

Info GENEdia

GD 230 REAL BKV (IVD)

Ricerca e determinazione quantitativa del BK virus mediante Real Time PCR

Il polyomavirus BK è molto diffuso in tutto il mondo. L'infezione primaria avviene generalmente nella prima infanzia per via respiratoria. Poi il virus persiste in forma latente a livello renale, nei linfociti e spesso anche nel tessuto cerebrale. In condizioni favorevoli può riattivarsi. Durante la riattivazione il virus viene eliminato nelle urine. L'infezione primaria così come le riattivazioni sono generalmente asintomatiche nei soggetti sani, immunocompetenti. Negli immunodepressi l'infezione può portare a danni clinicamente evidenti di solito a livello dell'apparato urinario e molto raramente può interessare altri organi. Le manifestazioni cliniche più frequenti e più importanti colpiscono i trapiantati di midollo osseo (cistite emorragica) e i trapiantati di rene (nefrite interstiziale BKV-associata, che può portare anche all'insufficienza dell'organo trapiantato). Meno frequenti le manifestazioni gravi in malati di AIDS, dove però si possono avere anche infezioni disseminate, meningite/encefalite.

Tale patologia si sviluppa nel 5-10% di pazienti sottoposti a trapianto di rene e nel 50 % dei casi può evolvere in insufficienza renale. Inizialmente il quadro clinico non è facilmente distinguibile dal rigetto dell'organo, nel caso della nefropatia nei pazienti con trapianto renale. Il controllo sia della infezione primaria che delle riattivazioni virali ha un ruolo fondamentale nella prevenzione degli effetti più drammatici e nella risoluzione della nefropatia. In assenza di farmaci antivirali di sicura efficacia e bassa tossicità, la terapia si basa prevalentemente sulle possibilità di riduzione dell'immunosoppressione, per controllare l'infezione da BKV, con il rischio tuttavia sempre presente di favorire reazioni di rigetto del trapianto.

La diagnosi eziologica è quindi estremamente importante perché comporta di conseguenza interventi terapeutici nettamente diversi (aumento dell'immunosoppressione in caso di rigetto, attenua-

zione dell'immunosoppressione nella nefropatia da BKV, oltre all'eventuale impiego di antivirali). Per la diagnosi di nefropatia BKV associata si fa ricorso all'esame di biopsie renali tramite immunoistochimica per l'individuazione di antigeni virali nel tessuto in un contesto patologico, all'individuazione di cellule con caratteristiche inclusioni da polyomavirus (decoy cells) nel sedimento urinario e oggi anche alla ricerca del genoma virale in campioni di urina e di siero. Poiché il virus negli immunodepressi, soprattutto nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo, e in percentuale lievemente inferiore nei pazienti sottoposti a trapianto renale, si riattiva con notevole frequenza, la presenza di virus nelle urine a basse concentrazioni è scarsamente significativa dal punto di vista diagnostico. Altri livelli di viruria sono invece più frequentemente e significativamente associati alle manifestazioni patologiche.

Recentemente è stato osservato che negli episodi di riattivazione più intensi, compare anche una viremia da BKV.

Soprattutto nella nefropatia nei soggetti con trapianto di rene alla presenza di viremia, in aggiunta alla viruria, viene attribuito un significato diagnostico.⁽¹⁾ In entrambi i casi sono dunque necessari test quantitativi, per la determinazione della concentrazione virale.



ANALISI QUANTITATIVA DEL BK VIRUS, DETERMINAZIONE MEDIANTE REAL TIME PCR

(1)Hans H. Hirsch, Daniel C. Brennan, Cinthia B. Drachenberg, Fabrizio Ginevri, Jennifer Gordon, Ajit P. Limaye, Michael J. Mihatsch, Volker Nickleit, Emilio Ramos, Parmjeet Randhawa, Ron Shapiro, Juerg Steiger, Manikkam Suthanthiran, and Jennifer Trofe Polyomavirus-Associated Nephropathy in Renal Transplantation: Interdisciplinary Analyses and Recommendations. *Transplantation* • Volume 79, Number 10, May 27, 2005



GD 230 REAL BKV

L'utilizzo di tecniche di amplificazione degli acidi nucleici nella diagnostica di infezioni virali è ormai molto diffusa. Il dispositivo Real BKV è stato studiato per consentire la determinazione qualitativa di BKV-DNA in campioni di siero/plasma ed urine di individui infetti utilizzando un protocollo HPA (High Performance Amplification) a singolo step, che coniuga le esperienze acquisite della tecnica Real Time PCR ed una ottimizzazione spinta della reazione di amplificazione.

Il dispositivo contiene il necessario per lo svolgimento del seguente protocollo:

- **Estrazione** (da plasma /siero ed urine) e purificazione del DNA virale.
- **Amplificazione genica.**
- **Rivelazione automatica** del virus in Real Time PCR/ Sybr Green e calcolo automatico del melting point (TM) di ogni amplificato.

ALCUNE SUE CARATTERISTICHE:

“Analisi diretta mediante Sybr Green I”

- **Estrazione virale semplice e rapida in un singolo tubo**
- **Rivelazione diretta del DNA mediante “Sybr Green I”**
- **Determinazione quantitativa del BKV**
- **Ampio range dinamico ed elevata sensibilità analitica**
- **Verifica della specificità attraverso la curva di dissociazione**

Estrazione:

il dispositivo permette di ottenere un estratto di acidi nucleici virali di alta purezza da campioni biologici senza l'utilizzo di solventi organici, in un singolo step e con un solo tubo mediante l'utilizzo di una microcentrifuga. L'uso simultaneo di sali di guanidinio (forte inibitore delle DNasi) e di DNA-RNA-carrier permette una rapida separazione e la precipitazione degli acidi nucleici in un pellet ben visibile.

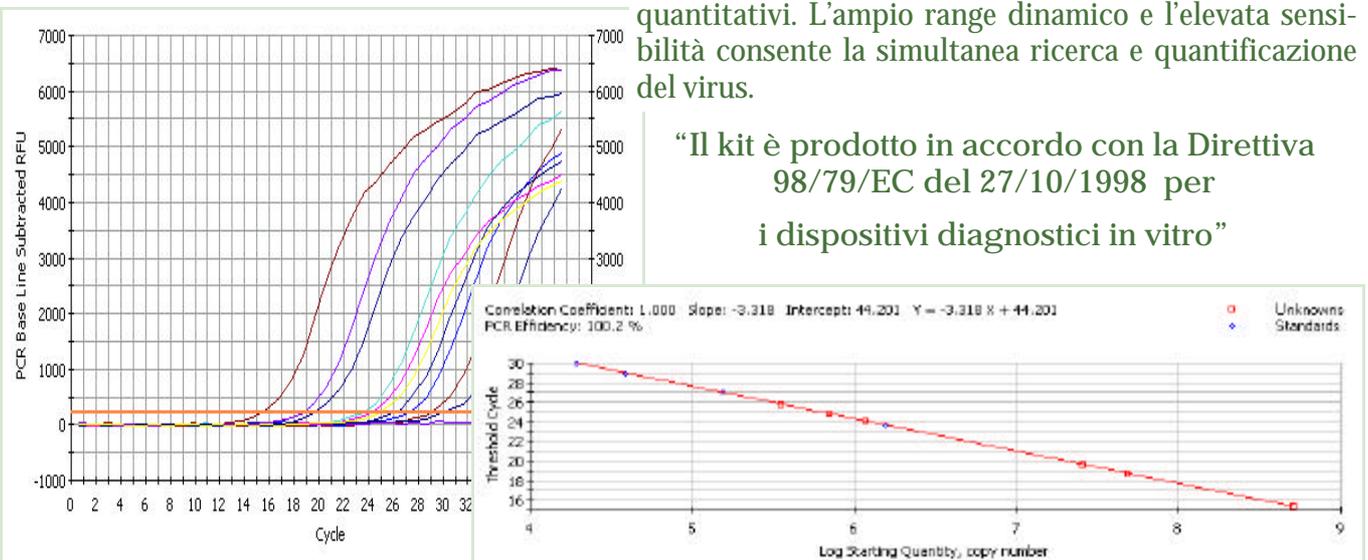
PRINCIPIO DEL METODO

- Lisi del capsido virale
- Precipitazione alcolica degli acidi nucleici

Amplificazione:

La rivelazione del BK virus viene eseguita mediante l'utilizzo di una coppia di primers altamente specifici, che definiscono una regione di 366 bp nella regione noncoding, transcription control region del BKV (e che non cross-reagiscono con il DNA genomico umano) . La deoxitimidina è sostituita con il deoxyuracile nella mix dei deoxynucleosidi trifosfati, contenuti nel Real T-Buffer, consentendo l' eventuale utilizzo della Uracil DNA glicosilasi (non contenuto nel Kit) per il controllo del carry over. La reazione d'amplificazione genica avviene ad opera di una DNA polimerasi termostabile che garantisce un'elevata emivita ed omogenea efficienza per l'intero processo analitico. Il dispositivo contiene un calibratore, STD BKV, che consente l'allestimento della curva di calibrazione per l'esecuzione di test quantitativi. L'ampio range dinamico e l'elevata sensibilità consente la simultanea ricerca e quantificazione del virus.

“Il kit è prodotto in accordo con la Direttiva 98/79/EC del 27/10/1998 per i dispositivi diagnostici in vitro”



Validazione della specificità analitica



All'ultimo step del programma del termociclatore viene eseguita la curva di dissociazione applicando un gradiente di temperatura, da 65°C a 95°C in circa 17 minuti, e registrando la fluorescenza dei campioni/standards/controlli negativi in funzione del variare della temperatura. Il software visualizza la curva di fluorescenza e la sua derivata prima.

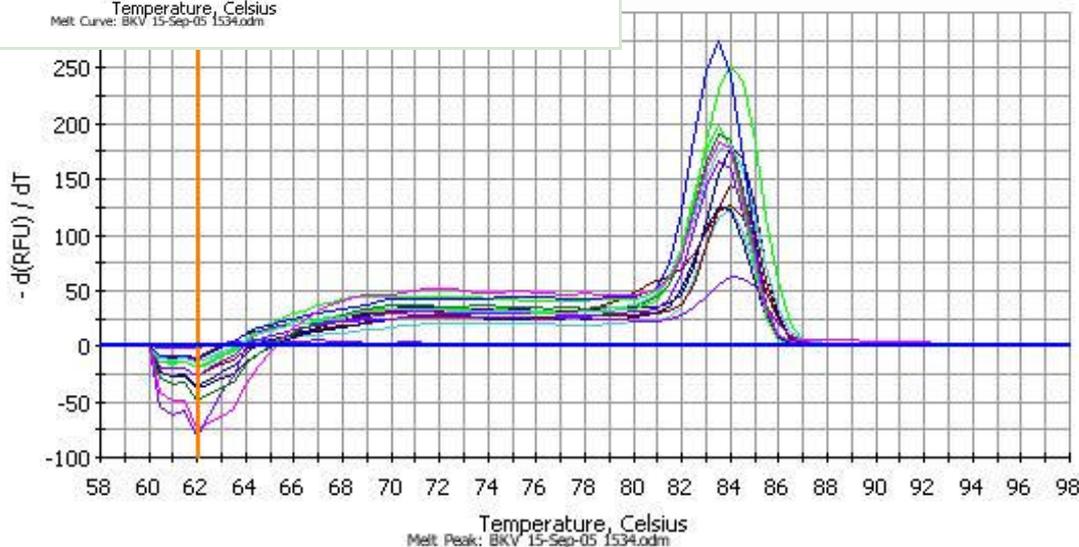
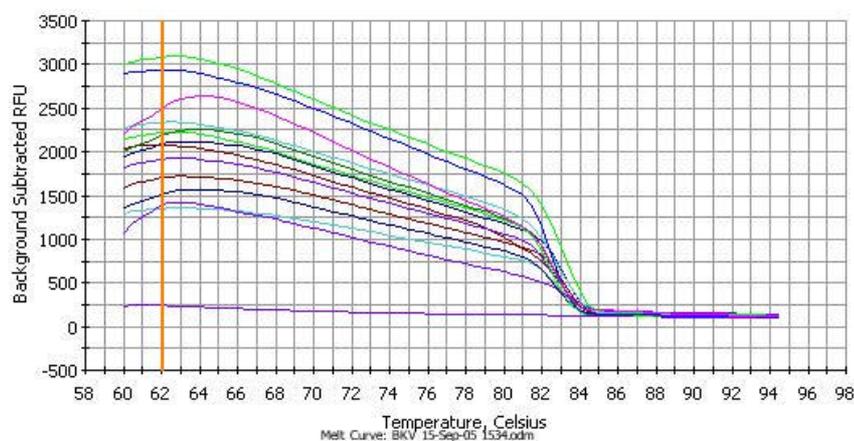
Ai fini della validazione dei risultati, si rende necessario:

verificare la presenza di un picco di dissociazione, specifico per BKV-DNA, alla temperatura di 85,0°C±1°C per i campioni positivi/controlli positivi e la sua assenza per campioni negativi/controlli negativi;

I prodotti di amplificazione con temperatura di melt inferiore a 85°C, non compromette il risultato analitico, in quanto l'acquisizione del segnale di fluorescenza per la determinazione della viremia avviene alla temperatura di 82°C e registra solo i templati **non dissociati**, quindi con temperatura di dissociazione superiore a 82°C.

La figura mostra un esempio di curva di fluorescenza e la sua corrispondente curva di dissociazione:

“verificare la presenza di un picco di dissociazione, specifico del BK virus, alla temperatura di 85°C ±1,0°C.”

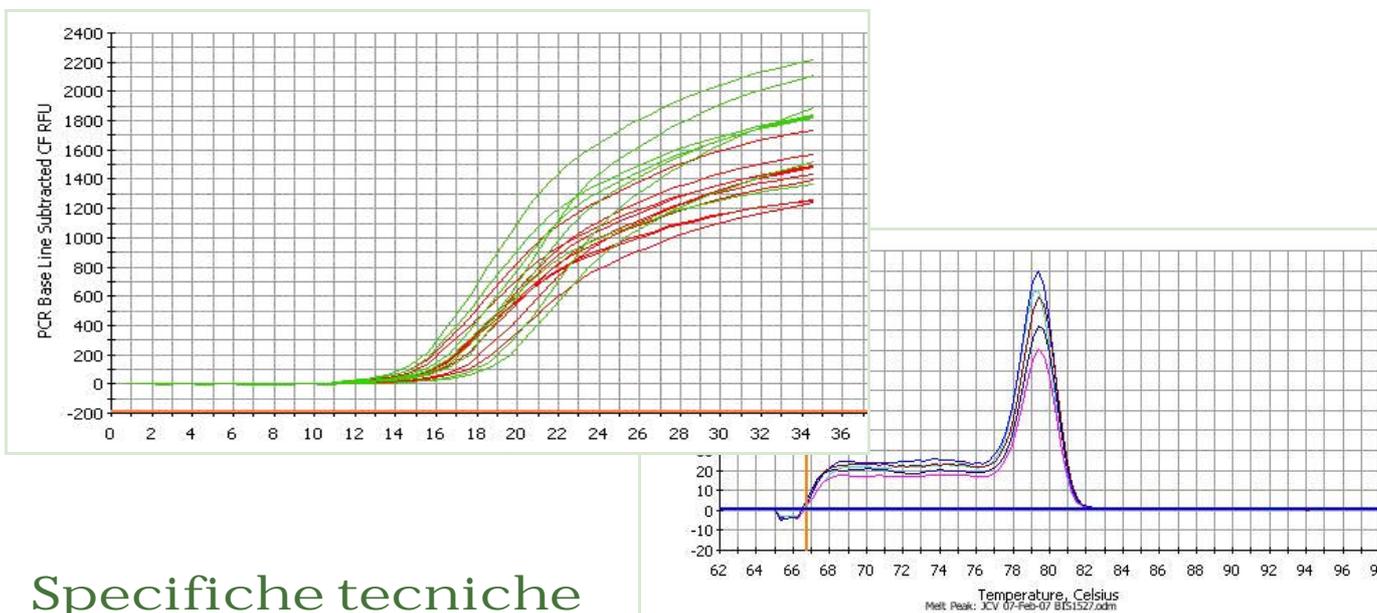


Dispositivi correlati: GD 231 Real JCV (determinazione qualitativa)



JCV è stato isolato per la prima volta nel 1971 da tessuto cerebrale di un paziente affetto da **leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML)** e presenta un'analogia nucleotidica pari al 75% con un altro polyomavirus umano, il BK virus (BKV).

Patologie correlate ai polyomavirus si sviluppano a seguito di severe condizioni di immuno-soppressione cellulare come trapianto di organi, AIDS e leucemie; mentre la riattivazione del BKV determina esclusivamente patologie del tratto urinario come cistite emorragica, stenosi degli ureteri, glomerulonefriti e nefropatie, con rischio di rigetto renale nei pazienti trapiantati sottoposti a terapia immuno-soppressiva, il JCV rappresenta l'agente eziologico della PML (che si manifesta nel 3-5% dei pazienti colpiti da AIDS) oltre a causare patologie renali.



Specifiche tecniche

Applicabilità:	DNA virale estratto da siero, plasma ed urine
Volume di campione:	0,1 ml di campione per l'estrazione
Numero di reazioni:	60 reazioni
Specificità	noncoding, transcription control
Controlli:	STD BKV calibratore
Tempo d'analisi:	<2,5 ore
Contenuto del dispositivo:	Estrazione virale, Enzima, controlli e pre Mix.
Reagenti richiesti: <i>non inclusi</i>	Beta mercaptoetanolo, etanolo ed alcol isopropilico
Materiali richiesti: <i>non inclusi</i> :	Tubi da 2 ml conici con tappo; portaprovette refrigerato; puntali sterili con barriera antiaerosol ; Pipette; tubi per PCR da 0,2 ml (DNAsi RNAsi Free) con tappo ottico.
Strumentazione richiesta: <i>non inclusa</i> :	REAL TIME PCR SYSTEM (TERMOCICLATORE con unità fluorimetrica , filtro eccitazione ed emissione per SYBR GREEN I dye; software dedicato; PC e stampante a colori).

SYBR GREEN È UN MARCHIO REGISTRATO DA MOLECULAR PROBES

QUALITY
ENDORSED
COMPANY
ISO 13485:2003
ISO 9001:2000



SVILUPPATO E PRODOTTO IN ITALIA DA:
GENEDIA S.R.L.: VIA LOMBARDA, 169/A - 55013 LAMMARI (LU)
TEL./FAX +39(0)583 962672 - EMAIL info@genedia.it