

Organizzazione e gestione tecnica di un laboratorio di medicina molecolare: linee guida

S. Ursi^a, A. Bomba^b, R. De Marinis^b

^aLaboratorio di Patologia Clinica II, Policlinico, Chieti

^bLaboratorio Analisi, P.O. "Renzetti", Lanciano (CH)

Evoluzione tecnologica della medicina molecolare

Dal punto di vista della evoluzione storica delle tecniche di biologia molecolare si possono distinguere quattro diverse generazioni di procedure.

- Le tecniche di *prima generazione*, prevedevano che tutte le fasi fossero compiute manualmente ed erano rappresentate, prevalentemente, da tecniche di ibridazione molecolare che, pertanto, non prevedevano la fase di amplificazione.
- Le tecniche di *seconda generazione* con le quali fu possibile compiere, con sistemi semi-automatici, sia la fase di amplificazione che quella di rivelazione mentre la fase iniziale di estrazione dei campioni veniva effettuata ancora con metodica manuale.
- Le apparecchiature di *terza generazione* prevedono che l'amplificazione e la rivelazione avvengano in tempo reale, si comincia a parlare di PCR "real time" o dinamica o di quantificazione cinetica. La rappresentazione della avvenuta reazione di polimerizzazione può essere ottenuta mediante sistemi di quantificazione dei prodotti della PCR man mano che si accumulano, ovvero mediante il rilievo del consumo dei primers nel corso della reazione.
- Nei più recenti sistemi di *quarta generazione*, infine, il ciclo è completamente integrato. Con l'avvento di tecniche avveniristiche come quella del bio-chip, i campioni vengono continuamente monitorati in modo da processarli interamente in un singolo tubo di reazione.

Più nel concreto, tuttavia, le energie delle aziende del settore, attualmente, sono volte alla "miniaturizzazione" dei sistemi di analisi di microcampioni biologici, in completa automazione.

Le tecniche di *Sequenziamento* non sono dissimili da quelle della PCR per quanto attiene alle procedure di estrazione degli acidi nucleici, mentre se ne discostano parzialmente per ciò che attiene alle fasi di amplifi-

cazione e di rivelazione. La descrizione delle tecniche di sequenziamento non rientra nelle finalità di questa esposizione per cui ci limitiamo ad accennare, sinteticamente, che le procedure prevedono: a) una fase estrattiva; b) la separazione delle emieliche del DNA (*denaturazione*); c) la composizione di un mix di reazione che contiene:

- i primers
- i deossinucleotidi dNTPs
- i dideossinucleotidi ddNTPs marcati
- la DNA polimerasi (Taq polimerasi).

Nel mix, la TAQ polimerasi dirige la sintesi delle catene indotta dai primers in senso 5' → 3'. L'intervento dei dideoxinucleotidi determina il blocco della reazione di polimerizzazione in corrispondenza della estremità 3' impedendo, con ciò, l'aggiunta di altre basi (*estensione*).

Dopo separazione dei singoli frammenti mediante opportune tecniche elettroforetiche (su gel di poliacrilammide o capillare o multicapillare) un sistema di rilevamento ottico consente la identificazione dei nucleotidi terminali relativi ai singoli frammenti. Ciò permette, in ultima analisi, la ricostruzione della catena in esame sulla base del principio della complementarità delle basi.

Sistemi tecnologici

Rispetto alle tecniche quasi "pionieristiche" degli approcci iniziali alla PCR due elementi hanno notevolmente semplificato la procedura e permesso la sua rapida diffusione:

- la DNA polimerasi (Taq, Ultma, Tth, Pfu ed altre)
- i thermal cycler (s).

Le caratteristiche di un buon termociclatore sono:

- velocità di modificazione della temperatura del campione ("rumping time") non superiore o, quantomeno, uguale ad 1 °C/sec
- approssimazione della temperatura di incubazione non superiore a 1°C

- temperatura di incubazione omogenea in tutto il blocco contenente i campioni
- possibilità di verificare la corretta funzionalità.

I principali fattori che influenzano una reazione di polimerizzazione a catena sono:

- 1) *Specificità (falsi positivi)*
 - scelta dei primers
 - condizioni della reazione
 - contaminazioni
- 2) *Sensibilità (falsi negativi)*
 - eterogeneità genomica
 - presenza inibitori
 - efficienza reazione
- 3) *Riproducibilità (standardizzazione)*
 - protocollo PCR
 - preparazione campione
 - metodo di rivelazione.

Per quanto riguarda i primers, si può dire che esistono due famiglie: 1) *primers specifici*; 2) *primers universali*. La sostanziale differenza risiede nel fatto che i primi si adoperano prevalentemente per sequenze altamente conservate e/o variabili intraspecie mentre i secondi su mutazioni non note e/o su sequenze omologhe intraspecie. Per ciò che invece attiene alle *condizioni della reazione* vanno considerati vari fattori influenzanti, tra i quali gli ioni magnesio.

La concentrazione di cloruro di magnesio rappresenta probabilmente il parametro più critico nella fase di ottimizzazione di una reazione di PCR.

Il pH della reazione, nella fase di incubazione a 72°C (estensione) è pari a 7.2.

Ai fini dell'effetto tamponante, la presenza di cationi divalenti rappresenta un punto cruciale: gli ioni magnesio hanno un effetto decisamente superiore agli ioni manganese e agli ioni calcio, i quali ultimi sembrano essere assolutamente ininfluenti al fine del mantenimento di un pH ottimale.

Linee guida: gestione tecnica operativa

Un corretto utilizzo della tecnica di amplificazione degli acidi nucleici richiede l'uso di specifici accorgimenti per minimizzare da una parte il rischio di contaminazione e dall'altra di aumentare la sensibilità del test che potrebbe essere inficiata dalla degradazione dell'acido nucleico nei campioni da testare.

La possibilità di introdurre la tecnologia PCR in un laboratorio è, in larga misura, condizionata dalle preesistenti attività il che comporta, spesso, la necessità di una riorganizzazione del lavoro.

Bisognerà, pertanto, conciliare da una parte le particolari esigenze delle tecniche di biologia molecolare e, dall'altra, la necessità di non stravolgere totalmente le rimanenti attività.

Si tratterà il più delle volte di mediare, di caso in caso, tra l'obiettivo del "laboratorio ideale di PCR" e le condizioni logistiche di ciascuna realtà.

Esistono, tuttavia, alcuni principi base a cui nessun laboratorio di medicina molecolare deve derogare.

Questa sorta di "tavole della legge", per usare un riferimento biblico, può essere sintetizzata nel modo seguente:

- *Identifica, prepara e conserva correttamente i campioni.* A tale scopo ogni laboratorio deve dotarsi di un protocollo scritto che contenga le norme di preparazione ed estrazione del campione biologico da esaminare ai fini della massima standardizzazione e, quindi, di una più precisa riproducibilità dei risultati. Analogamente appare indispensabile una corretta identificazione e conservazione dei campioni, aliquotati negli appositi tubi di raccolta sterili, in frigo e/o congelatori, che faccia anch'essa riferimento a procedure scritte.
- *Consenti un corretto e agevole spostamento dell'operatore nelle aree di lavoro.*
- *Cambia frequentemente i guanti in lattice.* A tal proposito va detto che è *consigliabile* cambiare i guanti in lattice per lo meno ogni volta che si accede all'area pulita. Questo semplice accorgimento consente di ridurre le possibilità di trasferimento di DNA amplificabile dalle aree contaminate e dai campioni aumentando la specificità del test.
- *Suddividi i reagenti in piccole aliquote.* Scongellare e ricongellare ripetutamente nucleotidi, enzimi e primers porta, inevitabilmente, o al loro deterioramento o allo smaltimento con perdita di materiale. È, pertanto, intuitivo il vantaggio di aliquotare i reagenti in maniera adeguata.
- *Apri ed etichetta con attenzione i tubi di reazione sterili DNAsi e RNAsi free.* È *consigliabile*, a tal riguardo, mettere in opera un efficace sistema di controllo scorte sia dei materiali d'uso che dei reagenti al fine di evitare interruzioni dell'attività o "soluzioni d'emergenza" con utilizzazione di reagenti o materiali non destinati alla PCR e di cui non è garantita la conservazione e/o l'utilizzazione in condizioni PCR.
- *Prepara in maniera completa il mix di reazione ("premix") prima dell'aggiunta del DNA o cDNA.*
- *Chiudi sempre il tubo di reazione, dopo l'aggiunta del campione prima di passare al campione successivo.* Esistono in commercio tubi di reazione con tappo a vite o con tappo a pressione attaccato ad un lato della parete per facilitare questa manovra.
- *Usa pipette ad erogazione positiva dedicata nelle due aree di manovra e per ognuna disponi di idonei portapipette.*
- *Usa puntali con filtro posti su supporti portapuntali.*
- *Pulisci le superfici di lavoro con prodotti specifici (ipoclorito di sodio 10% e alcool etilico al 70%).* È opportuno organizzare uno specifico programma per la pulizia del laboratorio (ad eccezione di quella dei banconi e degli strumenti che è di pertinenza dell'operatore) al fine di evitare che questa possa divenire fonte ed occasione di contaminazione degli amplificati.

Se quelle appena riportate sono le *linee comportamentali minime* per la esecuzione di indagini di biologia molecolare, tuttavia non si può prescindere da un sia pur sintetico elenco della *Strumentazione e Materiale* necessario per portare a termine procedure di 2^a e 3^a generazione:

- Cappa a flusso laminare
- Microcentrifuga
- Vortex
- Blocco termostato a secco e stufa
- Fotometro
- Figorifero, congelatore -20 °C
- Thermal-cycler
- Lavatore micropiastra o sistema elettroforetico
- Cronometro
- Pipette variabili autoclavabili (0,5-1000 µL) con supporti
- Puntali con filtro in portapuntali
- Tubi di biologia molecolare (0.2/0.5/1.5/2.0 mL)
- Rack porta tubi (anche refrigerati)
- Guanti in lattice
- Pennarello indelebile
- Cilindri e Becker
- Reagenti aggiuntivi (alcol etilico - isopropilico - tamponi ipoclorito).

Organizzazione di un modello base: proposta di linee guida

La organizzazione di un modello base di Laboratorio di Biologia Molecolare può essere paragonato alla costruzione di un puzzle, nel quale ogni figura è composta da più elementi che rappresentano le fasi elementari di una reazione PCR o variante PCR.

Ogni singolo passaggio dovrà quindi incastrarsi con il successivo in maniera sequenziale, fino a completare ciascuna fase costituente la procedura di PCR.

In ciascuna operazione sono previsti requisiti fondamentali ai quale *bisogna* attenersi ed altri ai quali è sempre *consigliabile* attenersi.

L'osservazione di questo procedimento, in ciascuna sua componente, consente di raggiungere gli obiettivi di specificità, sensibilità e riproducibilità necessari ai fini di una perfetta resa della reazione.

Un modello base di Laboratorio di Medicina Molecolare deve prevedere la disponibilità di 2 differenti zone:

- A) Zona "pulita" o area di pre-PCR nella quale si compiono le operazioni di:
- preparazione del campione
 - estrazione degli acidi nucleici
 - preparazione della reazione.
- B) Zona "sporca" o area PCR e post-PCR nella quale sono portate a termine le operazioni di:
- amplificazione (o PCR p.d.) (nei sistemi di 2^a generazione, anche questa, dovrà svolgersi in una zona pulita)
 - rivelazione
 - gestione dati e archiviazione.

Area A

Preparazione campione (es.: da sangue intero)

- centrifugazione
- aliquotamento nei tubi sterili
- isolamento linfociti (o delle cellule nucleate)
- lisi cellulare.

Estrazione acidi nucleici

Possono, come abbiamo già visto, adoperarsi tecniche diverse:

- sistema di Boom con particelle solide di silice
- sistema di precipitazione con solventi organici
- sistema di colonne filtranti con membrana di silice
- sistema di cattura mediante biglie magnetiche (magnapure, etc.).

Preparazione della reazione

- aliquotamento reagenti
- preparazione premix
- allestimento reazione PCR (mix o cocktail).

Area B

Amplificazione

Dopo la fase di amplificazione e prima di passare alla fase successiva, *si consiglia* una centrifugazione per evitare l'effetto aerosol che può osservarsi sui tappi dei tubi di amplificazione (5 sec) per effetto dei cicli termici.

Area C

Rivelazione

Come abbiamo già accennato si possono adottare tecniche diverse tra le quali:

- elettroforesi su gel di agarosio con etidio bromuro
- tecniche di ibridazione su micropiastrine (ad es. DEIA)
- elettroforesi capillare
- sequenziamento.

Gestione dati e archiviazione

In questa fase è *consigliabile* prevedere anche le procedure per la gestione del magazzino scorte.

Raccomandazioni finali

Ogni stanza o zona dedicata deve essere attrezzata con tutto ciò che necessita (strumenti e materiale) al completamento della procedura prevista in quella stanza o zona. *Per nessuna ragione strumentazione o materiale dedicato ad una stanza o area, va trasportato o utilizzato in un'altra.*

Nei frigoriferi e nei congelatori è *consigliabile* una separazione fisica fra:

- kit reattivi, aliquote reagenti
- prodotti estratti
- prodotto della reazione di amplificazione (solo per la 1^a e 2^a generazione).

Norme di sicurezza

Le norme di sicurezza per il Laboratorio di Medicina Molecolare sono sovrapponibili a quelle previste per un qualsiasi laboratorio a rischio biologico e che utilizza sostanze chimiche.

Come misure preventive sono indicate l'uso di protezione personale costituita da:

- guanti monouso
- occhiali di protezione (sempre ben puliti)
- camici
- adeguata ventilazione dei locali
- manutenzione attenta della apparecchiatura
- addestramento specifico

- adozione, aggiornamento e divulgazione del protocollo per la sicurezza.

Particolari requisiti e autorizzazioni a norma di legge sono indispensabili nel caso si utilizzi materiale radioattivo.

Bibliografia

1. Marin MG, ed. Diagnostica di laboratorio. Tecniche di amplificazione genica: dal laboratorio alla pratica clinica. Milano: Sorbona publ., 1999.
2. Verna R. La diagnostica di laboratorio con i metodi della biologia molecolare. Padova: Piccin Editore, 1998.
3. DNA Learning Center Academy (sito internet).