RISE

*Infrastruttura Strategica della Ricerca*

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI ALDO MORO

# Real-Time PCR system (CICLIZZATORE REAL TIME)




Per informazioni rivolgersi al responsabile scientifico:

Prof. Vito Martela

vito.martella@uniba.it

Polo Agraria Veterinaria

Dipartimento di Medicina Veterinaria (DiMeV)

Valenzano (BA), 70010

ENG: Within the framework of the PNRR, the University of Bari, in partnership with the University of Pavia and key stakeholders, participates in the INF-ACT research program, which was developed to address unmet needs related to emerging infectious diseases in humans. The program adopts a One Health approach, considering human health within a broader context that includes domestic and wild animals as potential disease reservoirs, as well as environmental factors that may increase the risk of spillovers.

The project is organized into five research nodes. Three “vertical” research nodes focus on specific research themes: Node 1, emerging and re-emerging viral diseases, with a focus on respiratory and zoonotic viruses; Node 2, arthropod vectors and vector-borne pathogens, with a focus on vector-borne diseases most at risk of expanding or emerging in Italy, such as arboviruses; and Node 3, diseases caused by bacteria and fungi resistant to multiple antibiotics, with a focus on antimicrobial resistance and the molecular mechanisms of multidrug resistance.

In this context, a CFX Opus 96 Real-Time PCR system was acquired in 2024 with PNRR funds and allocated to the research activities of the Department of Infectious Diseases at the Faculty of Veterinary Medicine. The instrument supports molecular research and diagnostic activities aimed at the rapid detection and characterization of microorganisms and their genetic determinants. Since its acquisition, the Real-Time PCR system has strengthened the

laboratory's capacity to investigate microbial and viral pathogens originating from domestic and wild animals, as well as from environmental samples. In particular, the instrument represents an important tool for research activities related to Node 1, supporting the detection and molecular characterization of emerging and re-emerging viral pathogens.
Over the past year, UNIBA has focused its efforts on research related to Node 1, supporting PhD students, professors, and alumni through the development of molecular approaches for the detection and characterization of microorganisms of veterinary and zoonotic relevance.

## What is this technique?

Real-Time PCR, also known as quantitative PCR or qPCR, stands for Real-Time Polymerase Chain Reaction. It is a molecular biology technique used to detect and quantify specific DNA sequences during the amplification process. Unlike conventional PCR, in which the amplified DNA is generally analyzed at the end of the reaction, Real-Time PCR monitors the accumulation of amplified DNA in real time through fluorescent signals.
The technique is particularly useful for the rapid and sensitive detection of microorganisms and specific genetic targets. Depending on the assay design, it can be used to microbial, or viral nucleic acids or other relevant biological characteristics. Because it provides results directly from molecular targets, Real-Time PCR can complement or, in some applications, substantially accelerate traditional culture-based methods.

## How it works?

Real-Time PCR is based on the same fundamental principle as conventional PCR: the selective amplification of a specific DNA sequence through repeated cycles of heating and cooling. The reaction mixture contains the DNA template, primers that define the target region, nucleotides required for DNA synthesis, a thermostable DNA polymerase, and fluorescent components that allow the newly generated DNA to be detected.
During each PCR cycle, three main steps take place. First, the DNA double strand is heated and separated into two single strands in a process called denaturation. Second, the temperature is lowered to allow the primers to bind specifically to their complementary target sequences; this step is known as annealing. Third, the DNA polymerase extends the primers by incorporating nucleotides and synthesizing new DNA strands. These steps are repeated for several cycles, resulting in an exponential increase in the number of copies of the target sequence.
What distinguishes Real-Time PCR is the simultaneous detection of fluorescence during amplification. As the amount of target DNA increases, fluorescent signal also increases. The instrument measures this signal after each cycle and generates an amplification curve. The point at which fluorescence becomes distinguishable from the background is used to determine the cycle threshold (Ct or Cq). In general, a lower Ct value indicates that a larger

amount of target nucleic acid was present in the original sample, whereas a higher Ct value indicates a lower starting amount.
Two of the most used fluorescence-based approaches are DNA-binding dyes, such as SYBR Green, and sequence-specific fluorescent probes, such as TaqMan probes. Probe-based assays provide an additional level of specificity because fluorescence is generated only when the probe binds to the target sequence and is processed during amplification. This makes the technique particularly suitable for the detection of specific pathogens or genetic determinants.
When RNA is the target molecule, such as in the case of many RNA viruses, an additional reverse-transcription step is required. In this case, the RNA is first converted into complementary DNA (cDNA), which is subsequently amplified and detected by Real-Time PCR. This approach is commonly referred to as RT-qPCR.
Real-Time PCR enhances research, diagnostics, and laboratory services by combining high analytical sensitivity with rapid and specific detection of genetic targets. It is particularly valuable when microorganisms are difficult or slow to culture, when rapid confirmation is required, or when the target of interest is a specific gene rather than the microbial genome.
Within the One Health framework of INF-ACT, this technology is especially relevant because it allows rapid investigation of microbial and viral pathogens and genetic determinants across different biological and environmental matrices. In the context of Node 1, Real-Time PCR can support the molecular detection of emerging and re-emerging viral pathogens.
The technique also facilitates the screening of a large number of samples and allows the comparison of pathogen or resistance-marker levels among different samples and experimental conditions. Its speed, sensitivity, specificity, and relatively low reagent consumption make Real-Time PCR a valuable molecular tool for both research and diagnostic applications.
By enabling the rapid detection of specific genetic targets, Real-Time PCR can significantly shorten the time required to obtain molecular information compared with approaches based exclusively on culture and phenotypic characterization.

ITA: Nell'ambito del PNRR, l'Università di Bari, in collaborazione con l'Università di Pavia e i principali stakeholder, partecipa al programma di ricerca INF-ACT, sviluppato per rispondere alle esigenze insoddisfatte relative alle malattie infettive emergenti nell'uomo. Il programma adotta un approccio One Health, considerando la salute umana in un contesto più ampio che include gli animali domestici e selvatici come potenziali serbatoi di malattie, nonché i fattori ambientali che possono aumentare il rischio di spillover.
Il progetto è organizzato in cinque nodi di ricerca. Tre nodi di ricerca "verticali" si concentrano su temi specifici: Nodo 1, malattie virali emergenti e riemergenti, con particolare attenzione ai virus respiratori e zoonotici; Nodo 2, vettori artropodi e patogeni trasmessi da vettori, con particolare attenzione alle malattie trasmesse da vettori a maggior rischio di espansione o di

emersione in Italia, come gli arbovirus; e Nodo 3, malattie causate da batteri e funghi resistenti a più antibiotici, con particolare attenzione alla resistenza antimicrobica e ai meccanismi molecolari della multiresistenza.
In questo contesto, nel 2024, grazie a fondi PNRR, è stato acquisito un sistema CFX Opus 96 Real-Time PCR, destinato alle attività di ricerca del Dipartimento di Malattie Infettive della Facoltà di Medicina Veterinaria. Lo strumento supporta le attività di ricerca molecolare e diagnostica finalizzate all'individuazione e alla caratterizzazione rapida di microrganismi e dei loro determinanti genetici. Fin dalla sua acquisizione, il sistema Real-Time PCR ha rafforzato la capacità del laboratorio di studiare agenti patogeni microbici e virali provenienti da animali domestici e selvatici, nonché da campioni ambientali. In particolare, lo strumento rappresenta un importante strumento per le attività di ricerca relative al Nodo 1, supportando l'individuazione e la caratterizzazione molecolare di agenti patogeni virali emergenti e riemergenti.
Nel corso dell'ultimo anno, l'UNIBA ha concentrato i propri sforzi sulla ricerca relativa al Nodo 1, supportando dottorandi, professori e alunni nello sviluppo di approcci molecolari per l'individuazione e la caratterizzazione di microrganismi di rilevanza veterinaria e zoonotica.

## Cos'è questa tecnica?

La PCR in tempo reale, nota anche come PCR quantitativa o qPCR, è l'acronimo di Real-Time Polymerase Chain Reaction (Reazione a catena della polimerasi in tempo reale). Si tratta di una tecnica di biologia molecolare utilizzata per rilevare e quantificare specifiche sequenze di DNA durante il processo di amplificazione. A differenza della PCR convenzionale, in cui il DNA amplificato viene generalmente analizzato al termine della reazione, la PCR in tempo reale monitora l'accumulo di DNA amplificato in tempo reale tramite segnali fluorescenti.
Questa tecnica è particolarmente utile per il rilevamento rapido e sensibile di microrganismi e specifici bersagli genetici. A seconda della configurazione del test, può essere utilizzata per analizzare acidi nucleici microbici o virali o altre caratteristiche biologiche rilevanti. Poiché fornisce risultati direttamente dai bersagli molecolari, la PCR in tempo reale può integrare o, in alcune applicazioni, accelerare significativamente i metodi tradizionali basati sulla coltura.

## Come funziona?

La PCR in tempo reale si basa sullo stesso principio fondamentale della PCR convenzionale: l'amplificazione selettiva di una specifica sequenza di DNA attraverso cicli ripetuti di riscaldamento e raffreddamento. La miscela di reazione contiene il DNA stampo, i primer che definiscono la regione bersaglio, i nucleotidi necessari per la sintesi del DNA, una DNA polimerasi termostabile e componenti fluorescenti che consentono di rilevare il DNA appena sintetizzato.

Durante ogni ciclo di PCR, si verificano tre fasi principali. Innanzitutto, il doppio filamento di DNA viene riscaldato e separato in due filamenti singoli in un processo chiamato denaturazione. In secondo luogo, la temperatura viene abbassata per consentire ai primer di legarsi specificamente alle loro sequenze bersaglio complementari; questa fase è nota come annealing. In terzo luogo, la DNA polimerasi estende i primer incorporando nucleotidi e sintetizzando nuovi filamenti di DNA. Queste fasi vengono ripetute per diversi cicli, con conseguente aumento esponenziale del numero di copie della sequenza bersaglio.

Ciò che distingue la PCR in tempo reale è il rilevamento simultaneo della fluorescenza durante l'amplificazione. All'aumentare la quantità di DNA bersaglio aumenta anche il segnale di fluorescenza. Lo strumento misura questo segnale dopo ogni ciclo e genera una curva di amplificazione. Il punto in cui la fluorescenza diventa distinguibile dal rumore di fondo viene utilizzato per determinare la soglia del ciclo (Ct o Cq). In generale, un valore di Ct inferiore indica che una maggiore quantità di acido nucleico bersaglio era presente nel campione originale, mentre un valore di Ct superiore indica una quantità iniziale inferiore.

Due degli approcci basati sulla fluorescenza più utilizzati sono i coloranti che si legano al DNA, come il SYBR Green, e le sonde fluorescenti sequenza-specifiche, come le sonde TaqMan. I test basati su sonde offrono un ulteriore livello di specificità perché la fluorescenza viene generata solo quando la sonda si lega alla sequenza bersaglio e viene elaborata durante l'amplificazione. Ciò rende la tecnica particolarmente adatta per l'individuazione di patogeni specifici o determinanti genetici.

Quando la molecola bersaglio è l'RNA, come nel caso di molti virus a RNA, è necessario un ulteriore passaggio di retrotrascrizione. In questo caso, l'RNA viene prima convertito in DNA complementare (cDNA), che viene successivamente amplificato e rilevato mediante PCR in tempo reale. Questo approccio è comunemente noto come RT-qPCR.

La PCR in tempo reale migliora la ricerca, la diagnostica e i servizi di laboratorio combinando un'elevata sensibilità analitica con il rilevamento rapido e specifico di bersagli genetici. È particolarmente utile quando i microrganismi sono difficili o lenti da coltivare, quando è necessaria una conferma rapida o quando il bersaglio di interesse è un gene specifico piuttosto che l'intero genoma microbico.

Nell'ambito del quadro One Health di INF-ACT, questa tecnologia è particolarmente rilevante perché consente l'indagine rapida di patogeni microbici e virali e di determinanti genetici in diverse matrici biologiche e ambientali. Nel contesto del Nodo 1, la PCR in tempo reale può supportare il rilevamento molecolare di patogeni virali emergenti e riemergenti.

La tecnica facilita inoltre lo screening di un elevato numero di campioni e consente il confronto dei livelli di patogeni o marcatori di resistenza tra diversi campioni e condizioni sperimentali. La sua velocità, sensibilità, specificità e il consumo relativamente basso di reagenti rendono la PCR in tempo reale un prezioso strumento molecolare sia per la ricerca che per le applicazioni diagnostiche.

Grazie alla possibilità di rilevare rapidamente specifici bersagli genetici, la PCR in tempo reale può ridurre significativamente i tempi necessari per ottenere informazioni molecolari rispetto agli approcci basati esclusivamente sulla coltura e sulla caratterizzazione fenotipica.

## References


1. INF-ACT- Piano Nazionale di Ripesa e Resilenza. Università degli Studi di Bari Aldo Moro. *One Health basic and translational research actions addressing unmet needs on emerging infectious diseases*. Retrieved [03-09-2026], from: https://www.uniba.it/it/ricerca/pnrr/progetti-pnrr/progetti-m4c2/inf-act
2. Bustin SA, Ruijter JM, van den Hoff MJB, Kubista M, Pfaffl MW, Shipley GL, Tran N, Rödiger S, Untergasser A, Mueller R, Nolan T, Milavec M, Burns MJ, Huggett JF, Vandesompele J, Wittwer CT. MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. Clin Chem. 2025 Jun 3;71(6):634-651. doi: 10.1093/clinchem/hvaf043. PMID: 40272429.
3. Bio-Rad Laboratories. CFX Opus 96 and CFX Opus 384 Real-Time PCR Systems: Instrument Guide. Bio-Rad Laboratories from: https://www.bio-rad.com/sites/default/files/2023-04/Bulletin_7479.pdf?utm_source=chatgpt.com