specie

L'identificazione dei germi isolati dai campioni biologici, riveste importanza clinica ed epidemiologica ed è una tappa fondamentale per allestire i test di sensibilità agli antibiotici

# MODALITA' DI PRELIEVO

- Il campione per le indagini microbiologiche dirette deve provenire dalla sede di infezione;
- E' importante stabilire i periodi ottimali per la raccolta dei campioni;
- Va prelevata una quantità di campione sufficiente per l'esame;
- Vanno impiegati dispositivi di raccolta e contenitori per campioni, idonei e sterili.
- Il campione per le indagini microbiologiche indirette, di solito siero viene ottenuto da un campione di sangue venoso

# TRASPORTO DEL CAMPIONE

L'obiettivo primario nel trasporto dei campioni diagnostici è il mantenimento del campione in condizioni il più possibile simili alle originali riducendo al minimo il deterioramento.

E' necessario evitare condizioni ambientali sfavorevoli come l'esposizione a caldo o freddo eccessivi, i rapidi cambiamenti di pressione o l'eccessivo essiccamento.

I campioni devono essere inviati al laboratorio di microbiologia il più presto possibile.

Le **METODICHE** per il **TRATTAMENTO** del campione dipendono dalla natura del materiale da processare:

- ❖ I campioni per la coltura devono essere seminate al più presto e incubate (in genere) ad una Temperatura di 35-37°C per 18-24 ore.
- ❖ I campioni per la NAT e/o le colture cellulari dei virus devono essere immediatamente congelati in azoto liquido e tenute a -70°C fino al momento dell'esame.
- ❖ I campioni di siero per la ricerca degli anticorpi vengono di solito conservati a -20°C fino al momento dell'esame.



# L'ESAME AL MICROSCOPIO

Di importanza fondamentale e l'osservazione al microscopio del campione prelevato dopo colorazione di Gram (la colorazione più utilizzata in lab. di micr.).

## Vantaggi

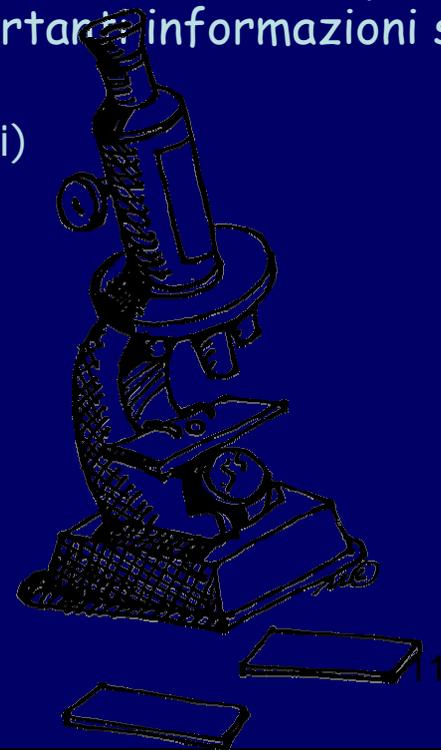
L'esame microscopico è fondamentale in quanto, pur essendo same rapido e semplice, consente di indirizzare la diagnosi fornendo importanti informazioni su:

- il tipo di microrganismo coinvolto (batteri, parassiti, funghi)
- la morfologia (cocchi, bacilli ecc)
- la reattività alla colorazione.
- la presenza di spore o inclusi
- l'eventuale presenza nella sede del prelievo di linfociti e granulociti, indice di risposta infiammatoria all'infezione.

## I limiti sono costituiti da:

- scarsa specificità morfologica
- impossibilità di utilizzarlo per i virus
- limitata sensibilità (50-70%)

scaricato da [www.sunhepo.it](http://www.sunhepo.it)



# coltura batterica

Tecnica di laboratorio per moltiplicare batteri e altri microrganismi patogeni a scopo diagnostico o sperimentale; l'espressione indica anche l'insieme dei microrganismi che si sono moltiplicati in adatti terreni nutritivi.

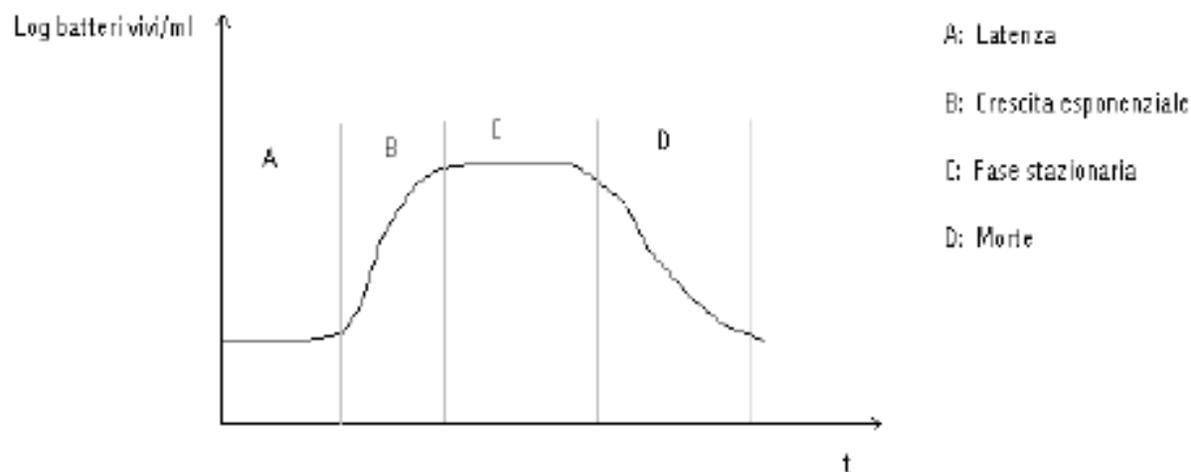
*I terreni di coltura*

## *I terreni di coltura*

I terreni di coltura, che possono essere **liquidi o solidi**, tendono a riprodurre l'ambiente naturale in cui i batteri crescono. Il terreno liquido più utilizzato è il brodo di coltura, preparato con infuso di carne bollita, con l'aggiunta dello 0,3% di cloruro di sodio; in esso i batteri crescono producendo intorbidimento cui può seguire deposizione di masse batteriche sul fondo del recipiente

## TERRENI LIQUIDI

Vengono utilizzati se nel materiale in esame è presente solo un tipo di batterio. Il vantaggio è dato dal fatto che è possibile esaminare una grande qtà di materiale, lo svantaggio è dato dalla necessità di materiali



La curva di crescita dei batteri si divide in quattro fasi :

# Le 4 fasi dello sviluppo

- a. latenza** : i batteri sintetizzano gli enzimi necessari per la duplicazione
- b. crescita esponenziale** : i batteri si moltiplicano fino a quando nell'ambiente è presente cibo a sufficienza
- c. fase stazionaria** : l'accumulo di sostanze nocive che provoca la morte dei batteri è in equilibrio con la qtà di cibo necessaria alla sopravvivenza
- d. declino** : le sostanze nutrienti vengono consumate interamente.

# Coltivazione dei Batteri

Lo sviluppo della Batteriologia ebbe inizio solo quando fu trovata la possibilità di coltivare i batteri in vitro nei terreni di coltura, costituiti da sostanze più o meno complesse capaci di mantenere la vitalità e di permettere la riproduzione dei batteri fuori del loro ambiente naturale di vita, ma fondamentale quando i Microbiologi riuscirono a trovare il modo di isolare le varie specie microbiche in **coltura pura**.

Questo avvenne quando fu possibile preparare terreni di coltura solidi su cui poter seminare i vari campioni biologici da esaminare.

## *Terreni liquidi e Terreni solidi*

A loro volta suddivisibili in :

- Terreni arricchiti
- Terreni di arricchimento
- Terreni selettivi
- Terreni per anaerobi
- Terreni di identificazione



- Terreni arricchiti

- Sono costituiti da brodo o da agar a cui sono state aggiunte una o più sostanze nutritive e/o anche fattori di crescita

- Terreni di arricchimento

- Contengono sostanze che facilitano la crescita delle specie ricercate.

- Terreni selettivi

- Contengono sostanze che, mentre non ostacolano lo sviluppo della specie ricercata, impediscono quello delle altre contenute nel materiale in esame.

- Terreni di identificazione

- In questi terreni sono contenuti rivelatori di attività biochimiche caratteristiche di ciascuna specie batterica.

- Terreni per anaerobi

- Contengono sostanze con attività riducente

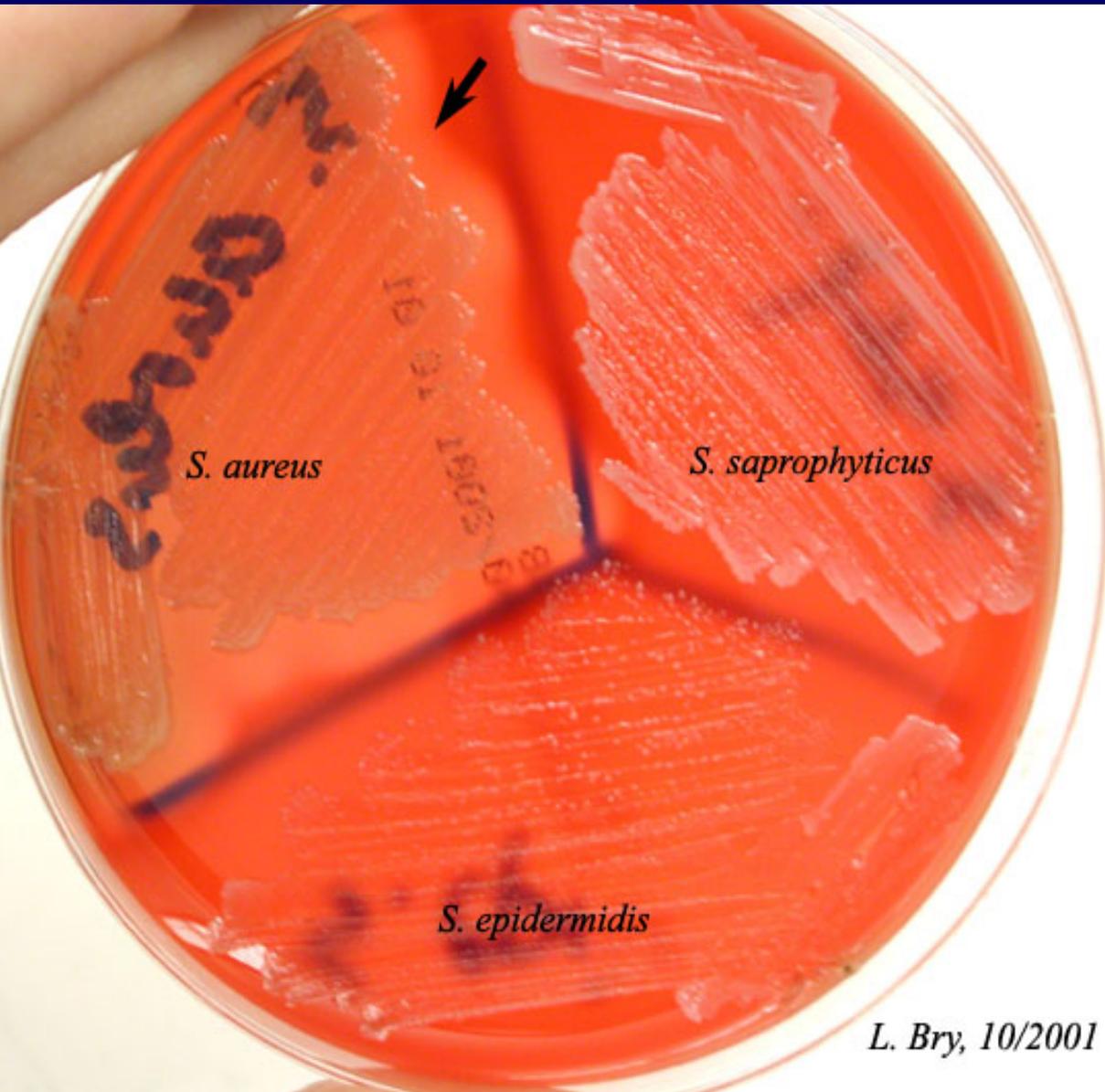
- Terreni disidratati

- I più utilizzati oggi nella preparazione dei terreni in Laboratorio

# Esame colturale:

## semina in agar sangue

(colonie circondate da un alone di emolisi)





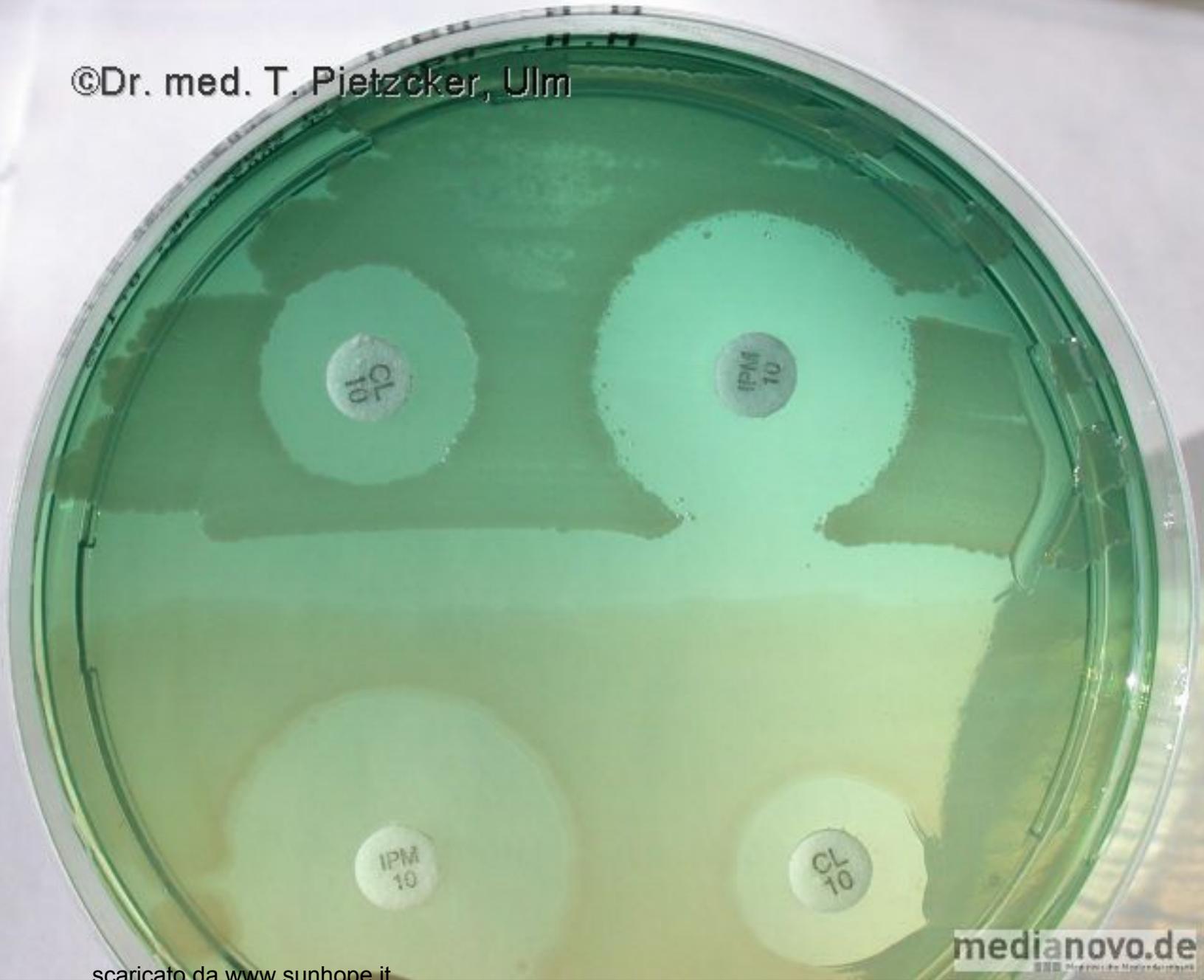
Salmonella



**Salmonella on Hektoen Enteric Agar**

*Ellen Foxman, 4/2004*

©Dr. med. T. Pietzcker, Ulm

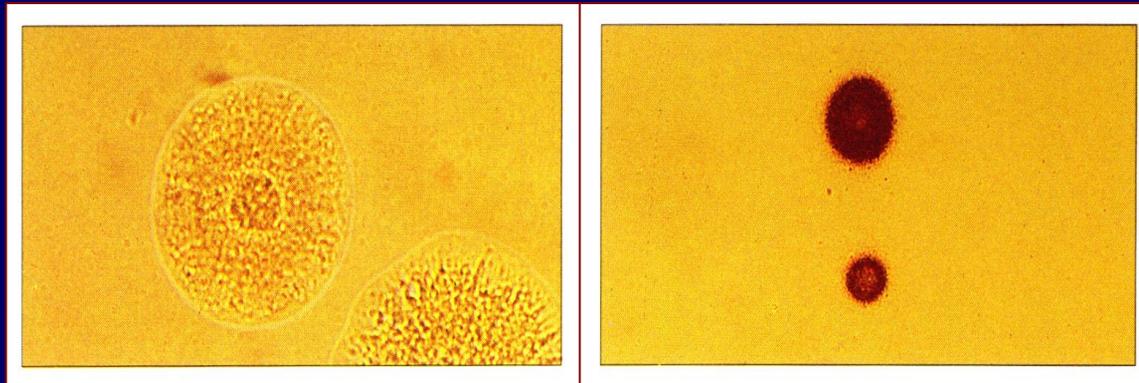






# Micoplasmi

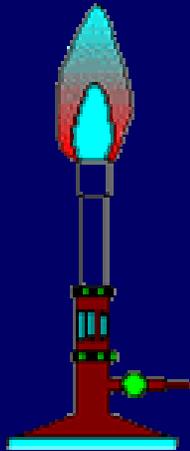
I **Micoplasmi** sono microrganismi di piccole dimensioni (  $0.2 - 0.3 \mu$  ) caratterizzati dalla **mancanza di parete cellulare rigida** che li rende **sensibili all'essiccazione**.



*Mycoplasma hominis*  
Tipiche colonie a uovo fritto  
(100-300  $\mu m$ )

*Ureaplasma urealyticum*  
Colonie a forma di riccio e di  
colore marrone (10-50  $\mu m$ )

# Sterilità e lavoro al bunsen



fiamma riducente

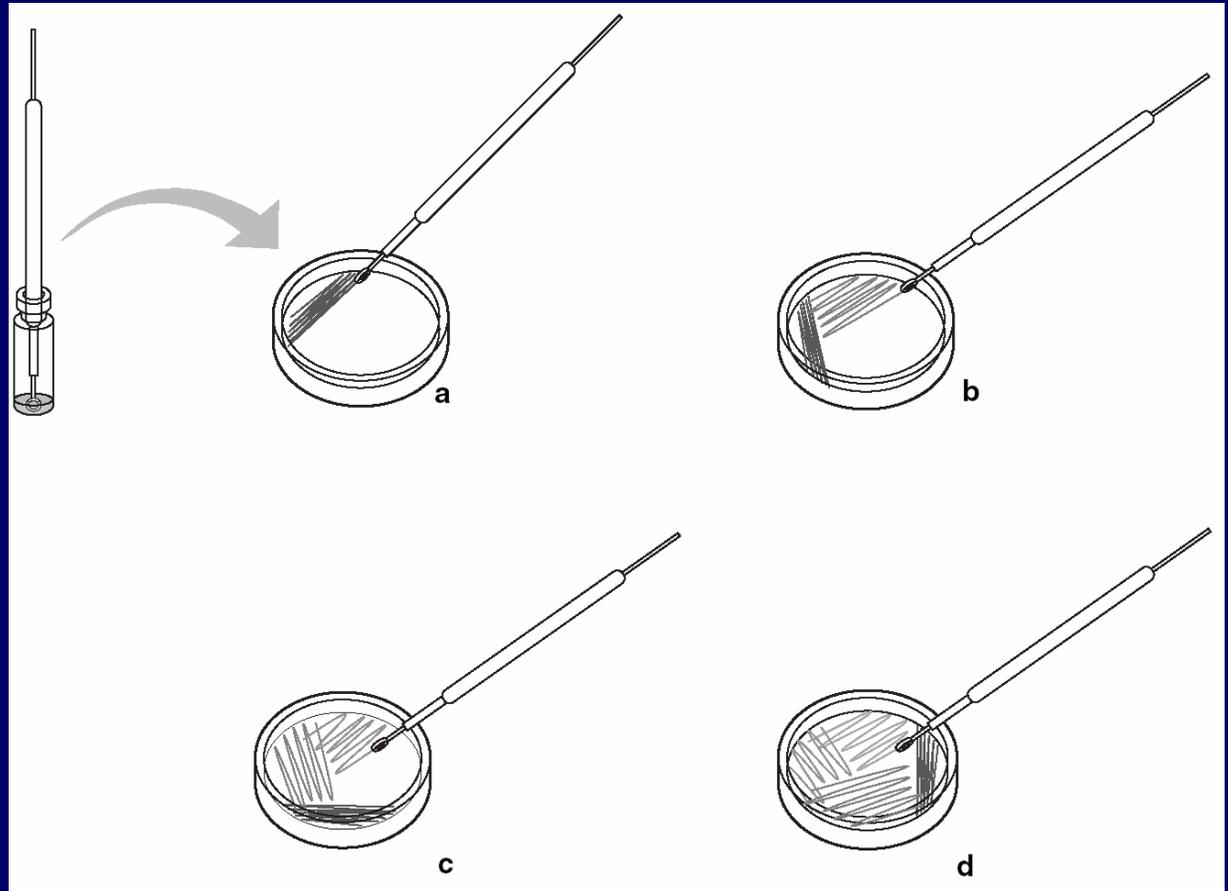
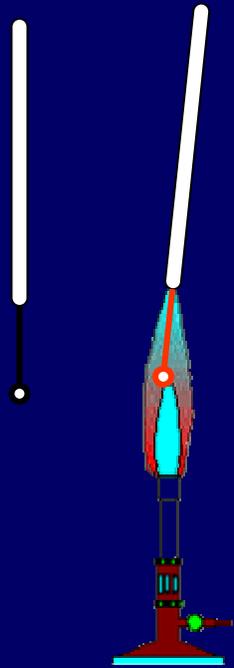


fiamma ossidante

## Uso dei micropipettatori e pipettatori

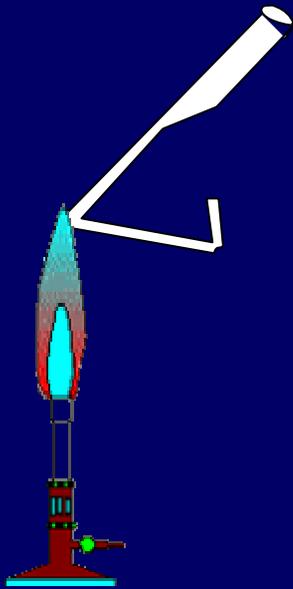
# Semina su terreni solidi $\Rightarrow$ ottenimento di colonie singole

## 1) Semina con l'ansa

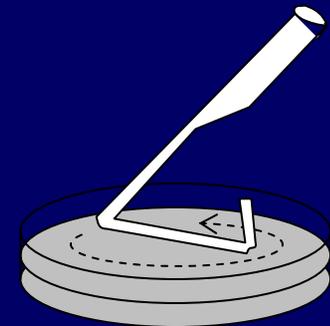
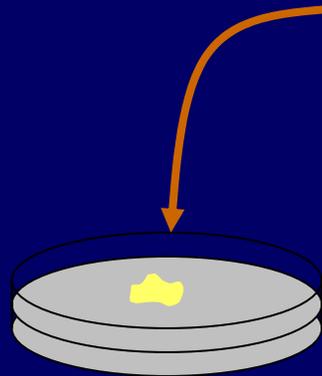


Semina su terreni solidi  $\Rightarrow$  ottenimento di colonie singole

## 2) Semina con la spatola



piccolo volume di coltura liquida

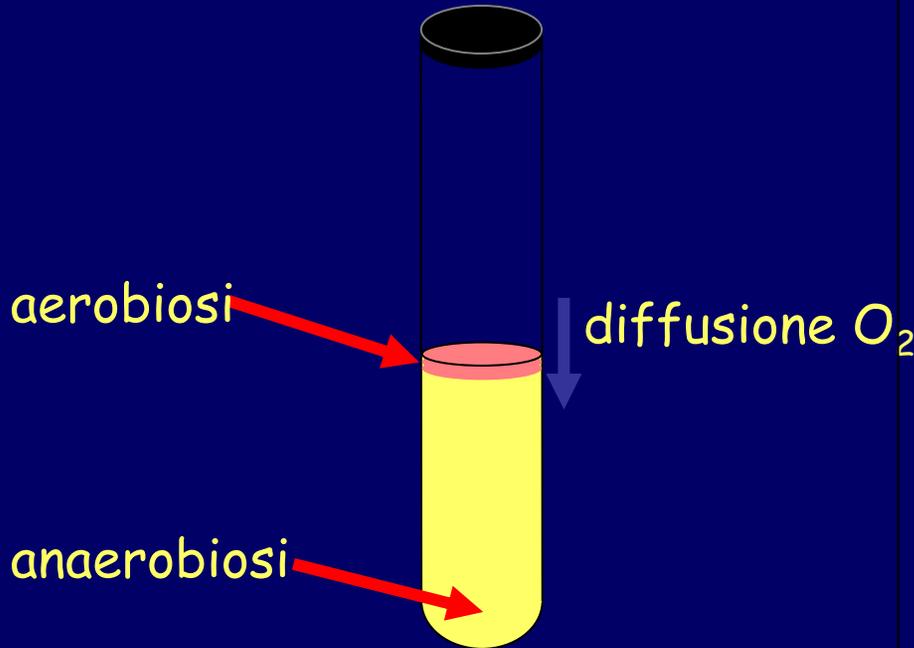


TG

terreno semi-solido

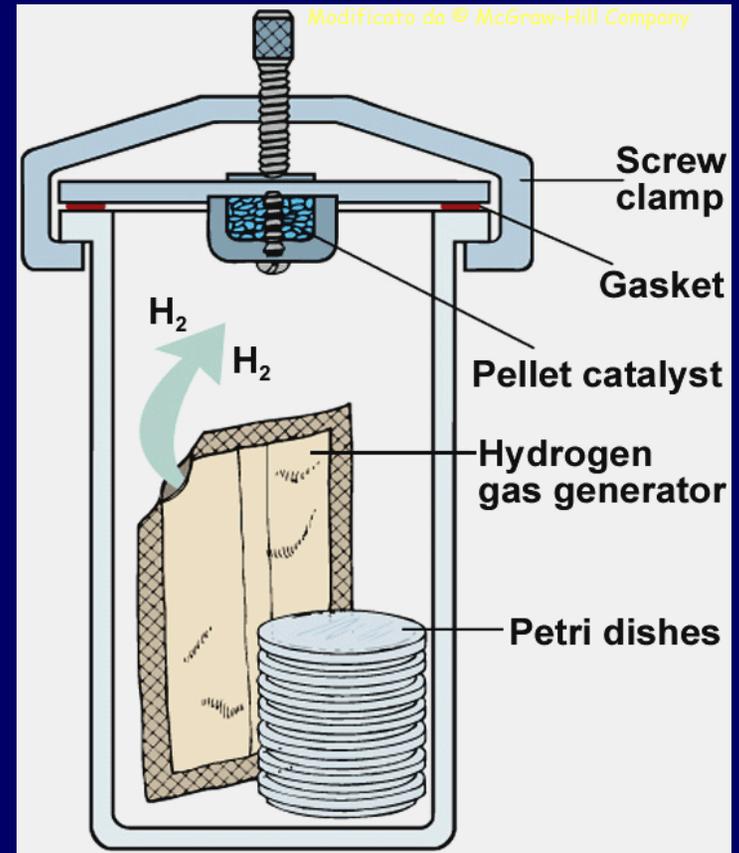
+ tioglicolato (riduce  $O_2$  a  $H_2O$ )

+ indicatore redox (resazurina)



scaricato da [www.sunhope.it](http://www.sunhope.it)

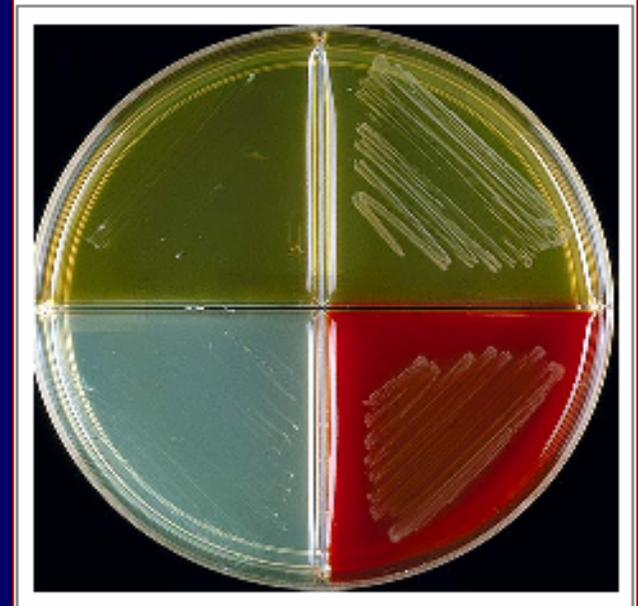
## Anaerobe jar



in presenza di un catalizzatore  
(palladio)



# SEMINA DEI CAMPIONI SU Terreni Selettivi Artificiali per isolare gli agenti patogeni



Piastra con terreni selettivi  
Per la crescita dei germi

SEMINA



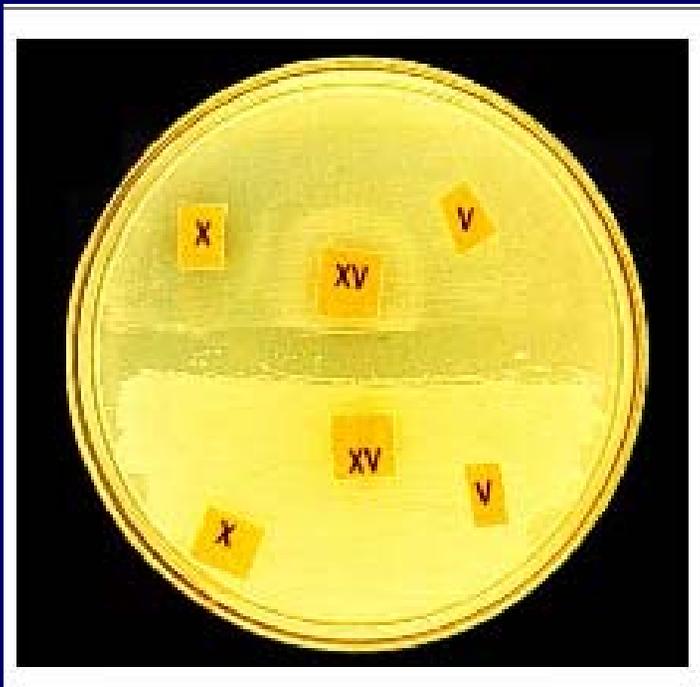
CRESCITA



*S.pneumoniae*



*H.influenzae*



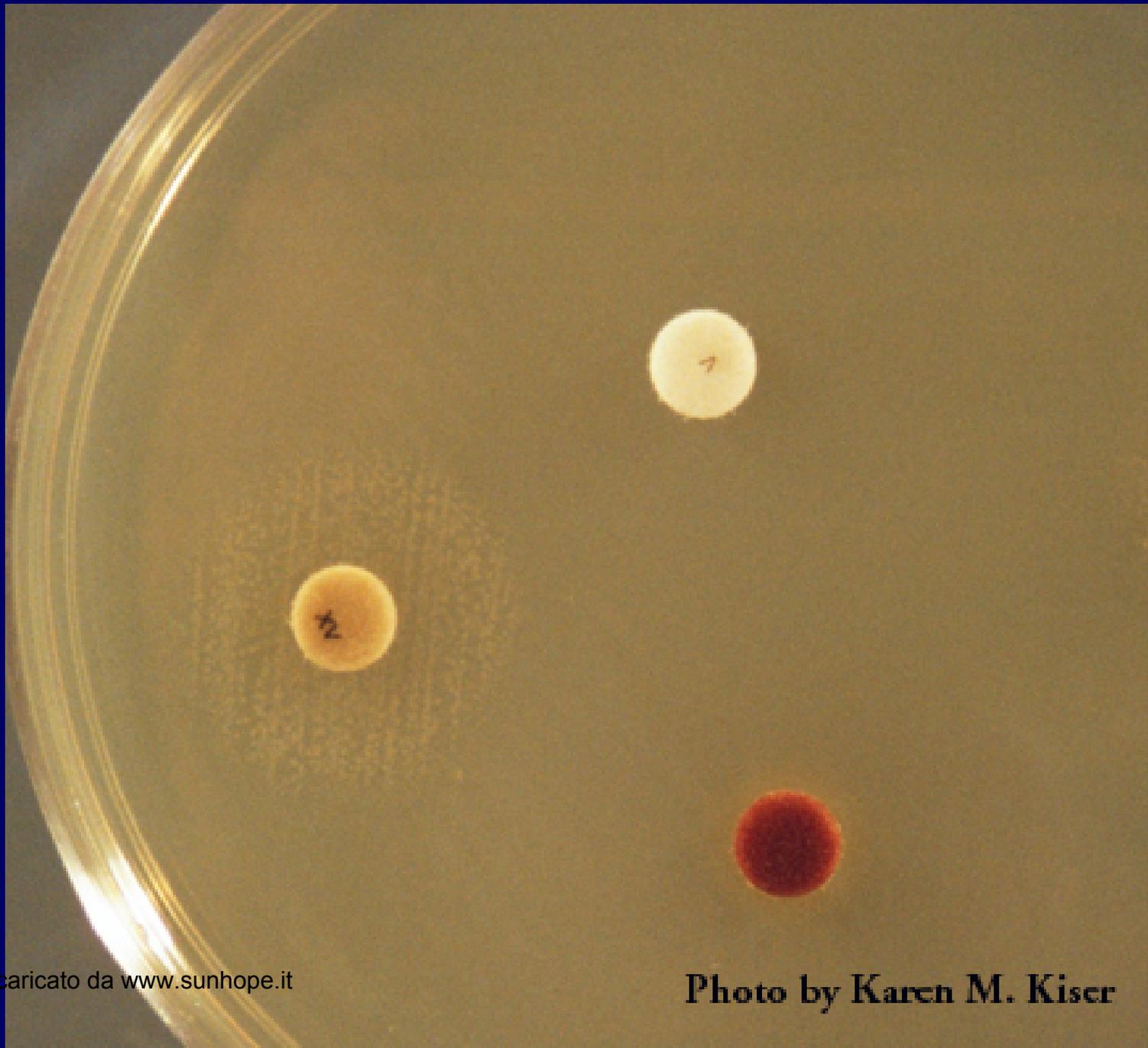
Test per *H. influenzae*

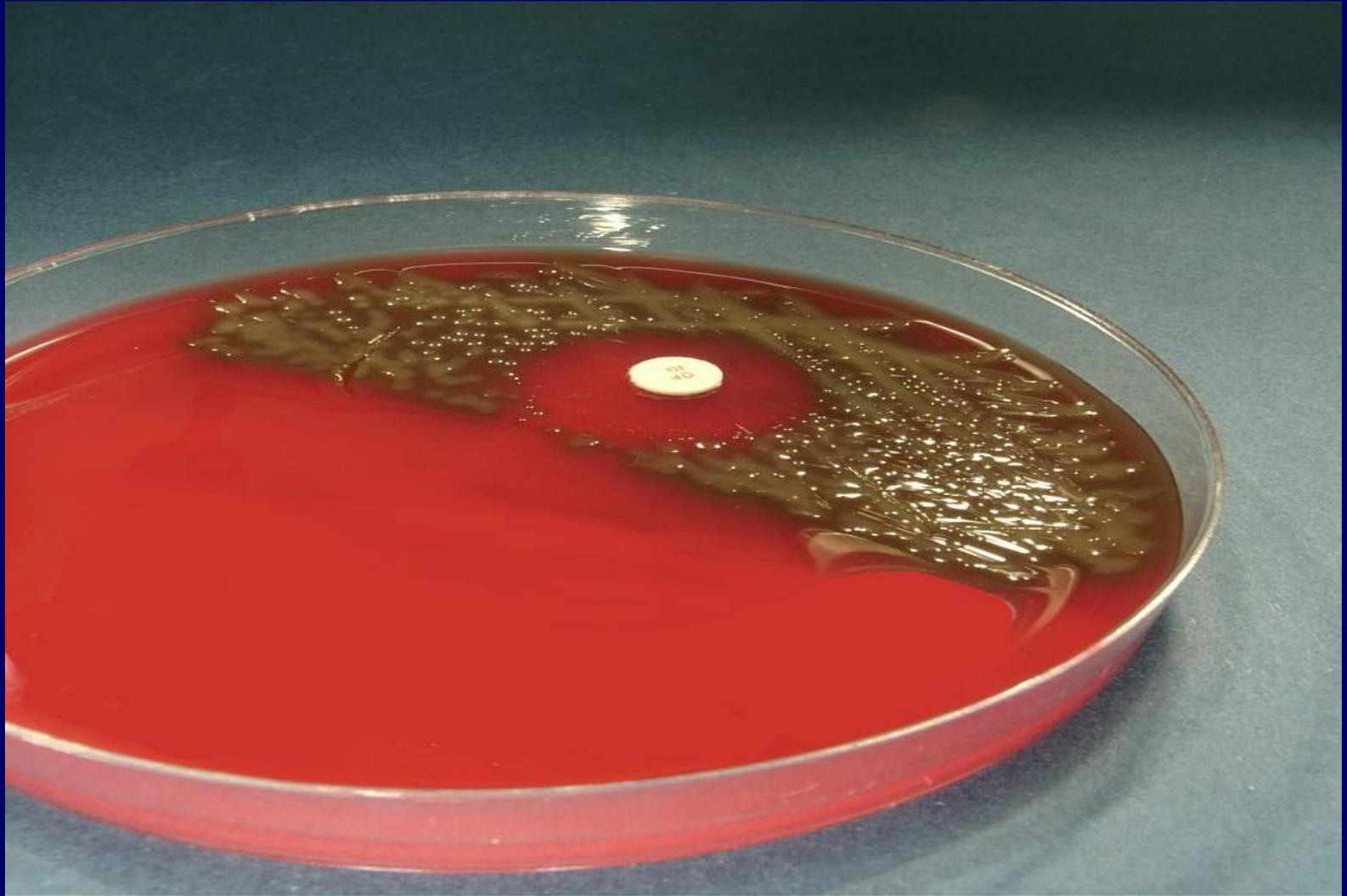


Test per *S. pneumoniae*



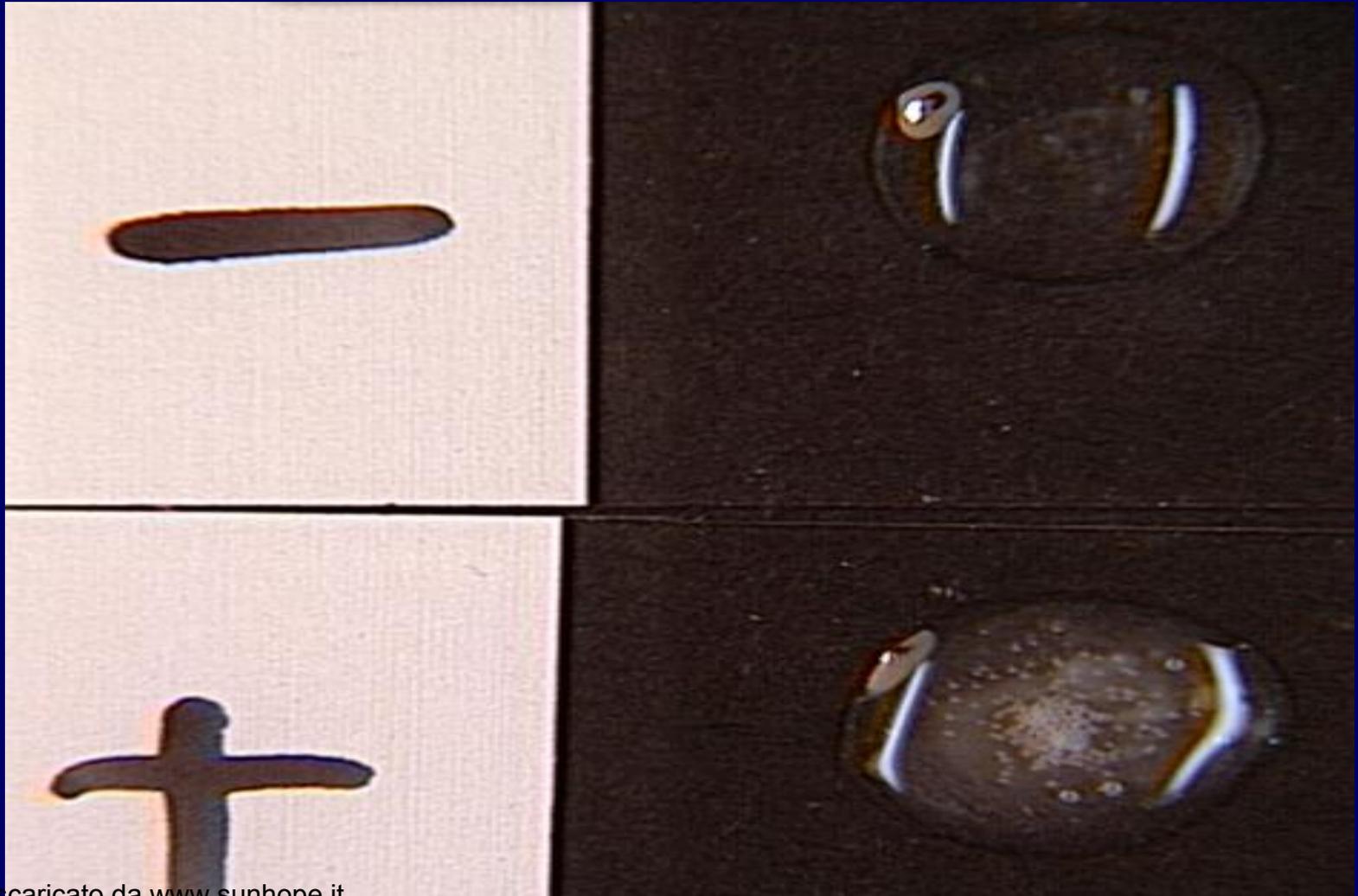
Test all'ossidasi

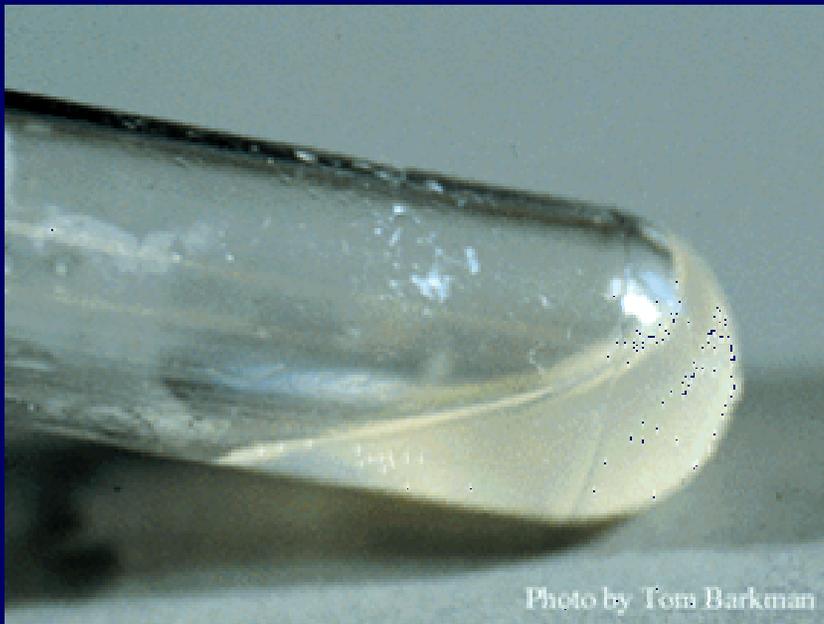




• Pneumococco + test optochina

# Test alla catalasi





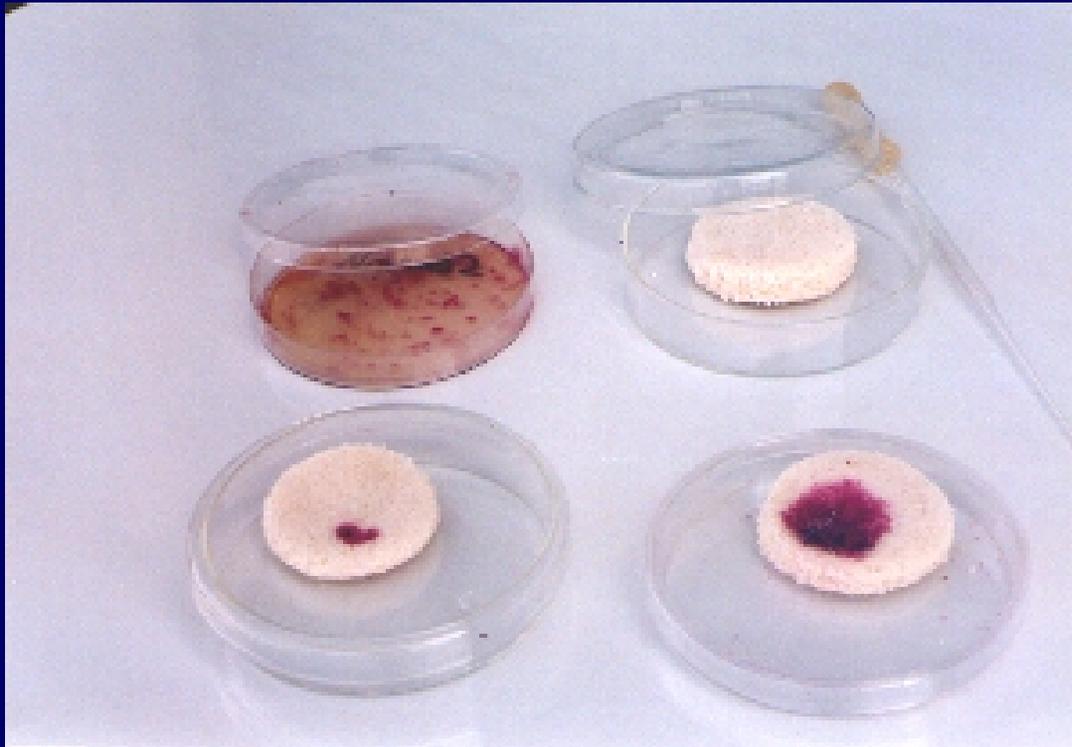
Test coagulasi negativo



Test coagulasi positivo

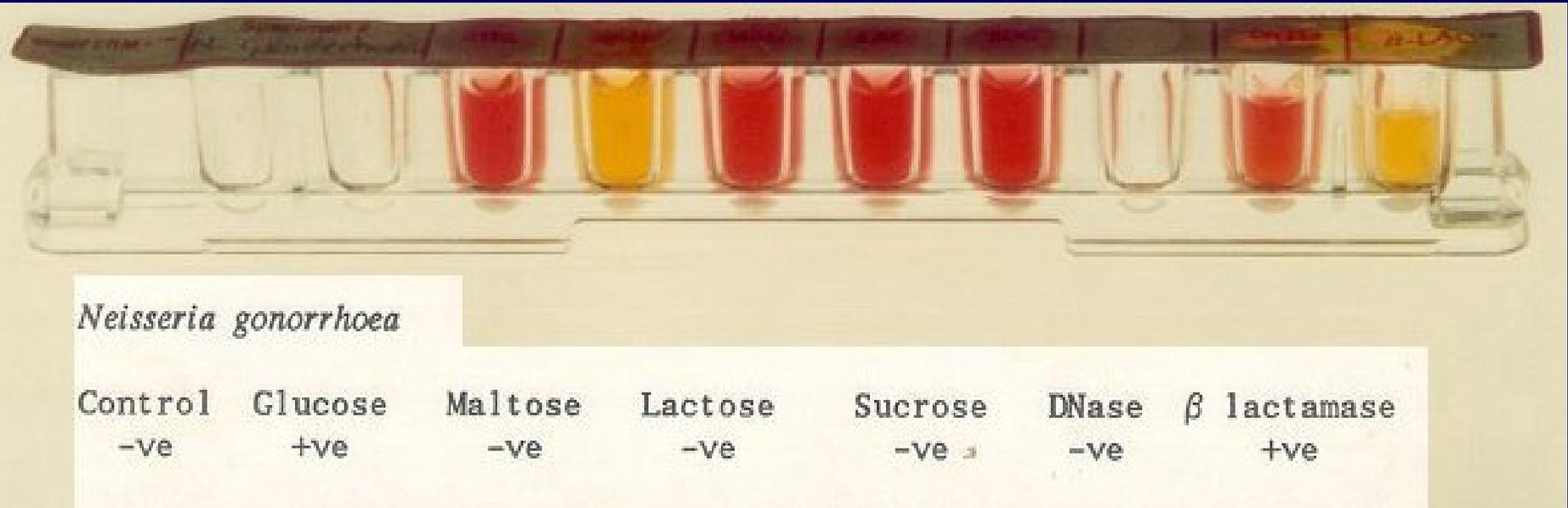


- Test alla bile - esculina



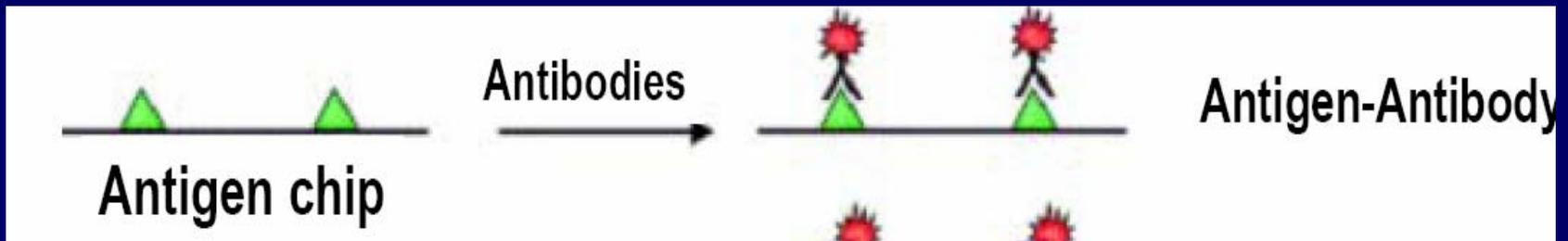
Test ossidasi

# *Neisseria gonorrhoeae* 'sugar' tests



- The bacterium *Neisseria gonorrhoeae* must be differentiated from commensal members of the family Neisseriaceae. This can be done by testing reactions against a range of substrates. Genitourinary infections: gonorrhoea

## Principio di immunofluorescenza diretta



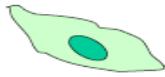
**ELISA diretto:** la cellula batterica (antigene) viene fatta adsorbire direttamente sulla superficie dei pozzetti oppure più comunemente, si procede prima alla sensibilizzazione dei pozzetti con anticorpi batterio specifici, incubandoli per alcune ore (2-6 h) a 37° C (DAS-ELISA: "double antibody sandwich ELISA").

In quest'ultimo caso, si asporta poi l'eccesso di anticorpo con appositi tamponi e si aggiunge il campione da testare, incubando in genere per una notte.

Se sono presenti antigeni omologhi, questi si legheranno ai pozzetti sensibilizzati.

L'aggiunta dell'anticorpo specifico coniugato con un enzima (fosfatasi alcalina, perossidasi di rafano) e la successiva aggiunta, dopo i necessari lavaggi, del substrato colorimetrico specifico per l'enzima, darà origine, nel caso di responso positivo, ad una modificazione dello spettro di assorbimento del substrato con la possibilità di registrare l'assorbimento a una data lunghezza d'onda .

# Immunofluorescenza diretta



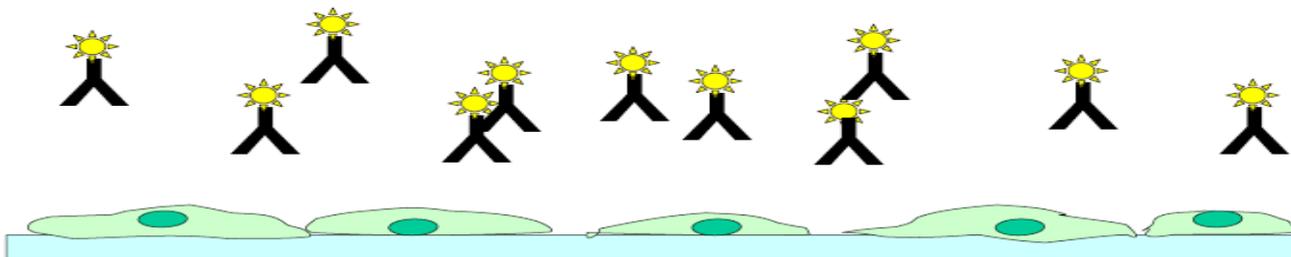
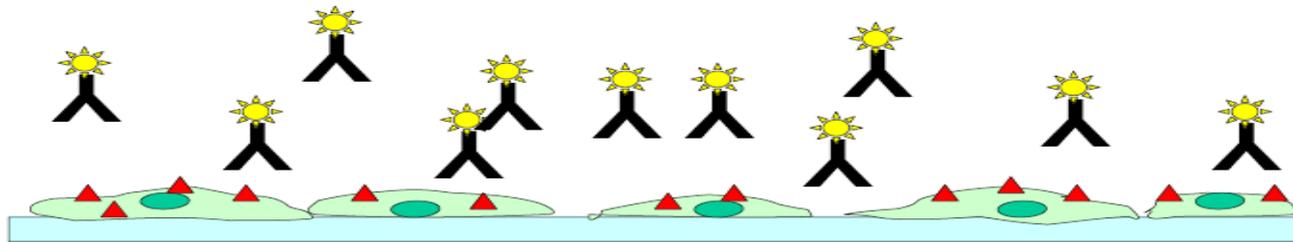
Linea cellulare permissiva, sezione o impronta di tessuto

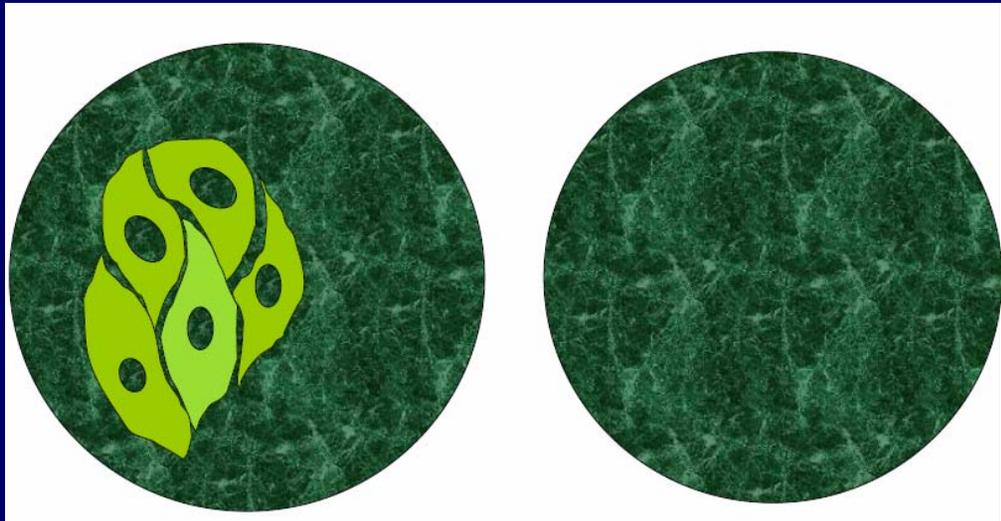
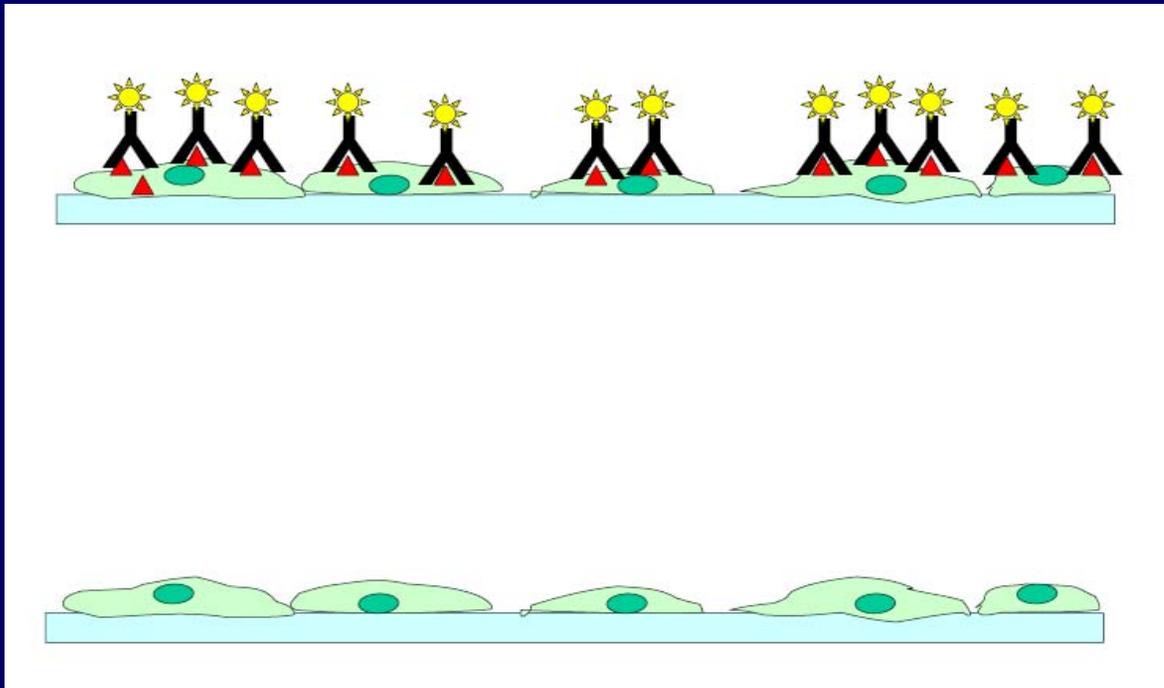


Anticorpo monoclonale marcato con fluorocromo



Antigene virale





# IMMUNOFLUORESCENZA DIRETTA

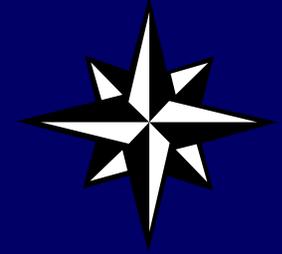
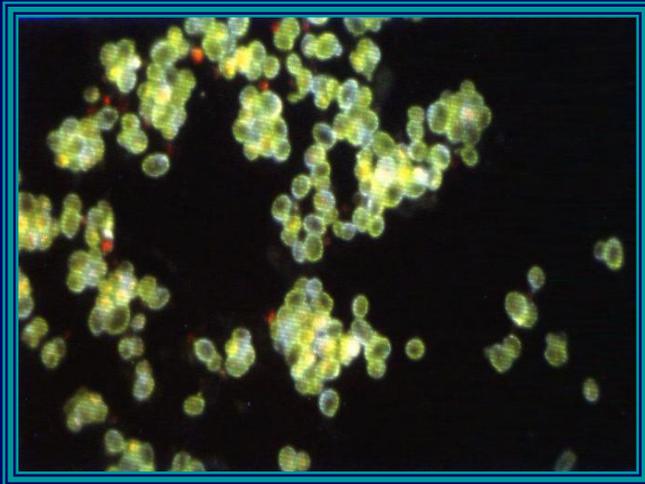
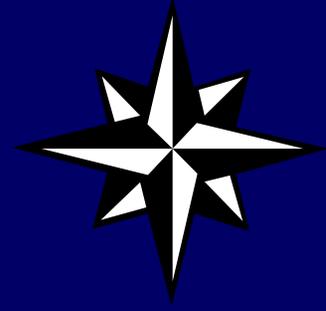


Fig. 3, HSV-infected epithelial cell from skin lesion (DFA)

Anche in questo caso la diagnosi è possibile in presenza dell'agente patogeno, e la sensibilità dipende dal tipo di microrganismo e dalla carica infettante (virus, batterio, micete o protozoo) ricordiamo in particolare la ricerca rapida degli Antigeni di Legionella e Pneumococco nel sedimento urinario



# COLTURE CELLULARI



Si utilizzano linee cellulari continue su cui vengono inoculati i campioni biologici infetti

**Campioni biologici:** siero, sangue, tampone naso-faringeo od oro-faringeo, aspirato faringeo, materiale autoptico.

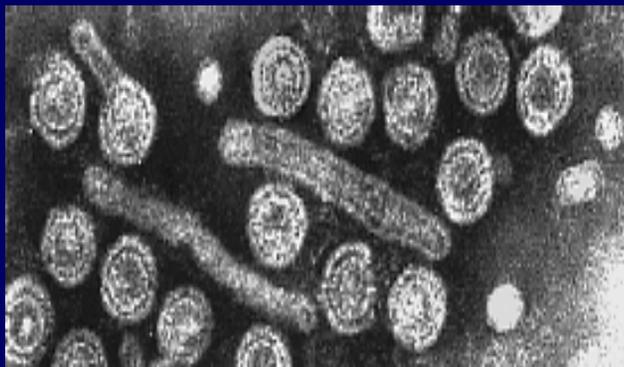
# MICROSCOPIA ELETTRONICA



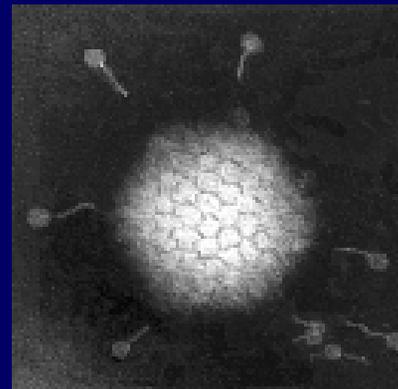
- ▶ **Contrasto negativo su:** sovranatante di colture cellulari infettate da estratti o liquidi biologici.
- ▶ **Sezioni ultrasottili:** tessuti bioptici/autoptici, pellet di colture cellulari

**VANTAGGI:** visione diretta delle particelle virali

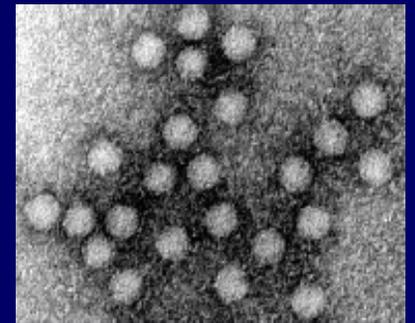
**SVANTAGGI:** scarsa sensibilità ( $> 10^6$  particelle / ml)



scaricato da [www.sunhope.it](http://www.sunhope.it)  
Epstein-Barr virus (EBV)



Adenovirus



parvovirus 45

# Diagnosi indiretta



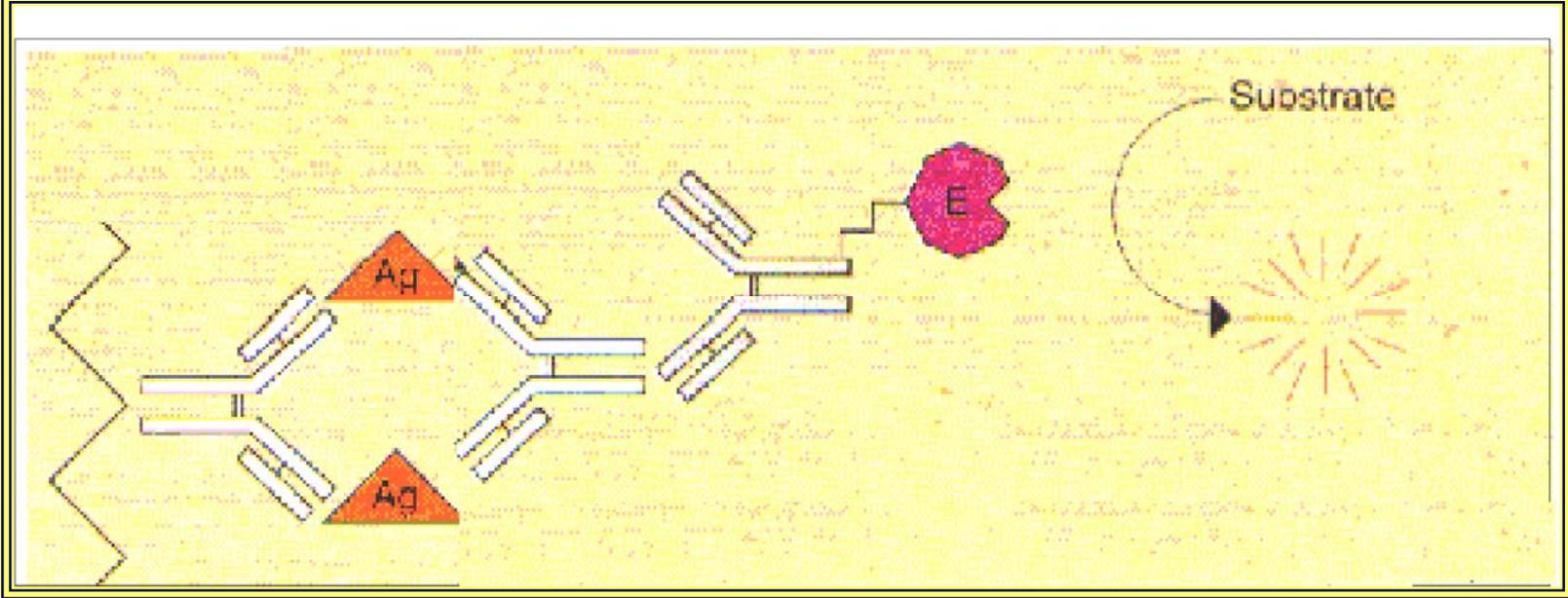
Si avvale di metodiche che evidenziano una risposta immunologica nei riguardi del microrganismo sospettato di essere l'agente eziologico della malattia in esame.

Vengono ricercati :

Gli anticorpi delle diverse classi (IgM, IgG, IgA e IgE) nei liquidi biologici (in genere nel siero),

Tecnologia :

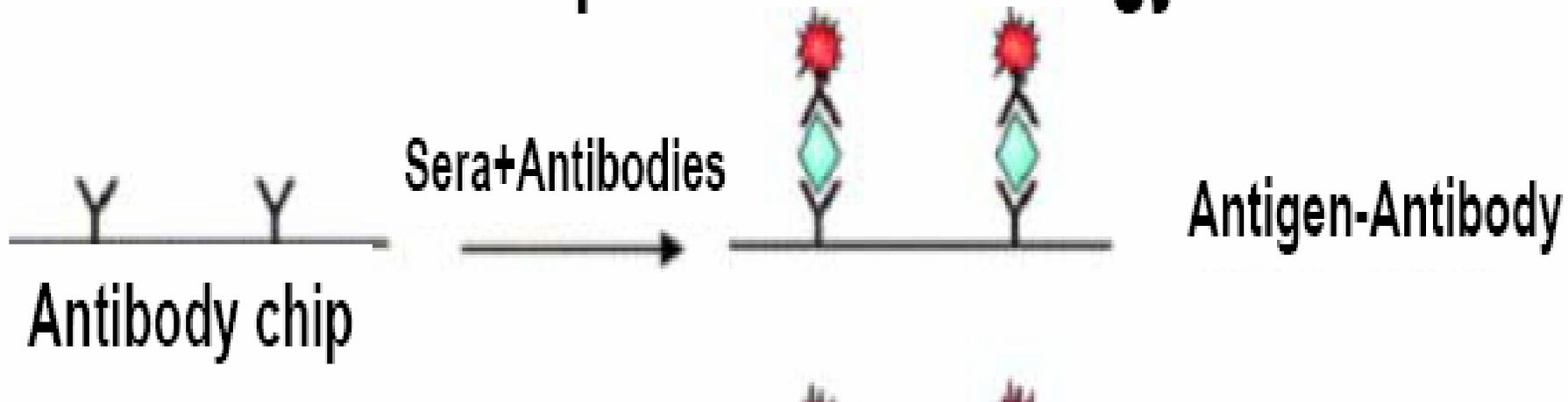
ELISA, WESTERN BLOT,  
IMMUNOPEROSSIDASI, IMMUNOFLUORESCENZA  
etc.



- **ELISA *indiretto***: in tale metodica si ricorre all'antigene adsorbito sui pozzetti (ELISA in fase solida), anche se vi sono procedure in cui esso viene intrappolato da anticorpi specifici (DASI-ELISA: "double antibody sandwich indirect");
- In questo caso gli anticorpi coniugati sono anticorpi anti frammenti Fc degli anticorpi specifici per il batterio [Clark, 1981]. La procedura prevede in seguito, una rivelazione-misurazione analoga alla metodica precedentemente descritta.
- In entrambi i casi l'attività enzimatica, dosata in condizioni standard, sarà direttamente proporzionale alla quantità di antigene presente]
- I vantaggi derivanti dalla relativa semplicità strumentale, dalla elevata sensibilità analitica e dall'ampia disponibilità di reazioni chemiluminescenti dotate di elevata specificità, hanno portato a un loro utilizzo anche nel campo dei saggi immunologici [Pazzagli, 1996] ed in particolare nell'ELISA.

# principio

## Protein chip based technology





# Tecniche ELISA per la ricerca di anticorpi specifici nella diagnostica di malattie virali e/o batteriche



# Tecnica Western blot per la diagnosi di infezioni da virus e/o da batteri



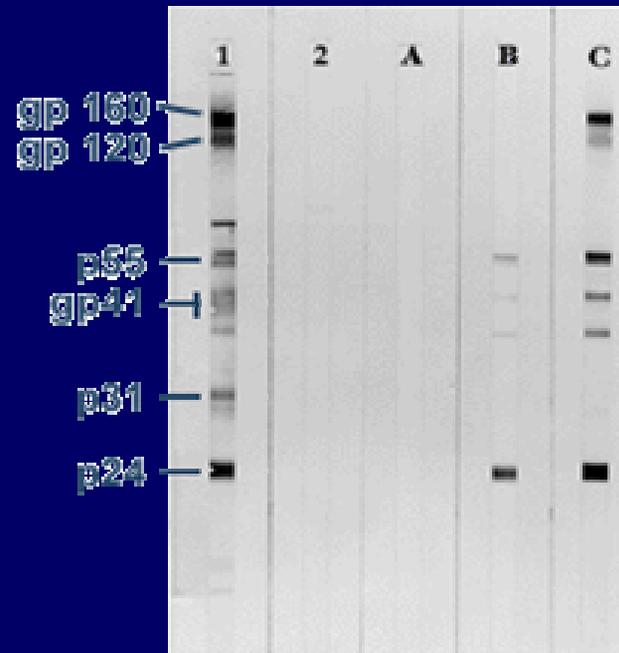
La ricerca degli anticorpi mediante la tecnica di

**Western blot** ha una sensibilità e specificità  $> 99\%$

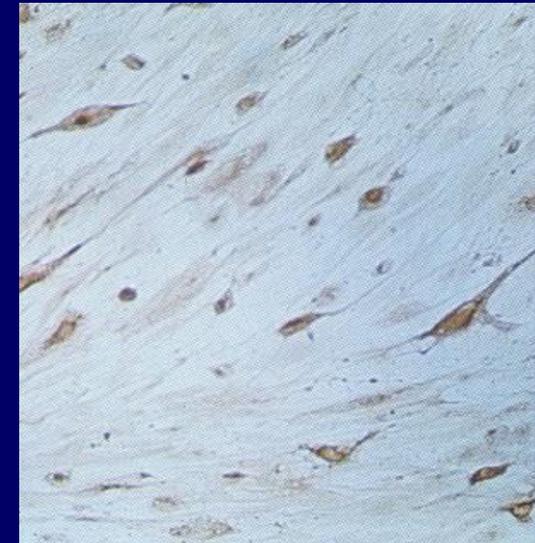
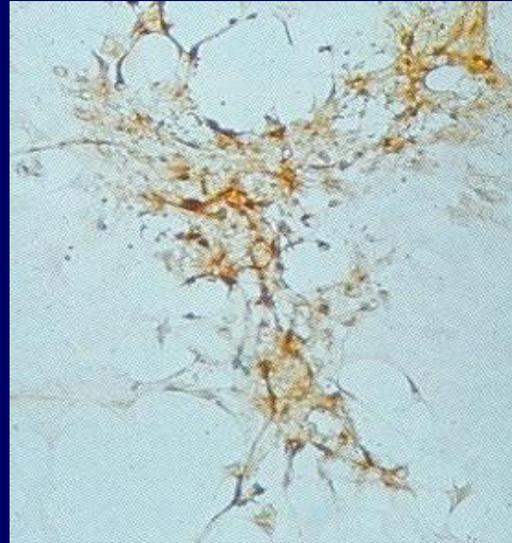
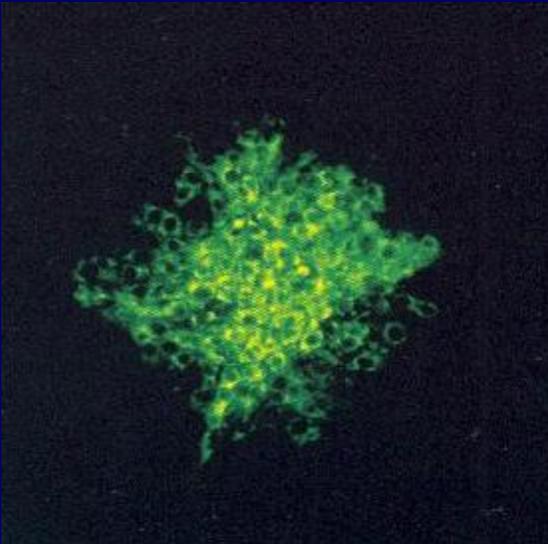
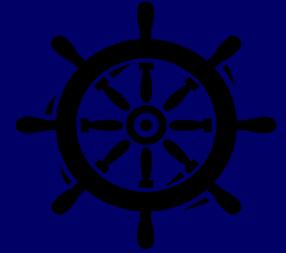
in caso di infezioni sintomatiche diagnosticate da circa 6 mesi. In quanto con questa tecnica si determinano anticorpi verso una serie di antigeni specifici e distinti per Virus o Batteri in esame

## Western Blot

- Lane 1: Positive Control
- Lane 2: Negative Control
- Sample A: Negative
- Sample B: Indeterminate
- Sample C: Positive



# IMMUNOFLUORESCENZA / PEROSSIDASI



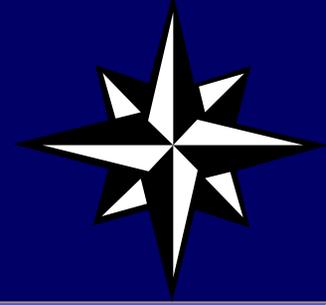
1. Cellule Vero infettate con OC43 (immunofluorescenza indiretta)
2. Cellule da coltura primaria di rene di cercopiteco infettate con OC43 (immunoperoxidasi indiretta)
3. Coltura di fibroblasti embrionali umani infettati con OC43 (immunoperoxidasi indiretta)

(da Rondanelli E.G., Gerna G.)

Anche queste metodiche (OPPORTUNAMENTE MODIFICATE) possono essere applicate sia nella ricerca di anticorpi virali che batterici

# BIOLOGIA MOLECOLARE

# TECNICHE di amplificazione degli acidi nucleici ( NAT)

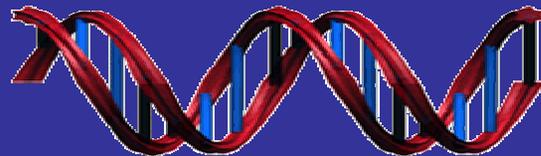


## TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE (PCR, LCR, SDA e TMA)

Si utilizzano sonde di acidi nucleici in grado di discriminare i microrganismi in base alla loro sequenza genomica .

**Sono molto sensibili e specifiche** in quanto consentono di individuare anche un basso numero di copie di DNA o RNA batterico su campioni biologici o biopsie.

I limiti sono il costo relativamente elevato e la complessità tecnologica.



Le tecniche di biologia molecolare, sviluppatesi inizialmente nel settore della ricerca di base, hanno in breve tempo trovato ampia applicazione anche nel campo

della **diagnostica di laboratorio** aprendo nuove ed enormi potenzialità nella **diagnosi, terapia e controllo** delle infezioni.

Tra queste, le tecniche di amplificazione degli acidi nucleici o NAT (Nucleic acid Amplification Technology), sono attualmente quelle più sensibili

- la *Polymerase Chain Reaction* (PCR),
- la *Ligase Chain Reaction* (LCR)
- la *Nucleic Acid Sequence*
- la *Based Amplification* (NASBA)
- *Real time amplification*

sono potentissime procedure di amplificazione di acidi nucleici in vitro che permettono di moltiplicare virtualmente all'infinito una sequenza specifica di **DNA o RNA**

# *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

- La **reazione a catena della polimerasi** *Polymerase Chain Reaction*,( **PCR**), è una tecnica di biologia molecolare che consente :
- la moltiplicazione (*amplificazione*) di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali.
- L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere in vitro molto rapidamente la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni.

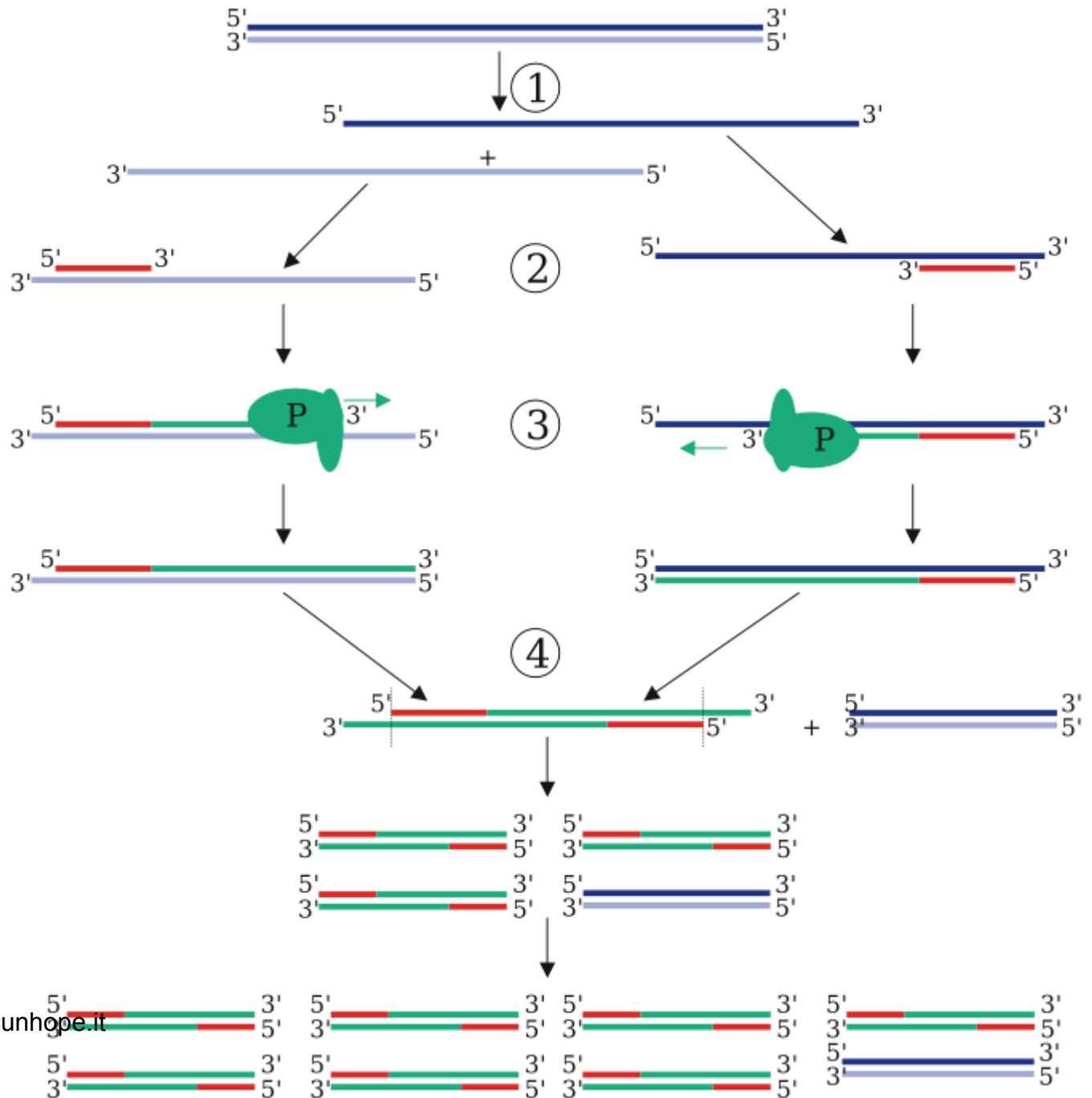
# Meccanismo di funzionamento

- La PCR **ricostruisce in vitro** uno specifico passaggio della riproduzione cellulare:
- la ricostituzione (*sintesi*) di un segmento di **DNA "completo"** (a doppia elica) a partire da un filamento a singola elica.
- Il filamento mancante viene ricostruito a partire da una serie di nucleotidi (i "mattoni" elementari che costituiscono gli acidi nucleici) che vengono disposti nella corretta sequenza, complementare a quella del DNA interessato.

# Meccanismo di funzionamento

- Questo processo viene svolto in natura da enzimi chiamati DNA-polimerasi, che sono in grado di sintetizzare progressivamente un nuovo filamento di DNA nelle seguenti condizioni:
- devono essere disponibili i nucleotidi da polimerizzare, sotto forma di desossiribonucleotidi trifosfati (dNTP);
- il DNA deve essere denaturato, ovvero le due eliche che compongono i filamenti devono essere già separate;
- il segmento da ricostruire può essere soltanto *prolungato*, ovvero non è possibile sintetizzare un nuovo filamento a partire da zero;
- devono inoltre essere rispettate opportune condizioni di temperatura, pH, ecc.

Schema delle  
fasi di una PCR:  
1. Denaturazione  
2. *Annealing*  
3. Allungamento  
4. Termine del  
ciclo



È possibile quindi ricostruire le condizioni che portano alla formazione dei nuovi segmenti di DNA, ponendo in soluzione :

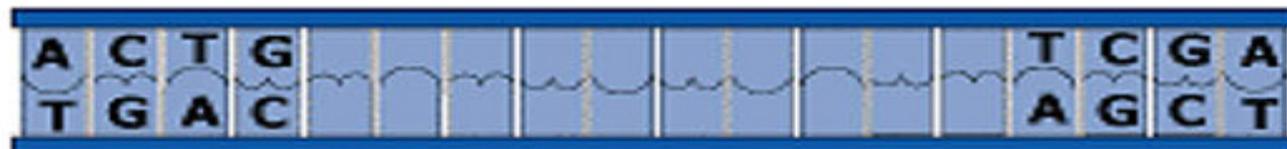
- una quantità, anche minima, del segmento di DNA che si desidera riprodurre;
- una quantità opportuna di nucleotidi liberi per costituire i nuovi filamenti;
- opportuni "inneschi", detti primer, costituiti da brevi sequenze di DNA (oligonucleotidi) complementari agli estremi 5' e 3' del segmento da riprodurre;
- altri elementi di supporto (ad es. ioni magnesio), necessari per costituire l'ambiente adatto alla reazione;
- una DNA polimerasi (non è necessario che provenga dallo stesso organismo di cui si deve replicare il DNA).

# INIZIO DELLA REAZIONE DI PCR

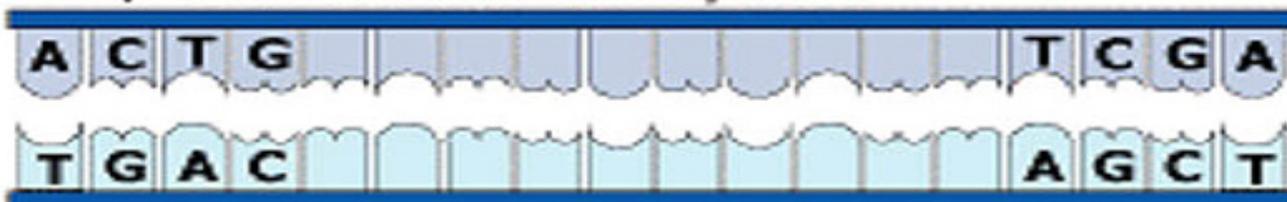
- separazione dei filamenti del DNA (**fase di denaturazione**),
- creazione del legame tra i *primer* e le regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati (fase di **annealing**).

la reazione della polimerasi inizia con la fase di **prolungamento** del filamento a partire dal *primer* 5'

Questo processo risulta incompatibile con la DNA polimerasi umana, che viene distrutta alle temperature necessarie alla denaturazione (96-99 °C).



Heat to 95°C  
DNA Strands will separate (A)



55°C  
Primers bind to template DNA strands (B)



72°C  
Taq polymerase synthesizes new DNA strands (C)



Two New DNA Molecules



Per ovviare a questo inconveniente si fa ricorso alle polimerasi appartenenti a organismi termofili che non sono inattivate dalle alte temperature,

viene utilizzata la "Taq polimerasi" proveniente dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*.

Ciò consente di realizzare più **cicli** di PCR in sequenza:

- in ogni ciclo viene duplicato anche il DNA sintetizzato nelle fasi precedenti.
- si ottiene una **reazione a catena** che consente una moltiplicazione estremamente rapida del materiale genetico di interesse.

# ENZIMI TERMOSTABILI E RELATIVE APPLICAZIONI

È stato visto che è conveniente una DNA polimerasi estratta dal batterio *Thermophilus aquaticus* detta "**Taq polimerasi**".

Il vantaggio risiede nella sua **termostabilità**.

All'atto della denaturazione del DNA, condotta ovviamente ad alta temperatura (90-95°C), la polimerasi di *E. coli*, usata quando questa metodologia fu messa a punto per la prima volta, si denatura anch'essa e nuovo enzima va aggiunto ad ogni ciclo. Questo costituisce tra l'altro un ostacolo per ogni tentativo di automatizzazione del processo.

# GLI ENZIMI TERMOSTABILI

Un enzima termostabile supera bene i cicli di denaturazione e l'intera procedura può venire automatizzata in una macchina programmata per compiere queste operazioni.

La macchina è costituita da una celletta termostata che viene ritmicamente:

- riscaldata per denaturare il DNA
- raffreddata per permettere l'appaiamento del DNA con gli oligonucleotidi.

Il tutto viene ripetuto venti o trenta volte nello spazio di due o tre ore.

L'enzima ha un'attività **5'-3'esonucleasica** ed è priva di attività **3'-5'esonucleasica**.

La reazione di polimerizzazione avviene a temperature elevate (**70-75°C**). Questo ne aumenta di molto la specificità, perchè **riduce gli appaiamenti aspecifici degli oligonucleotidi** e la **formazione casuale di strutture secondarie**.

- L'automazione della procedura mediante appositi termostati programmabili permette di completare il processo in una o poche ore senza l'intervento dell'operatore.
- Ogni ciclo, teoricamente, raddoppia il numero di frammenti bersaglio.



- Il thermocycler esegue automaticamente i cambi di temperatura necessari per la PCR

## Composizione della soluzione:

- DNA da replicare,
  - desossiribonucleotidi trifosfati,
  - ioni magnesio,
  - *primer*
  - DNA polimerasi
- 
- **la soluzione** viene portata a una temperatura compresa tra 94 e 99 °C. Ci si trova, di conseguenza, in una situazione in cui la doppia elica del DNA viene completamente scissa ed i due filamenti di cui essa è composta sono liberi (**fase di denaturazione**).
  - Successivamente la temperatura viene abbassata fino a 30-55 °C circa al fine di permettere il legame dei *primer* alle regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati (**fase di annealing**).
  - Infine la temperatura viene alzata fino a 65-72 °C al fine di massimizzare l'azione della DNA polimerasi che determina un allungamento dei *primer* legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA (**fase di prolungamento**).

- Il ciclo descritto viene ripetuto generalmente per circa 20-30 volte.
- In genere non si superano i 50 cicli in quanto ad un certo punto la quota di DNA ottenuto raggiunge un *plateau*.
- Ciò avviene, ad esempio, per carenza degli oligonucleotidi usati come inneschi o per diminuzione dei dNTP.
- Bisogna inoltre considerare che si potrebbe amplificare in maniera eccessiva anche eventuale materiale genomico contaminante.

# Efficienza

- In linea teorica ogni ciclo dovrebbe raddoppiare la quantità di DNA; ciò, tuttavia, non si realizza. Per avere una stima sufficientemente attendibile del numero di filamenti di DNA ottenuti dopo  $n$  cicli si può ricorrere alla formula:

$$Y = a (1+F)^n, \text{ dove:}$$

dove:

$Y$  = DNA prodotto dopo  $n$  cicli

$A$  = quantità iniziale di DNA presente

$n$  = numero di cicli di PCR effettuati

$F$  = fattore di efficienza dell'amplificazione (in genere compresa tra 0,7 e 0,8)

# FATTORI DI OTTIMIZZAZIONE

Ogni piccolo errore che la **polimerasi** commette nei primi cicli viene **immediatamente amplificato**.

È fondamentale valutare la frequenza di errori introdotti nelle varie condizioni sperimentali e cercare di ridurla.

Il parametro determinante sembra essere la concentrazione dei **nucleotidi trifosfati**. Se questa cade al di sotto di **5 mM**, la frequenza di incorporazioni errate sale di molto.

# I fattori di ottimizzazione includono:

- l'uso di primer ben purificati che abbiano temperature di melting simili
- l'uso di stampi di DNA/RNA altrettanto purificati e non denaturati
- I parametri di amplificazione e i tempi di denaturazione devono essere i più brevi possibili, per evitare inattivazione enzimatica o danneggiamento dello stampo.
- La sintesi dell'intera lunghezza della sequenza bersaglio e le temperature di annealing (*ibridizzazione*) dovrebbero essere vicine il più possibile alla temperatura di melting dei primers.

# FATTORI DI OTTIMIZZAZIONE

- il tampone PCR dovrebbe essere ottimizzato per la specifica polimerasi utilizzata.

Ad esempio la concentrazione di ioni Mg, in assenza di adeguato magnesio libero, la Taq DNA polimerasi è inattiva,

- I componenti della reazione:
- lo stampo di DNA,
- Gli agenti chelanti presenti nel campione (come il citrato),
- i nucleotidi trifosfato
- le proteine, risentono tutti della quantità di magnesio libero.

## **Al contrario**

Un eccesso di ioni magnesio riduce la fedeltà dell'enzima e può aumentare il livello di amplificazione non specifica.

Per questa ragione, è importante determinare, e lo si fa empiricamente, la concentrazione precisa e ottimale di cloruro di magnesio ( $MgCl_2$ ) per ciascuna reazione.

Un altro fattore non trascurabile è l'inerzia della provetta contenente il campione.

Per migliorare il processo di scambio termico con il blocco termostato vengono usate provette con pareti particolarmente sottili, caratterizzate da una equilibrata termica molto veloce.

# contaminazione.

quello della contaminazione è un problema.

Il metodo è così potente che amplifica minime tracce di DNA.

**Infatti il limite tecnico principale è il problema dei falsi positivi.**

**MINORI** sono le molecole di **DNA o RNA** che devono essere rilevate

**MAGGIORE** è il rischio di avere risultati falsi positivi che derivano dall'amplificazione di DNA estraneo penetrato nel campione dall'esterno.

Questo può avere luogo quando si lavora in aree in cui sono spesso manipolati acidi nucleici o quando si usano pipette e materiale non sterile o contaminato da acidi nucleici.

Il problema più diffuso è però quello del ***carry over*** o contaminazione con DNA già amplificato che può passare da una provetta all'altra.

# *Reverse Transcriptase-PCR*

La *Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)*, che prende il nome dal processo di trascrizione inversa, si propone di applicare la metodologia della PCR allo studio di un **campione di RNA**.

1. RNA deve essere convertito in cDNA per poter fornire lo stampo richiesto dalla polimerasi termo-stabile.
2. Le trascrittasi inverse usate a questo scopo sono quelle dell'*Avian myeloblastosis virus (AMV)* o del *Moloney murine leukemia virus (M-MLV o MuLV)*.

# *Reverse Transcriptase-PCR*

Dopo la conversione in cDNA, **la procedura segue i cicli descritti nella reazione di PCR**, amplificando la sequenza interessata come una molecola di DNA.

**La qualità e la purezza dello stampo iniziale di RNA è determinante per il successo dell'RT-PCR.**

# La Ligase Chain Reaction (LCR)

La **Ligase Chain Reaction (LCR)** è una tecnica semplice e sensibile che permette la rivelazione di **qualsiasi sequenza specifica di DNA** tramite amplificazione geometrica di prodotti di ligazione complementari alla sequenza stessa.

utilizza quattro sonde oligonucleotidiche che ibridizzano al DNA bersaglio in stretta vicinanza e sono ligate da una DNA polimerasi e una DNA ligasi termostabili che agiscono in successione.

Ad ogni ciclo la quantità di acido nucleico bersaglio risulterà raddoppiata.

## Analisi quantitativa in 'REAL TIME'

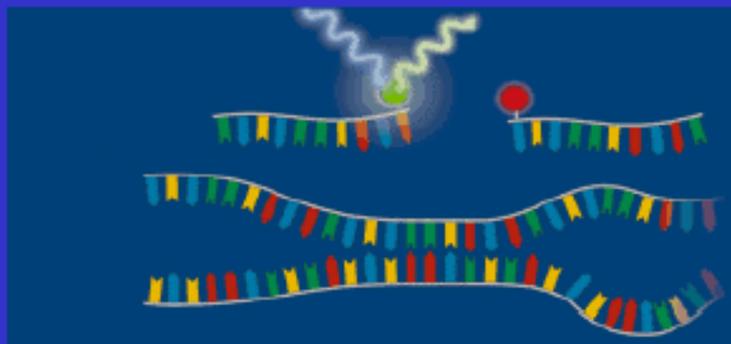
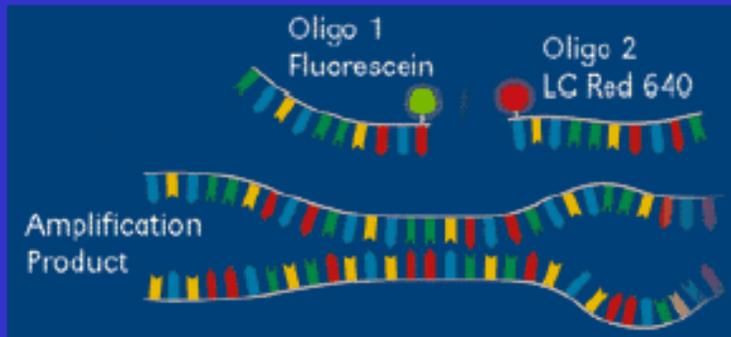


- Ciclo termico molto rapido
- Termostatazione ad aria
- Mantenimento uniforme della temperatura all'interno dei capillari
- Tempi di esecuzione delle analisi molto rapidi (30-40 cicli di PCR vengono completati in 20-30 minuti).

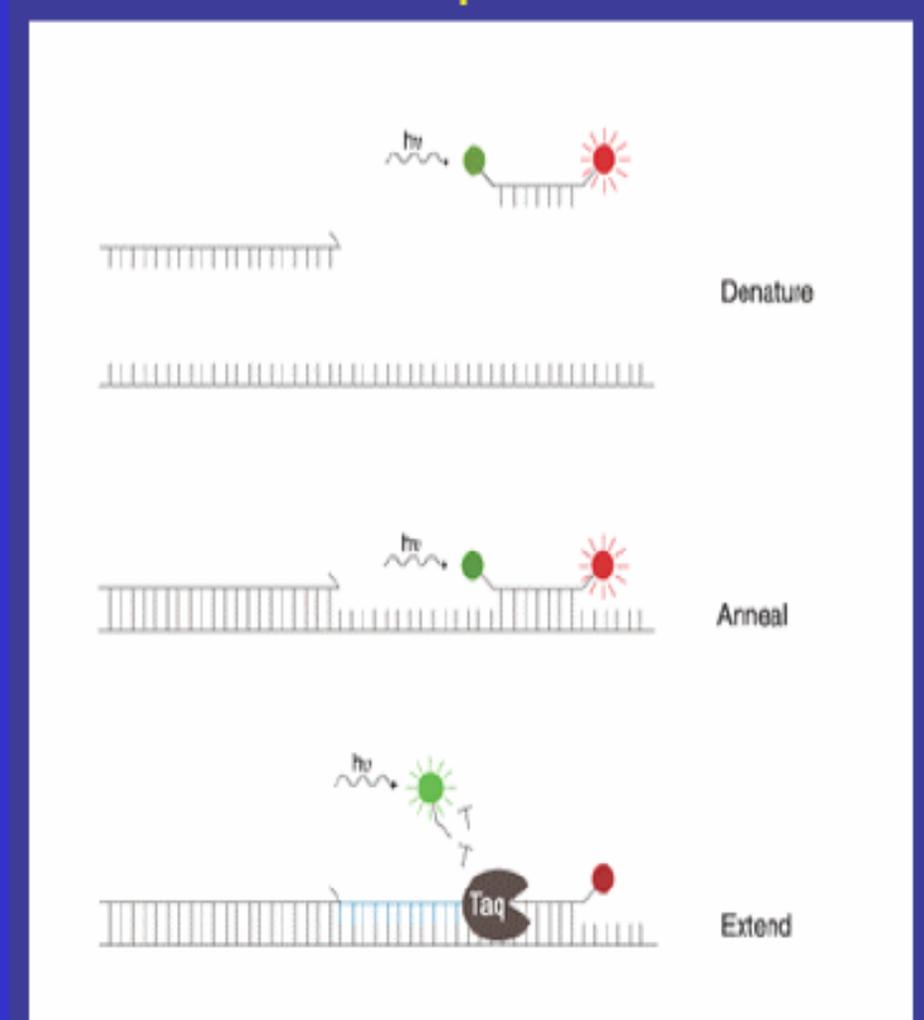
**LightCycler® System**

# Fluorescence-based probes for Real Time PCR

## FRET



## Taqman®



# Nucleic Acid Sequence Based Amplification

## NASBA

- La **Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA)** permette l'amplificazione selettiva di DNA o RNA.
- La NASBA utilizza tre enzimi.
- la NASBA è un processo di amplificazione isotermica che si svolge generalmente a **41°C** : tutti e tre gli enzimi sono attivi nello stesso momento in una provetta di reazione per tutta la durata del processo.

# TERMOCICLATORI

Da quando la PCR è stata scoperta, sono stati messi a punto vari tipi di termostati che funzionano in base a un programma che assicura la variazione ciclica della temperatura.

Dal punto di vista tecnico gli ultimi modelli sviluppati prevedono riscaldamento e raffreddamento tramite elementi Peltier.

Infatti l'effetto Peltier garantisce con la sua alimentazione pulsata alta velocità di riscaldamento/raffreddamento mantenendo una ottima uniformità di temperatura, e rende lo strumento indipendente da una unità di refrigerazione esterna.

gli elementi Peltier assicurano rampe di salita e discesa maggiori di  $2-3^{\circ}/\text{sec}$  e quindi cicli di amplificazione estremamente corti.

Il range di temperatura offerto va da  $4-20^{\circ}$  a  $99^{\circ}$  con una risoluzione di  $0,1^{\circ}\text{C}$ .

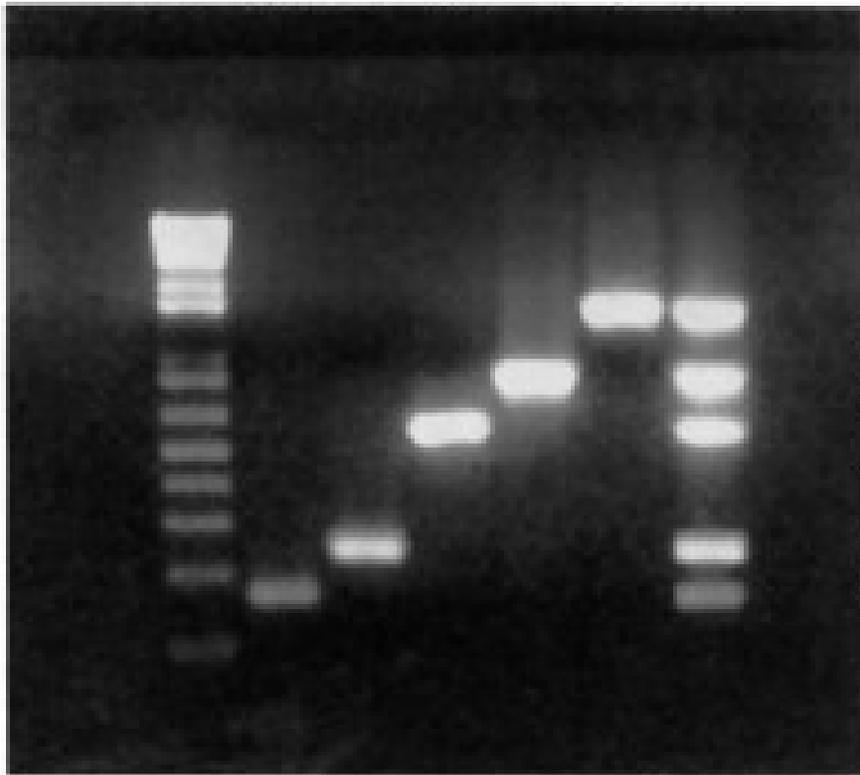
# RILEVAZIONE-QUANTIFICAZIONE E APPLICAZIONI

Per accertare la specificità dei prodotti di amplificazione si utilizza tradizionalmente il metodo di separazione elettroforetica su gel di agarosio o di poliacrilamide, caricando una piccola aliquota della miscela di reazione e colorando il gel con bromuro d'etidio o altri coloranti anche più sensibili.

Oltre alle dimensioni delle bande dei prodotti amplificati, si può controllarne la specificità mediante digestioni enzimatiche che tagliano il frammento amplificato in punti specifici o mediante ibridazione con un terzo oligonucleotide marcato, scelto all'interno della sequenza amplificata.

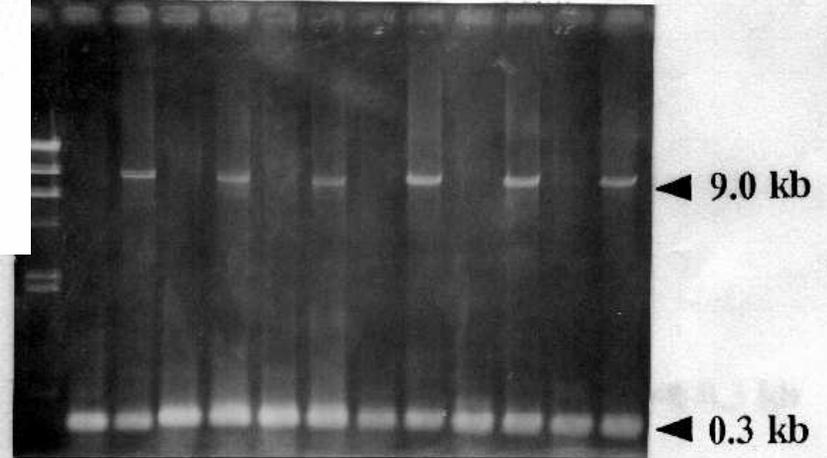
La rilevazione qualitativa di prodotti PCR specifici, può essere eseguita usando la tecnologia ELGA (*Enzime Linked Gel Assay*)

M 1 2 3 4 5 6



1.6 kb  
670 bp  
580 bp  
260 bp  
180 bp

ycgH ycgK ycgL ycgM ycgN ycgO  
C D C D C D C D C D C D  
M



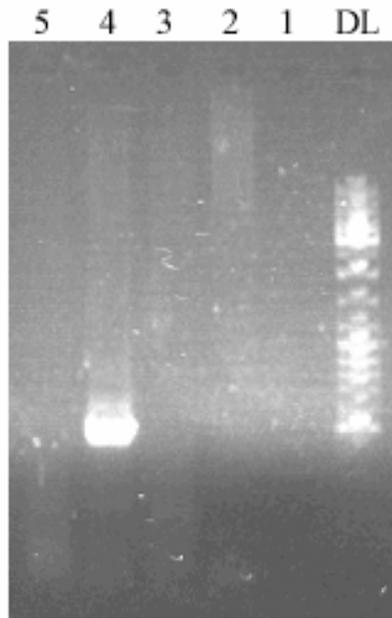
M :  $\lambda$ -DNA HindIII digest  
C : wildtype 168  
D : disruptant

# ***ELETTROFORESI SU GEL AGAROSIO***

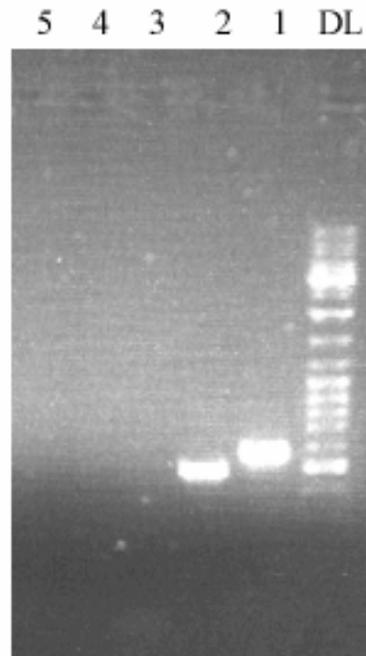
- L'elettroforesi su gel di agarosio è un metodo semplice e veloce che permette di separare, e quindi identificare, frammenti di DNA in base al loro peso molecolare.
- I frammenti migrano, nel campo elettrico che attraversa il gel, dal polo negativo a quello positivo, in funzione delle cariche elettriche conferitegli dai gruppi fosfato.

## Lab no. 4 - PCR Results

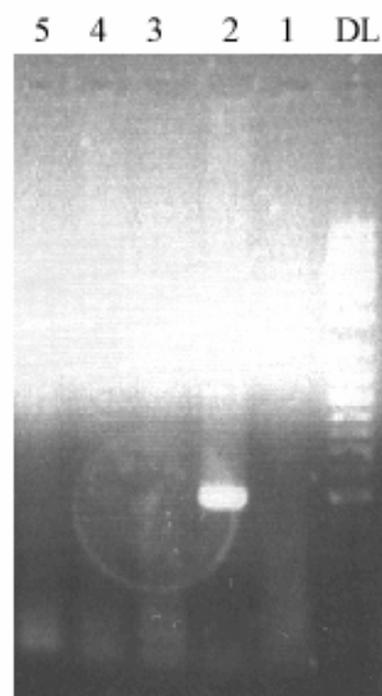
### Cell A



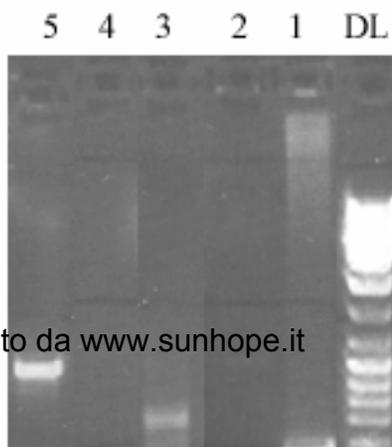
### Cell B



### Cell C



### Cell D



DL- DNA Ladder

1- primers #1

2- primers #2

3- primers #3

4- primers #4

5- primers #5

# La velocità di migrazione dipende:

- 1) dalle dimensioni dei frammenti
- 2) dalla percentuale dell'agarosio nel gel
- 3) dal voltaggio applicato.
- 

Frammenti lineari più piccoli migrano più velocemente rispetto a quelli più grandi.

a parità di peso molecolare, il DNA circolare migra più velocemente di un DNA lineare, in quanto assume una conformazione detta superavvolta (super coiled DNA).

- Attrezzatura richiesta: Apparato per elettroforesi orizzontale, Power supply, Forno a microonde, Transilluminatore a raggi UV  
Reagenti: Agarosio, TBE 1X, Ficoll loading buffer 6X

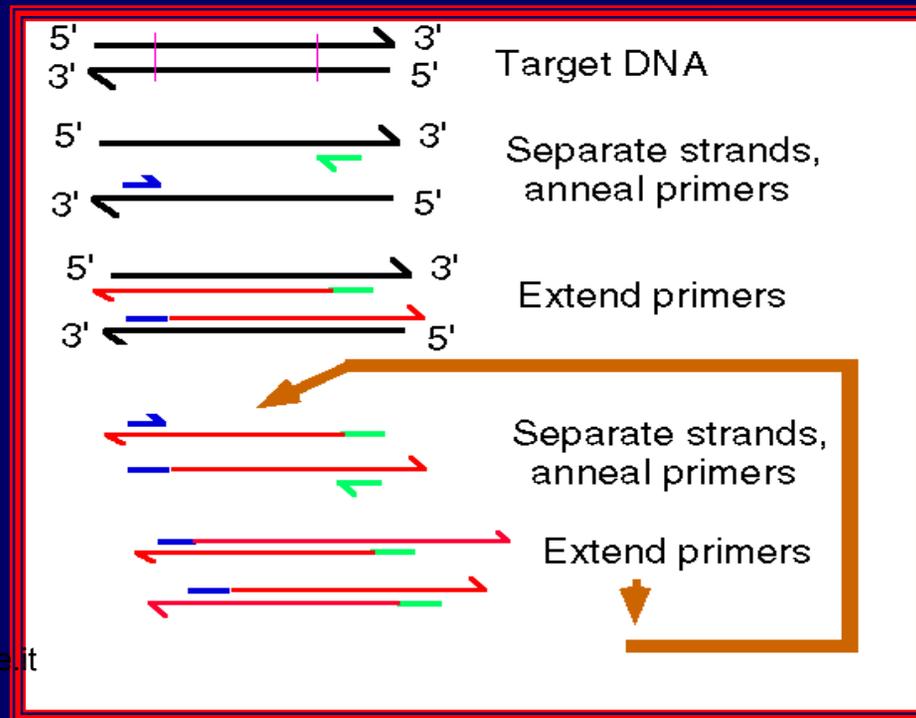
- ***IBRIDAZIONE- SOUTHERN BLOT***
- Dopo essere stati separati per dimensione su gel di agarosio, i frammenti di DNA vengono denaturati e trasferiti dal gel di agarosio ad una membrana di nitrocellulosa (Hybond ecc) o di nylon, secondo il metodo descritto da E. Southern(ref.).
- Il metodo prese il nome di Southern Blot ed in seguito, per un gioco di parole, vennero ideati il Northern Blot, per il trasferimento del RNA, e il Western Blot per indicare il trasferimento di proteine da gel a supporto solido.

fine

L'elevato  
potenziale diagnostico di **PCR** e tecniche  
derivate  
proviene dalla loro capacità di **rilevare la  
presenza di organismi patogeni** presenti in  
**piccolissime quantità** o in campioni di  
**minime dimensioni**, senza bisogno di  
coltivarli.

# AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE PCR

Scoperta da Kary Mullis nel 1984, la PCR, *Polimerase Chain Reaction*, cioè **reazione a catena mediata dalla DNA polimerasi** è una reazione che ha come risultato l'amplificazione selettiva di una piccola sequenza genomica delimitata da due sequenze specifiche.



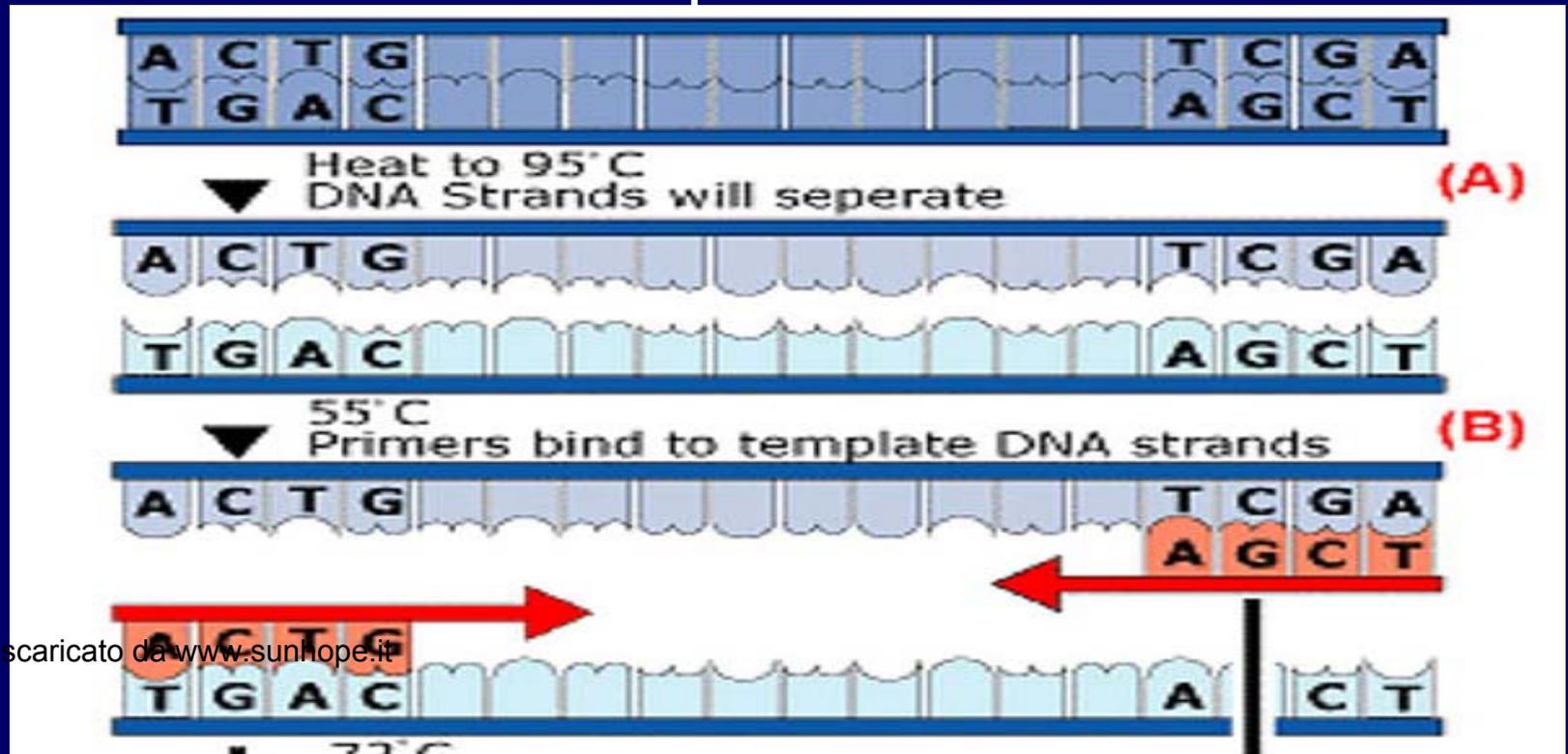
L'amplificazione può raggiungere valori di **centinaia di migliaia di volte** e le due brevi sequenze che definiscono la regione da amplificare sono fissate dallo sperimentatore.

Questa metodologia è caratterizzata quindi da

- un'enorme sensibilità
- un'alta risoluzione.

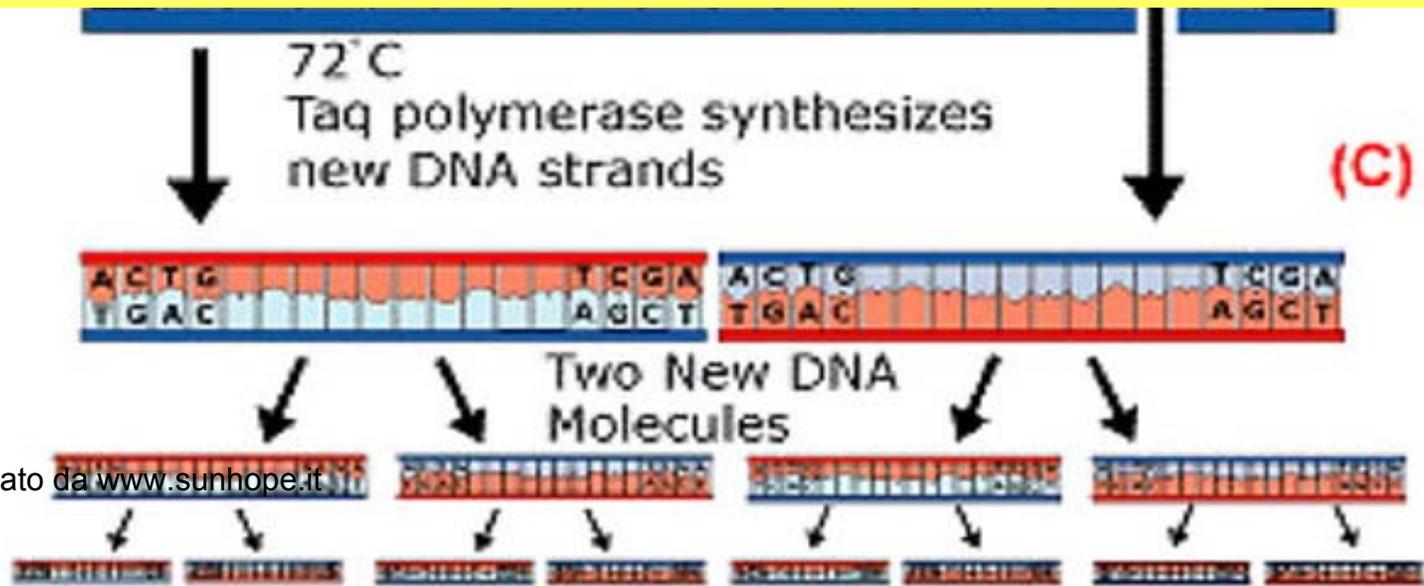
# Principio del metodo

.Dopo aver denaturato il DNA si fanno riassociare i filamenti singoli in presenza di un eccesso di **due oligonucleotidi sintetici** che rappresentano le sequenze delimitanti la regione che si vuole amplificare.



I prodotti di questo processo di amplificazione sono complementari e quindi **capaci di ibridizzare tra loro e con i primers.**

Sfruttando le proprietà di resistenza alla inattivazione termica di **polimerasi termo-stabili**, è possibile sottoporre il campione a cicli termici successivi (generalmente tra i 25-40 cicli ripetuti), si ottiene così, un **amplificazione esponenziale del frammento compreso tra i due primers.**

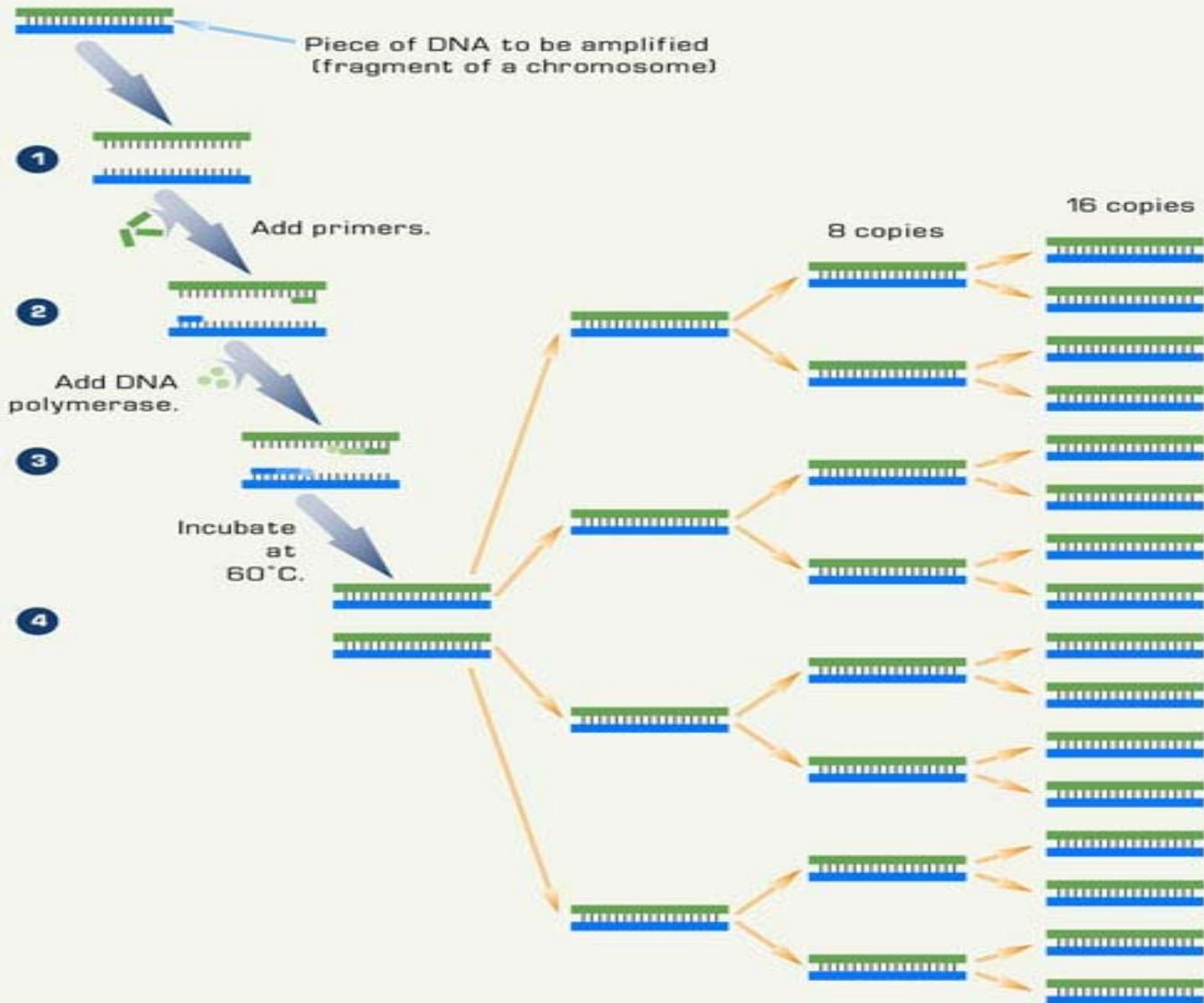




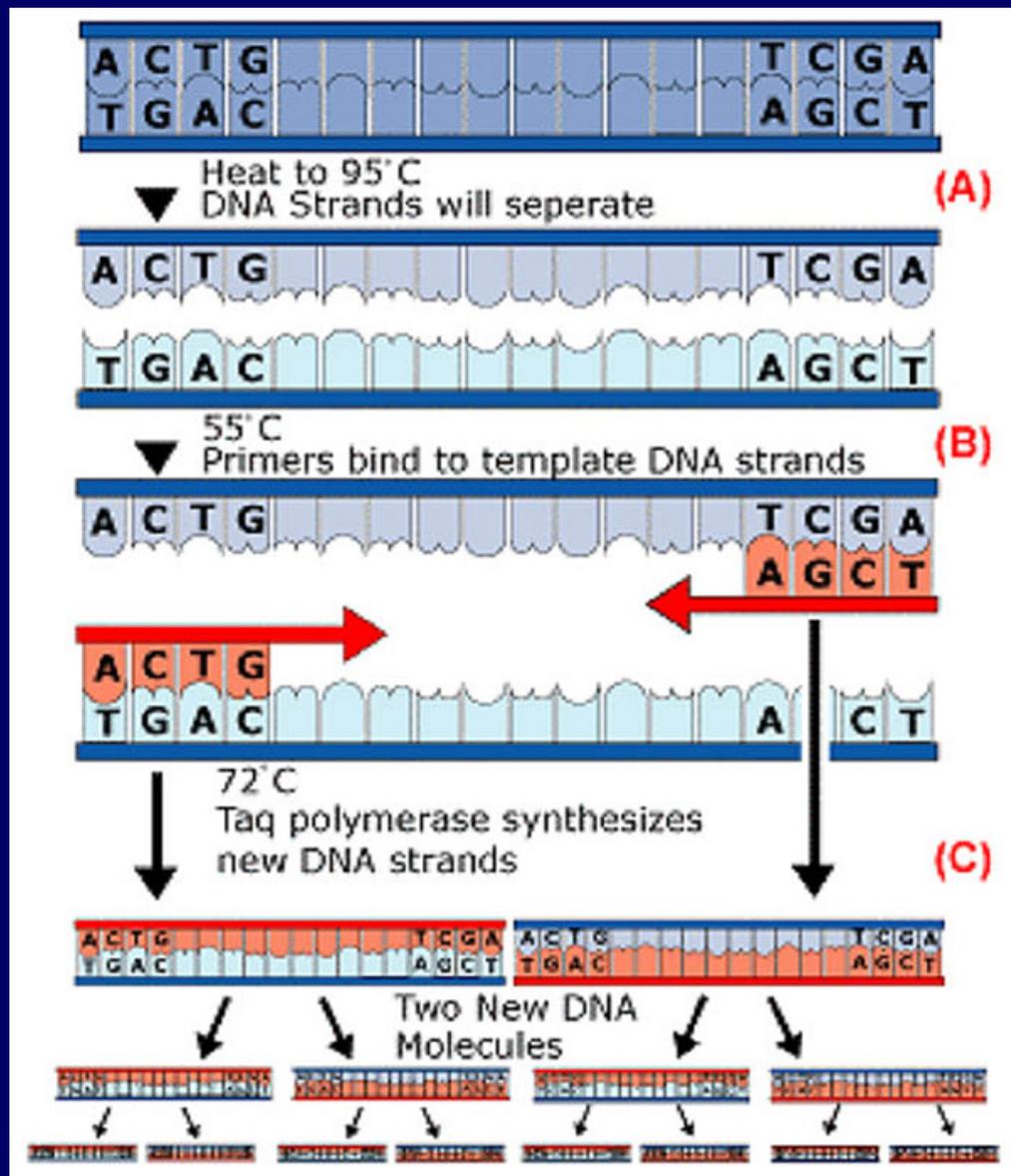
**DNA polimerasi termo-stabili derivate da microorganismi termofili che sono preferibili alla "Taq polimerasi" per alcune specifiche applicazioni.**

- La 'UIT-ma DNA polimerasi' proveniente da *Thermatoga* maritima (Questo enzima ha attività esonucleasica 3'-5', è cioè in grado di riparare i disappaiamenti che si producono durante l'amplificazione PCR )
- La 'Pfu DNA polimerasi', isolata dal batterio *Pyrococcus furiosus*, possiede anche attività 3'-5' esonucleasica di correzione di bozze.

Questi enzimi con funzione di correzione di bozze garantiscono un'altissima fedeltà di amplificazione, generando prodotti PCR "blunt-ended" particolarmente adatti per il clonaggio e l'espressione genica.

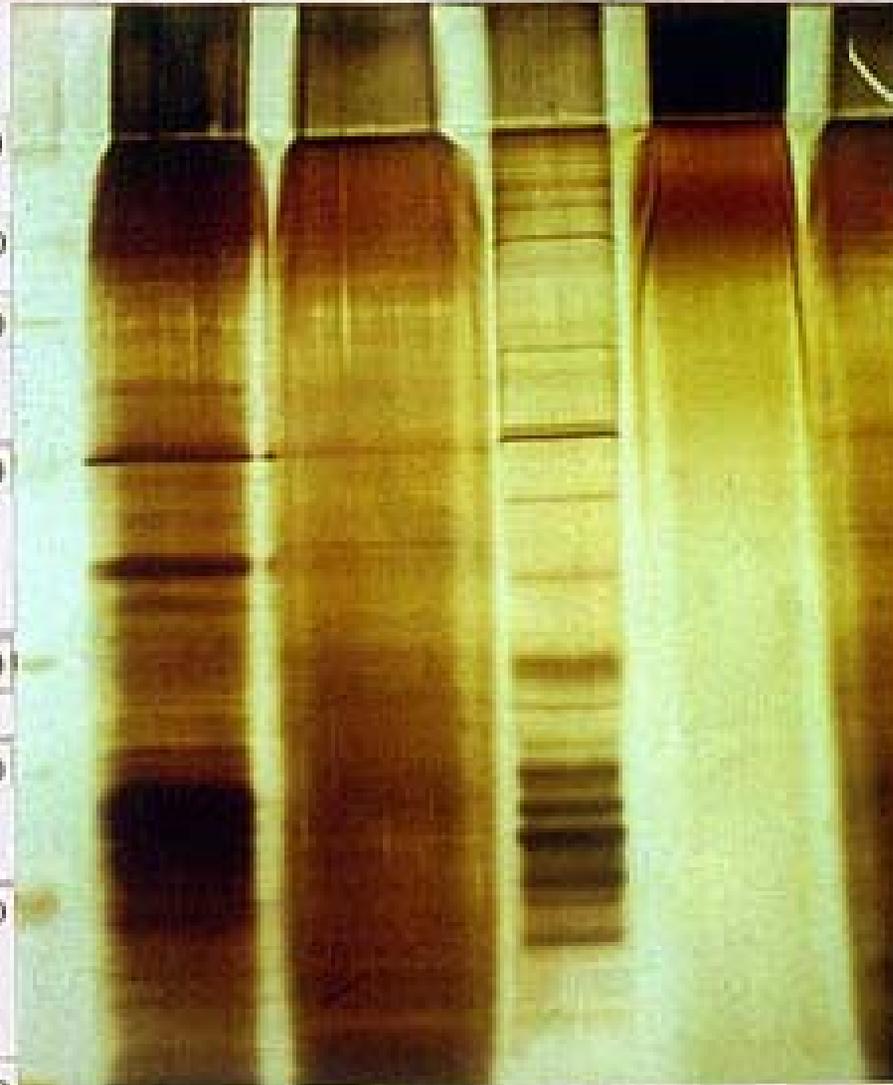






S A L F

200,00  
116,250  
97,400  
66,200  
45,000  
31,000  
21,500  
6,500



© W.P. Armstrong 2002

S = molecular weight standard

A = alga (*Trebouxia erici* photobiont 911)

L = natural lichen (*Cladonia cristatella*)

F = fungus (*Cladonia cristatella* mycobiont 113 single spore isolate)

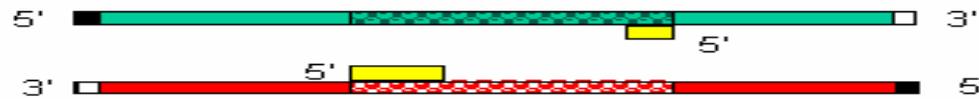
Sequence to amplify



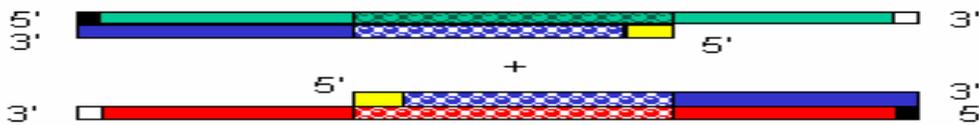
# POLYMERASE CHAIN REACTION - PCR



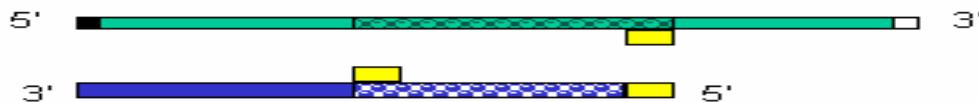
Heat to separate  
Cool, add primers



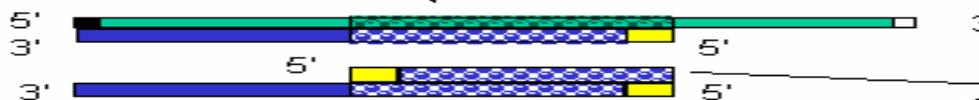
Add Taq polymerase



Heat to separate  
Cool, add primers



Add Taq polymerase



From these, get  
amplifications  
of the specific  
target sequence

Repeat cycles

# SIEROLOGIA

## Tecnica Western blot per la diagnosi

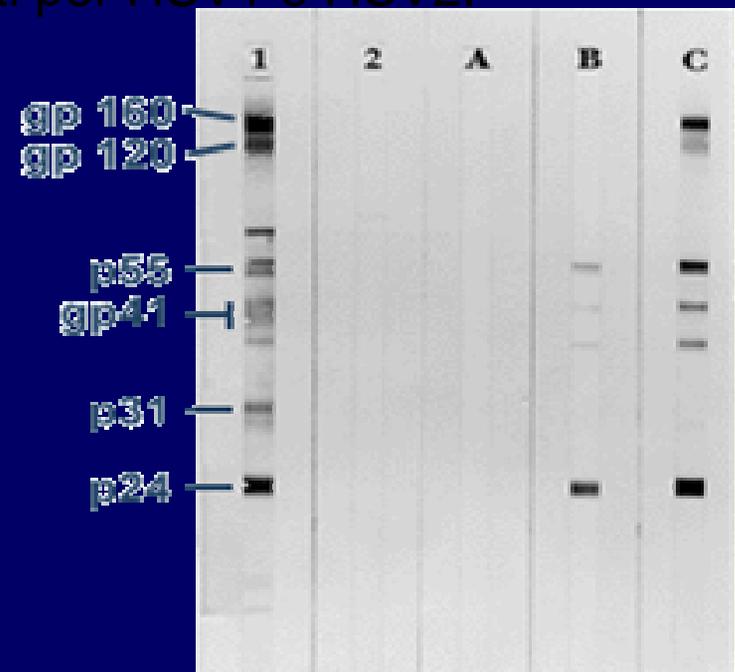
La ricerca degli anticorpi mediante la tecnica di Western blot ha una sensibilità e specificità > 99% in caso di infezioni sintomatiche diagnosticate da circa 6 mesi. In quanto con questa tecnica si determinano anticorpi verso una serie di antigeni specifici e distinti per HSV1 e HSV2.

(il **test** non è ancora disponibile per gli screenings allargati)

### Western Blot

- Lane 1: Positive Control
- Lane 2: Negative Control
- Sample A: Negative
- Sample B: Indeterminate
- Sample C: Positive

scaricato da [www.sunhope.it](http://www.sunhope.it)



- 2.4.4 Biologia molecolare
- L'impiego di sonde biotinate (probes) mediante ibridizzazione
- *in situ* ha messo in evidenza una sensibilità
- di circa il 60% (rivelazione mediante sistema
- streptoavidina-perossidasi biotinilata) legata in gran
- parte alla scarsa componente del DNA cellulare e ai
- rischi di alterazione durante la fase di denaturazione
- della doppia elica.
- L'ibridizzazione DNA/RNA è una metodica in chemiluminescenza
- che aumenta la sensibilità di risposta
- perché permette l'ibridizzazione tra il DNA/probe
- marcato con un estere di acridinio e l'rRNA di *Chlamydia*
- *trachomatis* presente già in singola elica ed in
- grande quantità nella fase attiva di replicazione.
- L'applicazione dei probes è stata affiancata dall'utilizzo
- di più recenti tecnologie di biologia molecolare
- previa amplificazione (PCR, LCR, SDA isotermica).
- La Strand Displacement Amplification permette
- simultaneamente l'amplificazione e il rilevamento in
- tempo reale con ottimi risultati di sensibilità e specificità.
- Mediante PCR, seppur con le limitazioni e le attenzioni
- che il metodo ancora richiede (inibitori, contaminazioni,
- costi) si ottengono risultati a più elevata
- sensibilità e specificità (è il test che possiede la massima

- La LCR (Ligase Chain Reaction) con tecnica di
- amplificazione del DNA plasmidico ha dato risultati

Ogni ciclo di amplificazione è composto da tre reazioni a temperature diverse:

- 1. **Denaturazione** del DNA a 92-98°C
- 2. **Ibridizzazione** (o *Annealing*) dei primers, con temperatura variabile dai 40 ai 68°C a seconda della sequenze
- 3. **Estensione o sintesi** di un nuovo filamento di DNA a 72°C, che è la temperatura ottimale delle DNA polimerasi termostabili

