

REAL-TIME PCR

Ricerca di microrganismi e allergeni alimentari

INTRODUZIONE

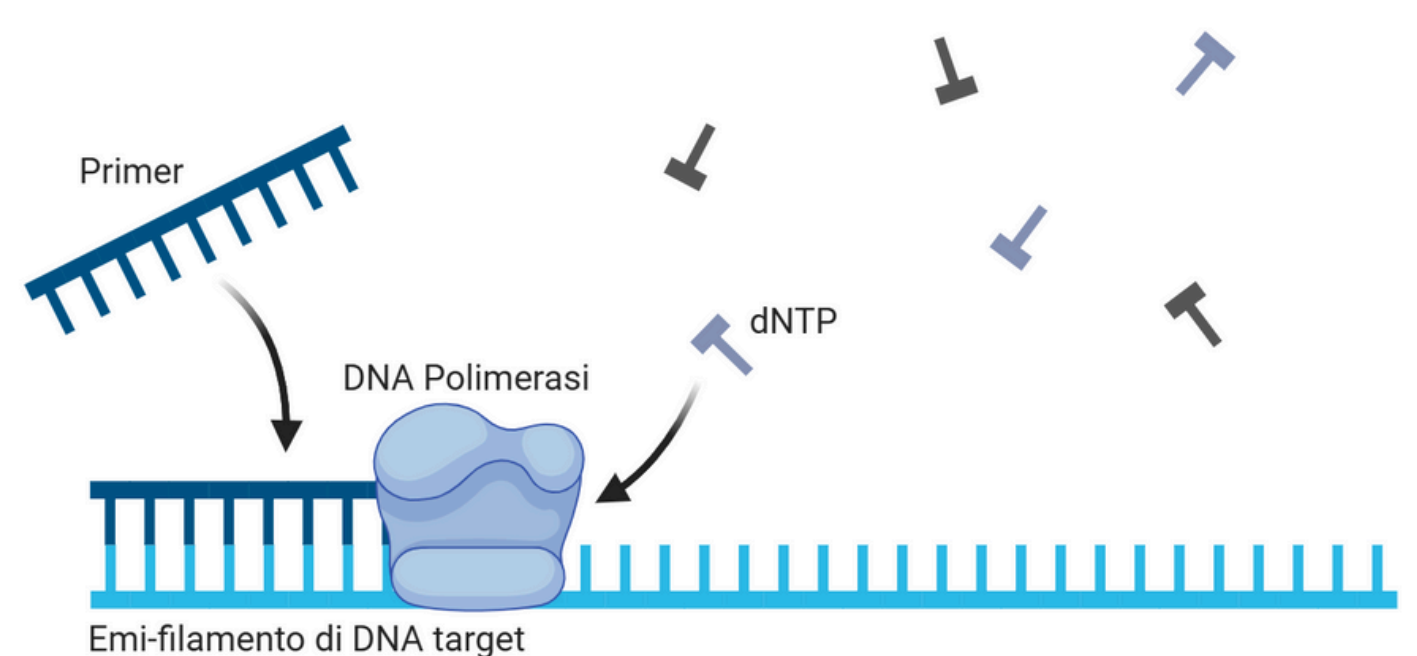
La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica di biologia molecolare sviluppata nel 1986 che consente di ottenere un elevato numero di copie (ampliconi) di un frammento di DNA bersaglio, a partire anche da una quantità minima. Il processo si basa su una reazione che contiene DNA polimerasi, nucleotidi e primer complementari alla sequenza di interesse. L'amplificazione consente di ottenere sufficienti copie del DNA target per poterlo identificare e utilizzare. Questo principio può quindi venir sfruttato per rilevare in modo rapido ed efficace microrganismi ed allergeni alimentari, mediante l'analisi del DNA presente nei campioni di interesse.

Real-Time PCR

La Real-Time PCR (qPCR) è una variante della PCR tradizionale, impiegata per amplificare e contemporaneamente quantificare il DNA target e i relativi ampliconi. A differenza della PCR convenzionale, la qPCR utilizza coloranti fluorescenti o sonde specifiche che si legano al DNA durante l'amplificazione. L'intensità della fluorescenza emessa, rilevata da appositi sensori, permette di monitorare in tempo reale la velocità di amplificazione. Questo consente di determinare con precisione la presenza o l'assenza dell'organismo bersaglio, oltre a quantificare il DNA presente.

Principi base

La PCR si basa su una serie di cicli termici controllati che permettono di denaturare il filamento di DNA target e amplificarlo in modo esponenziale, ciclo dopo ciclo. Nel dettaglio, la prima fase è quella di **denaturazione**, durante la quale, grazie all'aumento della temperatura, i due emi-filamenti che compongono il DNA target si separano. Successivamente, raffreddando la soluzione, si passa alla fase di **annealing**, in cui i primer si legano alle sequenze bersaglio dei filamenti separati. A questo punto inizia la fase di **estensione**, in cui la DNA polimerasi sintetizza nuovi filamenti estendendo i primer con i nucleotidi (dNTP) presenti in soluzione, generando così le prime copie della sequenza iniziale (ampliconi). Ripetendo ciclicamente queste tre fasi, il numero di ampliconi cresce esponenzialmente.



Reagenti

- DNA target
- Primers
- dNTPs
- DNA polimerasi

Steps

- Denaturazione
- Annealing
- Estensione

Vantaggi

La Real-Time PCR (qPCR) è uno strumento altamente efficace per la rilevazione di allergeni e microrganismi in modo rapido e accurato.

Rispetto ai metodi tradizionali, offre numerosi vantaggi, tra cui:

- **Tempi di analisi ridotti**, ideali per controlli rapidi durante il processo produttivo;
- **Elevata sensibilità**, in grado di individuare tracce minime di allergeni o DNA microbico;
- **Alta specificità**, garantita da primer e sonde altamente selettivi;
- **Protocolli semplici** e standardizzabili, adatti all'utilizzo giornaliero in laboratorio;
- **Facile automazione**, per gestire un elevato numero di campioni in modo efficiente.

Materiali: reagenti e strumentazione

- **Reagenti:** Extraction kit (necessario per estrarre il DNA dal campione in esame, composto da uno o più reagenti), Detection kit (necessario per l'identificazione, l'amplificazione e la quantificazione del DNA target durante la PCR, specifico per il campione in esame, composto da Master Mix, Assay Mix e controlli), ViableCell reagent.
- **Consumabili:** è necessario l'utilizzo di consumabili dedicati alla PCR, in particolare i materiali devono essere RNasi-, DNasi-, DNA-free. Questa categoria comprende: provette da 1.5ml, provette da 0.2ml o piastra da 96 pozzetti da 0.2ml, puntali con filtro da 10 - 100 - 1000 µl.
- **Strumentazione:** micropipette da 10 - 20 - 50 - 1000 µl, vortex, centrifuga, incubatore termoblocco, Blue-Light device e termociclatore per qPCR.



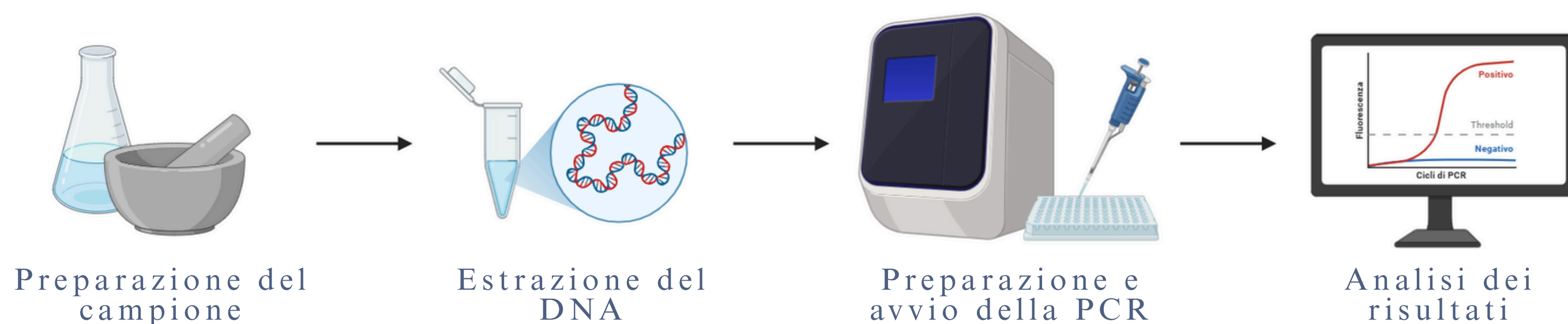
Detection Kit

Kit necessario per il rilevamento, l'amplificazione e la quantificazione del DNA target. La divisione Condagene®, di Condalab, ha sviluppato kit specifici per allergeni alimentari e microrganismi, anche patogeni. Ciascun kit, specifico per il target da rilevare, è composto da:

1. **Master Mix:** Buffer, dNTPs, DNA polimerasi + Internal Control (IC)
2. **Assay mix:** Primers e sonde fluorescenti
3. **Controlli negativi:** acqua priva di nucleasi
4. **Controlli positivi:** DNA target

WORKFLOW - REAL TIME PCR

La qPCR permette di rilevare in modo rapido ed efficace microrganismi ed allergeni alimentari, mediante l'analisi del DNA presente nei campioni di interesse. A seconda del target, variano il Detection kit e le specifiche di utilizzo, tuttavia, il workflow non cambia.



1. Preparazione del campione

A seconda delle caratteristiche specifiche del campione, possono essere necessarie procedure come l'omogeneizzazione e la macinazione prima dell'estrazione del DNA.

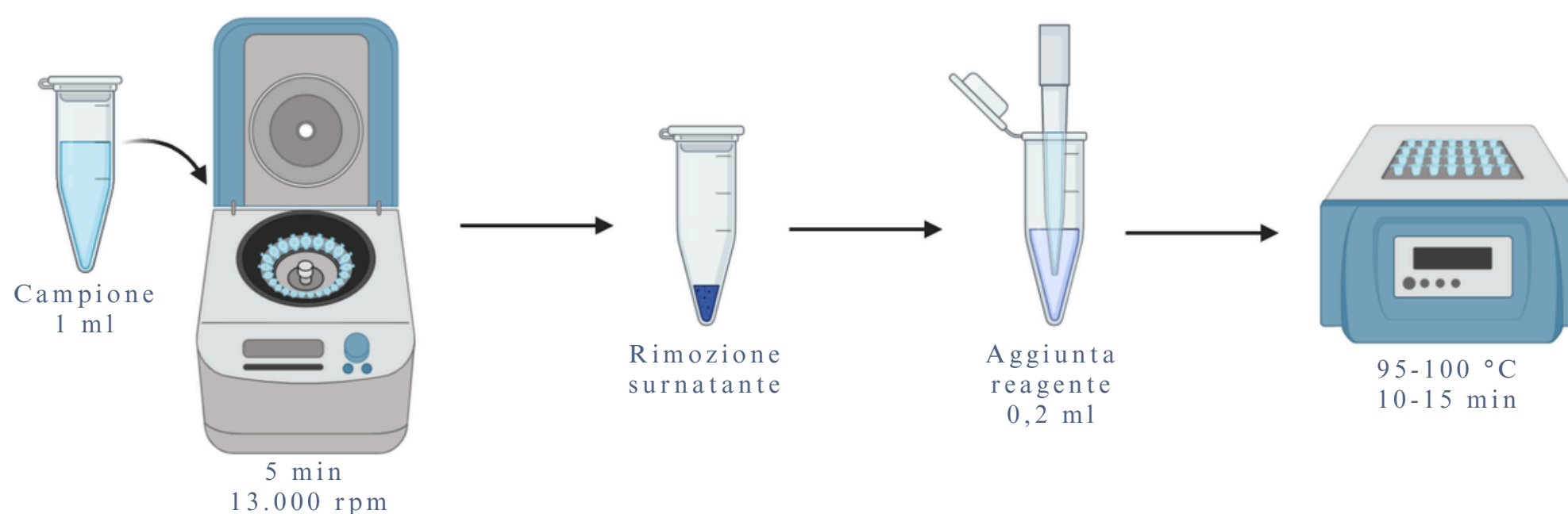
2. Estrazione del DNA

Prima di procedere con la qPCR vera e propria, è necessario estrarre il DNA dal campione in esame. La divisione Condagene®, di Condalab, ha sviluppato diversi kit per questo processo (come Condagene® Extraction Rapid e Condagene® Extraction Column) a seconda delle caratteristiche del campione.

Scegliere il kit più appropriato e seguire il protocollo indicato sulla scheda tecnica corrispondente.

Esempio: Condagene® Extraction Rapid

Reagente progettato per l'estrazione del DNA in soli 15 minuti e in un unico passaggio, adatto a un'ampia varietà di matrici: ortaggi, carni, prodotti lattiero-caseari, acqua.

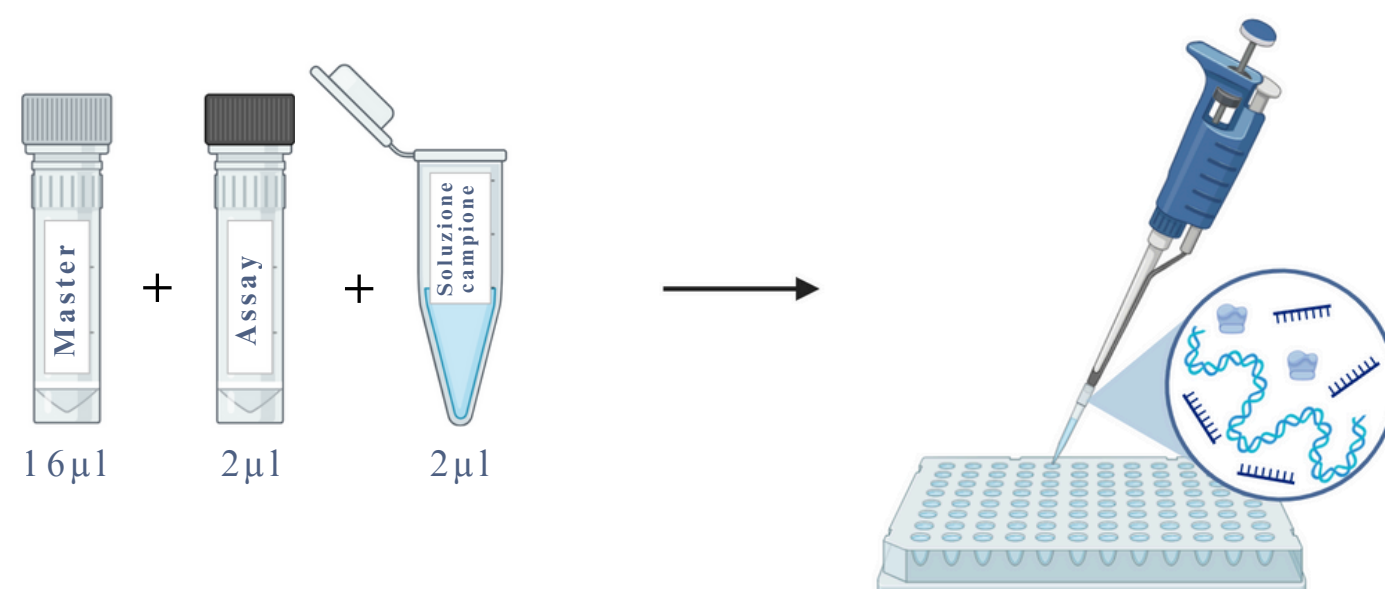


In questa fase è inoltre importante limitare l'insorgenza di falsi positivi, identificando le "viable cells". A tale scopo, si utilizza il reagente ViableCell in combinazione con lo strumento Blue-Light, entrambi prodotti da Condalab. L'obiettivo di questo passaggio è neutralizzare il DNA proveniente da cellule morte e/o il DNA libero, che potrebbe interferire e generare falsi positivi durante l'analisi PCR successiva. Il reagente viene aggiunto ai campioni prima dell'estrazione del DNA; le soluzioni così preparate vengono quindi inserite nell'apposito dispositivo ed esposte a luce blu. Questo trattamento consente di marcare selettivamente i filamenti di DNA indesiderati prima della loro estrazione, rendendoli distinguibili da quelli target nella successiva fase di amplificazione tramite PCR.

3. Preparazione e avvio della PCR

Il seguente protocollo, definito per i Detection kit di Condalab, è lo stesso per il rilevamento di allergeni alimentari e di microrganismi. Di seguito sono riportati gli step principali.

- ① Scongelare le soluzioni del kit.
Mescolare e centrifugare brevemente.
- ② Preparare i mix di reazione prelevando 16µl di Master Mix e 2µl di Assay Mix, per ciascuna condizione da analizzare. Si ottengono così aliquote da 18µl da dispensare nelle provette finali o nei pozzetti della multiwell da 96 da utilizzare per la lettura.
- ③ Aggiungere:
 - 2µl soluzione di controllo positivo o
 - 2µl soluzione di controllo negativo o
 - 2µl soluzione campione.Per ogni condizione deve essere presente almeno un pozzetto/provetta con 20µl di soluzione totale (Master Mix + Assay Mix + soluzione campione/controllo).
- ④ Centrifugare brevemente.
Inserire i campioni nel termociclatore e programmarlo con le specifiche riportate sul manuale di utilizzo del kit (tempo e temperatura di ciascuna fase del ciclo, numero di cicli).



4. Analisi dei risultati

Per l'analisi dei risultati qPCR, selezionare le opzioni di visualizzazione della fluorescenza. I campioni con valori di Ct positivi sono considerati positivi, tuttavia, è bene considerare anche l'andamento delle curve.

Nei Detection kit è inoltre presente un Internal Control (IC), amplificato contemporaneamente al DNA target dei campioni ma con primers e sonde fluorescenti diversi. L'analisi di questo parametro e il suo confronto con il campione e con i controlli negativi/positivi permette di valutare eventuali interferenze e di assicurare l'accettabilità del test.

Condizioni di accettabilità del test:

- **Controlli Positivi:** deve risultare positivo sia il controllo che il parametro IC,
- **Controlli Negativi:** il controllo deve risultare negativo mentre il parametro IC deve risultare positivo.

Risultati sul campione:

- **Test positivo:** Se risultano positivi sia il campione che il parametro IC allora il DNA è stato rilevato e il campione è positivo all'allergene/microrganismo ricercato.
- **Test negativo:** Se il campione risulta negativo e il parametro IC risulta positivo allora il DNA non è stato rilevato e il campione è negativo all'allergene/microrganismo ricercato.
- **Test non valido:** Se risultano negativi sia il campione che il parametro IC allora il risultato del test non è valido e probabilmente sono presenti inibitori della PCR nel campione. Diluire quindi il campione o estrarre nuovamente il DNA e ripetere la PCR.

Accorgimenti

Le analisi di biologia molecolare devono essere eseguite da personale qualificato per evitare errori dovuti a contaminazioni o degradazione del DNA.

È fortemente raccomandato disporre di aree, materiali e strumenti dedicati per l'estrazione del DNA, la preparazione della PCR e le procedure post-PCR. Inoltre, il workflow in laboratorio deve essere unidirezionale: iniziare dall'area di estrazione e proseguire verso l'area di amplificazione e rilevazione.

È fondamentale leggere le istruzioni, non mescolare lotti di reagenti, usare adeguati dispositivi di protezione e tenere separati i materiali positivi dagli altri reagenti.

PRODOTTI PER REAL-TIME PCR NEL CATALOGO KAIROSAFE

Reagenti

- Extraction kit,
- Detection kit
- Viability

Consumabili

- Provette e micropiastre
- Puntali con filtro

Strumentazione dedicata

- Termociclatore
- Incubatore termoblocco
- Pipette automatiche
- Vortex
- Centrifuga
- Blue-Light device

DETECTION KIT - ALLERGENI ALIMENTARI

C6530	Condagene® Allergens Almond, 10 rnx
C6531	Condagene® Allergens Cashew, 10 rnx
C6532	Condagene® Allergens Celery, 10 rnx
C6533	Condagene® Allergens Hazelnuts, 10 rnx
C6534	Condagene® Allergens Lupin, 10 rnx
C6535	Condagene® Allergens Mustard, 10 rnx
C6536	Condagene® Allergens Peanuts, 10 rnx
C6537	Condagene® Allergens Pecan (Walnut), 10 rnx
C6538	Condagene® Allergens Sesame, 10 rnx
C6539	Condagene® Allergens Soy bean, 10 rnx
C6540	Condagene® Allergens Walnut, 10 rnx

DETECTION KIT - MICRORGANISMI

C6518	Condagene® Salmonella spp., 10 rnx
C6519	Condagene® Listeria monocytogenes, 10 rnx
C6520	Condagene® Campylobacter jejuni, 10 rnx
C6521	Condagene® Cronobacter spp., 10 rnx
C6522	Condagene® Vibrio spp., 10 rnx
C6523	Condagene® STEC Screening, 10 rnx
C6524	Condagene® STEC ID, 10 rnx
C6525	Condagene® Legionella spp., 10 rnx
C6526	Condagene® L. pneumophila, 10 rnx
C6527	Condagene® Legionella spp. and L. pneumophilla, 10 rnx
C6528	Condagene® Brettanomyces/Dekkera, 10 rnx
C6529	Condagene® Zygosaccharomyces bailii, 10 rnx
C6541	Condagene® E. coli O157:H7 / O157, 10 rnx

VIABILITY

C6502	Condagene® ViableCell
-------	-----------------------

EXTRACTION KIT

C6500	Condagene® Extraction Complex
C6504	Condagene® Extraction Rapid
C6505	Condagene® Extraction Rapid
C6506	Condagene® Extraction Column
C6507	Condagene® Extraction Column

PROVETTE E MICROPIASTRE PER PCR

5615008	Microprovette per centrifuga con tappo a pressione "Safety Cup" 1.5ml, fondo conico autoclavabili. 1000pz.
8610001	Microprovette per PCR con tappo a cupola, 0.2ml, 1000 pz
861006	Microprovette per PCR con tappo piatto, 0.2ml, 1000 pz
8610040	PCR strips con 8 microprovette da 0,2ml, con tappo piatto, 126pz
8610039	PCR strips con 8 microprovette da 0,2ml, con tappo a cupola, 120pz
8610002	PCR strips con 8 microprovette da 0,2ml, senza tappo, 250pz
8610015	PCR cap strips con 8 tappi piatti, 126pz
8610003	PCR cap strips con 8 tappi a cupola, 126pz
8610011	Piastre per PCR a 96 pozzetti 0.2ml, con bordo, 100pz
8610014	Piastre PS per PCR a 96 pozzetti 0.2ml, senza bordo, 100 pz.

STRUMENTI PER REAL-TIME PCR

CDL96	Termociclatore CDL96
C6503	Blue-light
22008013	Mix Vortex (0-2500 rpm). Molto compatto. Velocità regolabile, modalità di funzionamento a tocco o in continuo
C2000-E	PlateFuge. Centrifuga per 2 micropiastre o 24 strisce x 0,2ml. Velocità 2550rpm
4780100	Ratiopetta® Pipetta automatica 10-100 µl
4780200	Ratiopetta® Pipetta automatica 20-200 µl
4781000	Ratiopetta® Pipetta automatica 100-1000 µl
4770066	Pipetta automatica multicanale ME200 8 canali 20-200 µl
BSH100X-E	Incubatore a secco. Digitale, Impostazione della temperatura da RT +5°C a 150°C. Da utilizzare con 1,2 o 4 blocchi riscaldanti serie BSW
BSW1500	Blocco riscaldante in alluminio per 24 provette da centrifuga da 1.5ml. Da alloggiare in incubatore a secco serie BSH

PUNTALI PER PCR

1770010	Puntali ratiolab® aerojet ultra tips volume 0.1-10 µl con filtro, 960 pz (10rack)
1770020	Puntali ratiolab® aerojet ultra tips volume 1-20 µl con filtro, 960 pz (10rack)
1770200	Puntali ratiolab® aerojet ultra tips volume 1-200 µl con filtro, 960 pz (10rack)
1771000XL	Puntali ratiolab® aerojet ultra tips volume 1000 µl con filtro, 960 pz (10rack)

Per informazioni e richieste:

KAIROSafe S.r.l.

Sistiana, 41/D 34011 Duino Aurisina (TS)

Tel: 040 2907149 - 299502

e-mail: info@kairosafe.it

web: www.kairosafe.it

