

Le tecniche molecolari nella diagnostica infettivologica

A. Bomba

Laboratorio Analisi, P.O. "Renzetti", Lanciano (CH)

Introduzione

"Sometimes a good idea comes to you when you are not looking for it", così inizia una pubblicazione del 1990 dell'ideatore della PCR (polymerase chain reaction), Kary B. Mullis (premio Nobel per la chimica nel 1993). "Cominciando da una singola molecola di DNA, mediante una reazione a catena, si possono generare 100 bilioni di molecole simili in un pomeriggio", così nasceva quel prezioso strumento oggi diffuso in tutte le aree delle scienze biologiche (1).

Sin dalla sua introduzione la PCR si è rivelata uno strumento diagnostico estremamente preciso, una tecnica di straordinaria sensibilità, in grado di riconoscere la presenza di poche copie di una particolare sequenza di DNA o RNA all'interno di un campione biologico.

Le semplificazioni metodologiche introdotte e lo sviluppo di strumenti automatizzati hanno reso possibile l'applicazione sempre più diffusa d'indagini di laboratorio, basate sull'amplificazione con preziose potenzialità nella diagnostica clinica. La richiesta, infatti, è sempre maggiore da parte del clinico, per test in grado di identificare direttamente la presenza di un agente infettivo in un campione biologico per diagnosticare precocemente un'infezione o scegliere adeguatamente e monitorare il trattamento per il paziente. Nell'arco di pochi anni sono state rese disponibili un gran numero di metodiche standardizzate per la determinazione di agenti patogeni. L'identificazione di agenti virali rappresenta una delle principali applicazioni della PCR, ma riveste importanza anche nella ricerca di batteri patogeni, come i micobatteri per i quali la rapidità di diagnosi è molto importante.

Tecniche di amplificazione genica

Dopo l'introduzione della PCR, che è stata la prima tecnica di amplificazione di DNA riportata in letteratura e quella più ampiamente sviluppata ed applicata, sono stati sviluppati altri metodi, alternativi

o complementari, di amplificazione genica come Ligase chain reaction (LCR), Transcription Mediated Amplification (TMA), Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA), Strand Displacement Amplification (SDA), Nested PCR, o di amplificazione del segnale come branched DNA e, di recente introduzione, l'innovazione rappresentata dalla PCR real time.

Le applicazioni delle tecniche molecolari nella diagnostica infettivologica sono numerose e hanno modificato diagnostica e terapia di numerose malattie infettive. Tra le varie tecniche parleremo in particolare della branched DNA per la diagnostica delle epatiti, della TMA-HPA per la diagnostica dei micobatteri da materiale biologico e da coltura, della Nested PCR per la diagnostica liquorale e della PCR real time che apre delle possibilità del tutto nuove alla reazione a catena della polimerasi.

Nested PCR

Le infezioni del Sistema Nervoso Centrale costituiscono un problema di considerevole rilevanza clinica essendo associate a patologie estremamente gravi quali: encefaliti, mieliti, meningiti e ascessi cerebrali e che necessitano di diagnostica d'urgenza.

Gli agenti eziologici responsabili coprono una vasta gamma di microrganismi, includendo virus, batteri, funghi e parassiti. Tra questi agenti patogeni, riveste un ruolo molto importante la famiglia dei virus erpetici, come HSV, CMV, EBV, VZV, HHV, Enterovirus (2). Un'accurata diagnosi eziologica di infezione da virus non è assicurata né dalla sola valutazione dei segni clinici né dalla diagnostica per immagini, né dalle convenzionali tecniche di laboratorio, però una diagnosi virale rapida, sensibile e specifica è molto importante perché può consentire un tempestivo approccio terapeutico mirato. Il gold standard per la diagnosi di infezione virale del SNC è la PCR e il campione di scelta è il liquor. La PCR può essere usata per ricercare il genoma virale presente nel liquor del paziente nei primi giorni di infezione, quando il virus è ancora in replicazione, con-

sentendo una precocità di diagnosi che è essenziale per adottare l'opportuna terapia.

La PCR è una reazione che ha come risultato l'amplificazione selettiva di una piccola sequenza genomica delimitata da due sequenze specifiche. Praticamente questa tecnica consiste in un susseguirsi di tre reazioni a temperature diverse che si ripetono ciclicamente. Ogni ciclo consiste in una fase di denaturazione nella quale la doppia catena di DNA si svolge e si divide nelle due catene complementari, a 92-98°C; una fase di ibridizzazione (o Annealing) di oligonucleotidi specifici (primer) al DNA bersaglio, con temperatura variabile dai 40 ai 68°C secondo le sequenze, ed una fase di estensione con la sintesi di due nuove catene complementari, a 72°C che è la temperatura ottimale delle DNA polimerasi termostabili. Ogni catena di DNA neosintetizzata diviene a sua volta stampo per i seguenti cicli di amplificazione. La ripetizione di tali fasi per una trentina di cicli porta ad un'amplificazione esponenziale del frammento compreso tra i due primers.

La PCR Nested(3) è un sistema in grado di migliorare sia la sensibilità che la specificità della reazione di amplificazione. Consiste nell'esecuzione di due successive amplificazioni con due coppie di primers: il frammento di DNA, amplificato nella prima PCR con la coppia di primers più esterni, è ulteriormente amplificato con una coppia di primers che fiancheggiano una sequenza interna al segmento bersaglio della prima reazione. Praticamente, una frazione del prodotto amplificato nella prima PCR è trasferito in una seconda provetta contenente una nuova miscela di reazione, uguale alla precedente per tutti i componenti, ad eccezione dei primers. Rispetto ad una PCR singola, con la PCR nested la resa della reazione aumenta e i prodotti possono essere direttamente visualizzati su gel dopo colorazione con etidio bromuro; anche la specificità aumenta perché sono amplificati selettivamente solo i prodotti della prima PCR realmente corrispondenti alla sequenza desiderata. Il frammento amplificato viene, infatti, riconosciuto da quattro primers complementari alla sua sequenza. L'utilizzo di questa tecnica consente, quindi, di evitare un'addizionale ibridazione del prodotto amplificato con sonde specifiche per confermare la sua specificità e una corsa elettroforetica su gel d'agarosio per la visualizzazione ai raggi UV del frammento di DNA, colorato con etidio bromuro, è sufficiente per confermare la presenza di amplificato specifico, mediante il confronto con il marcatore di peso molecolare.

È possibile identificare contemporaneamente vari virus erpetici utilizzando una PCR Multiplex che prevede una simultanea amplificazione di differenti sequenze specifiche, usando più primer, il che consente di effettuare un'identificazione molecolare rapida e di rilevare eventuali confezioni di virus dello stesso gruppo. In caso di positività il risultato viene confermato con la nested PCR specifica per il virus.

In conclusione, è utile ribadire che, data la difficoltà di diagnosi di infezione virale basandosi su segni clinici e risultati sierologici, è raccomandato utilizzare le indagini molecolari(4) nella diagnosi di patologie del SNC per ottimizzare la gestione dei pazienti affetti da queste patologie.

Branched DNA

La bDNA è un metodo alternativo alla PCR, ed è utilizzato per la quantificazione diretta dell'acido nucleico in un campione, senza amplificazione della sequenza target (3-5). È basato sull'amplificazione del segnale: sul legame di un grande numero di molecole "segnale" (fosfatasi alcalina) specificamente e direttamente alla sequenza di acido nucleico da identificare, creando una struttura a "branched DNA", vale a dire DNA ramificato. Poiché il numero di molecole segnale legate alla sequenza bersaglio è costante, il segnale ottenuto alla fine della reazione è proporzionale alla quantità di bersaglio presente nel campione. Questa tecnica può essere applicata per la quantificazione di target sia a DNA che a RNA, quindi viene utilizzata sia per la quantificazione diretta dell'RNA del virus dell'epatite C (HCV RNA) che per la quantificazione del DNA dell'epatite B (HBV DNA). Tale quantificazione è un mezzo valido per controllare la terapia antivirale, la progressione della patologia e migliorare l'esito finale della terapia.

Con l'eccezione della reazione finale enzima substrato, tutte le reazioni sono ibridizzazioni di acidi nucleici, reazioni altamente specifiche e con un'elevata affinità. L'acido nucleico viene legato ad un set di sonde oligonucleotidiche specifiche (ibridazione) sulla superficie di un pozzetto di una micropiastra; un altro set di sonde, con una sequenza complementare ad un'altra porzione del target, viene utilizzato per la rivelazione. A queste sonde vengono successivamente legate molecole di DNA "ramificate", che amplificano l'entità del segnale generato da ciascuna molecola target. L'aggiunta di sonde marcate con fosfatasi alcalina, complementari a tre diversi siti di legame su ciascun "ramo" della molecola, e di un substrato chemiluminescente genera un'emissione di luce. Questo segnale, letto al luminometro, è direttamente proporzionale alla quantità di RNA o DNA nel campione. La concentrazione dell'acido nucleico target viene determinata rispetto ad una curva standard.

I principali vantaggi di questo test, rispetto alla tecnica di PCR, sono che l'acido nucleico contenuto nel campione, viene liberato attraverso una semplice lisi del virus e non necessita di estrazione; non occorre la suddivisione del laboratorio in aree distinte, ma il test può essere eseguito in una sola zona, semplificando anche l'aspetto logistico dell'esecuzione e c'è un minor rischio di contaminazioni.

TMA

Per identificare direttamente nei materiali biologici gli acidi nucleici dei micobatteri del *Mycobacterium tuberculosis complex* che comprende *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*, sono disponibili diverse procedure che si effettuano su campioni clinici provenienti dall'apparato respiratorio. I test che utilizzano tecniche di amplificazione possono individuare *M. tuberculosis* in poche ore e hanno dimostrato una buona sensibilità e specificità.

I campioni clinici vengono sottoposti all'amplificazione dopo essere stati decontaminati secondo le metodiche standard che utilizzano NALC-NAOH.

Nel sistema TMA (Transcription Mediated Amplification) (6) il materiale in esame viene trattato con ultrasuoni per liberare l'RNA ribosomiale dei micobatteri. Mediante riscaldamento a 95°C si denatura e si rompe la struttura secondaria dell'rRNA. Il materiale genomico liberato viene sottoposto all'azione combinata di due primers e due enzimi, transcriptasi -inversa e RNA-polimerasi, che inducono la sintesi di DNA dall'RNA micobatterico e di ulteriori copie di RNA (Amplicon) dal DNA neosintetizzato.

La reazione si svolge ad una temperatura costante di 42°C.

L'identificazione viene effettuata applicando la metodologia HPA (Hybridization Protection Assay) utilizzando sonde marcate con molecole chemiluminescenti (estere di acridinio) che si legano specificamente all'amplicon bersaglio. Una reazione chimica permette di differenziare le sonde ibridate da quelle libere evitando di ricorrere a metodi di separazione fisica: l'estere di acridinio utilizzato per la marcatura del probe, risulta protetto dopo l'ibridizzazione, grazie alla conformazione assunta dal doppio filamento di acido nucleico ed è quindi insensibile all'azione del reagente di idrolisi che viceversa inattiva facilmente la marcatura presente sui filamenti singoli. Le provette vengono poi introdotte in un luminometro che dispensa automaticamente i reattivi nelle provette per produrre e rilevare il segnale chemiluminescente.

Il risultato diagnostico si ottiene in meno di tre ore.

La TMA, essendo una reazione isoterma, non utilizza cicli a varie temperature ed è estremamente veloce dal momento che in 15-30 minuti può produrre miliardi di copie della sequenza bersaglio, obiettivo che, con la PCR, richiede tempi più lunghi.

Per l'esecuzione dell'esame non è necessaria la suddivisione in diversi ambienti del laboratorio.

Il principale vantaggio del sistema TMA è che tutte le fasi del test avvengono in un'unica provetta e senza procedimenti di lavaggio. Si aggiungono solamente i reattivi, che non vengono mai rimossi o trasferiti, nella provetta in cui avviene l'amplificazione. Questo minimizza il rischio di contaminazioni e di falsi positivi.

Un altro vantaggio è costituito dall'utilizzo, come bersaglio, dell'abbondante rRNA, che è presente in migliaia di copie in ogni cellula, quindi la probabilità di iniziare l'amplificazione è più elevata di quando viene presa come bersaglio una singola copia di DNA. Questo è molto importante quando i germi sono presenti in piccola quantità.

Utilizzando le tecniche basate sull'ibridazione che sono denominate sonde genetiche o DNA probes(7) e si usano per testare i micobatteri già cresciuti in coltura, sia solida che liquida, è possibile identificare più specie micobatteriche oltre il *M. tuberculosis*, come *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*. Il campione può essere testato sin da quando è visibile la proliferazione anche da una sola colonia. I test di ibridazione degli acidi nucleici sfruttano la capacità dei filamenti complementari degli acidi nucleici di accoppiarsi in maniera specifica per formare composti stabili a doppia catena. Il metodo accuprobe, da noi utilizzato, impiega una sonda genetica a catena singola associata ad un marker chemiluminescente complementare all'RNA ribosomiale dell'organismo bersaglio. Una volta liberato l'RNA dell'organismo bersaglio le sonde si combinano con le sequenze omologhe, formando dei complessi DNA-RNA stabili, ed essendo marcate ne permettono il riconoscimento, applicando la metodologia HPA già descritta.

PCR real time

L'innovazione tecnologica della PCR è rappresentata dalla PCR real time, la metodica per eccellenza nella quantificazione del DNA amplificato. La PCR real time permettendo di visualizzare l'amplificato man mano che si forma, rappresenta uno strumento prezioso per migliorare la diagnostica e fornire al clinico risultati attendibili in tempo utile. Con la PCR real time non sono richieste manipolazioni post amplificazione e questo comporta una diminuzione dei tempi di ottenimento dei risultati, l'eliminazione dei problemi di carry-over e la possibilità di monitorare costantemente l'andamento della reazione.

I numerosi studi condotti rivelano sensibilità, specificità e riproducibilità più elevate rispetto alle tecniche di amplificazione tradizionali ed un ampio range dinamico per quanto riguarda il risultato quantitativo.

La determinazione continuativa della quantità di amplificato si basa essenzialmente sulla marcatura di primers, probes o degli stessi ampliconi con molecole fluorescenti e sfrutta la FRET (trasferimento di energia di risonanza fluorescente) tra due fluorofori o meccanismi non propriamente FRET ma che comportano comunque l'emissione di fluorescenza e coinvolgono un fluoroforo ed un quencher non fluorescente.

La strumentazione per PCR real time è costituita da

un Thermal cycler con incorporato un modulo ottico per eccitare i fluorocromi all'interno dei tubicini di reazione chiusi e raccogliere la fluorescenza di ritorno e da un modulo di controllo per analizzare i dati e produrre le quantificazioni.

Ci sono varie possibilità di generare segnali fluorescenti dipendenti dalla reazione. La più semplice è l'uso di un fluoroforo che emette fluorescenza dopo essersi legato a DNA a doppio filamento (bromuro di etidio, SYBR green) generando un segnale visibile dal detector proporzionale al numero di copie presenti. Tuttavia questo segnale non è veramente specifico in quanto tali fluorofori rivelano anche dimeri formati dai primer e amplificati aspecifici.

Esistono vari tipi di sonde che generano un segnale sfruttando la FRET o il quenching in dipendenza dalla presenza del filamento a loro complementare.

Nel saggio TaqMan (Fluorogenic 5' Nuclease Assay), una speciale sonda fluorogenica complementare alla sequenza del DNA bersaglio viene aggiunta alla miscela di PCR. Durante l'amplificazione, alla fase di annealing, sia i primer che la sonda si ibridano al template. La sonda, essendo bloccata al 3' non può essere estesa dalla polimerasi. Durante l'estensione del primer, la Taq incontra la sonda ibridata che le sbarrando la strada e quindi la taglia utilizzando la sua attività 5'-3' esonucleasica, liberandosi la strada e portando così a termine la copiatura del frammento. Il risultato è che, per ogni copia di prodotto PCR portata a termine, una sonda viene degradata. Utilizzando le apposite sonde fluorogeniche TaqMan, ogni volta che una sonda viene tagliata dalla Taq polimerasi, si libera in soluzione una molecola fluorescente che genera il segnale rivelabile dal detector. La sonda TaqMan fornisce un'ulteriore specificità, eliminando la possibilità che siano rivelati prodotti amplificati aspecifici dovuti al misappaiamento con i primer o a dimeri primer-primer.

Utilizzando sonde oligonucleotidiche diverse, marcate con fluorofori diversi e quenchers non fluorescenti, è possibile il rilevamento di più ampliconi contemporaneamente (PCR Real time Multiplex).

Le possibilità di applicazione della PCR real time nella diagnostica infettivologica sono teoricamente illimitate. La rapidità con cui si ottiene il risultato e la possibilità di evidenziare ampliconi diversi in contemporanea rendono questa tecnica indispensabile per la diagnosi rapida delle infezioni: dare in poco tempo al clinico un risultato può evitare di somministrare terapie antibiotiche inutili e consente di somministrare terapie antivirali adeguate.

Uno dei campi di applicazione più immediati è comunque quello della quantificazione degli acidi nucleici virali che è estremamente importante per stabilire il grado di attività di un'infezione, per monitorare la progressione della malattia, per differenziare un'infezione attiva da una persistente e per definire quale sia il ruolo della riattivazione virale o della persistenza nella progressione della malattia, e soprattutto per impostare la terapia antivirale e per monitorarne la risposta. Gli esempi più eclatanti in questo senso sono rappresentati da HBV, HCV e HIV, senza dimenticare l'importanza di disporre di test quantitativi per CMV e EBV nei pazienti sottoposti a trapianto. Fino ad ora la chimica più ampiamente utilizzata e studiata è quella degli oligoprobes sensibili alla 5'-nucleasi (TaqMan).

Con queste premesse è facile prevedere un'ulteriore diffusione della PCR real time nella diagnostica infettivologica, con nuove applicazioni e notevoli miglioramenti in tutto il processo diagnostico delle malattie infettive.

Bibliografia

1. Marin M.G. Tecniche di amplificazione genica: dal laboratorio alla pratica clinica. Milano: Ed. Sorbona 1996. La PCR: che cos'è e quali sono i suoi vantaggi p: 3.
2. Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious disease Clin Infect Dis 1999; 475-88.
3. Marin M.G. Tecniche di amplificazione genica: dal laboratorio alla pratica clinica. Milano: Ed. Sorbona 1996. Nested-PCR: 69-72; l'amplificazione del segnale p: 115.
4. Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious disease. CMAJ 2000;163(3):301-9.
5. Pfaller MA, Hewald LA. Diagnosis and management of infectious disease: molecular methods for the new millennium. Clinical Laboratory News 2000;26:10-3.
6. Chin DP, Yajko DM, Hadley WK, et al. Clinical utility of a commercial test based on the polymerase chain reaction for detecting Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens. Am J Respir Crit Care Med 1995;151:1872-7.
7. Crovatto M, Gava G, Da Re M. La PCR real time: metodologia d'analisi nella diagnostica delle malattie infettive. Pubblicazioni/ esa 13/33-3.