

## Sistemi di rivelazione e controllo di qualità

R. Locont

P.O. "S.G. Bosco" - ASL I, Napoli

Rivelazione e controllo di qualità, un binomio inscindibile se per rivelazione si intende, oltre alla rivelazione del prodotto ricercato, evidenziazione di percorsi errati tali da inficiare il buon esito dell'intero percorso analitico, essa costituisce l'ultima fase nelle tecniche di biologia molecolare clinica, così come nella maggior parte delle metodiche di laboratorio perchè rappresenta la "resa dei conti" dell'intero percorso analitico e deve soddisfare requisiti tali da garantire che il segnale rivelato corrisponda esattamente a quello ricercato, che non vi siano tracce di contaminanti (specificità analitica), che il dato ottenuto sia ripetibile.

Inoltre la tecnica di rivelazione deve permettere di identificare piccole quantità del segnale (sensibilità analitica).

Sensibilità, specificità e ripetibilità devono assolutamente essere garantiti, affinché il test possa ritenersi qualitativamente valido.

La maggior parte di questi sistemi prevede l'uso, in fase di ibridazione, di oligonucleotidi marcati con traccianti non radioattivi.

I principali metodi utilizzati per la rivelazione del DNA amplificato sono:

1. elettroforesi su gel di agarosio
2. ibridazione con utilizzo di sonde "calde" o "fredde"
3. sequenziamento
4. HPLC
5. elettroforesi capillare

Fra tutti, l'elettroforesi su gel d'agarosio è, senza dubbio, il più semplice.

La tecnica consiste in una migrazione del DNA, in un campo elettrico, impiegando come supporto un gel d'agarosio contenente bromuro d'etidio (colorante che intercala il DNA ed appare quindi fluorescente su una lampada ad UV).

In un campo elettrico, ad intensità e direzione costante, ciascun tratto di DNA, migra con velocità inversamente proporzionale al proprio peso molecolare.

Su supporto di agarosio si possono quindi separare frammenti di DNA amplificato e identificare, in base

alla migrazione delle bande, il loro peso molecolare e stabilire se si tratta del segmento di DNA ricercato, ovviamente, per uno studio accurato, è possibile utilizzare marcatori di peso molecolare, oppure adeguati controlli di cui è noto il peso molecolare. Comunque, anche adottando idonei controlli, il limite di questa tecnica è la scarsa specificità, in quanto la separazione di una "banda" dà indicazioni relative alla massa del frammento e non alla sequenza nucleotidica; è per questo motivo che l'elettroforesi su gel d'agarosio è poco impiegata come tecnica di rivelazione ma risulta essere un valido controllo di valutazione in termine di resa di prodotto amplificato, presenza di eventuali contaminanti, buona qualità del prodotto amplificato in termine di PM ricercato o presenza di eventuali frammenti anomali indicativi di inquinamento della master mix o ambientale o delle pipette o di cattiva performance dell'amplificatore infine di cattiva ibridazione tra primer e filamento estratto.

Per quanto riguarda le tecniche di ibridazione il termine "ibridazione" indica l'appaiamento di basi complementari fra molecole di acidi nucleici a singola elica (DNA o RNA), sulla base della loro sequenza nucleotidica, secondo il modello di Watson e Crick.

Le reazioni di ibridazione *in vitro* sono il fondamento delle tecniche molecolari di rivelazione di sequenze specifiche di acidi nucleici. Sfruttando tale principio sono stati allestiti sistemi in grado di selezionare e rivelare in maniera specifica, i frammenti di acido nucleico di interesse.

Nel caso di un saggio PCR si utilizzano dei *primers* a sequenza nucleotidica complementare alla sequenza del DNA o RNA da amplificare e l'ibridazione già avviene in fase di amplificazione garantendo l'amplificazione del solo frammento target. Ciò permette di amplificare in maniera specifica la frazione di acido nucleico ricercata. Dopo l'amplificazione, utilizzando delle sonde oligonucleotidiche marcate, con sequenza complementare ad un segmento interno al frammento amplificato, è possibile rivelare il prodotto dell'amplificazione in modo specifico.

Per visualizzare (cioè rivelare) l'avvenuta ibridazio-

ne, è necessario incorporare, nella sonda, dei nucleotidi marcati con traccianti radioattivi (sonde o primers caldi) o con enzimi o elementi fluorescenti (sonde o primers freddi).

La marcatura con radioisotopi migliora la sensibilità del test consentendo di rivelare anche quantità di DNA o RNA, inferiori al picogrammo.

I primi sistemi di ibridazione su base solida, impiegavano sonde o primers caldi, marcati con <sup>32</sup>P, come ad esempio nel "Southern Blotting" o nel "DOT BLOT".

I rischi legati all'uso di materiale radioattivo e le complesse procedure di sicurezza da adottare, i problemi relativi al decadimento del tracciante ed al suo smaltimento, hanno indirizzato la scelta verso traccianti diversi, alcuni esempi:

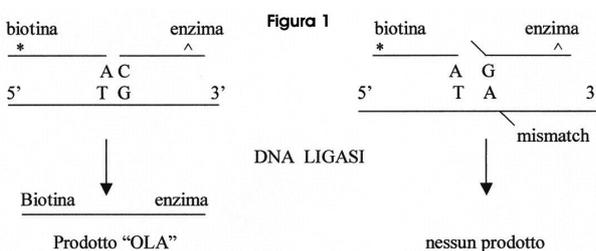
- biotina (vitamina introdotta in nucleotidi modificati, in posizione 5')
- enzimi (fosfatasi alcalina, perossidasi, β-galattosidasi)
- sostanze chemiluminescenti (luminolo, luciferina...).

L'ibridazione in fase liquida, previa denaturazione del DNA/RNA amplificato, con utilizzo di traccianti freddi, rappresenta una valida alternativa all'ibridazione su fase solida.

Questo tipo di ibridazione si avvale di tecniche, per la rivelazione, già ampiamente utilizzate in immunenzimatica ed in chemiluminescenza, pertanto di familiare e facile approccio per l'operatore.

In questo tipo di ibridazione la sonda marcata è adesa a pozzetti in micropiastra o a membrane; con questa tecnica è possibile discriminare, con un'unica amplificazione, più mutazioni come nel caso delle b-Talassemia, o più genotipi, come nel caso del virus dell'epatite C.

Altro metodo di rivelazione che utilizza sonde marcate è l'"OLA" (oligonucleotide ligation assay), questo sistema non è altro che un saggio colorimetrico che utilizza sia la tecnica di ibridazione sia le proprietà della DNA-ligasi (enzima che permette di discriminare la presenza di mutazioni puntiformi): il principio della tecnica è schematizzato di seguito



Si utilizzano due oligonucleotidi adiacenti, di cui uno marcato con biotina, complementare all'estremità 5' del DNA amplificato, l'altro, marcato con

un enzima, che ibriderà in posizione adiacente; solo in caso di perfetta complementarità, la DNA ligasi unirà le due sonde dando un prodotto "OLA"; per aggiunta di streptavidina si formerà il complesso biotina-streptavidina rivelabile con reazione colorimetrica. Con questa tecnica è possibile evidenziare anche più mutazioni puntiformi contemporaneamente, utilizzando più marcatori e leggendo a diverse lunghezze d'onda è possibile rilevare la presenza dei diversi target mutati.

I sistemi finora studiati, prevedono l'uso di sonde marcate, in alternativa esistono metodi che utilizzano primers marcati, ad esempio con coloranti fluorescenti, in grado di legarsi con elevata specificità al DNA/RNA target; questi sistemi sono impiegati per evidenziare delezioni o riarrangiamenti genici.

A seconda del tipo di marcatura, la rivelazione degli ibridi tra il prodotto amplificato e la sonda marcata o tra la sonda e l'amplificato marcato, segue percorsi diversi. Se si utilizzano traccianti radioattivi gli ibridi si evidenziano per autoradiografia, invece ibridi con marcatura fredda seguiranno un percorso del tutto simile ad un comune test EIA o LIA.

I metodi di rivelazione sono di due tipi: diretti ed indiretti.

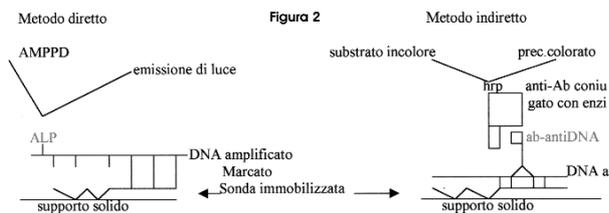
I metodi diretti di rivelazione dell'ibrido formatosi tra il prodotto amplificato marcato e la sonda, prevedono il legame dell'enzima rivelatore alla sonda e l'aggiunta del substrato corrispondente, l'enzima in presenza del substrato dà formazione di prodotti colorati che precipitano nel punto stesso in cui è avvenuta la reazione. Se il marcatore utilizzato è l'ALP o la perossidasi, il substrato chemiluminescente potrà essere l'AMPPD che per la presenza dell'ALP sarà defosforilato, il composto intermedio ottenuto essendo molto instabile si decomporrà emettendo energia luminosa direttamente proporzionale al DNA target amplificato.

I metodi di rivelazione indiretta utilizzano reazioni secondarie o meglio un complesso sistema Ag-Ab marcato. Un esempio è dato dall'ibridazione tra la biotina marcante la sonda specifica ed il DNA amplificato e denaturato. L'ibrido biotilinato ottenuto, è incubato con la streptavidina o l'avidina coniugata con un enzima (es. perossidasi di rafano), il complesso biotina-avidina-enzima in presenza del substrato (tetrametilbenzidina), darà luogo allo sviluppo di colore e quindi leggibile con un normale colorimetro o spettrofotometro.

Altro esempio di metodo indiretto prevede il riconoscimento dell'ibrido tramite anticorpi diretti contro il DNA non denaturato o contro la biotina, l'aggiunta di un anti-anticorpo-coniugato con un enzima e la successiva aggiunta di substrato rivelerà il complesso formatosi.

Queste tecniche complesse ma di semplice applica-

zione, permettono di raggiungere standard di sensibilità e specificità, sovrapponibili ai metodi che utilizzano traccianti radioattivi.



La semplicità del sistema di rivelazione non è sinonimo di facilità, sottovalutare questo passaggio rischia di invalidare l'intero processo, infatti, non bisogna dimenticare che l'intero sistema allestito non è altro che un'insieme di più sottoprocessi (estrazione –amplificazione –denaturazione –rivelazione). Quali le possibilità di errore che possono inficiare o falsare il dato diagnostico?

**ESTRAZIONE:** cattiva resa, scarsa quantità e bassa qualità del DNA/RNA estratto.

**AMPLIFICAZIONE:**

1) *preparazione della Master-mix*, in questa fase il rischio maggiore è rappresentato dall'inquinamento (pipette sporche, materiale non sterile, ambiente inquinato, reagenti inquinati), altra possibilità di errore può essere dovuta ad una cattiva preparazione della miscela di reazione (es. volumi non rispettati dei diversi componenti della mix)

2) *cattivo funzionamento dell'amplificatore*, errore "rampe di temperatura" dovuto ad una cattiva gestione della manutenzione strumentale. Il risultato di una cattiva amplificazione sarà un amplificato "sporco, scarso, nullo"

**RIVELAZIONE:** le problematiche sono correlate alla tecnica utilizzata.

Come garantire qualità ad un processo così articolato? Il quesito che si pone è: controllo di qualità o allestimento di un sistema di gestione che garantisca la qualità dell'intero processo analitico?

L'uso di un campione di controllo consentirà di appurare l'appropriatezza dell'intero sistema ma non ci fornirà garanzie sul dato analitico specifico, alcuni esempi: l'assenza di contaminanti nel campione di controllo non è garanzia di assenza di inquinanti nei singoli campioni, le rampe di temperatura in un am-

plificatore potrebbero essere rispettate in un pozzetto e non in un altro col risultato di un prodotto di amplificazione non uniforme per tutti i campioni testati. La risposta al quesito sarà quindi sia utilizzare campioni di controllo sia allestire un sistema di verifica del tipo "step by step" che possa garantire l'attendibilità del dato analitico.

Già è stato evidenziato l'uso del sistema elettroforetico quale controllo delle fasi **ESTRAZIONE** ed **AMPLIFICAZIONE** (II e III STEP), altra buona norma è misurare al densitometro, dopo l'estrazione, la quantità di materiale genetico ottenuto e quindi valutarne la resa (I STEP).

In caso di ricerca di mutazioni correlate a patologie genetiche è consigliabile confermare il risultato ottenuto utilizzando una seconda metodologia di ricerca (IV STEP).

Nell'allestimento del saggio è buona norma lavorare in doppio, utilizzare un bianco, ed un campione di controllo sia normale che patologico, lavorare sotto cappa a flusso laminare, tenere separati i materiali d'uso per ricerche di DNA da quelli per RNA.

Prima di avviare una procedura controllare l'amplificatore accertandosi dell'assenza di eventuale condensa nei pozzetti, verificare il buon funzionamento delle rampe di temperatura, provvedere alla manutenzione giornaliera degli strumenti da utilizzare.

Accertarsi della corretta pulizia e sterilità degli ambienti, pulire il banco di lavoro con ipoclorito di sodio prima di ogni seduta analitica.

Usare guanti monouso da cambiare continuamente, mascherina, pipette ben pulite con manutenzione periodica che preveda lavaggio in alcool, trattamento UVA e taratura, stoccare in aliquote i reagenti che prevedono riutilizzo.

Tutto il materiale d'uso sarà conservato nelle rispettive aree di preamplificazione ed amplificazione.

Non fumare né mangiare negli ambienti di lavoro, cambiare il camice passando da un'area all'altra, evitando il percorso inverso (rivelazione, amplificazione estrazione).

Registrare e verificare che sia ottemperata la manutenzione periodica degli strumenti dalla ditta fornitrice.

Concludendo, il buon esito di un processo analitico prevede la conoscenza dettagliata delle metodologie utilizzate comprese le relative problematiche, onde poter capire i punti critici dell'intero sistema e trovare i mezzi per poterli risolvere.