

LISI GREZZA: UN'ALTERNATIVA RAPIDA ED EFFICACE AI CONVENZIONALI SISTEMI DI ESTRAZIONE DEL DNA

S. Coassin¹, G. Costanzi¹, C. Savio¹, S. Mason¹, A. Gani¹

¹AB ANALITICA srl, Via Svizzera 16, 35127 Padova, Italia

INTRODUZIONE

Spesso, i laboratori di analisi molecolare di dimensioni medio-piccole non possono avvalersi dell'impiego di sistemi di automazione high-throughput per l'estrazione degli acidi nucleici. D'altra parte, i convenzionali metodi di estrazione manuale possono risultare piuttosto laboriosi. La lisi grezza rappresenta un'alternativa poco dispendiosa ed assai rapida rispetto a questi ultimi. Di seguito sono esposti i risultati ottenuti dalla validazione di un sistema di lisi grezza a calore (GENEQUALITY Lysis Buffer SW, AB ANALITICA) abbinato a dispositivi diagnostici in vitro (IVD) per l'identificazione di patogeni a trasmissione sessuale.

METODI

Per lo studio di validazione, le performance del kit GENEQUALITY Lysis Buffer SW sono state confrontate con quelle di due comuni sistemi di estrazione: il sistema a biglie magnetiche EZ1 DSP Virus Kit in associazione allo strumento automatico EZ1 Advanced XL (QIAGEN) ed il sistema manuale a colonnine Invisorb Spin DNA Extraction Kit (STRATEC biomedical). Per il confronto, sono stati impiegati 159 campioni tra urine, secreti vaginali e tamponi cervicali, vaginali, cervico-vaginali, endocervicali ed uretrali, positivi per HPV o altri patogeni sessualmente trasmessi. Per valutare la resa di ciascun metodo, gli estratti sono stati amplificati con uno o più IVD (AB ANALITICA) per la ricerca dei virus/microrganismi di interesse. Tutti gli IVD impiegati amplificano, oltre al target infettivo, anche il gene umano β -globina (BG) come controllo interno di reazione. Il sistema in esame è stato inoltre testato su liquido seminale negativo per i patogeni di cui sopra. In questo caso, la bontà dell'estratto è stata valutata sulla base del Ct prodotto dalla BG. Infine è stato eseguito uno studio sulla compatibilità di vari mezzi di trasporto per tamponi.

RISULTATI

155 campioni su 159 sono risultati idonei all'analisi. I restanti 4 campioni, una volta lisati, non hanno prodotto alcuna amplificazione. Non è noto se tali campioni appartenessero a pazienti in cura con sostanze potenzialmente inibitorie; gli stessi sono, pertanto, stati esclusi dall'analisi. Dei 155 campioni valutati idonei, 150 hanno prodotto risultati concordi tra i sistemi a confronto (concordanza del 96,8%). Le prove su liquido seminale hanno prodotto valori di Ct per la BG idonei. Tutti i mezzi di trasporto testati sono risultati compatibili ad eccezione dell'unico contenente sostanze lisanti (eNAT, COPAN).

CONCLUSIONI

Il sistema in esame è risultato idoneo per l'estrazione di DNA genomico, virale e batterico a partire da tutte le matrici testate. Le performance dello stesso sono infatti paragonabili a quelle dei metodi di estrazione a biglie magnetiche o su colonnina messi a confronto. L'incompatibilità dei mezzi di trasporto lisanti si giustifica in quanto l'iniziale passaggio di pellettamento del campione previsto dal protocollo di lisi con GENEQUALITY Lysis Buffer SW comporta la perdita del DNA ormai disperso in soluzione.