

«La tecnica della PCR nel monitoraggio microbiologico delle acque»

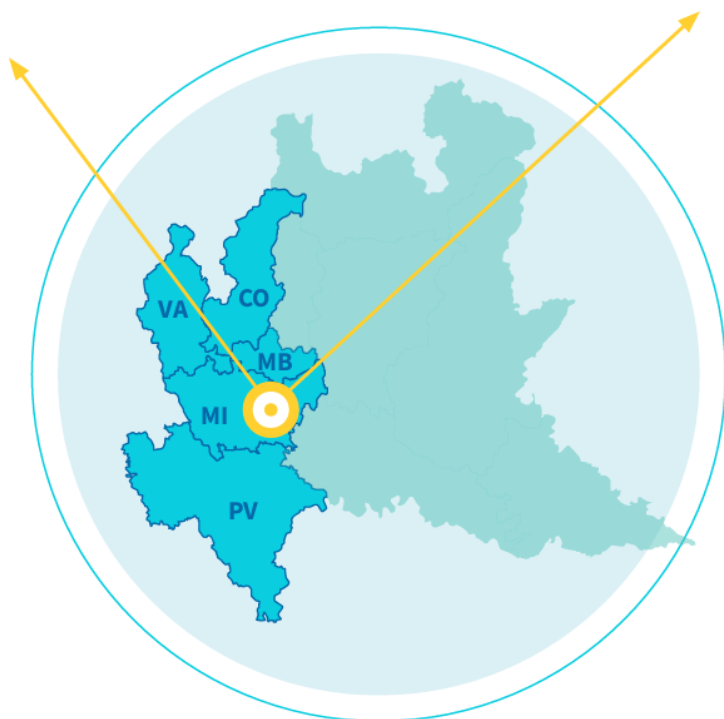
NH Milano Congress Centre – Assago (MI) 16 giugno
2026

Chi siamo?

Il territorio

Siamo l'azienda di gestione del servizio idrico integrato della **Città metropolitana di MILANO** e di alcuni comuni delle province di:

- Como
- Monza e Brianza
- Pavia
- Varese



La sede principale è in via Rimini, 38 a Milano.

Gruppo CAP, chi siamo

Trasparenza, responsabilità e partecipazione sono i principi che ci guidano nella gestione del Servizio Idrico Integrato nel territorio della Città metropolitana di Milano e dei comuni nelle province limitrofe.

Il Gruppo

Gruppo CAP gestore del Servizio Idrico Integrato, si colloca tra i **principali operatori italiani**.



2,5Mio

NUMERO
DI CITTADINI SERVITI

Gruppo CAP è la prima monutility pubblica per **patrimonio** nello scenario nazionale.



I nostri numeri

oltre **242** Mln

M³ DI ACQUA
IMMESSA IN RETE

100%

RETE ACQUEDOTTISTICA
CONTROLLATA CON
WATER SAFETY PLAN

202,73

LITRI DI UTILIZZO
GIORNALIERO PRO CAPITE
DI ACQUA

40

IMPIANTI DI
DEPURAZIONE

oltre **278** Mln

M³ DI ACQUA REFLUA
TRATTATA

81

VASCHE VOLANO
IN GESTIONE

Un impegno verso il Pianeta

I cambiamenti climatici avranno un impatto inevitabile sulla gestione della risorsa idrica. In particolar modo, **impianti e infrastrutture** saranno esposti ai maggiori rischi, con danni che potrebbero concretizzarsi con maggiore frequenza e costi rilevanti per l'azienda, il territorio e le persone. Tra i rischi più probabili correlati alla crisi climatica in atto vi è la **riduzione della quantità della risorsa idrica rinnovabile**. Efficientamento della rete, riduzione e contenimento delle perdite idriche e uno sguardo attento al pianeta e alle sue risorse sono alcuni dei temi che ci guidano verso una rotta sostenibile.



42%
la media
dell'acqua estratta
che in Italia
viene dispersa e
non raggiunge
la destinazione
prevista.¹



+50%
la crescita dei
disastri naturali
legati all'acqua;
negli ultimi 10
anni si è registrata
una frequenza di
4 volte maggiore
rispetto al 1980.²

I nostri numeri

Oltre **29** Mln

DI MJ DI RISPARMI
ENERGETICI

25

IMPIANTI DI DEPURAZIONE
AUTORIZZATI AL RIUSO
IDRICO

115.337.272

M³ DI ACQUA RIUTILIZZATA

3,92 tons

TONS DI CO₂ EQ EVITATE
GRAZIE ALLA MOBILITÀ
ELETTRICA

548.831

SM³ PRODUZIONE DI BIOMETANO
DAI REFLUI FOGNARI

0%

DI SMALTIMENTO FANGHI
IN DISCARICA

Verso la carbon neutrality

Climate action ed economia circolare

L'economia circolare è il perno attorno al quale strutturiamo la nostra strategia di sostenibilità, con un'attenzione costante alla riduzione degli impatti ambientali e all'**utilizzo dell'acqua come volano** per lo sviluppo di energie sostenibili. Anche nel 2022, inoltre, abbiamo raggiunto la **neutralità carbonica**, compensando la totalità delle emissioni prodotte grazie a investimenti in progetti che garantiscono benefici sociali, economici e ambientali su scala globale. Contribuiamo anche così agli obiettivi dell'Agenda 2030.



6%

l'aumento di
emissioni di CO₂
registrato in Italia
alla fine del 2022.⁴



7,2%

il tasso di
circularità
dell'economia
mondiale.⁵

Infrastruttura acquedotto Città Metropolitana Milano



- 133 comuni gestiti;
- Approvvigionamento da pozzi ad uso-idropotabile distribuiti su tutto il territorio;
- Rete di distribuzione fortemente magliata ed interconnessa;
- Presenza di serbatoi di accumulo di tipo pensile;
- Presenza di n. 3 centrali di produzione dell'acqua;
- Rete di adduzione di 96 km nell'area a nord-est del territorio gestito che si diparte dalle centrali di Pozzuolo M. e Trezzo S.A. verso i territori di MB



133 Comuni



1.845.422
Abitanti



722 Pozzi
Ad uso idro-
potabile



301
Impianti di
trattamento



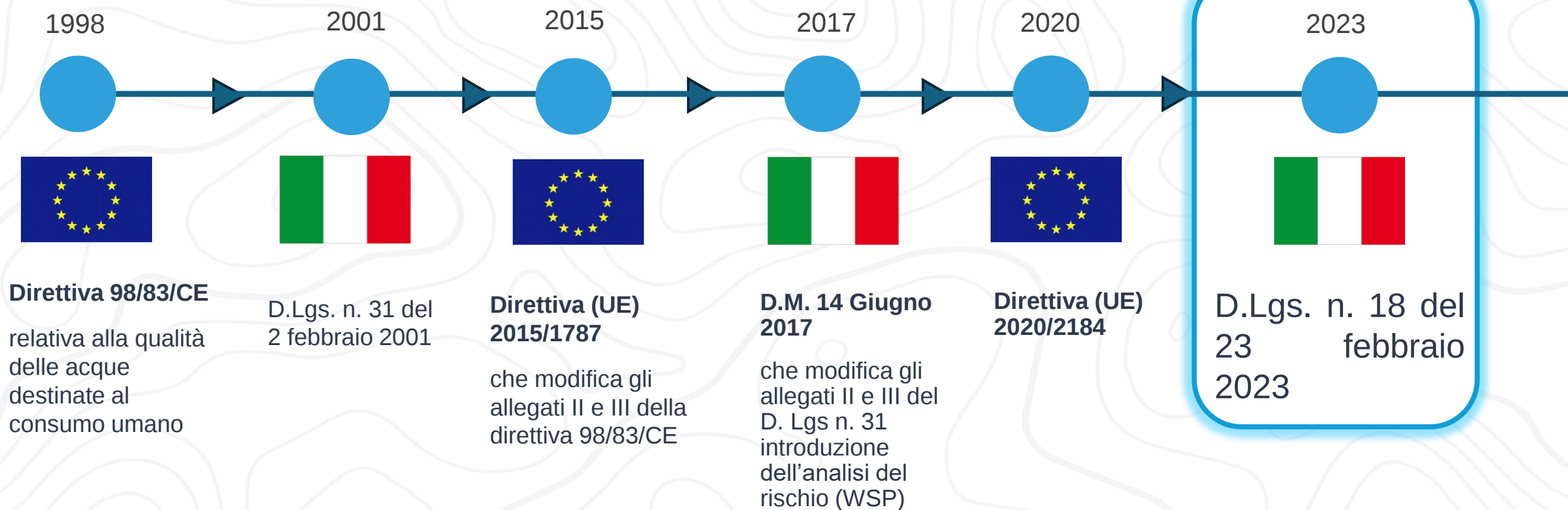
6.461 km
Lunghezza della rete
acquedotto totale



242 milioni m³
Acqua erogata



Quali normative si applicano per le acque potabili?



Finalità: proteggere la salute umana dagli effetti negativi derivanti dalla contaminazione delle acque, garantendone la salubrità e la pulizia.



POTABILITÀ: REQUISITI MINIMI D. lgs 18/23



NON deve contenere microrganismi e parassiti, né altre sostanze, in quantità o concentrazioni tali da rappresentare un potenziale pericolo per la salute umana.



deve avere **caratteristiche microbiologiche e chimiche conformi** ai Valori di Parametro fissati nelle tabelle presenti nell'Allegato I, Parte A e Parte B:

35 Parametri Chimici
2 Parametri Microbiologici
18 Parametri Indicatori



In caso di **non conformità** ai valori di parametro dell'allegato I, l'autorità d'ambito sentita l'ATS, deve prendere i provvedimenti necessari per **ripristinare la qualità dell'acqua** ove ciò sia necessario per tutelare la salute umana.

parametri CHIMICI e MICROBIOLOGICI

Parametri chimici		
Parametro	Valore di parametro	Unità di misura
Acrilammide	0,1	µg/l
Antimonio	5	µg/l
Arsenico	10	µg/l
Benzene	1	µg/l
Benzo(a)pirene	0,01	µg/l
Boro	1	µg/l
Bromato	10	µg/l
Cadmio	5	µg/l
Cromo	50	µg/l
Rame	10	mg/l
Cianuro	50	µg/l
1,2 Dicloroetano	3	µg/l
Epicloridrina	0,1	µg/l
Fluoruro	1,5	mg/l
Piombo	10	µg/l
Mercurio	1	µg/l
Nichel	20	µg/l
Nitrato (come NO ₃)	50	mg/l
Nitrito (come NO ₂)	0,5	mg/l
Antiparassitari	0,1	ug/l

Parametri chimici		
Parametro	Valore di parametro	Unità di misura
Antiparassitari-Totale	0,5	µg/l
Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)	0,1	µg/l
Selenio	10	µg/l
Tetracloroetilene + Tricloroetilene	10	µg/l
Triometani-Totale	30	µg/l
Cloruro di vinile	0,5	µg/l
Clorito	200	µg/l
Vanadio	50	µg/l

Parametri microbiologici	
Parametro	Valore di parametro (numero/100 ml)
Escherichia coli (E. coli)	0
Enterococchi	0



Parametri indicatori

Parametro	Valore di parametro	Unità di misura
Alluminio	200	mg/l
Ammonio	0,5	mg/l
Cloruro	250	mg/l
Clostridium perfringens (spore comprese)	0	Numero/100ml
Colore	Accettabile per i consumatori e senza variazioni anomale	
Conduttività	2500	µScm ⁻¹ a 20° C
concentrazione ioni idrogeno	≤6,5 e ≥ 9,5	Unità pH
Ferro	200	mg/l
Manganese	50	mg/l
Odore	Accettabile per i consumatori e senza variazioni anomale	
Ossidabilità`	5	mg/l O2
Solfato	250	mg/l
Sodio	200	mg/l
Sapore	Accettabile per i consumatori e senza variazioni anomale	
Conteggio delle colonie a 22° C	Senza variazioni anomale	
Batteri coliformi a 37° C	0	Numero/100 ml
Carbonio organico totale (TOC)	Senza variazioni anomale	
Torbidità	Accettabile per i consumatori e senza variazioni anomale	
Durezza *		
Residuo secco a 180° C **		
* valori consigliati: 15-50° F** valore massimo consigliato: 1500 mg/L*** valore consigliato 0,2 mg/L (se impiegato) (16)		

Definizione dei limiti di legge



Ministero della Salute

I parametri e i valori parametrici della direttiva, così come il recepimento nazionale di questi, sono basati sulle conoscenze scientifiche disponibili, tenendo conto del principio di precauzione, al fine di garantire che le acque possano essere utilizzate e **consumate in condizioni di sicurezza nell'intero arco della vita**. In generale, i valori parametrici individuati si fondano sugli orientamenti stabiliti dall'Organizzazione mondiale della Sanità (WHO).

ALLEGATO III

SPECIFICHE PER L'ANALISI DEI PARAMETRI

DECRETO LEGISLATIVO 23 febbraio 2023 , n. 18

«Parte A

Parametri microbiologici per i quali sono specificati i metodi di analisi

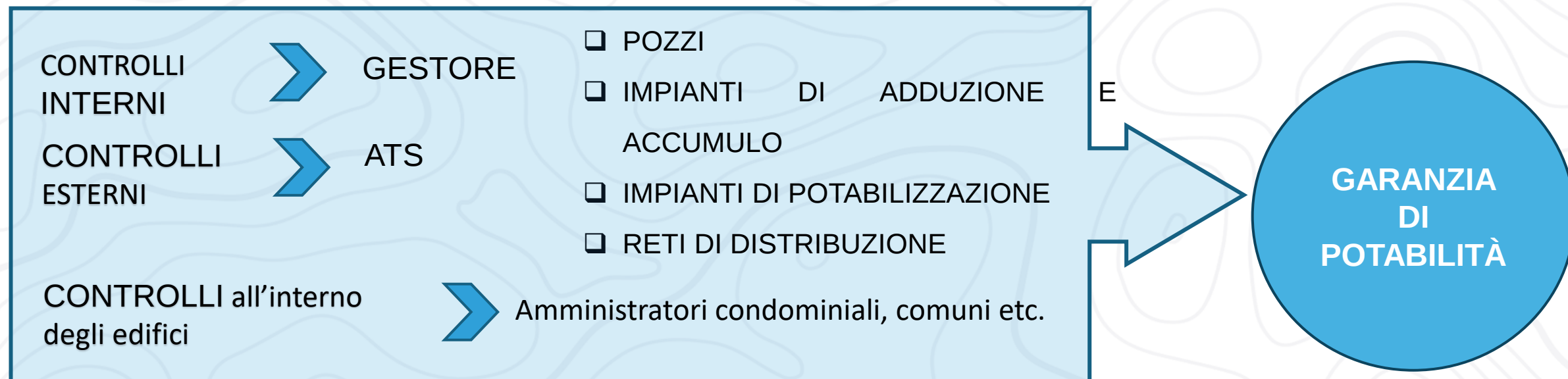
Per ciascuno dei parametri microbiologici elencati nelle Parti A, C e D, i metodi d'analisi per i parametri microbiologici sono:

- a) *Escherichia coli* e batteri coliformi (UNI EN ISO 9308-1 o UNI EN ISO 9308-2);
- b) Enterococchi intestinali (UNI EN ISO 7899-2);
- c) conteggio delle colonie o conteggio degli eterotrofi su piastra a 22°C (UNI EN ISO 6222);
- d) *Clostridium perfringens* spore comprese (UNI EN ISO 14189);
- e) *Legionella* (UNI EN ISO 11731 conforme al valore stabilito nell'allegato I, Parte D)

sia per il controllo di verifica basato sul rischio, sia per integrare i metodi colturali, possono essere utilizzati in aggiunta altri metodi, quali metodi colturali rapidi, metodi non colturali, metodi molecolari, tra cui qPCR, eseguita in accordo alla ISO/TS 12869

Come e dove vengono effettuati i controlli?

CONTROLLI



Dove effettuiamo i controlli: Impianti di potabilizzazione

Filtri a carbone attivo (circa 250 impianti)

- Solventi (clorurati e aromatici)
- Erbicidi & Pesticidi
- Microinquinanti vari

Osmosi inversa (circa 15 impianti)

- Nitrati
- Cromo

Ossidazione/Filtrazione (circa 40 impianti)

- Ferro, Manganese, Arsenico
- Ammoniaca

Disinfezione (Biossido, Ipoclorito, Ozono)

- Batteri coliformi, E. coli,
- Enterococchi,
- Pseudomonas aeruginosa

Con che frequenza facciamo le analisi?



Dal WSP all'attività analitica del laboratorio

WSP



PIANO DI CAMPIONAMENTO



PIANO DI ANALISI



LABORATORIO ANALISI ACQUA POTABILE

	2020	2021	2022	2023	2024
N. prelievi	28.857	19.911	18.183	21.877	23.458
N. determinazioni analitiche	799.000	782.656	728.865	866.325	1.090.428



Laboratorio Accreditato secondo norma UNI CEI EN ISO 17025:2018

L'accreditamento è garanzia di:

- Competenza tecnica e imparzialità del personale addetto alle prove
- Risultati accurati e affidabili
- Imparzialità del Laboratorio



ACCREDIA è l'Ente unico nazionale riconosciuto dallo Stato italiano ai fini dell'accreditamento dei laboratori di prova

Il laboratorio

LABORATORIO MISURE CHIMICO- FISICHE E SPETTROMETRIA UV

(analisi parametri
semplici pH,
conducibilità ecc.
*analisi nitriti, cromati,
ammoniaca, ecc.)*

LABORATORIO SCINTILLAZIONE

(analisi radioattività,
alfa e beta totale,
Radon)

LABORATORIO CROMATOGRAFIA IONICA

(analisi anioni e cationi,
cloruri, solfati, nitrati)

LABORATORIO MICROBIOLOGIA

(Batteri coliformi
totali, E. Coli,
Enterococchi,
Pseudomonas,
Legionella ecc.)

LABORATORIO
GAS CROMATOGRAFIA
e CROMATOGRAFIA
LIQUIDA (analisi
solventi clorurati, e
microinquinanti
emergenti)

LABORATORIO
SPETTROMETRIA
emissione atomica
plasma (ICP-MS)
(metalli)



RISCHIO ACUTO vs RISCHIO CRONICO

RISCHIO BIOLOGICO:

Gli agenti biologici che possono contaminare le acque da destinare e destinate a consumo umano sono rappresentati da batteri, virus e parassiti.

A causa della loro capacità di diffondersi rapidamente attraverso l'acqua e di provocare **effetti acuti** sulla salute, i microrganismi patogeni rappresentano il rischio maggiore associato al consumo delle acque

Esempi:

- **Legionella**
- **Coliformi (citrobacter)**



Vs

RISCHIO CHIMICO:

La presenza di inquinanti chimici in acque destinate al consumo umano - a differenza di quanto avviene per la contaminazione microbiologica - raramente causa patologie di tipo acuto, associandosi invece, ad un potenziale rischio di **malattie cronico-degenerative**, in primo luogo patologie tumorali

Esempi:

- **Cromo VI**
- **Arsenico**
- **LM6 (microinquinanti)**



Polimerase Chain Reaction

La **P**olymerase **C**hain **R**eaction o PCR è una tecnica relativamente recente che ha rivoluzionato la Biologia molecolare. Ideata da Kary Mullis intorno ai primi anni '80, è stata perfezionata e automatizzata al punto da sostituire molte tecniche di clonaggio tradizionali. Numerose varianti della PCR trovano applicazioni, tra l'altro, nella ricerca di base, in diagnostica molecolare e in ambito forense.

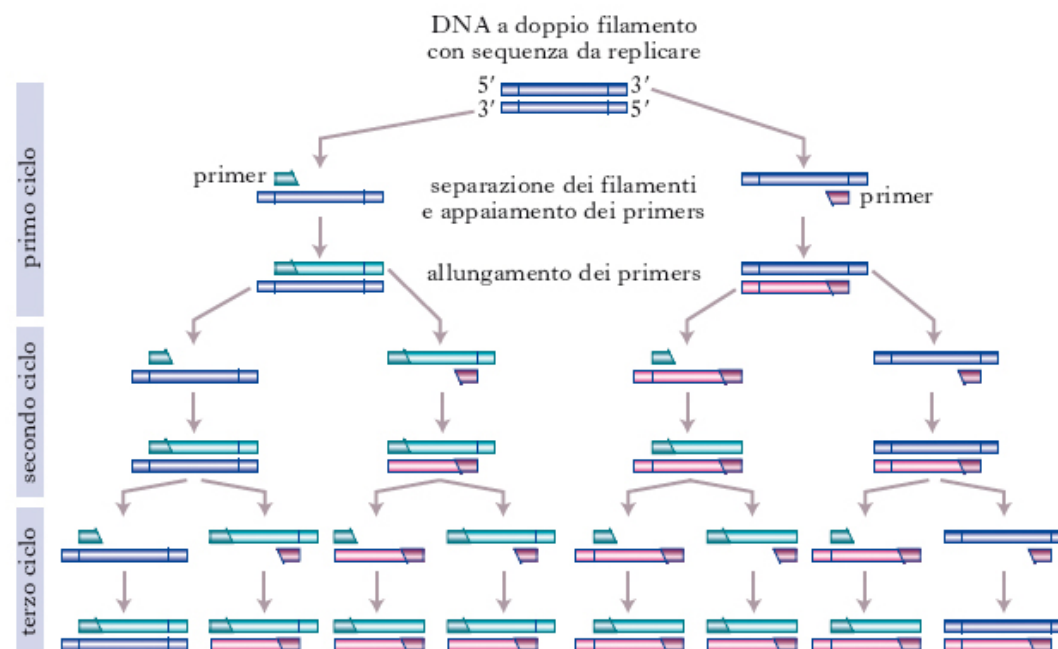


Polimerase Chain Reaction

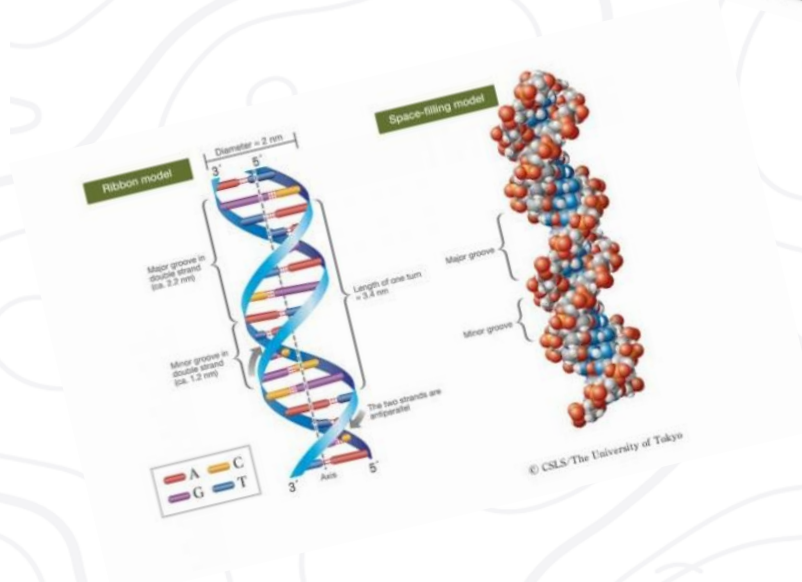
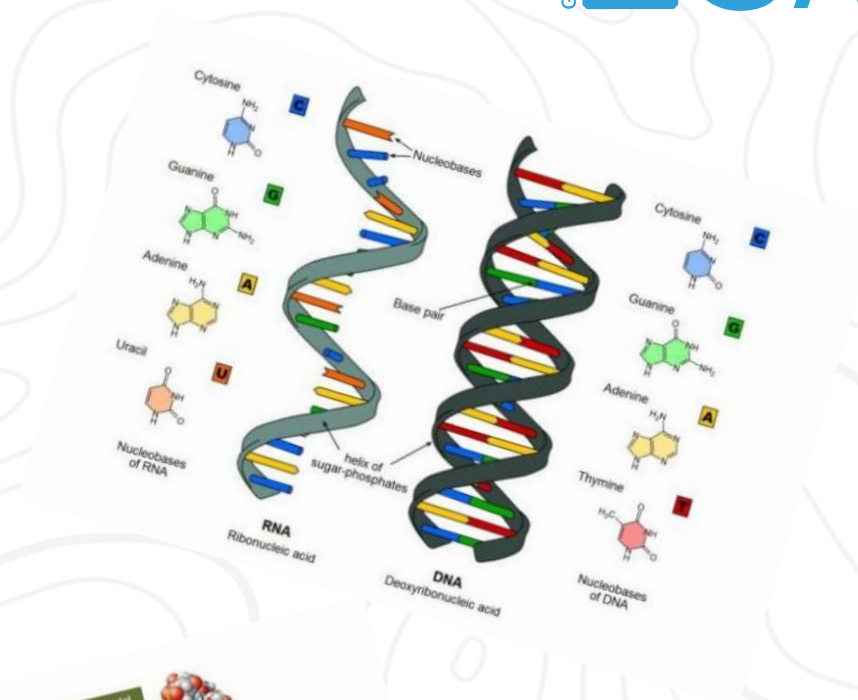
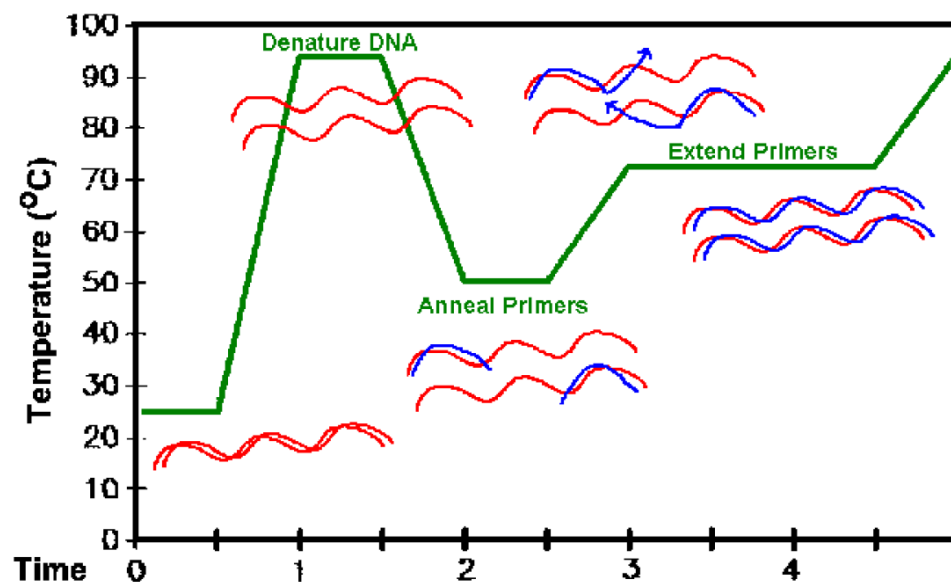
La tecnica della PCR si basa sull'amplificazione di specifici frammenti compresi tra le estremità 5' e 3' di due primers definiti dallo sperimentatore, attraverso la ripetizione di n cicli, ciascuno dei quali include uno step di denaturazione, uno di appaiamento ed uno di estensione.

Caratteristiche di questa tecnica sono: sensibilità, specificità e versatilità.

L'amplificazione della sequenza bersaglio è pari a circa 2^{n-2} . In pratica dopo 30 cicli di PCR la nostra sequenza bersaglio si sarà amplificata circa 2^{28} volte, producendo più di 250 milioni di molecole.



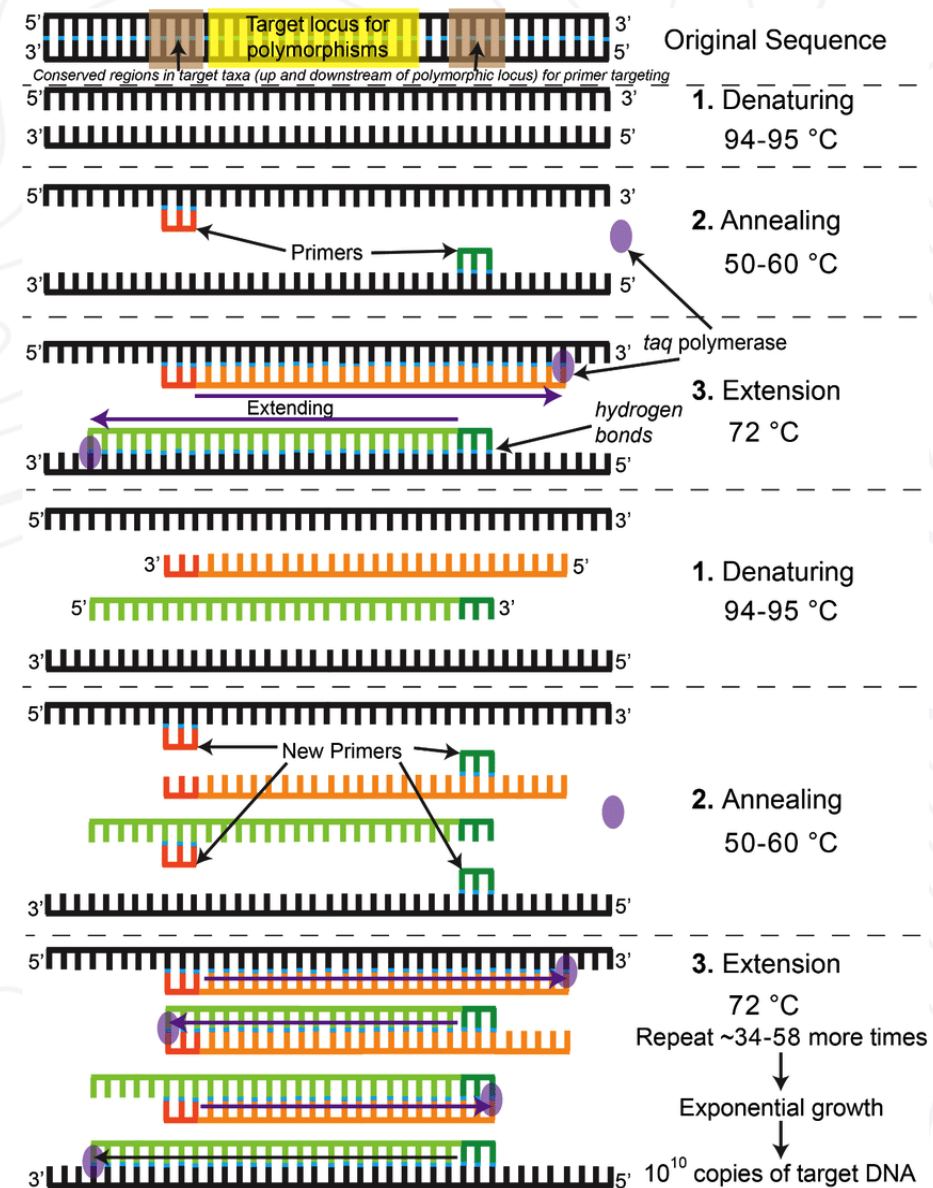
Polymerase Chain Reaction



Polimerase Chain Reaction

Ingredienti:

1. Due oligonucleotidi complementari a due regioni situate sui due filamenti opposti del DNA stampo ai lati della regione che si vuole amplificare
2. DNA stampo contenente la regione da amplificare
3. DNA Polimerasi termostabile
4. I 4 deossiribonucleotidi trifosfati

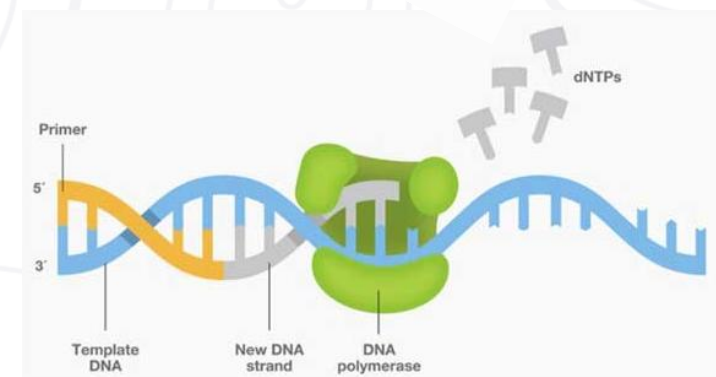
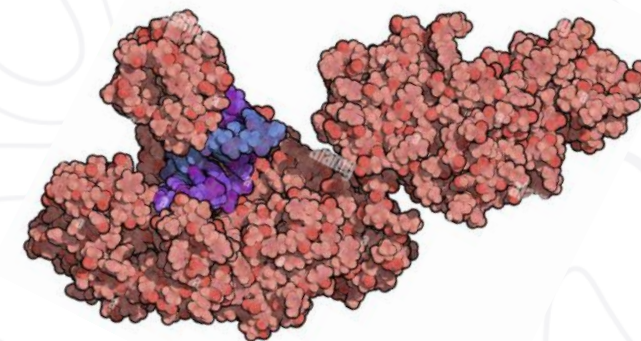


Taq polimerasi

Le prime PCR, effettuate utilizzando la polimerasi Klenow, erano molto inefficienti perché, essendo termolabili, dovevano essere aggiunte ad ogni ciclo di amplificazione. Un significativo miglioramento della tecnica si deve all'uso di DNA pol termostabile isolata da *Thermus aquaticus*, batterio isolato nelle pozze termali. Questa polimerasi ha un optimum a 72°C e resiste alle alte temperature usate negli step di denaturazione permettendo l'automatizzazione dell'intera procedura, oltreché un deciso miglioramento della specificità della reazione. Esistono oggi numerose varianti della Taq polimerasi, come le polimerasi isolate da *Thermus flavus* (Tfl polimerasi), *Thermus thermophilus* (Tth polimerasi) e molte altre.

Caratteristiche importanti di queste polimerasi sono:

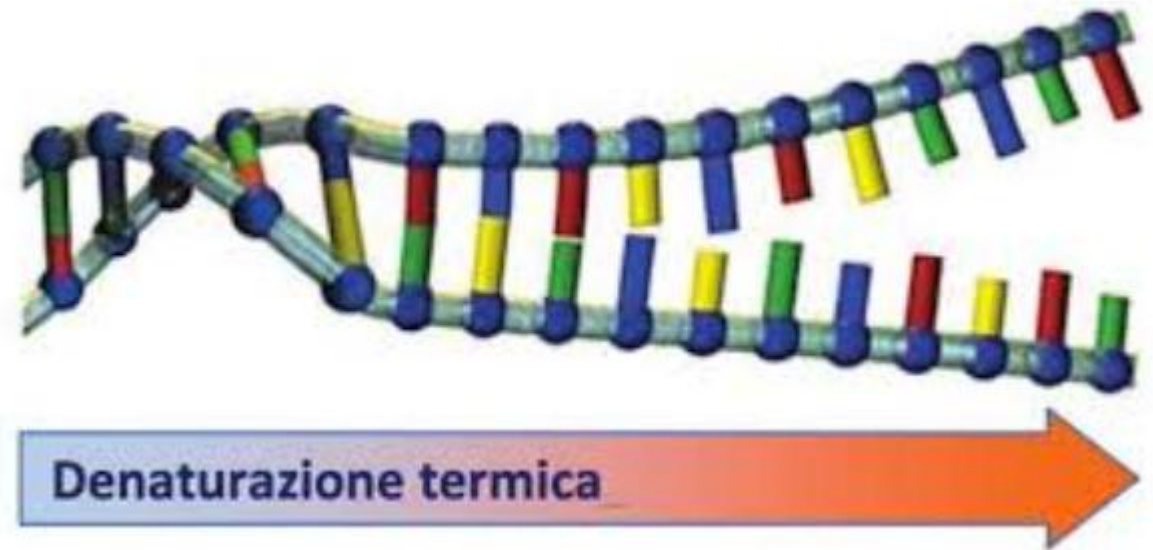
- la termostabilità,
- la processività (affinità per lo stampo che determina il numero di basi incorporate prima della dissociazione),
- la fedeltà di incorporazione (solo le proofreading).



Denaturazione

Durante questa fase, il cocktail contenente il DNA stampo e tutti gli altri ingredienti principali viene riscaldato a 94-95 °C.

L'alta temperatura provoca la rottura dei legami a idrogeno tra le basi dei due filamenti di DNA stampo e la loro separazione. Ciò si traduce in due singoli filamenti di DNA, che fungeranno da stampo per la produzione dei nuovi filamenti di DNA. È importante che la temperatura venga mantenuta a questo livello per un tempo sufficiente a garantire la completa separazione dei filamenti di DNA. Questo processo richiede in genere dai 15 ai 30 secondi.



Annealing

Durante questa fase, la reazione viene raffreddata a 50-65 °C. Ciò permette ai primer di legarsi a una posizione specifica sul filamento singolo di DNA stampo tramite legami a idrogeno (la temperatura esatta dipende dalla temperatura di fusione dei primer utilizzati).

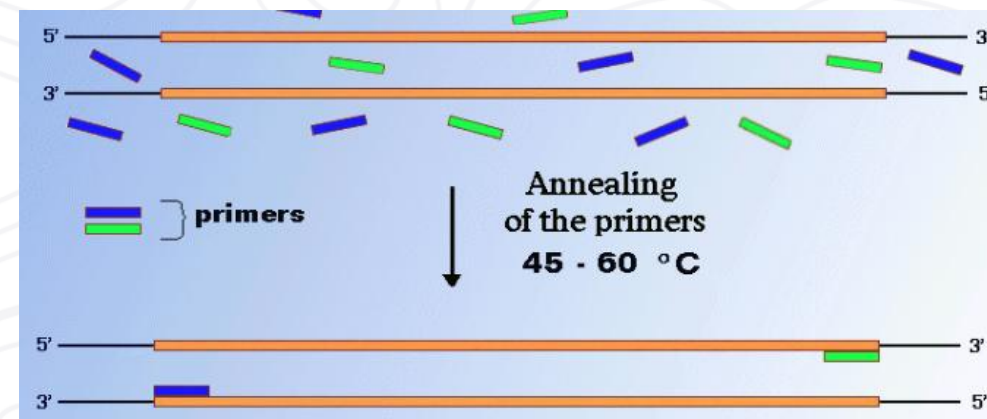
I primer sono sequenze di DNA o RNA a singolo filamento, lunghe circa 20-30 basi.

I primer sono progettati per essere complementari a brevi sezioni di DNA alle estremità della sequenza da copiare.

I primer fungono da punto di partenza per la sintesi del DNA. L'enzima polimerasi può aggiungere basi di DNA solo a un doppio filamento di DNA. Solo dopo che il primer si è legato, l'enzima polimerasi può attaccarsi e iniziare a sintetizzare il nuovo filamento complementare di DNA a partire dalle basi di DNA libere.

I due filamenti di DNA separati sono complementari e corrono in direzioni opposte (dall'estremità 5' all'estremità 3'); di conseguenza, sono necessari due primer: un primer forward e un primer reverse.

Questa operazione richiede in genere dai 10 ai 30 secondi.



Durante quest'ultima fase, la temperatura viene aumentata a 72°C per consentire la sintesi del nuovo DNA da parte di uno speciale enzima, la DNA polimerasi Taq, che aggiunge le basi del DNA.

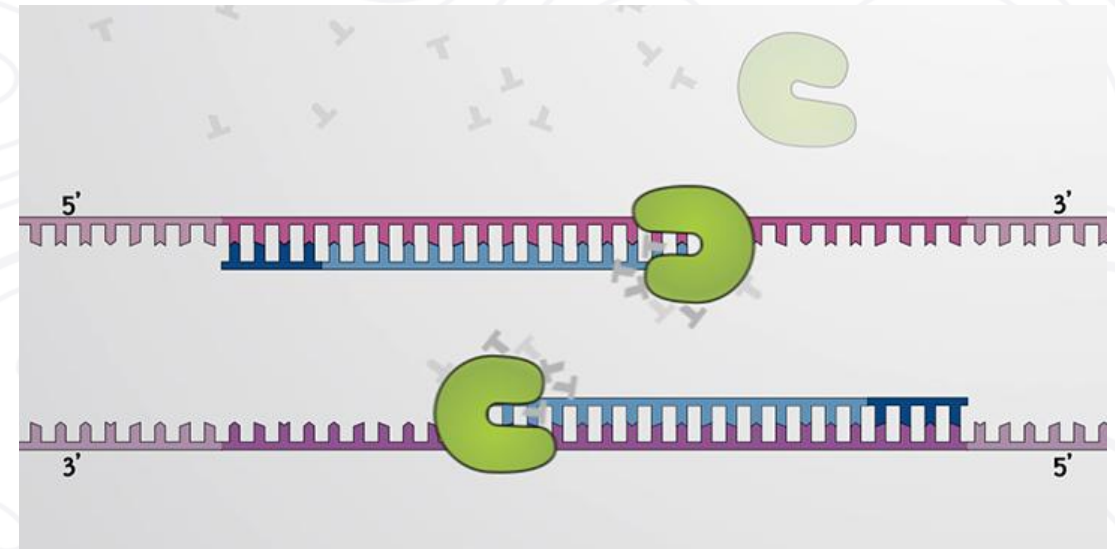
La DNA polimerasi Taq è un enzima estratto dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*, che vive normalmente nelle sorgenti termali e può quindi tollerare temperature superiori a 80°C.

La DNA polimerasi di questo batterio è molto stabile ad alte temperature, il che significa che può resistere alle temperature necessarie per separare i filamenti di DNA nella fase di denaturazione della PCR.

La DNA polimerasi della maggior parte degli altri organismi non sarebbe in grado di resistere a queste alte temperature; ad esempio, la polimerasi umana funziona in modo ottimale a 37°C (temperatura corporea).

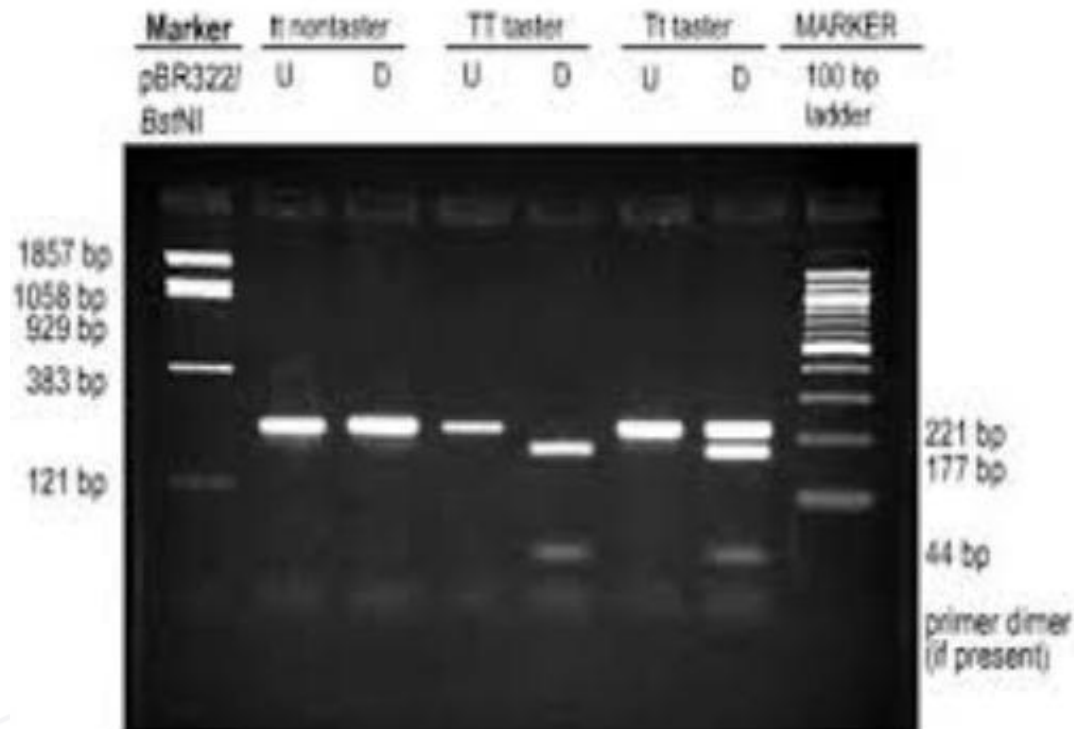
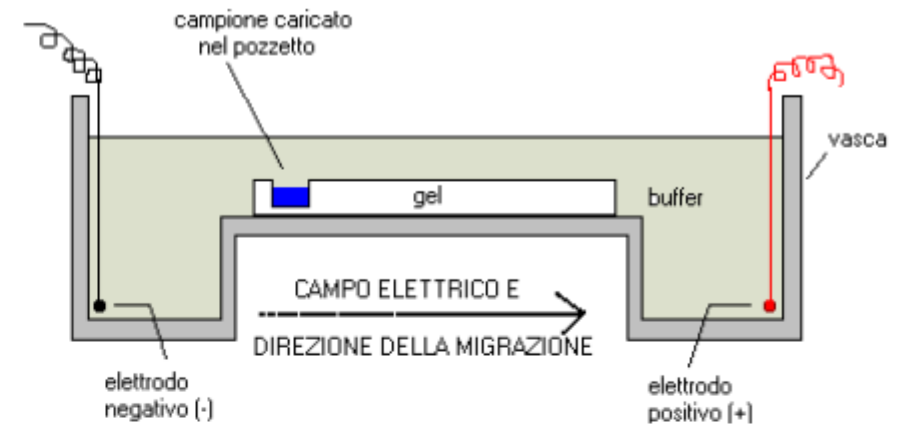
72°C è la temperatura ottimale per la DNA polimerasi Taq per la sintesi del filamento complementare. Si lega al primer e aggiunge le basi del DNA al singolo filamento in direzione 5'→3'.

La durata di questa fase dipende dalla lunghezza della sequenza di DNA da amplificare, ma in genere occorre circa un minuto per copiare 1.000 basi di DNA (1 Kb).



Quantificazione dei risultati della PCR classica

Si prepara un gel di agarosio ad una data percentuale (1-2%) con 0,4 µg/ml di Etidio Bromuro, si sviluppano le immagini del gel e si analizzano i risultati



Quantificazione dei risultati della PCR classica



PCR Real-Time

Le tecnologie Real-Time comprendono sistemi di amplificazione PCR in grado di ottenere simultaneamente nella stessa provetta sia il processo di amplificazione sia quello di rivelazione dell'amplificato.

Si avvalgono di particolari strumenti che uniscono un termociclatore ad un fluorimetro e che permettono di monitorare in tempo reale la quantità di prodotto che si sta formando nella fase esponenziale di amplificazione e di ottenere così stime della concentrazione del DNA bersaglio di partenza (PCR quantitativa)

La rivelazione del DNA amplificato avviene tramite l'utilizzo di particolari sonde specifiche per i frammenti da amplificare che generano segnali fluorescenti.



PCR Real-Time

L'accuratezza della RT-PCR deriva dalla sua capacità di monitorare i prodotti di reazione in tempo reale, che gli permettono di ottenere informazioni sulla fase logaritmica della reazione di PCR

Infatti, a differenza della PCR classica che ha bisogno di un post-trattamento, tipicamente un gel di agarosio con bromuro di etidio, per visualizzare i risultati dopo un certo numero di cicli alla fine della reazione, la PCR in tempo reale è in grado di identificare, "al suo primo apparire", un prodotto di PCR, monitorando di continuo l'andamento della reazione, senza dover interrompere la reazione per poterla visualizzare su gel.

La real time PCR risolve questo problema utilizzando precursori fluorescenti, come il bromuro di etidio o il SYBR Green, che vengono incorporati nel prodotto in formazione o che si intercalano nella doppia elica, man mano che si forma. In ogni caso sarà possibile monitorare in tempo reale la formazione del prodotto di amplificazione seguendone l'assorbimento con un sistema spettrofotometrico, in un sistema automatizzato che provvede anche alla routine della PCR.

In questo modo la qRT-PCR riesce a misurare le curve di accumulo durante tutte le fasi della reazione



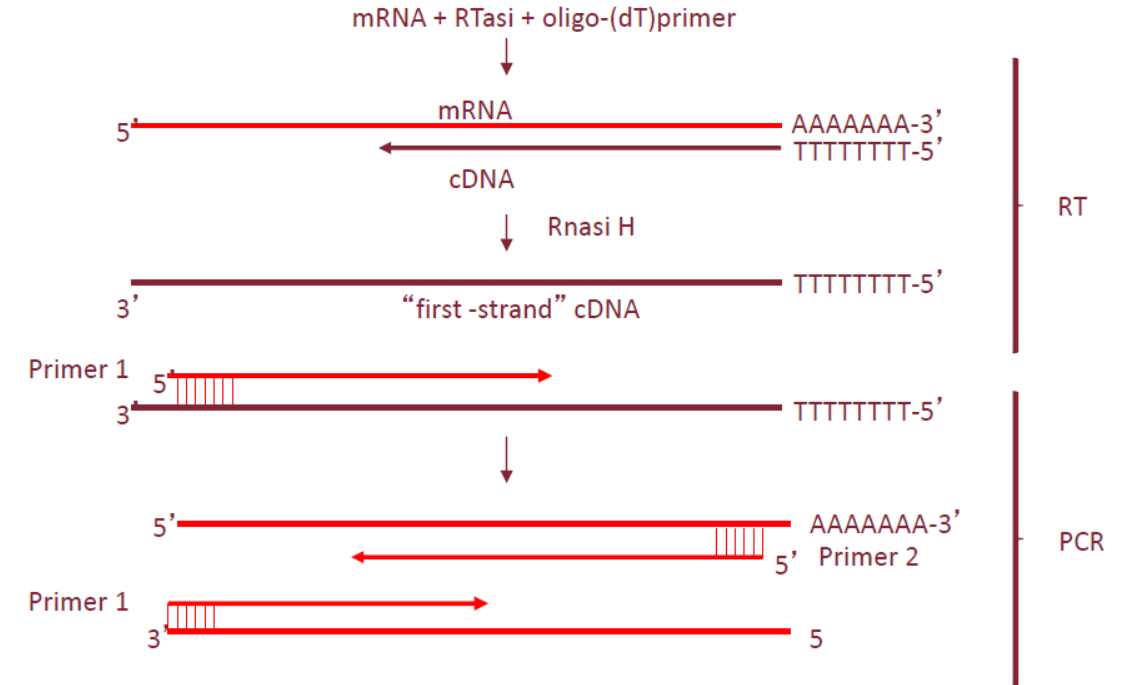
PCR Real-Time

La PCR in tempo reale è una implementazione della PCR che permette di avere informazioni quantitative più precise sulle concentrazioni relative di cDNA amplificati e dei loro mRNA corrispondenti.

La quantificazione può essere assoluta o relativa.

Nel caso della quantificazione assoluta si fa ricorso alla costruzione di una curva di calibrazione standard di DNA a concentrazione nota, da cui si può estrapolare la concentrazione ignota e quindi il numero di copie iniziali del nostro campione.

La quantificazione relativa compara, con vari metodi, le concentrazioni relative di due campioni normalizzati ad un gene di riferimento.



PCR Real-Time

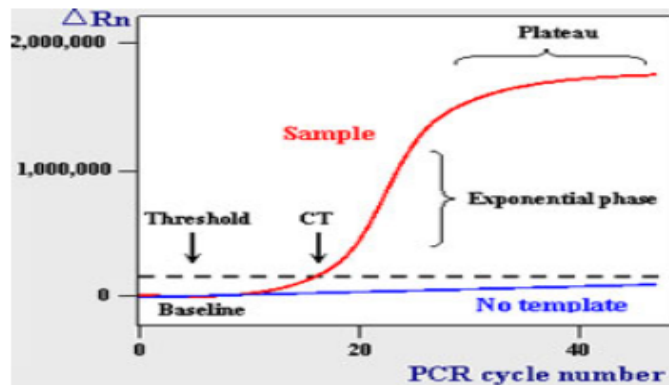
Analisi PCR quantitativa

Real time
PCR

impiego di marcatori fluorescenti il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione PCR. La misurazione della fluorescenza dà in tempo reale la quantità dello specifico prodotto di PCR



Termociclatore con detector per fluorocromi e software per analisi dati



Linea di base (baseline): valore al di sopra del quale inizia l'accumulo di un amplificato

Linea soglia (Threshold): scelta dall'operatore in modo da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale

Ciclo soglia: E' il ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza del campione è maggiore rispetto a quello della Threshold

PCR Real-Time

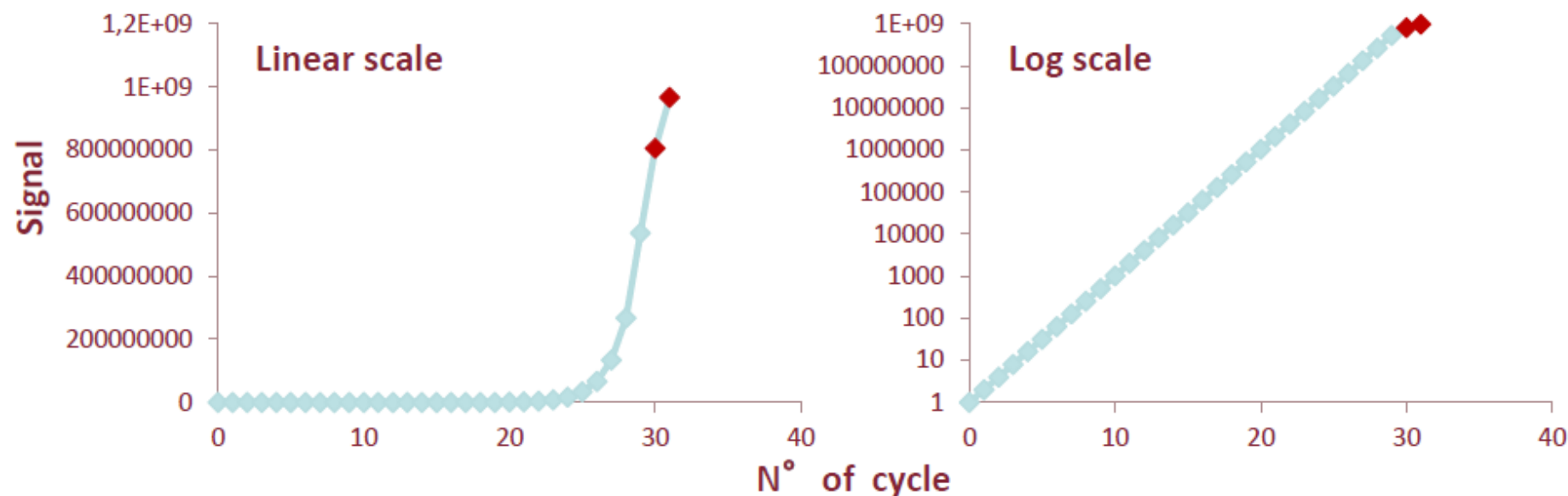
N° of cycle	N° of molecules
-------------	-----------------

0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1024
11	2048
12	4096
13	8192
14	16384
15	32768
16	65536
17	131072
18	262144
19	524288
20	1048576
21	2097152
22	4194304
23	8388608
24	16777216
25	33554432
26	67108864
27	134217728
28	268435456
29	536870912
30	805306368
31	966367641,6

Esistono due modi di visualizzare i risultati di una qRT-PCR/real time PCR su un grafico:

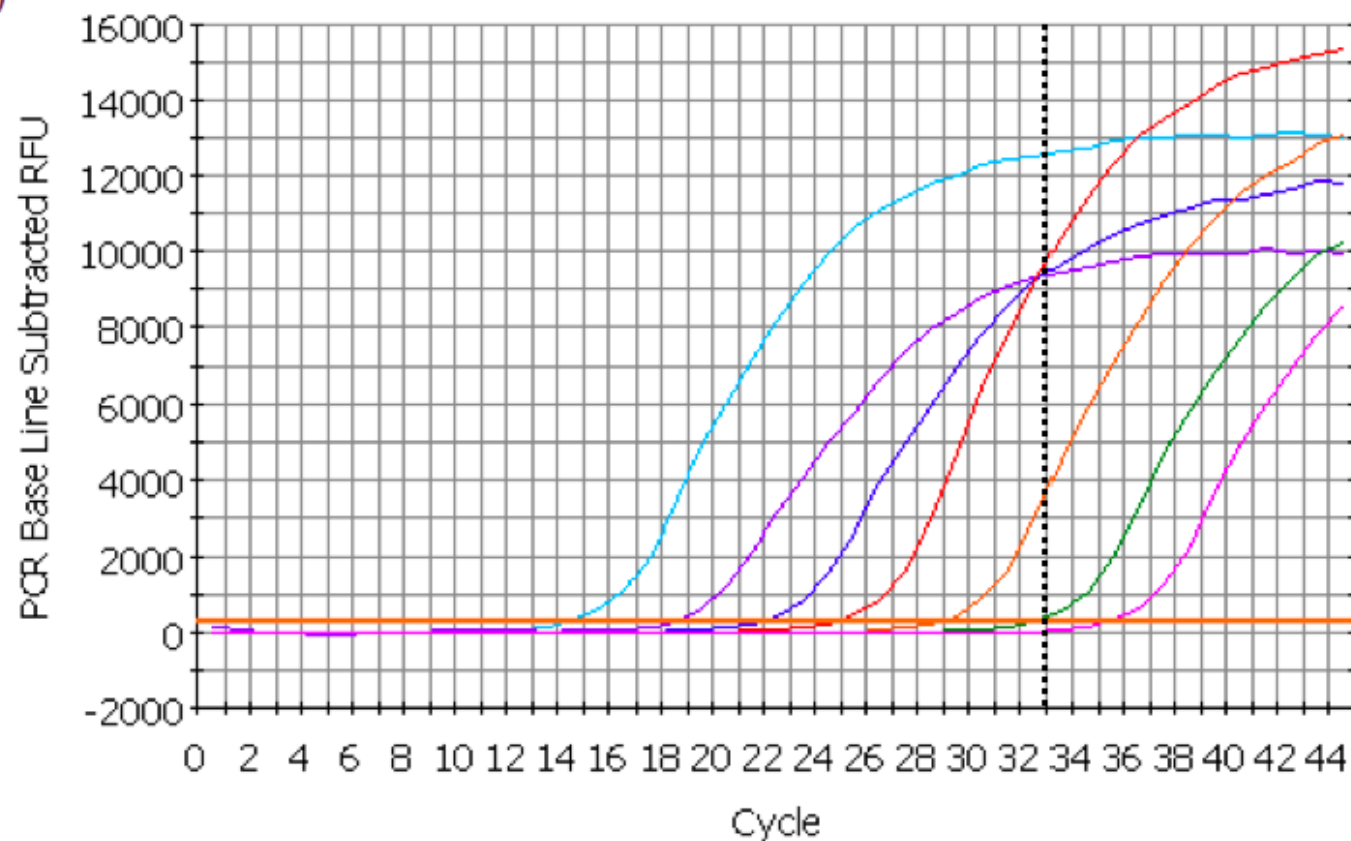
1. Scala lineare
2. Scala Log

Dato l'andamento esponenziale della reazione, è impossibile visualizzare dettagli dell'amplificazione durante i primi cicli su una scala lineare; si passa dunque alla visualizzazione in scala logaritmica

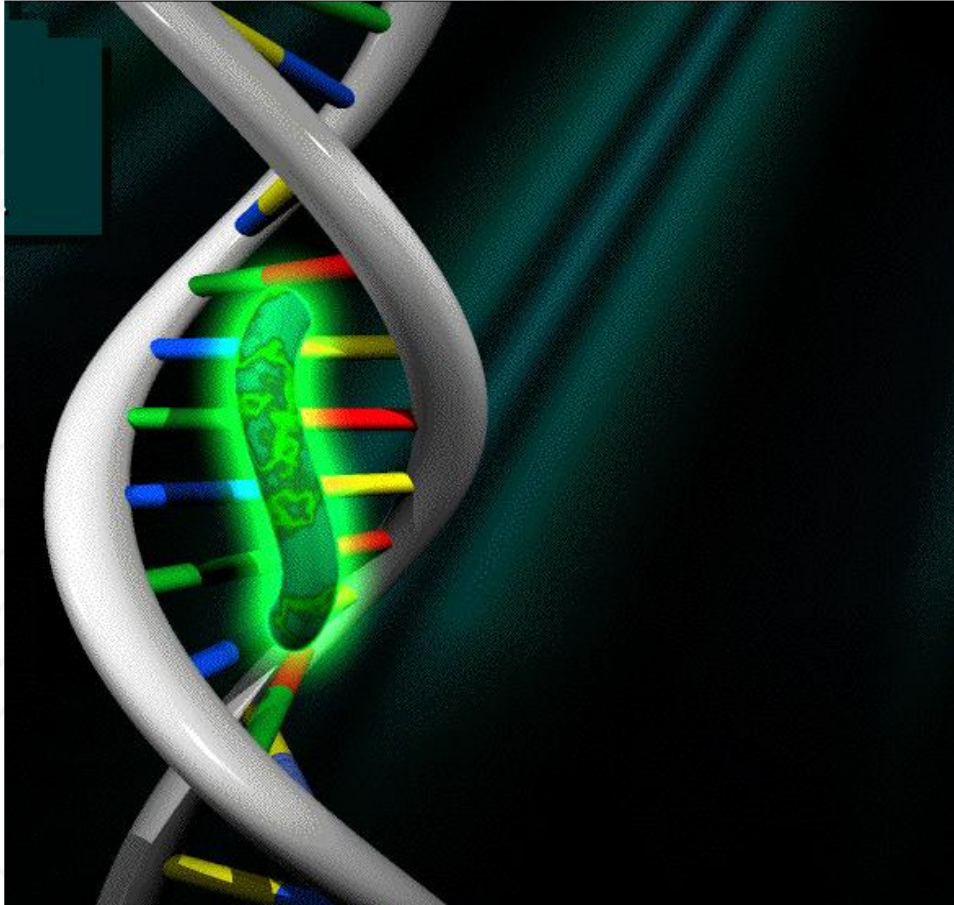


PCR Real-Time

Un'importante proprietà della qRT-PCR è che i valori di Ct sono inversamente proporzionali alla concentrazioni iniziali dei DNA target, come si può verificare facendo diluizioni seriali di un campione e osservando come, man mano che le diluizioni crescono, ci vogliono più cicli per raggiungere la soglia di concentrazione (Ct)

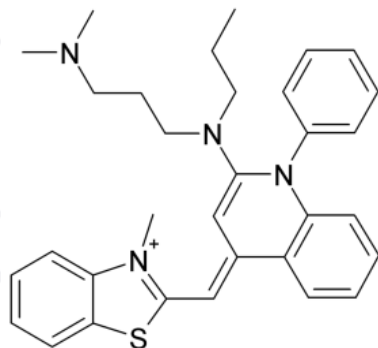


Nella figura un esempio di diluizioni seriali (10 volte)

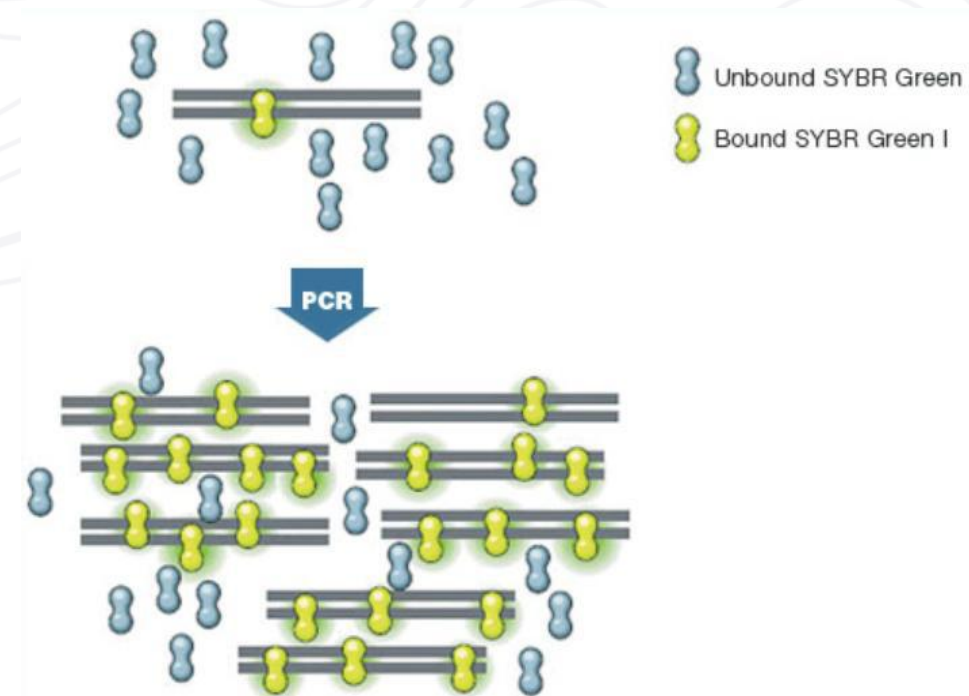
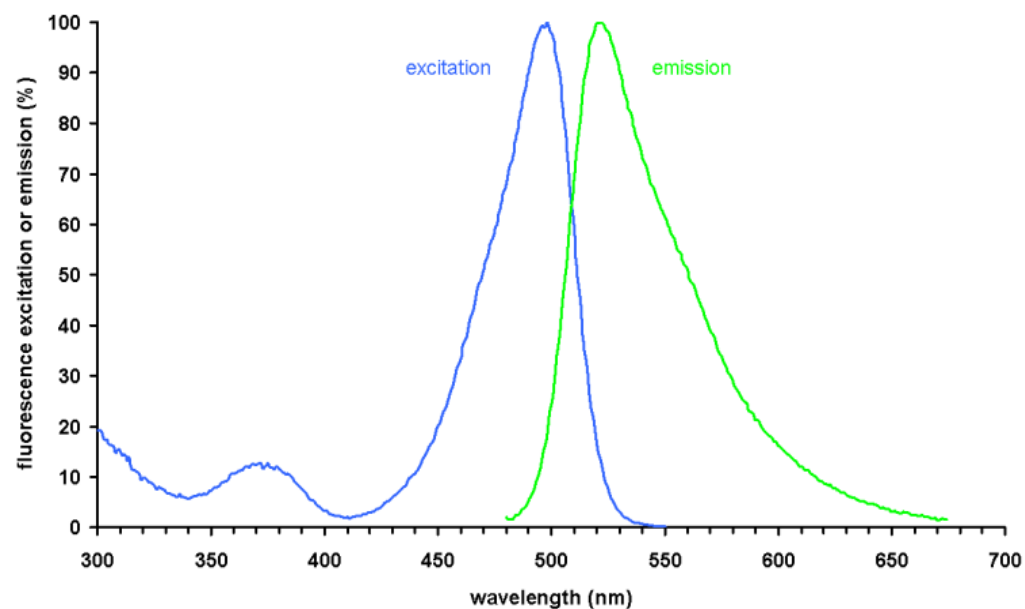


SYBR green: molecola
fluorescente **non**
specifica che si lega
al solco minore del
DNA a doppio
filamento

PCR Real-Time



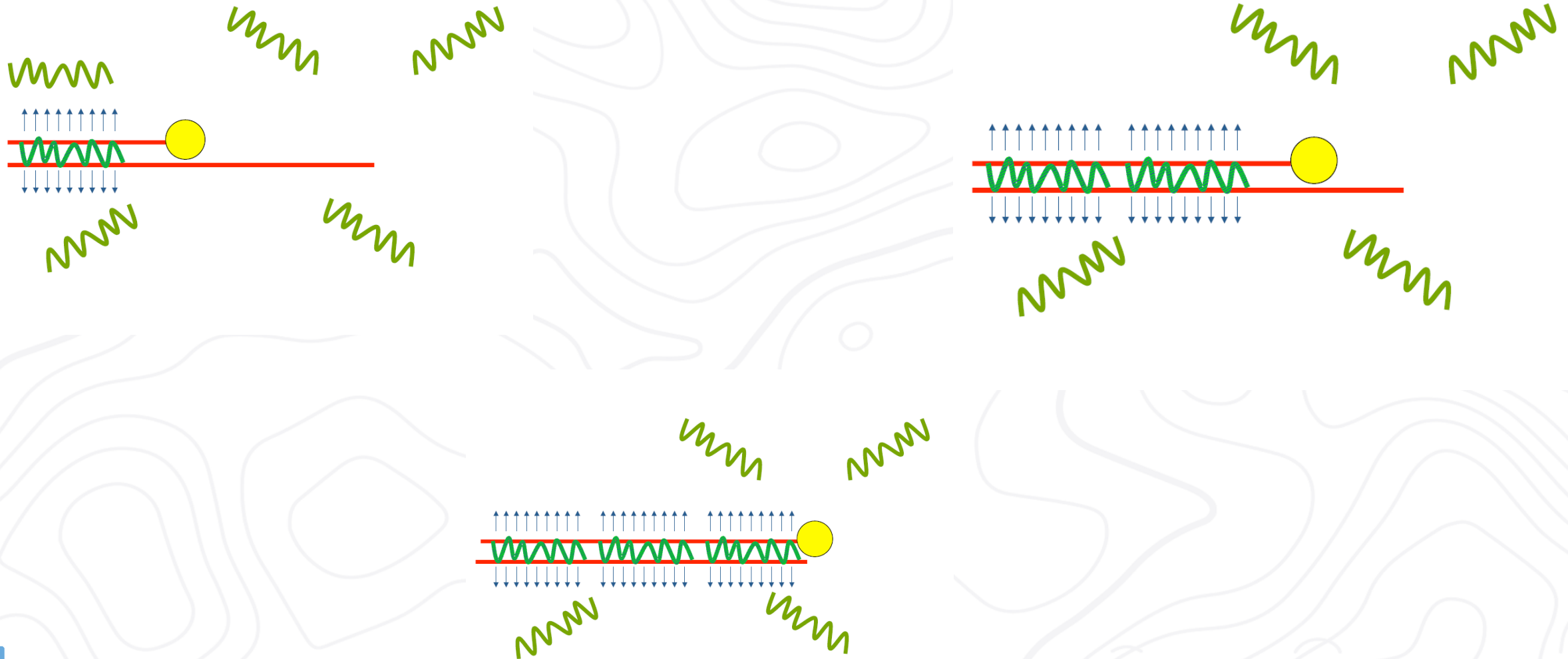
Il Sybr-green è una molecola fluorescente non specifica che si lega al solco minore del DNA a doppio filamento



PCR Real-Time SYBR Green detection



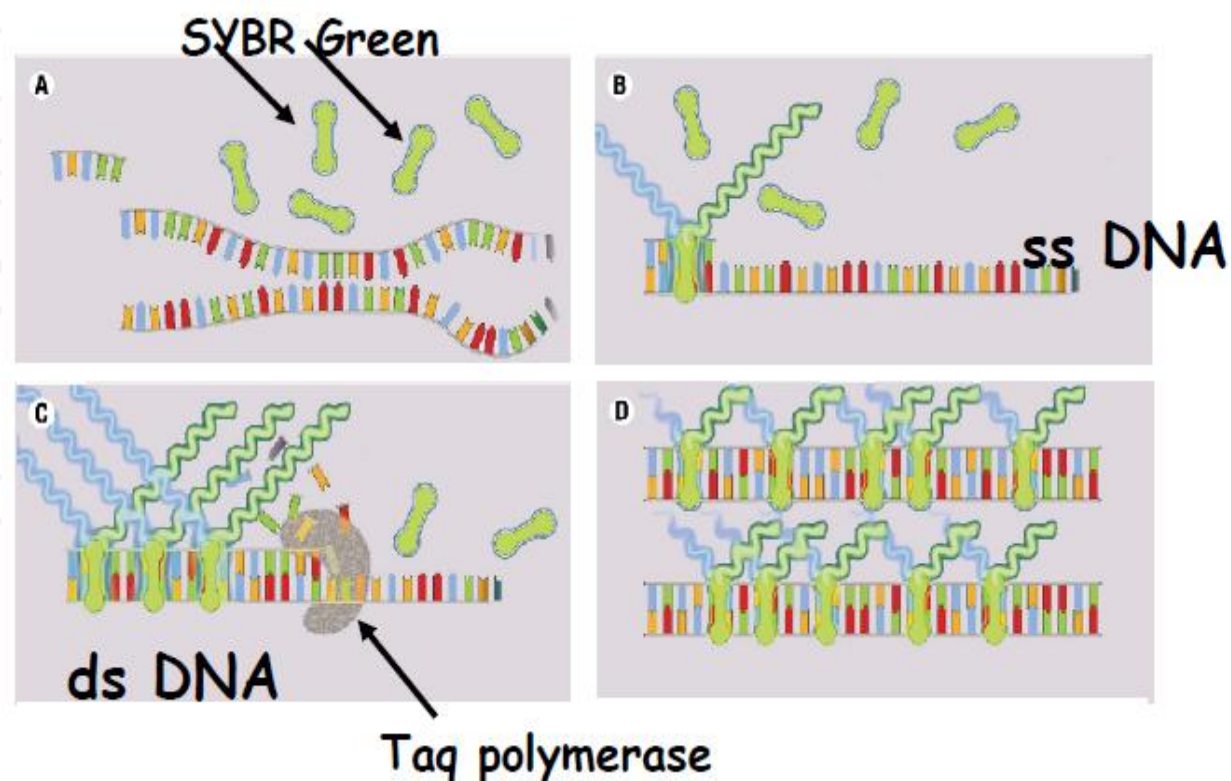
PCR Real-Time SYBR Green detection



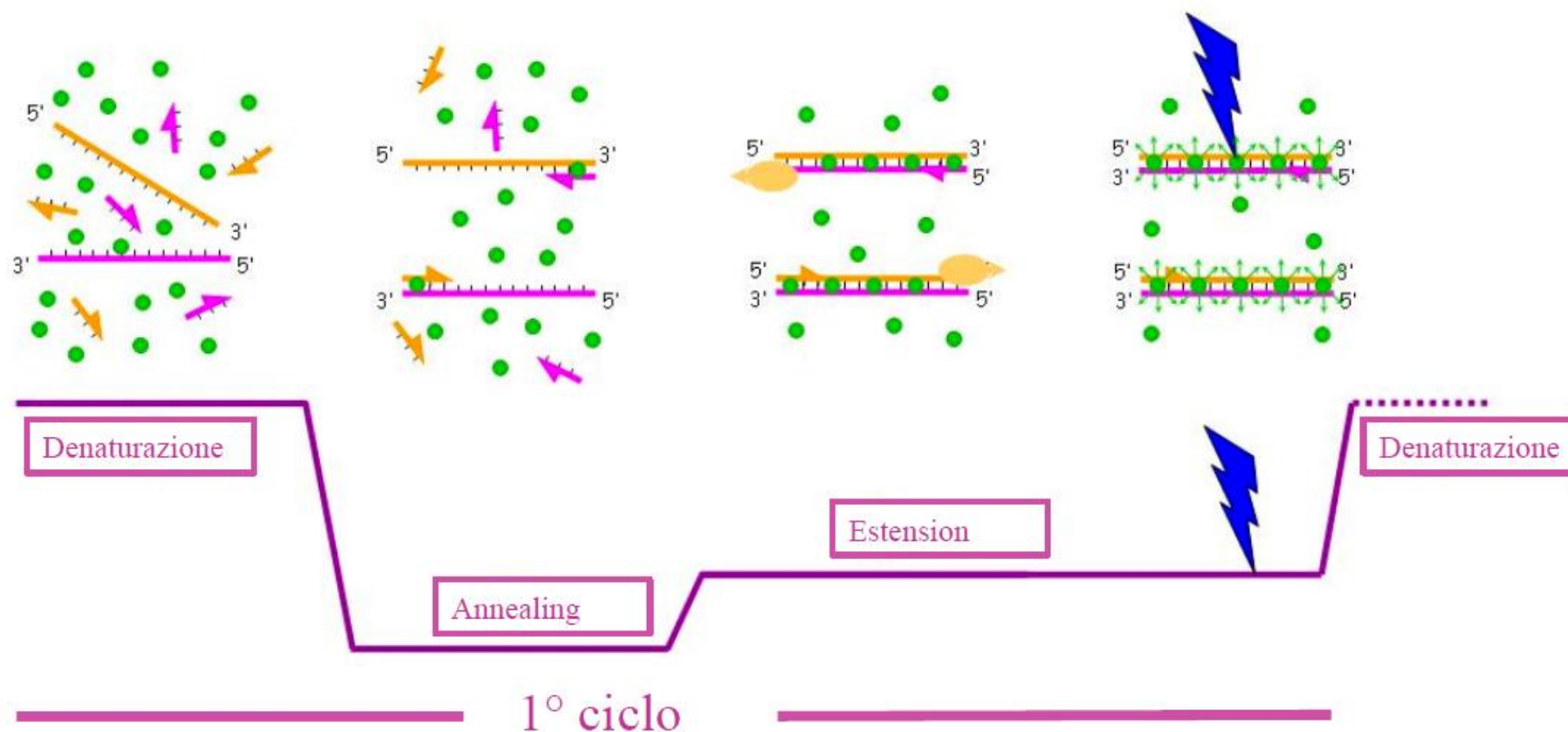
PCR Real-Time SYBR Green detection

Il SYBR Green si lega al DNA a doppio filamento, nel solco minore, in modo non dipendente dalla sequenza. (si lega ai dimeri di primer, si lega ai prodotti di amplificazione aspecifici)
Il legame al dsDNA determina una forte emissione di fluorescenza (eccitazione 488 nm, emissione 520-530 nm), proporzionale alla quantità di amplificato.

- **Denaturazione:** nessuna fluorescenza
- **Annealing:** si sviluppa fluorescenza
- **Estensione:** aumenta fluorescenza con l'accumulo dell' amplificato
- Lettura della fluorescenza (Plate Read): in fase di annealing o, di solito, in fase di estensione.



PCR Real-Time SYBR Green detection



PCR Real-Time SYBR Green detection

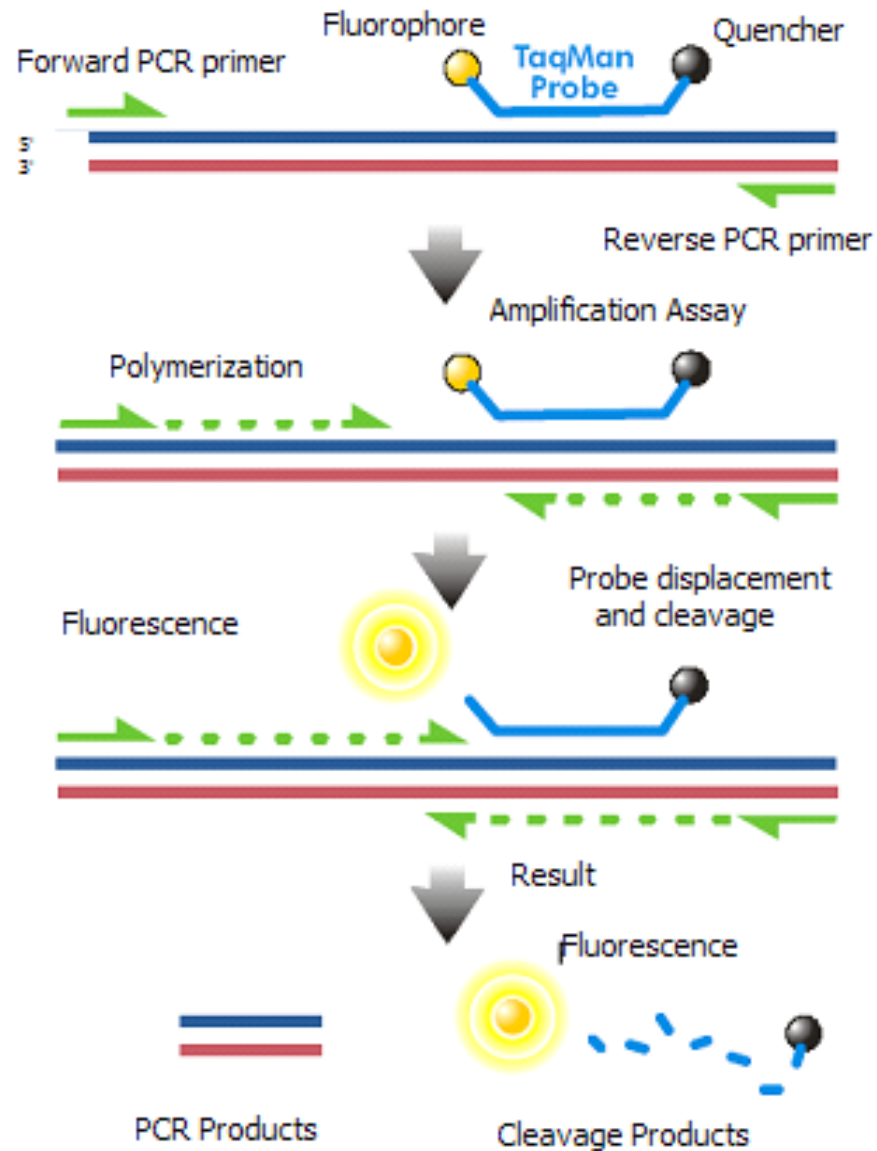
PRO:

- Metodica semplice
- Versatilità
- Non costosa

CONTRO:

- Non-specifica: la molecola fluorescente si lega random a tutte le doppie eliche, includendo i dimeri di primers
- È necessario ottimizzare la metodica per evitare la formazione di prodotti aspecifici
- Richiede la costruzione di una retta standard e l'analisi della curva di melting

PCR Real-Time



TaqMan è il nome di una serie di sonde utilizzate per aumentare la specificità della real time PCR. Il metodo, descritto per la prima volta nel 1991, si basa sull'utilizzo di un oligonucleotide marcato con un fluoroforo a una estremità mentre nell'altra estremità è presente un *quencher*. Sfruttando l'attività 5'→3' esonucleasica della Taq polimerasi, dopo la normale fase di *annealing* della PCR, l'enzima esplica la propria attività esonucleasica scindendo il fluoroforo dal resto della molecola durante l'ibridazione. Pertanto, ad ogni ciclo, dopo irradiazione del campione viene emessa una fluorescenza in quantità proporzionale al DNA target che diviene così facilmente quantificabile. Quando invece il fluoroforo si trova vicino al quencher quest'ultimo ne smorza l'emissione di fluorescenza tramite trasferimento di energia per risonanza. Il nome TaqMan deriva dal videogioco Pac-Man (Taq polimerasi + PacMan = TaqMan) richiamandone il principio di funzionamento. La tecnica trova comunemente utilizzo in biologia molecolare e nella diagnostica di laboratorio di diverse malattie infettive

PCR convenzionale vs. PCR real time

VANTAGGI:

- Analisi quantitativa e qualitativa
- **SENSIBILE (10 – 10¹⁰ copie di stampo; 3pg di DNA)**
- ACCURATA
- VELOCE (no gels)
- SICURA (no EtBr)
- Facile determinazione e comparazione campioni
- Analisi simultanea di molti campioni (96 wellsplate)
- Si presta all'analisi di DNA degradato o incluso, o fissato

SVANTAGGI:

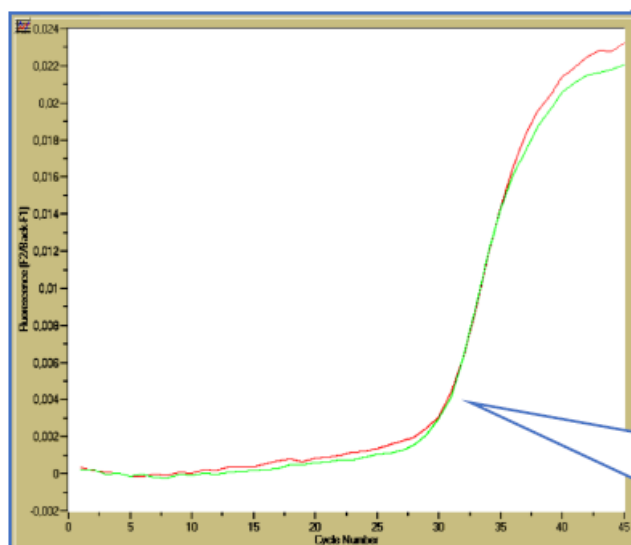
- Sensibilita' (**RISCHIO** di contaminazioni-falsi positivi)
- **VARIABLE EFFICIENZA** di amplificazione a seconda della sequenza
- Richiede conoscenza di base delle sequenze da amplificare e messa a punto per coppie di oligonucleotidi di innesco (primers)
- Può sintetizzare frammenti relativamente corti

Real-Time PCR

misura in tempo reale la concentrazione iniziale di una sequenza target in un campione

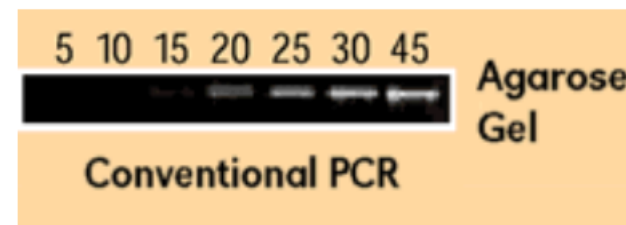
PCR Convenzionale vs. PCR Real-Time

Misura di fluorescenza: riflette quantità di amplificato prodotto in ogni ciclo



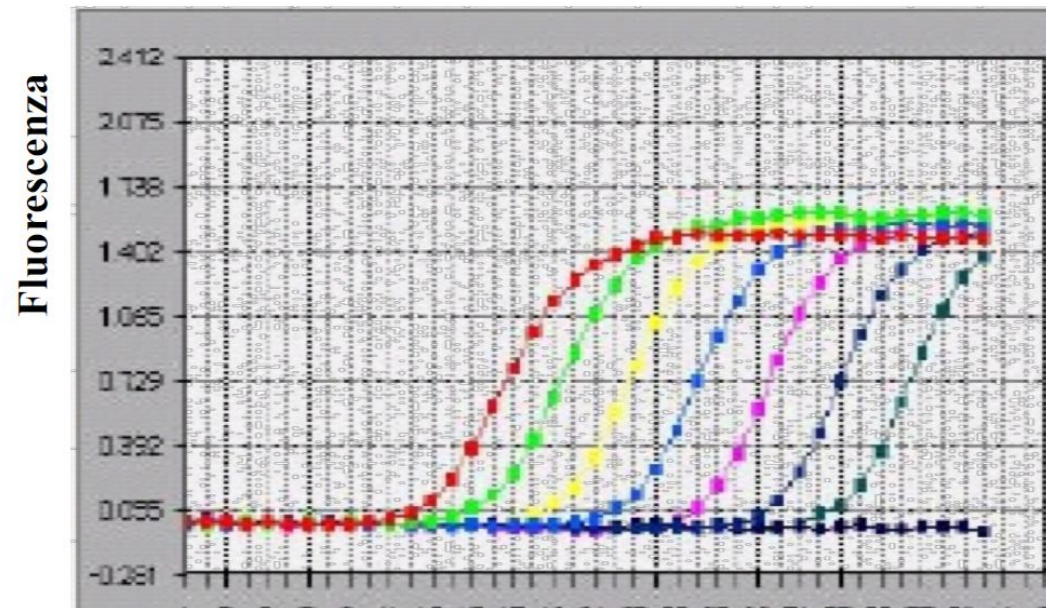
END-POINT
rilevazione
Tradizionale
(semiquantitativa)

TIME-COURSE
Rilevazione
Real-Time PCR
(qualitativa e
quantitativa)



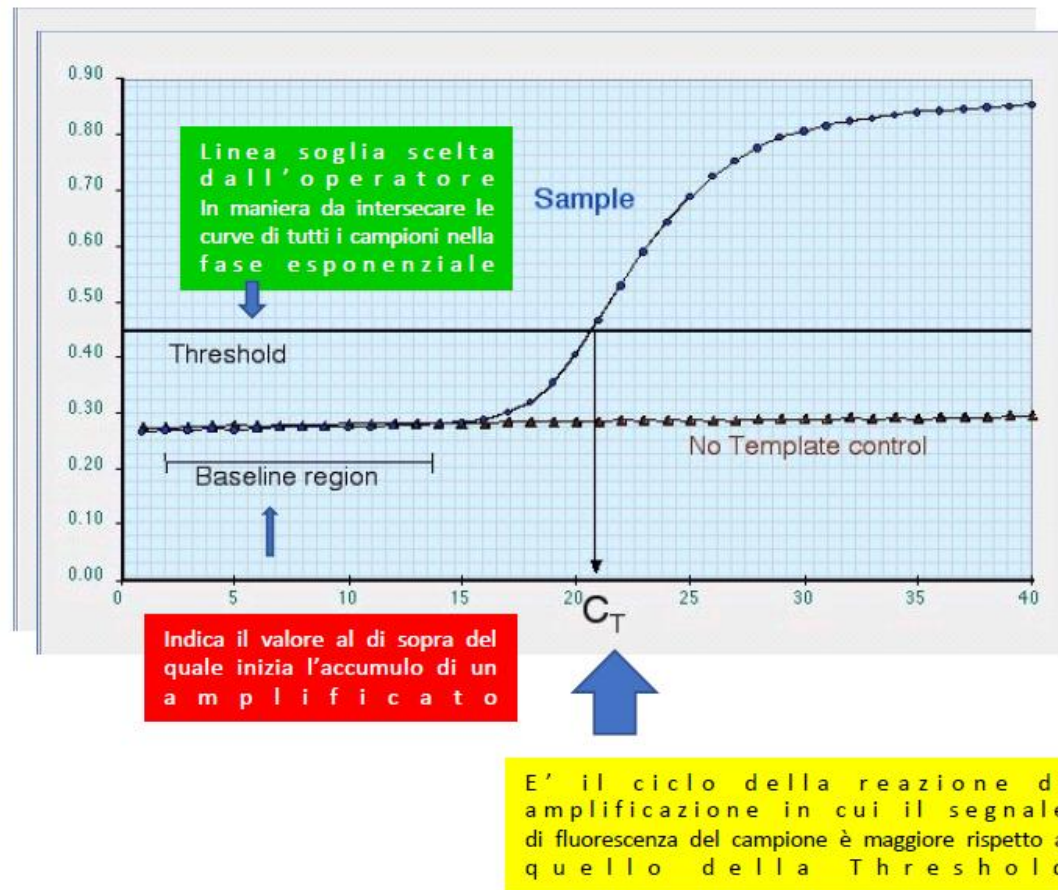
PCR Real-Time

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



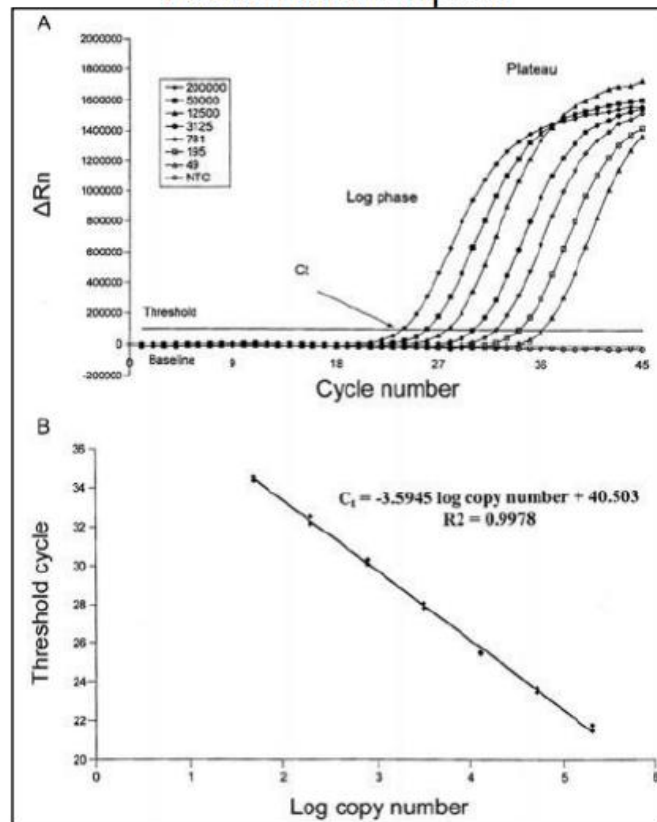
Cicli di amplificazione

PCR Real-Time

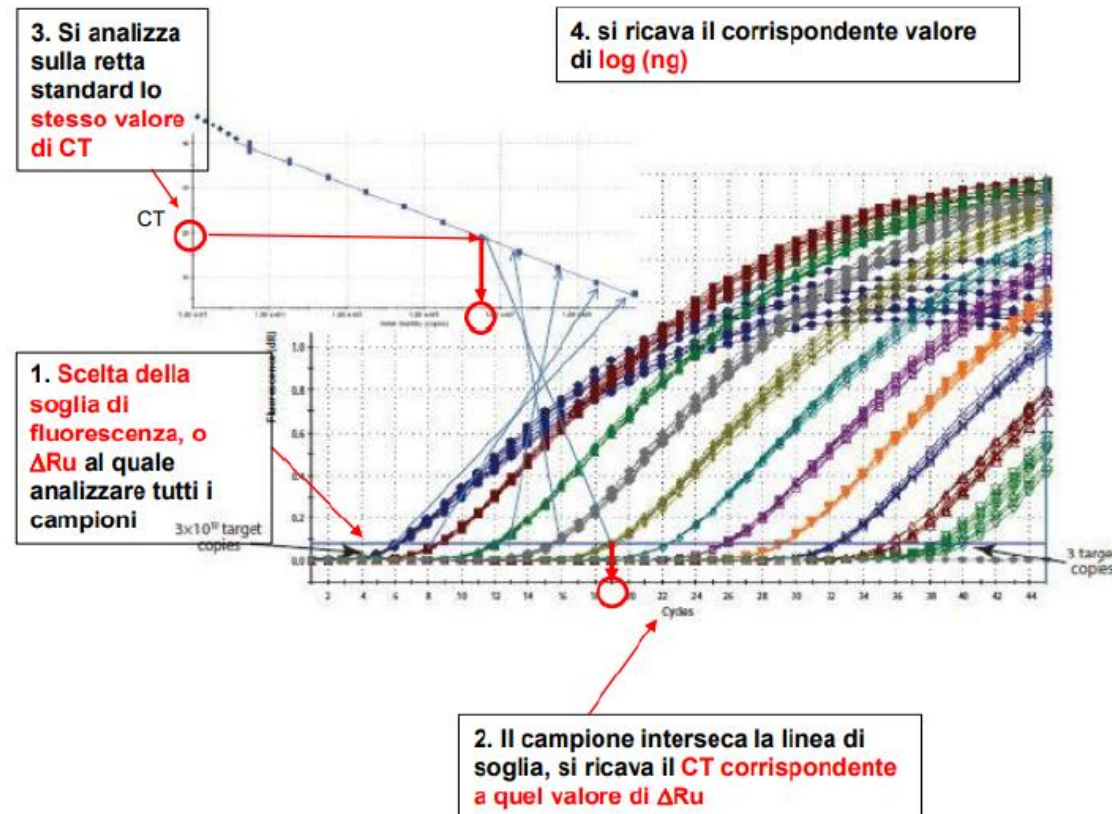


real time Polymerase Chain Reaction: absolute quantification

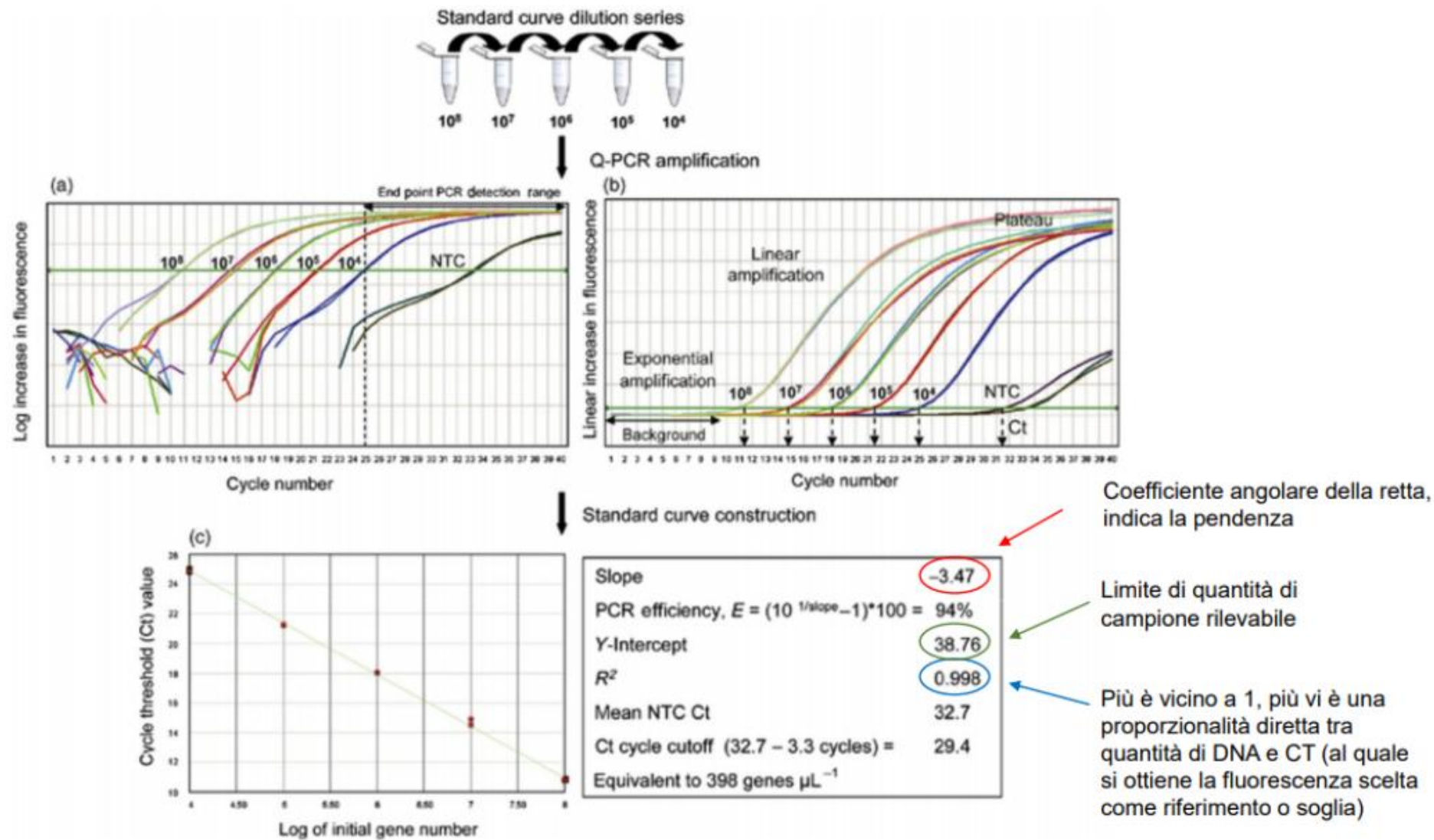
A. Standard template



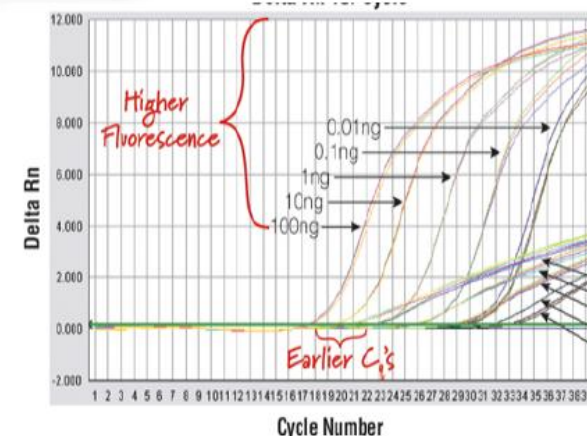
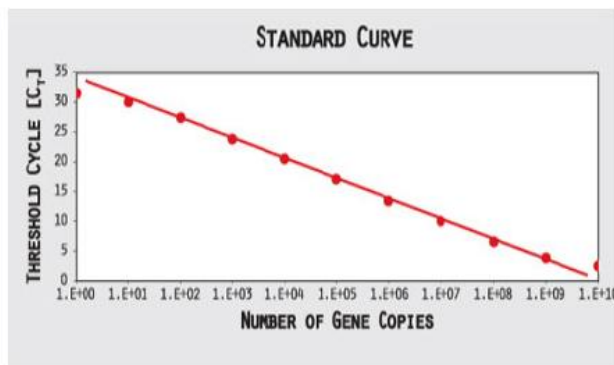
B. analyzed samples



PCR Real-Time

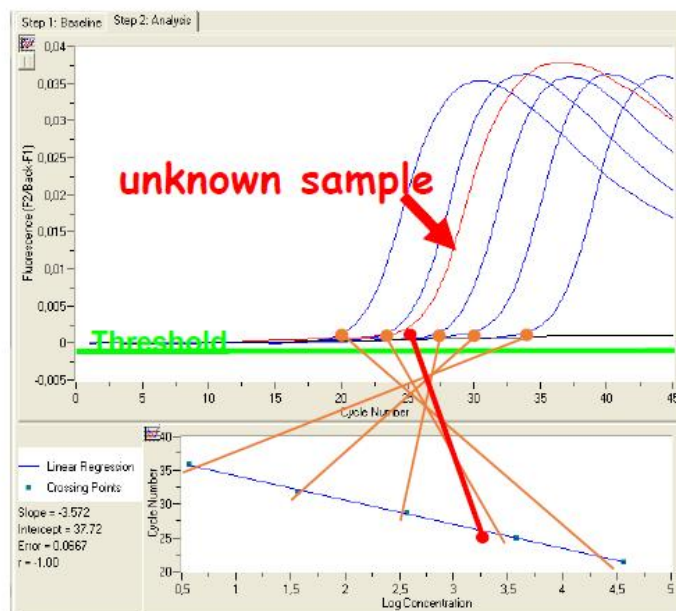


PCR Real-Time

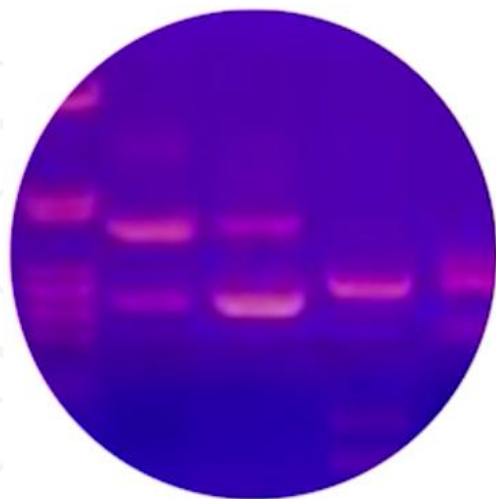


• DILUIZIONE SCALARE i.e.: FATTORE 10

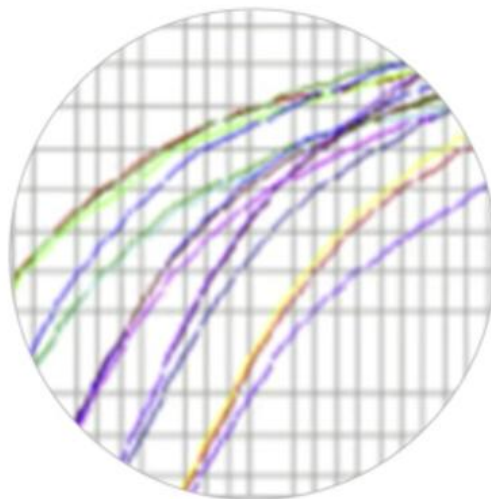
• Amplificando quantità note dello stesso template, le quantità ignote si ricavano per interpolazione dalla curva standard.



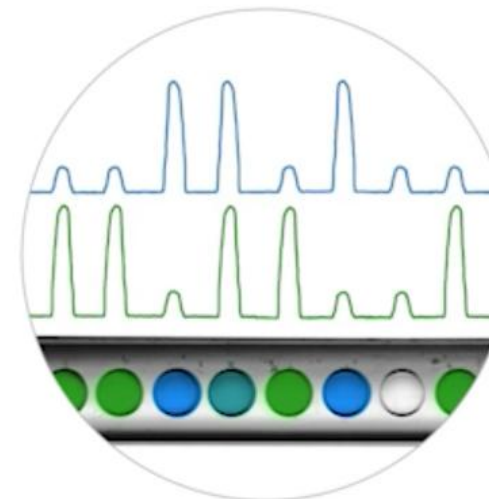
Digital PCR: l'evoluzione della PCR



PCR
Qualitative



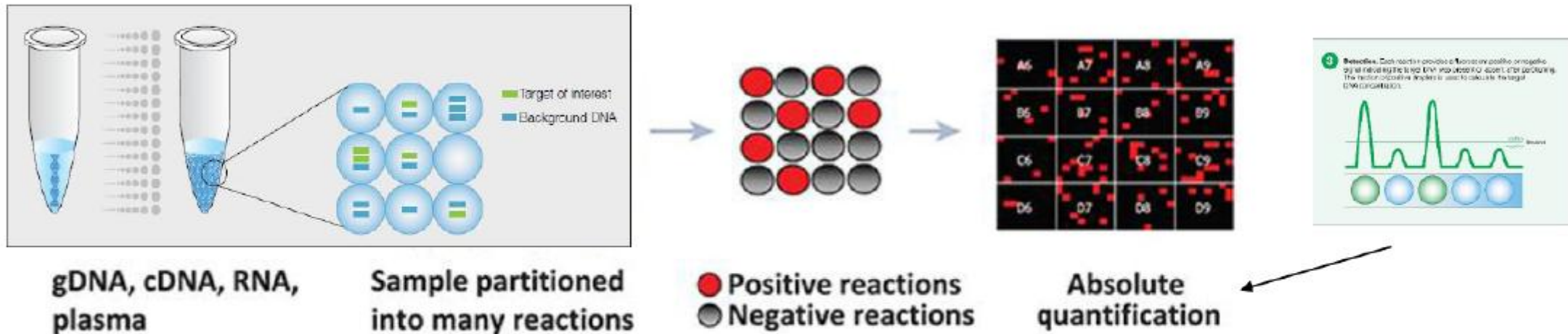
Real-Time PCR
Relative Quantification



Droplet Digital PCR
Absolute Quantification

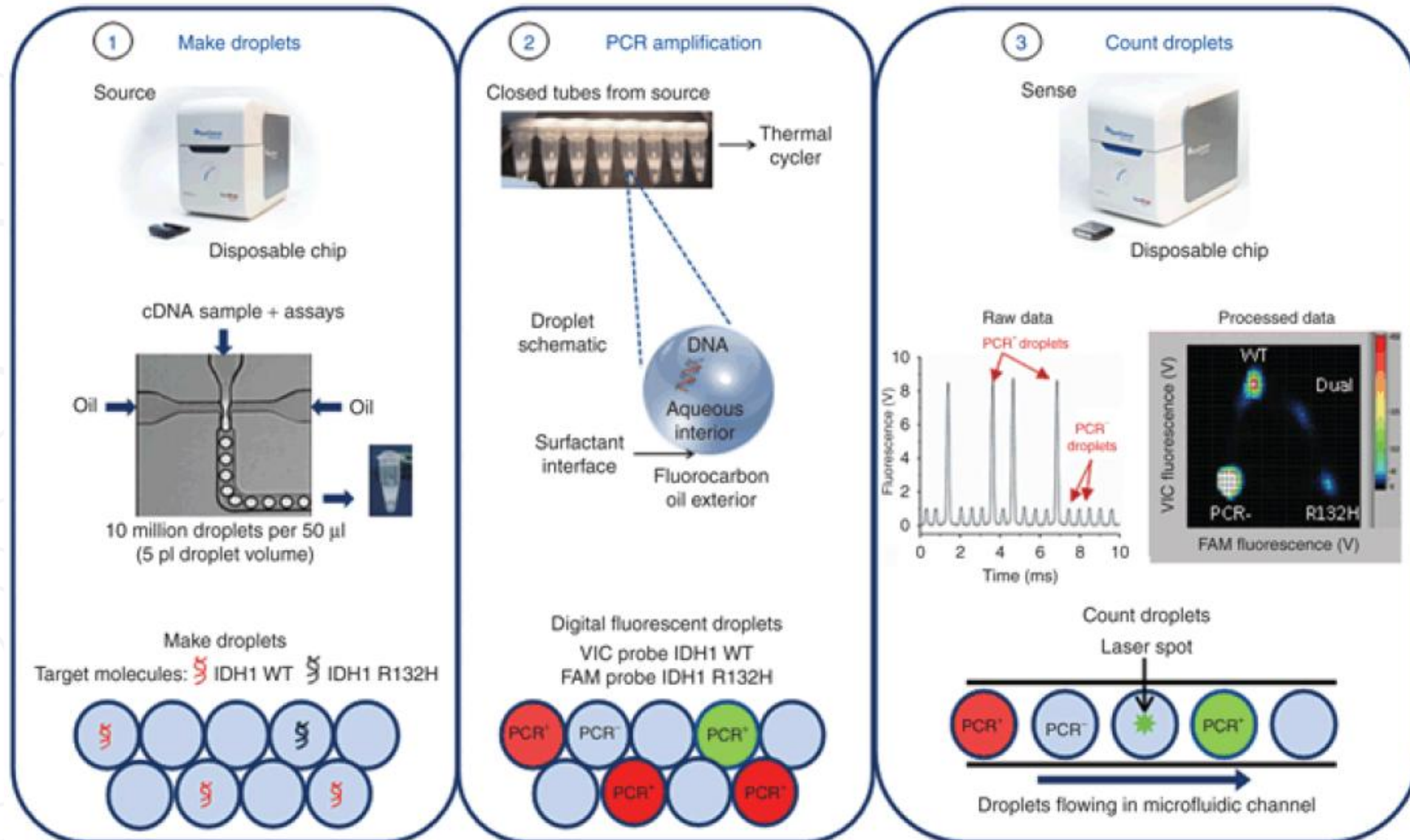
Digital PCR: l'evoluzione della PCR

Droplet digital PCR is an analytical technique for quantification of nucleic acid samples based on **PCR amplification of single template molecules**

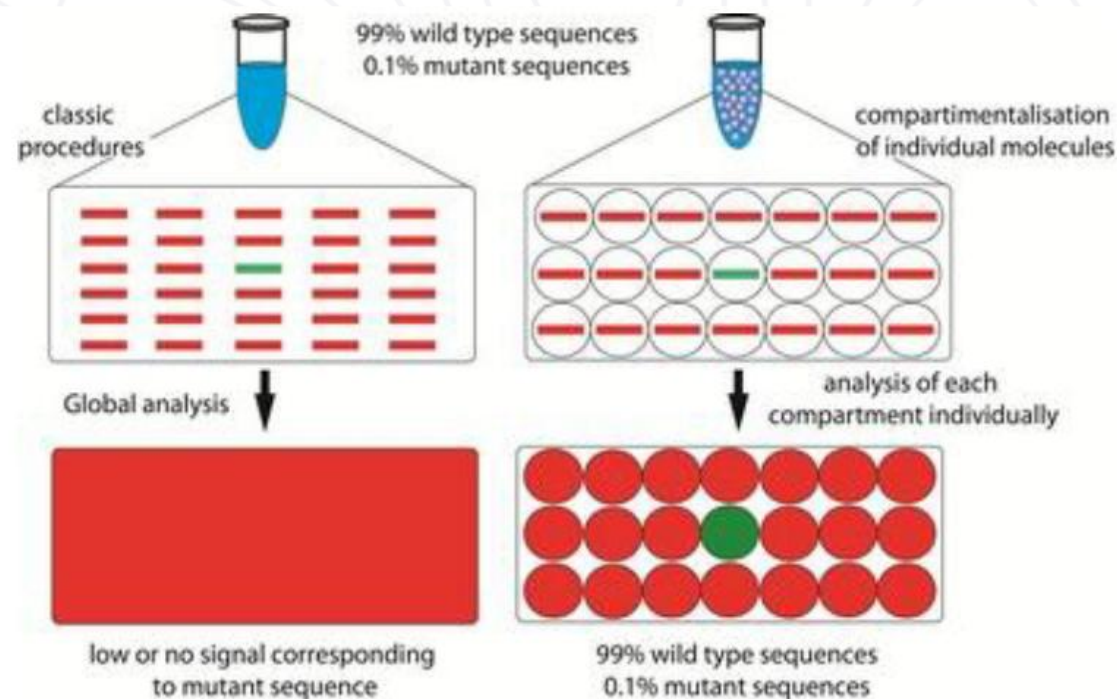


- **Partition reagents and sample into droplets**
- Perform PCR on thermal cycler
- **Count droplets** with a **positive** PCR product (fluorescent) **and a negative** PCR product
- Digital readout provides **concentration of target DNA**

Digital PCR: l'evoluzione della PCR

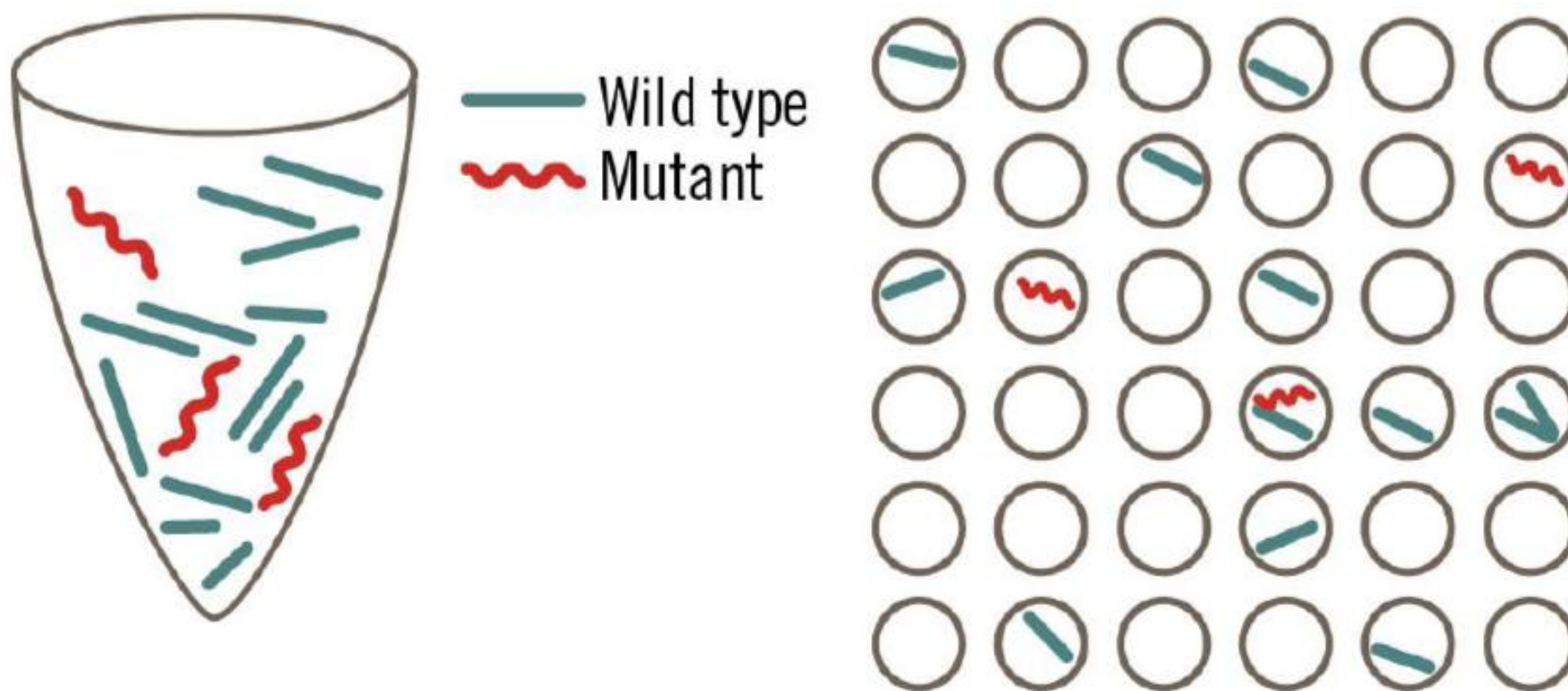


Digital PCR: l'evoluzione della PCR



I target rari (es. una variante mutata) non possono essere amplificati mediante PCR a causa della competizione operata del DNA più rappresentato per i reagenti (primers etc...)

Digital PCR: l'evoluzione della PCR



Source: (Sedlaka & Keith, 2013).¹⁰

**Partition reagents and
sample into 20.000 droplets**

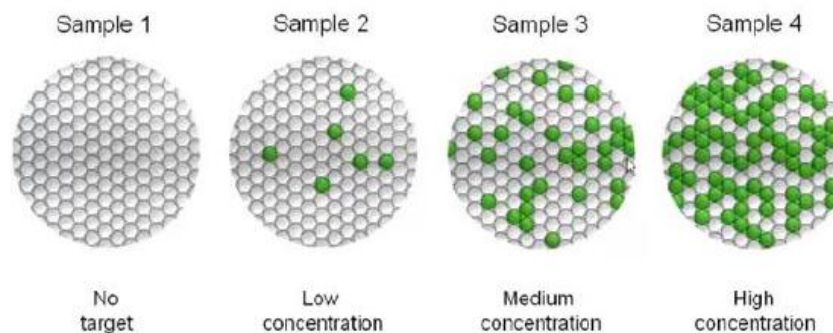
Digital PCR: l'evoluzione della PCR

Vi è una distribuzione casuale (di eventi indipendenti) delle molecole di DNA (da analizzare) nelle gocce, queste vengono ripartite casualmente durante l'emulsione del campione. **Producendo un numero sufficientemente elevato di gocce avremo la probabilità queste conterranno una sola molecola di DNA.**

Il numero di gocce contenenti una molecola di DNA dipenderà dalla **concentrazione di DNA** del campione



Siméon Denis Poisson
(1781-1840)



Poisson equation:

$$-\ln\left(1 - \frac{\text{positives}}{\text{total counted}}\right)$$

(positives + negatives)

Legge dei piccoli numeri o degli eventi rari

Digital PCR: l'evoluzione della PCR



Fine prima parte

GRUPPO CAP
Via Rimini 38<sup>[L]
[SEP]</sup>
20142 Milano
www.gruppocap.it

