Scheda tecnica
GD 641 Real Quali Micro
Contaminazione batterica nelle piastrine

DESTINAZIONE D'USO: Il Real Quali Micro Kit, è un test qualitativo *in vitro* per una rapida rivelazione della contaminazione batterica nei preparati di piastrine, mediante la tecnica della Real Time PCR (Polymerase Chain Reaction). Le informazioni ottenute tramite il test, congiuntamente ad eventuali altre indagini di laboratorio (come ad es. la crescita batterica in coltura), consentono di determinare tale contaminazione.

INTRODUZIONE E PRINCIPIO DEL METODO: La contaminazione batterica dei prodotti ematici è una delle principali cause di morbilità e mortalità correlate alle trasfusioni (100-150 trasfusi ogni anno negli USA), con un tasso mortalità pari ad 1 ogni 20-85 mila donazioni, e negli USA è la seconda causa di morte in seguito a trasfusioni. A causa della loro conservazione a 20°-24°C, in condizioni aerobiche, fino a 5 giorni, le piastrine consentono ad un'amplia varietà di batteri di proliferare, e pertanto le trasfusioni di piastrine sono responsabili della maggior parte dei casi di sepsi associate agli emoderivati. Più del 30% delle complicanze cliniche correlate alle piastrine è dovuto alla specie *Staphilococcus* (in particolar modo *S.epidermidis* e *S.aureus*), ma numerose altre specie possono esserne responsabili. L'incidenza della contaminazione batterica delle piastrine è di circa 1 caso ogni 2-3 mila donazioni, ed il rischio di ricevere piastrine contaminate è 50-250 volte maggiore di ricevere prodotti contaminati da HIV, HBV. Per tutte queste motivazioni l' American Association of Blood Bank (AABB) a partire dal marzo 2004 ha imposto ai servizi trasfusionali metodi per limitare e rilevare la contaminazione batterica nelle piastrine. Lo screening per la ricerca batterica nelle piastrine viene già eseguito in alcune nazioni europee come il Belgio (dal 1998) e Olanda (novembre 2001). Un test per la ricerca della contaminazione batterica nelle piastrine deve essere pertanto rapido, affidabile, adeguatamente sensibile, specifico e semplice da effettuare. Inoltre è indispensabile che il DNA batterico sia estratto nel modo più efficace possibile, e che la mix di PCR non debba essere contaminata da DNA batterico presente nei reagenti (come ad es. la *DNA Polymerase*, ottenuta da *E.Coli* ricombinante), causa di falsi positivi. La metodica di PCR tuttavia presenta un limite: l'impossibilità di distinguere tra organismi vivi e morti (come avviene invece per la crescita batterica in coltura). Il Real Quali Micro Kit è stato studiato per consentire una rapida rivelazione della regione conservata 16S rDNA ,comune ad un'amplia popolazione batterica, mediante l'uso di un protocollo HPA (High Performance Amplification) che coniuga le conoscenze acquisite con le tecniche Real Time PCR e l'ottimizzazione della reazione d'amplificazione.

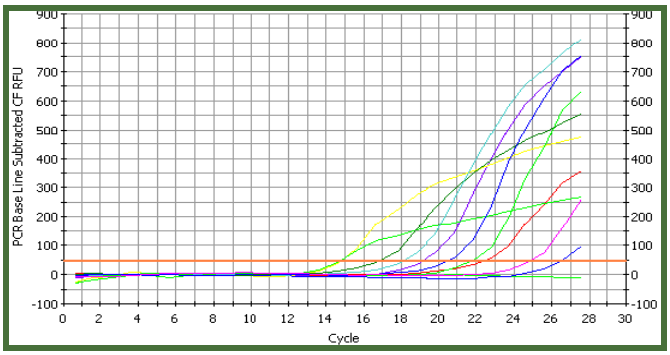


Il Real Quali Micro contiene i reagenti necessari per l'esecuzione del **protocollo analitico, costituito da tre processi:**

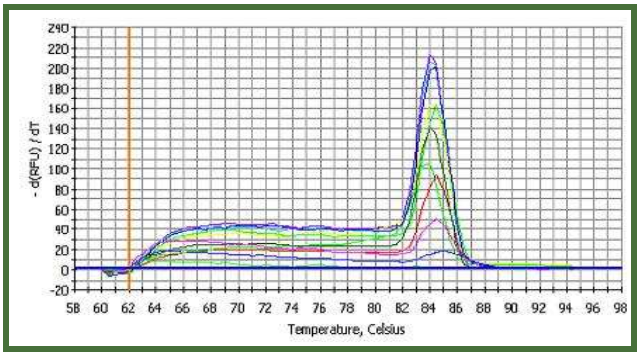
- **Estrazione** (da piastrine) e purificazione dell'acido nucleico batterico (DNA)
- **Purificazione** mediante enzima di restrizione, della contaminazione batterica dei reagenti (DNA TAQ Polymerase)
- **Amplificazione** e rivelazione automatica della eventuale contaminazione batterica dei campioni di piastrine, mediante Real Time PCR/SyBr Green I con determinazione del TM per ogni campione.

IL TARGET

La regione **16S r-DNA** del genoma batterico è particolarmente indicata per la selezione del target, in quanto altamente conservata per un amplio numero di batteri. Il Kit utilizza due primers 16S rev e 16S fwd che definiscono una porzione di 466 bp nell' ambito di tale regione (16S del genoma batterico); la regione complementare ai due primers è rappresentata per il maggior numero di batteri conosciuti, garantendo la specificità analitica. La reazione di amplificazione avviene(previa disattivazione dell'enzima di restrizione) ad opera di una TAQ-DNA polimerasi termostabile che, in presenza del cofattore Mg^{2+} e di un opportuno tampone contenete i dUTPs/ dNTPs, garantisce un'elevata emivita ed omogenea efficienza per l'intero processo analitico. Nella mix dei deoxynucleosidi trifosfati, la deoxitimidina è sostituita con il deoxyuracile consentendo un' eventuale utilizzo della Uracil DNA glicosilasi per il controllo del carry over.



PLOT D'AMPLIFICAZIONE



CURVA DI DISSOCIAZIONE

VERIFICA DELLA SPECIFICITA' ANALITICA

All'ultimo step del programma del termociclatore, viene eseguita la curva di melting (mediante un gradiente di temperatura da 60°C a 95°C) durante la quale si ha una registrazione della variazione della fluorescenza dei campioni in funzione della temperatura. Il software visualizza l'andamento della curva di fluorescenza e la sua derivata prima.

Ai fini della validazione dei risultati, si rende necessario verificare, da una parte, la presenza di un picco di dissociazione, specifico per il DNA batterico, la cui temperatura varia in funzione del tipo di batterio presente (ad es. 84°C±0,5 per Stafilococco Epidermidis), dall' altra la sua assenza per il controllo negativo. Eventuali picchi a temperature inferiori a 81°C, segnalano la presenza di reazioni aspecifiche (dimeri di primers), generalmente presenti nei campioni negativi o con bassa carica batterica. La presenza di questi templati non compromette il risultato analitico; infatti, l'acquisizione del segnale di fluorescenza avviene alla temperatura di 81°C ,rilevando solo i templati non dissociati, con temperatura di dissociazione superiore a 81°C sino a 87°C vengono tenuti validi.

I campioni che evidenziano picchi con temperature comprese tra 87°C e 95°C sono da considerarsi falsi positivi e se ne consiglia un riesame.

GD 641 REAL QUALI MICRO	
APPLICABILITÀ	Preparati di piastrine
SPECIFICITÀ	Regione 16S r-DNA del genoma batterico
VOLUME DEL CAMPIONE	il processo d'estrazione richiede 0.1 ml di piastrine.
NUMERO DI TEST:	60 reazioni, 50 estrazioni
CONSERVAZIONE:	a -20°C (spedizione refrigerata)
STABILITÀ:	Superiore a 12 mesi se correttamente conservato.
REAGENTI RICHIESTI: NON COMPRESI NEL KIT	Isopropanolo, Etanolo 70%, βmercaptoetanolo