POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Strumentazione Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale

Caratterizzazione di strumenti per indagare il degrado del sistema ottico dell'apparecchiatura ELITe InGenius



Relatore: Alberto Vallan

Candidato: Maria Lucia Manconi

Correlatore: Pim Giesen

Anno accademico 2019-2020

А Мата е а Вабби.

Introduzione

Introduzione

Nell'elaborato si analizzano delle metodologie che hanno lo scopo di indagare il degrado della parte ottica posta all'interno dello strumento ELITe InGenius.

L'apparecchiatura ELITe InGenius, prodotta e venduta dall'azienda ELITechGroup S.p.A., consente di eseguire la Real Time PCR, una metodica di amplificazione del DNA in vitro a scopi clinici. Lo scopo della PCR è la valutazione diagnostica di geni mutati o della presenza di batteri o virus nei pazienti. Il principio chimico su cui si basa richiede la presenza in soluzione del campione di DNA del paziente da analizzare, detto DNA target, e di primers, singoli filamenti di DNA a catena corta contenenti la mutazione o l'agente infettivo. Se il DNA del paziente si ibridizza con i primers e l'amplificazione avviene, il paziente risulta positivo all'esame diagnostico e viene emesso un segnale fluorescente. Il segnale è emesso da speciali sonde contenenti fluorofori poste in soluzione ed è correlato alla quantità di DNA iniziale del paziente.

Se le prestazioni della parte ottica cambiano nel tempo, rilevando un segnale diverso da quello reale, cambia il risultato dell'esame diagnostico, inducendo il clinico a una diagnosi errata. È pertanto importante studiare dei metodi per indagare il degrado della parte ottica, consentendo al team aziendale di rilevare il calo delle prestazioni e agire in anticipo.

Una caratteristica importante del metodo è che esso non preveda test di tipo chimico. Innanzitutto, per un motivo legato alla figura del tecnico che esegue le manutenzioni, il quale non ha competenze di tipo biologico; il secondo per una riduzione dei tempi e dei costi, risultando in un metodo veloce, facilmente realizzabile e ripetibile.

Per comprendere a fondo la necessità di analisi delle prestazioni della parte ottica, nella prima parte del presente elaborato sarà trattato lo stato dell'arte della PCR: come essa è nata, come si è evoluta nel tempo e il passaggio dalla tradizionale a quella in real time. Successivamente è descritto il sistema ELITe InGenius, focalizzando l'attenzione soprattutto nella descrizione della parte ottica qui presa in esame.

Introduzione

Nella parte centrale vengono proposte due metodologie per valutare lo stato di degrado della parte ottica. La prima si basa sull'analisi della trasmittanza delle fibre ottiche correlata alla potenza ottica misurata direttamente dalle fibre contenute nei probes ottici rimossi dall'apparecchiatura. A causa dei risultati poco soddisfacenti è stata sostituita da una seconda metodologia che si basa sull'analisi dei segnali di fluorescenza rilevati direttamente dall'apparecchiatura. Come fonte di emissione di fluorescenza si utilizzano speciali carte, poste all'interno di fixture metalliche e portate a contatto con i probes ottici. In un primo momento è stata testata la stabilità delle fixture metalliche e delle carte fluorescenti in termini di emissione del segnale. Successivamente si sono testate le prestazioni di diverse apparecchiature ELITe InGenius a inizio vita, ossia mai utilizzate per eseguire sessioni di Real Time PCR, per indagare eventuali differenze nella rilevazione dei segnali.

Nella parte finale si valutano le prestazioni del sistema di carte fluorescenti nel rilevare un eventuale degrado della parte ottica: si analizzano come cambiano i segnali rilevati dai diversi probes a causa dell'utilizzo dell'apparecchiatura nel tempo. In particolare, si analizza come essi cambiano quando vengono eseguiti i due diversi livelli di manutenzione previsti dall'azienda: la pulizia di particolari lenti posizionate all'interno dei probes ottici, che tendono ad opacizzarsi nel tempo, e la sostituzione completa dei probes.

Per quanto riguarda il secondo livello di manutenzione, in parallelo ai test effettuati con le carte fluorescenti si sono eseguite due sessioni di Real Time PCR identiche, prima e dopo la sostituzione dei probes. Si confrontano i segnali rilevati nelle due tipologie di test allo scopo di capire se utilizzando le carte fluorescenti è possibile prevedere l'impatto degli effetti di usura nelle sessioni di Real Time PCR. Si pone particolare attenzione anche al punto di vista clinico, per indagare che effetti ha il degrado a livello diagnostico.

Indice

| Introduz | ione | | | | |
|-----------------|------|--|--|--|--|
| Indice | | 7 | | | |
| Capitolo | 1. | Il DNA e la PCR | | | |
| 1.1. | La l | Real Time PCR16 | | | |
| Capitolo | 2. | ELITe InGenius® | | | |
| 2.1. | Sez | ione ottica | | | |
| Capitolo | 3. | Prima metodologia: analisi della trasmittanza delle fibre ottiche | | | |
| 3.1. | Dis | cussione dei risultati | | | |
| Capitolo | 4. | Seconda metodologia: caratterizzazione del sistema di test basato su carte | | | |
| fluoresce | enti | | | | |
| 4.1. | Dis | cussione dei risultati | | | |
| 4.2. | Cor | relazione tra fluorescenza e potenza ottica64 | | | |
| Capitolo | 5. | Analisi delle prestazioni di Sistemi ELITe InGenius differenti65 | | | |
| Capitolo | 6. | Analisi del Sistema ELITe InGenius nel tempo71 | | | |
| 6.1. | Mai | nutenzione di primo livello79 | | | |
| 6.2. | Mai | nutenzione di secondo livello | | | |
| Capitolo | 7. | Analisi dei test di Real Time PCR | | | |
| 7.1. | Pun | to di vista clinico | | | |
| Conclusioni | | | | | |
| Bibliografia110 | | | | | |

Capitolo 1. Il DNA e la PCR

Prima di presentare l'elaborato, volto ad analizzare le metodologie per indagare il degrado della parte ottica del sistema ELITe InGenius, è bene introdurre il concetto di PCR e la sua evoluzione nel tempo.

Il DNA, acronimo comunemente usato di acido desossiribonucleico, è un acido nucleico che contiene le informazioni genetiche, trasmissibili da generazione a generazione, necessarie alla biosintesi di RNA e proteine, molecole indispensabili per tutti i processi da cui dipendono lo sviluppo ed il funzionamento degli esseri viventi. È un polimero organico costituito da monomeri chiamati nucleotidi; ogni nucleotide è costituito da uno zucchero (il desossiribosio), un gruppo fosforico e una delle quattro basi tra adenina, guanina, citosina e timina.

Il DNA è formato da una doppia catena polinucleotidica, antiparallela, orientata, complementare, spiralizzata (Figura 1.1). Negli organismi viventi è quasi sempre presente sotto forma di doppio filamento: due filamenti appaiati tra di loro a formare una struttura a doppia elica. Ogni filamento è orientato e possiede due estremità definite 5' e 3': nella struttura della doppia catena il senso di un filamento è opposto a quello del filamento complementare, per questo la doppia elica è detta antiparallela.



Figura 1.1. Raffigurazione della doppia elica di DNA e indicazione dei suoi componenti costitutivi. Sono indicate anche le coppie di basi. [1]

Ogni nucleotide ha una parte strutturale, posta esternamente nella doppia elica, costituita dalle molecole di zucchero e dai gruppi fosforici, che permette il legame covalente con i nucleotidi adiacenti, e una parte informazionale, posta internamente nella doppia elica, costituita dalle basi azotate che formano coppie complementari tra i due filamenti opposti: adenina con timina e citosina con guanina.

Una importante proprietà del DNA è la sua capacità di duplicarsi: partendo da una singola molecola di DNA è possibile ricostruire due molecole uguali alla molecola di partenza in un processo biologico che avviene nella cellula in divisione. Durante tale processo la doppia elica si apre separando i due filamenti e alle basi spaiate di ogni filamento si uniscono quelle complementari dei nucleotidi liberi che, grazie alla presenza degli enzimi che presiedono alla sintesi del DNA, vengono legati in una nuova catena. Si formano quindi due nuovi filamenti complementari a quelli iniziali.

Il processo naturale di duplicazione del DNA sta alla base del processo artificiale denominato PCR. La PCR è l'acronimo della reazione a catena della polimerasi (in inglese: *Polymerase Chain Reaction*) ideata nel 1983 da Kary B. Mullis [2], che ottenne per questo ritrovato il Premio Nobel per la chimica (1993) [3]. È una tecnica di amplificazione in vitro di uno specifico frammento di DNA: a partire da poche unità di uno specifico acido nucleico si ottengono miliardi di molecole di DNA identiche. Tra le molte applicazioni di questa tecnica, una è quella diagnostica per rilevare infezioni virali o batteriche, identificare malattie genetiche o tumorali o monitorare l'efficacia di trattamenti terapeutici. In questo caso la metodica di PCR permette la rilevazione della presenza in un campione clinico del DNA bersaglio (o target), specifico per l'agente infettivo o contenente la mutazione, attraverso la sua amplificazione.

La PCR si basa sulla esecuzione ciclica di tre fasi principali. La prima fase è quella di denaturazione, in cui la doppia elica del DNA stampo è divisa in due singole eliche, la seconda è quella di ibridazione, in cui i singoli filamenti ottenuti vengono appaiati ai primers, corte molecole di DNA o oligonucleotidi, e l'ultima è l'estensione, in cui a partire dai primers sono sintetizzati i nuovi filamenti complementari, grazie alla presenza di un enzima detto DNA polimerasi. I primers sono due oligonucleotidi a singolo filamento lunghi circa 20 - 30 basi, complementari alle porzioni 3'- terminale della regione del DNA da amplificare e sono gli elementi di innesco dell'attività della DNA polimerasi.

L'enzima DNA polimerasi è il catalizzatore del processo ed è posto nella soluzione contenente il campione. Inizia la replicazione del DNA grazie alla presenza dei due primers, che ibridano in modo specifico con la regione bersaglio [4], a cui sono complementari. Mullis e i suoi collaboratori misero a punto la tecnica di PCR utilizzando il frammento di Klenow della DNA polimerasi I del batterio *Escherichia coli*, enzima che normalmente lavora alla temperatura corporea di circa 37 °C ed è instabile alle alte temperature richieste dalla PCR durante la fase di denaturazione [4]. Per questi motivi nel 1988 fu isolato un enzima DNA polimerasi I termostabile dal batterio *Thermus aquaticus*, detto Taq DNA polimerasi: grazie ad esso è possibile lavorare a temperature più alte, aumentando la resa e la specificità dei prodotti di reazione [4]. La Taq DNA polimerasi (Figura 1.2) ha la sua attività ottimale a una temperatura che varia tra 70 e 80 °C, mentre si destabilizza se esposta a temperatura di 95 °C per una durata superiore ai 30 minuti. È in grado di sintetizzare una sequenza di più di 1000 basi in meno di un minuto.



Figura 1.2. Struttura della Taq DNA Polimerasi. [5]

Esistono anche altre DNA polimerasi, come quelle dotate di attività di trascrittasi inversa, cioè in grado di sintetizzare un filamento complementare di DNA da un filamento stampo di RNA, utili durante la RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), utilizzata per amplificare l'RNA.

In seguito, sono descritte le tre fasi principali su cui si basa la PCR illustrate in Figura 1.3.



Figura 1.3. Riassunto delle fasi principali della PCR: denaturazione, annealing ed estensione. [6]

La denaturazione ("denaturation").

È la fase iniziale del processo di PCR durante la quale il DNA passa dalla conformazione a doppio filamento a quella a singolo filamento. Perché ciò accada è necessario rompere i legami idrogeno tra le basi azotate complementari, che tengono uniti i due filamenti, portando la soluzione contenente il DNA a una temperatura superiore a quella che è definita temperatura di fusione (T_M : *Melting Temperature*) compresa tra 92 e 96 °C [4].

L'ibridazione ("annealing").

Dopo la divisione della doppia elica si verifica l'appaiamento (o annealing) dei singoli filamenti alle molecole di primer, portando alla formazione del cosiddetto ibrido a doppio filamento. I primers oligonucleotidici sono complementari alle due estremità 3' della sequenza da amplificare, in modo da poter innescare la polimerizzazione del DNA, che procede nel senso $5' \rightarrow 3'$, nel tratto compreso tra le due regioni a cui essi si associano.

Affinché avvenga l'ibridazione tra primer e filamento di DNA stampo occorre portare la soluzione contenente i due filamenti denaturati ad una temperatura detta temperatura di annealing (T_A), scelta solitamente di 5 – 10 °C inferiore a quella di fusione dei primers e tenuta costante o fatta diminuire durante i cicli di amplificazione [4]. È importante inoltre che il tempo di annealing sia dell'ordine di 30 secondi o meno, ma comunque non troppo elevato in modo da sfavorire l'appaiamento dei primers con filamenti di DNA stampo con bassa complementarietà [4].

L'ibrido che si forma alla temperatura di annealing deve essere stabile: la stabilità è data dal numero di legami idrogeno che si formano nella doppia elica tra le basi complementari. Pertanto, maggiore è la lunghezza dei primers e la percentuale di coppie di basi citosina – guanina (che formano tre legami idrogeno, al contrario delle coppie basi adenina – guanina che ne formano solo due), maggiore è la stabilità.

Inoltre, la perfetta complementarietà delle sequenze che formano l'ibrido è molto importante: la presenza di basi azotate che non sono in grado di appaiarsi correttamente, causa la destabilizzazione dell'ibrido.

L'estensione ("extension").

Nell'ultima fase del ciclo, i primers oligonucleotidici dell'ibrido in presenza della DNA polimerasi vengono estesi ognuno in direzione dell'altro, ma sulle due diverse catene complementari, portando alla sintesi di due nuove molecole di DNA copie della regione bersaglio delimitata dai primers. La temperatura di estensione varia tra 68 e 72 °C, raggiungendo la Taq DNA polimerasi il massimo della attività a circa 70 °C [4].

Ad ogni ciclo di amplificazione, vengono sintetizzate due nuove molecole di DNA a partire da una molecola di DNA stampo e la concentrazione di DNA prodotto cresce esponenzialmente, come mostrato in Figura 1.4.



Figura 1.4. Grafico che mostra la crescita esponenziale delle molecole di DNA prodotto (verde) tramite PCR a partire da una molecola campione di DNA (blu). I segmenti rossi e neri indicano i primers.

Parametri del processo

I parametri fondamentali del processo PCR sono cinque: la temperatura di fusione dei primers, la stringenza, la sensibilità, la specificità e l'efficienza del processo.

La temperatura di fusione dei primer, detta anche Melting Temperature (T_M), è la temperatura alla quale il 50% di una sequenza nucleotidica è ibridata al suo filamento complementare. È detta di "fusione" in quanto il DNA passa da uno stato ordinato a uno disordinato. Essa dipende dalla lunghezza dei primer e dalla concentrazione di coppie di basi citosina – guanina. Dalla temperatura di fusione dei primer è calcolata la temperatura di ibridazione (annealing).

La stringenza è la percentuale di ibridi specifici sul totale degli ibridi formati. Gli ibridi specifici, essendo quelli più stabili a causa del maggior numero di legami idrogeno dato dalla maggiore complementarietà, hanno una temperatura di fusione più elevata. Per questo motivo manipolando la temperatura di ibridazione è possibile aumentare il numero degli ibridi specifici, in quanto a temperature vicine a quella di fusione dei primers si ottiene la denaturazione degli ibridi aspecifici, con bassa complementarietà delle basi.

La sensibilità dipende dalla quantità di materiale iniziale che la reazione è in grado di rilevare: essa è alta quando si ottiene un'elevata quantità di prodotto amplificato partendo da una quantità molto limitata di materiale iniziale.

Affinché la PCR sia specifica ed efficiente, il frammento amplificato deve avere la stessa sequenza di quello bersaglio. La PCR è poco specifica quando si hanno errati appaiamenti tra primers e filamenti di DNA stampo, ossia l'amplificazione di frammenti indesiderati, e/o la formazione di dimeri di primers, ossia l'appaiamento di due primers con regioni complementari tra loro.

L'efficienza è legata alla quantità di DNA amplificato secondo la equazione 1.1:

$$N = (1 + E)^n$$
 Equazione 1.1.

dove N è il numero di copie amplificate al termine della reazione di PCR, E è l'efficienza di amplificazione e n è il numero di cicli di PCR che può essere massimo attorno a 50. Nel caso in cui ci fosse un'efficienza ideale del 100 %, E sarebbe uguale a uno e N sarebbe uguale a 2ⁿ: si avrebbe una crescita esponenziale delle molecole di DNA amplificate che dipende dal

numero di cicli n. In realtà l'efficienza è solitamente tra il 70 e l'80 % e non si mantiene costante durante tutto il processo.

All'inizio della PCR la cinetica è esponenziale, poi la quantità di prodotto sintetizzato ad ogni ciclo tende a stabilizzarsi e a crescere secondo una proporzionalità diretta, quindi, negli ultimi cicli, l'efficienza si riduce ulteriormente e si raggiunge una fase di plateau. La riduzione è causata dalla diminuzione dell'attività dell'enzima polimerasi in soluzione e dall'aumento della competizione tra l'ibridazione del DNA stampo con i primers e l'ibridazione con altri frammenti complementari [4].

Metodi di rilevazione

Per analizzare il DNA amplificato dopo la PCR si utilizza l'elettroforesi su gel, una tecnica che permette la separazione, la visualizzazione e la purificazione di molecole di interesse biologico, quali acidi nucleici e proteine. Tale separazione avviene in base al peso molecolare e alla carica elettrica di cui sono dotate le molecole. Le molecole sono poste in un gel con una soluzione tampone in presenza di un campo elettrico generato dalla differenza di potenziale applicata tra due elettrodi. Esse si muovono in direzione dell'elettrodo di carica opposta, pertanto gli acidi nucleici migrano sempre verso il polo positivo per la presenza nella loro molecola delle cariche negative dei gruppi fosfato (PO4²⁻). Inoltre, a causa della struttura reticolare del gel, quelle a maggior peso molecolare e a maggior ingombro sterico migrano più lentamente rispetto a quelle a minor peso molecolare.

Il gel può essere costituito da poliacrilamide, se occorre una risoluzione elevata per frammenti di DNA di piccole dimensioni, o agarosio, per separare molecole di DNA di dimensioni maggiori. Il sistema è assemblato su un apparecchio per elettroforesi, detto cella elettroforetica (Figura 1.5).



Figura 1.5. Esempio di cella elettroforetica utilizzata per la separazione, identificazione e purificazione di frammenti di DNA dopo la PCR tradizionale.

Il risultato della corsa elettroforetica consiste in una serie di bande formate dalle molecole di DNA. Le molecole di DNA a seconda della dimensione avanzano di più o di meno nel gel, collocandosi a distanze diverse dall'elettrodo negativo. È possibile calcolare la lunghezza in basi delle bande di DNA migrate sul gel se si carica insieme al campione in analisi una miscela di frammenti di DNA a peso molecolare noto, detti marker, che funge da calibratore.

Per quantificare la concentrazione del DNA amplificato da un campione si può misurarne l'assorbanza considerando il fatto che gli acidi nucleici presentano il picco di assorbimento a circa 260 nm. Si utilizza la proporzione tra il rapporto dell'assorbanza a 260 nm nota (A_{rif}) e la concentrazione nota (C_{rif}) di un campione di DNA a doppio filamento di riferimento e il rapporto dell'assorbanza a 260 nm misurata (A_{sam}) e la concentrazione incognita (C_{sam}) del campione di DNA a doppio filamento in analisi, come indicato nell'equazione 1.2:

$$C_{\text{sam}} = \frac{C_{\text{rif}} A_{\text{sam}}}{A_{\text{rif}}}$$
 Equazione 1.2

Tale tecnica, sebbene sia comune nei laboratori di biologia molecolare, può essere soggetta a inesattezze che derivano dal contributo di contaminanti. È per questo che per la quantificazione dell'acido nucleico si è passati all'utilizzo di particolari coloranti fluorescenti, specifici per il DNA a doppio filamento, che si intercalano tra le coppie di basi azotate e solo in questa condizione emettono a particolari lunghezze d'onda [7].

Il grafico in Figura 1.6 mostra l'andamento della concentrazione di DNA prodotto all'aumentare dei cicli di PCR. Si distinguono tre fasi: la prima fase è esponenziale, la seconda

è lineare con conseguente rallentamento della formazione di nuovi ampliconi¹, nell'ultima fase, detta di plateau, non vi è più formazione di ampliconi [4].



Figura 1.6. Step della PCR: il grafico mostra il logaritmo della concentrazione di DNA amplificato per numero di cicli.

Nella PCR "tradizionale" si effettua il rilevamento del DNA amplificato nella terza fase, detto rilevamento ad "*end – point*". Pertanto, è un metodo dispersivo, poiché la reazione di amplificazione deve essere terminata, e fornisce informazioni qualitative (presenza o assenza del DNA target nel campione di partenza) ma non quantitative [4]. Infatti, teoricamente la quantità finale di DNA amplificato dipende dalla quantità iniziale di DNA target, secondo l'equazione 1.1. Tale equazione in realtà non è immediatamente applicabile per ricavare le quantità iniziali, poiché l'efficienza non è costante ma diminuisce con l'aumentare del numero di cicli e la quantità di prodotto amplificato non aumenta in modo esponenzialmente per tutto il ciclo, ma raggiunge un plateau.

1.1. La Real Time PCR

La Real Time PCR nasce per sopperire al problema del metodo di rilevazione laborioso e non quantitativo, tipico della PCR tradizionale. Infatti, permette di seguire l'aumento della

¹ Ampliconi: frammenti di DNA, ossia il prodotto della reazione di amplificazione o di replicazione.

quantità di prodotto PCR in modo continuo ad ogni ciclo di amplificazione, ossia mentre l'amplificazione avviene, e quindi di identificare la fase esponenziale utilizzando sistemi di sensing che consentono di avere un segnale in tempo reale [4].

I sistemi di sensing si basano sull'utilizzo di fluorofori: l'aumento progressivo di molecole di DNA amplificate genera un segnale di fluorescenza monitorato in tempo reale e correlato alla quantità di prodotto PCR. Questo approccio unisce quindi ad alte sensibilità e specificità, l'eliminazione dell'analisi post – amplificazione, con la conseguente riduzione delle contaminazioni ambientali dovuta alla manipolazione dei prodotti di amplificazione. Inoltre, si riducono i tempi di analisi, avvenendo amplificazione e rivelazione contemporaneamente.

Metodi di rilevazione

La Real Time PCR si basa sui cambiamenti di fluorescenza dovuti alla generazione del prodotto amplificato. Per ottenere il segnale fluorescente si utilizzano delle molecole di fluorofori intercalanti o delle sonde oligonucleotidiche legate a fluorofori. Durante la reazione di PCR i campioni sono irradiati con una sorgente luminosa utile ad eccitare i fluorofori, che a seguito dell'eccitazione emettono un segnale fluorescente rilevato per mezzo di un detector [8].

Le molecole di fluoroforo utilizzate non accoppiate alle sonde sono coloranti fluorescenti intercalanti che si legano al DNA a doppio filamento in modo aspecifico. Un esempio è il SYBR Green I. Esso si trova in soluzione nella di fase di denaturazione, durante la quale emette un segnale fluorescente debole, non essendo legato alle molecole di DNA a singolo filamento (Figura 1.7). È nella fase di ibridazione che le molecole di fluoroforo iniziano ad interagire con le doppie eliche costituite dal primer e dalla sequenza stampo da amplificare, aumentando il segnale fluorescente emesso. Esso raggiunge il massimo nella fase di estensione quando la molecola di fluoroforo si intercala nei frammenti amplificati, per poi diminuire rapidamente nella successiva fase di denaturazione, quando è rilasciato in soluzione a causa della dissociazione dei filamenti del DNA dovuta all'aumento di temperatura. Quindi la quantità di prodotto amplificato è misurata rilevando l'emissione del segnale dai fluorofori al termine della fase di estensione di ciascun ciclo [4].



Figura 1.7. Emissione del segnale fluorescente utilizzando i fluorofori di tipo SYBR Green I. Nell'immagine a sinistra i fluorofori sono in soluzione ed emettono un segnale fluorescente debole. Nell'immagine a destra sono legati alle doppie eliche primer – DNA target ed emettono un segnale fluorescente crescente. [9]

Questa metodologia ha alta sensibilità e non presenta rischi di contaminazione, ma è aspecifica: rileva anche i prodotti non specifici come i dimeri, che aumentando erroneamente il valore di fluorescenza portano ad errori nel calcolo della concentrazione del target.

Per questi motivi le molecole di colorante fluorescente possono essere vantaggiosamente sostituite con sonde oligonucleotidiche marcate tramite fluorofori, complementari a specifiche sequenze dell'amplicone. Il segnale fluorescente emesso dalle sonde viene rilevato solamente dopo l'appaiamento della stessa alla sequenza bersaglio e corrisponde all'amplificazione della sequenza bersaglio [4].

Le sonde sono tipicamente oligomeri a base di DNA con coloranti coniugati. Quasi tutte le sonde si basano su un processo noto come trasferimento di energia a risonanza fluorescente (FRET). Il fenomeno alla base del processo è il trasferimento di energia da una molecola fluorescente eccitata che ha un livello energetico superiore (corrispondente all'emissione di un fotone con una lunghezza d'onda corta) ad una con un livello energetico inferiore (corrispondente all'emissione di un fotone una lunghezza d'onda più lunga). Si utilizzano due coloranti legati alle sonde, aventi lo spettro di emissione di uno sovrapposto a quello di eccitazione dell'altro. Quando i due coloranti sono spazialmente vicini l'uno all'altro (< 100 Å), il colorante con energia di emissione maggiore, detto reporter, se eccitato trasferisce la sua energia all'altro colorante nelle immediate vicinanze, detto quencher, con energia di emissione minore [8]. Se i due coloranti non sono vicini, il fenomeno FRET non può verificarsi e il primo colorante emetterà il suo segnale ad energia maggiore. Sulla base della tipologia del secondo colorante, che può ricoprire il ruolo di accettore o inibitore di fluorescenza (dark quencher), le sonde possono presentare diversi livelli di segnale di fondo. A seconda delle modalità con cui

il reporter è liberato dall'interferenza del quencher, le sonde sono distinte in sonde ad idrolisi e sonde di ibridazione.

Le sonde ad idrolisi, come schematizzato dalla sonda TaqMan in Figura 1.8, hanno legati alle due estremità un fluoroforo (R, detto reporter) e un accettore / inibitore di fluorescenza (Q, detto quencher). Quando la sonda è in soluzione, l'inibitore è abbastanza vicino al fluoroforo reporter per bloccare l'emissione del segnale sfruttando il fenomeno FRET. Quando avviene l'amplificazione del DNA target, nella fase di allungamento di ciascun ciclo, la polimerasi idrolizza la sonda oligonucleotidica e il fluoroforo reporter viene liberato nella miscela di reazione, sfuggendo all'azione inibitoria del quencher. L'emissione della fluorescenza del reporter è il segnale che viene rilevato di norma nella fase di ibridazione ed è proporzionale alla quantità di prodotto amplificato [4].

Le sonde TaqMan sono il sistema di sonde ad idrolisi più noto. Sono composte da un singolo oligonucleotide lineare marcato all'estremità 5' con il colorante reporter (ad esempio la fluoresceina o FAM) e all'estremità 3' con il colorante quencher (ad esempio la tetra-metil-rodamina o TAMRA) [8].



Figura 1.8. Schematizzazione del funzionamento di una sonda TaqMan.

Le sonde di ibridazione, al contrario, permettono di rilevare il segnale quando sono appaiate alla sequenza bersaglio. Esistono diverse tecnologie di sonde ad ibridazione, una molto nota prende il nome direttamente di sonde FRET, poiché in questo caso il segnale rilevato è quello del secondo fluoroforo che è costituito da un colorante accettore. Sono utilizzate in coppia (Figura 1.9), ossia due oligonucleotidi adatti per ibridare uno accanto all'altro sulla sequenza bersaglio nell'amplicone. Una sonda è legata al fluoroforo fluoresceina nella sua estremità 3' e l'altra è legata ad un altro fluoroforo, ad esempio LC Red 640 (Roche Applied Science), nella sua estremità 5'. Durante la fase di denaturazione le sonde sono libere in soluzione e non avviene la FRET, mentre nella successiva fase di appaiamento si ibridano vicine. Lo strumento eccita il fluoroforo donatore, che a sua volta trasferisce energia tramite il fenomeno FRET al fluoroforo accettore, il quale emette a una lunghezza d'onda più lunga che rappresenta il segnale. Durante la fase di allungamento le sonde sono ibridate e vicine e il segnale emesso è proporzionale alla quantità di prodotto amplificato [4].



Figura 1.9. Esempio di funzionamento di una coppia di sonde di ibridazione. [8]

Un'altra variante delle sonde di ibridazione è l'utilizzo di una singola sonda con due fluorofori. Un esempio è rappresentato dai molecular beacons (Figura 1.10), sequenze di oligonucleotidi progettate per formare strutture a forcina quando sono in soluzione nello stato inattivo. La forcina ha due braccia complementari che formano il gambo (stem) e una struttura ad anello (loop) progettata per consentire l'ibridazione alla sequenza da amplificare. Alla fine di un braccio c'è un colorante reporter e a quella dell'altro un quencher non fluorescente: in assenza di DNA target la sonda rimane nella struttura a forcina e, essendo i due coloranti molto vicini, non viene emessa fluorescenza poiché è interamente assorbita dal quencher. Quando il loop ibrida con il DNA amplificato la struttura della sonda diventa lineare, il reporter è in una posizione lontana rispetto al quencher, ed è quindi possibile misurare il segnale fluorescente emesso dal reporter [8].

L'emissione della fluorescenza avviene, quindi, solamente durante l'amplificazione specifica della sequenza target, quando la sonda può ibridare ed annullare il fenomeno FRET [8].



Figura 1.10. Esempio di funzionamento dei molecular beacons.

In generale, rispetto ai coloranti intercalanti, le sonde presentano il vantaggio che, avendo bisogno di un'ibridazione specifica con il DNA target per generare il segnale fluorescente, non rilevano i possibili prodotti aspecifici di amplificazione.

Metodi di quantificazione

La Real Time PCR si basa sulla capacità dello strumento di rilevare il ciclo di amplificazione in cui la reazione è in fase esponenziale. In particolare, lo strumento identifica il ciclo in cui nella reazione si è accumulata una quantità di prodotto di amplificazione sufficiente da generare un segnale al di sopra di un valore soglia stabilito, che coincide con il

livello minimo di fluorescenza significativo. Questo avviene mentre la PCR è in fase esponenziale, ben prima della fase di plateau. Tale numero di cicli viene definito ciclo soglia o valore C_T (Cycle threshold) [7].

Nella Real Time PCR si può misurare l'aumento della fluorescenza nella fase esponenziale tramite l'analisi della curva di fluorescenza indicata in Figura 1.11, detta Curva di Amplificazione. In essa è tracciata la variazione della fluorescenza (come logaritmo del valore arbitrario) emessa dalle sonde specifiche per il DNA target all'aumentare del numero di cicli della reazione [10].

La Curva di Amplificazione è una sigmoide: nei primi cicli la fluorescenza non viene rilevata, nei cicli successivi cresce esponenzialmente, poi entra in fase lineare fino al plateau.

Nella Curva di Amplificazione si prendono in considerazione tre parametri: la baseline, la linea soglia e il ciclo soglia, indicati in Figura 1.11 rispettivamente come "*Baseline region*", "*Threshold*" e " C_T ".



Figura 1.11. Esempio di curva di amplificazione.

La baseline si riferisce al livello del segnale durante i cicli iniziali, in cui il segnale fluorescente è troppo basso e può essere equiparato al rumore di fondo [10].

La linea soglia è il livello del segnale fluorescente che riflette un aumento statisticamente significativo della fluorescenza emessa rispetto alla baseline, spesso impostato a 10 volte la deviazione standard del valore di fluorescenza della baseline [10].

Il ciclo soglia C_T è il numero di cicli in corrispondenza del quale il segnale fluorescente della reazione attraversa la soglia. È utilizzato per quantificare il numero iniziale di molecole stampo del DNA, poiché è inversamente correlato alla quantità iniziale di target: maggiore è la quantità di campione iniziale, prima viene raggiunta la soglia del ciclo e più basso è il valore C_T [4], [7].

Con la Real Time PCR possono essere eseguite due tipi di analisi: qualitativa o quantitativa. Per le analisi qualitative, i risultati positivi o negativi generati dai campioni sono validati tramite l'utilizzo di controlli di qualità, positivi e negativi. I controlli permettono di evidenziare la presenza di falsi positivi o falsi negativi: quello positivo consiste in un campione in cui è presente con certezza la sequenza bersaglio, mentre quello negativo consiste in un campione in cui essa non è presente. Pertanto, se dal primo non si ottiene un amplificato (cioè il C_T non è determinato) è probabile che ci siano problemi a livello dei reagenti utilizzati, dell'allestimento della reazione o dello strumento, che potrebbero generare altri risultati "falsi negativi". Qualora invece il controllo negativo dia un amplificato (cioè il C_T è determinato) è probabile che ci siano problemi di contaminazione a livello dei reagenti utilizzati, dell'allestimento della reazione o dello strumento, che potrebbero generare altri risultati "falsi positivi" [11].

Nelle analisi quantitative, per quantificare la concentrazione iniziale di DNA nel campione, si misura l'aumento della fluorescenza nella fase esponenziale tramite l'analisi della curva di fluorescenza indicata in Figura 1.11 e si definisce il valore di C_T .

Durante la fase esponenziale è possibile quantificare il DNA e vale l'equazione 1.3:

$$\boldsymbol{Q}_f = \boldsymbol{Q}_i (1 + \mathbf{E})^{(n-1)}$$
Equazione 1.3

dove Q_f è la quantità di prodotto finale, Q_i è la quantità di prodotto iniziale, E è l'efficienza che varia durante i cicli e n è il numero di cicli.

Se l'efficienza della PCR è del 100%, la quantità di prodotto raddoppia ad ogni ciclo; pertanto un aumento del C_T di uno rappresenta un raddoppio della molecola bersaglio; una variazione di due valori C_T rappresenta un aumento quadruplo della quantità di target e così via [7].

Determinare la concentrazione iniziale di un acido nucleico all'interno di un campione, utilizzando il valore di ciclo soglia, richiede la costruzione di una Curva Standard (Figura 1.12). Per generarla si parte da un campione di DNA target diluito in serie, avente una concentrazione nota e determinata con mezzi indipendenti. Se preparati correttamente gli standard diluiti producono una linea retta quando i loro valori C_T vengono tracciati rispetto al logaritmo della concentrazione di DNA per ogni diluizione [7].

La curva standard presenta i valori di C_T dei campioni nelle ordinate e il logaritmo della concentrazione nota delle serie di diluizioni di DNA nelle ascisse. È descritta da un'equazione di regressione (equazione 1.4), utilizzata per calcolare la concentrazione di DNA di un campione sconosciuto in base al C_T ricavato dalla Curva di Amplificazione.



Figura 1.12. Esempio di curva standard: è il logaritmo del numero iniziale di sequenze bersaglio in funzione del ciclo soglia (C_T). [12]

L'equazione 1.4 che descrive la curva standard è del tipo:

y = mx + q

Equazione 1.4

dove x è la concentrazione di DNA in ng/mL e y è il valore di C_T [7].

Oltre all'equazione della curva standard, quindi al valore dell'intercetta q e della pendenza della retta m (indicata in Figura 1.12 come slope), viene fornito anche il coefficiente di determinazione R^2 della retta: esso indica quanto i valori di C_T ottenuti dai campioni sono fedeli ai valori degli standards. Se i punti sono prossimi alla retta, il valore R^2 sarà vicino a uno e quindi il valore C_T sull'asse delle ordinate prevede con precisione la concentrazione di DNA sull'asse delle ascisse [7].

La base che descrive l'amplificazione esponenziale può essere calcolata dalla curva standard usando la seguente equazione 1.5:

Amplificazione Esponenziale = $10^{\left(\frac{-1}{m}\right)}$ Equazione 1.5 [7]

L'efficienza di amplificazione nella fase esponenziale della PCR è una misura della quantità di DNA target convertita in prodotto amplificato durante ciascun ciclo della fase esponenziale della reazione. È determinata dalla curva standard usando la seguente equazione 1.6:

$$E = \left(10^{\left(\frac{-1}{m}\right)} - 1\right) \cdot 100$$
 Equazione 1.6 [7]

Per avere un'efficienza pari al 100 %, in cui la quantità di prodotto raddoppia esattamente ad ogni ciclo, la pendenza della retta deve essere pari a -3,322: ossia si produce un aumento di 10 volte del prodotto PCR ogni 3.32 cicli. Un valore di efficienza della reazione inferiore al 100 % porta ad una pendenza della retta inferiore (ad esempio -3,8), mentre un valore di pendenza superiore (ad esempio -2,8) è indice di possibili errori di allestimento della reazione o della formazione di prodotti aspecifici che hanno incrementato la fluorescenza in modo errato [7].

Avendo la retta di regressione della curva standard pendenza negativa, i valori di C_T sono inversamente correlati alla quantità di prodotto iniziale: maggiore è la quantità di prodotto iniziale in una reazione, più basso è il valore C_T per quella reazione [10].

Per calcolare la quantità di DNA prodotto ad un dato valore di C_T, è necessario risolvere l'equazione 1.7 di regressione della curva standard:

$$C_T = m \cdot \log DNA + q$$

da cui si ottiene il logaritmo della concentrazione di DNA prodotto (equazione 1.8)

$$\log DNA = \frac{C_T - q}{m}$$
 Equazione 1.8

Risolvendo il logaritmo, la quantità di DNA target espressa nell'unità di misura dello standard è la seguente (equazione 1.9):

$$DNA = 10^{\frac{C_T-q}{m}}$$
 Equazione 1.9

È quindi chiaro quanto sia importante determinare con esattezza il valore di C_T per una quantificazione corretta dalla concentrazione di DNA nel campione.

Equazione 1.7

Descrizione dello strumento

La strumentazione per eseguire una sessione di Real Time PCR deve essere dotata di un termociclatore, degli elementi ottici e di un software per la raccolta e l'analisi dei dati [10].

Il termociclatore è uno strumento di laboratorio utilizzato per automatizzare le variazioni cicliche di temperatura necessarie per eseguire la PCR. È costituito da un blocco termico, dotato di alloggi per le provette contenenti i campioni, e da un sistema in grado di riscaldare o raffreddare velocemente il blocco termico per portarlo alla temperatura richiesta nelle diverse fasi della PCR [10].

Gli elementi ottici possono essere suddivisi in due categorie principali: la sorgente di eccitazione e il rilevatore di emissioni. La fonte di eccitazione può essere una lampada alogena o un LED ed è necessaria per eccitare i coloranti fluorescenti, mentre il rivelatore può essere costituito da telecamera CCD (dispositivo ad accoppiamento di carica) o un fotodiodo che cattura le emissioni fluorescenti in tempo reale.

Il campione è posto all'interno di singole provette o di pozzetti di una micropiastra per PCR. Il principio di funzionamento della Real Time PCR prevede che il campione venga irradiato da una radiazione luminosa. La radiazione che colpisce il campione deve avere una lunghezza d'onda adatta ad eccitare i fluorofori, selezionata tramite un primo sistema di filtri. Un sistema ottico di lenti, specchi e/o fibre devia e proietta la luce sulle provette o sulla micropiastra con i campioni. Dopo essere stati irradiati, dai campioni origina una fluorescenza che è catturata e proiettata verso un secondo sistema di filtri. La radiazione della lunghezza d'onda di emissione arriva quindi al rilevatore, che registra i segnali di fluorescenza generati da ogni provetta o pozzetto per costruire le curve di fluorescenza di ogni campione [10].

A inizio vita lo strumento può avere una fonte di eccitazione e una sensibilità di emissione dotate di eccellente uniformità, ma con il passare del tempo e con l'utilizzo, lo strumento è affetto da variazioni delle prestazioni ottiche dovute ad usura.

Esistono inoltre altre variazioni occasionali da imputare al fatto che alle alte temperature, si possono creare delle bolle d'aria nei reagenti liquidi. Questi fenomeni si trovano nel percorso della luce di eccitazione e di emissione e possono causare fluttuazioni del segnale fluorescente, influenzando la precisione dei risultati e causando variazioni nei valori di C_T .

Per eliminare l'effetto di fenomeni dovuti alla non perfetta uniformità della radiazione di eccitazione o di emissione si utilizzando dei fluorofori di riferimento passivi: tali fenomeni influenzano sia il segnale proveniente dalle sonde, sia il segnale provenienti dal riferimento passivo, in eguale misura. La normalizzazione del segnale del reporter rispetto al riferimento passivo corregge le fluttuazioni [10].

Le variabilità legate a fenomeni di degrado del sistema ottico saranno invece analizzate nei capitoli successivi.

Capitolo 2. ELITe InGenius®

Il sistema ELITe InGenius® (Figura 2.1) è uno strumento totalmente automatizzato che consente di eseguire sia le operazioni di estrazione e purificazione degli acidi nucleici sia quelle di amplificazione e rilevamento della sequenza target in Real Time. Il sistema può essere utilizzato con diversi tipi di campioni per applicazioni di diagnostica in vitro, di tipo sia qualitativo sia quantitativo [11].



Figura 2.1. Apparecchiatura ELITe InGenius.

Le sonde

Le sonde utilizzate con il sistema ELITe InGenius® sono chiamate MGB Pleiades Probes. Sono sonde di ibridazione ad alta specificità e sensibilità. Sono composte da quattro differenti parti, indicate in Figura 2.2, e presentate di seguito [13].



Figura 2.2. MGB Pleiades Probes. Nella parte superiore è raffigurata la configurazione inattiva in soluzione, mentre in quella inferiore la configurazione attiva, ibridata alla sequenza di DNA target [13].

Il Minor Groove Binder (MGB) è una molecola sintetica che interagisce con il solco minore della doppia elica di DNA e consente alla sonda di legarsi al DNA in modo più stabile, aumentando l'affinità di legame e portando ad un aumento della specificità. Infatti, utilizzando l'MGB è possibile progettare sonde più corte, dove una mancata corrispondenza di una base ha un impatto molto maggiore sulla stabilità dell'ibrido rispetto a quello che si osserva in una sonda più lunga [10].

L'Eclipse® Dark Quencher è l'inibitore della fluorescenza: assorbe l'energia del fluoroforo reporter dissipandola in calore e non riemettendola neanche in piccola parte sotto forma di luce, come spesso accade con l'utilizzo di altri quencher. Grazie a questo si riduce il segnale di background e si aumenta la sensibilità della Real Time PCR.

Le Superbases® come la Super A sono dei nucleotidi ingegnerizzati utilizzati per ottimizzare la progettazione e le prestazioni di primer e sonde [13].

I fluorofori utilizzati sono è indicati come AquaPhluor® Dyes. Sono una famiglia di composti fluorescenti con aumentata idrofilicità che a seguito dell'eccitazione emettono fluorescenza in un largo spettro di lunghezze d'onda, dal blu al Far-Red². [13]

 $^{^2\ {\}rm Far}-{\rm Red:}$ radiazione luminosa con lunghezza d'onda posta all'estremità dello spettro visibile, appena prima dell'infrarosso.

Rispetto alle più comuni sonde di tipo TaqMan, le sonde MGB Pleiades non subiscono idrolisi durante il processo di estensione. Pertanto, è possibile riutilizzarle dopo il completamento della PCR per l'analisi della Curva di Dissociazione (Melting Plot) al fine di valutare l'accuratezza dei risultati quantitativi, distinguendo i prodotti specifici da quelli aspecifici sulla base delle relative temperature di fusione. Le sonde TaqMan, subendo l'idrolisi, non sono disponibili per analisi successive alla PCR (Figura 2.3) [13].



Figura 2.3. Differenze nel funzionamento di sonde TaqMan e ELITe MGB Pleiades durante le tre fasi principali della PCR [13].

Metodo di funzionamento

Il sistema ELITe InGenius® è in grado di processare da uno a dodici campioni diversi in dodici tracks paralleli, consentendo di eseguire estrazioni e PCR multiple e indipendenti una dall'altra. Come spiegato in precedenza, viene generata la Curva di Amplificazione da cui si ricava il C_T per la quantificazione della concentrazione di DNA [11]. Lo strumento consente di eseguire analisi sia qualitative sia quantitative. Per le analisi qualitative, i risultati generati dai campioni sono validati tramite l'utilizzo dei controlli, positivi e negativi. Per quelle quantitative, il software necessita di una curva di calibrazione, ossia la curva standard (Figura 2.4), e di uno o più risultati di controllo, positivi e negativi [11].



Figura 2.4. Esempio di curva standard generata dal sistema ELITe InGenius con il saggio per il citomegalovirus (CMV) [11].

Durante le sessioni di Real Time PCR, il sistema ELITe InGenius si avvale dell'utilizzo di un pipettatore a canale singolo per la dispensazione nei dodici pozzetti dei reagenti di amplificazione e dell'acido nucleico estratto dai campioni clinici. Durante la PCR su ognuno dei dodici tracks sono disposti i dodici probes ottici per la rilevazione in tempo reale della fluorescenza emessa dalle sonde nei dodici pozzetti. Come per gli altri sistemi di Real Time PCR occorre eccitare con la corretta lunghezza d'onda i fluorofori contenuti all'interno delle sonde affinché venga emessa e rilevata la fluorescenza. Una volta eccitati i fluorofori, se la sonda si trova nella configurazione ibridata attiva, la fluorescenza viene emessa, altrimenti l'energia di eccitazione è assorbita dall'inibitore di fluorescenza (dark quencher).

2.1. Sezione ottica

Per consentire il meccanismo di lettura del segnale delle sonde sono disponibili sei "canali" di rilevazione della fluorescenza, ognuno caratterizzato da due lunghezze d'onda: una di eccitazione e una di emissione. Le lunghezze d'onda sono diverse nei sei canali per consentire l'utilizzo di diversi fluorofori. Nei canali sono presenti sei LED con i filtri di eccitazione e sei fotodiodi con i filtri di emissione.

La fluorescenza emessa dai fluorofori di diverse sonde può avere diverse lunghezze d'onda, pertanto ogni pozzetto è scansionato da tutti e sei i canali. Solamente quello corrispondente alle lunghezze d'onda del fluoroforo di una sonda ibridata e attivata rileva il segnale [11]. Per lo strumento ELITe InGenius®, le specifiche di ogni canale e dei fluorofori ad essi associati sono indicate in Tabella 2.1 [11].

| Canali | Fluorofori ELITechGroup | Fluorofori compatibili | Filtro di eccitazione (nm) | Filtro di rilevazione (nm) |
|--------|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 1 | FAM | FAM, SYBR Green, Alexa Fluor 488 | 470 | 510 |
| 2 | AP525 | JOE, HEX, VIC | 530 | 560 |
| 3 | AP559 | TAMRA, Alexa Flour 555, NED | 560 | 590 |
| 4 | AP593 | Rox, Texas red | 590 | 630 |
| 5 | AP642 | Cy5, Alexa Flour 647 | 630 | 670 |
| 6 | AP680 | Cy5.5, Alexa Flour 680, Quasar 705 | 670 | 710 |

Tabella 2.1. Specifiche dei sei canali di emissione e rilevazione e dei fluorofori ad essi associati. [14]

I sei canali comprendenti i filtri, i LED e i fotodiodi sono posizionati all'interno di blocco ottico su cui scorre uno "*shuttle*" che lo collega attraverso fibre ottiche ai dodici probes ottici per rilevare in tempo reale la fluorescenza emessa nei dodici pozzetti. Ogni probe ottico è in comunicazione da un lato con i canali del blocco ottico e dall'altro lato con i pozzetti dove avviene la PCR. Per consentire il meccanismo di eccitazione e rilevazione all'interno dei probes sono presenti due fibre ottiche: una è utilizzata per trasportare la radiazione utile ad eccitare i fluorofori e l'altra per trasmettere la radiazione emessa dagli stessi. Le due fibre in corrispondenza dei canali del blocco ottico sono in contatto rispettivamente con i filtri di eccitazione e con quelli di emissione. All'estremità del probe ottico a contatto con i pozzetti dove avviene la PCR è presente una lente, detta ball lens, utile a focalizzare la radiazione luminosa di eccitazione e quella di emissione. Tra la ball lens e le fibre è posto un distanziale. In Figura 2.5 sono indicati i cinque componenti principali di ogni probe ottico, descritti in Tabella 2.2 [14].



Figura 2.5. Fotografia di un probe ottico scomposto nelle varie parti numerate indicate in Tabella 2.2. [14]

Tabella 2.2. Descrizione dei vari costituenti dei probes ottici indicati in Figura 2.5. [17]

| N° Parte del probe ottico corrisponde | Parte del probe ottico corrispondente | | | |
|---|---------------------------------------|--|--|--|
| 1 Ugello di rilevamento | | | | |
| 2 Ball lenses: lente a sfera di vetro | | | | |
| 3 Distanziale | | | | |
| 4 Tappo finale con anello trasparente e fibra c | ottica | | | |
| 5 Viti a chiave Allen. | | | | |

Oltre alle 24 fibre ottiche dei dodici probes sullo shuttle è presente un'ulteriore fibra ottica singola, detta "*LED monitoring fiber*" o anche *fibra di loop*. Questa è posizionata in modo da collegare direttamente il filtro di emissione al filtro di eccitazione di ciascun canale mentre lo shuttle scorre sul blocco ottico. Il segnale di tale fibra è utilizzato come riferimento per i probes ottici: i segnali di fluorescenza utilizzati per la creazione della Curva di Amplificazione sono normalizzati rispetto ad esso. In questo modo si compensano le fluttuazioni di segnale dovute a un degrado della parte ottica a monte dei probes ottici (blocco ottico con filtri, LED, fotodiodi), utilizzando un segnale relativo, normalizzato rispetto al segnale della fibra di loop. È indispensabile che le prestazioni della fibra di loop siano costanti nel tempo, in quanto, se è il probe ottico a valle del sistema a degradare, diminuendo la sua trasmittanza e quindi la

Capitolo 2 - ELITe InGenius®

fluorescenza rilevata, si potrà osservare una diminuzione del segnale relativo. Qualora fosse il loop a subire un degrado nel tempo e quindi a diminuire la sua trasmittanza e il segnale rilevato, non si riuscirebbe a distinguere un eventuale degrado dei probes ottici in quanto si avrebbe comunque un segnale relativo elevato, poiché normalizzato per un segnale di loop inferiore.

La vita dei probes ottici viene misurata in numero di cicli: un ciclo consiste in una scansione dello shuttle con tutte e dodici le fibre ottiche sul blocco ottico, durante la quale ognuno dei sei canali invia il segnale di eccitazione su ciascun probe e rileva il segnale di fluorescenza emesso dai fluorofori. Una sessione completa di Real Time PCR consta mediamente di circa 600 cicli. Sulla base di test svolti con l'ELITe InGenius®, è stato impostato come limite di vita massimo delle fibre un milione di cicli, raggiunto il quale i probes ottici sono sostituiti.

Su tutte le apparecchiature vengono inoltre eseguiti due differenti livelli di manutenzione. La manutenzione di primo livello riguarda le ball lenses contenute nei probes ottici, che nel tempo e con l'aumentare del numero dei test effettuati tendono a opacizzarsi. Per questo motivo annualmente viene eseguita la pulizia di tutte e dodici le ball lenses, utilizzando un panno bianco che non rilascia residui. Il secondo livello di manutenzione consta nella sostituzione completa di tutti i probes ottici al raggiungimento del limite massimo di cicli imposto dall'azienda.

A tal proposito, scopo del presente lavoro è l'analisi delle prestazioni di strumenti adatti a rilevare l'eventuale degrado nel tempo dei probes ottici. Attualmente infatti entrambe le manutenzioni sono eseguite a scadenza (annuale o al raggiungimento di un milione di cicli). Sarebbe invece importante avere uno strumento che consenta di analizzare lo stato dei probes ottici, al fine di poter procedere con la manutenzione quando è effettivamente rilevato un degrado. Questo per evitare non solo il protrarsi nel tempo di variazioni del segnale rilevato, che può portare a errori diagnostici, ma anche l'esecuzione di manutenzioni non necessarie, riducendo i tempi e i costi.

(Non è stato possibile approfondire ulteriormente la descrizione della parte ottica del Sistema ELITe InGenius per una politica di tutela della proprietà intellettuale interna all'azienda).

Capitolo 3. Prima metodologia: analisi della trasmittanza delle fibre ottiche

In questa sezione viene presentata la prima metodologia utilizzata per valutare il degrado delle fibre ottiche contenute nei probes. Si analizza la trasmittanza delle fibre ottiche, correlata alla potenza ottica emessa dalle stesse: una diminuzione della potenza ottica emessa è indice di una riduzione della trasmittanza.

L'ipotesi iniziale prevede che la trasmittanza delle fibre diminuisca all'aumentare del numero di cicli di vita dello strumento.

Sono stati condotti dei test su tre gruppi di probes ottici appartenenti a tre strumenti che presentano diversi cicli di vita:

- gruppo A, composto da dodici probes ottici mai utilizzati;
- gruppo B, composto da dodici probes ottici con una vita media di circa 600 mila cicli;
- gruppo C, composto da dodici probes ottici con una vita media di circa un milione di cicli.

I test sui primi due gruppi di probes ottici, A e B, sono stati condotti precedentemente al lavoro qui presentato.

Per misurare la potenze direttamente dalle fibre contenute nei probes è necessario smontarli e rimuovere la ball lens e il distanziale. I test si basano sulla misurazione della potenza ottica all'uscita della fibra quando viene applicato un segnale ottico costante all'ingresso della stessa. La sorgente ottica è un LED iper-rosso (650 nm, Diemount GmbH, Germania), accoppiato alla fibra sottoposta al test tramite una guaina di accoppiamento di tipo ST-ST. Il LED è pilotato da una corrente costante affinché la potenza ottica fornita sia costante; la corrente viene monitorata mediante un multimetro digitale (Agilent 34401A) ed è stata impostata su 10,00 mA. La potenza ottica alla fine della fibra viene misurata utilizzando un misuratore di potenza per fibre ottiche in plastica (Kingfisher International, Pocket Power Meter). La fibra in prova è accoppiata al misuratore utilizzando un adattatore personalizzato. Durante il test la fibra viene mantenuta diritta.

3.1. Discussione dei risultati

All'interno di ciascun probe ottico, come detto in precedenza, sono presenti due diverse fibre ottiche, una di colore nero e una di colore giallo, utilizzate rispettivamente per illuminare il campione e raccogliere e indirizzare la luce al rilevatore. La potenza ottica è stata misurata per entrambe le fibre e sono state considerate indistintamente per i confronti tra i tre gruppi, considerando quindi per ogni gruppo 24 valori di potenza totali. I valori di potenza misurati dai tre gruppi di probes sono stati normalizzati rispetto ad un massimo comune di 379 μ W, per avere una migliore leggibilità dei risultati.

Come si vede dalla Figura 3.1 e dalla Figura 3.2, nelle quali sono raffigurate rispettivamente le potenze normalizzate per gruppo di fibre e le loro distribuzioni, le fibre appartenenti al gruppo B producono una potenza ottica minore rispetto a quelle del gruppo A, con una differenza percentuale delle medie presentate in Tabella 3.2 dell'1,5 %. Hanno quindi una trasmittanza inferiore, confermando l'ipotesi iniziale che le fibre con un maggior numero di cicli di vita presentano una maggiore attenuazione. Tale ipotesi invece non è confermata dal gruppo C, che presenta addirittura una potenza ottica media superiore dello 0,42 %, rispetto a quella del gruppo A.



Figura 3.1 Potenze ottiche normalizzate per i tre gruppi di probes: A, B e C.


Figura 3.2. Distribuzioni delle potenze ottiche normalizzate per i tre gruppi di probes.

In Tabella 3.1 sono riportati i valori delle potenze medie normalizzate per ciascun gruppo di probes e le loro deviazioni standard. Le medie hanno valori che si discostano tra di loro di meno del 2%.

Tabella 3.1. Tabella dei valori delle potenze medie normalizzate e delle loro deviazioni standard per ciascun gruppo di probes ottici.

| | Madia | Deviazione | | |
|----------|--------|------------|--|--|
| | wieula | standard | | |
| Gruppo A | 0.944 | 0.027 | | |
| Gruppo B | 0.929 | 0.019 | | |
| Gruppo C | 0.948 | 0.027 | | |

Attraverso un test ANOVA a un fattore in ambiente Excel si valuta quanto le medie siano significativamente uguali o diverse. ANOVA è l'acronimo di "Analysis Of Variance" (Ronald Fisher, 1918). È un test utile a verificare che le medie di due o più gruppi siano significativamente uguali, validando o smentendo l'ipotesi nulla attraverso l'utilizzo di un test statistico. Per verificare l'ipotesi nulla viene impostato un livello di significatività del test

(indicato di solito con la lettera greca α), che indica la probabilità di accettare o rigettare l'ipotesi nulla. La decisione viene presa considerando il valore di p – value: valori di p - value inferiori al livello di significatività indicano che le medie non sono statisticamente uguali e quindi si può escludere l'ipotesi nulla; al contrario la si può accettare.

In questo caso specifico si sono confrontati i gruppi di probes ottici a coppie e per ognuno dei tre test ANOVA l'ipotesi nulla prevede che i valori di potenza dei due gruppi in analisi siano statisticamente uguali, ossia abbiano media e varianza uguali. I risultati sono presentati in Tabella 3.2: è stato calcolato il p - value utilizzando lo stesso livello di significatività pari al 5 % per tutti i test.

Tabella 3.2. Tabella riassuntiva dei test ANOVA per confrontare statisticamente le medie e le varianze dei tre gruppi di probes ottici considerati a coppie.

| | α | P-Value | Risultato |
|---------------------|------|----------------|---------------------|
| Gruppo B – Gruppo A | 0,05 | 0,0029 | B non è uguale ad A |
| Gruppo B – Gruppo C | 0,05 | 0,00001263 | B non è uguale a C |
| Gruppo A – Gruppo C | 0,05 | 0,372 | A è uguale a C |

I primi due test sono statisticamente molto significativi, infatti hanno valori di p - value inferiori a 0.01. Si può quindi concludere che il gruppo di probes B emette delle potenze ottiche statisticamente diverse sia dal gruppo A, che dal gruppo C: più precisamente emette una potenza ottica media inferiore, ossia ha una trasmittanza media inferiore. Il terzo test conferma l'ipotesi nulla con un valore di p - value di molto superiore al livello di significatività, pertanto le potenze ottiche emesse dei due gruppi di probes A e C non possono essere considerate statisticamente diverse.

Per i probes del gruppo C è stata tenuta traccia del track in cui erano posizionati all'interno dell'apparecchiatura prima di essere rimossi. È interessante notare l'andamento delle potenze ottiche rilevate dalle fibre gialle e nere per track, presentato in Figura 3.3. Il punto di minimo corrisponde alle fibre del probe posto al nono track: sia la fibra gialla che la fibra nera emettono una potenza ottica inferiore rispetto alle altre fibre.



Figura 3.3. Andamento delle potenze ottiche per track emesse da ciascuna delle due fibre appartenenti ai probes del gruppo C.

Analizzandole al microscopio ottico entrambe le fibre appartenenti al nono track risultano danneggiate. Nelle immagini presentate si nota che la superficie delle due fibre appartenenti al probe posto al nono track (Figura 3.4) è meno regolare e nitida rispetto a quella della fibra appartenente al probe posto nel primo track (Figura 3.5).



Figura 3.4. Fotografie al microscopio ottico delle due fibre del gruppo C appartenenti al probe posizionato nel nono track: la fibra gialla a sinistra, quella nera a destra.



Figura 3.5. Fotografia al microscopio ottico della fibra nera del gruppo C appartenente al probe posizionato nel primo track.

Alla luce dei risultati è chiaro che non è possibile utilizzare questa metodologia per indagare il degrado dei probes ottici nel tempo, sulla base dei cicli di vita dello strumento: non consente di distinguere tra probes mai utilizzati e probes aventi un milione di cicli di vita. La causa è imputabile anche alla poca stabilità del setup di misura. Il test discrimina solamente i probes aventi le fibre danneggiate a causa di una maggiore riduzione della potenza ottica misurata.

Inoltre, non da escludere, l'effetto di opacizzazione delle ball lenses nel tempo: per eseguire questo test è necessario smontare il probe ottico per portare il misuratore di potenza direttamente a contatto con la fibra ottica. Pertanto, non è possibile rilevare l'effetto di opacizzazione, che invece incide sui risultati dei test di Real Time PCR, come sarà descritto nei capitoli successivi.

Alla luce dei risultati dei test di misure di potenza ottica direttamente dalle fibre contenute nei probes, è evidente che tramite tale metodologia non è possibile distinguere quali fibre presentano una maggiore attenuazione della trasmittanza dovuto all'usura dei probes, ma distingue solamente quelle danneggiate.

Per questo motivo si è cambiata metodologia per indagare il degrado dei probes ottici. Si analizzano i segnali di fluorescenza acquisiti direttamente dall'apparecchiatura ELITe InGenius, utilizzando come fonte di emissione della stessa speciali carte fluorescenti. Fattore fondamentale per poter confrontare i segnali rilevati dai probes è che la fluorescenza emessa dalla carte possa essere rilevata uguale da tutti i probes e sia costante nel tempo.

Avendo l'apparecchiatura sei diversi canali di emissione ed eccitazione a diverse lunghezze d'onda, per analizzare oltre ai probes anche i canali si sono utilizzate cinque carte di diversi colori, nominalmente dal verde al rosso, per coprire tutte o quasi le lunghezze d'onda dell'apparecchiatura. Non è stato possibile trovare una tipologia di carta che stimolasse tutti e sei i canali. Le cinque tipologie carte, anche dette "tape", sono indicate nell'elaborato come Green, Yellow, Orange, Red2 e Red1, nominalmente di colore verde, giallo, arancione e due tonalità di rosso differente.

Tali carte sono inserite all'interno di fixture meccaniche (Figura 4.1), dette anche tools, predisposte per ricevere in modo stabile sei dei dodici probes ottici del sistema ELITe InGenius. Al fine di testare tutti i probes dell'apparecchiatura è necessario quindi utilizzare due fixture o eseguire due prove diverse con la stessa fixture, la prima comprendente i primi sei probes e la seconda comprendente i successivi sei. In azienda sono presenti due fixture metalliche e sono indicate come Tool 1 e Tool 2.



Figura 4.1. Fotografia raffigurante una delle due fixture meccaniche presenti in azienda. All'interno dei sei fori sono portati a contatto il probe ottico e la carta fluorescente.

Dopo avere inserito i probes nella fixture (come in Figura 4.2), si avvia la procedura di misura. L'apparecchiatura stimola le carte con i segnali ottici emessi dalle sue sei sorgenti led e registra i segnali ottici emessi dalle carte, poi filtrati dai rilevatori.



Figura 4.2. Schema raffigurante l'inserimento dei primi sei probes nella tool per ottenere il segnale di fluorescenza. Per ottenere il segnale dai successivi sei probes occorre rimuovere e riposizionare la tool a contatto con essi.

Il sistema ELITe InGenius registra automaticamente i segnali misurati durante ogni scansione e li salva in un file .csv. Come mostrato in Figura 4.3, il file riporta i dati misurati dai sei rilevatori indicando nella prima colonna ("*Pulse*") i 5200 impulsi dell'encoder, usato per conoscere la posizione dello shuttle che trasla sul gruppo sorgenti/rilevatori. Dalla seconda alla settima colonna ("*Ch0*", "*Ch1*", "*Ch2*", "*Ch3*", "*Ch4*", "*Ch5*") sono riportate le intensità dei segnali ottenuti stimolando le carte da ciascuno dei sei canali, ognuno alla sua lunghezza d'onda.

I dati riportati nei file .csv sono le uscite grezze dei convertitori Analogico Digitale e quindi sono in LSB.

| 6 | Pluse | ch0 | ch1 | ch2 | ch3 | ch4 | ch5 |
|----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 7 | 0 | 157 | 1 | 82 | 36 | -13 | 10 |
| 8 | 1 | 155 | 1 | 77 | 36 | -13 | 10 |
| 9 | 2 | 156 | 2 | 73 | 35 | -12 | 10 |
| 10 | 3 | 158 | 2 | 68 | 35 | -14 | 11 |
| 11 | 4 | 156 | 2 | 63 | 34 | -14 | 10 |
| 12 | 5 | 156 | 3 | 58 | 33 | -12 | 9 |
| 13 | 6 | 157 | 4 | 53 | 34 | -13 | 10 |
| 14 | 7 | 157 | 4 | 49 | 32 | -13 | 9 |
| 15 | 8 | 156 | 3 | 44 | 34 | -13 | 9 |

Figura 4.3. Esempio di scansione .csv contenente i segnali rilevati dallo strumento, importato in Matlab.

I segnali ottenuti alla fine di ogni scansione (Figura 4.4 e Figura 4.5) presentano sette picchi totali, sei corrispondenti ai probes inseriti all'interno della tool contenente la carta fluorescente e l'ultimo picco corrispondente al segnale proveniente dalla fibra di loop.



Figura 4.4. Segnale ottenuto posizionando la tool nei primi sei probes dello strumento posizionati dal primo al sesto track.



Figura 4.5. Segnale ottenuto posizionando la tool negli ultimi sei probes posizionati dal settimo al dodicesimo track.

Si è prima proceduto applicando un filtro a densità media (ND filter), comunemente impiegato in fotografia per ridurre l'intensità luminosa, poiché analizzando il segnale proveniente dal tape verde non filtrato si vede che esso satura il rilevatore del canale 1, come indicato in Figura 4.6. Esso inoltre non è rilevato da altri canali. Volendo utilizzare tape di differenti colori per analizzare i sei differenti canali, si è proceduto con l'utilizzo del filtro sopracitato.



Figura 4.6. Segnale proveniente dal canale 1 utilizzando il tape verde non filtrato: satura il rilevatore del canale.

I cinque colori diversi dei tape filtrati producono segnali ottici di buona intensità che possono essere misurati con accuratezza. In particolare, i tape Green e Yellow hanno caratteristiche ottiche molto simili in quanto producono un segnale di notevole intensità sul canale 1. Il tape Green produce un segnale utile solo sul canale 1, mentre quello Yellow si estende anche al canale 2. Poiché esso non è rilevato da altri canali, per il canale 2 si sceglie di utilizzare il tape Yellow. Il tape Orange produce una risposta a lunghezze d'onda superiori ed è significativa sul canale 2 e sul canale 3. Poiché produce un segnale con fluorescenze superiori nel canale 3, è utilizzato per questo canale. Il tape Red2 produce una risposta sia sul canale 3 che sul canale 4, mentre il tape Red1 sul canale 4 e sul canale 5. Affinché ad ogni canale corrisponda un colore, il primo è utilizzato per il canale 4 e il secondo per il canale 5. Nessun tape fluorescente stimola in modo significativo il sesto rilevatore, poiché ha una lunghezza d'onda di rilevazione spinta verso l'infrarosso, posta all'estremità dello spettro visibile.

Nelle figure sottostanti (Figura 4.7 Figura 4.8 Figura 4.9 Figura 4.10 e Figura 4.11) sono mostrati i segnali rilevati da ciascun canale utilizzando i diversi tape fluorescenti. Il canale scelto per ciascuno è posto in evidenza in grassetto.



Figura 4.7. Fluorescenza emessa dal tape Green e rilevata da tutti e i sei canali. È stato scelto il canale 1.



Figura 4.8. Fluorescenza emessa dal tape Yellow e rilevata da tutti e i sei canali. È stato scelto il canale 2.



Figura 4.9. Fluorescenza emessa dal tape Orange e rilevata da tutti e i sei canali. È stato scelto il canale 3.



Figura 4.10. Fluorescenza emessa dal tape Red2 e rilevata da tutti e i sei canali. È stato scelto il canale 4.



Figura 4.11. Fluorescenza emessa dal tape Red1 e rilevata da tutti e i sei canali. È stato scelto il canale 5.

In ambiente Matlab si isolano i picchi corrispondenti a ciascun probe tramite la funzione *"findpeaks"*. Essi sono normalizzati rispetto al picco del segnale della fibra di loop, essendo quest'ultimo utilizzato anche dal sistema come riferimento per le analisi dei segnali fluorescenti emessi dai fluorofori durante la PCR. A tal proposito, l'analisi dei segnali

provenienti dalla fibra di loop ha permesso di osservare una notevole differenza tra i diversi rilevatori ottici. In particolare, il rilevatore del terzo canale genera un segnale notevolmente più ampio delle altre (Figura 4.12)



Figura 4.12. Segnali provenienti dalla fibra di loop per ciascun canale.

Prima di indagare le prestazioni del sistema tool – tape nell'analizzare lo stato di degrado della parte ottica, si esamina la ripetibilità delle sue prestazioni in termini di segnale fluorescente emesso. Si prendono in considerazione possibili differenze dei segnali rilevati a causa di instabilità sia del tape, che della fixture metallica. Si analizza un solo colore per volta a partire dal tape verde filtrato. Essendo rilevato dal primo canale, nella prima parte si analizzeranno i segnali provenienti solo da questo canale.

Le due tools sono state distinte in Tool 1 e Tool 2 marcandole con un segno nero come mostrato in Figura 4.13 e per ciascuna è stato definito un verso:

- verso sinistro: triangolo in alto a sinistra;
- verso destro: triangolo in basso a destra.



Figura 4.13. Schematizzazione delle due tools. A sinistra, le due tools nel verso sinistro e a destra le due tools nel verso destro.

Le prove sono state eseguite su una stessa apparecchiatura ELITe InGenius con un numero di cicli di vita dei probes ottici pari a 17 mila. Sono state utilizzate entrambe le tools e 4 tape verdi diversi, chiamati "Tape G", "Tape G1", "Tape G2" e "Tape G3".

Durante le prove è stata utilizzata una sola tool per volta: per analizzare tutti e dodici i probes ottici è stato necessario posizionarla nei primi sei tracks per poi rimuoverla e riposizionarla nei successivi tracks. In questo modo sono necessari almeno due segnali per valutare tutti e dodici i probes ottici, indicati in Figura 4.14: in blu quello comprendente i primi sei tracks e in rosso quello comprendente i successivi.



Figura 4.14. Esempio di scansione. Canale 1. Sono raffigurate sovrapposte la scansione comprendente i primi sei probes (blu) e quella comprendente i successivi sei probes (in rosso).

Per ogni prova dai due segnali si isolano i dodici picchi corrispondenti a ciascun probe, come detto in precedenza, e si normalizzano rispetto al picco del segnale proveniente dalla fibra di loop. Per confrontare le diverse prove e valutare l'eventuale instabilità di emissione della

fluorescenza da parte del sistema tool – tape, il modello di calcolo utilizzato è quello probabilistico del calcolo dell'incertezza [15]. Esso si basa sull'ipotesi che il misurando possa essere modellizzato come una variabile aleatoria. Ogni misura è una realizzazione del processo aleatorio. Per valore di misura si considera la media della variabile, mentre come incertezza la deviazione standard della media.

L'equazione 4.1 è il calcolo della media empirica (inteso come valore di misura):

$$\overline{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} x_i$$
 Equazione 4.1

mentre l'equazione 4.2 è la deviazione standard intesa come scarto di tipo empirico della media:

$$u_x^T = \sigma_{\overline{x}} = \sqrt{\frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^N (x_i - \overline{x})^2}$$
 Equazione 4.2

In questa analisi si considera come misura il valore del picco normalizzato corrispondente a ciascun probe, mentre come misura di instabilità di emissione del sistema tool - tape la deviazione standard percentuale tra i picchi rilevati da ciascun probe nelle prove consecutive. Si sceglie per ogni caso analizzato in seguito quella massima tra i dodici probes perché non avendo un dataset esteso si preferisce sovrastimare l'instabilità ponendosi nel caso peggiore. Per calcolarla, considerando le prove eseguite, si utilizza l'equazione 5.1:

$$\sigma_i \% = \frac{\sigma_i}{Max_i} * 100$$
 Equazione 4.3

dove i = 1, 2, ..., 12 corrisponde ai dodici probes e Max_i è il valore massimo fra tutti i picchi nella prova in analisi.

4.1. Discussione dei risultati

Il primo test eseguito prevede l'esecuzione di cinque scansioni consecutive senza rimuovere la tool, per valutare in queste condizioni la stabilità di emissione della fluorescenza da parte del sistema tool – tape.

Il segnale proveniente dalla fibra di loop nelle cinque scansioni non ha un valore costante, ma differisce tra una scansione e l'altra di una deviazione standard dello 0,19 %, equivalente a circa

4,27 LSB su un picco medio di circa 2243 LSB. Seppur piccola e non potendolo considerare costante, i segnali successivamente analizzati saranno normalizzati rispetto al segnale del loop della scansione ad essi corrispondente.

Le cinque scansioni presentano una variabilità, riportata nelle Figura 4.15 e Figura 4.16. In esse è rappresentato il segnale medio +/- la deviazione standard delle 5 scansioni corrispondenti al probe posizionato nel primo track (si è preso in esame il caso peggiore), ottenuto isolando un range da 250 a 650 di 5200 campioni totali di ogni scansione.



Figura 4.15. Media delle cinque scansioni del segnale del probe posizionato nel primo track +/- la deviazione standard.



Figura 4.16. Zoom della media delle cinque scansioni del segnale del probe posizionato nel primo track +/la deviazione standard.

I cinque valori del primo picco normalizzati presentano una deviazione standard dello 0,0085 su un picco medio di 4,483 (circa lo 0,19 %).

Le differenti scansioni sono state confrontate in ambiente Excel tramite un test ANOVA a un fattore. L'ipotesi nulla prevede che le distribuzioni di tutti i picchi tra scansioni differenti siano statisticamente uguali, ossia abbiano media uguale. È stato utilizzato un livello di significatività pari al 5 % e i risultati del test sono riportati in Tabella 4.1. Il test conferma l'ipotesi nulla con un valore di p-value prossimo a 1, pertanto le cinque scansioni sono statisticamente uguali.

Tabella 4.1. Risultato del test ANOVA a un fattore utile a confrontare le cinque scansioni successive.

| | Varianza | | P-Value |
|-----------|----------|-----|----------------|
| Risultato | 0,001709 | 0,5 | 0,999829 |

È pertanto possibile definire stabile il sistema tool – tape nell'emettere la fluorescenza senza modificare alcuna condizione della prova.

Sono state successivamente eseguite sei diverse tipologie di prove, distinte nella parte successiva in sei casi differenti.

In tutte le prove da ora in avanti i picchi considerati sono normalizzati per il picco corrispondente al segnale della fibra di loop.

CASO 1: Prove consecutive nelle stesse condizioni.

Durante le prove la tool è stata posizionata nei probes consecutivamente per diverse volte senza cambiarne mai il verso, né il tape all'interno. È stata utilizzata la tool 1 nel verso sinistro con il tape "G" posizionato al suo interno.

Si confrontano le fluorescenze rilevate da parte dello strumento tra le prove consecutive, senza quindi modificare altre condizioni.

Per quanto riguarda il segnale proveniente dalla fibra di loop, esso non è perfettamente stabile

tra le diverse prove: ha una deviazione standard percentuale dello 0,14 % (Figura 4.17 e Figura 4.18).



Figura 4.17. Media dei segnali corrispondenti alla fibra di loop nelle prove consecutive. È indicata anche la deviazione standard tra i picchi.



Figura 4.18. Zoom della Figura 4.17.

Analizzando i picchi dei segnali rilevati da ciascun probe nelle prove consecutive, nella Figura 4.19 sono indicate le deviazioni standard percentuali calcolate come citato in precedenza per ogni probe. Con un asterisco rosso è indicata la deviazione standard percentuale massima tra tutte.



Figura 4.19. Deviazioni standard percentuali tra i picchi corrispondenti a ciascun probe nel caso di prove consecutive senza modificare alcuna condizione.

Si considera quindi come misura di instabilità di emissione della fluorescenza da parte del sistema tool – tape utilizzato nelle condizioni sopra indicate la deviazione standard percentuale massima: circa lo 0,45 %.

CASO 2: Cambio del verso della tool.

Si confrontano le fluorescenze emesse al cambio del verso di utilizzo di entrambe le tool senza modificare il tape, ma semplicemente ruotando la tool di 180°. Sono state eseguite diverse prove utilizzando la tool prima nel verso sinistro e poi in quello destro con il tape "G" inserito la suo interno in modo stabile.

Si è proceduto come per il caso 1.

In Figura 4.20 sono rappresentate le deviazioni standard percentuali tra i picchi per ciascuno dei dodici probes riguardanti la tool 1 al cambio del verso di utilizzo. Nell'ultima colonna è stata inserita quella del loop.



Figura 4.20. Deviazioni standard percentuali tra i picchi corrispondenti a ciascun probe nel caso di prove consecutive eseguite cambiando il verso di utilizzo della tool 1 tra una prova e la successiva.

Successivamente alle prove eseguite con la prima tool, si è inserito lo stesso "Tape G" nella seconda tool, prestando attenzione a non modificarne il verso di inserimento. In Figura 4.21 sono riportati i dati relativi alla tool 2.



Figura 4.21. Deviazioni standard percentuali tra i picchi corrispondenti a ciascun probe nel caso di prove consecutive eseguite cambiando il verso di utilizzo della tool 2 tra una prova e la successiva.

Durante le prove effettuate con la tool 2 si nota un aumento della deviazione standard del loop: esso mostra una instabilità anomala rispetto al caso della tool 1, dove per altro si sono avute percentuali di deviazioni standard maggiori.

Si considera comunque come misura di instabilità di emissione massima una deviazione standard percentuale del 5 %, ipotizzando di utilizzare la stessa tool con lo stesso tape, ma non tenendo conto del suo verso.

CASO 3. Confronto tra tool diverse

Per valutare eventuali differenze meccaniche tra le due tool si confrontano le fluorescenze rilevate dallo strumento utilizzando prima la tool 1 e successivamente la tool 2. Il "tape G" è stato inserito nello stesso verso prima in una tool e poi nell'altra. Entrambe sono state utilizzate nel verso sinistro.

Dalle prove è stata calcolata una deviazione standard percentuale massima tra i picchi dell'1 % (Figura 4.22).



Figura 4.22. Deviazioni standard percentuali tra i picchi corrispondenti a ciascun probe nel caso di prove consecutive eseguite modificando la tool utilizzata ma non il tape, né il verso dello stesso.

CASO 4. Rimozione e riposizionamento del tape nello stesso verso

Per andare a valutare quanto il tape sia stabile si sono confrontate le fluorescenze ottenute da prove consecutive in cui il "Tape G" è stato rimosso e riposizionato all'interno della

stessa tool senza modificarne mai il verso, né della tool, né del tape.

Dalle prove è stata calcolata una deviazione standard percentuale massima tra i picchi dell'1,2 % (Figura 4.23).



Figura 4.23. Deviazioni standard percentuali tra i picchi corrispondenti a ciascun probe nel caso di prove consecutive eseguite rimuovendo e riposizionando il tape all'interno della tool, ma non modificandone il verso di inserimento.

CASO 5. Cambio del verso di inserimento del tape

Successivamente il "Tape G" è stato rimosso e riposizionato nel verso opposto tra prove consecutive per valutare la sua stabilità di emissione di fluorescenza lungo la sua estensione: è importante che il tape emetta la stessa fluorescenza in ogni porzione. È stata utilizzata la tool 2 senza modificarne il verso durante il suo utilizzo.

Le prove hanno dimostrato una deviazione standard percentuale massima tra i picchi del 6,7 % (Figura 4.24).



Figura 4.24. Deviazioni standard percentuali tra i picchi corrispondenti a ciascun probe nel caso di prove consecutive svolte invertendo il verso di inserimento del tape nella tool.

CASO 6. Confronto tra tape diversi

Si sono confrontati per ultimo quattro tape verdi diversi: "Tape G", "Tape G1", "Tape G2" e "Tape G3". Durante le prove è stata utilizzata la tool 2 senza mai cambiarne il verso, ma inserendo uno per volta i quattro tape verdi.

Le prove hanno dimostrato una deviazione standard percentuale massima tra i picchi del 7,5 % (Figura 4.25).



Figura 4.25. Deviazioni standard percentuali tra i picchi corrispondenti a ciascun probe nel caso di prove consecutive eseguite sostituendo il tape inserito all'interno della tool.

Analizzando solamente le deviazioni standard percentuali massime per ogni caso preso in esame in precedenza si nota come prima cosa che esse non sono posizionate sempre nello stesso track, ma la loro posizione varia tra le prove. Pertanto, l'instabilità può essere imputata al sistema tool – tape e non al probe. Inoltre, sono posizionate quasi per ogni caso nel track a cui corrisponde il foro iniziale o finale dalla tool, ossia dai fori laterali della tool viene emesso un segnale fluorescente maggiormente instabile rispetto ai fori posti nella parte centrale.

Ad ogni modo analizzando le deviazioni standard percentuali massime per ogni caso, indicate Figura 4.26, è evidente che ciò che introduce maggiore variabilità nei segnali rilevati dai probes durante le prove è il tape.



Figura 4.26. Deviazione standard percentuale massima tra i picchi per ogni caso sopra analizzato.

Il caso 1 presenta le deviazioni standard percentuali inferiori (< 0.5 %): durante le prove la tool è stata solo rimossa e riposizionata senza cambiare né il verso della stessa, né il tape. Mentre nel caso 2 dove sono state solamente ruotate le tool di 180°, la deviazione standard percentuale è maggiore. Ruotando la tool si ruota anche il tape al suo interno, pertanto gli stessi probes si interfacciano con due diverse porzioni di tape. Rimuovere e ruotare il tape (caso 5) o addirittura utilizzare dei tape differenti (caso 6), porta ad una deviazione standard attorno al 7 %.

Nei casi 3 e 4 invece le deviazioni standard percentuali sono basse e simili (< 1,5 %): nel caso 3 si utilizzano due tool diverse per lo stesso tape inserito nello stesso verso, nel caso 4 il tape è stato solo rimosso e riposizionato, ma non ne è stato modificato il verso. Alla luce dei risultati si può dire che nel caso 3 la maggiore variabilità è introdotta dal tape e non dalla tool, poiché

nonostante sia stato rimosso dalla prima tool e accuratamente riposizionato nella seconda senza cambiarne il verso, in ogni foro delle due tool non è possibile posizionare la stessa esatta porzione di tape, allo stesso modo del caso 4 dove è stato rimosso e riposizionato nella stessa tool.

È quindi evidente che lo stesso tape emette fluorescenze diverse nelle differenti porzioni ed è quindi ovvio che utilizzando tape diversi le fluorescenze emesse siano diverse.

Analisi dei tape di colore differente

Alla luce dei risultati ottenuti utilizzando il tape verde filtrato, nelle modalità sopra descritte, si sono analizzati anche gli altri quattro tape di diversi colori, anche essi filtrati:

- Yellow (giallo), rilevato dal canale 2;
- Orange (arancione), rilevato dal canale 3;
- Red2 (tonalità di rosso), rilevato dal canale 4;
- Red1 (tonalità di rosso), rilevato dal canale 5.

È stata utilizzata in tutte le prove solamente una tool nel verso sinistro e per ogni colore si sono analizzati tre tape diversi. Non si sono confrontate né le fluorescenze rilevate al cambio del verso della tool, né le stesse rilevate utilizzando le due tool con lo stesso tape, in quanto come si è visto in precedenza ciò che introduce maggiore variabilità è il tape.

Il primo test con i tape di colori differenti prevede la rotazione di 180 ° del tape all'interno della tool, mentre nel secondo test si analizzano le fluorescenze emesse da tre tape diversi per ogni colore.

In Figura 4.27 sono indicate le deviazioni standard percentuali massime al cambio del verso del tape per ciascun colore. Si nota che i tape più instabili sono quelli rossi, mentre quelli meno instabili il giallo e l'arancione.



Figura 4.27. Confronto deviazioni standard percentuali massime tra i picchi di fluorescenza emessa al cambio del verso del tape per ciascun colore.

La Figura 4.28 presenta le deviazioni standard percentuali massime tra i picchi confrontando le fluorescenze emesse da tre tape diversi per ogni colore. La figura mostra un andamento opposto alla precedente, risultando i tape arancioni e gialli quelli meno stabili.



Figura 4.28. Confronto deviazioni standard percentuali massime tra i picchi di fluorescenza emessa da tape diversi per ciascun colore.

Alla luce dei risultati finora riportati si è ipotizzato che l'instabilità di emissione della fluorescenza da parte dei tape potesse essere dovuta alla presenza dei filtri di attenuazione. Per questo motivo si sono ripetute le stesse prove nelle stesse condizioni, ma utilizzando dei tape senza il filtro. (Come dimostrato in precedenza non è possibile utilizzare il tape di colore verde

in quanto satura il rilevatore del canale 1).

Le deviazioni standard percentuali massime rilevate tra i probes per ciascun tape di diverso colore, filtrato e non filtrato, sono riportate in Tabella 4.2. Anche quelli non filtrati sono instabili con deviazioni standard percentuali in alcuni casi superiori e in altri inferiori dei corrispettivi filtrati. Pertanto, non è il filtro a introdurre la variabilità tra i segnali di fluorescenza, ma la natura del tape stesso.

Tabella 4.2. Deviazioni standard percentuali massime tra i dodici picchi per ciascun tape di diverso colore, filtrato e non filtrato. Il primo test prevede la rotazione di 180° del tape e il secondo l'utilizzo di tape diversi.

| | | Green | Yellow | Orange | Red2 | Red1 |
|------------|--------------|-------|--------|--------|-------|-------|
| Cambio del | Con filtro | 6,72 | 2,99 | 3,52 | 11,08 | 9,15 |
| verso | Senza filtro | / | 5,64 | 6,22 | 13,77 | 6,98 |
| Таре | Con filtro | 7,42 | 11,12 | 15,49 | 7,79 | 3,27 |
| differenti | Senza filtro | / | 12,05 | 16,64 | 12,30 | 12,96 |

Alla luce dei risultati ottenuti non è possibile indagare le prestazioni dei sei canali nel tempo: essendo i tape instabili nell'emettere la fluorescenza nella loro estensione, non ha senso confrontare due segnali provenienti da canali diversi, ottenuti utilizzando tape di differente colore. La variabilità imputabile ai tape sarebbe troppo elevata da distinguere un degrado dei canali.

A seguito di ciò, per indagare lo stato di degrado dei soli probes ottici è necessario un tape di un solo colore. Per consentire la misurazione accurata dell'intensità dei segnali per rilevare un eventuale deterioramento dei probes, nelle prove successive verrà utilizzato solamente il tape verde dotato di filtro. Infatti, il segnale generato è più elevato rispetto agli altri colori e quindi misurabile con una migliore accuratezza.

Comunque, anche a posteriori di queste accortezze, è bene sottolineare che a causa dell'instabilità del tape, che emette fluorescenze differenti nelle sue diverse porzioni, all'interno della stessa prova non si possono confrontare le prestazioni di probes posti in tracks diversi: la

differente fluorescenza rilevata non può essere ricondotta solamente a un diverso degrado dei probes, ma anche alla natura del tape stesso.

Tenendo conto delle varie condizioni di utilizzo sopra elencate del sistema tool – tape da parte del tecnico è indispensabile prendere in considerazione le instabilità delle fluorescenze emesse dal tape intese come deviazioni standard percentuali tra i picchi e indicate in Tabella 4.3. Esse rappresentano delle soglie: per considerare due segnali differenti a causa di un effetto di degrado del probe ottico la differenza dei due picchi in termini di deviazione standard percentuale deve essere superiore alla soglia imposta in base all'utilizzo del sistema tool – tape.

Tabella 4.3. Tabella contenente le informazioni circa le diverse condizioni di utilizzo del sistema tool – tape. Ad ognuno corrisponde una deviazione standard percentuale tra i picchi del segnale fluorescente impostata come soglia per definire due segnali diversi nelle diverse condizioni di utilizzo.

| | Dev. Std % |
|---|------------|
| Prove consecutive nelle stesse condizioni | 0,45 % |
| Cambio del verso della tool | 5 % |
| Confronto tra tool diverse | 1 % |
| Rimozione e riposizionamento del tape | 1,2 % |
| Cambio del verso di inserimento del tape | 6,7 % |
| Confronto tra tape diversi | 7,5 % |

Nelle successive analisi sarà comunque sempre utilizzata una sola tool senza mai modificarne il verso, all'interno della quale è posto un tape verde filtrato e fisso. Questo consente di ridurre al minimo le variazioni di segnale rilevato dovute all'instabilità di emissione della fluorescenza da parte del tape. Pertanto, successivamente per definire diversi due segnali in termini di degrado sarà utilizzata come soglia una deviazione standard percentuale tra i due picchi dello 0,45 %.

4.2. Correlazione tra fluorescenza e potenza ottica

Per quanto riguarda le misure di potenza ottica analizzate nel Capitolo 3, prima della rimozione dei probes ottici dal sistema ELITe InGenius avente un numero di cicli di vita pari a un milione è stata eseguita una prova con il sistema tool – tape. È stato utilizzato nelle condizioni sopracitate e i segnali di fluorescenza rilevata sono utili per un confronto con le potenze ottiche.

Nella Figura 4.29 è mostrato l'andamento delle potenze ottiche misurate dalle fibre (nera e gialla) appartenenti a ciascun probe e l'andamento dei picchi di fluorescenza rilevati utilizzando la tool contenente il tape verde. Il punto di minimo al nono track indicato in rosso è lo stesso sia per le potenze, che per le fluorescenze. C'è quindi una coerenza tra le potenze ottiche misurate e le fluorescenze rilevate, ma solamente nei probes usurati e avente un'eccessiva ridotta trasmittanza.



Figura 4.29. Correlazione tra le potenze ottiche misurate dalle due fibre di ciascun probe e le fluorescenze rilevate dagli stessi aventi un milione di cicli di vita nelle due tipologie di metodi presentati.

Capitolo 5. Analisi delle prestazioni di Sistemi ELITe InGenius differenti

Come si è visto nel capitolo precedente, il sistema tool – tape presenta una sua variabilità intrinseca nei segnali emessi che è possibile ridurre utilizzando sempre la stessa tool con un tape verde fisso all'interno, senza mai modificarne il verso.

È indispensabile valutare anche le prestazioni della parte ottica di differenti sistemi ELITe InGenius per indagare una possibile variabilità nella rilevazione dei segnali fluorescenti. Per fare ciò si considerano diverse apparecchiature a inizio vita, quando non hanno eseguito nessun test di Real Time PCR e i probes hanno un numero di cicli di vita pari a zero. Pertanto, è possibile considerare un livello di usura dei probes ottici nullo.

A tale scopo si analizzano i segnali delle fluorescenze rilevate dal canale 1 da tre sistemi ELITe InGenius differenti, tutti e tre mai utilizzati, utilizzando una sola tool nel verso sinistro con il tape verde filtrato inserito all'interno.

L'ipotesi iniziale prevede che i probes posizionati nello stesso track delle tre apparecchiature rilevino gli stessi segnali di fluorescenza e che la variabilità tra di essi sia riconducibile alla sola variabilità del sistema di emissione, fissata a una deviazione standard percentuale massima tra i picchi dello 0,45 %.

Come mostrato in Figura 5.1, i segnali grezzi³ mostrano delle differenze.

³ Segnale grezzo: segnale non normalizzato rispetto al segnale rilevato dalla fibra di loop.



Figura 5.1. Sovrapposizione dei tre segnali grezzi delle fluorescenze rilevate da ciascuno dei dodici probes delle tre diverse apparecchiature ELITe InGenius. Il tredicesimo picco di ogni segnale corrisponde al segnale rilevato dalla fibra di loop.

Il segnale corrispondente alla fibra di loop utilizzata come riferimento nelle tre apparecchiature analizzate non è uguale, come indicato in Figura 5.2. I segnali si discostano tra di loro dell'8,22 % (deviazione standard percentuale): percentuale di gran lunga superiore a quella calcolata nel Capitolo 4 dove si è analizzata la variabilità di emissione del sistema tool - tape.



Figura 5.2. Sovrapposizione dei tre segnali rilevati dalla fibra al loop delle tre apparecchiature analizzate.

Sono state calcolate per ciascuna apparecchiatura in analisi la media dei dodici picchi dei segnali di fluorescenza grezzi rilevati da ciascun probe ottico e le deviazioni standard tra di essi, indicate in Tabella 5.1.

| InGenius | Fluorescenza media (LSB) | Deviazione standard (LSB) |
|------------|-----------------------------|------------------------------|
| InGenius 1 | 12883,3 | 1061,7 |
| InGenius 2 | 12465,6 | 1141,3 |
| InGenius 3 | 11244,3 | 477,7 |

Tabella 5.1. Media e deviazioni standard dei picchi dei segnali di fluorescenza grezzi rilevati dai dodici probes per ognuna delle apparecchiature ELITe InGenius in analisi.

Attraverso un test di ANOVA a un fattore si dimostra che i tre gruppi di picchi di fluorescenza dei segnali grezzi sono statisticamente differenti. Infatti, il test rigetta l'ipotesi nulla che le medie siano uguali con un valore di p-value (Tabella 5.2) inferiore allo 0,000449, considerando un livello di significatività pari a 0,05.

Tabella 5.2. Risultati del test ANOVA a un fattore per indagare se i tre gruppi di picchi di fluorescenza dei segnali grezzi corrispondenti alle tre apparecchiature in analisi sono statisticamente uguali o differenti.



Alla luce di questi risultati è bene ricordare che la fibra di loop è utilizzata proprio al fine di ridurre questa variabilità tra apparecchiature differenti. Per questo si considerano i picchi di fluorescenza dei segnali rilevati da ciascun probe delle tre apparecchiature normalizzati rispetto al picco del segnale della fibra di loop a loro corrispondente. Si è calcolata la media complessiva e la deviazione standard tra i picchi normalizzati per ogni apparecchiatura, entrambe indicate in Tabella 5.3 assieme ai valori corrispondenti al picco del segnale della fibra di loop (in LSB). Alle tre apparecchiature corrisponde una media e una deviazione standard tra i picchi diverse, ma dello stesso ordine di grandezza.

Tabella 5.3. Media e deviazioni standard dei picchi di fluorescenza normalizzati dei segnali rilevati dai dodici probes per ognuna delle apparecchiature ELITe InGenius in analisi. È indicato anche il picco del segnale corrispondente alla fibra di loop (in LSB)

| InGenius | Fluorescenza | Deviazione | Loop |
|------------|--------------|------------|-------|
| | media | standard | (LSB) |
| InGenius 1 | 2,600 | 0.215 | 4955 |
| InGenius 2 | 2,686 | 0.245 | 4641 |
| InGenius 3 | 2,711 | 0.114 | 4147 |

Attraverso un test ANOVA a un fattore, condotto imponendo un livello di significatività pari al 5 %, si accetta l'ipotesi nulla secondo cui i tre gruppi di picchi di fluorescenze normalizzate siano statisticamente uguali, con un valore di p-value di 0,369 superiore al livello di significatività. Pertanto, ogni strumento rileva dei segnali di fluorescenza normalizzati per il segnale della fibra di loop statisticamente uguali, utilizzando la stessa tool nello stesso verso con lo stesso tape verde. Questo risultato conferma il fatto che sia necessario normalizzare i segnali.

Per il test è indicato anche l'indicatore statistico detto varianza MQ: è il quadrato della deviazione standard. Più precisamente è indicata quella all'interno di ciascun gruppo di picchi di fluorescenze (intra) e quella tra i diversi gruppi (inter). La varianza tra i diversi gruppi è superiore, ma le due differiscono solamente dello 0,001. I probes ottici infatti non sono mai stati utilizzati e i segnali di fluorescenza rilevata dipendono in misura minore dallo strumento in cui sono inseriti i probes. Il livello di usura è lo stesso per tutti i probes, più precisamente è nullo, e per questo motivo le prestazioni dei probes hanno bassa correlazione con l'apparecchiatura in cui essi sono posizionati.

Tabella 5.4. Risultati del test ANOVA a un fattore per indagare se i tre gruppi di picchi di fluorescenza normalizzati rispetto al picco del segnale rilevato dalla fibra di loop corrispondenti alle tre apparecchiature in analisi sono statisticamente uguali o differenti. È indicata anche la varianza tra i tre gruppi di picchi e quella all'interno degli stessi.

| | α | P-Value | MQ inter | MQ intra |
|-----------|------|----------------|----------|----------|
| Risultati | 0,05 | 0,369 | 0,041 | 0,040 |

Considerando che è stata utilizzata la stessa tool nello stesso verso con lo stesso tape fisso all'interno in tutte e tre le apparecchiature, ogni probe ottico corrispondente a uno specifico track si è interfacciato con il medesimo foro della tool e quindi con la stessa porzione di tape. Si è reputata stabile l'emissione di fluorescenza da parte del tape entro una deviazione standard percentuale dello 0,45 % per ciascun foro e quindi ciascun track.

Si sono calcolate le deviazioni standard percentuali tra i picchi di fluorescenza rilevati dai probes posti nello stesso track ma in apparecchiature differenti, normalizzati per il picco del segnale della fibra di loop. Per calcolarla si è proceduto come nelle analisi precedenti riguardanti la stabilità di emissione della fluorescenza da parte del sistema tool – tape. Il grafico mostrato in Figura 5.3 smentisce l'ipotesi iniziale secondo la quale apparecchiature differenti rilevano segnali di fluorescenza uguali entro il limite di stabilità del sistema di emissione. A conferma di ciò, nonostante i probes ottici siano a inizio vita, la deviazione standard percentuale è in ogni caso superiore alla soglia fissata a 0,45 %. Pertanto, non la si può considerare dovuta al tape, ma a differenze nella rilevazione dei segnali da parte di apparecchiature diverse.



Figura 5.3. Deviazioni standard percentuali tra i picchi dei segnali di fluorescenza normalizzati rispetto al picco del segnale della fibra di loop rilevati da probes di diverse apparecchiature ma posti nello stesso track.

Come per il calcolo dell'instabilità legata al sistema di emissione della fluorescenza (tool – tape), per l'analisi delle differenti prestazioni del sistema ottico dell'ELITe InGenius nel

Capitolo 5 - Analisi delle prestazioni di Sistemi ELITe InGenius differenti

rilevare i segnali di fluorescenza si utilizza come modello di calcolo quello probabilistico [15]. Per valore di misura si considera il valore del picco normalizzato per ciascun probe, mentre come misura delle differenti prestazioni dei sistemi ottici la deviazione standard percentuale tra i picchi rilevati dai probes posti nello stesso track ma in apparecchiature diverse. Si considera quella massima tra i diversi tracks, come nell'analisi precedente, pari a: $\sigma = 8,5 \%$. Essa comprende anche l'instabilità dovuta al sistema di emissione della fluorescenza, calcolata nel capitolo precedente tra prove consecutive eseguite senza modificare alcuna condizione:

infatti la tool è stata posizionata a contatto dei probes di ogni apparecchiatura e rimossa per essere spostata nelle differenti apparecchiature, ma non ne è stato cambiato né il verso né il tape inserito all'interno.

L'analisi di tale instabilità complessiva è utile quando si analizzano segnali provenienti da due o più sistemi ELITe InGenius differenti. Si deve tener conto che c'è un fattore di instabilità legato al sistema di emissione della fluorescenza, che cambia a seconda della modalità di utilizzo della tool, e un fattore legato alle differenti prestazioni dei sistemi di Real Time PCR. Per considerare diversi due segnali provenienti da due apparecchiature differenti, in termini di un diverso degrado del sistema ottico, la deviazione standard percentuale tra di loro deve essere superiore a quella indicata sopra e pari all'8,5 %.

(Tale instabilità rientra comunque nel limite fissato dall'azienda e pari al 10 %).

Capitolo 6. Analisi del Sistema ELITe InGenius nel tempo

Per valutare come variano nel tempo i segnali di fluorescenza rilevati dalla parte ottica del sistema ELITe InGenius nell'ottica di poterne misurare un degrado, si sono eseguite le stesse prove nel tempo sempre sulla stessa apparecchiatura a intervalli di sette giorni. Si è utilizzata la stessa tool senza mai modificare né il tape verde inserito all'interno, né il verso di inserimento della stessa nei probes. Per questo motivo si considera anche in questo capitolo come soglia di instabilità del sistema di emissione della fluorescenza una deviazione standard tra i picchi normalizzati dei segnali rilevati dallo stesso probe pari allo 0,45 %. Durante le prime due prove l'apparecchiatura aveva un numero di cicli di vita pari rispettivamente a 929 mila e 948 mila, ossia i probes avevano quasi raggiunto quello che per l'azienda è considerato il limite massimo di cicli che possono subire. Dopodiché è stata eseguita la manutenzione di secondo livello durante la quale i probes ottici sono stati sostituiti con dei nuovi mai utilizzati e si sono proseguite le prove una volta a settimana.

Si analizzano come variano nel tempo le fluorescenze rilevate dai probes per capire come cambiano le prestazioni degli stessi a causa dell'usura. Per ogni prova, dopo aver isolato i dodici picchi e averli normalizzati per il picco del segnale corrispondente alla fibra di loop, ne è stata calcolata la media e l'andamento di queste nel tempo è raffigurato in Figura 6.1. Il tempo è calcolato in numero di cicli dell'apparecchiatura. La linea tratteggiata indica che tra le due prove sono stati sostituiti i probes, pertanto le prove successive sono state eseguite su probes diversi. È importante sottolineare che ci sono dei casi isolati tra due prove consecutive in cui la deviazione standard percentuale tra i picchi di fluorescenza di uno stesso probe è inferiore al limite di stabilità del sistema di emissione. Per questo motivo si analizza la media complessiva.



Figura 6.1. Media dei dodici picchi dei segnali di fluorescenza normalizzati per il picco del segnale della fibra di loop nel tempo (indicato come numero di cicli del sistema ELITe InGenius). La linea tratteggiata indica che tra le due prove è stata eseguita la manutenzione di secondo livello e pertanto le prime due medie sono relative a probes diversi.

Il punto di minimo è rappresentato dalle fluorescenze rilevate dai probes ottici nuovi. Subito dopo la sostituzione e con l'aumento del numero cicli la fluorescenza aumenta in modo sostanziale già dopo le prime sessioni di Real Time PCR, raggiungendo un valore elevato nel punto indicato da un numero di cicli di vita pari a circa 27 mila. Dopodiché, la fluorescenza tende ad aumentare ma in misura ridotta. A fine vita invece i probes ottici rilevano segnali di fluorescenza superiori ai probes nuovi, ma simili ai probes aventi pochi cicli di vita.

Se si considera che in una sessione di Real Time PCR sono eseguiti circa 600 cicli, un'apparecchiatura avente 17 mila cicli significa che ha eseguito circa 28 sessioni di Real Time PCR. La durata di una sessione è di 90 minuti: in un laboratorio è possibile arrivare anche a 4 sessioni di PCR giornaliere. Dopo soli 7 giorni il segnale rilevato da un probe a inizio vita è pari a quello rilevato da un probe a fine vita.

È bene sottolineare, come si vede dal grafico, che la diminuzione in termini di deviazione standard percentuale tra i primi due punti (probes a fine vita) è dello 0,405 %, inferiore al limite di stabilità del sistema di emissione. Questo conduce al fatto che con il sistema tool – tape non si è in grado di distinguere un degrado a fine vita in un tempo ridotto.

Per analizzare la differenza delle prestazioni dei diversi probes all'interno della stessa prova, non potendo confrontare le fluorescenze rilevate da probes posti in tracks diversi, si considera come misura della variabilità la deviazione standard tra i picchi dei segnali di fluorescenza rilevati dai dodici probes all'interno della stessa prova. Come indicato in Figura 6.2, essa è
massima quando i probes ottici sono a fine vita: infatti durante le varie sessioni i probes ottici subiscono un degrado differente a causa del diverso grado di utilizzo degli stessi. Dalle informazioni ottenute dal team aziendale che utilizza le apparecchiature per eseguire i test di Real Time PCR durante gli stessi non vengono utilizzati sempre tutti i tracks, ma quelli iniziali e posti nella parte sinistra dell'apparecchiatura sono i più utilizzati (dal primo al sesto track). Al contrario la deviazione standard è minima quando i probes sono nuovi e in questo caso la differente fluorescenza rilevata è imputabile alla variabilità della fluorescenza emessa dal tape nelle sue diverse porzioni, se si considera che i probes nuovi dovrebbero idealmente avere tutti le stesse prestazioni. Successivamente alla sostituzione dei probes ottici, la deviazione standard tende ad aumentare per lo stesso meccanismo di differente utilizzo che porta ad un'usura differente.



Figura 6.2. Deviazioni standard tra i picchi dei segnali di fluorescenza (normalizzati rispetto al picco del segnale della fibra di loop) rilevati dai dodici probes per ciascuna prova nel tempo.

Alla luce delle diverse prestazioni dei probes posizionati nei tracks e delle stesse nel tempo, per indagare quale sia l'usura dei singoli probes si sono calcolate per ognuno due deviazioni standard percentuali. La prima, indicata in Figura 6.3. in blu, è la deviazione standard percentuale tra il picco di fluorescenza rilevato in uno specifico track dal probe a fine vita (949 mila cicli di vita) e quello rilevato nello stesso track dal probe appena sostituito. La seconda, indicata in arancione, è la deviazione standard percentuale tra il picco di fluorescenza rilevato in uno specifico track dal probe ottico nuovo e quello rilevato nello stesso track nell'ultima

prova a 63 mila cicli.

Nella grafico non si è tenuto conto del fatto che nel primo caso il segnale diminuisce per cui la differenza tra i due picchi è positiva, nel secondo caso il segnale subisce un aumento pertanto la differenza è negativa. La deviazione standard percentuale è in ogni caso raffigurata positiva (anche da definizione), poiché ciò di cui si tiene conto è il valore assoluto della variazione, indice di un diverso grado di utilizzo e di degrado del probe. È in ogni caso superiore al limite di stabilità del sistema di emissione, pertanto la si può imputare al probe e non alla variabilità del tape.



Figura 6.3. Per ognuno dei dodici tracks è raffigurata in blu la deviazione standard percentuale tra il picco di fluorescenza normalizzato e rilevato nella prova eseguita a 949 mila cicli di vita e il picco normalizzato relativo alla prova eseguita con i probes appena sostituiti. In arancione è raffigurata la stessa tra la prova eseguita con i probes nuovi e l'ultima prova a 63 mila cicli.

È interessante notare che mediamente le deviazioni standard percentuali delle prove a posteriori della sostituzione dei probes sono superiori. I probes ottici che presentano una variabilità nel segnale fluorescente rilevato maggiore sono quelli posti nei tracks iniziali: le prime tre deviazioni standard percentuali dei primi tre tracks relative alle prove effettuate a posteriori della sostituzione (arancione) sono le più elevate, in quanto sono i tracks più utilizzati.

Per quanto riguarda le deviazioni standard percentuali relative alle prove antecedenti alla sostituzione sono sì inferiori alle precedenti, ma mostrano lo stesso andamento da sinistra verso destra. Ci sono comunque degli outliers: i probes posizionati nei tracks 3, 5 e 10 hanno una deviazione standard tra i picchi di fluorescenza inferiore rispetto agli altri.

Alla luce di questi risultati è evidente che ci siano due effetti di usura dei probes che si sovrappongono e si compensano a vicenda. Uno è rilevante a inizio vita e porta a un'amplificazione graduale del segnale rilevato, l'altro è rilevante a fine vita e porta a una diminuzione dello stesso.

Per questo motivo, avendo analizzato come cambia la fluorescenza rilevata quando i probes sono sostituiti, è importante valutare anche come essa cambia quando viene eseguita la manutenzione di primo livello, durante la quale sono pulite le ball lenses di ogni probe per ridurre il livello di opacità. Nel grafico riportato in Figura 6.4 sono raffigurate le medie dei picchi normalizzati del segnale di fluorescenza rilevato dai dodici probes di quattro differenti prove eseguite in una stessa apparecchiatura. Nell'asse delle ascisse sono indicati il numero di cicli che l'apparecchiatura presentava al momento della prova. Tra la seconda e la terza prova i probes hanno subito la manutenzione di primo livello, indicata dalla linea tratteggiata. Tra le due prove la media diminuisce di circa il 24 %.

È quindi evidente che il segnale di fluorescenza aumenta nel tempo a causa dell'opacizzarsi delle ball lenses.



Figura 6.4. Media dei picchi del segnale di fluorescenza normalizzati rispetto al picco del segnale della fibra di loop in quattro prove consecutive eseguite sulla stessa macchina. Nelle ascisse è indicato il numero di cicli dei probes durante la prova. La linea tratteggiata tra la seconda e la terza prova indica che tra le due è stata eseguita la manutenzione di primo livello.

Per capire come cambi il segnale rilevato dai probes a seconda della posizione in cui essi si trovano nei tracks, si analizzano le stesse medie per ogni prova, ma dividendo i probes a gruppi

(Figura 6.5): i probes iniziali, posizionati nei tracks da 1 a 4, i probes centrali, posizionati nei tracks da 5 a 8 e i probes finali, posizionati nei tracks da 9 a 12. La linea tratteggiata indica che tra le due prove è stata eseguita la manutenzione di primo livello. È interessante notare che i probes posti nei tracks iniziali rilevano segnali di fluorescenza superiori, a discapito di quelli posti nei tracks finali che invece rilevano un segnale di fluorescenza inferiore a tutti.



Figura 6.5. Ogni punto indica la media dei quattro picchi del segnale di fluorescenza, normalizzati per il picco del segnale della fibra di loop, per ogni gruppo di probes (probes iniziali posizionati nei tracks da 1 a 4 in blu, probes centrali posizionati nei tracks da 5 a 8 in arancione e probes finali posizionati nei tracks da 9 a 12 in verde) nelle quattro diverse prove. Nell'asse delle ascisse è indicato il numero di cicli dell'apparecchiatura durante ciascuna prova. La linea tratteggiata tra la seconda e la terza prova indica che tra le due è stata eseguita la manutenzione di primo livello.

Alla luce di questi risultati è possibile affermare che l'effetto delle ball lenses opache porta ad un'amplificazione del segnale, effetto che è possibile diminuire pulendo le ball lenses contenute nei probes. Nonostante tale amplificazione il segnale a fine vita diminuisce.

Pertanto, è possibile distinguere due fattori di usura dei probes: uno legato alle ball lenses opache e uno legato all'usura della fibra stessa in termini di riduzione di trasmittanza. Nel primo caso la fluorescenza rilevata aumenta, probabilmente perché l'opacizzarsi delle ball lenses diffonde il raggio di fluorescenza emesso dal tape invece di focalizzarlo in un punto, risultando in un'amplificazione del segnale. Le prime sessioni di Real Time PCR dell'apparecchiatura sono significative e risentono maggiormente di quest'effetto. La riduzione della trasmittanza, significativa a fine vita, diminuisce la fluorescenza rilevato dai probes.

La risultante è una compensazione dei due effetti a vicenda.

È importante comunque sottolineare che nella Figura 6.1, dove sono indicate le medie dei dodici picchi normalizzati delle prove settimanali, la media corrispondente alle due prove a fine vita (primi due punti rossi nel grafico) è simile a quella delle prove in cui i probes hanno pochi cicli di vita. Le ball lenses dei probes con pochi cicli di vita sono opache, così come quelle dei probes a fine vita in misura maggiore, ma le fibre di questi ultimi hanno ridotta trasmittanza. La somma dei due contributi porta a una condizione in cui considerando un solo segnale di fluorescenza non è possibile distinguere se esso è rilevato da un probe a fine vita, che ha ridotta trasmittanza, o da un probe a inizio vita che risente in misura ridotta dell'effetto di diffusione. Questo poiché non è possibile misurare separatamente i due effetti opposti.

Non avendo a disposizione dati di una stessa apparecchiatura che ricoprano tutto l'arco di vita dei probes per mancanza di tempo, si considerano di seguito 9 sistemi ELITe InGenius differenti aventi cicli di vita ordinati in ordine crescente a intervalli di circa 100 mila cicli. Essendo apparecchiature differenti si considera come soglia per condurre un'analisi in termini di usura dei probes una deviazione standard percentuale tra i picchi normalizzati superiore all'8,5 %.

L'andamento delle medie nel tempo (calcolate come per la Figura 6.1) è mostrato in Figura 6.6. Il grafico presenta un picco a circa 106 mila cicli; successivamente la media decresce all'aumentare dei cicli fino a un punto di minimo a circa 869 mila cicli, con conseguente aumento verso fine vita.



Figura 6.6. Media dei dodici picchi dei segnali di fluorescenza normalizzati per il picco del segnale della fibra di loop per ogni apparecchiatura considerata a un determinato numero di cicli, indicato sull'asse delle ascisse in ordine crescente da inizio vita a fine vita.

Questo andamento è dovuto al fatto che annualmente si esegue la pulizia delle ball lenses, portando il segnale rilevato a diminuire a causa della ridotta diffusione del raggio di fluorescenza. La manutenzione non è fissata a un dato livello di cicli di vita, pertanto apparecchiature diverse subiscono la manutenzione a diversi cicli di vita.

Inoltre, non è possibile confrontare in termini di differente usura le sei apparecchiature adiacenti in Figura 6.6 aventi un numero di cicli di vita compreso tra 242 mila e 949 mila, essendo le medie dei picchi diverse tra di loro di una quantità in termini di deviazione standard percentuale inferiore al limite fissato e pari a 8,5 %, come indicato in Figura 6.7. Il grafico mostra le deviazioni standard percentuali tra le medie dei picchi dei segnali di fluorescenza tra due apparecchiature adiacenti in Figura 6.6: la prima blu indica la deviazione standard percentuale tra la media dell'apparecchiatura avente 0 cicli di vita e quella dell'apparecchiatura avente 51 mila cicli e quella dell'apparecchiatura avente 106 mila cicli, e così via. La linea rossa indica la soglia.



Figura 6.7. Deviazione standard percentuale tra le medie dei picchi di fluorescenza di due sistemi ELITe InGenius adiacenti in Figura 6.6. La linea rossa indica la soglia fissata e pari all'8,5 %.

Alla luce di questi risultati le differenti prestazioni delle apparecchiature, i diversi fattori di usura che si compensano, uniti agli effetti della manutenzione di primo livello, conducono a un importante limite: non si possono analizzare sistemi ELITe InGenius differenti a intervalli di cicli di vita pari o inferiori a 100 mila cicli, in quanto l'instabilità dovuta al sistema di emissione sommata a quella intrinseca dell'apparecchiatura è troppo elevata. Questo rende inutile ulteriori analisi.

Come evidenziato in precedenza le due manutenzioni incidono parecchio sulla fluorescenza rilevata dai probes ottici. Pertanto, è interessante analizzare come varia il segnale rilevato subito prima e subito dopo le stesse.

6.1. Manutenzione di primo livello

Per valutare gli effetti della manutenzione di primo livello si sono eseguite due prove utilizzando la stessa tool nello stesso verso e senza cambiare il tape, una antecedente alla manutenzione e una subito dopo la stessa in un sistema ELITe InGenius avente un numero di cicli di vita pari a 106 mila. Pertanto, durante la prima prova i segnali di fluorescenza sono rilevati dai probes ottici aventi le ball lenses opache, mentre nella seconda prova le ball lenses sono pulite. I due segnali grezzi pre – manutenzione (Figura 6.8 in blu) e post – manutenzione (Figura 6.8 in rosso), come evidenziato dall'immagine in cui sono raffigurati sovrapposti, sono diversi. È evidente che i probes contenenti le ball lenses opache rilevano segnali di fluorescenza superiori in tutti i casi, confermando quanto detto in precedenza sull'effetto diffusivo delle ball lenses opache.



Figura 6.8. Sovrapposizione dei due segnali grezzi delle fluorescenze rilevate da ciascun probe ottico nella prova pre – manutenzione di primo livello (in blu, le ball lenses dei probes sono opache) e nella prova post – manutenzione (in rosso, le ball lenses sono state pulite). Il tredicesimo picco per ciascuna prova corrisponde al segnale rilevato dalla fibra di loop.

I picchi dei due segnali rilevati dalla fibra di loop nelle due prove, come indicato nelle Figura 6.9 e Figura 6.10, differiscono di una deviazione standard percentuale dello 0.3019 %: corrisponde a circa 8,34 LSB su un picco medio di circa 2760 LSB. Quello relativo alla prova post – manutenzione è di valore inferiore rispetto a quello della prova antecedente, in accordo con le fluorescenze rilevate dai probes. Alla luce della variazione infinitesima può essere considerato costante.



Figura 6.9. Sovrapposizione dei due segnali rilevati dalla fibra di loop durante le due prove, pre - e post – manutenzione di primo livello (ottenuto isolando il range di campioni ad essi corrispondente dai segnali grezzi). È indicata anche la deviazione standard tra i due picchi.



Figura 6.10. Zoom della figura 7.2 precedente per evidenziare la deviazione standard tra i due picchi.

Le medie totali dei dodici picchi del segnale di fluorescenza per le due prove sono indicate in Tabella 6.1., assieme alle deviazioni standard tra i dodici picchi corrispondenti ai dodici tracks all'interno della stessa prova. La deviazione standard è considerata come indice di variabilità del segnale rilevato da probes posti in tracks diversi durante la stessa prova. Entrambe sono normalizzate per il picco del segnale corrispondente alla fibra di loop.

Come ci si aspettava la media prima della manutenzione è superiore di circa il 19 % rispetto alla media corrispondente alla prova eseguita con le ball lenses pulite. Anche la deviazione

standard tra i picchi corrispondenti ai probes posti in diversi tracks durante la stessa prova è maggiore nel caso pre – manutenzione: ossia dopo la manutenzione i picchi di fluorescenza, oltre ad avere un valore inferiore, hanno anche una minore variabilità tra i diversi tracks.

Tabella 6.1. Tabella contenente la media dei dodici picchi del segnale di fluorescenza e la deviazione standard tra di essi per ciascuna prova: pre – e post – manutenzione di primo livello.

| | Fluorescenza media | Deviazione standard |
|---------------------|-----------------------|------------------------|
| Pre – manutenzione | 5,067 | 0,328 |
| Post - manutenzione | 4,117 | 0,275 |

È importante che le medie dei picchi delle due prove pre – e post – manutenzione siano statisticamente differenti, altrimenti la manutenzione eseguita sulle ball lenses non ha avuto effetto. Attraverso un test di ANOVA ad un fattore (Tabella 7.1), considerando come livello di significatività il 5 %, si conferma che le due medie delle due prove sono statisticamente molto diverse, essendo il valore di p-value estremamente basso.

Tabella 6.2. Risultati del Test ANOVA a un fattore utile a confrontare le fluorescenze rilevate durante le due prove: pre – e post – manutenzione di primo livello. È indicato il livello di significatività e il valore di p-value.

| | α | P-Value |
|------------------|------|------------------|
| Prove (pre/post) | 0,05 | 1,130 * 10^ (-7) |

Alla luce dell'instabilità calcolata per il sistema di emissione come deviazione standard percentuale è fondamentale capire se le differenti fluorescenze rilevate dai probes ottici sia possibile imputarle a una differente prestazione degli stessi o all'instabilità del tape. Per confermare ciò occorre confrontare le deviazioni standard percentuali tra i picchi dei segnali di fluorescenza rilevati pre – manutenzione e post – manutenzione dallo stesso probe. Sono

indicate per ciascun track in Figura 6.11: è evidente che esse sono molto superiori alla soglia di instabilità del tape fissata a 0,45 %.



Figura 6.11. Bar diagram delle deviazioni standard percentuali tra i picchi dei segnali di fluorescenza rilevati dallo stesso probe prima e dopo la manutenzione di primo livello, per ognuno dei dodici tracks.

È bene sottolineare che per tutti i tracks, tranne per l'undicesimo, è possibile osservare l'effetto della manutenzione utilizzando tape differenti o ruotando la tool tra una prova e l'altra, in quanto le deviazioni standard percentuali sono superiori ai limiti di instabilità del sistema di emissioni fissati nel Capitolo 4.

Si può pertanto concludere che l'aumentare dei cicli di vita dell'apparecchiatura, ossia il numero dei test di Real Time PCR eseguiti, e il conseguente opacizzarsi delle ball lenses amplificano il segnale di fluorescenza rilevato dai probes ottici. È possibile ridurre tale effetto fino anche al 20 % attraverso la manutenzione di primo livello.

6.2. Manutenzione di secondo livello

Come detto in precedenza, il secondo livello di manutenzione consiste nel sostituire tutti e dodici i probes ottici dell'apparecchiatura al raggiungimento di un numero di cicli di vita pari a un milione.

Si confrontano i segnali di fluorescenza rilevati dalla parte ottica di una stessa apparecchiatura prima e dopo la sostituzione dei probes. Durante la prima prova i probes erano a fine vita, mentre durante la seconda erano nuovi, ossia non erano mai stati utilizzati per eseguire una sessione di Real Time PCR. Per quanto riguarda la fibra di loop essa non viene sostituita in tutte le manutenzioni. In questo caso specifico non è stata sostituita: è stata solo smontata e rimontata.

Nella Figura 6.12 sono raffigurati sovrapposti i due segnali grezzi corrispondenti alle due diverse prove. I probes a fine vita, come si evince dalla figura, hanno rilevato segnali di fluorescenza molto variabile tra i diversi tracks. I picchi sono in ogni caso superiori a quelli relativi alla prova con i probes nuovi, tranne nel nono e decimo track. Ciò è in accordo con l'amplificazione dovuta all'opacizzarsi delle ball lenses, mentre per quanto riguarda i segnali dei due tracks sopracitati il trend è opposto. È bene prendere in considerazione per questi due i dati elaborati nel Capitolo 3 in cui si è trattata l'analisi della trasmittanza delle stesse fibre (appartengono alla stessa apparecchiatura): si è notato che entrambe le fibre appartenenti al nono probe erano danneggiate. Pertanto, è possibile affermare che quando il segnale rilevato da un probe a fine vita è inferiore a quello rilevato da un probe mai utilizzato, che non risente dell'effetto diffusivo, molto probabilmente le fibre appartenenti al primo probe hanno ridotta trasmittanza.



Figura 6.12. Sovrapposizione dei due segnali grezzi delle fluorescenze rilevate da ciascun probe ottico nella prova pre – manutenzione di secondo livello (in blu, i probes hanno un livello di cicli di vita pari a un milione e le ball lenses opache) e nella prova post – manutenzione (in rosso, i probes non sono mai stati utilizzati). Il tredicesimo picco per ciascuna prova corrisponde al segnale rilevato dalla fibra di loop.

I picchi dei due segnali rilevati dalla fibra di loop nelle due prove, come indicato in Figura 6.13, differiscono di una deviazione standard percentuale dello 2,18 %: corrisponde a circa 51 LSB su un picco medio di circa 2284 LSB. Quello relativo alla prova post – manutenzione è di valore inferiore rispetto a quello della prova antecedente come nel caso della manutenzione di primo livello, ma in questo caso la variazione è maggiore nonostante non sia stato sostituito (è bene comunque considerare che è stato rimosso e riposizionato).



Figura 6.13. Sovrapposizione dei due segnali rilevati dalla fibra di loop durante le due prove, pre - e post – manutenzione di secondo livello (ottenuto isolando il range di campioni ad essi corrispondente dai segnali grezzi). È indicata anche la deviazione standard tra i due picchi.

Si è proceduto come per la manutenzione di primo livello analizzando le medie dei dodici picchi dei segnali di fluorescenza e le deviazioni standard tra di essi nelle due prove, normalizzando i picchi rispetto al picco del segnale della fibra di loop. Per entrambe le prove i risultati sono riportati in Tabella 6.1: sono indicate anche le stesse relative al caso della manutenzione di primo livello. La media dei picchi relativa alla prova antecedente la sostituzione dei probes ottici è superiore di circa l'11,5 % rispetto alla stessa rilevata alla prove eseguita con i probes ottici nuovi, ma lo scarto tra le due è inferiore rispetto al caso della manutenzione di primo livello. Infatti, al fattore diffusivo legato alle ball lenses si aggiunge il fattore di riduzione della trasmittanza delle fibre: sommandosi si ottiene una media delle fluorescenze pre – manutenzione inferiore rispetto al caso precedente, determinando uno scarto inferiore tra le due. La deviazione standard tra i dodici picchi nelle prove relative alla manutenzione di secondo livello è molto maggiore per i probes a fine vita, risultando in una maggiore variabilità delle fluorescenze rilevate tra i diversi tracks.

Tabella 6.1. Tabella contenente la media dei dodici picchi del segnale di fluorescenza e la deviazione standard tra di essi per ciascuna prova: pre – e post – manutenzione, sia di primo livello, che di secondo livello.

| | Manutenzione - 2° livello | | Manutenzione - 1° livello | |
|---------------------|---------------------------|----------|---------------------------|----------|
| | Media | Dev. Std | Media | Dev. Std |
| Pre – manutenzione | 3,937 | 0,614 | 5,067 | 0,328 |
| Post - manutenzione | 3,482 | 0,238 | 4,117 | 0,275 |

È interessante confrontare le deviazioni standard pre – manutenzione e post – manutenzione dei due diversi casi analizzati in Tabella 6.1. Esse differiscono di una quantità inferiore a 0,04 per entrambe le prove post – manutenzione: nei probes mai utilizzati la differenza della fluorescenza rilevata nei diversi track è imputabile in misura maggiore all'instabilità del sistema di emissione, è invece di poco più elevata quando le ball lenses hanno subito la pulizia perché rimane probabilmente un residuo di opacità diverso nei diversi probes. Per le due prove successive pre – manutenzione la deviazione standard tra i picchi rilevata prima della manutenzione di secondo livello, ossia dai probes a fine vita, è circa il doppio della stessa relativa ai probes aventi solamente le ball lenses opache.

Per i probes a fine vita la sovrapposizione dei due effetti di usura conduce alla rilevazione di

segnali di intensità differente a seconda di quanto ognuno dei due fattori incida su ogni probe. Mentre nel caso della manutenzione di primo livello l'apparecchiatura aveva solamente 100 mila cicli per cui la variabilità tra le fluorescenze rilevate dai probes è dovuta al differente grado di utilizzo dei probes, che porta a un diverso grado di diffusione, ma non la si può imputare alla ridotta trasmittanza delle fibre (se si considera che i probes sono a un decimo del livello massimo di cicli di vita).

Anche un test ANOVA a un fattore (Tabella 7.1) conferma che le due medie dei picchi sono diverse, ma essendo il p – value molto vicino al livello di significatività e di tanti ordini di grandezza superiore rispetto al caso della manutenzione di primo livello, è bene sottolineare quanto detto in precedenza: il sommarsi dei due fattori di usura rende le fluorescenze rilevate dai probes a fine vita simili a quelle rilevate dai probes mai utilizzati. Solo qualora la riduzione della trasmittanza fosse eccesiva, come nel nono track, si rilevano segnali inferiori dai probes a fine vita.

Tabella 6.2. Risultati del Test ANOVA a un fattore utile a confrontare le fluorescenze rilevate durante le due prove: pre – e post – manutenzione di secondo livello. È indicato il livello di significatività e il valore di p-value.

| | α | P-Value |
|------------------|------|----------------|
| Prove (pre/post) | 0,05 | 0,027 |

Il calcolo delle deviazioni standard percentuali tra i picchi rilevati dai probes diversi ma posti nello stesso track nelle due prove (Figura 6.14) dimostra che, sebbene i due segnali siano maggiormente simili, è possibile utilizzare la tool come sistema di emissione della fluorescenza per evidenziare le differenze, in quanto sono in ogni caso più elevate della soglia di stabilità imposta. Sono comunque ovviamente inferiori rispetto al caso della manutenzione di primo livello per i motivi citati sopra.

Per rimarcare il fatto che nei probes posizionati nel nono e decimo track la fluorescenza rilevata dai probes a fine vita è inferiore rispetto a quella rilevata dai probes nuovi la deviazione standard

percentuale è stata resa negativa e indicata al di sotto dell'asse delle ascisse (benché la deviazione standard sia un valore in ogni caso positivo per definizione).



Figura 6.14. Bar diagram delle deviazioni standard percentuali tra i picchi dei segnali di fluorescenza rilevati dai probes posti nello stesso track prima e dopo la manutenzione di secondo livello, per ognuno dei dodici tracks.

Dalla figura precedente si distinguono anche il terzo e quinto track, che presentano segnali più simili prima e dopo la manutenzione nonostante l'effetto diffusivo delle ball lenses. Questo può essere ricondotto a una diminuzione della trasmittanza e quindi a un degrado della fibra.

Rispetto al caso precedente è invece interessante notare che a causa della diminuzione del segnale dovuto alla riduzione di trasmittanza delle fibre a fine vita, non è possibile valutare l'effetto della manutenzione utilizzando qualsiasi tool e qualsiasi tape in qualsiasi verso. Le deviazioni standard percentuali sono infatti in molti casi inferiori alla soglia più elevata fissata nel Capitolo 4 e pari al 7,5 % (deviazione standard percentuale massima tra i picchi rilevati in uno stesso track utilizzando per le due prove tape differenti).

È evidente che per apprezzare la differenza di fluorescenza è importante utilizzare lo stesso tape, anche in tool diverse, ma senza mai cambiarne il verso tra le due prove. Se così non fosse si avrebbe una variabilità che non sarebbe possibile imputare all'usura del probe, poiché potrebbe essere invece dovuta al tape.

Capitolo 7. Analisi dei test di Real Time PCR

Nei capitoli precedenti si sono analizzati quali siano i fattori di degrado dei probes ottici e i limiti del sistema di emissione utilizzato (tool – tape) nell'individuazione degli stessi. È quindi interessante valutare quanto i dati ottenuti siano coerenti con i dati provenienti dalle sessioni di Real Time PCR, nell'ottica di poter utilizzare il sistema tool – tape per analizzare il degrado della parte ottica.

Per questo motivo in parallelo ai test eseguiti sulla parte ottica per mezzo della tool prima e dopo la manutenzione di secondo livello sono stati eseguiti anche due test di Real Time PCR. Il secondo test di Real Time PCR non è stato eseguito quando i probes non erano mai stati utilizzati per problemi tecnici interni all'azienda, ma durante lo stesso la parte ottica presentava un livello di cicli di vita pari a circa 26 mila. Prima di eseguire il test di Real Time PCR è stata quindi eseguita anche un'ulteriore prova con la tool in modo da poter confrontare le fluorescenze rilevate dallo strumento allo stesso livello di cicli di vita.

Per quanto riguarda i due test di Real Time PCR, in ogni track è stata allestita una sessione "PCR Only" con il prodotto Pneumocystis ELITe MGK Kit [16], utilizzando un campione artificiale contenente un plasmide con la sequenza target del prodotto, preparato alla concentrazione teorica di 10 copie reazione. Il campione è stato amplificato come replicato in ognuno dei dodici tracks dello strumento per analizzare l'eventuale variazione di fluorescenza durante l'amplificazione di un campione a basso numero di copie. È stata utilizzata una sonda contenente come fluoroforo il FAM, rilevato come per il tape verde nel canale 1.

Dunque sono state eseguite due sessioni PCR identiche prima e dopo la manutenzione, con la stessa tipologia di test ripetuta identica in tutti i tracks. Idealmente in tutti i tracks si dovrebbe avere lo stesso risultato, sia prima che dopo la sostituzione dei probes.

Dai due Amplification Plots relativi alle due sessioni di Real Time PCR (Figura 7.1, pre – manutenzione, e Figura 7.2, post - manutenzione) è interessante notare che le fluorescenze emesse dai fluorofori sono di gran lunga superiori a quelle emesse dal tape. Inoltre, nonostante i test eseguiti su tutti e dodici i probes siano identici, le fluorescenze massime ottenute non sono uguali in nessuna delle due sessioni, così come non sono uguali tra i tracks all'interno della

stessa prova. In particolar modo i probes a fine vita posti in tracks diversi rilevano fluorescenze che variano in un range maggiore rispetto ai probes nuovi, in modo simile ai test eseguiti utilizzando la tool.



Figura 7.1. Sovrapposizione dei dodici Amplification Plots della sessione di Real Time PCR eseguita prima di sostituire i probes, ossia con i dodici probes ottici aventi un livello di cicli di vita pari a circa un milione.



Figura 7.2. Sovrapposizione dei dodici Amplification Plots della sessione di Real Time PCR eseguita dopo la sostituzione dei probes, ossia con i dodici probes ottici aventi un livello di cicli di vita pari a 26 mila.

Degli Amplification Plots ciò che in realtà interessa al clinico non è la fluorescenza massima rilevata in ogni track, ma il valore di C_T calcolato nel sistema ELITe InGenius utilizzando come

soglia del segnale 50 (normalizzato). Prima di ogni cosa è bene chiarire che lo strumento costruisce l'Amplification Plot sulla base di 45 punti sull'asse dell'ascisse, corrispondenti a 45 cicli di PCR: limite superiore entro il quale dovrebbe aumentare la fluorescenza per raggiungere il massimo ad avvenuta amplificazione.

Considerando che i valori di C_T in queste prove sono in ogni caso mediamente uguali a 37, si considerano per ogni track le fluorescenze rilevate al 37° ciclo per confrontarle con le stesse ottenute utilizzando la tool.

Analizzando le medie delle fluorescenze rilevate dai dodici probes nei due test per le prove pre – e post – manutenzione e le deviazioni standard tra le stesse all'interno di ciascuna prova (le fluorescenze sono normalizzate per entrambi i test rispetto al segnale della fibra di loop), i risultati sono riportati in Tabella 7.1. In entrambi i casi la media delle fluorescenze pre – manutenzione è inferiore rispetto a quella post - manutenzione, mentre la deviazione standard è più alta, indice di una maggiore variabilità tra le fluorescenze rilevate dai probes a fine vita posti in tracks diversi.

Tabella 7.1. Tabella contenente le medie e le deviazioni standard delle dodici fluorescenze rilevate dai dodici probes per ciascuna prova: pre – e post – manutenzione, sia per i test eseguiti utilizzando il tape come sistema di emissione, sia per i test di Real Time PCR. Nel primo caso come valore di misura si considerano i picchi dei segnali fluorescenti, nel secondo caso la fluorescenza rilevata al 37° ciclo di PCR (in entrambi i casi sono normalizzate per il segnale rilevato dalla fibra di loop).

| | Tool - Tape | | Real Time PCR (37° ciclo) | | |
|---------------------|-------------|----------|---------------------------|----------|--|
| | Media | Dev. Std | Media | Dev. Std | |
| Pre – manutenzione | 3,937 | 0,614 | 54,191 | 27,401 | |
| Post - manutenzione | 4,263 | 0,451 | 54,658 | 20,419 | |

È necessario comunque tenere conto del fatto che entrambe le deviazioni standard calcolate per le sessioni di Real Time PCR sono più elevate in percentuale rispetto alle stesse dei test eseguiti utilizzando la tool: questo è indice del fatto che i due fattori di usura producono effetti diversi nelle due tipologie di test.

Occorre pertanto analizzare le fluorescenze rilevate nei diversi tracks per capire in che modo i

fattori di usura incidano e valutare un'eventuale coerenza tra i dati ottenuti utilizzando il tape come sistema di emissione e quelli relativi alle sessioni di PCR. In Figura 7.3 sono raffigurati nella parte superiore i picchi di fluorescenza rilevata da tutti e dodici i probes utilizzando la tool nelle due prove pre – e post – sostituzione dei probes; in quella sottostante le fluorescenze al 37° ciclo relative ai due test di Real Time PCR eseguiti in laboratorio. A causa dell'effetto diffusivo delle ball lenses opache analizzato nei capitoli precedenti, che amplifica il segnale rilevato utilizzando la tool dopo solamente poche sessioni di Real Time PCR, non è in alcuni casi possibile distinguere i segnali rilevati dai probes a fine vita da quelli rilevati dai probes aventi 26 mila cicli di vita. Per questo motivo si è scelto di raffigurare per le prove riguardanti la tool anche l'andamento dei picchi di fluorescenza rilevati dai probes mai utilizzati (in giallo) per analizzare quanto l'effetto diffusivo incida sulla fluorescenza rilevata.



Figura 7.3. In alto: sono raffigurati i picchi dei segnali di fluorescenza rilevati da tutti e dodici i probes e relativi alle prove effettuate con la tool, pre – (in blu) e post – manutenzione (in arancione). Sono raffigurati anche gli stessi relativi alla prova eseguita utilizzando la tool quando i probes ottici erano stati appena sostituiti (in giallo tratteggiato).

In basso: sono raffigurati i valori della fluorescenza al 37 ° ciclo di PCR degli Amplification Plots relativi a tutti e dodici i probes prima (in blu) e dopo la sostituzione (in arancione) degli stessi.

In entrambi i casi il valore della fluorescenza è normalizzato per il segnale rilevato dalla fibra di loop.

È interessante notare diversi aspetti.

Nei test eseguiti con l'utilizzo della tool le fluorescenze rilevate a 26 mila cicli (linea blu) in alcuni tracks sono già indistinguibili dalle fluorescenze rilevate a fine vita (linea arancione). Inoltre, a causa del diverso grado di utilizzo dei tracks la linea blu è decrescente da sinistra verso destra, rispetto alla linea gialla posta a un livello inferiore e più costante. Questo conferma quanto detto in precedenza: i probes posti nei tracks iniziali sono quelli maggiormente utilizzati, quindi presentano un segnale più amplificato a causa dell'effetto diffusivo. Infatti, nell'undicesimo e dodicesimo track il segnale post - manutenzione è ancora inferiore a quello rilevato dai probes ottici a fine vita.

In entrambe le tipologie di test le fluorescenze rilevate dai probes a fine vita hanno una variabilità più elevata rispetto al caso dei probes nuovi, che hanno invece un trend meno variabile. Questo è un aspetto importante soprattutto nei test di Real Time PCR, in quanto eseguendo lo stesso test su tutti e dodici i probes ci si aspetta dei risultati identici o comunque poco variabili tra di loro, mentre non è così quando la parte ottica è a fine vita.

Prendendo in considerazione non solo i due fattori di usura ma anche la posizione del probe, verranno analizzati i segnali di fluorescenza dividendo i tracks in tre gruppi.

Considerando i tracks centrali dal quarto al settimo è possibile distinguere i due fattori di usura. Nel quarto e sesto track nei test eseguiti con la tool i picchi di fluorescenza delle due prove sono pressoché uguali (linea blu e arancione in Figura 7.3), a causa del fatto che non è possibile distinguere dai soli segnali di fluorescenza i probes a fine vita da quelli che hanno subito pochi cicli di vita. Mentre le fluorescenze relative alle prove di Real Time PCR sono maggiori nel caso dei probes pre – manutenzione poiché avendo subito questi un numero maggiore di sessioni PCR hanno le ball lenses con un livello di opacità più elevato.

Nel quinto e settimo track il trend è opposto: in entrambi i test il segnale proveniente dal probe a fine vita (linea arancione) è inferiore rispetto a quello rilevato dai probes aventi 26 mila cicli. Più precisamente nei test riguardanti la tool il segnale rilevato dai probes fine vita è simile a quello rilevato dai probes mai utilizzati (linea gialla): le fibre del probe posto nel quinto track hanno una ridotta trasmittanza e si trovano invece in una situazione intermedia quelle del probe posto nel settimo track. La riduzione della trasmittanza ha lo stesso effetto in entrambe le tipologie di test.

Pertanto si può concludere che i due test risentono in misura differente dei due fattori di usura. In particolare, nei test eseguiti con la tool è meno marcato l'effetto diffusivo, mentre è più evidente l'effetto di riduzione della trasmittanza.

Per quanto riguarda i probes posti dall'ottavo al dodicesimo track, escluso il nono, è bene considerare che sono i tracks meno utilizzati, quindi risentono in misura ridotta dell'effetto diffusivo. In entrambi i test la variabilità tra le due prove è minima: i probes a fine vita risentono della ridotta trasmittanza e dell'effetto diffusivo, quest'ultimo in misura minore rispetto agli altri tracks, mentre i probes con pochi cicli di vita risentono solamente dell'effetto di diffusione, ma in misura minore rispetto ai probes a fine vita. La somma dei due effetti in entrambi i test riduce la variabilità tra le due prove, conducendo ancora una volta a non poter distinguere i due diversi livelli di vita dell'apparecchiatura dai soli segnali.

Per il probe posto nel nono track, le cui fibre sono state dimostrate essere usurate nel Capitolo 3, il segnale rilevato dal probe fine vita è inferiore anche al segnale rilevato dal probe mai utilizzato, rimarcando una eccessiva ridotta trasmittanza delle fibre del primo. Nei test di PCR invece i due valori di fluorescenza al 37° ciclo sono identici (come identico è il C_T): il probe ottico a fine vita è danneggiato ma risente dell'effetto di diffusione, quello nuovo probabilmente è stato poco utilizzato per cui il segnale rilevato è poco amplificato. Per questo motivo sono rilevati due segnali identici.

Dai due probes posizionati nella parte sinistra dell'apparecchiatura, nel primo e secondo track (i più utilizzati), in entrambi i test i segnali rilevati post – manutenzione sono di poco superiori a quelli rilevati pre – manutenzione, poiché i probes a fine vita risentono probabilmente di un piccolo effetto di riduzione della trasmittanza. Essendo i tracks più utilizzati probabilmente le ball lenses dei probes nelle due prove post – manutenzione avevano già raggiunto un livello elevato di opacità.

Il probe posizionato nel terzo track se si valuta solamente il test eseguito con la tool è in una situazione analoga al quinto track, ossia la fibra dovrebbe avere ridotta trasmittanza essendo il segnale rilevato dal probe a fine vita simile a quello rilevato dal probe a inizio vita. Dato non confermato dai test di Real Time PCR perché a fine vita è rilevata una fluorescenza più elevata rispetto a quella rilevata a inizio vita, seppur con una differenza ridotta rispetto al caso sopracitato: ancora una volta l'effetto diffusivo nei test di PCR è predominante.

Pertanto, alla luce dei risultati non c'è una correlazione diretta tra le fluorescenze rilevate nelle due tipologie di test, come si vede dal grafico in Figura 7.4. In esso sono raffigurati per ogni track il rapporto tra le fluorescenze rilevate post – e pre – manutenzione per entrambe le tipologie di test eseguiti (in blu i test eseguiti con la tool e in rosso quelli di Real Time PCR).

Ciò che è evidente è che i segnali rilevati con l'utilizzo della tool mostrano delle variazioni molto inferiori tra le due prove rispetto a quelli rilevati con i test di Real Time PCR.



Figura 7.4. Rapporto tra la fluorescenza rilevata post - manutenzione e quella rilevata pre – manutenzione da ciascun probe posizionato nei diversi tracks. In rosso il rapporto relativo ai test di Real Time PCR considerando la fluorescenza al 37° ciclo, in blu il rapporto relativo ai test eseguiti con la tool considerando i picchi del segnale fluorescente.

Per definire una possibile relazione tra i rapporti dalle due tipologie di test si è utilizzato il modello statistico della regressione lineare. Il modello assume una relazione lineare tra i valori di input x della variabile indipendente (in questo caso il rapporto delle fluorescenze ottenute dalla due prove eseguite utilizzando la tool) e un valore di output y della variabile dipendente (in questo caso il rapporto delle fluorescenze ottenute al 37° ciclo nei test di Real Time PCR). Il modello di regressione lineare semplice prevede che la variabile dipendente possa essere calcolata come combinazione lineare dei valori di input, come è indicato dalla seguente equazione 7.1:

y = mx + q

Equazione 7.1

dove y è la variabile dipendente, x è la variabile indipendente, q è il termine costante definito intercetta e m è il coefficiente di relazione tra y e x, ossia la pendenza della retta.

Per capire se il modello è abbastanza buono da prevedere future relazioni tra le due variabili,

viene calcolato il coefficiente di determinazione R^2 , una misura statistica di quanto i dati sono vicini alla linea di regressione. Il modello creato è un ottimo predittore se R^2 è uguale 1, mentre non lo è se è nullo. Valori compresi tra 0 e 1 indicano la misura in cui la variabile dipendente è prevedibile.

Per costruire il modello di regressione lineare è stato raffigurato in Figura 7.5 per ogni track il rapporto ottenuto dalle due prove eseguite utilizzando la tool (nelle ascisse) rispetto a quello ottenuto dalle due prove di PCR (nelle ordinate). I dati sono raffigurati tramite i numeri corrispondenti ai tracks per una maggiore leggibilità del grafico. La linea rossa tratteggiata è il modello di regressione lineare, indicato dall'equazione in alto a destra. Come è possibile vedere dal coefficiente di determinazione il modello non è un buon predittore in quanto è pari a 0,097 (9,7%).



Figura 7.5. Rapporto tra le fluorescenze rilevate da ogni probe post – e pre – manutenzione nei due test eseguiti: nelle ascisse il test effettuato utilizzando la tool e in ordinate i test di Real Time PCR. I rapporti sono indicati tramite i numeri dei tracks nei quali sono posizionati i probes, per una maggiore leggibilità del grafico. La linea rossa tratteggiata è il modello di regressione lineare dei dati. È indicata anche l'equazione della retta di regressione lineare e il coefficiente di determinazione.

È evidente che le differenze tra i segnali di fluorescenza pre – e post – manutenzione rilevate utilizzando la tool sono meno marcate rispetto a quelle ottenute nei test di Real Time PCR, infatti stanno in un range molto più compatto che si estende da 0.9 a 1.5. Quelli che sono prossimi al punto di coordinate (1,1) sono i tracks finali e quelli iniziali: sia nel caso della PCR che nel caso di utilizzo della tool i risultati sono simili a inizio vita e a fine vita. Solamente il

track 12 si trova nel rettangolo nero posto in basso a sinistra del grafico, delimitato dalle linee corrispondenti a un valore di rapporto pari a uno sia in ascissa che in ordinata. Ossia a una diminuzione del segnale tra post – e pre – manutenzione in un test, corrisponde lo stesso nell'altro test.

I quattro test PCR che subiscono una diminuzione del segnale rilevato post – manutenzione (tracks 6, 4, 10 e 3), subiscono un aumento dello stesso nei test eseguiti con la tool sempre a causa dei differenti effetti che hanno i due fattori di usura nei due test. È interessante notare che il trend è crescente: una maggiore riduzione della fluorescenza rilevata nei test di PCR, corrisponde a una minore aumento del segnale nei test eseguiti con la tool. Infatti, i test eseguiti con la tool risentendo soprattutto della ridotta trasmittanza rilevano un segnale pre – manutenzione sì inferiore al caso post – manutenzione, ma con una minore differenza tra i due a causa dell'effetto di amplificazione di cui risente il test seppur in misura ridotta rispetto alla PCR.

Nei restati tracks in entrambi i test il segnale post – manutenzione è più elevato ma non c'è una corrispondenza delle percentuali con cui esso aumenta.

A tutti questi fattori infatti si deve aggiungere il fatto che il test di PCR è di per sé intrinsecamente variabile poiché ci saranno sempre, seppur minime, differenze nella preparazione dei campioni e delle soluzioni in cui essi sono posti, sommate alla variabilità intrinseca propria dell'apparecchiatura.

Riassumendo è bene dire che nel caso di utilizzo della tool dall'analisi dei soli segnali di fluorescenza non si distingue un probe che ha subito pochi cicli di vita da uno a fine vita, a causa del fatto che l'effetto di diffusione è preponderante solo nei primi cicli e poi tende a diminuire. Si distinguono solo nel caso in cui ci sia una riduzione della trasmittanza tale da rendere il segnale rilevato inferiore a quello rilevato dai probes mai utilizzati; altrimenti il segnale decresce ma non lo si distingue da un segnale proveniente da un probe mai utilizzato. Nelle prove di PCR un probe a fine vita in cui la trasmittanza non si è ridotta rileva un segnale maggiore rispetto a quello a inizio vita a causa dell'effetto diffusivo maggiore. Allo stesso modo della tool il segnale è ridotto se la trasmittanza è inferiore, ma non si può dire se sia distinguibile da un probe mai utilizzato in quanto non si hanno i dati.

97

7.1. Punto di vista clinico

Al di là dei dati puramente numerici è importante valutare a livello clinico quanto questi cambiamenti costituiscano o meno una fonte di errore nella diagnosi. Alla luce dei risultati ottenuti in PCR è bene valutare che effetti hanno i due fattori di usura sul calcolo del C_T e sul conseguente calcolo della concentrazione del DNA nel campione iniziale.

Un abbassamento eccessivo della fluorescenza rilevata con conseguente spostamento a destra del C_T , ossia un aumento dello stesso, potrebbe causare dei falsi negativi durante le analisi qualitative. L'amplificazione non viene rilevata perché la soglia è raggiunta ad un ciclo corrispondente ad un C_T troppo elevato per essere considerato attendibile e positivo. Oltre a ciò questo causa sottostime della quantità di DNA del campione iniziale. Al contrario, un innalzamento eccessivo della fluorescenza rilevata con conseguente spostamento a sinistra del C_T , ossia una diminuzione dello stesso, nel caso specifico delle analisi quantitative causa sovrastime della quantità di DNA nel campione iniziale.

Dal punto di vista clinico è bene conoscere la quantità di carica virale o batterica in un determinato paziente e per questo è necessario calcolare la quantità di DNA in copie/reazione o copie/mL presente nel campione iniziale. Per fare ciò è indispensabile conoscere la curva standard del prodotto e il valore di C_T della specifica amplificazione considerata. In Figura 7.6 è raffigurata la curva standard per il prodotto Pneumocystis ELITe MGK Kit [16]: la pendenza della retta *m* è di -3,3201 (pertanto l'efficienza è prossima al 100%), mentre l'intercetta *q* è di 39,947. Il valore del coefficiente di determinazione R² è prossimo a 1.

Si risale al logaritmo della quantità di DNA prodotto in copie/reazione risolvendo l'equazione 7.2, come indicato nel sotto capitolo 1.1:

$$DNA = 10^{\frac{c_T-q}{m}}$$
 Equazione 7.2.

dove q è l'intercetta e m è la pendenza della retta di standard.

Per ottenere la concentrazione di DNA in copie/mL occorre moltiplicare la stessa in copie/reazione per un fattore 25 (specifico per questo saggio: saggi diversi, prevedono calcoli diversi).



Figura 7.6. Curva standard del prodotto Pneumocystis ELITe MGK Kit [16].

Si considerano in seguito tre esempi: un caso in cui a causa dell'effetto diffusivo il segnale di fluorescenza è maggiore utilizzando una fibra a fine vita (quarto track), un caso in cui a causa della ridotta trasmittanza delle fibre si ha una diminuzione dello stesso (quinto track) e un caso in cui i due effetti si compensano (nono track).

Nelle figure sottostanti (Figura 7.7, Figura 7.8 e Figura 7.9) sono raffigurati sovrapposti per ogni track sopracitato gli Amplification Plots ottenuti dal probe a fine vita (in arancione) e dal probe a inizio vita (in blu). La linea rossa indica la soglia del sistema ELITe InGenius, posta a una fluorescenza normalizzata di 50 come detto in precedenza.



Figura 7.7. Sovrapposizione dei due Amplification Plots ottenuti nel quarto track dal probe a fine vita (in arancione) e dal probe a inizio vita (in blu): in arancione quello pre – manutenzione e in blu quello post – manutenzione. La linea rossa indica la soglia del sistema ELITe InGenius posta a una fluorescenza normalizzata di 50.



Figura 7.8. Sovrapposizione dei due Amplification Plots ottenuti nel quinto track dal probe a fine vita (in arancione) e dal probe a inizio vita (in blu): in arancione quello pre – manutenzione e in blu quello post – manutenzione. La linea rossa indica la soglia del sistema ELITe InGenius posta a una fluorescenza normalizzata di 50.



Figura 7.9 Sovrapposizione dei due Amplification Plots ottenuti nel nono track dal probe a fine vita (in arancione) e dal probe a inizio vita (in blu): in arancione quello pre – manutenzione e in blu quello post – manutenzione. La linea rossa indica la soglia del sistema ELITe InGenius posta a una fluorescenza normalizzata di 50.

In Tabella 7.2 sono riportati le differenze tra i due C_T , le variazioni dei segnali fluorescenti al 37° ciclo indicata come rapporto tra le due fluorescenze post – e pre – manutenzione per ognuno dei tre tracks sopracitati, le concentrazioni di DNA ottenute dalle due prove e il loro rapporto.

Tabella 7.2. Sono indicati nella prima colonna le differenza dei valori di CT post – e pre – manutenzione per i tracks considerati, nella seconda colonna il rapporto tra le stesse fluorescenze rilevate al 37° ciclo, nella terza le concentrazioni di DNA pre – manutenzione, nella quarta le stesse ma per la prova post – manutenzione, nell'ultima il rapporto tra queste ultime due.

| | Differenza C _T (Post – Pre) | Rapporto fluorescenze (Post/Pre) | [DNA] Copie/mL Pre – manutenzione | [DNA] Copie/mL Post – manutenzione | Δ[DNA] Copie/mL (Post/Pre) |
|----------|---|--|--|---|----------------------------------|
| Tracks 4 | 1,23 | 0,360 | 323,19 | 137,24 | 0,425 |
| Tracks 5 | -1,80 | 4,384 | 79,00 | 276,24 | 3,497 |
| Tracks 9 | 0,00 | 0,963 | 160,34 | 160,61 | 1,002 |

Nel quarto track il segnale prima della manutenzione supera la soglia imposta con un anticipo di 1,23 cicli (differenza tra i due C_T : 37,48 e 36,25) a causa all'effetto diffusivo delle ball lenses

opache che porta a un aumento del segnale di fluorescenza rilevata. Nel caso specifico causa un aumento del segnale fluorescente pre – manutenzione al 37° ciclo del 64 %. Per quanto riguarda il quinto track il C_T nei probes a fine vita viene calcolato con un ritardo di 1,8 cicli, portando a un rapporto superiore a 4 le due fluorescenze post – e pre – manutenzione al 37° ciclo. Nel nono track invece, nel quale si compensano i due fattori, le prestazioni pre e post manutenzione sono identiche, risultando in un C_T uguale e in una diminuzione del solo 4 % della fluorescenza rilevata post – manutenzione.

Per quanto riguarda i dati corrispondenti alle concentrazioni di DNA rilevate pre – e post – manutenzione, nel caso del quarto track si ha una diminuzione del 58 %, mentre nel caso del quinto track la concentrazione di DNA rilevata post – manutenzione è 3,5 volte superiore a quelle pre – manutenzione. Ovviamente nel nono track il rapporto è pari a 1.

Il clinico quando tratta un paziente ritenuto positivo ad un determinato virus o batterio tiene conto della quantità di DNA rilevato in copie/mL, poiché pazienti con carica virale o batterica differente richiedono differenti trattamenti in termini di cura e tempistiche. Inoltre, spesso il test è ripetuto per valutare l'efficacia di un trattamento.

Utilizzando dei probes ottici usurati e ottenendo dei valori inferiori di quantità di DNA amplificato in copie / mL, il clinico erroneamente è portato a pensare che il paziente ha una carica virale o batterica inferiore a quella reale e tratta il paziente in modo non efficace. Nel caso in cui il test sia volto a verificare l'efficacia del trattamento, rilevando una quantità di DNA inferiore, il medico è portato a considerare il trattamento efficace, mentre in realtà la bassa quantità di DNA rilevata è dovuta ai probes ottici usurati e non è quella reale. Allo stesso modo una quantificazione errata superiore del DNA porta a considerare il paziente in uno stato clinico peggiore, quando in realtà è dovuto a un errore di quantificazione del sistema ELITe InGenius.

Dal grafico della curva standard (Figura 7.6) è evidente che a una diminuzione del C_T corrisponde un aumento nella quantificazione della concentrazione di DNA in copie / reazione. Il grafico è una retta poiché sull'asse delle ascisse è posto il logaritmo della concentrazione del DNA.

È quindi evidente che il C_T è una funzione della concentrazione di DNA, come indicato nell'equazione 7.3:

Equazione 7.3

$C_T = f([DNA])$

Analogamente la concentrazione di DNA è la sua funzione inversa (equazione 7.4):

$$[DNA] = f^{-1}(C_T) = g(C_T)$$

Equazione 7.4

Per ricavare l'equazione 7.4 occorre tracciare i dati sperimentali su un grafico, come indicato in Figura 7.10. I valori della concentrazione di DNA in copie / reazione ottenuti dalle due prove di Real Time PCR sono posti sull'asse delle ordinate e ad essi corrispondono i valori di C_T posti sull'asse delle ascisse.



Figura 7.10. I punti rossi indicano la concentrazione di DNA rilevata ad un determinato C_T indicato sull'asse delle ascisse. La linea blu è l'interpolazione dei punti secondo un'equazione esponenziale, indicata nel box a destra (a e b sono i coefficienti dell'equazione).

La linea blu è l'interpolazione esponenziale dei punti sperimentali ottenuta secondo l'equazione indicata nel box (Equazione 7.5) e corrisponde all'equazione 7.4:

$$g(x) = a * \exp(b * x)$$
 Equazione 7.5

dove x è il valore di C_T , a e b sono i coefficienti ottenuti dall'interpolazione e g(x) è la concentrazione di DNA in copie / reazione, funzione del C_T . Pertanto, si ottiene l'equazione 7.6:

$$[DNA] = g(C_T) = a * \exp(b * x)$$
 Equazione 7.6

Tramite il calcolo della derivata dell'equazione esponenziale si ottiene la sensibilità: di quanto

varia la quantificazione della concentrazione del DNA iniziale al variare del C_T. La sensibilità è indicata dall'equazione 7.7:

$$S = \frac{dg(x)}{dx} = \frac{\Delta[DNA]}{\Delta C_T}$$
 Equazione 7.7

dove x è il valore di C_T.

La sensibilità è come ovvio una funzione logaritmica ed è raffigurata in Figura 7.11 rispetto ai valori di C_T . Come è evidente minore è il valore del C_T , maggiore è la sensibilità dei test di Real Time PCR nel rilevare la concentrazione del DNA calcolata a partire dalla curva standard. È quindi importante che le fibre non abbiano ridotta trasmittanza, in modo tale da rilevare l'aumento della fluorescenza non in ritardo e quindi ad un più basso valore di C_T .



Figura 7.11. Sensibilità calcolata come variazione della concentrazione del DNA al variare del C_T (è la derivata prima della funzione esponenziale raffigurata in Figura 7.10). I punti rossi indicano i C_T ottenuti dai dati delle due prove di Real Time PCR.

È pertanto indispensabile un'attenta analisi della parte ottica del sistema ELITe InGenius per poterne prevedere gli effetti del degrado dei probes sulla PCR, anche alla luce della variabilità del processo di PCR stesso. È bene analizzare l'andamento dei segnali fluorescenti nel tempo, tenendo traccia dei segnali rilevati a inizio vita, considerando anche la variabilità delle prestazioni dell'apparecchiatura stessa. È importante inoltre considerare anche il numero di cicli del sistema quando si eseguono le prove e i tracks all'interno del quale è posizionato ogni probe a causa del differente utilizzo degli stessi nel tempo. Non è possibile considerare un unico segnale senza avere ulteriori informazioni del sistema e fare una previsione sullo stato di degrado.

Conclusioni

Come visto nell'elaborazione dei dati, si può comprendere che non è possibile indagare lo stato di degrado della parte ottica dell'apparecchiatura in termini di diminuzione della sola trasmittanza, tramite misure di potenza. A causa della poca stabilità del setup di misura, questa metodologia non consente di distinguere le fibre mai utilizzate da quelle che hanno subito un milione di cicli di PCR, ma discrimina solamente quelle danneggiate a causa di una maggiore riduzione della potenza ottica misurata. Inoltre, come analizzato nei capitoli centrali, un importante fattore di cambiamento del segnale fluorescente è la diffusione dovuta alle ball lenses opache: le potenze sono misurate a livello della fibra ottica stessa, quindi non risentono dell'effetto diffusivo di cui invece risentono i test di Real Time PCR.

Si è per questi motivi cambiata strategia utilizzando le carte fluorescenti descritte nell'elaborato come fonte di emissione della fluorescenza. Essendo tali carte instabili, nel senso che porzioni differenti o carte differenti emettono segnali fluorescenti diversi, si è proceduto utilizzando durante le prove solamente una carta di colore verde filtrata, senza mai cambiarne il verso. È stato necessario impostare una soglia in termini di deviazione standard percentuale entro cui due segnali non possono essere considerati differenti a causa di una diversa usura del probe, ma la differenza è dovuta alla sua instabilità di emissione.

Questo pone due limiti. Non è possibile analizzare le prestazioni dei sei canali poiché per farlo sono indispensabili tape di differente colore: alla luce dell'alta instabilità del tape stesso non è possibile confrontare segnali provenienti da canali differenti, ottenuti utilizzando tape di colori diversi. Inoltre, non è possibile confrontare probes posti in tracks diversi all'interno della stessa prova, ma è possibile confrontare solamente il segnale rilevato da probes posizionati nello stesso track in prove diverse.

Nell'ambito della valutazione delle prestazioni dei probes posti in apparecchiature differenti è bene sottolineare quanto sia importante normalizzare i segnali grezzi provenienti dai dodici probes per quello della fibra di loop per poter proseguire con l'analisi degli stessi. Nonostante questo accorgimento si rileva comunque una differenza tra i segnali normalizzati provenienti da apparecchiature diverse e mai utilizzate, considerata come soglia per definire uno stato di degrado differente analizzando segnali provenienti da apparecchiature diverse. Questo è un

Conclusioni

limite in quanto, come si è visto, conduce a non poter distinguere un degrado nel breve periodo tra probes di apparecchiature differenti.

Dall'analisi della stessa apparecchiatura nel tempo emerge che i probes ottici risentono di due fattori di usura che si compensano a vicenda. Il primo riguarda l'effetto diffusivo delle ball lenses rilevante a inizio vita, che amplifica il segnale rilevato; il secondo è dovuto alla riduzione della trasmittanza delle fibre ottiche rilevante a fine vita, che al contrario lo diminuisce.

Per quanto riguarda i due livelli di manutenzione successivamente ad entrambi la fluorescenza diminuisce a causa della riduzione dell'effetto diffusivo. In quella di primo livello la riduzione è più evidente, poiché risentono in maniera minore della ridotta trasmittanza rispetto ai probes a fine vita, che per questo motivo sono sostituiti.

Oltre alla ridotta fluorescenza dopo entrambe le manutenzioni si riduce anche la variabilità tra i segnali rilevati tra probes differenti all'interno della stessa prova, che è riconducibile in misura maggiore al tape e non più all'effetto diffusivo che incide diversamente nei dodici probes.

Questo è un fattore che accomuna i test eseguiti con le carte fluorescenti e quelli di Real Time PCR. Mentre per quanto riguarda i due effetti di usura essi incidono in misura diversa nei due test. Il test eseguito con il sistema tool – tape risente maggiormente dell'effetto di riduzione della trasmittanza, mentre è molto ridotto l'effetto diffusivo delle ball lenses rispetto ai test di Real Time PCR.

Pertanto, non è stato possibile stabilire una relazione diretta tra i due test, anche alla luce della variabilità intrinseca del test di Real Time PCR.

Alla luce di ciò, non potendo misurare in modo diretto quanto ognuno dei due fattori incida sulla fibra e a causa del fatto che essi si compensano a vicenda, è indispensabile un'attenta analisi del sistema ELITe InGenius per poter prevedere gli effetti dell'usura sulla PCR. È necessario tenere traccia del segnale rilevato quando l'apparecchiatura non è mai stata utilizzata, della posizione dei vari probes nei tracks e del numero di cicli ai quali le prove vengono eseguite, per una corretta interpretazione dei risultati. Non è possibile considerare un segnale isolato senza avere ulteriori informazioni, per fare una corretta previsione sullo stato di degrado dei probes ottici.

Se dopo l'aumento del segnale a causa dell'effetto diffusivo venisse rilevato un segnale di fluorescenza decrescente nel tempo in un probe che non ha subito manutenzione significa che le fibre poste al suo interno hanno ridotta trasmittanza. Il segnale diventerà nel tempo sempre

Conclusioni

più simile a quello a inizio vita, fino a quando la riduzione della trasmittanza sarà tale da rilevare un segnale inferiore.

I test di Real Time PCR, risentendo dei fattori di usura, conducono a risultati errati nella quantificazione del DNA presente nel campione iniziale del paziente e inducono il clinico in errore nelle valutazioni diagnostiche. A causa dell'effetto diffusivo, il ciclo soglia è quantificato in anticipo con conseguente sovrastima della concentrazione di DNA nel campione; la ridotta trasmittanza posticipa il ciclo soglia con conseguente sottostima della concentrazione di DNA nel campione.

Per i motivi sopracitati, legati in misura maggiore al fatto che il tape non sia stabile, in futuro sarebbe opportuno sostituire la tipologia delle carte fluorescenti con altre che non varino il segnale emesso nelle diverse porzioni per sopperire ai limiti di utilizzo del sistema sopracitati. Inoltre, è consigliabile utilizzare carte che risentano dell'effetto diffusivo in misura più simile ai fluorofori utilizzati nelle sonde, oppure potrebbe essere interessante pensare alla realizzazione di un probe che non risenta dell'effetto diffusivo dovuto alle ball lenses opache, che come si è visto incide parecchio nei risultati dei test di Real Time PCR.
Bibliografia

Bibliografia

- [1] Biblioteca nazionale a Bethesda (Maryland), «National Library of Medicine,» [Online]. Available: https://www.nlm.nih.gov/.
- [2] K. B. Mullis, «Polymerase Chain Reaction Making DNA accessible,» [Online]. Available: www.karymullis.com.
- [3] K. B. Mullis, «The Nobel Prize in Chemistry,» in *"For his invention of the polymerase chain reaction (PCR) method."*, 1993.
- [4] A. Scialpi e A. Mengoni, La PCR e le sue varianti, Firenze University Press, 2008.
- [5] R. Laos, J. M. Thomson e S. Benner, «DNA Polymerases Engineered by Directed Evolution to Incorporate Nonstandard Nucleotides,» *Frontiers in Microbiology*, 2014.
- [6] A. A. Goldberg, «A brief history of pcr and its derivates,» GA International, [Online]. Available: http://labtag.com/.
- [7] F. Stephenson, Calculations for Molecular Biology and Biotechnology, Academic Press, 2016.
- [8] J. Mackay e O. Landt, «Real-Time PCR Fluorescent Chemistries,» Methods in Molecular Biology, 2007.
- [9] Merck, «Universal SYBR Green Quantitative PCR Protocol,» [Online]. Available: https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/sybr-green-qpcr.html.
- [10] ThermoFisher Scientific, «Real-time PCR handbook,» [Online]. Available: https://www.thermofisher.com/.
- [11] ELITechGroup S.p.A., «Manuale d'istruzioni per l'uso Operatore,» Torino, 2019.
- [12] I. Leal, E. Allen, L. Humble, M. Green e M. Rott, «Application of Conventional PCR and Real-Time PCR Diagnostic Methods for Detection of the PineWood Nematode, Bursaphelenchus xylophilus, in Wood Samples from Lodgepole Pine,» in *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat* to Forest Ecosystems, Springer Science, Business Media B.V., 2008.
- [13] ELITechGroup S.p.A., «Applicative Training Book,» Torino.

- [14] ELITechGroup S.p.A., «Fibre Optics Hands On Service procedure,» Torino, 2019.
- [15] ISO ENV 13005, Norma UNI CEI ENV 13005: Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, 1992.
- [16] ELITechGroup S.p.A., «Calibration Reports PJ ELITe_STD_pr05 Pneumocystis ELITe Standard».