

## La diagnostica PCR nella clinica equina

Nell'ambito della diagnostica delle malattie infettive abbiamo a disposizione una metodica di ricerca ed amplificazione del materiale genetico relativo all'agente eziologico causa di malattia: la PCR (Polymerase Chain Reaction).

Si tratta di una tecnica di amplificazione genica in vitro di specifiche sequenze di DNA, attraverso l'utilizzo di polimerasi e primers di estensione, riferita al genoma di agenti eziologici responsabili di malattia, per la tipizzazione delle neoplasie e per i test genetici.

Questa metodica è stata scoperta nei primi anni 80, si è evoluta con molteplici varianti (Real time, Nested, RT-PCR, etc...) fino ai giorni nostri, assumendo una notevole importanza nella diagnostica specifica delle malattie infettive batteriche, virali e parassitarie, rilevando l'agente eziologico direttamente dal paziente, senza aspettarne la sierconversione.

Approfondiamo questa metodica: viene attuata la sintesi in vitro di un segmento di DNA completo a partire da un filamento singolo, che funge da stampo per il completamento del DNA, attraverso l'utilizzo di DNA polimerasi, con una sequenza „ a catena“.

Vengono ripetuti più cicli amplificanti, dalle 30 fino alle 50 volte, aumentando di volta in volta il materiale genetico di interesse finché la reazione raggiunge un plateau, dovuto al consumo delle polimerasi e dei primers utilizzati.

A questo punto sappiamo se c'è stata la replicazione del materiale genetico di interesse (esito positivo) oppure se nel materiale preso in esame non abbiamo alcun DNA patologico (esito negativo).

Prendiamo in esame i vari passaggi:

- la sequenza viene estratta da vari materiali e separata in due monofilamenti (denaturata)
- viene preparata una soluzione dove sono poi aggiunti dei nucleotidi liberi
- il tutto in particolari condizioni di temperatura e pH, per un certo periodo di tempo
- si aggiungono dei primers, ovvero delle brevi sequenze di RNA complementari a due acidi nucleici delle estremità 5 e 3 dei due filamenti da riprodurre con le sequenze di interesse, che innescano la reazione
- si aggiunge una DNA polimerasi termoresistente (Taq-polimerasi) ed altre sostanze che agevolano la reazione
- si aspetta e si valuta poi se l'amplificazione genica del genoma di interesse sia avvenuta

Per ridurre le fonti di errore – si tratta di una serie di reazioni delicate e molto sensibili - è necessario che:

- l'estrazione e la denaturazione del DNA da prendere in esame siano attuati in condizioni controllate, in caso contrario le

reazioni non avvengono od avvengono in modo alterato, dando luogo ad errori interpretativi.

- il DNA target – cioè il segmento genetico da analizzare - deve essere relativo a parti e/o funzioni vitali o che codifichino la patogenicità del microrganismo che si vuole ricercare, per non rischiare di amplificare parti di genoma aspecifiche comuni e di scarsa utilità diagnostica

- I primers quindi devono essere specifici per le sequenze genomiche patologiche (es. *Rhodococcus* sp.), oltre che essere inseriti nella soluzione in concentrazione idonea con precise diluizioni scalari, in quanto diversamente si avrebbero dei falsi negativi

- anche la concentrazione di magnesio e dei nucleotidi da utilizzare per la sintesi e le temperature delle varie reazioni enzimatiche devono rispettare un certo range per una perfetta funzionalità della polimerasi, dei primers, delle sonde che li agganciano e per la conservazione del DNA da esaminare

- l'interpretazione della reazione passa attraverso l'analisi delle curve di amplificazione e del plateau che determina la fine del test

- usualmente si lavora sotto cappa a flussi laminari, con pipette dedicate e puntali con filtri per evitare le contaminazioni con materiale genetico estraneo.

### **Materiale utilizzabile per l'estrazione**

L'estrazione del genoma di interesse diagnostico è possibile da molti materiali: sangue intero, cute, croste e peli, tampone senza medium proveniente da scoli, tessuti vari preferibilmente non fissati, feci, urina e sperma, liquidi cavitari, etc. scelti anche in base alle caratteristiche della malattia.

Nel cavallo ad esempio:

- sangue in EDTA e zecca per gli emoparassiti

- tampone a secco da scolo oculo-nasale e sangue in EDTA per le malattie respiratorie

- tampone a secco / materiale abortivo o sangue in EDTA per le forme che provocano aborto

- sperma (anche congelato) per le malattie veneree

- sangue in EDTA per forme virali neurologiche

- feci per le malattie del tratto gastroenterico

- urina

- tampone a secco da ascessi per malattie batteriche (*Streptococcus* sp. E *Rhodococcus*)

- sangue in EDTA e criniera con bulbo pilifero per i test genetici

- peli, croste e tessuto non fissato per Dermatofiti e Sarcoide equino

Si consiglia di chiedere nello specifico al Laboratorio il dettaglio del materiale idoneo per l'agente eziologico da ricercare per ciascuna malattia.

**Varianti utilizzate presso Laboklin:**

- **Real time PCR:** permette di quantificare in tempo reale oltre che amplificare il DNA ricercato, attraverso l'utilizzo di marcatori fluorescenti.

- **Nested PCR:** permette di ridurre l'amplificazione di siti aspecifici non corretti, attraverso l'utilizzo di 2 set di primers, uno che amplifica un target secondario della prima reazione, che si attiva quindi solo se la prima reazione ha avuto luogo nel modo corretto. Si utilizza per aumentare la specificità della PCR su substrati difficili.

- **RT-PCR (Reverse transcriptase PCR):** si tratta di una PCR che lavora su stampi ad RNA che vengono trascritti a cDNA tramite una trascrittasi inversa. Parte di questo DNA viene poi amplificato come nella classica reazione.

- **Melting curve analysis / Agarose gel electrophoresis:** permettono di implementare i risultati di una PCR attraverso l'analisi ulteriore del DNA prodotto dalla reazione di amplificazione, per stabilirne unicità e specificità, indice di accuratezza e correttezza diagnostica (o per differenziare, per esempio, Babesia vs Theileria, o Streptococcus sp.).