2° Congresso nazionale FNO TSRM e PSTRP
19 - 21 novembre 2021
Palacongressi di Rimini

L'ESPERIENZA PANDEMICA PER RIFORMARE IL SISTEMA SALUTE
Il contributo delle professioni sanitarie

FNO TSRM e PSTRP

Ruolo della biologia molecolare nella diagnostica di laboratorio

Maria Todaro[1], Antonio Giuseppe Bianculli[2], Ilaria Casalanguida[3], Patrizia Gallese[4], Natalina Antonella Marchi[5], Marina Bertolini[6], Davide Antognoli[7], Vincenzo Palumbieri[8], Pietro Del Fine[9], Francesco Bonatti[1]

[1] Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, Parma; [2] Laboratorio di immunogenetica dei Trapianti, Ospedale pediatrico Bambin Gesù, Roma; [3]U.O. Patologia Clinica ASL-2 Abruzzo, Lanciano; [4]U.S.L. Avezzano-Sulmona; [5]Ospedali Riuniti Padova Sud Madre Teresa di Calcutta, Monselice, Padova; [6]Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini, Roma; [7]Laboratorio di Anatomia Patologica–ASST 7 Laghi, Varese; [8]P.O. San Timoteo, ASREM Molise, Termoli, Campobasso; [9]Policlinico S.S. Annunziata, ASL Lanciano, Chieti

Introduzione. Negli ultimi anni, le tecniche di analisi molecolare applicate alla diagnostica di laboratorio sono state caratterizzate da un poderoso sviluppo tecnologico, che ha dato la possibilità di analizzare un numero sempre crescente di target molecolari, con una netta riduzione dei tempi e dei costi di analisi. L'entità di questo progresso è testimoniata dal sequenziamento del genoma umano; l'analisi del primo genoma, completata nel 2003, ha richiesto lo sforzo di migliaia di ricercatori in tutto il mondo, che con l'impiego di centinaia di sequenziatori Sanger disposti in serie ed un costo stimato di circa 100 milioni di dollari hanno portato a termine il progetto, durato circa 13 anni [1]. Ad oggi, con l'utilizzo di una piattaforma di nuova generazione (*next generation sequencing*, *NGS*), è possibile sequenziare un genoma in pochi giorni, con costi che non superano i mille dollari (Fig. 1). Nonostante le piattaforme NGS stiano sormontando a livello tecnologico le metodiche di analisi molecolare tradizionali (Fig. 2), l'utilizzo di queste ultime resta ad oggi indicato nella ricerca di target molecolari noti, come la ricerca di una mutazione familiare o di un genoma virale (Fig. 3).

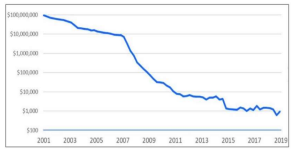

Fig 1. Evoluzione dei costi del sequenziamento del genoma umano

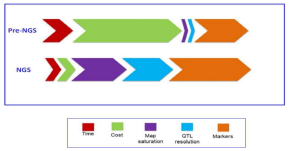

Fig 2. Confronto tra metodiche di analisi tradizionali (pre-ngs)

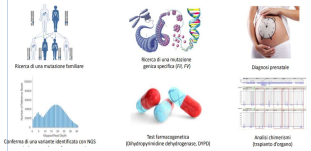

Fig 3. Applicazioni delle tecniche tradizionali di analisi molecolare

Obiettivi. Lo scopo di questo lavoro è di fornire una panoramica sull'evoluzione delle tecniche di biologia molecolare nella diagnostica, confrontare le metodiche di vecchia e nuova generazione con particolare riferimento alla definizione del loro impiego negli specifici ambiti di applicazione.

Materiali e metodi. *Tecniche tradizionali.* Le metodiche tradizionali di analisi molecolare si basano sull'applicazione della reazione a catena della polimerasi (*PCR*). L'applicazione più immediata della PCR è costituita dalla *Real-Time PCR* (RT-PCR), che sfrutta la capacità di una sonda fluorescente di ibridare uno specifico target molecolare e di emettere fluorescenza rivelandone la presenza. Recentemente, sono state sviluppate piattaforme di piccole dimensioni per poter effettuare il test direttamente al letto del paziente (Point-of-Care Test, POCT) (Fig. 4). I frammenti genici amplificati con PCR possono essere sottoposti a sequenziamento di Sanger, che restituisce l'esatta sequenza nucleotidica dei frammenti stessi. Questo metodo è l'ideale per lo screening di piccoli geni, rendendo possibile anche l'individuazione di amplificazioni o delezioni geniche mediante l'applicazione della tecnica multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) (Fig. 5).
In figura 6 sono riportate le principali caratteristiche della RT-PCR e del sequenziamento mediante metodo Sanger

Fig 4. Fasi dell'analisi in POCT Real-time (Vita-PCR platform, Menarini Diagnostics)

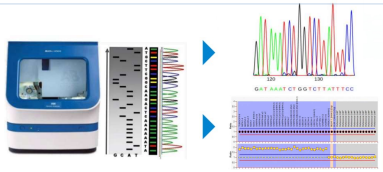

Fig 5. Sequenziamento in automatico: spettro elettroferografico e software analitico per MLPA

A
- Ideale per la ricerca di varianti note
- Rapido (risultato in ~3 ore)
- Poco costoso (~10€/saggio)
- Sensibile
- Specifico

B
- Ideale per lo screening di piccoli geni e frammenti
- Tempo di analisi ~3 giorni
- Più costoso rispetto alla Real-Time PCR
- Individua inserzioni e delezioni geniche (MLPA)
- Sensibile
- Specifico

Fig 6: Principali caratteristiche applicative di RT-PCR (A) e sequenziamento (B)

Piattaforme NGS. L'evoluzione più recente delle metodiche di sequenziamento genico è caratterizzato dalle tecniche NGS, mediante le quali è possibile sequenziare in poco tempo pannelli di geni specifici per l'identificazione di loci-malattia, esomi ed interi genomi. In linea generale, processo di sequenziamento NGS consta di quattro fasi in successione: preparazione del campione (Fig. 7A) frammentazione del DNA da testare (7B), amplificazione in parallelo dei frammenti prodotti (7C) e sequenziamento (7D). A seguire avviene un controllo di qualità dei dati (7E) e l'analisi bioinformatica dei dati si sequenza (7F, 7G, 7H). La ricerca sulle tecniche di sequenziamento ha permesso di mettere a punto tecnologie sempre più evolute e sensibili, che hanno permesso di distinguerle temporalmente in sequenziamento di seconda, terza e quarta generazione. L'ultima frontiera delle metodiche NGS è incentrata al sequenziamento di frammenti genici senza una propedeutica fase di amplificazione del target (Fig. 8).

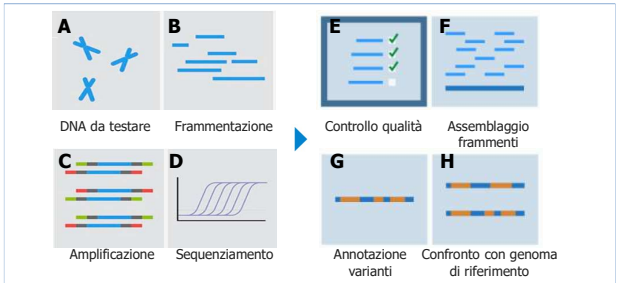

Fig 7: Work-flow del sequenziamento NGS e dell'analisi bioinformatica dei dati

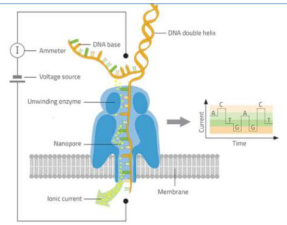

Fig 8. Sequenziamento con nanopori (terza generazione): un singolo filamento di DNA passa attraverso un nanoporo sintetico e viene misurata l'entità della corrente ionica, diversa per ogni nucleotide

Risultati e Conclusioni. Le piattaforme NGS costituiscono ad oggi il *gold standard* per lo screening di pannelli genici o estese porzioni di genoma. La grande mole di dati prodotti mediante queste tecnologie può produrre informazioni genetiche che spesso risultano di difficile interpretazione nel quadro di un particolare quesito clinico. Per questo, le tecniche di analisi molecolari classiche sono tutt'oggi molto utilizzate nei laboratori di diagnostica o di ricerca, e risultano strumenti fondamentali nell'identificazione rapida e sensibile di target specifici.

Bibliografia. 1. Venter JC et al., *The sequence of the human genome.* Science. 2001 Feb 16;291(5507):1304-51.