



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Progetto formativo aziendale

PCR TRADIZIONALE E REAL-TIME PER IL RILEVAMENTO DEL DNA DI *LEISHMANIA* spp.

Roma 13-15-27 Ottobre 2015

PCR tradizionale e Real-time: differenze e applicazioni nella ricerca della *Leishmania infantum*

Roma 27/10/2015

Dr.ssa Laura Salvato

DO SIEROLOGIA IZSLT SEDE DI ROMA



Amplificazione

L'amplificazione del DNA mediante PCR consente di ottenere rapidamente in vitro la quantità di materiale genetico necessaria ai fini diagnostici o per successive applicazioni.

L' amplificazione può essere eseguita utilizzando:

**PCR tradizionale
o “end point”**



Analisi qualitativa

PCR Real-time



**Analisi qualitativa e
quantitativa**



Componenti di una reazione di PCR tradizionale

Primers

Oligonucleotidi complementari a regioni dei filamenti opposti che fiancheggiano la sequenza DNA bersaglio

Deossiribonucleotidi trifosfati

Miscela equimolare di dATP, dTTP, dGTP, dCTP

Tampone contenente cloruro di magnesio

Lo ione Mg_2^+ è essenziale per il funzionamento dell'enzima

Enzima

Tradizionalmente viene usata la Taq polimerasi, enzima termostabile estratto dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*

Stampo

DNA a doppio filamento



Alcune varianti delle PCR tradizionali

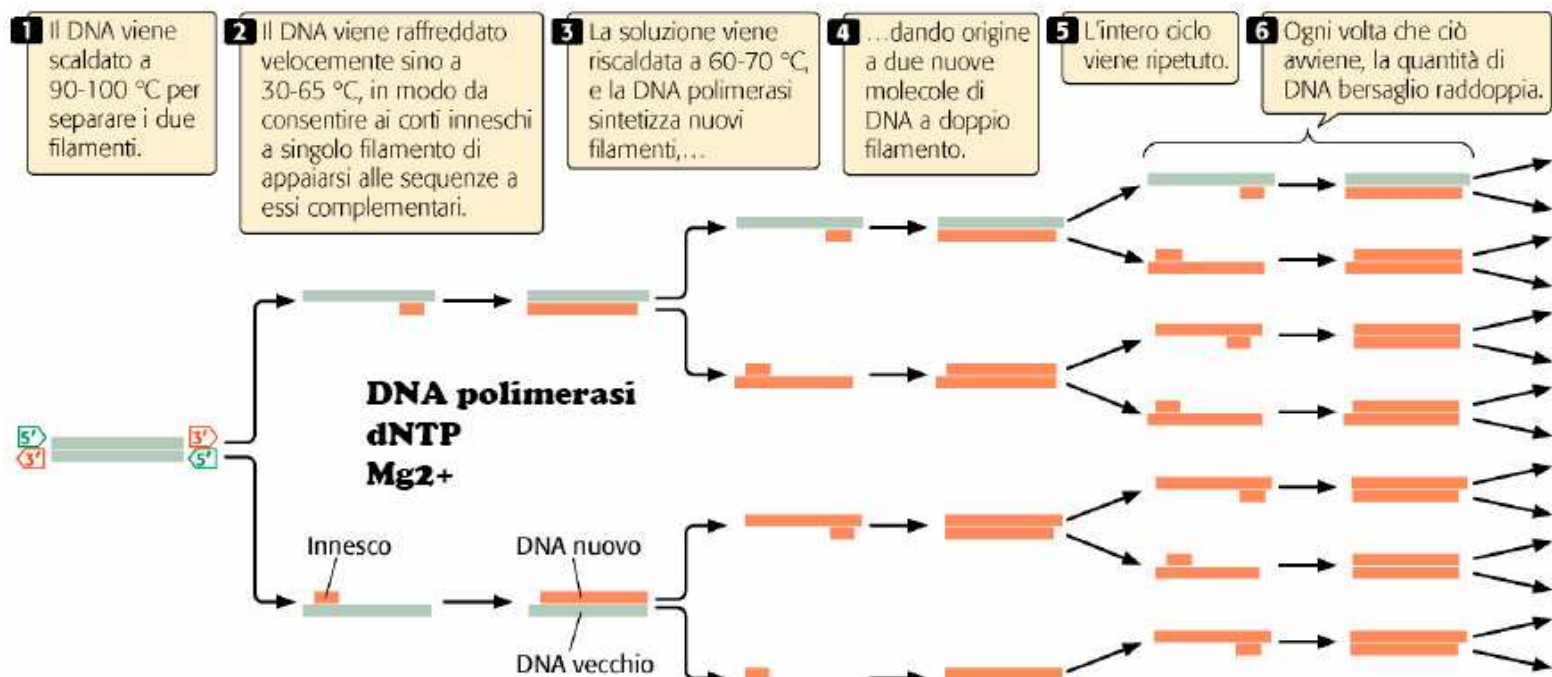
Standard: viene utilizzata una sola coppia di primer

Nested PCR: vengono utilizzate due coppie di primer in successione relativamente allo stesso segmento del gene di interesse

Multiplex: vengono utilizzate contemporaneamente più coppie di primer relativamente a diversi segmenti di uno o più geni di interesse



Fasi di un'amplificazione tradizionale

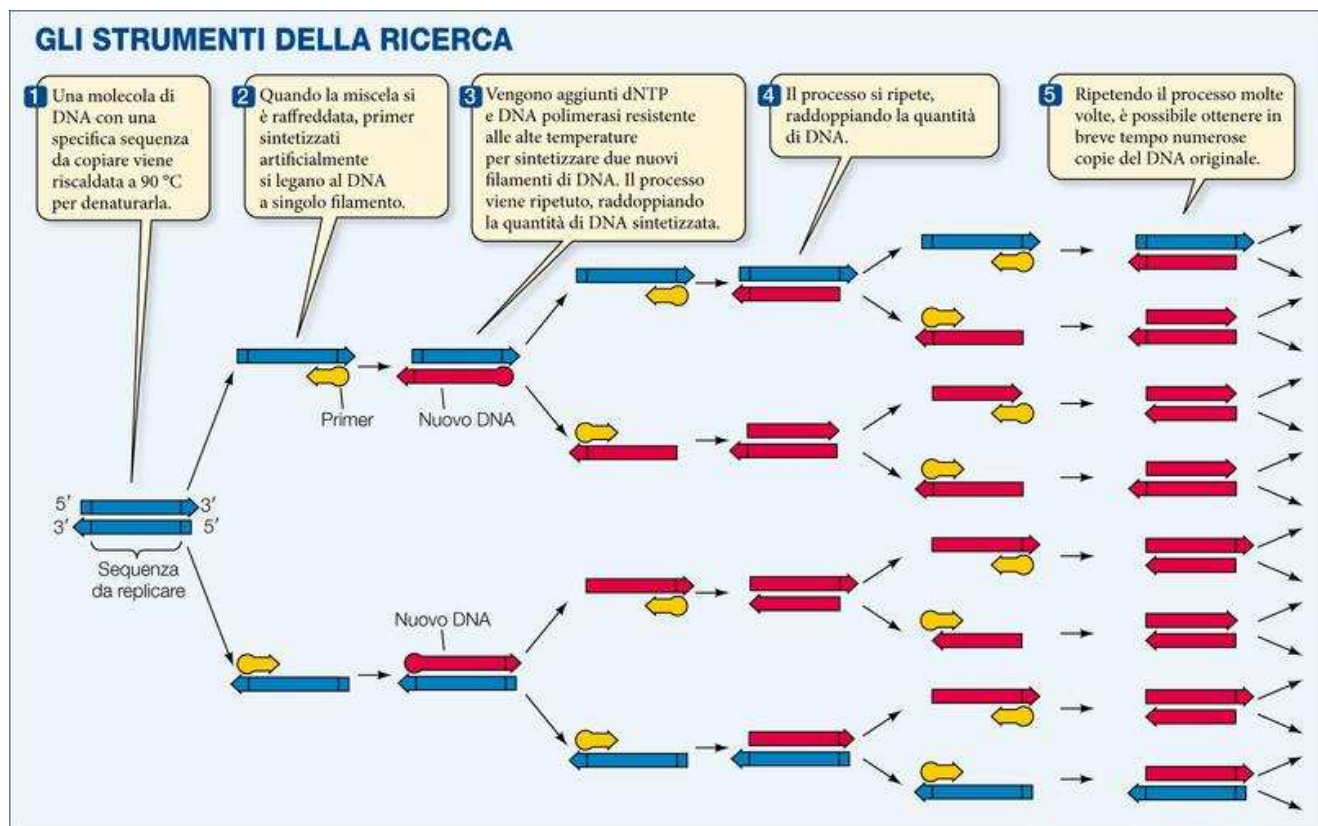


Il processo di duplicazione non procede "all'infinito", esso è limitato da:

- quantità dei primers
- attività della Taq polimerasi



PCR standard



Reazione a catena della polimerasi

Viene utilizzata una sola coppia di primer

Le tappe di questo processo ciclico vengono ripetute molte volte al fine di produrre copie multiple di un determinato frammento di DNA

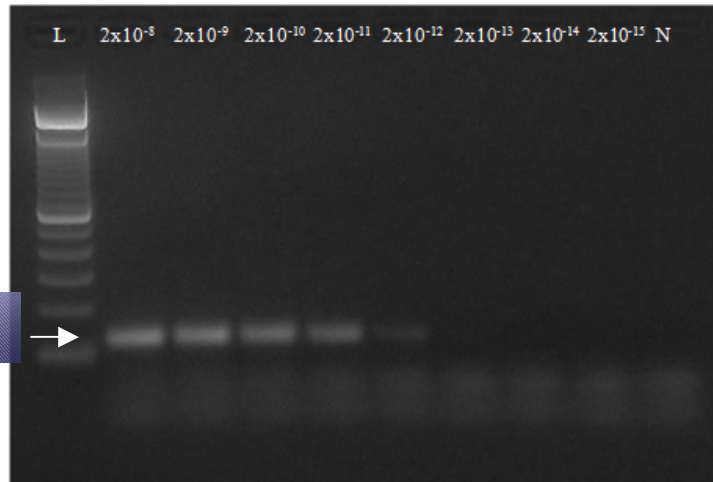




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

PCR tradizionale

PCR standard *Leishmania spp.*



bp 116

12/08/10 PCR PER LEISHMANIA (kinetoplasto – 13/a – 13/b)
STUDIO DI SENSIBILITA' CON DNA ESTRATTO DA COLTURA PURA
LIMITE DI RILEVABILITA': 2×10^{-12} pg (1 parassita = 0.2 pg DNA)

Forward (13a) 5'-GTGGGGGAGGGGCGTTCT-3'

Reverse (13b) 5'-ATTTTACACCAACCCCCAGTT-3'



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Veterinary Parasitology 125 (2004) 251–262

veterinary
parasitology

www.elsevier.com/locate/vetpar

Comparison of different tissue sampling for
PCR-based diagnosis and follow-up
of canine visceral leishmaniosis

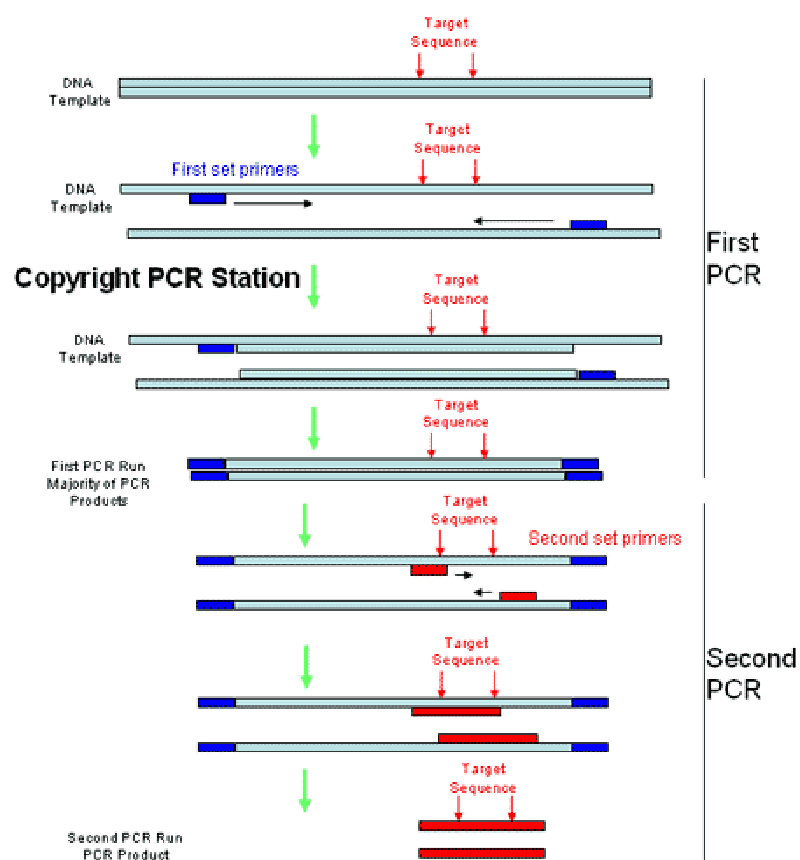
Laura Manna^a, Fabrizio Vitale^b, Stefano Reale^b, Santo Caracappa^b,
Luigi Michele Pavone^a, Rossella Della Morte^c, Giuseppe Cringoli^d,
Norma Staiano^{c,*}, Angelo Elio Gravino^a

- viene amplificata una regione costante del minicircolo del kDna.
- specific ma poco sensibile

LAURA SALVATO - DO Sierologia IZSLT



Nested-PCR



è una PCR che utilizza di due coppie di primers:

- una coppia di primers più esterna che genera un normale prodotto di PCR (first)
- una seconda coppia di primers interni al tratto amplificato nella prima reazione (nested)

serve ad ottenere una maggiore specificità del prodotto di amplificazione:

la nested va a buon fine solo se il prodotto della first è specifico



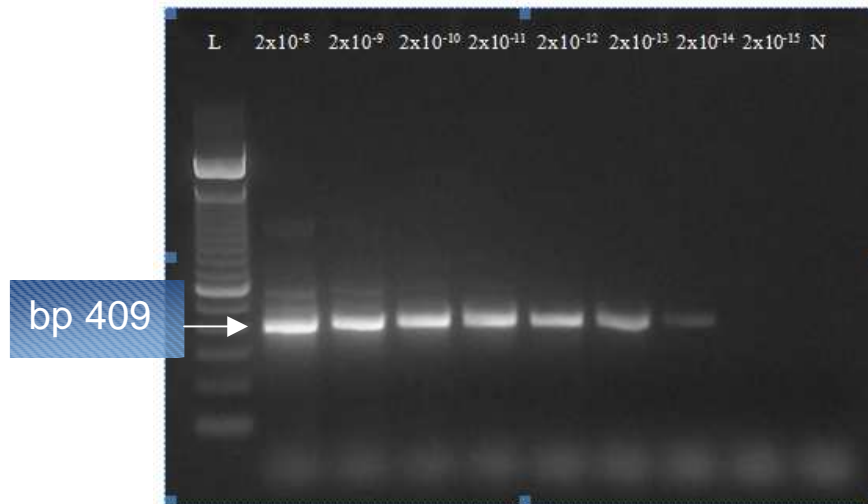


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

PCR tradizionale

Nested-PCR *Leishmania spp.*

Primers: R221/R332 R222/R333



11/08/10 NESTED PCR PER LEISHMANIA (16S RNA - 332/221 333/222)
STUDIO DI SENSIBILITA' CON DNA ESTRATTO DA COLTURA PURA
LIMITE DI RILEVABILITA': 2×10^{-14} pg (1 parassita = 0.2 pg DNA)

- viene amplificata la *small-subunit (SSU) rRNA* (SSUrRNA o 16s rRNA) specifica della *Leishmania spp.*

- molto più sensibile della PCR standard

Mol Biochem Parasitol. 1992 Mar;51(1):133-42.

Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites.

van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB.

Laboratory for Tropical Hygiene, Royal Tropical Institute, Amsterdam, The Netherlands.

LAURA SALVATO - DO Sierologia IZSLT



Fasi della PCR tradizionale o “end point”

Amplificazione → preparazione del gel di agarosio →
elettroforesi → analisi dei risultati

Svantaggi

- fornisce solo informazioni sulla presenza del frammento genico ricercato
- rischio d'inquinamento nelle varie fasi del processo
- tempi di risposta legati alle diverse fasi della reazione



Perché scegliere una PCR Real-time?

- è una metodica che, attraverso l'utilizzo di sostanze fluorescenti, permette di monitorare in tempo reale l'andamento della reazione di PCR e di misurare le quantità assolute di molecole di partenza
- consente di abbandonare tutte le manipolazioni successive all'amplificazione, potenziali fonti di inquinamento del campione riducendo anche i tempi di analisi
- la specificità dell'amplificato è ulteriormente garantita dalla specificità della sonda



Metodi di rilevamento della fluorescenza

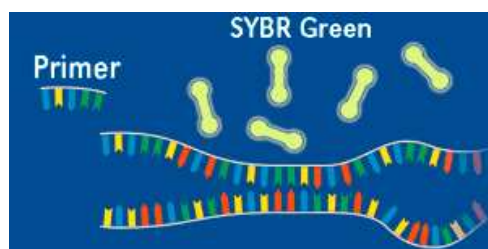
In commercio sono presenti diversi kit di amplificazione basati sull'uso di molecole fluorescenti.

La fluorescenza si genera durante la PCR per effetto di diverse reazioni chimiche basate:

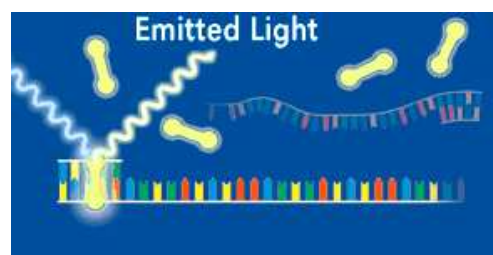
- sul legame di coloranti fluorescenti (es. SYBR Green) che si legano alle molecole del DNA in modo **aspecifico**
- sull'ibridazione di sonde **specifiche** per il frammento di interesse, marcate con molecole fluorescenti



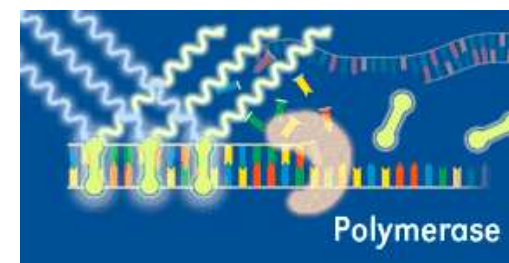
SYBR Green



All'inizio del processo di amplificazione, la miscela di reazione contiene DNA denaturato, primers e la molecola fluorescente



Dopo l'annealing dei primers, si legano poche molecole fluorescenti alla doppia elica.



Durante l'elongazione si verifica un aumento di fluorescenza che corrisponde all'aumento del numero di copie dell'amplicone

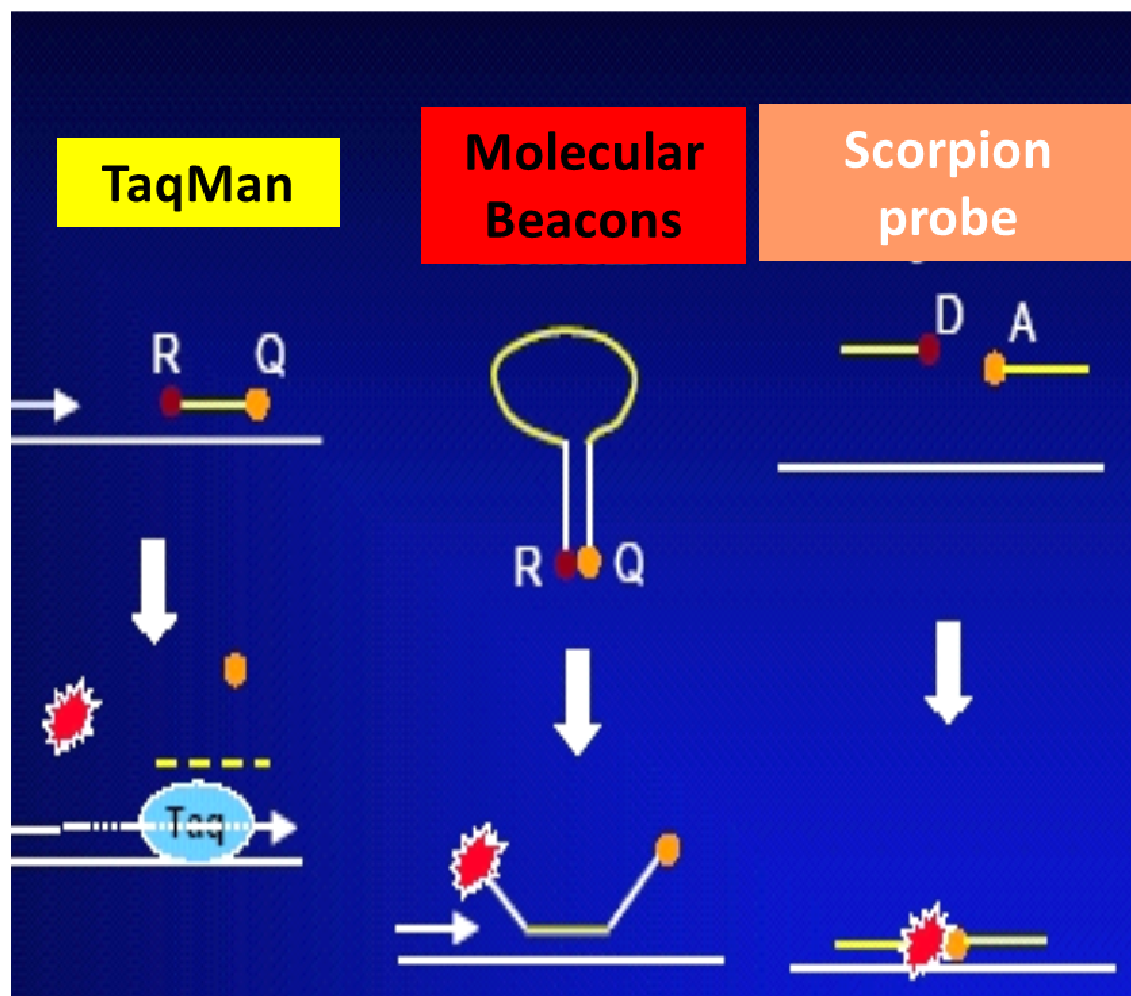
- la molecola fluorescente si lega **random** a tutte le doppie eliche, inclusi i dimeri di primers
- è necessario ottimizzare la metodica per evitare la formazione di prodotti aspecifici



Sonde specifiche

Esistono diversi tipi di sonde:

- Sonde a idrolisi:
TaqMan
- Sonde a ibridazione:
FRET
Molecular beacons
Scorpion probes

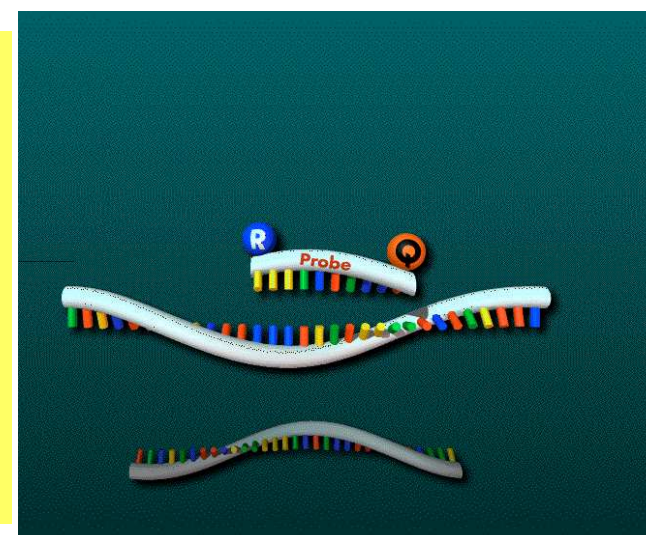


Sonda TaqMan

La sonda di tipo TaqMan è un oligonucleotide che, come i primers della PCR, viene disegnato per essere complementare alla sequenza bersaglio da amplificare.

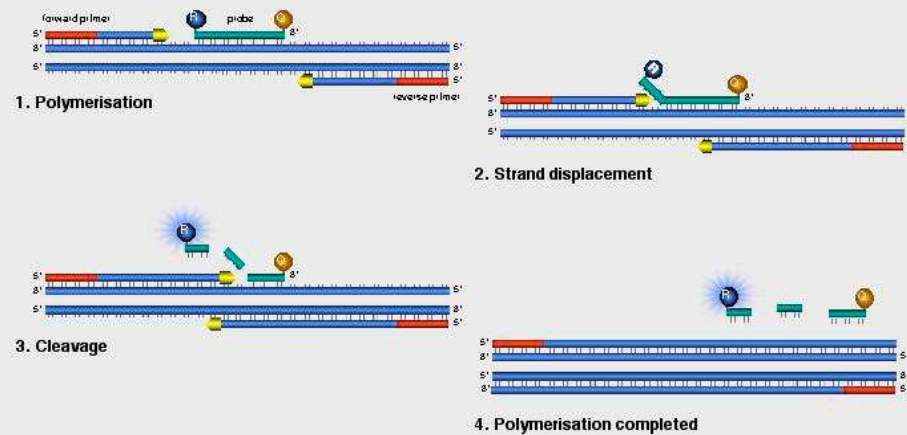
La sonda è disegnata in modo da ibridarsi all'interno del frammento amplificato nella reazione di PCR.

Presenta all'estremità 5' un fluoroforo "Reporter" ed all'estremità 3' una molecola "Quencher".



Sonda TaqMan

Fluorogenic 5' nuclease assay (TaqMan[®] chemistry)



5' REPORTER (R): fluorocromo ad energia che emette fluorescenza

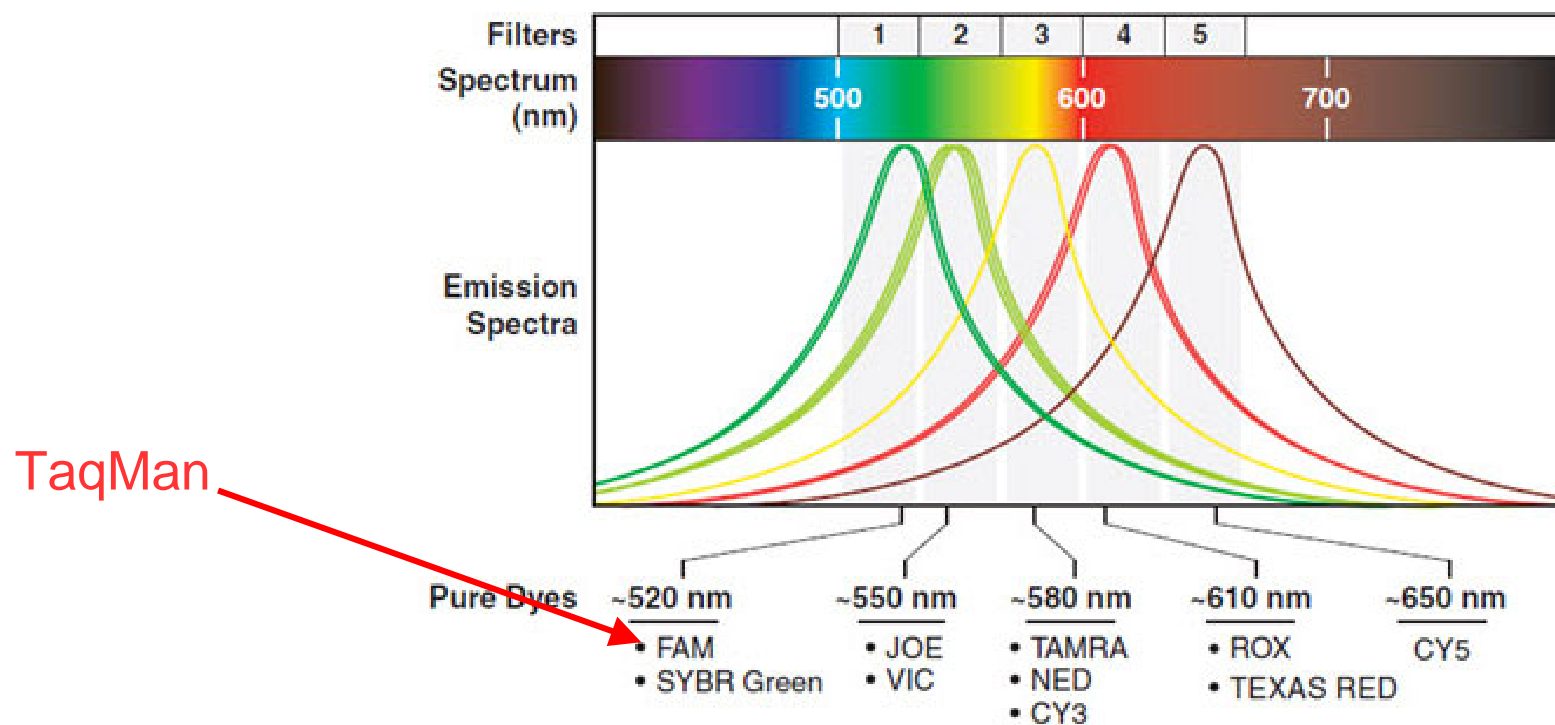
3' QUENCHER (Q): fluorocromo a energia che spegne la fluorescenza del reporter

Se **R** e **Q** si trovano vicini, Q spegne l'effetto di R perchè i fotoni di R vengono assorbiti da Q

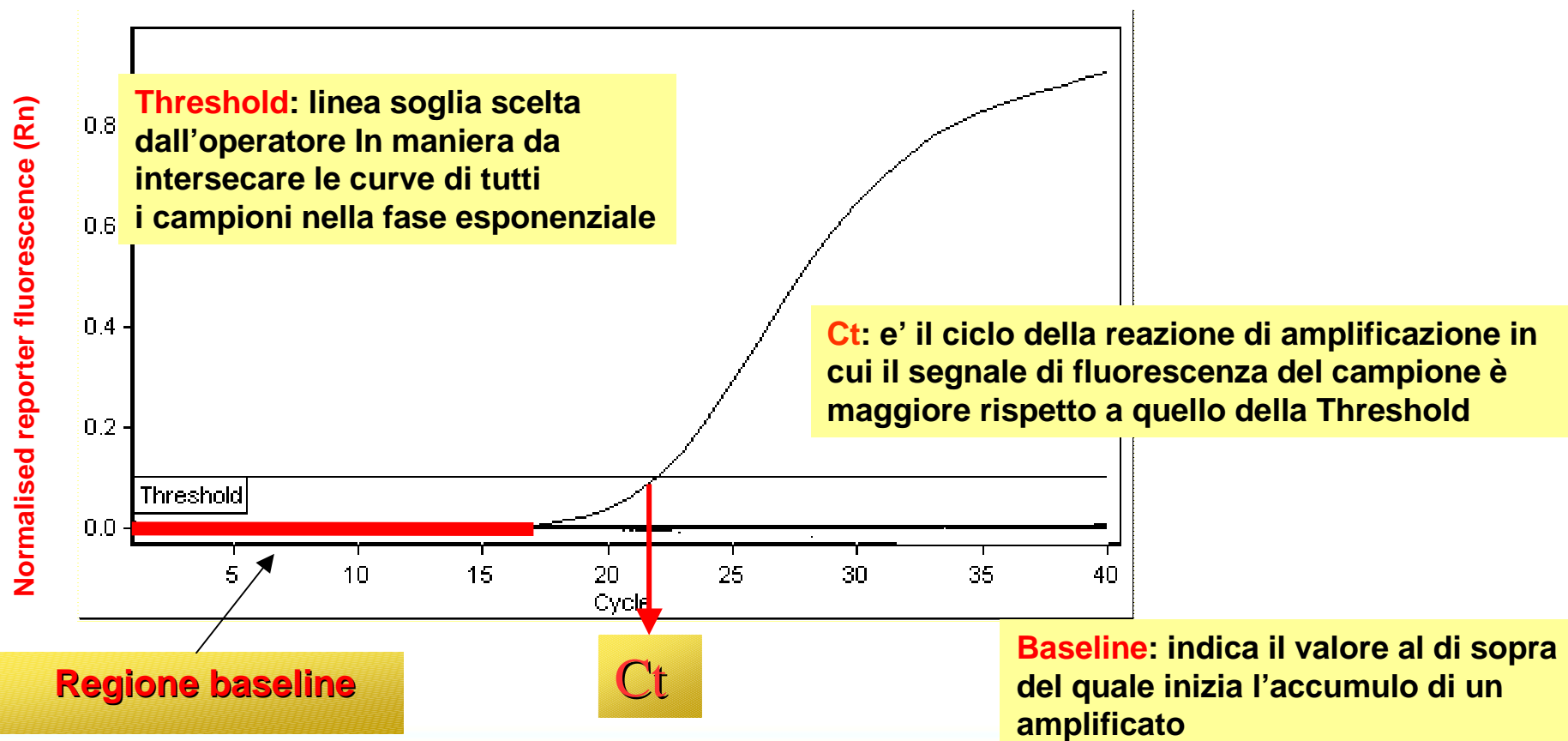
L'aumento di fluorescenza del Reporter è direttamente proporzionale al numero di ampliconi generati



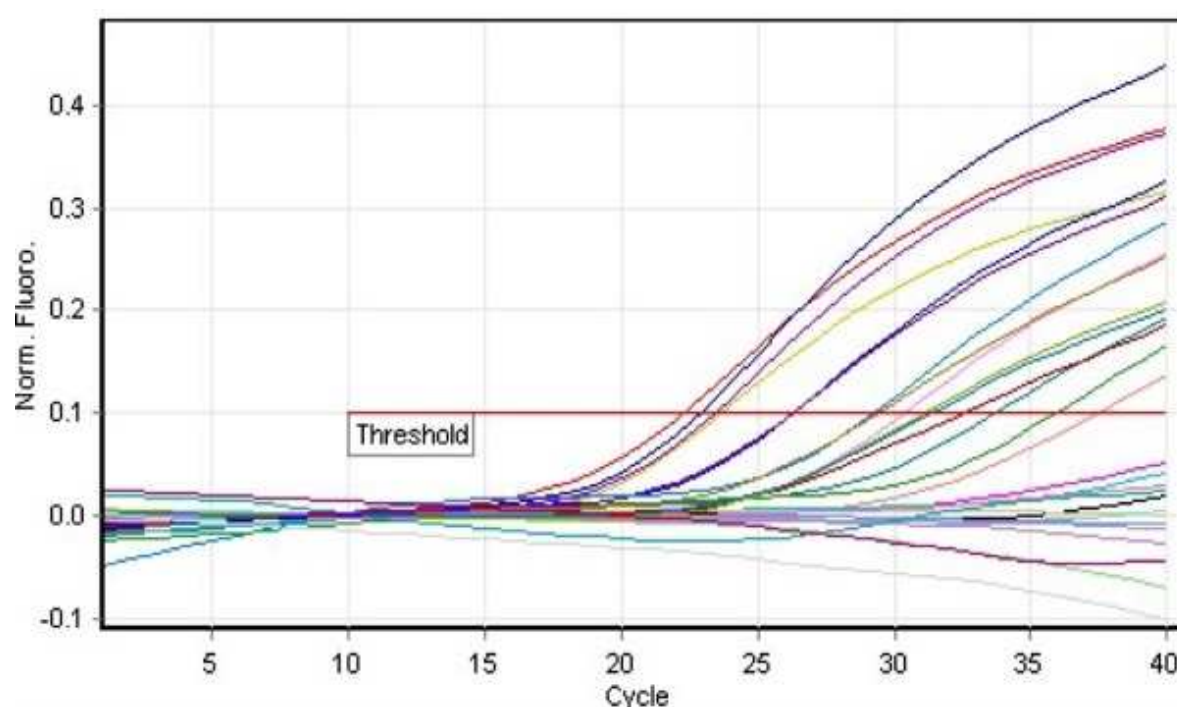
Sonda TaqMan: canali di acquisizione



Analisi della cinetica della reazione Real-Time PCR

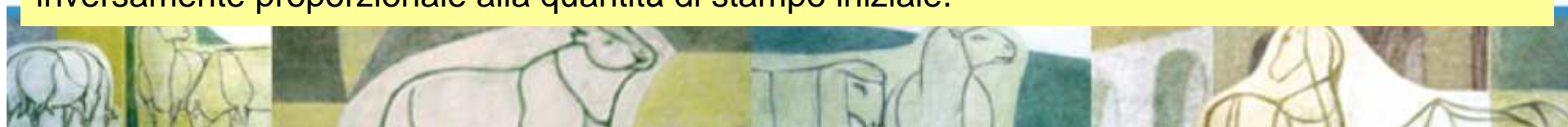


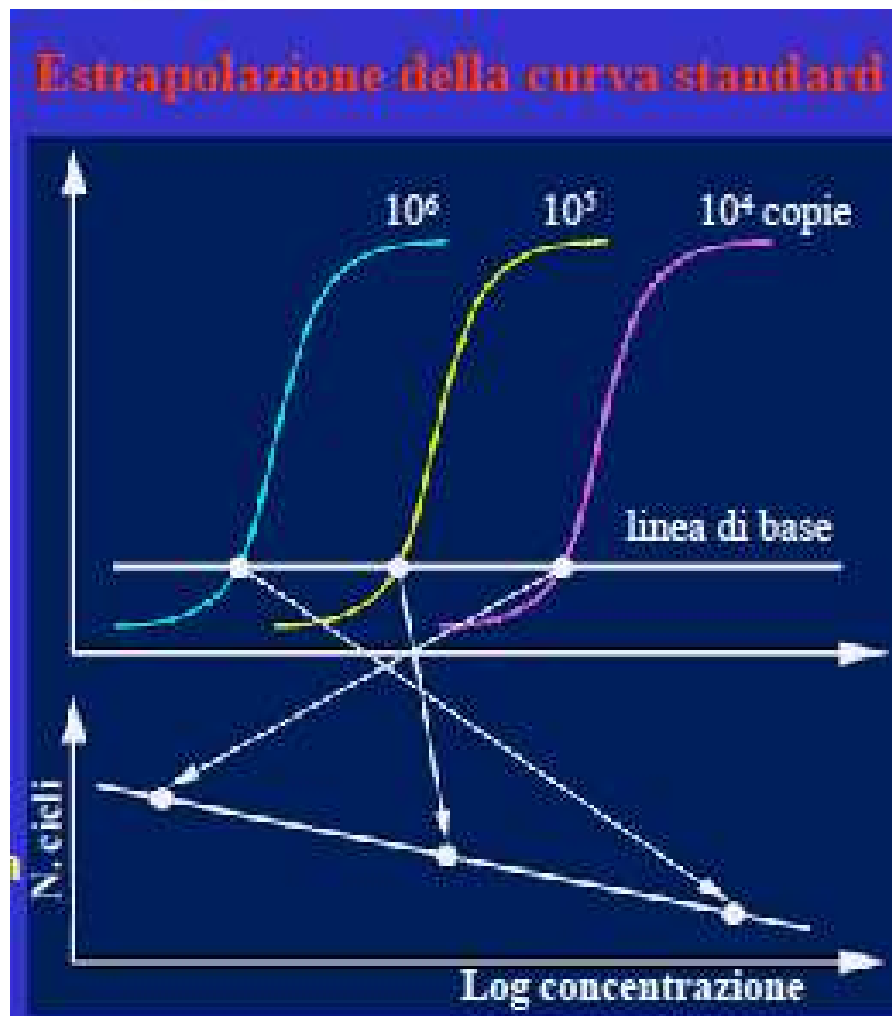
Analisi della cinetica della reazione Real-Time PCR



Lo strumento determina il numero iniziale di copie del DNA bersaglio analizzando ciclo per ciclo la variazione del segnale della fluorescenza come risultato dell'amplificazione del DNA durante la PCR.

Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione il cui CT (=Threshold Cycle) è inversamente proporzionale alla quantità di stampo iniziale.





Quantificazione ASSOLUTA

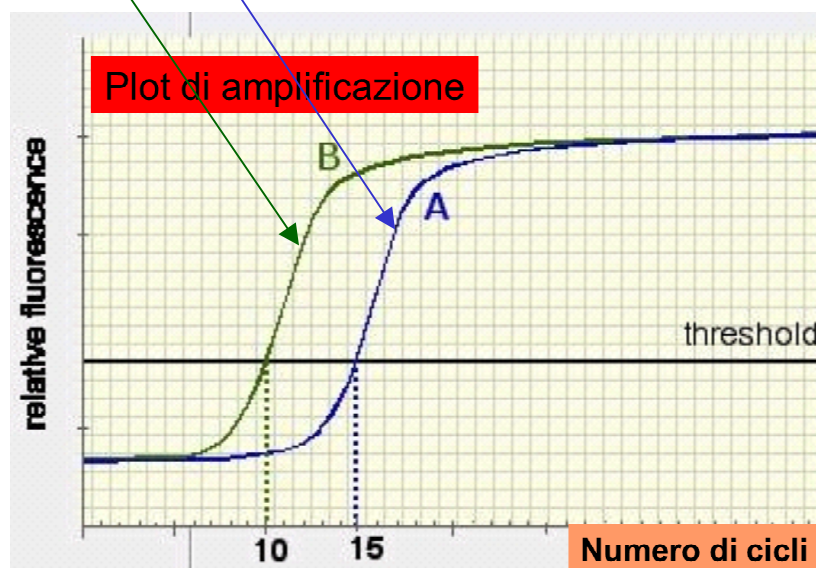
- i campioni sono quantificati in modo assoluto
- necessita di **standard** a concentrazione scalare nota con i quali si costruisce una curva standard
- per tutti gli *unknowns* devono essere saggiate identiche quantità di campioni



Quantificazione RELATIVA

campione

controllo endogeno



$$\Delta C_T$$

- la quantificazione viene effettuata paragonando i C_T
- non si utilizza una curva standard
- necessita di controlli endogeni (geni di controllo o housekeeping) e richiede la loro quantificazione per normalizzare l'espressione del gene studiato.
- gli *unknowns* vengono "quantificati" paragonando il loro C_T con quello del controllo endogeno



Il dubbio diagnostico, soprattutto nelle prime fasi della malattia,
legato ad una sintomatologia non patognomonica di leishmaniosi
spesso accompagnata da esiti di altri esami di laboratorio non
indicativi di leishmaniosi



Sviluppo e applicazione delle metodiche *qualitative* di
PCR standard e PCR Nested



Importanza delle metodiche di PCR nella diagnostica della leishmaniosi canina

è possibile effettuare la quantificazione della
carica parassitaria rilevata, quando si tratta o di
campioni fluidi quali sangue e midollo osseo
oppure di biopsie d'organo che possano essere
pesate



dalla quantificazione del DNA stampo presente
all'inizio della reazione deriva una stima della
carica parassitaria presente nel campione in
esame





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Importanza delle metodiche di PCR nella diagnostica della leishmaniosi canina

Monitorare l'andamento della malattia in corso di terapia
mediante quantificazione della carica parassitaria



Sviluppo e applicazione della metodica *quantitativa* di
PCR Real-time



VANTAGGI

PCR tradizionale

- costi più contenuti

SVANTAGGI

- analisi solo qualitativa
- minore specificità
- rischio inquinamento più basso
- tempi di risposta più lunghi

PCR Real-time

- analisi quantitativa
- alta specificità
- alta sensibilità
- rischio inquinamento più basso
- rapidità

- laboratori attrezzati
- personale specializzato
- costi più elevati





cautele nell'interpretazione dei risultati della PCR

- in genere la PCR rileva, in maniera più attendibile e con maggior precisione, gli stadi precoci della malattia e quindi anche i casi transitori ed autolimitanti, cioè quei cani che in qualche modo risolvono l'infezione.
- la PCR non permette di differenziare un parassita “vivo” da uno “morto” (può rilevare la presenza di DNA parassitario non vitale, con la possibilità di risultati falsamente positivi).



Pcr real time per leishmania spp.

Nel nostro laboratorio utilizziamo il kit **Primerdesign™ genesig®** progettato per amplificare e quantificare una sequenza *Leishmania*-genere specifica.

Il kit contiene:

- **controllo interno** del processo di estrazione, costituito da DNA esogeno da aggiungere al tampone di lisi al momento dell'estrazione dei campioni (VIC labeled) da amplificare con reazione multiplex insieme al DNA di *Leishmania* spp (FAM labeled)
- **controllo di estrazione** (β -actina) per valutare la qualità del DNA estratto dal campione in esame, da amplificare separatamente (FAM labeled)
- **controllo positivo** per *Leishmania* spp.



Pcr real time per leishmania spp.

-specificità:

I primers e la sonda specifica per *Leishmania* spp. presentano una omologia del 100% con sequenze di riferimento di numerose specie di *Leishmania* clinicamente rilevanti ottenute con l'ausilio di analisi bioinformatiche.

-sensibilità:

capacità di rilevare meno di 100 copie di sequenza target.



Grazie per l'attenzione

