

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI RNA HCV MEDIANTE HPA (HIGH PERFORMANCE AMPLIFICATION)

L'HPA è un protocollo d'amplificazione che coniuga le conoscenze acquisite con le tecniche Real Time™ Pcr e l'ottimizzazione estrema del protocollo d'amplificazione. L'accurata selezione dei componenti costituenti la reazione quali reagenti, additivi, intercalanti e il particolare disegno e sintesi dei Primers fanno di HPA uno strumento particolarmente indicato nella diagnostica virale. L'utilizzo di questo protocollo, in grado di determinare la viremia totale indipendentemente dallo sciame virale presente nel campione, garantisce un'accuratezza superiore alle normali tecniche attualmente in uso.

Il processo analitico è costituito da tre fasi distinte:

- a) Estrazione - arricchimento
- b) Retrotrascrizione
- c) Amplificazione Real Time™

ESTRAZIONE

L'estrazione dell'acido nucleico virale (RNA) è la fase più delicata dell'intero processo analitico. La variabile fondamentale nella determinazione della carica virale risiede nella riproducibilità del recovery d'estrazione unita al controllo della degradazione dell'RNA. A tal fine, il protocollo estrattivo proposto utilizza i Sali di Guanidinio per la lisi del capsido virale e l'inattivazione delle ribonucleasi presenti nel campione. La soluzione lisante, pronta all'uso, contiene un RNA Carrier che favorisce la precipitazione alcolica dell'acido Nucleico, presente a concentrazioni infinitesimali, agendo sul prodotto di solubilità dello stesso; l'RNA Carrier, inoltre, diviene molecola bersaglio per le Ribonucleasi eventualmente presenti nei materiali o nell'ambiente.

La validazione del protocollo, ha dimostrato un recovery superiore al 90% per concentrazioni comprese tra 10^6 e 10^2 /copie ml e una variabilità inferiore al 5%.

La procedura prevede i seguenti steps:

- a 100 μ l di siero o plasma vengono addizionati 400 μ l di soluzione Lisante (Guanidinio) e 500 μ l di isopropanolo,
- si centrifuga per 10' a 14.000 rpm e si rimuove il surnatante.
- il pellet viene lavato per due volte con etanolo 70% e quindi ricostituito con 50 μ l di H₂O-DEPC.

La procedura descritta è applicabile a tutti i virus, RNA e DNA, quali HCV, HIV-RNA, HGV, HBV, parvo virus B19 ecc.

Prove condotte nei nostri laboratori con standard multipli, contenenti virus HCV, HBV, HIV, B19 a concentrazioni inferiori a 200 UI/ml, hanno dimostrato l'efficacia estrattiva e la completa rimozione di interferenti e fattori di inibizione della reazione di amplificazione.

VIREMIE "LOW LEVEL"

Qualora si renda necessaria la determinazione della carica virale in campioni con titolo inferiore alle 200 UI /ml (Es RNA HIV), GeneDia ha sviluppato un processo d'arricchimento del campione che permette l'estrazione di volumi compresi tra 250-500 μ l di siero o plasma.

Il fattore di arricchimento, fino a 5 volte, migliora significativamente la riproducibilità estrattiva e supera i limiti statistici dovuti al campionamento di piccoli volumi, con viremie inferiori alle 200 UI/ml.

Il processo d'arricchimento, rapido ed efficace, si realizza con una precipitazione selettiva del virus ad opera di una soluzione PEG/Saccarosio.

La procedura consiste nell'aggiungere 250/500 μ l di campione alla soluzione precipitante, già predisposta in tubi da estrazione, centrifugare a 14.000 rpm per 12', eliminare il sovrantante ed eseguire l'estrazione con sali di Guanidinio.

La fig 9 mostra, un esempio di determinazione di RNA HCV, in campioni con concentrazione compresa tra 250-32 UI/ml (estratti 250 μ l), utilizzando la procedura di arricchimento.

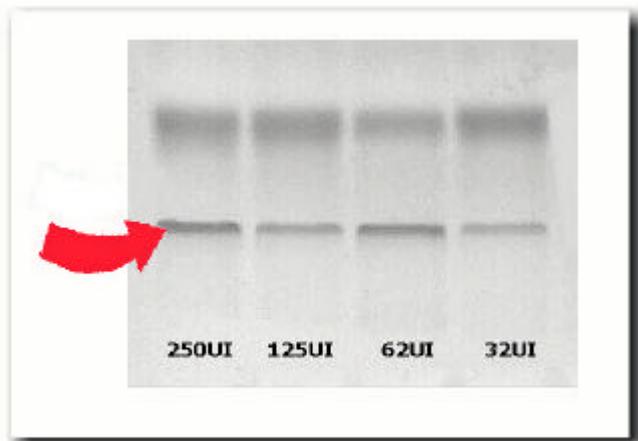


Figura 9: Gel in Agarosio al 2% rivelazione Bromuro di Etidio

RETROTRASCRIZIONE ED AMPLIFICAZIONE.

La specificità dei Primers selezionati per la regione 5'UTR, che producono un frammento di 236 bp, è stata verificata su campioni di RNA HCV di genotipo 1, 2 e 3; gli amplificati prodotti sono stati sottoposti a reazione di sequenza, previa purificazione, con gli stessi Primers utilizzati in RT-PCR.

Il protocollo di trascrizione selettivo, riportato in tabella, utilizza il Primer antisenso al fine di selezionare specificatamente il target evitando di produrre cDNA aspecifici.

A 25 μ l di estratto si aggiungono 25 μ l di mix RT e si incubano a 42°C per 15 min.

Tabella RT	
Reagente	Volume per campione in μ l
H ₂ O-DEPC	5.45
Rnase Inb. 40 UI/ μ l	0.5
Pre Mix RT	15.0
MgCl ₂ 100 mM	3.75
Reverse 50 UI/ μ l	0.3
Volume Totale	25 μl

Il cDNA prodotto può essere immediatamente processato o conservato a -20°C, previa inattivazione della Reverse Transcriptasi incubando per 5' a 95°C.

La reazione d'amplificazione si ottiene aggiungendo 40 μ l di Mix PCR a 10 μ l di cDNA.

La tabella mostra la composizione della master Mix d'amplificazione.

Tabella PCR	
Reagente	Volume per campione in μ l
H ₂ O-DEPC	28.5
Pre Mix PCR	10.0
TAQ 5 UI/ μ l	0.5
UDG 1 UI/ μ l	1.0
Volume Totale	40.0 μl

Dal protocollo d'amplificazione Real Time TM utilizzato, mostrato in figura, si evidenziano le varie fasi:

- 1 controllo carry over
- 2 hot start
- 3 pre cicli formazione template
- 4 cicli amplificazione con lettura della fluorescenza a 72°C
- 5-6 melting curve
- 7 hold

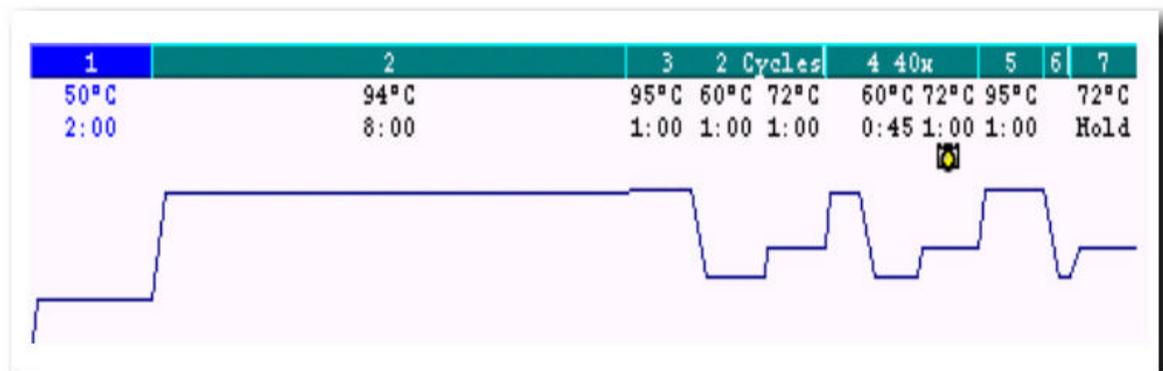


Figura 10: Protocollo REAL TIME PCRTM

Il protocollo descritto utilizza un intercalante specifico per il ds DNA, **SYBR Green I^o**, disciolto nella pre Mix PCR, che permette di monitorare la cinetica d'amplificazione al formarsi del prodotto d'amplificazione. Al termine della reazione viene registrata la curva di dissociazione dei prodotti d'amplificazione formati, con la conseguente determinazione del **TM specifico**. La determinazione quantitativa si ottiene attraverso il calcolo automatico di una curva di calibrazione ottenuta amplificando, contemporaneamente ai campioni, dei calibratori a titolo noto. I calibratori utilizzati, non infettivi, contengono l'intero genoma virale e vengono preventivamente titolati contro lo standard di riferimento internazionale WHO std 96/790.

Il report sotto riportato evidenzia la curva di calibrazione per tre diluizioni (1.25×10^4 , 2.5×10^4 e 1×10^5 UI/ml di RNA HCV) e la replica delle stesse calcolate come campione incognito.

I dati riportati confermano una elevata accuratezza, verificabile dal coefficiente di correlazione e la riproducibilità della curva duplicata, mentre la slope di -3.2 evidenzia una efficienza di reazione prossima al valore teorico, confermata osservando i **TC** (ciclo soglia).

Data Analysis Parameters

Threshold has been calculated using baseline cycles **2** to **22**.

Calculated threshold is **16.86** = **1.69** (average standard deviation) X **10.00**.

Calculated threshold has been replaced by user selected threshold of **17.22**.

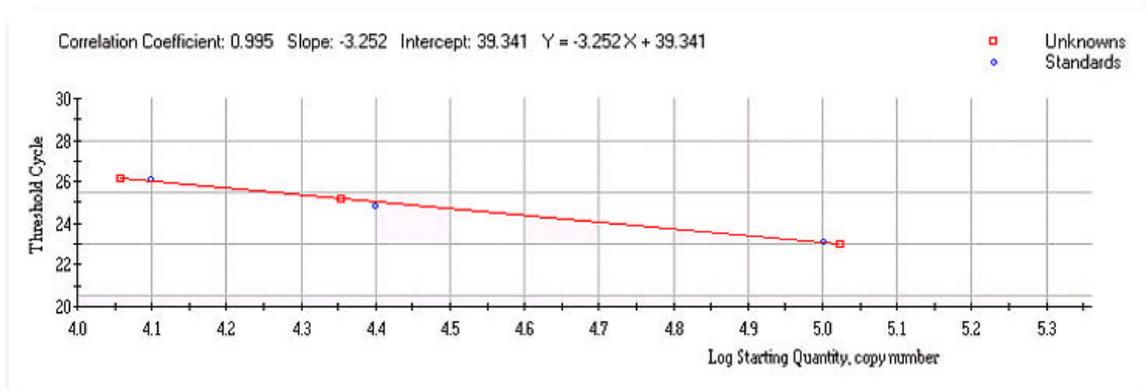
Data analysis window is set at **10.00%** of a cycle, centered at **end** of the cycle.

Weighted Mean digital filtering has been applied. Global filtering is **off**.

Standard Curve Spreadsheet Data for SYBR Green I

Units: U.I./ml number

Well	Type	Repl	TC	Log SQ	SQ	SQ Mean	SQ SD	TC Mean	TC SD
C02	Standard	1	26.13	4.097	1.25E+04	1.25E+04	N/A	26.130	N/A
D02	Replica STD	1	26.15	4.057	1.14E+04	1.14E+04	N/A	26.149	N/A
C03	Standard	2	24.88	4.398	2.50E+04	2.50E+04	N/A	24.876	N/A
D03	Replica STD	2	25.18	4.354	2.26E+04	2.26E+04	N/A	25.183	N/A
C05	Standard	3	23.14	5.000	1.00E+05	1.00E+05	N/A	23.139	N/A
D05	Replica STD	3	23.01	5.023	1.05E+05	1.05E+05	N/A	23.009	N/A



Il ? teorico del ciclo soglia, per diluizioni seriali, è pari a 1 ciclo; dal report si evince che i valori registrati di **TC** sono prossimi al valore teorico, confermando che il protocollo **HPA** mostra una elevata efficienza d'amplificazione che si mantiene costante nell'intervallo di concentrazione considerato, permettendo una elevata accuratezza nel dosaggio della viremia totale.

Figura 11: Esempio di Report

Il range di linearità del protocollo **HPA**, verificato sperimentalmente, è compreso tra 10^2 e 10^6 U.I./ml di RNA HCV; il report illustrato nella figura successiva ne mostra un esempio.

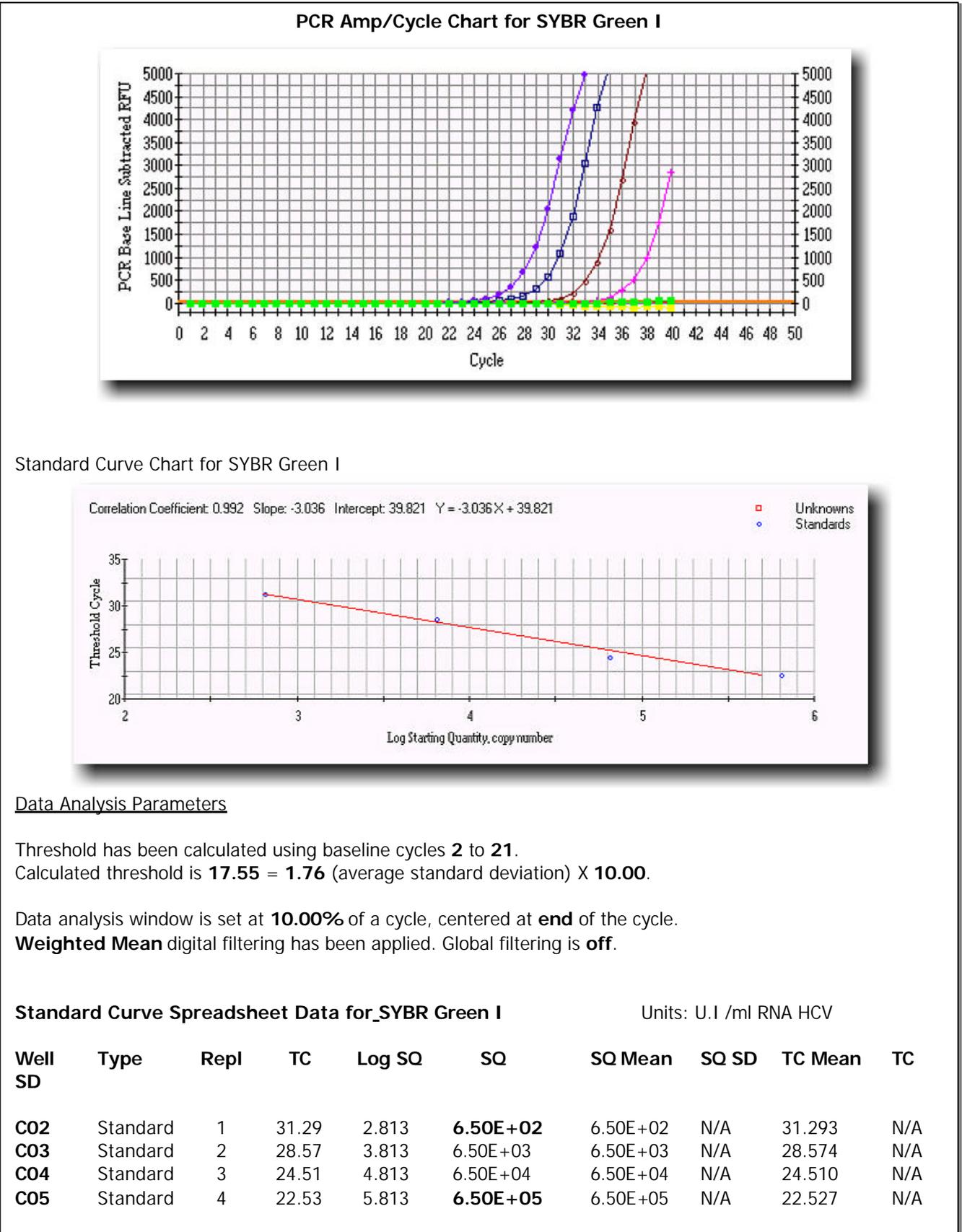


Figura 12: Esempio di Report

La specificità del protocollo analitico, verificabile per ogni seduta di reazione, si evince dalla curva di dissociazione registrata al termine della reazione d'amplificazione.

Il **TM** del prodotto della reazione, amplificato di 236 bp, è di $88^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$; la figura mostra la derivata 1° della curva di dissociazione.

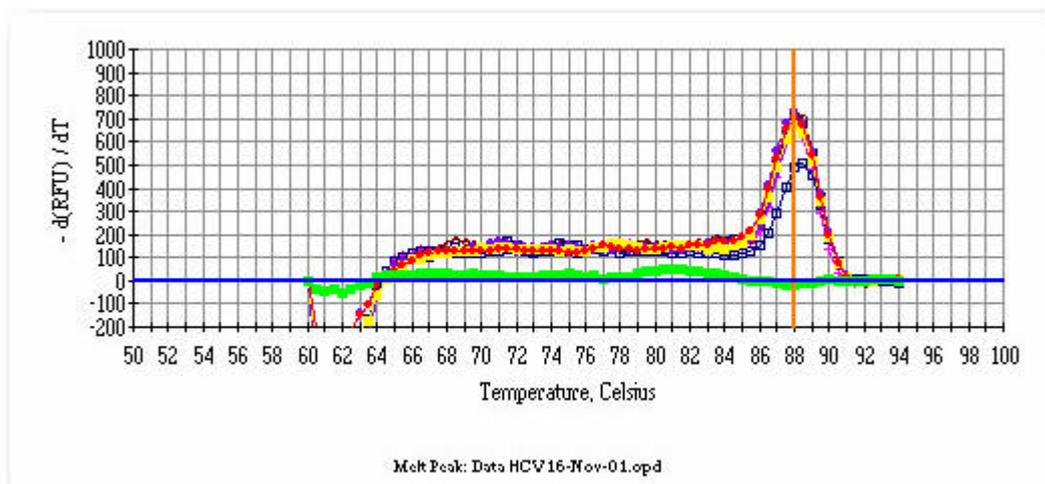


Figura 13: Derivata $\frac{d}{dT}$ della Curva di Dissociazione

L'utilizzo dell'intercalante **SYBR Green I** permette la sicura rivelazione di tutti i prodotti della reazione, fornendo altresì utili informazioni quali: aspecifico, primers, dimers.

La classica rivelazione diretta in gel di Agarosio al 2%, inoltre, conferma la validazione della seduta di lavoro

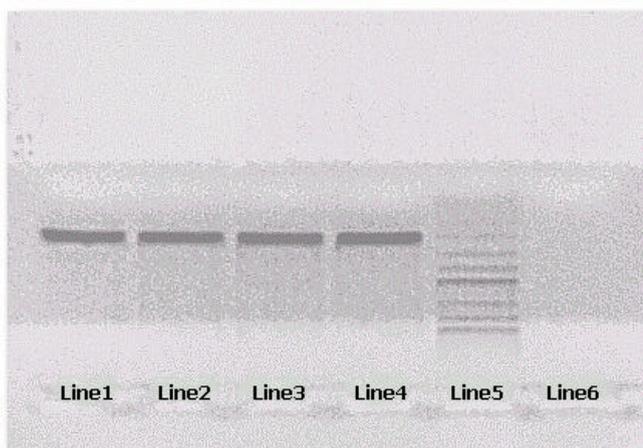


Figura 14: Gel in Agarosio al 2% rivelazione Bromuro di Etidio

LEGENDA:

Line 1	C02	Standard 1	6.50E+02 UI/ml
Line 2	C03	Standard 2	6.50E+03 UI/ml
Line 3	C04	Standard 3	6.50E+04 UI/ml
Line 4	C05	Standard 4	6.50E+05 UI/ml
Line 5		MARKER VIII	
Line 6		Campione Negativo	

CONCLUSIONI

Riteniamo che la HIGH PERFORMANCE AMPLIFICATION sia una importante innovazione, nell'analisi molecolare, per la determinazione della carica virale.

Caratteristiche peculiari della tecnica RTPcr quali l'ampio range di linearità, l'elevata riproducibilità analitica, la semplicità ed immediatezza del risultato, accoppiate all'approfondito studio di ottimizzazione dell'intero processo offrono all'utilizzatore un tool analitico estremamente accurato, robusto e di semplice utilizzo.

La specificità e sensibilità, inferiore alle 200 UI/ml, promuovono l'utilizzo della metodica anche per la determinazione qualitativa di RNA HCV.

La robustezza analitica e i parametri estrapolabili quali il calcolo del ciclo soglia, il coefficiente angolare nel calcolo della curva di calibrazione e la determinazione del TM del prodotto d'amplificazione, permettono all'utilizzatore la valutazione critica della seduta d'amplificazione consentendo il significativo miglioramento degli standards qualitativi del referto.

PRODOTTO DA :



AMMINISTRAZIONE E PRODUZIONE: VIA LOMBARDA, 169/A – 55013 LAMMARI (LU) – TEL./FAX 0583 962672 – EMAIL: adminlucca@genedia.it
info@genedia.it

LABORATORIO RICERCA E SVILUPPO: TRAV. PIETRAVALLE, 11 – 80100 NAPOLI – TEL./FAX 081 5465026 – EMAIL: ricercanapoli@genedia.it

WEB: www.genedia.it

