

PCR SWM-01 (Shineway)

L'analizzatore di acido nucleico PCR SWM-01 (Fig. 1) esegue il rilevamento qualitativo di campioni di acido nucleico (DNA/RNA) mediante PCR a fluorescenza singola. Questo strumento, basato sulla tecnologia del “chip microfluidico”, è in grado di rilevare il virus da 3 a 9 campioni in un solo microchip con 3 canali (quindi fino ad un massimo di 27 campioni contemporaneamente) in 45 minuti, esclusa l'esecuzione del tampone e l'estrazione dell'RNA. Questo tempismo è molto inferiore alle tradizionali tecnologie di che di solito impiegano da 2 a 3 ore.



Fig. 1. Analizzatore di acido nucleico PCR SWM-01

Un micro-riscaldatore a pellicola sottile a base di silicio viene utilizzato come componente di riscaldamento rapido e il chip microfluidico viene utilizzato come supporto per la reazione di PCR. Il sistema di reazione PCR utilizza una sonda fluorescente, specifica per il rilevamento dell'RNA virale SARS-CoV-2, come indicazione del segnale di reazione. Man mano che la reazione della PCR progredisce, la fluorescenza della reazione positiva si accumula e il segnale viene raccolto come immagini da una telecamera CMOS. Infine, il sistema di controllo completa la raccolta dei dati ed effettua l'elaborazione delle immagini digitali che avrà come risultato finale la positività o negatività alla presenza di acido nucleico virale ed inoltre una quantificazione dell'RNA virale rilevato espresso come Ct (threshold cycle). Campioni con Ct superiori a 0 vengono considerati positivi per SARS-CoV-2 con classificazione di “debolmente positivi” per Ct >35.

I goals questo progetto sono stati:

1. Ottimizzazione del protocollo di PCR SWM-01
2. Confronto i risultati ottenuto con metodica PCR SMW-01 con Real time PCR classica
3. Ottimizzazione e sensibilità per l'utilizzo di PCR SMW-01 con pool di tamponi

Risultati

1. Ottimizzazione del protocollo di Real Time PCR SWM-01

Il primo step di ottimizzazione, effettuato usando uno standard sintetico positivo, ha permesso di paragonare l'analisi effettuata con PCR SWM-1 con uno strumento standard per Real Time PCR (CFX Connect - Bio-Rad). L'ottimizzazione del il protocollo di PCR ha utilizzato il kit SARS-CoV-2 (BioER) in cui

abbiamo ottimizzato la mix di reazione portandola da 25 μ l a 15 μ l di volume finale. I risultati sono riferiti al gene N del virus testato dal kit. Il protocollo definito è schematizzato in Fig. 2.

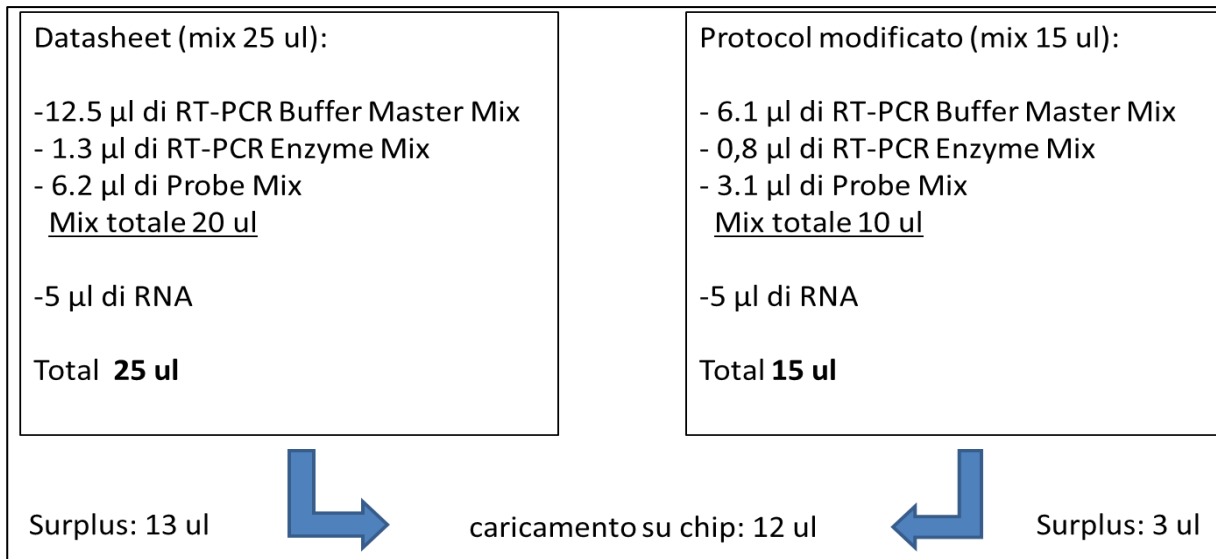


Fig. 2. Schema di reazione di PCR con protocollo standard (25 μ l) e protocollo con ridotte quantità di reagenti (15 μ l)

12 μ l di mix è stata caricata in un canale del chip della PCR SMW-01 utilizzando un protocollo termico specifico che permette il rilevamento del virus dopo 3000 sec contro i normali 4800 sec con un risparmio di 30 min a tornata di amplificazione (Tab.1).

Protocollo Bio-Rad

1 cycle	95°C	600 sec
40 cycles	94°C	30 sec
	60°C	60 sec
1 cycle	98°C	600 sec
TOT		4800 sec

Protocollo PCR SWM-01

1 cycle	50°C	600 sec
1 cycle	95°C	600 sec
45 cycles	95°C	10 sec
	60°C	30 sec
TOT		3000 sec

Tab.1 : Protocolli termici di PCR Bio-Rad e di PCR SWM-01

I campioni sono stati validati su entrambe le macchine da PCR ottenendo le curve di PCR presentate in Fig.

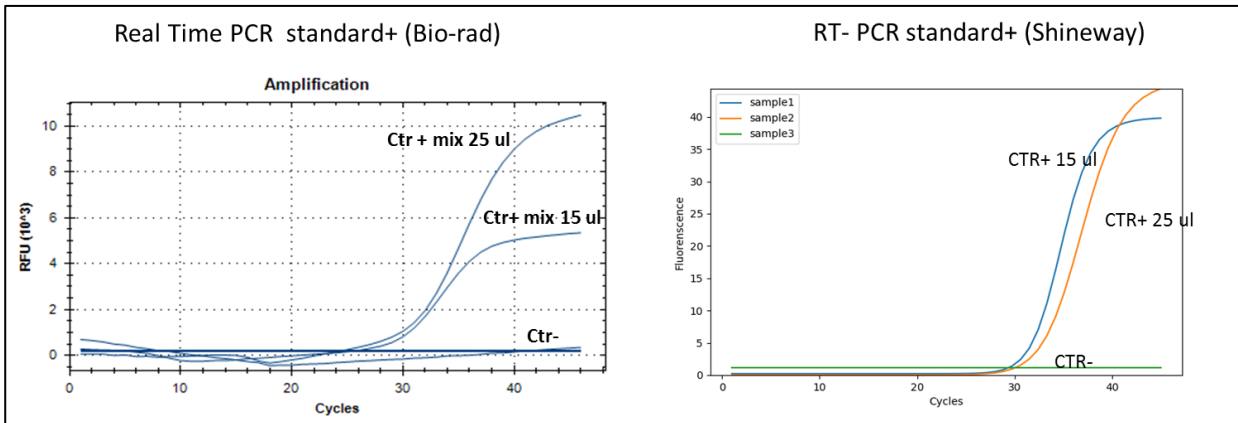


Fig. 3. Confronto tra Bio-rad PCR (RT classica) e SWM-01 utilizzando un campione Covid positivo standard (sintetico) utilizzando 15 μ l e 25 di mix.

I dati ottenuti hanno dimostrato che la PCR SWM-1 è in grado evidenziare la positività del campione allo stesso modo di una RT PCR classica anche dopo riduzione dei volumi di mix di amplificazione. I dati successivi sono stati ottenuti con questo nuovo protocollo e un risparmio del 40% sui reagenti.

2. Confronto tra Bio-rad PCR (RT classica) e SWM-01 utilizzando un campione Covid-19 positivo standard (sintetico)

Al fine di verificare la sensibilità dello strumento SWM-01 abbiamo testato uno standard sintetico Covid-19 positivo tal quale, diluito 1:2 e 1:5. I tre campioni sono stati caricati sullo strumento PCR SWM-01 e sulla RT-PCR Bio-rad (Fig. 4).

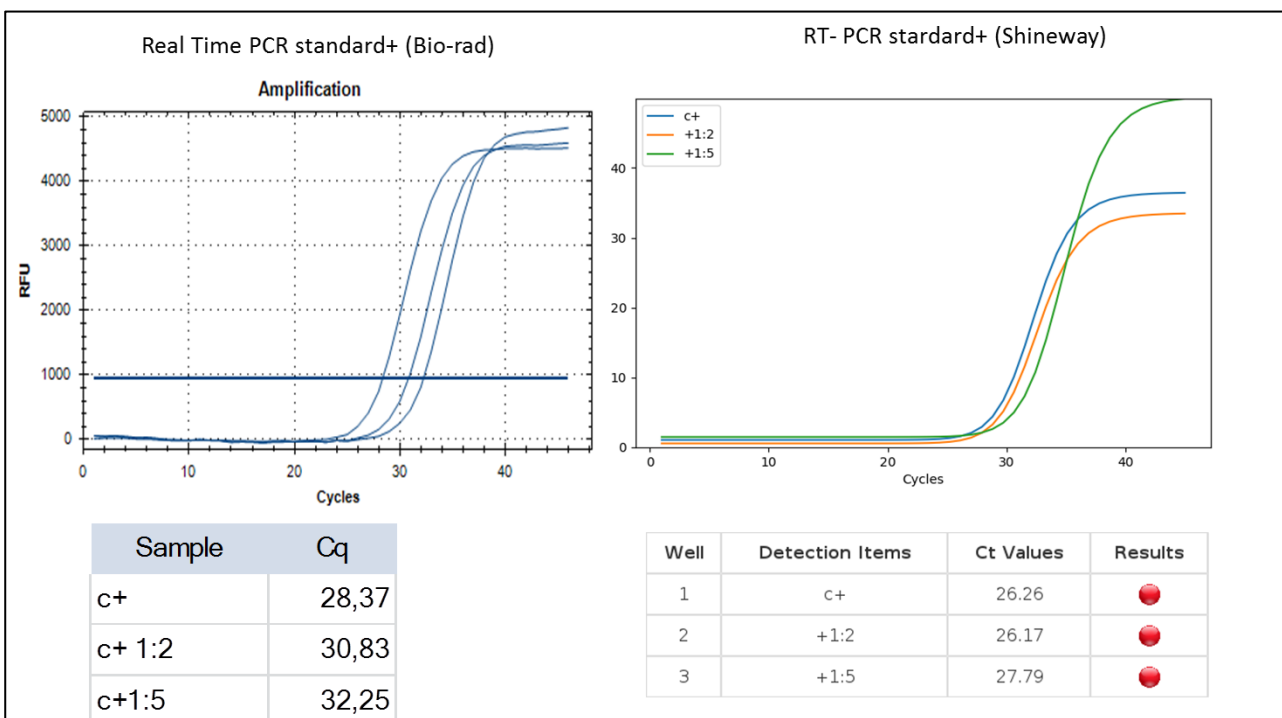


Fig. 4. Risultati dello studio di un campione Covid-19 tal quale e diluito 1:2 e 1:5 analizzato con RT PCR Bio-rad e PCR SWM-01.

I risultati ottenuti mostrano che lo strumento PCR SWM-01 è più sensibile della PCR BioRad nella rivelazione dell'RNA virale sia nel campione tal quale sia nei campioni diluiti. La PCR SWM-01 è più sensibile

in media di 3.74 cicli di PCR rispetto alla BioRad con uno scostamento del diluito 1:5 dal campione tal quale di solo 1,53 cicli contro i 3.88 della BioRad.

Al fine di confermare questo dato sono stati analizzati con le Real time PCRs dei campioni di RNA estratti da tamponi UTM di individui positivi. L'estrazione dell'RNA virale è stata effettuata con NucliSENS EasyMag (Biomerieux) ed estrattore automatico.

Tre campioni (56182, 13191, 13153) sono stati caricati su entrambi gli strumenti per confrontarne la sensibilità (Fig. 5).

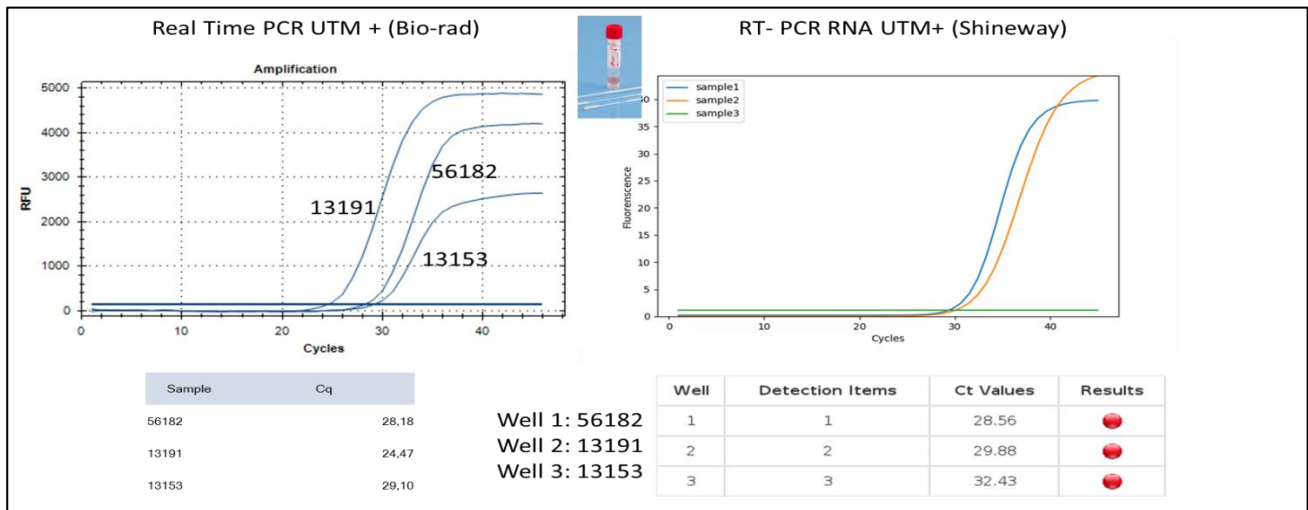


Fig. 5. Confronto tra Bio-rad PCR (RT classica) e SWM-01 nell'analisi di 3 tamponi in UTM (universal trasport medium).

I dati ottenuti mostrano che le due tecniche sono abbastanza sovrapponibili con campioni positivi tra i 25 ed i 20 cicli di PCR.

Abbiamo provato a ripetere lo stesso esperimento con campioni che risultavano positivi tra i 32 ed i 38 cicli di PCR definiti "debolmente positivi" (Fig. 6).

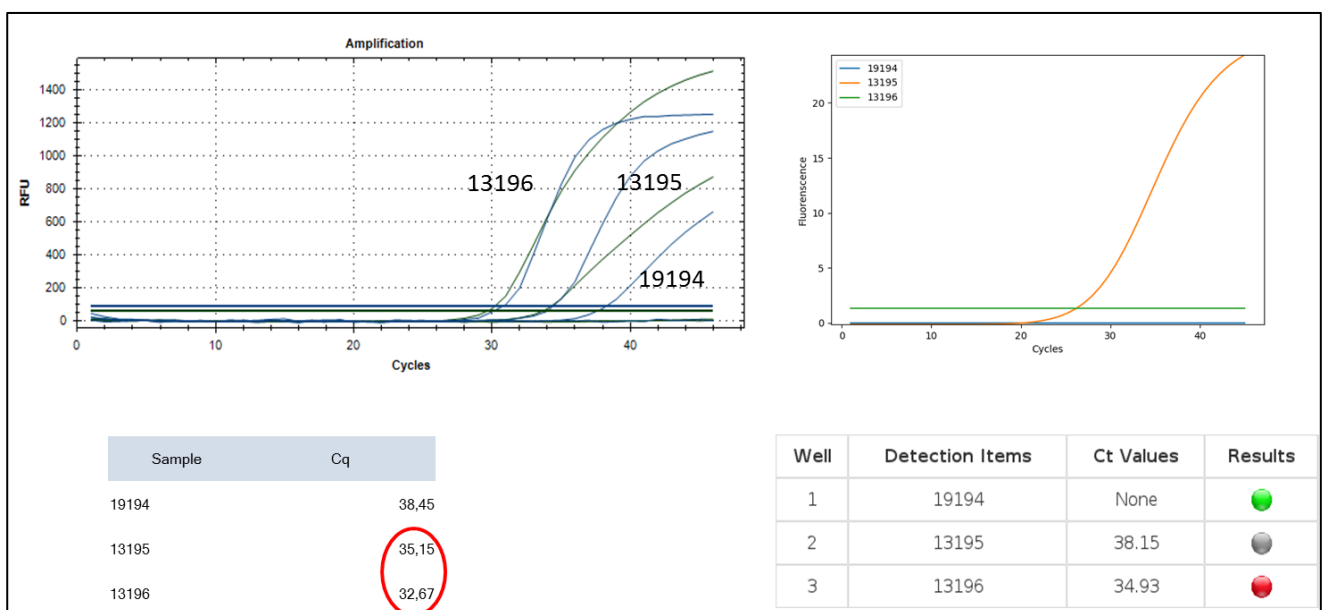


Fig. 6. Confronto tra Bio-rad PCR (RT classica) e SWM-01 nell'analisi di 3 tamponi in UTM con bassa carica virale (debolmente positivi)

Questo esperimento ha permesso di definire la sensibilità della PCR SWM-01 tra i 33 e i 35 cicli di PCR. Perciò utilizzando la PCR SWM-01 sarà possibile la quantificazione virale per campioni con una bassa quantità di RNA virale intorno ai 35 cicli mentre i campioni con carica virale molto bassa (come i campioni 13194) non sono rilevabili.

Inoltre, al fine di testare ulteriormente la sensibilità in campioni con carica virale molto bassa, abbiamo messo a confronto la reazione di RT-PCR Bio-Rad e la reazione con PCR SWM-01 nell'analisi di 3 tamponi in UTM tal quali, diluiti 1:10 e 1:20 (Tab.2).

	BIO-RAD	SWM-01
Sample	Ct	Ct
c+	27	26
13188	18	19
13192	27	28
c+ 1:10	30	27
13188 1:10	24	26
13192 1:10	33	NA
c+ 1:20	36	32
13188 1:20	31	30
13192 1:20	NA	NA

Tab. 2: Riassunto dei campioni analizzati con RT-PCR Bio-rad e PCR SWM-01 diluiti.

L'analisi dei campioni diluiti ha dimostrato che i campioni diluiti 1:10 sono rilevabili con entrambi gli strumenti mentre per i campioni maggiormente diluiti (1:20), il dato non è riproducibile.

3. Pool di campioni

Poiché la tecnologia PCR SWM-01 è stata pensata per effettuare screening di popolazione abbiamo effettuato pool di tamponi oro-rinofaringee UTM miscelando 1 tampone oro-rinofaringeo positivo (13191) con tamponi oro-rinofaringei negativi (5 e 8). I pool sono stati preparati secondo il seguente schema:

POOL 1:6		POOL 1:9	
TAMPONE POSITIVO 13191	TAMPONI NEGATIVI	TAMPONE POSITIVO 13191	TAMPONI NEGATIVI
50 microL	250 microL	33 microL	267 microL
Volume totale 300 microL		Volume totale 300 microL	

Tab.3: pool realizzati miscelando il campione positivo n. 13191 con 5 (pool 1:6) e 8 (pool 1:9) tamponi negativi, per un volume totale di 300 microL.

Come indicato in Fig.5 il campione positivo utilizzato aveva una positività rilevabile sulla PCR BioRad di 24.47 Ct ed è stato rilevabile in tutti e due i pool effettuati.

30 campioni di cui 5 positivi sono stati studiati formando pool da 6 tamponi oro faringei (1 positivo + 6 negativi) all'interno dello stesso canale. Si è riusciti ad identificare la positività nei pool per campioni che presentavano un Ct≤24.



Conclusioni

Il progetto ha permesso di valutare la sensibilità dello strumento PCR SWM-01 rispetto a metodi di PCR standard nell'ambito virologico per il rilevamento specifico di Covid 19. I nostri dati dimostrano che la PCR SWM-01 e la PCR Bio-Rad hanno una sensibilità comparabile sia per quanto riguarda l'analisi di RNA estratti da tamponi positivi ($Ct < 35$) e parzialmente comparabile in caso di campioni debolmente positivi ($Ct > 35$). La PCR SWM-01 ha dato buoni risultati anche utilizzando pool di campioni facendola risultare un buona per screening di popolazione.