

DESCRIZIONE DEL KIT SOTTOPOSTO A VALUTAZIONE GD228

TRI-NAT ASSAY

(PRODOTTO DA GENEDIA S.R.L.)

REAGENTI FORNITI IN MISCELE PREALLESTITE

N°TEST 150

I prodotti oggetto della valutazione sono dedicati alla ricerca di HCV-RNA HIV1-RNA e HBV-DNA in campioni di siero/plasma umano a scopo Qualitativo. Il sistema consente la simultanea rivelazione ed identificazione dei tre patogeni e può essere applicati su campioni provenienti da singoli donatori o su mini pool.

Principio del metodo.

Sistema per la ricerca Qualitativa di HCV-RNA su campioni di donatori singoli e/o previa predisposizione di mini - pool (in numero consigliato da 5 a 24 a discrezione dell'utente):

- Preparazione di mini-pool a partire da almeno 0,2 ml di plasma (in caso di pool da 5 campioni) di ciascun donatore.
- Procedura di arricchimento mediante super centrifuga.
- Estrazione del campione con l'uso di sali di guanidinio e precipitazione alcolica dell'RNA in presenza di un carrier.
- Retrotrascrizione ed amplificazione simultanea dell'RNA virale con l'ausilio di una Trascrittasi Termostabile e di una Taq-Polymerase inattivata, in presenza dei seguenti primer specifici:
Primer senso ed antisense diretto verso regione **5'UTR** del virus HCV;
Primer senso ed antisense diretti verso la regione **gag** del virus HIV-1;
Primer senso ed antisense diretti verso la regione **precore** del virus HBV.
- Rivelazione diretta dei tre prodotti di Amplificazione mediante gel di agarosio

Il Kit è composto di tre confezioni:

- 1) I reagenti necessari per l'estrazione dei campioni sono inclusi nella confezione **RNA-DNA EXTRA NAT**.
- 2) Tutti i reagenti e gli enzimi necessari all'esecuzione delle reazioni di Retrotrascrizione ed Amplificazione ed i controlli calibrati, sono contenuti nel Kit **FAST-TRI**.
- 3) Tutti i reagenti necessari per la rivelazione sono inclusi nel Kit **AGAR NAT**.

Tutti i reagenti vengono forniti in miscele preallevate a cui aggiungere gli enzimi ed i primer per l'esecuzione della reazione.

DESCRIZIONE DELLA PROCEDURA

Applicabilità : Su RNA e DNA estratto e purificato (2-30 microlitri).

Numero di Test : 150 campioni.

Conservazione: -20°C

Stabilità: superiore a 12 mesi se correttamente conservato

Materiali e Reagenti Richiesti non inclusi nel Kit:

- -Portaprovette refrigerato
- -Puntali sterili con barriera antiaeriosol
- -Tubi Thin-Walled 0,5 ml oppure 0,2 ml per PCR (Rnase/Dnase free).
- -Tubi Sarstedt 1,6-2,0 ml per estrazione (sterili)
- -2 - mercaptoetanololo
- -Isopropanolo, Etanololo

Strumentazione richiesta:

- Micropipette a volume variabile:

1 set pipette "pre-PCR" per l'estrazione; 1 set pipette "pre-PCR" per la preparazione reagenti; 1 set pipette "post-PCR" per la rivelazione

Volumi richiesti

- 1) 0,5 - 10 microlitri
- 2) 5 - 50 microlitri
- 3) 50 - 200 microlitri
- 4) 200 - 1000 microlitri

- Termociclatore programmabile
- Centrifuga 17.000xg (meglio se refrigerata)
- Vortex
- Agitatore Riscaldante
- Camera elettroforetica orizzontale Submarine
- Alimentatore 10-400 Volt
- Transilluminatore UV
- Sistema fotografico

Tutti i materiali necessari all'esecuzione del test devono essere sterili e monouso. Occorre poter disporre di un set di micropipette dedicato. Si suggerisce di eseguire tutte le operazioni in cappa biologica ed in ghiaccio.

E' tassativo l'uso di guanti durante la manipolazione di campioni e reagenti.

RACCOLTA, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI DA SOTTOPORRE AD INDAGINE

Prelievo dei campioni

Viene consigliata l'esecuzione del test su campioni di plasma. Il sangue deve essere raccolto in presenza di EDTA, in vacutainer sterili (tappo viola tipo Becton e Dickinson). Dopo la raccolta i campioni possono essere conservati a 2-10°C per un tempo non superiore a 72 ore.

Eeguire la procedura di separazione del plasma entro 72 ore dalla raccolta centrifugando a 600 – 1600 g per 20' a temperatura ambiente.

I campioni vanno processati o conservati a -20°C , entro e non oltre 4 ore dalla raccolta.

Trasporto dei campioni

Il trasporto dei campioni dopo la raccolta, nel caso sia richiesto, deve avvenire a $2 - 10^{\circ}\text{C}$. Durante questa fase i campioni non devono rimanere a temperatura ambiente per un periodo superiore alle 8 ore.

Conservazione dei campioni

Il plasma può essere conservato a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ per un periodo non superiore a 7 giorni oppure congelati a -70°C in aliquote da 1 ml in tubi sterili provvisti di tappo a vite (tipo Sarstedt). Non è consigliato sottoporre il campione ad oltre due scongelamenti e ricongelamenti.

Preparazione di mini - pool

La reazione può essere condotta senza alcuna modifica sia su campioni singoli che su mini pool. Il test è stato testato per la preparazione di pool fino a 24 campioni, tuttavia si suggerisce di lavorare su un pool non superiore a 5 campioni allo scopo di mantenere statisticamente valida la rappresentatività del singolo campione.

La procedura di preparazione del mini pool è stata validata con procedura manuale, con l'ausilio di un pipettatore automatico (Mod. Biomek 2000, BECKMAN) e prevede la seguenti fasi.

- Acquisizione del codice a barre (se previsto in fase di accettazione) tramite lettore a pistola e registrazione del campione con *Easy Mini Pool Data Banking Software* (Applicazione di Access, sviluppata da GeneDia e distribuita gratuitamente agli utilizzatori del Kit Tri-NAT GD228).
- Il software permette inoltre di:
 1. Gestire un Archivio Provvisorio di Giornata all'interno del quale non è possibile inserire duplicare i dati delle emo-sacche
 2. Gestire una Archivio storico nel quale vengono registrate tutte le informazioni
 3. Definire Sessioni di lavoro.
 4. Assegnare alle sessioni le emo-sacche da accettare
 5. Raggruppare i dati a gruppi di cinque sacche (MiniPool)
 6. Redigere e stampare una scheda di refertazione
 7. Archiviare tutti i dati
 8. Gestire il protocollo di lavoro per i Test NAT
 9. Spedire i dati in formato.TXT per archivi telematici
 10. Stampare e visualizzare varia documentazione
- Predisporre le provette campione sul rack a 24 posizioni di partenza;
- Predisporre due rack a 24 posizioni di arrivo per la preparazione del mini pool in uso e per l' aliquota da stoccare. I due rack 1 e 2 contengono tubi Sarstedt da 1,7 ml sterili (rack 1) e tubi idonei al congelamento a -70 (rack 2) con capacità non inferiore a 2,5 ml. Sui tubi viene applicata una etichetta con codice a barre, fornita nel kit, che permette il successivo riconoscimento del pool e la sua decodificazione.
- Dalla provetta madre vengono prelevati 0,4 ml da ciascuno dei 5 campioni, che vengono distribuiti nel tubo di stoccaggio.

- Un'aliquota da 1 ml viene poi trasferita nel tubo da processare; la restante quota viene lasciata nel tubo di stoccaggio, che viene conservato a -70°C , per eventuali ripetizioni.
- Il pool in esame viene sottoposto alla procedura di arricchimento.

Procedura di arricchimento (applicare solo in caso di operazioni con mini pool)

La procedura di arricchimento consiste nella sedimentazione per centrifugazione del virus. Ciò consente di operare su una quantità di campione pari ad 1 ml senza modificare le procedure e la strumentazione in uso. Il protocollo prevede:

- Centrifugare i campioni a 24.000 gravità per 60 minuti, oppure 60.000 gravità per 30 minuti, a $2 - 8^{\circ}\text{C}$. Contrassegnare la parete del tubo rivolta verso l'alto. Su questo lato si formerà un leggero pellet. Usare solo tubi tipo Sarstedt (*)
- Con l'ausilio di una pipetta da 1 ml e puntale antiaerosol, rimuovere delicatamente 0,9 ml di supernatante.

Procedere alla fase di estrazione.

Estrazione del campione

Uso del kit RNA/DNA EXTRA NAT

Contenuto della confezione e sua conservazione:

- **Soluzione Lisante** contenente Guanidinio Isotiocianato e sali (12 tubi da 5 ml).

Conservare a 4°C . Controllare che i sali siano completamente disciolti prima dell'uso.

- **RNA-Carrier**

Conservare a 4°C . **Agitare prima dell'uso.**

- **H₂O DEPC:** 1 tubo da 4,5 ml per la risospensione dei campioni. 1 tubo da 0,6 ml per la master mix. Conservare a 4°C .

Procedura

- Preparare la soluzione lisante(**) e distribuire 600 μl della miscela in ciascun tubo contenente il campione arricchito in esame (***). Agitare su Vortex per 1 minuto.
- Lasciare per 10 minuti a Temperatura ambiente. Aggiungere 600 μl di Iso-Propanolo freddo e vortexare per 30 secondi. Tenere 1 minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugare 17.000 gravità per 10 minuti ed eliminare il sovrinatante.
- Lavare con 1ml Etanolo 70%. Vortex 30 secondi centrifugando a 17.000 gravità per 5 minuti ed eliminando il sovrinatante;
- Eseguire un secondo lavaggio con Etanolo 70% allo stesso modo
- Asciugare il pellet e rispondere in 50 μl di H₂O-DEPC.
- Vortexare per 30 secondi; incubare 10 minuti a Temperatura Ambiente.

(*) usare solo Tubi Sarstedt originali, oppure tubi di cui sia stata verificata la resistenza nelle condizioni di lavoro.

(**) la soluzione viene preparata aggiungendo ad un tubo di Lisante 52 μl di 2-Mercaptoetanol e 52 μl di RNA-Carrier, questa soluzione è stabile per almeno una settimana, ma è preferibile prepararla fresca al momento dell'uso.

(***) I controlli di validazione della seduta almeno un positivo e 2 negativi vanno processati insieme ai campioni.

Sintesi di cDNA ed amplificazione

Uso del kit Fast TRI

Contenuto della confezione e sua conservazione:

- **PRE-MIX-RT/PCR** : in soluzione pronta all'uso.

La mix contiene gli additivi necessari per l'esecuzione della retrotrascrizione e dell'amplificazione. Scongela immediatamente prima dell'uso. Agitare accuratamente. Prelevare l'aliquota desiderata evitando di prolungare l'esposizione della soluzione per lungo tempo.

- **Primer HCV NAT-A** : in soluzione, pronto all'uso –
- **Primer HCV NAT-S** : in soluzione, pronto all'uso –
- **Primer HIV NAT-A** : in soluzione, pronto all'uso –
- **Primer HIV NAT-S** : in soluzione, pronto all'uso –
- **Primer HBV NAT-A** : in soluzione, pronto all'uso –
- **Primer HBV NAT-S** : in soluzione, pronto all'uso –
- **R.I. Inibitore di ribonucleasi** : in soluzione pronta all'uso -
- **MIX di Enzimi di Retrotrascrizione ed Amplificazione** : in soluzione pronto all'uso.

Attenzione non usare Enzimi diversi da quello contenuto nel Kit. Gli Enzimi vanno conservati a -20°C . Essi sono sospesi in una soluzione ad alta viscosità, per impedirne il congelamento e scongelamento e, pertanto, la perdita di attività biologica. E' indispensabile, seguire le seguenti precauzioni:

Agitare accuratamente il tubo manualmente. Centrifugare brevemente. Aspirare lentamente la quantità di enzima necessaria per l'esecuzione del test.

Distribuire nella MASTER-MIX avendo cura che la diffusione sia omogenea.

- **Controllo Positivo (High) : Controllo positivo non infettivo ad alta concentrazione (65.000 UI/ml di HCV-RNA pronto all'uso, già in soluzione lisante) -
Conservazione -20°C .**
- **Controllo Positivo (Low) : Controllo positivo non infettivo a bassa concentrazione (50 UI/ml HCV-RNA, 200 copie/ml per HIV e 50 copie/ml per HBV), pronto all'uso -**

attenzione lo standard Low è fornito in aliquote da 1 ml e deve essere arricchito mediante centrifugazione con la stessa procedura dei pool di campioni. La positività del controllo rappresenta la validazione della seduta. Il controllo è stato calibrato rispetto agli standard Internazionali *WHO N° 96/790 e NIBSC N° 98/756 per HCV, WHO 97/656 e NIBSC N° 99/634 per HIV; WHO 97/746 e NIBSC 98/780 per HBV.*

Conservazione -20°C / -70°C .

Procedura

- Scongellare i reagenti e portarli a Temperatura Ambiente.
- Agitare accuratamente le PREMIX-RT e PCR per ottenere un'omogenea distribuzione dei reagenti in esse contenuti.
- Predisporre i tubi per l'esecuzione della reazione di Retrotrascrizione nel portatubi refrigerato, includendo **i tubi per un controllo positivo** ed almeno **due controlli negativi** (anche H₂O estratta con i campioni).
- Preparare gli enzimi nel portatubi refrigerato.

<i>Preparazione della Master Mix per un test</i>		<i>x N° di Test Totali</i>
H₂O-DEPC	q.b. per 40 µl finali
Rib. Inibitore (40U.I./ µl)	0,5µl (20 U.I.)
PREMIX-RT/PCR	25 µl
Primer NAT A	1µl
Primer NAT S	1µl
Primer HIV1 NAT A	1µl
Primer HIV1 NAT S	1µl
Primer HBV NAT A	1µl
Primer HBV NAT S	1µl
MIX RT/Taq-Polymerase	1µl
VOLUME TOTALE	40 µl	

Moltiplicare i valori riportati per singolo test per il numero di test che si vuole eseguire per singola seduta per ottenere la MIX finale.

DISTRIBUIRE 40 microlitri di MASTER-MIX nei tubi predisposti per la reazione.

Aggiungere 10 microlitri di campione per tubo e porre in **TERMOCICLATORE PRERISCALDATO** a 58°C.

Eeguire il seguente ciclo di Temperature :

1 ciclo	58°C 20'	95°C 5'	
2 cicli	95°C 30"	58°C 1'	72°C 1'
38 cicli	95°C 30"	58°C 30"	72°C 45"
1 ciclo	72°C 10'	Storage 4°	

Rivelazione del prodotto di reazione

Uso del kit Agar NAT

Contenuto della confezione e sua conservazione:

- 12 tubi di Agarosio prepesato 1 g. per tubo. Conservare a Temperatura ambiente.
- 2 confezioni di TBE 5X da 150 ml, in soluzione sterile. Diluire 10 volte prima dell'uso. Conservare a 4°C.
- 1 tubo loading buffer 6 X. Conservare a 4°C.
- 1 tubo Intercalante 10.000X. Conservare a -20°C.
- 1 tubo Marcatore Pesi Molecolari 5ug, liofilo. Conservare a -0°C.

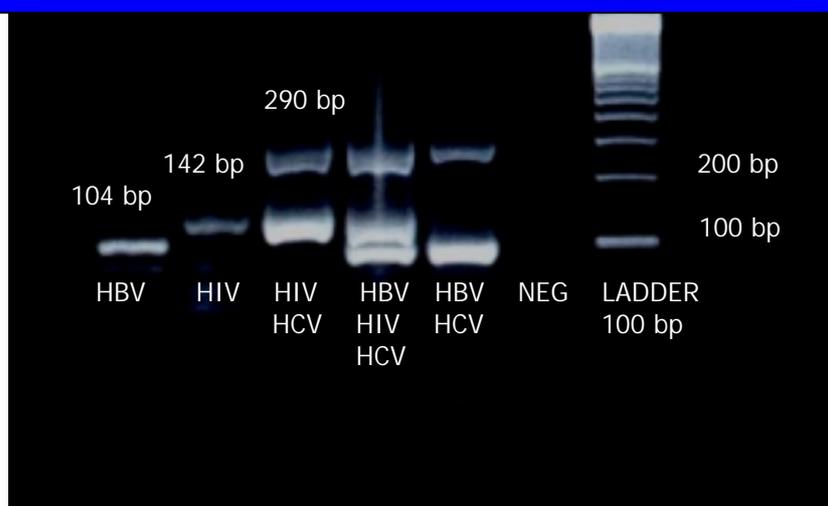
Preparazione: Centrifugare brevemente prima di aprire il tubo. Aggiungere 50 µl di H₂O sterile, risospendere. Usare almeno 2,5 µl per lane.

Procedura

- Preparare 500 ml di TBE 0,5X aggiungendo a 450 ml di H₂O bidistillata, 50 ml di tampone 5X.
- L'elettrolita una volta versato nella camera può essere utilizzato per 2 migrazioni. Il volume di 500 ml è indicativo per una camera di migrazione standard, possono essere in uso, tuttavia, camere di dimensioni diverse per le quali può essere necessario preparare un volume maggiore o minore di elettrolita. Condizione indispensabile perché la migrazione avvenga correttamente è che la superficie del gel sia coperta per almeno 4 mm dall'elettrolita.
- Assicurarsi che il gel tray sia ben pulito ed asciutto prima dell'uso. Porre il tray su di un piano livellato e mettere in sede le barriere di ritenzione del gel o avvolgerlo di nastro adesivo, posizionare il pettine idoneo.
- In un beaker o in una beuta (usare un contenitore il cui volume sia almeno 4 volte superiore al volume di TBE utilizzato) versare 50 ml di TBE 0,5X ed aggiungere il contenuto di un tubo di Agarosio. Porre su agitatore riscaldante (80-90°C in agitazione) o in forno a microonde (circa 2' sulla posizione MEDIUM) ed attendere la completa dissoluzione della polvere.
- Raffreddare a 50°C circa ed aggiungere 5 µl di Intercalante, agitare e versare lentamente sul Gel-Tray predisposto in precedenza (evitare la formazione di bolle d'aria).
- Attendere la polimerizzazione del Gel (non spostare il tray prima che il gel sia completamente solidificato). Il gel necessita di 15-30 minuti per solidificare. Rimuovere il pettine e le barriere (o il nastro) e posizionarlo nella camera di separazione. Aggiungere TBE fino a coprire per almeno 4 mm la superficie del gel.
- In figura viene riportato un esempio del risultato ottenuto

TRI-NAT ASSAY

Rivelazione multipla di HIV1-RNA, HCV-RNA e HBV-DNA in singola reazione su campioni di plasma coinfectato



Valutazione della seduta di lavoro

La seduta risulta validata solo in caso di positività del controllo LOW (multiplo HBV-HIV1-HCV calibrato), ed in assenza di Cross – Contaminazione eventualmente rilevabile attraverso i controlli negativi. In caso di positività dei campioni si consiglia di bloccare la distribuzione di tutti i campioni costituenti il mini pool e di procedere immediatamente all'analisi dei singoli campioni.

Precauzioni da adottare

Adottare le seguenti misure per l'organizzazione del lavoro e del laboratorio:

- Verificare che i flussi di lavoro all'interno del laboratorio si muovano in maniera unidirezionale, ovvero che abbiano inizio nell'area di Pre – Amplificazione e proseguano fino alla zona di Post - Amplificazione senza inversione di flusso.
- Utilizzare sempre guanti mono uso, cambiandoli ogni volta che si sospetta una possibile contaminazione degli stessi ed ogni volta che si abbandona un'area.
- Utilizzare strumentazione, reagenti e consumabili dedicati per ciascuna area, senza trasferire da un'area all'altra.
- Al fine di ottenere il massimo delle performance dal sistema è indispensabile che vengano rispettate le G. L. P. (Good Laboratory Practice).
- A causa della elevata sensibilità del sistema è indispensabile porre la massima attenzione alla preservazione della purezza dei reagenti. Qualsiasi sospetto sulla integrità di questi deve indurre alla loro eliminazione.

Limitazioni all'esecuzione del test

La riuscita dell'indagine è strettamente correlata ad una corretta raccolta, separazione, trasporto e conservazione dei campioni. La presenza di Eparina come anticoagulante può inibire la reazione di amplificazione.

Alcune variabili possono interferire con la rivelazione delle particelle virali come:

- il numero di particelle virali presenti e la loro distribuzione;
- fattori collegati al paziente (età, presenza di sintomi) e/o lo stadio di infezione;
- il numero di costituenti il mini – pool.

SPECIFICHE TECNICHE DEL SISTEMA TRI-NAT (GD228)

Campione in esame: plasma umano raccolto in presenza di EDTA come anticoagulante. E' da evitare l'uso di eparina che può inibire il processo di Amplificazione.

N° di analiti ricercati per singola reazione : 3

Tipo di analiti per singola reazione: HCV-RNA, HIV1-RNA, HBV-DNA.

Sensibilità per singolo analita:

HCV-RNA	50UI/ml	(Ref. STD WHO 96/790 100.000 UI/ml)
HIV1-RNA	200 copie/ml	(Ref. STD WHO 97/656 100.000 UI/ml)
HBV-DNA	100 copie/ml	(Ref. STD WHO 96/790 500.000 UI/ml)

Specificità del metodo:

La specificità analitica è stata valutata rispetto ai seguenti isolati virali e batterici:

Adenovirus tipo 2/3/7	Varicella Zoster	Coxsackievirus B1
Citomegalovirus AD 169	HRV	Staphilococcus epidermidis
HHV – 6/7	HTLV-I/II	HGV
HSV – 1/2	Chlamidia Trachomatis	TTV
HAV	Echovirus 1	Micobacterium Tuberculosis

Nessuno degli isolati ha dimostrato reattività al test.

Genotipi evidenziati:

Il sistema è stato testato sui seguenti genotipi:

Per HCV-RNA genotipi 1/2/3 singolarmente e su pool eterogenei;

Per HIV1-RNA genotipo B;

Per HBV-DNA genotipo adw;

Le calibrazioni sono state raffrontate agli standard di riferimento internazionali forniti dalla WHO e citati in precedenza. Tutti i campioni sono risultati reattivi a concentrazioni comprese le 25 e le 100 UI/ml.

Sistemi di prevenzione della contaminazione:

Identificazione e predisposizione dei flussi di lavoro in laboratorio.

Adeguata istruzione degli operatori presso i nostri laboratori e presso la sede di esecuzione, rispetto alle GLP (good laboratory practice) da seguire per ridurre il rischio di cross – contaminazione.

Predisposizione di ambienti ed attrezzatura dedicata per i singoli step di reazione.

Controlli di qualità:

I controlli contenuti nel kit sono tutti calibrati rispetto agli standard di riferimento internazionali (*WHO std 96/790 per HCV, WHO 97/656 per HIV, WHO 97/746 per HBV*) oltre che rispetto allo standard *QCHCV.1 (00/01)*, validato dal controllo di qualità inter - laboratorio condotto in collaborazione con *Il Gruppo di Studio Italiano per il Controllo di Qualità sull'applicazione delle tecniche di Biologia Molecolare per la sicurezza del sangue e degli emoderivati*.

Controllo interno di verifica delle inibizioni:

Il sistema non prevede allo stato attuale un controllo interno, per offrire la massima sensibilità sui singoli analiti ricercati. La procedura di estrazione del campione è stata tuttavia validata in condizioni diverse di inibizione (emolisi, iper - lipemia, farmacoterapia), dimostrando una efficace rimozione di queste.

Precisione intra ed inter – assay:

Calcolata utilizzando gli stessi lotti di reagenti e lo stesso controllo a bassa viremia per un numero non inferiore a 30 campioni, oppure con tre lotti diversi di enzimi reagenti campioni. I campioni testati sono stati analizzati anche con metodica alternativa di ricerca qualitativa dei tre patogeni.

Il limite di rivelazione è stato definito su 6 serie di diluizioni (4 replicati per diluizione) in sei giorni diversi, eseguite su un "Working Reagent" calibrato rispetto agli standard internazionali della WHO (*96/790*;

97/756; 97/746). Il punto di cut - off viene definito come il numero minimo di sequenza target per volume di campione rilevato nel 95% dei test.

Come espresso nella sezione sensibilità analitica, i valori ritrovati sono:

HCV-RNA 50 UI/ml (secondo lo standard internazionale WHO 96/790)

HIV1-RNA 200 copie/ml (secondo lo standard internazionale WHO 97/756)

HBV-DNA 50 copie/ml (secondo lo standard internazionale WHO 97/746)

Campioni singolarmente infetti con viremie uguali a quelle riportate sono stati analizzati in tre diversi laboratori (GeneDia R&D NAPOLI, SIMT BERGAMO, P.M. Caserta 1) con i seguenti risultati:

ANALITA	Precisione Intra ASSAY	Precisione Inter ASSAY
HCV – RNA	99,66%	97,6%
HIV – RNA	99%	96,2%
HBV - DNA	98,66%	97%

Tipo di rivelazione:

Il tipo di rivelazione utilizzato è DIRETTA e si ottiene mediante elettroforesi in gel di Agarosio.

Tale sistema di rivelazione è l'unico che consente la rivelazione target di amplificazione multipli, con identificazione specifica del patogeno senza ricorrere a successive conferme.

Viene fornita idonea apparecchiatura per la produzione della documentazione fotografica del protocollo di lavoro eseguito.

Tipo di standardizzazione e validazione del metodo

La validazione dei reagenti è stata eseguita secondo gli schemi dettati dalle linee guida europee.

SPECIFICITA' : definita su 100 pool di plasma negativi testati in doppio con il SIMT di Bergamo ed il Presidio Multizonale di CE. I pool sono stati inoltre testati anche con metodica di RT-PCR qualitativa a due step.

LIMITE DI RIVELAZIONE: è stato definito su 6 serie di diluizioni (4 replicati per diluizione) in sei giorni diversi, eseguite su un "Working Reagent" calibrato rispetto agli std internazionali della WHO (96/790; 97/756; 97/746). Il punto di cut - off viene definito come il numero minimo di sequenza target per volume di campione rilevato nel 95% dei test.

ROBUSTEZZA: calcolata utilizzando gli stessi lotti di reagenti e lo stesso controllo a bassa viremia per un numero non inferiore a 30 campioni, oppure con tre lotti diversi di enzimi reagenti campioni.

CROSS CONTAMINAZIONE: valutata su pannelli di almeno 20 campioni con alternanza di negativi e positivi con viremia maggiore o uguale a 10^4 UI/ml

Autorizzazioni e Certificazioni di Qualità

E' in fase di esecuzione la procedura di registrazione del Kit.

L'azienda produttrice è certificata ISO 9002 ed è in fase di implementazione la certificazione ambientale ISO 14001

VALIDAZIONE DEL SISTEMA TRI-NAT

La validazione del sistema è stata prodotta riferendosi alla linea guida CPMP (Committee for proprietary medicinal products)/BWP (Biotechnology working party)/390/97 e la linea guida PA/PH/OMCL (Official medicines control laboratory) (98).

SPECIFICITÀ

Viene definita come la capacità del sistema di rilevare, in maniera inequivocabile, sequenze specifiche di acidi nucleici in presenza di una matrice biologica complessa.

La specificità della procedura analitica di amplificazione del DNA è strettamente correlata alla scelta della regione target, che deve essere estremamente conservata, ed alla scelta dei primers utilizzati per il riconoscimento del target stesso.

Le regioni target selezionate per l'applicazione del Tri-NAT sono:

5'UTR per HCV-RNA (due primer HCV-NAT Antisense nt 312 di 24 basi e HCV-NAT Senso nt 21 di 30 basi vengono utilizzati nella reazione di RT-PCR).

Regione **gag** per il Virus HIV1 (due primer sk431 ed sk462 ben noti in letteratura, vengono utilizzati nella reazione di RT-PCR per produrre un frammento di 142 bp)

Regione **precore** del virus HBV (due primer PB1 e PB2vengono utilizzati nella reazione di amplificazione per produrre un frammento di 104 bp).

Al fine di confermare l'appartenenza dei frammenti di DNA ottenuti nelle condizioni descritte per il Tri-NAT assay, fossero realmente appartenenti alle regioni genomiche dei singoli virus, sono stati ulteriormente analizzati utilizzando:

- Nested PCR;
- Calcolo del peso Molecolare su gel di agarosio e mediante Elettroforesi Capillare;
- Ibridazione e rivelazione su micropiastra;
- Sequenziamento.

Studio di Specificità per la ricerca di HCV-RNA

Il DNA prodotto per HCV-RNA 291 bp è stato sottoposto a nested PCR con due primers interni di 24 basi posti in posizione 306 e 67 della sequenza di HCV. Il prodotto di PCR ottenuto aveva le dimensioni di 239 bp.

Il peso molecolare del prodotto di PCR di 291 bp e del suo frammento interno, sono stati valutati mediante gel di agarosio a confronto con uno standard di frammenti di DNA a peso molecolare noto.

Il peso molecolare dei due frammenti di PCR ottenuti è stato inoltre calcolato con l'ausilio della Elettroforesi Capillare, dopo aver costruito una curva di calibrazione contro lo standard di riferimento.

Successivamente un sistema di rivelazione DEIA è stato utilizzato per ibridare frammenti ottenuti con la reazione di RT-PCR, utilizzando una sonda specifica di 21 basi in posizione 140-151 della sequenza di HCV-RNA.

Infine i DNA amplificati ottenuti da 2 soggetti HCV-RNA positivi ed HCV- Ab positivi, tipizzati per la regione core come 1b e 3a rispettivamente, sono stati sottoposti, previa purificazione, a reazione di sequenza con l'ausilio degli stessi due primers utilizzati per la reazione di RT – PCR .

Su 100 plasma pools, negativi per HCV - Ab ed HCV-RNA, provenienti dal SIMT dell'Ospedale di Bergamo e dal SIMT della Seconda Università degli Studi di Napoli (Azienda Universitaria Policlinico), la reazione ha dato risultato negativo.

Infine l'analisi di campioni a titolo variabile, provenienti da soggetti infetti con Virus appartenenti ai ceppi 1 e 3, ha dato risultati confrontabili a viremie comprese tra le 50 e le 600 UI/ml.

Studio di Specificità per la ricerca di HIV1-RNA

Il peso molecolare del prodotto di PCR di 142 bp è stato valutato mediante gel di agarosio a confronto con uno standard di frammenti di DNA a peso molecolare noto. Il peso molecolare del frammento di PCR ottenuto è stato inoltre calcolato con l'ausilio della Elettroforesi Capillare, dopo aver costruito una curva di calibrazione contro lo standard di riferimento.

Infine il DNA amplificato ottenuto da 2 soggetti HIV1-RNA positivi ed HIV1 - Ab positivi, tipizzati per il gene *pol* come sottotipo B, sono stati sottoposti, previa purificazione, a reazione di sequenza con l'ausilio degli stessi due primers utilizzati per la reazione di RT – PCR .

Su 100 plasma pools, negativi per HIV1 - Ab ed HIV1- RNA, provenienti dal SIMT dell'Ospedale di Bergamo e dal SIMT della Seconda Università degli Studi di Napoli (Azienda Universitaria Policlinico), la reazione ha dato risultato negativo.

Studio di Specificità per la ricerca di HBV-DNA

Il peso molecolare del prodotto di PCR di 104 bp è stato valutato mediante gel di agarosio a confronto con uno standard di frammenti di DNA a peso molecolare noto. Il peso molecolare del frammento di PCR ottenuto è stato inoltre calcolato con l'ausilio della Elettroforesi Capillare, dopo aver costruito una curva di calibrazione contro lo standard di riferimento.

Infine il DNA amplificato ottenuto da 2 soggetti HBV-DNA positivi ed HBsAg positivi, tipizzati per precore come genotipo A e B, sono stati sottoposti, previa purificazione, a reazione di sequenza con l'ausilio degli stessi due primers utilizzati per la reazione di RT – PCR .

Su 100 plasma pools, negativi per HIV1 - Ab ed HIV1- RNA, provenienti dal SIMT dell'Ospedale di Bergamo e dal SIMT della Seconda Università degli Studi di Napoli (Azienda Universitaria Policlinico), la reazione ha dato risultato negativo.

La specificità analitica è stata anche valutata rispetto ai seguenti isolati virali e batterici:

Adenovirus tipo 2/3/7	Varicella Zoster	Coxsackievirus B1
Citomegalovirus AD 169	HRV	Staphylococcus epidermidis
HHV – 6/7	HTLV-I/II	HGV
HSV – 1/2	Chlamidia Trachomatis	TTV
HAV	Echovirus 1	Micobacterium Tuberculosis

Nessuno degli isolati ha dimostrato reattività al test.

In appendice (A) vengono riportati i dati per esteso, relativi alla sperimentazione eseguita.

LIMITE DI RIVELAZIONE

Il livello di cut – off positivo (secondo la definizione data nel Ph. Eur. General Method 2.6.21), rappresenta la minima quantità di sequenze target per volume, rivelabile nel 95% dei test eseguiti. Questo valore può essere fortemente influenzato dalla distribuzione dei genomi virali nel singolo campione testato, oltre che da fattori di inibizione presenti nel campione a dall'efficienza degli enzimi utilizzati nella reazione.

Preparazione degli standard di riferimento

Per la definizione del cut – off positivo è indispensabile disporre di riferimenti accuratamente calibrati relativi ai patogeni in esame. A tale scopo sono stati preparati standard relativi ai singoli patogeni, da pool eterologhi, con singola infezione, HIV1, HCV, HBV. I pool per singolo patogeno sono stati calibrati utilizzando due metodologie, branched DNA e Limiting Dilution RT-PCR. I test sono stati eseguiti avendo come riferimento gli standard internazionali forniti dalla WHO e gli standard forniti dalla Boston Biomedical (per HCV-RNA). Almeno cinque ripetizioni su 5 diluizioni diverse, sono state utilizzate.

La titolazione di HBV-DNA, oltre che riferita allo standard internazionale WHO, è stata eseguita anche usufruendo di uno standard sintetico, ottenuto mediante amplificazione della regione precore – core compresa tra il nucleotide 1547 ed il nucleotide 2397 di un soggetto infetto con genotipo A wild type. Il prodotto di PCR è stato purificato e quantizzato spettrofotometricamente. La purezza del DNA ottenuto è stata valutata su gel di agarosio e mediante corsa in Elettroforesi Capillare con rivelazione a 254 nm.

In appendice (B) vengono riportati i dati per esteso, relativi alla sperimentazione eseguita.

Le calibrazioni ottenute sono riportate in tabella 1.

Tab.1

Patogeno	Copie/ml	UI/ml	Reference Standard
HCV-RNA	2.600.000 ± 12,9%	650.000	WHO 96/790
HIV-RNA	222.000 ± 9%		WHO 97/756
HBV-DNA	60.000.000 ± 8%		WHO 97/746

Aliquote da 10 ml in tubi falcon sterili e da 0,5 ml in tubi sarstedt sterili dei pool eterologhi di ciascun patogeno sono state preparate in agitazione continua e conservate per due giorni a -20°C , quindi stoccate a -80°C .

Il 30% della preparazione è stata addizionata di Soluzione Lisante (Guanidinio Tiocianato tamponato), in rapporto 1 parte di pool e 4 parti di soluzione lisante e stoccate allo stesso modo.

Definizione del limite di rivelazione

Il cut-off positivo è stato ottenuto secondo le linee guida europee, su 4 diverse diluizioni degli standard di riferimento a diluizioni limite. La sperimentazione è stata condotta nel seguente modo:

Diluizioni logaritmiche degli standard di riferimento sono state sottoposte a reazione fino a definire il primo punto di negatività e l'ultimo punto di positività. Una volta individuate le concentrazioni relative 4 diluizioni di ciascun patogeno, sono state ripetute in 4 replicati (2 concentrazioni positive e 2 negative) per definire il numero di sequenze target detectabile nel 95% dei casi.

I dati ottenuti sono riportati nella tabella 2:

Tab. 2-

Patogeno	Concentrazione/ml	Concentrazione/ RT Senza Arricchimento	Probit (+)	Concentrazione/RT Dopo Arricchimento	Probit (+)
HCV-RNA	600 UI/ml	12	100%	120	100%
	300 UI/ml	6	95%	60	100%
	150 UI/ml	3	85%	30	100%
	75 UI/ml	1,5	70%	15	100%
	50 UI/ml	1	65%	10	100%
HIV1-RNA	800 c/ml	16	100%	160	100%
	400 c/ml	8	98%	80	100%
	200 c/ml	4	95%	40	100%
	100 c/ml	2	80%	20	100%
	50 c/ml	1	70%	10	100%
HBV-DNA	400 c/ml	8	100%	80	100%
	200 c/ml	4	88%	40	100%
	100 c/ml	2	75%	20	100%
	50 c/ml	1	58%	10	100%

RIPRODUCIBILITÀ

La riproducibilità del sistema è stata valutata sui pool di plasma validati in precedenza.

Aliquote da 0,5 ml di questo pool sono state preparate in condizioni di agitazione costante e sotto cappa sterile.

Lo studio è stato condotto nel corso di 6 mesi dal Marzo 2000 a Settembre 2000. I valori di area ottenuti, dopo lettura con elettroforesi capillare, sul prodotto dell'amplificazione vengono riportati in grafico in base tempo (Fig.1).

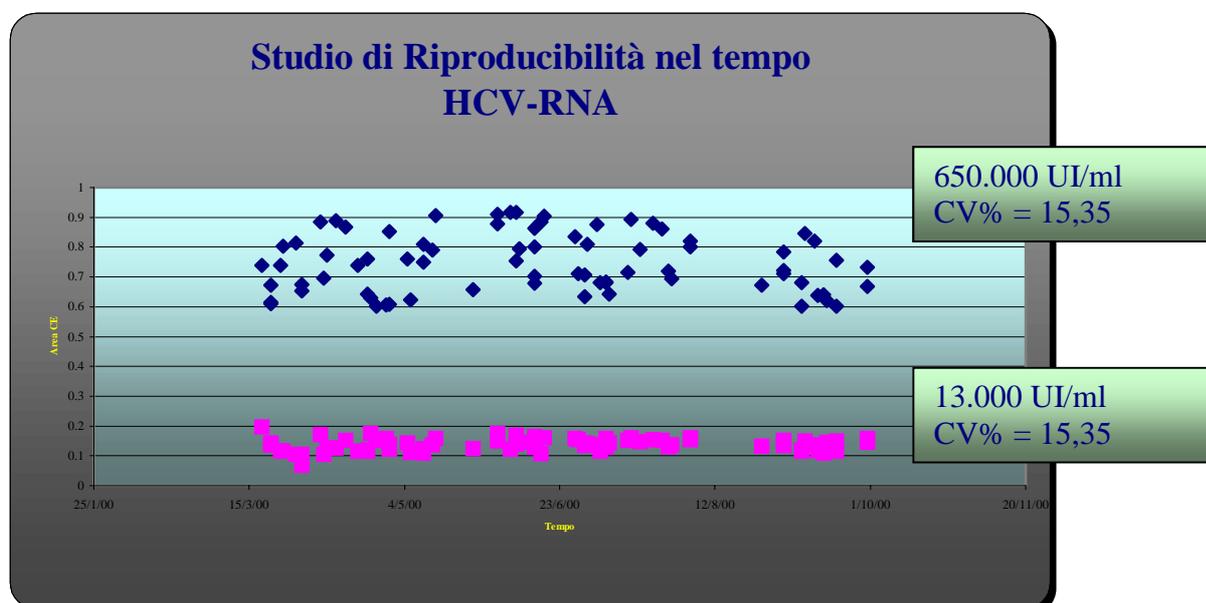
Vengono programmate indagini consecutive in giorni diversi di due campioni con diversa viremia secondo lo schema:

	HIGH		LOW	
	copie/ml	UI/ml	copie/ml	UI/ml
HCV-RNA	2.600.000	650.000	52.000	13.000
HIV1-RNA	200.000		5.000	
HBV-DNA	6.000.000		6.000	

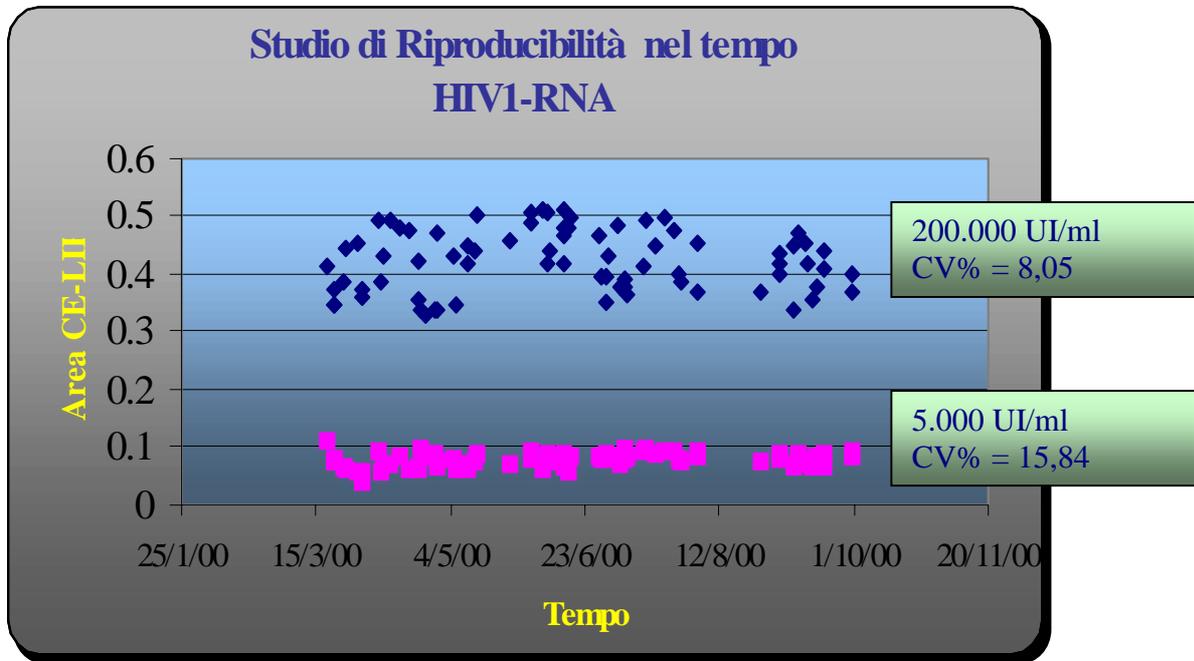
Lo studio è stato condotto nel corso di 6 mesi dal Marzo 2000 a Settembre 2000. I valori di area ottenuti, dopo lettura con elettroforesi capillare, sul prodotto dell'amplificazione vengono riportati in grafico in base tempo (Fig.1,2,3).

I dati statistici ottenuti sono riportati nella tabella:

HCV-RNA	650.000 UI/ml	13.000 UI/ml
MEDIA VALORI AREA CE	0,747	0,138
DEVIAZIONE STD	0,096	0,0212
C.V. %	12,92	15,35



HIV1-RNA	200.000 UI/ml	5.000 UI/ml
MEDIA VALORI AREA CE	0.452587	0.078217
DEVIAZIONE STD	0.036458	0.012391
C.V. %	8.055492	15.84193



HBV-DNA	200.000 UI/ml	5.000 UI/ml
MEDIA VALORI AREA CE	0.93828	0.097
DEVIAZIONE STD	0.076174	0.011
C.V. %	8.11847	11.577

