

Protocollo ottimizzazione PCR

Premesse: la probabilità p che un tampone sia infetto deve essere bassa (minore del 30%) per rendere questo metodo conveniente rispetto a quello attuale, e tanto più p è piccola tanto più il metodo conviene.

Breve riassunto: supponiamo che la probabilità p tra i nostri tamponi di avere un infetto sia $1/8$ allora organizziamo il materiale genetico proveniente dai tamponi in gruppi da 4, ovvero prendiamo parte dei liquidi in cui sono stati immersi i tamponi e li mischiamo a 4 a 4, e poi a questo miscuglio facciamo l'estrazione del genomico nel caso in cui la vostra procedura per l'analisi lo richieda. E' FONDAMENTALE che il genomico non venga estratto paziente per paziente, ma in forma aggregata come descritto, si capirà dopo perché.

Ora a questo si preleva una parte del miscuglio di materiali genetici e si procede a fare la real time RT-PCR per identificare la presenza di RNA virale. Se il risultato è negativo (e capiterà circa il 60% delle volte) abbiamo stabilito la negatività di quattro pazienti occupando solamente uno slot nella macchina per la PCR, altrimenti si torna ai liquidi in cui sono stati immersi i tamponi che avevamo mischiato in provette risultate positive al virus (indice che almeno uno dei quattro pazienti è infetto), li si mischia due a due, si estrae il genomico* (vedi la nota) e si procede a fare la PCR ai due gruppi da due provenienti da ogni gruppo da quattro positivo al test precedente. Per quelli che risulteranno ancora positivi si torna indietro, e questa volta si estrae il genomico dei singoli pazienti, si fa la pcr, e si determina chi di loro è infetto.

nota*: in realtà conviene per ragioni di tempo estrarre il genomico dei pazienti raggruppati a due a due mentre si sta facendo la pcr dei gruppi da 4, così i due processi vanno in parallelo e si risparmia tempo.

Bonus di questo metodo: se la probabilità di essere ammalati p è $1/32$ il nostro metodo può analizzare 4 volte più pazienti nell'unità di tempo, nel caso in cui $p=1/128$ addirittura 10 volte più pazienti.

Malus: il metodo richiede più corse di PCR, con un ritardo nel tempo a cui ogni persona sa se è positiva o negativa (Anche se in realtà più di metà degli esaminati sa dopo le usuali 5 ore di essere negativa, un quarto deve aspettare un'altra corsa di pcr, un ottavo un'altra ancora...

Criticità e missione del vostro laboratorio: bisogna scoprire se la concentrazione del titolo virale nelle provette nei primi stadi della procedura è abbastanza alta da consentire alla PCR di iniziare ad amplificare il genoma.

Proposta di protocollo per scoprirlo: la proposta varia a seconda che a voi convenga occupare con il nostro esperimento buona parte del macchinario per la real time RT-PCR e metterci poco tempo o occuparne una piccolissima parte ma dedicare più di un giorno di tentativi.

Ciò che bisogna scoprire è a quale stadio della diluizione iniziale (mescolare il liquido proveniente da 2,4,8...tamponi) iniziano ad esserci i falsi negativi. Quindi concretamente proponiamo un'analisi retrospettiva (quindi in cui si sa la positività o negatività di tutti i tamponi che andremo ad usare), si prende un tampone positivo e lo si mischia con 1,3,7,15 ed eventualmente 31 e 63 tamponi negativi, poi si fa l'estrazione del genomico e la PCR, e si guarda quali campioni risultano positivi in questo modo. Se tutti i campioni risultano positivi abbiamo vinto perché la concentrazione non è un problema e tutto il mondo adotterà questo metodo. Se invece per esempio solo i campioni fino a 8 tamponi insieme sono positivi e 16, 32 e 64 tamponi insieme sono negativi, allora si propone di riprovare ad effettuare i gruppi da 16, 32 e 64 però questa volta concentrando il materiale genetico in uscita dall'estrattore tramite centrifugazione. A tutti quelli che potrebbero obiettare che questo allunghi i tempi diamo ragione, ma il nostro metodo converrebbe comunque sul metodo standard anche con le centrifugazioni ad ogni passaggio.

Nel momento in cui si è determinata la soglia di sensibilità del nostro metodo sia con che senza la concentrazione per centrifugazione, che supponiamo essere ad esempio fino a 16 tamponi insieme con centrifugazione e 4 senza, noi proporremmo di effettuare un prototipo dell'analisi clinica nei due casi, ovvero prendere 3 negativi ed un positivo in un caso, e magari 2 positivi e 14 negativi nell'altro, ed effettuare ogni passaggio che consentirebbe la diagnostica dei pazienti, quindi estrazione collettiva, pcr, poi di nuovo estrazione del genómico dai tamponi in provette positive eccetra, fino ad arrivare a determinare chi ha la malattia in ciascuno dei due casi.

Se qualsiasi passaggio del processo non è chiaro o vedete delle criticità siete caldamente invitati a chiamare e ne discutiamo, Marco Eterno, marco.eterno@sns.it, 340 98 05 787.