

Evaluarea comparativă a două tehnici de monitorizare a încărcăturii virale HIV-1: COBAS TaqMan și COBAS Amplicor, v 1.5

Comparative evaluation of two techniques for HIV-1 viral load: COBAS TaqMan and COBAS Amplicor, v 1.5

Magdalena Dinu*, Simona Paraschiv, Mihaela Tinischi și Dan Oțelea

Institutul de Boli Infecțioase "Prof. Dr. Matei Balș", Laboratorul de Genetică

Rezumat

Introducere: Pentru monitorizarea evoluției pacienților cu infecție HIV-1 există diferiți parametri ce au la bază markeri virali / imunologici. Una din metodele de monitorizare a indivizilor seropozitivi HIV-1 este cea care măsoară cantitatea de ARN HIV. Prin determinarea încărcăturii virale se estimează nivelul replicării virale la pacienții naivi, dar și ca răspuns la tratamentul antiretroviral. În plus, prin corelarea cu alți markeri virali / imunologici și, în special, cu rezultate ale testelor de genotipare, se pot furniza clinicienilor date importante cu privire la stadiul infecției și optimizarea atitudinii terapeutice. Există o gamă largă de metode de determinare a încărcăturii HIV-RNA, la ora actuală cele mai folosite fiind cele ce au la bază tehnica de PCR cantitativ end-point, și, mai nou, tehnica Real-Time PCR. Aceasta monitorizează fluorescența emisă în timpul reacției PCR, ca indicator al producerii de ampliconi, în timpul fiecărui ciclu PCR. Unul din avantajele Real-Time PCR este domeniul de detecție mare.

Obiective/ Metode: În această lucrare s-a urmărit evaluarea performanțelor unei tehnici de tip Real-Time (Cobas TaqMan), în comparație cu o tehnică uzual folosită, bazată pe RT-PCR end-point (Cobas Amplicor, v1.5). Evaluarea s-a realizat pe 2 loturi de pacienți cu infecție HIV-1, un lot având valori ale încărcăturii virale ce acoperă domeniul 1.6log-5.8log, cel de-al doilea lot având valori sub limita de detecție. Probele de plasmă pozitive analizate conțin HIV-1, subtipul F, existent preponderent în România. Parametrii urmăriți sunt specificitatea, sensibilitatea și reproductibilitatea determinărilor cantitative. Analiza statistică folosită: Spearman's rank correlation, Pearson's correlation coefficient, Student's test.

Rezultate: S-a obținut o bună corelație între valorile obținute prin cele două tehnici. Student's test nu relevă o diferență semnificativă între cele 2 serii de valori. Sensibilitatea este mult îmbunătățită în cazul tehnicii TaqMan.

Concluzii: Real-Time PCR oferă avantaje semnificative, printre care: interval de linearitate mai mare decât al tehnicilor folosite anterior, post-procesarea produsilor PCR nu mai este necesară, este o tehnică ultra-rapidă.

*Adresa pentru corespondență: Str. Dr. Calistrat Grozovici, nr. 1, sector 2, București, tel. 021/ 3186100, 021/ 3186101, Fax: 021/3186090

Adresa de e-mail a primului autor: magda_dinu2003@yahoo.co.uk

Cuvinte cheie: End-point PCR, Real-Time PCR, încărcătura virală HIV-1.

Abstract

Introduction: Several parameters based on viral/immunological markers are used for monitoring the HIV-1 infection; one category of such markers measure the HIV RNA quantity. These tests are used to monitor the viral load in naïve patients and in those under antiretroviral treatment. When correlated with genotyping test results, they provide to clinicians important information concerning the evolution of the infection and instrument therapeutic optimization. There are various methods of measuring the HIV viral load; the most largely used are based on PCR, both end-point and, more recently, real-time.

Objectives/Methods: In this study we evaluate the performance of a real-time PCR technique (Cobas TaqMan) as compared with an end-point PCR technique (COBAS Amplicor v 1.5). The comparison was performed by using 2 panels of HIV-1 subtype F patients plasma; the first panel had viral load values (measured with COBAS Amplicor) between 1.6 log and 5.8 log and the second panel had values below the detection limit with the same technique. The parameters we examined were specificity, sensitivity and reproducibility of the quantitative determinations. The statistical tests used were Spearman's rank correlation, Pearson's correlation coefficient, and Student's test.

Results: A good correlation between the values generated with the two techniques was observed. The real-time PCR technique displayed improved sensitivity.

Conclusion: The real-time PCR technique confers significant advantages: significantly widened linearity interval, no PCR product post-processing, rapidity.

Keywords: end-point PCR, real-time PCR, HIV-1 viral load

Introducere

Pentru evaluarea pacienților cu infecție HIV-1 există diferite metode de laborator bazate pe markeri virali/imunologici. Una din metodele eficiente de monitorizare a indivizilor seropozitivi HIV este cea care masoară nivelul plasmatic al ARN HIV, reflectând nivelul replicării virale și implicit răspunsul la tratamentul antiretroviral. În plus, prin corelarea cu testele de genotipare, se pot furniza clinicienilor date importante cu privire la strategia terapeutică optimă. Există o gamă largă de metode de evaluare a încărcăturii HIV-RNA, la ora actuală cele mai folosite fiind cele ce au la bază tehnica de RT-PCR cantitativ. Amplificarea, în acest caz, constă în 3 faze:

1. exponențială: în care numărul de ampliconi la fiecare ciclu de reacție se dublează, eficiența fiind teoretic de 100%. În această fază, reacția este foarte specifică și precisă.

2. lineară: reacția este încetinită, deoarece reactivii s-au consumat.

3. de platou: reacția este stopată, iar producția de reacție încep chiar să se degradeze.

O tehnică, deja clasică, de determinare a nivelului viremiei plasmatice este cea bazată pe end-point PCR. Produsul PCR este cuantificat în faza de platou, etapa de detecție urmează celei de amplificare și constă într-o reacție de hibridizare a sondelor marcate, specifice, la produsul RT-PCR.

Recent, a fost introdus un nou test bazat, de asemenea, pe RT-PCR, ce se diferențiază de tehnicile clasice de cuantificare a acidului nucleic viral, prin faptul că detecția are loc concomitent cu etapa de amplificare (de unde și denumirea *Real-Time PCR*), astfel încât produsul PCR este cuantificat în faza exponențială. Studiile efectuate anterior au demonstrat că această tehnică prezintă avantaje față de RT-PCR cantitativ clasic, fiind astăzi acceptată ca tehnică uzuală de cuantificare a acizilor nucleici.

Acest lucru a fost posibil prin creșterea sensibilității, reproductibilității, prin reducerea riscului de contaminare, fiind, în plus, o tehnică

mai rapidă.

În această lucrare am analizat corelația dintre concentrațiile de ARN HIV, măsurate prin cele 2 tehnici. Aceasta s-a realizat atât pentru valori cuprinse între limitele de detecție, cât și pentru rezultatele ce se încadrează sub limita inferioară de detecție a testului de tip end-point.

Materiale și metode

Probele clinice

Probele de plasmă supuse testării s-au obținut de la pacienți cu infecție HIV-1, aflați în etapa de monitorizare a tratamentului antiretroviral. Sângele a fost colectat în tuburi sterile, ce conțin EDTA ca anticoagulant. Plasma a fost apoi separată prin centrifugare la 2000 rpm, timp de 10 minute la temperatura camerei, și stocată ulterior la -80°C .

S-au folosit 46 probe de plasmă, testate cu: (i) *Amplicor HIV-1 Monitor Test*, v 1.5 și (ii) *TaqMan HIV-1 Test*. La 20 dintre acestea s-au obținut valori cuprinse între limitele de detecție ale celor 2 teste, la 26 din probe s-au obținut rezultate sub limita inferioară de detecție.

Prepararea probelor

Prelucrarea probelor s-a făcut conform protocolului de lucru, corespunzător fiecărui test.

(i) *Amplicor HIV-1 Monitor Test*, v 1.5. ARN HIV a fost extras din 200 μl de plasmă, folosind tampon de liză ce conține un număr cunoscut de molecule ARN standard intern (QS). Standardul intern HIV-1 este un construct non-infecțios, ce conține situsuri de legare a primerilor identice cu ale țintei ARN HIV, distinguându-se de aceasta prin regiunea de legare a sondelor specifice. ARN a fost precipitat cu izopropanol. ARN a fost spălat cu etanol 70% și reluat în tamponul de eluție.

(ii) *TaqMan HIV-1 Test*. ARN HIV a fost extras din 500 μl de plasmă, folosind un tampon de liză ce conține ARN standard intern

(ARN QS), proteinaza K și carrier ARN. Etapa de incubare la 50°C , permite agentului chaotropic și proteinazei K să elibereze acizii nucleici din virion. ARN a fost precipitat cu izopropanol. Amestecul a fost transferat pe o coloană de fibră de sticlă, în timpul centrifugării, atât ARN QS, cât și ARN HIV s-au fixat pe coloana din fibră de sticlă. Substanțele nelegate (săruri, proteine și impurități celulare) au fost înlăturate prin centrifugare după adăugarea tamponului de înlăturare a inhibitorilor și a tamponului de spălare. În final, ARN a fost eluat.

Amplificarea prin RT-PCR:

(i) *Amplicor HIV-1 Monitor Test*, v 1.5. Secvența țintă este localizată într-o regiune înalt conservată din gena gag HIV-1. Master Mixul conține deoxinucleozid trifosfați (dATP, dCTP, dGTP, dTTP și dUTP), primeri biotinilați (primerul antisens SK431 și primerul sens SK462), ADN polimeraza extrasă din *Thermus thermophilus* (rTth ADN pol), acetat de mangan. Profilul termociclării a constatat în 2 min la 50°C ; 30 min la 60°C (pentru RT); 4 cicluri PCR cu 10 sec la 95°C , 10 sec la 55°C și 10 sec la 72°C ; 26 cicluri PCR cu 10 sec la 90°C , 10 sec la 60°C și 10 sec la 72°C ; la final 15 min la 72°C .

(ii) *TaqMan HIV-1 Test*. Secvența țintă este localizată de asemenea în regiunea înalt conservată a genei gag HIV-1, grup M. Transcrierea inversă, amplificarea PCR și detecția au la bază folosirea unei enzime recombinante ADN polimeraza Z05 de la o specie de *Thermus* (Z05). În prezența manganului (Mn^{2+}) Z05 îndeplinește ambele funcții: de revers-transcriptază și de ADN polimerază-ADN dependentă. Astfel, revers-transcrierea, amplificarea PCR și detecția au loc în același amestec de reacție. Probele procesate sunt adăugate în amestecul de reacție. Fiecare ciclu are rolul de a dubla cantitatea de ampliconi ADN. Uracil-N-glicozilaza (AmpErase) are rolul de a distruge înainte de demararea ciclurilor de amplificare, acele catene de ADN care conțin dUTP, care nu este prezentă, în mod normal, în catenele ADN. Astfel

se evită amplificarea acestui tip de catene ADN.

Detecția

(i) *Amplicor HIV-1 Monitor Test*, v 1.5. Cei 2 produși de amplificare: secvențe de 142 bp generate de ARN HIV-1 țintă și ARN QS, au fost detectați colorimetric. După terminarea reacției de amplificare, s-a adăugat soluția de denaturare în fiecare amestec de reacție. Produșii de amplificare ai ARN HIV-1 țintă au fost detectați cantitativ prin hibridizarea cu sonde oligonucleotidice specifice ARN țintă, în 6 diluții seriata. Diluțiile au fost preparate folosind tampon de hibridizare, realizându-se astfel 4 diluții pentru țintă și 2 diluții pentru standardul intern. A urmat etapa de adăugare a conjugatului (avidină - peroxidază din hrean) și incubarea la 37°C. S-a adăugat soluția substrat ce conține H_2O_2 și tetrametilbenzidina. S-a incubat amestecul la temperatura camerei. S-a adăugat reactivul de stopare și s-a citit densitatea optica la 450nm.

(ii) *TaqMan HIV-1 Test*. Folosirea sondelor marcate fluorescent conduce la detecția produșilor PCR concomitent cu amplificarea, prin monitorizarea emisiei de fluorescență eliberată în timpul procesului de amplificare. Sondele sunt specifice țintei ARN HIV-1 și ARN QS, fiind marcate diferit. Fiecare sondă conține un fluorocrom "reporter" și un fluorocrom "quencher". Când sonda marcată fluorescent este intactă, fluorescența "reporter-ului" este mascată de proximitatea "quencher-ului", datorită transferului de energie de tip Föster. În timpul PCR sondele hibridizează la secvența țintă și sunt clivate prin activitatea 5'→3' exonucleazică a ADN polimerazei Z05. Odată separați cei 2 fluorocromi "reporter" și "quencher", fluorescența emisă de "reporter" poate fi înregistrată și măsurată (Figura 1). Amplificarea ARN HIV-1 țintă și a ARN HIV-1 QS sunt măsurate independent

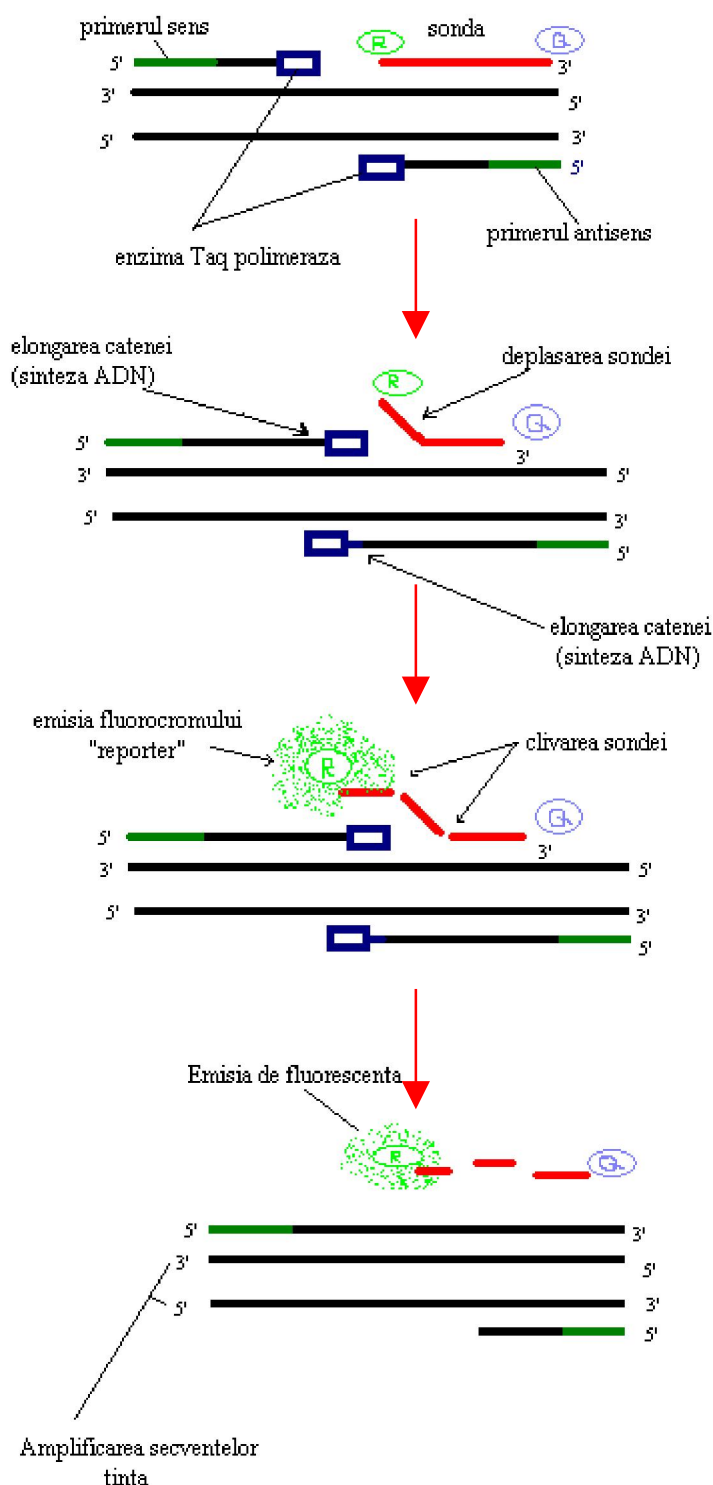


Figura 1. Etapele tehnicii TaqMan

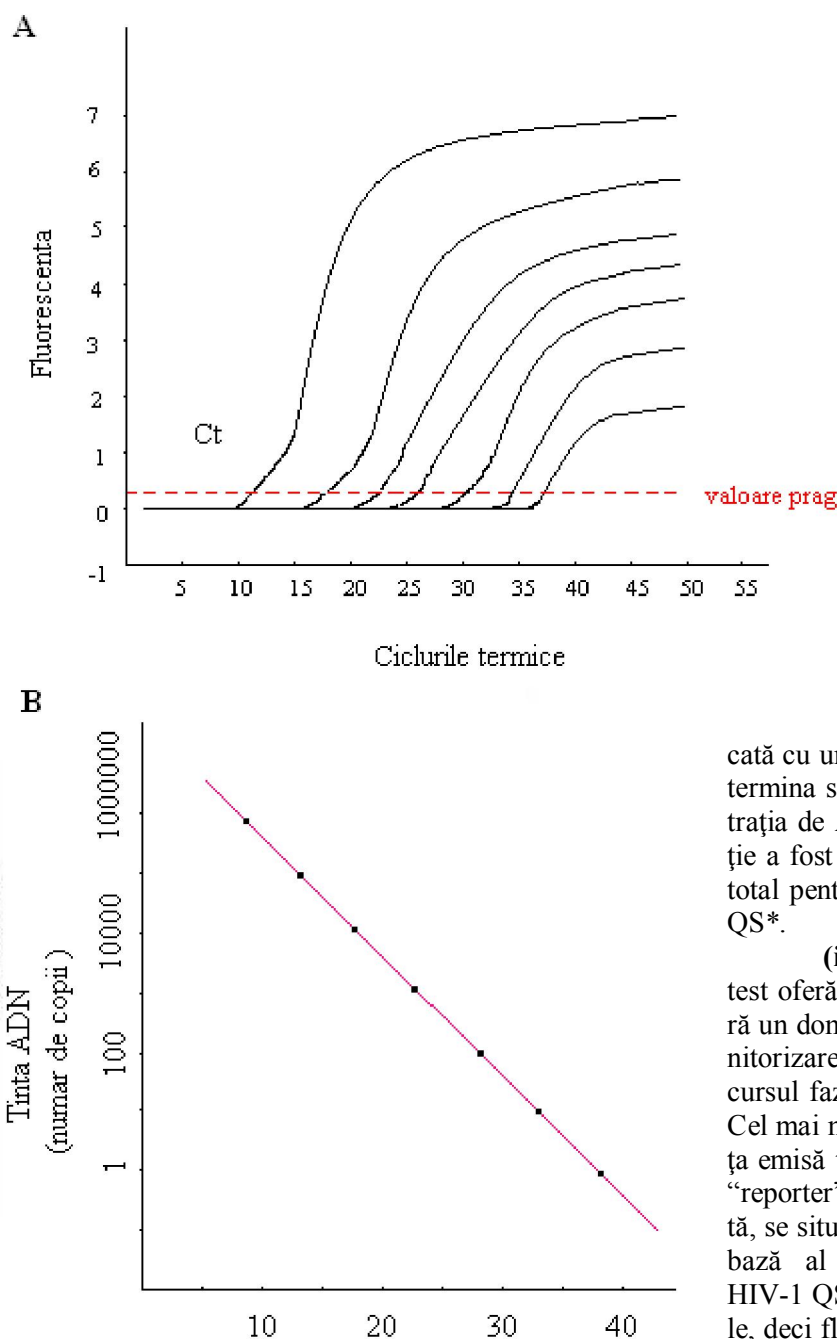


Figura 2. Reprezentarea grafică a fluorescenței emise în funcție de concentrația ADN. Cu cât concentrația este mai mare, cu atât curba intră în faza de creștere exponențială mai repede, la un Ct mai mic (A). Ciclul de *threshold* (prag) este direct proporțional cu concentrația ADN (B).

la diferite lungimi de undă. Acest proces are loc într-un număr repetat de cicluri, fiecare ciclu conducând la creșterea intensității emisiei de fluorescență, permițând identificarea independentă a HIV-1 țintă și HIV-1 QS. Intensitatea semnalului este proporțională cu cantitatea de ARN introdusă în reacție.

Calcularea concentrației ARN

(i) *Amplicor HIV-1 Monitor Test*, v 1.5. Atât pentru țintă, cât și pentru QS, semnalul emis este citit cu un spectrofotometru la 450nm. Fiecărei OD îi este aplicat un factor de corecție, după care această valoare este multiplicată cu un factor de diluție, pentru a determina semnalul total generat. Concentrația de ARN HIV-1 introdusă în reacție a fost calculată prin compararea OD total pentru proba HIV-1 cu OD pentru QS*.

(ii) *TaqMan HIV-1 Test*. Acest test oferă rezultate cantitative ce acoperă un domeniu de detecție mai larg, monitorizarea ampliconilor se realizează în cursul fazei exponențiale a amplificării. Cel mai mare titru al HIV-1, fluorescența emisă timpuriu de către fluorocromul "reporter" al sondei specifice HIV-1 țintă, se situează în apropierea nivelului de bază al fluorescenței. Cantitatea de HIV-1 QS este constantă la toate probele, deci fluorescența emisă de fluorocromul "reporter" al sondei QS.

HIV-1 apare la același ciclu la toate probele. Apariția unui semnal fluorescent specific situat în faza exponențială este raportat ca "valoare prag". Ct

*
$$\text{Copii ARN/ ml plasmă} = \frac{(\text{OD țintă total/ OD QS total}) \times \text{copii QS per reacție}}{(\text{Volum plasmă})}$$

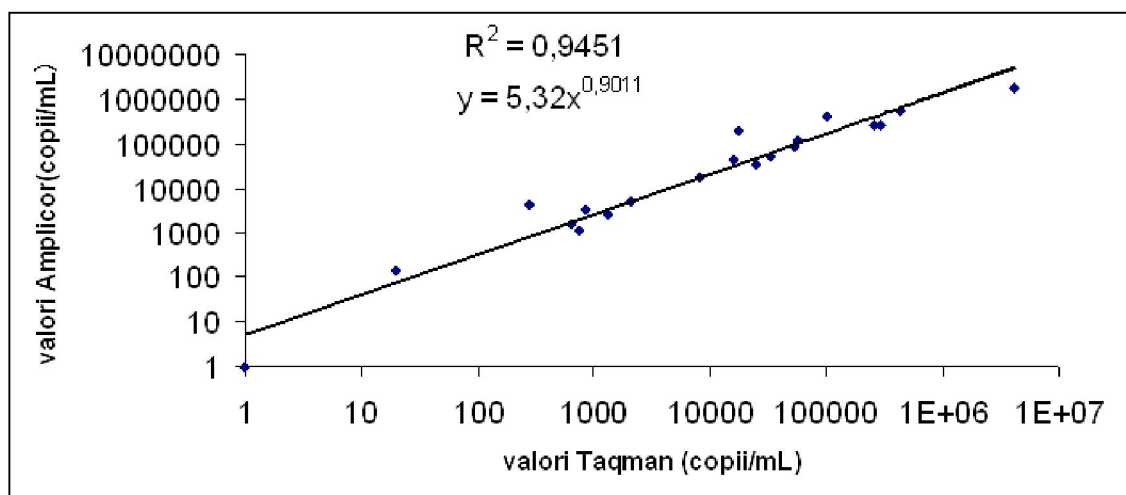


Figura 3. Analiza regresiei lineare a rezultatelor cantitative ARN HIV-1 pentru TaqMan și Amplicor, v.1.5; 20 probe cu valori cuprinse între limitele de detecție ale celor 2 teste.

este definit ca fiind numărul acelui ciclu PCR în care fluorescența emisă de fluorocrom depășește o valoare prag prestabilită (Figura 2). O valoare mare a Ct indică un titru scăzut al ARN țintă HIV-1 inițial.

Analiza statistică

Au fost analizate 2 loturi de pacienți cu infecție HIV-1, folosindu-se ambele teste. Analiza statistică a valorilor obținute cu cele 2 teste s-a realizat folosind: *Spearman's rank correlation*, *Pearson's correlation coefficient*, *Student's test*.

Rezultate

Analiza statistică a corelației dintre valorile obținute cu cele 2 teste

Au fost analizate 2 loturi de pacienți cu infecție HIV-1, subtip F, folosindu-se ambele tehnici, un lot având valori ale încărcăturii virale ce acoperă domeniul 1.6log-5.8log, cel de-al doilea lot având valori sub limita de detecție pentru COBAS Amplicor v 1.5. Analiza statistică a rezultatelor obținute a relevat o bună corelație pentru cele 20 probe cu valori situate în domeniul de citire al celor 2 tehnici: *Spearman's*

rank correlation ($r_s=0.959$) și *Pearson's correlation coefficient* ($r=0.960$), *Student's Test* ($t\text{-test}=0.666$). Analiza regresiei lineare este prezentată în Figura 3.

Pentru celelalte 26 probe, cu valori situate sub limita inferioară de detecție a celor două tehnici (40 copii/ml în cazul Taqman și 400 copii/ml în cazul Amplicor), s-a obținut, de asemenea, o bună corelație negativă *Pearson's correlation coefficient* ($r = -0,965$) - valorile mici ale unei variabile tind să poată fi asociate cu valorile mici ale celeilalte variabile. Din cele 26 probe din acest lot: 12 sunt nedetectabile în ambele teste, 7 nedetectabile la Amplicor au <40 copii/ml la TaqMan, 4 probe au valori <40 copii/ml TaqMan și <400 copii/ml la Amplicor și 3 probe cu valori >40 copii/ml la TaqMan au <400 copii/ml la Amplicor.

Discuții

Deoarece pacienții seropozitivi HIV necesită o cât mai corectă și constantă monitorizare, pentru stabilirea unui tratament adecvat, este utilă îmbunătățirea tehnicilor de cuantificare ARN HIV.

Ambele tehnici bazate pe RT-PCR

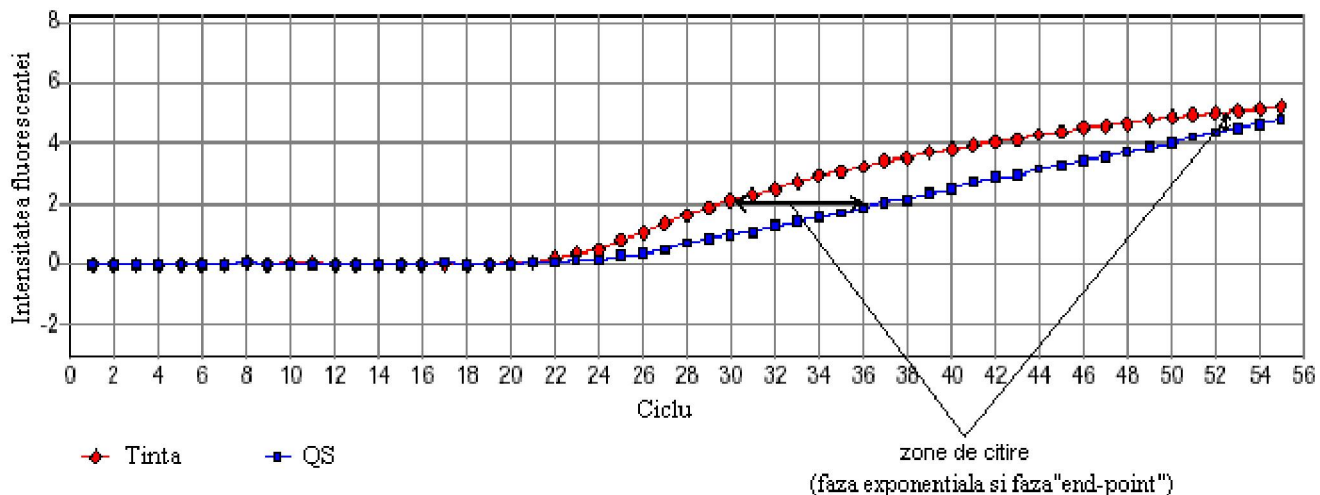


Figura 4. Reprezentarea grafică a concentrației țintei ADN și a standardului intern (QS), în tehnica TaqMan, comparând domeniul zonei de citire pentru cele 2 tehnici.

competitiv, expuse în lucrarea de față, prezintă acuratețe în determinarea încărcăturii virale, TaqMan conferind un plus de sensibilitate, rapiditate, precum și diminuarea riscului de contaminare.

Îmbunătățiri aduse de tehnica Real-Time PCR constau în:

1. Eliminarea etapei de post-procesare a produșilor PCR, în cazul TaqMan, detecția produșilor făcându-se concomitent cu amplificarea.

2. TaqMan conferă un domeniu mai larg de valori, deoarece înregistrările în acest test se realizează într-o zonă largă de citire, comparativ cu diluțiile realizate în tehnicile bazate pe "end-point", unde zona de citire este restrânsă. Astfel se observă o creștere a sensibilității, ajungându-se de la 400 copii/ml la 40 copii/ml, și o mărire a domeniului de detecție, de la $7,5 \times 10^5$ copii/ml la 10^7 copii/ml (Figura 4).

Sensibilitatea crescută a TaqMan HIV-1 Test este dată, pe lângă acuratețea citirii fluorescenței emise în timpul reacției și de: creșterea cantității de plasmă introduse în reacție cu un factor de 2.5 și de reducerea volumului de resuspensie finală cu un factor de 5.3. Cele mai multe erori în cuantificarea prin Real-Time

PCR provin din:

- Utilizarea unui ARN de o calitate slabă: fie degradat, fie insuficient purificat.
- Introducerea contaminării încrucișate.
- Eficiența scăzută a reacției.

Eficiența (Eff) reacției poate fi calculată după următoarea ecuație¹¹:

$$\text{Eff} = 10^{(-1/\text{panta})} - 1.$$

Eficiența PCR trebuie să fie teoretic de 90-110% ($3.6 \geq \text{panta} \geq 3.1$). Există un număr de variabile care afectează eficiența PCR, printre care: lungimea ampliconului, structurile secundare, construcția primerului.

Modul de cuantificare al tehnicii Real-Time permite evaluarea probelor de plasmă în timp real și cu o mai mare precizie. Sensibilitatea este dată de domeniul de detecție al *TaqMan HIV-1 Test* de 40 până la 10^7 copii ARN viral/ml plasmă. Aceasta reprezintă o îmbunătățire a limitei inferioare de detecție de până la 10 ori față de *Amplicor HIV-1 Monitor Test*, v.1.5. Astfel, această tehnică poate măsura titrul ARN HIV-1 la pacienții al căror titru se situează sub limita de detecție la determinările cu *Amplicor HIV-1 Monitor Test*, v.1.5. Totuși, o viremie plasmatică situată sub limita inferioară de detecție a ambelor tehnici nu semnifică ab-

sența virusului din organism⁸. HIV continuă să persiste în rezervoarele virale ale pacienților cu infecție HIV, conducând la persistența infecției și la creșterea viremiei plasmatice atunci când tratamentul antiretroviral a eșuat.

Bibliografie

1. Demeter L. M. , Bosch D. J., Coombs R. W. et al. "Detection of replication-competent human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) in cultures from patients with levels of HIV-1 RNA in plasma suppressed to less than 500 or 50 copies per milliliter". J Clin Microbiol, 2002; 40: 2089-2094.
2. Désiré N. , Dehée A., Schneider V. et al. "Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan Real-Time PCR assay". J Clin Microbiol, 2001; 39: 1303-1310.
3. Drosten C. , Seifried E. and Roth W. K. "TaqMan 5'-nuclease human immunodeficiency virus type 1 PCR assay with phage-package competitive internal control for high-throughput blood donor screening". J Clin Microbiol, 2001; 39: 4302-4308.
4. Fischer M. , Huber W., Kallivroussis A. et al. "Highly sensitive methods for quantitation human immunodeficiency virus type 1 RNA from plasma, cells and tissues". J Clin Microbiol, 1999; 37: 1260-1264.
5. Kostrikis L.G., Touloumi G., Karanickolas R. et al. "Quantification of human immunodeficiency virus type 1 DNA forms with the second template switch in peripheral blood cells predicts disease progression independently of plasma RNA load". J Virol, 2002; 76: 10099-10108.
6. McDermott J. L., Giri A. A., Martini I. et al. "Level of human immunodeficiency virus DNA in peripheral blood mononuclear cells correlates with efficacy of antiretroviral therapy". J Clin Microbiol, 1999; 37: 2361-2365.
7. Mendoza C., Koppelman M., Montes B. et al. "Multicenter evaluation of the NucliSens EasyQ HIV-1 v1.1 assay for the quantitative detection of HIV-1 RNA in plasma". J Virol Meth, 2005; 127: 54-59.
8. Niubo J. , Li W., Henry K. and Erice A. "Recovery and analysis of human immunodeficiency virus type 1(HIV) RNA sequences from plasma samples with low HIV RNA levels". J Clin Microbiol, 2000; 38: 306-312.
9. Scott Read "Evaluation of Roche Cobas TaqMan HIV-1 Test".
10. Sun R. , Ku J., Jayakar H., Jo-Chi Kuo et al. "Ultrasensitive reverse transcription-PCR assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma". J Clin Microbiol, 1998; 36: 2964-2969.
11. Tevfik Dorak M. "Real-time PCR (Advanced Method series)". Oxford: Taylor & Francis, 2006 (www.dorak.info/genetics/realtime.html)