

1° Congresso NEWMICRO

Bioteecnologie e diagnostica molecolare nella diagnosi delle malattie infettive

*« Rotor Gene Q una sola piattaforma
per Real Time e High Resolution Melt »*

19/21 Gennaio 2011 (TRENTO)
Sala Ferrari Incontri- Cantine Ferrari

Dott.ssa Laura Arboit
Product & Sales Specialist
QIAGEN

□ Il Rotor Gene Q:

- Caratteristiche distintive
- Gli aspetti chiave nella scelta di un termociclatore
- L'unità termica
- Il sistema ottico
- Le due unità a confronto con altri sistemi

□ L'analisi HRM (High Resolution Melt)

- Che cos'è
- La strumentazione in grado di eseguire una HRM
- La chimica
- I parametri che ne influenzano la buona riuscita
- Alcuni esempi applicativi in microbiologia

Rotor-Gene Q

Real Time Rotary Analyzer





Costruito per la detection in “tempo reale”

Caratteristiche chiave del sistema Rotor Gene Q



Caratteristiche

- Impareggiabili performance ottiche e termiche
- Termociclazione veloce
- Fino a 6 canali di acquisizione
- Analisi di Melt ad alta risoluzione e fast PCR su di un unico strumento
- Throughput flessibile da 36 a 100 posizioni (Volume input da 20 μ l a 200 μ l)
- Manutenzione minima
- Software capace di analisi per ogni tipo di applicazione in Real Time allo stato dell'arte

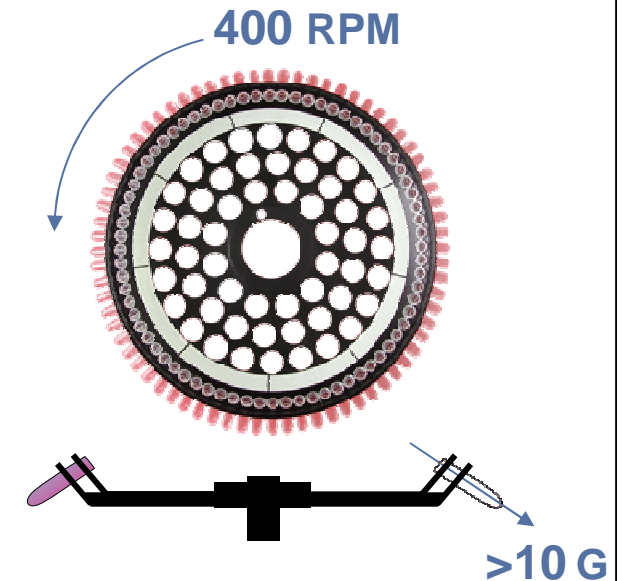
Perché scegliere il Rotore....

- I campioni ruotano continuamente a 400 RPM
 - massima uniformità termica e ottica
 - acquisizione veloce dei dati

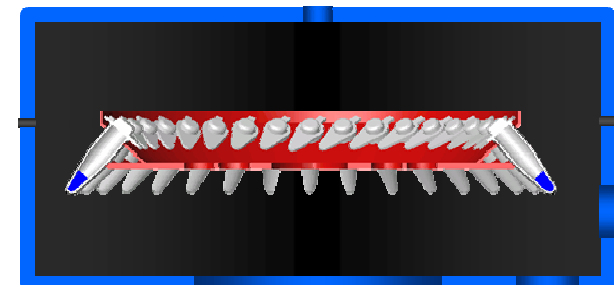
- Tutti i campioni vengono letti durante ogni rivoluzione (0.15 sec)
 - nessun calibratore passivo (es.ROX)
 - LED garantiti a vita

- La rotazione permette la rimozione delle bolle e della condensa dai tubi di reazione senza determinare il pellettamento dei reagenti

La rotazione continua del rotore garantisce l'assoluta uniformità delle condizioni termiche e ottiche per tutte le provette



Reaction Chamber

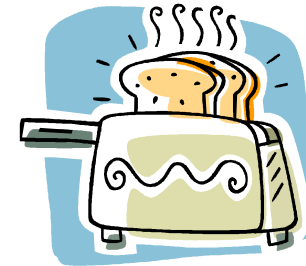


Gli aspetti più rilevanti nella scelta di un buon termociclatore si riducono alle due unità:

Dispositivo di riscaldamento/raffreddamento

La temperatura costituisce una criticità del sistema:

- L'annealing dei primers è influenzata da minime variazioni termiche
- La fluorescenza è $\propto 1/Temp$

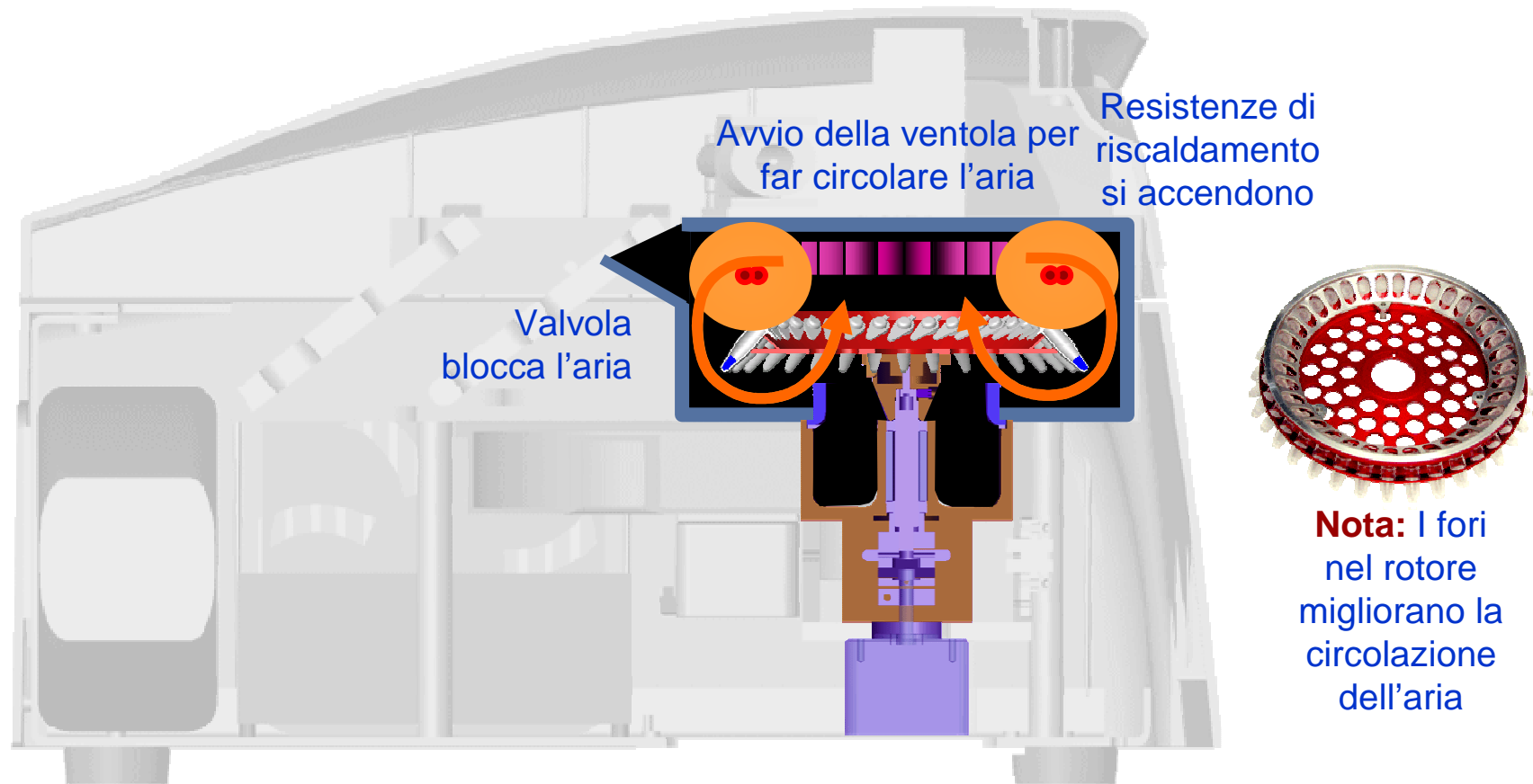


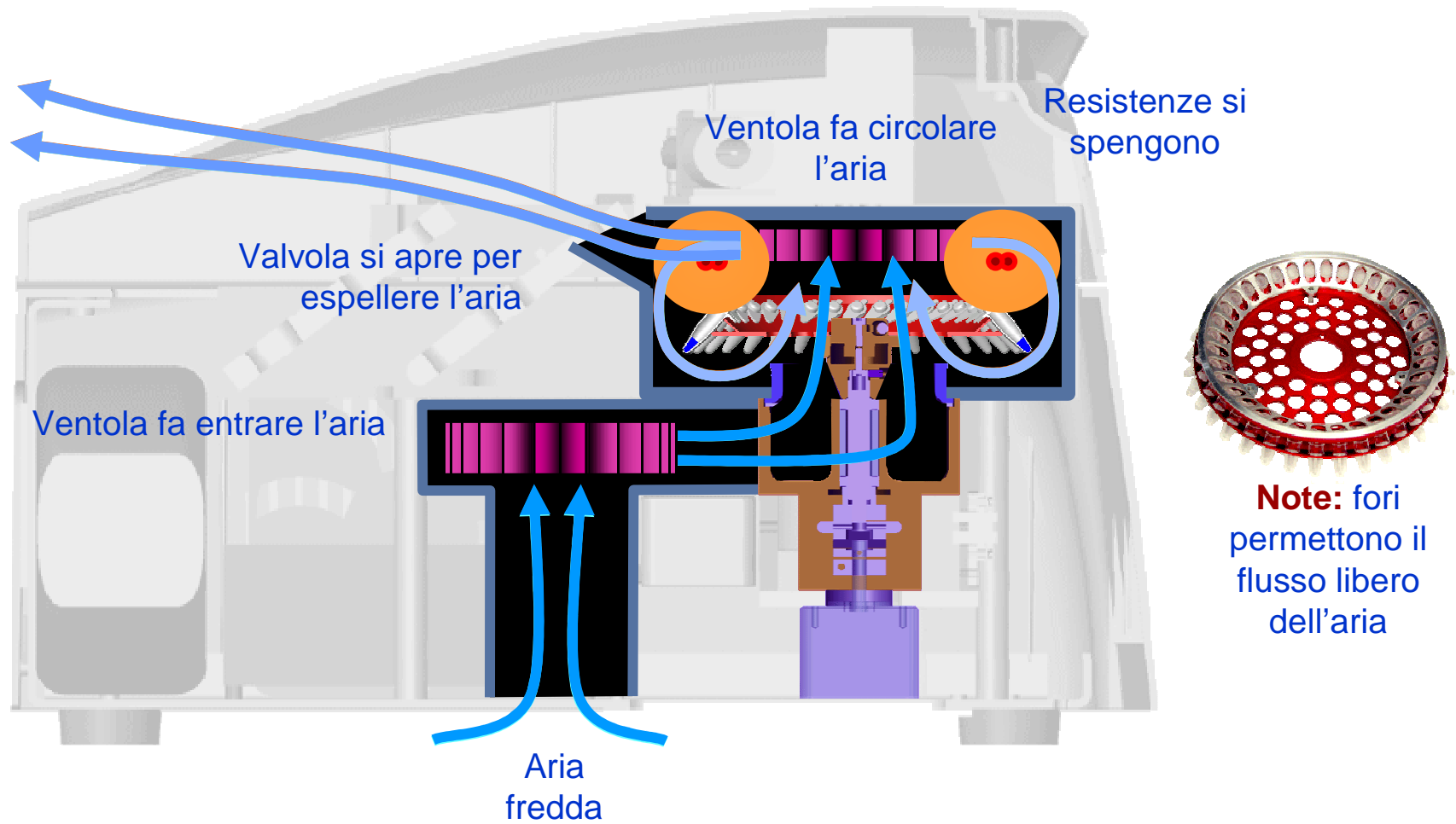
Sistema ottico

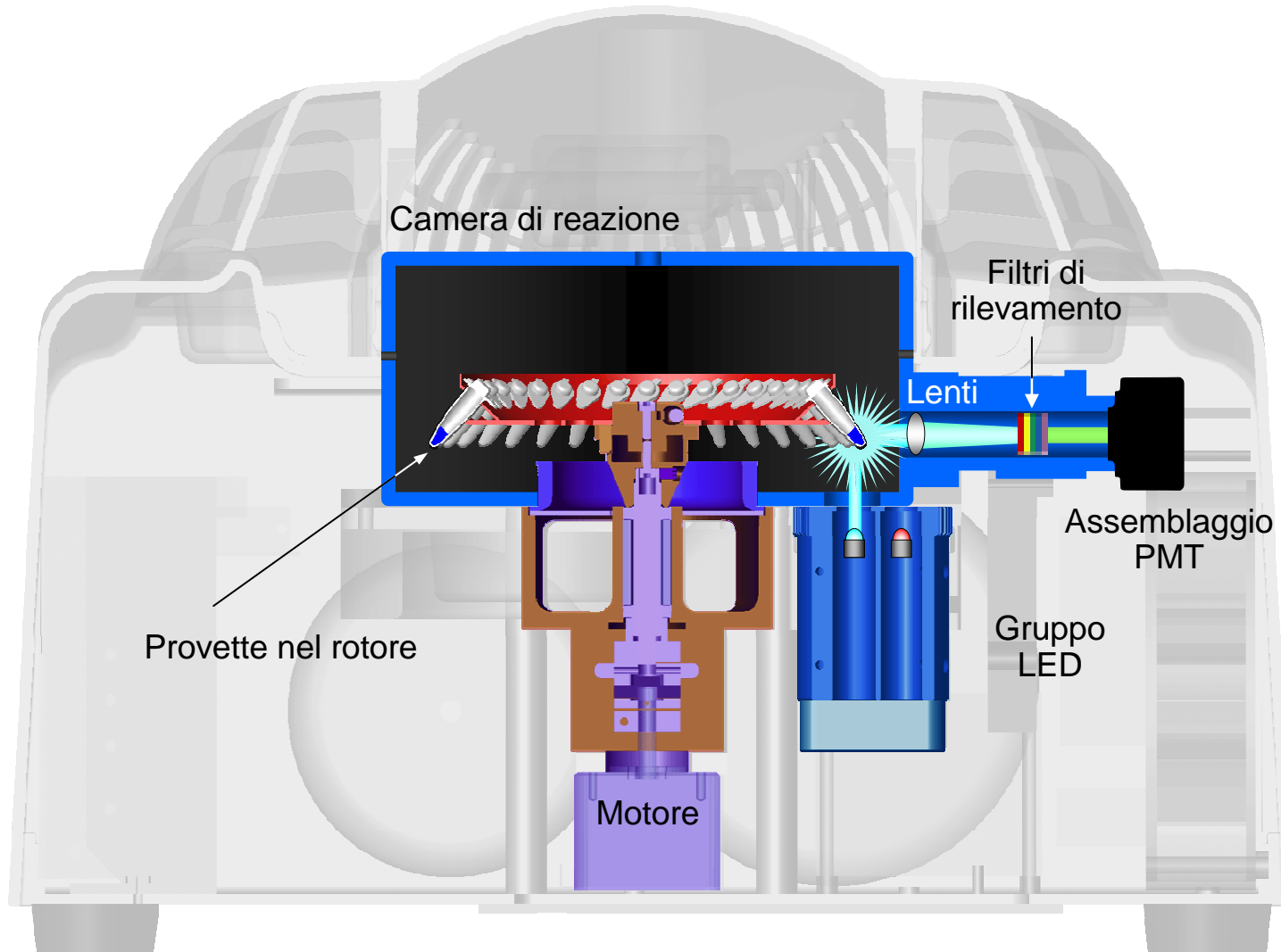
Il sistema ottico :

- Eccitazione/detection determina la sensibilità
- Colori/lunghezza d'onda /canali determinano la chimica utilizzabile





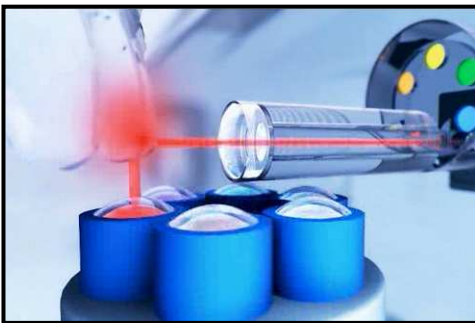
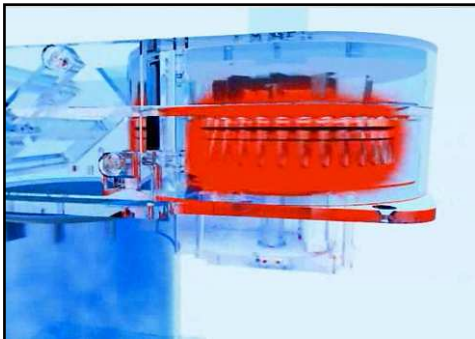






Requisiti delle piattaforme per real-time PCR

Rotor-Gene Q costruito per soddisfare tutti i requisiti



Criticità dei parametri strumentali:

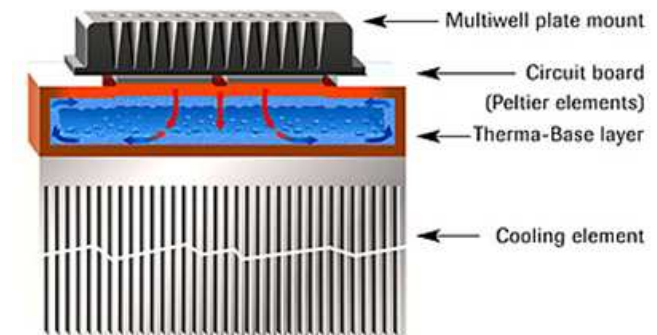
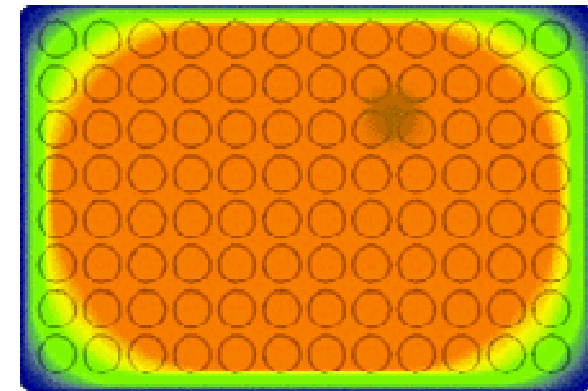
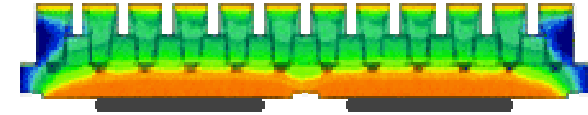
Precisione:	le variazioni della T° tra un tubo e l'altro devono essere minime per una riproducibilità ottimale
Accuratezza:	la T° impostata deve corrispondere a quella raggiunta
Tempo di equilibrio:	provoca pause nella raccolta dei dati
Ramping rate:	influenza la velocità di analisi
Illuminazione:	deve essere identica tra tubi per ottenere dati validi
No. di canali:	determina capacità di eseguire 'multiplexing'

Specifiche del Rotor-Gene Q :

Precisione:	0.01 °C; 20x migliore di ogni altro termociclatore
Accuratezza:	0.25 °C, al top della categoria
Tempo di equilibrio:	zero secondi, perchè il rotore gira continuamente
Ramping rate:	15-20 °C/sec, al top della categoria
Illuminazione:	100% identica per ogni tubo
No. di canali:	fino a 6 canali al top della categoria

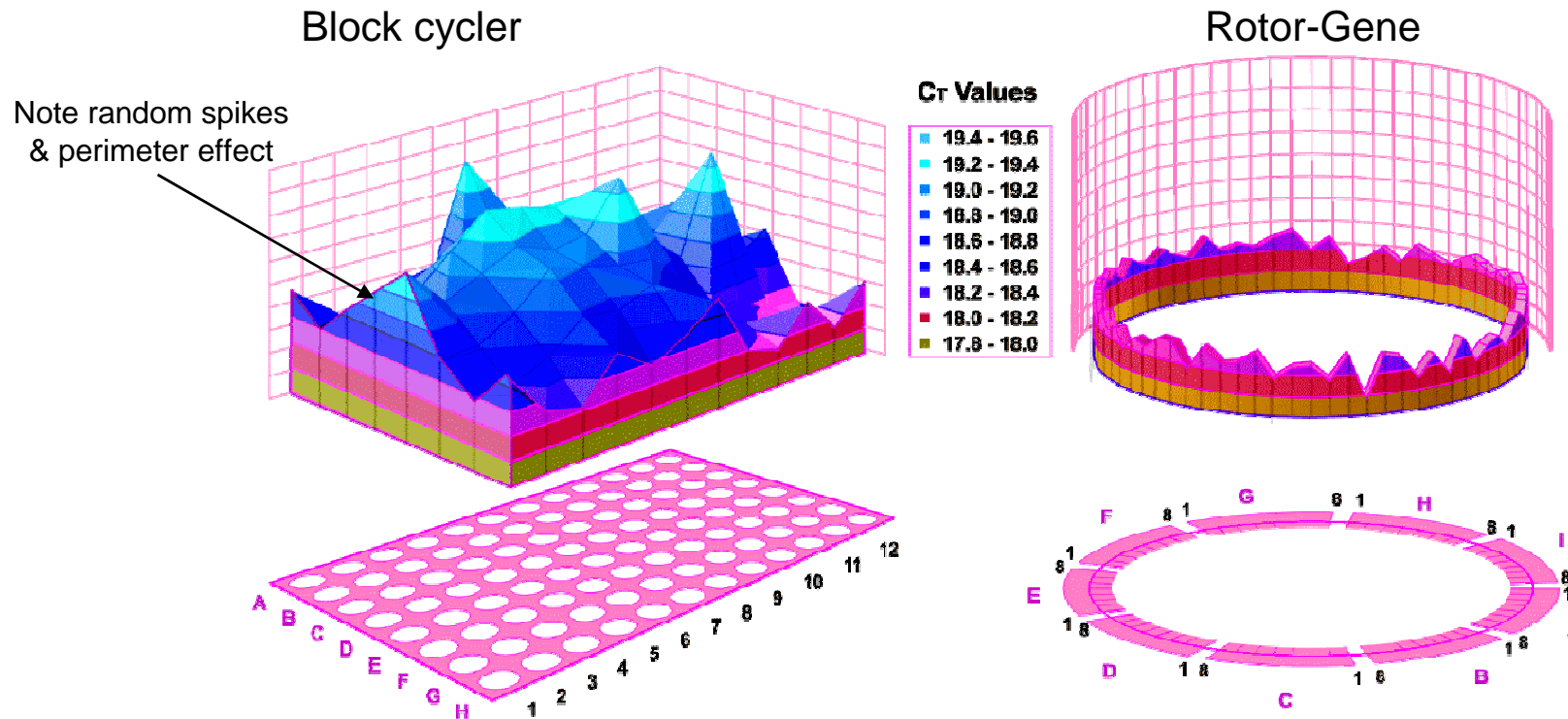
- ⊕ $\pm 0.50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (almeno)
(significa variazioni $> 1.00\text{ }^{\circ}\text{C}$!!!!)
- ⊕ Bordi ed angoli a rischio
- ⊕ **NOTA:** Fluorescenza $\propto 1/\text{Temp}$
- ⊕ “Hotspot” locali quando il Peltier si sta staccando parzialmente dal blocco
- ⊕ **Il Rotor-Gene non usa Peltier !!** perché si rompono in modo imprevedibile e sono molto costosi da sostituire!!

NOTA: Caratteristiche del Rotor-Gene Q:
Uniformità: $\pm 0.01\text{ }^{\circ}\text{C}$, Risoluzione: $\pm 0.02\text{ }^{\circ}\text{C}$



Comparazione diretta del Rotor Gene Q e termociclatori basati su Blocco Peltier

Distribuzione spaziale dei valori di Ct

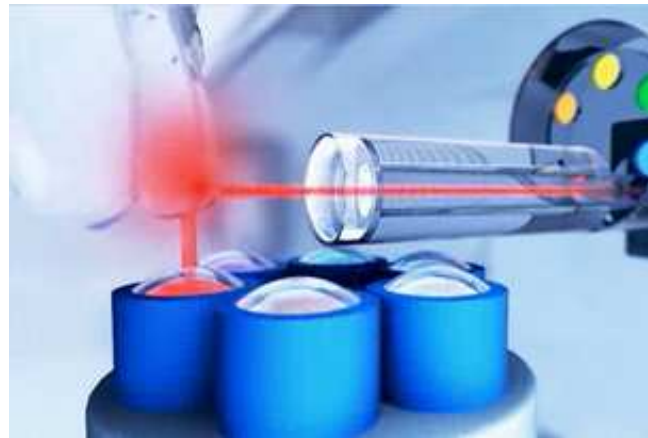


Comparison of 96-well block cycler vs. 72-well Rotor-Gene

La superiorità nell'uniformità di temperatura si traduce in una superiore precisione del Rotor Gene Q

- Permette di distinguere le differenze tra i valori di Ct con grande accuratezza
- riduce la necessità di eseguire repliche di un campione
- consente di ottenere performance insuperate nelle applicazioni HRM
- garantisce sempre il massimo dell'affidabilità dei risultati

Rotor Gene Q



....altri

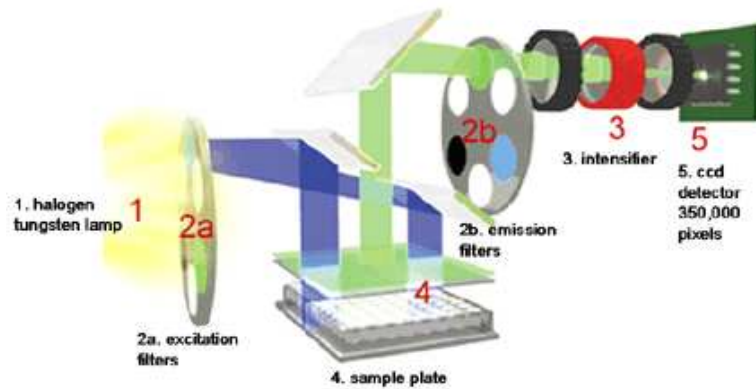


Fig. 1.2. Representation of Optical Detection System layout.

www.biorad.com



L'analisi di Melt ad alta risoluzione (HRM)



Vir

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 2010, p. 1047–1054
0095-1137/10/\$12.00 doi:10.1128/JCM.02036-09
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 48, No. 4

Research
Detection
in culture
surveillance
Esthetic
and Medical

Address: 1
Email: Est
Sancho@l
* Correspo

Published:
Virology Jou
This article

C
L
B
T
m
B
sc
ti
S
S
R
P
It
d
A
ci
6
*
Ir
ti
R

Rapid Detection of Rifampicin- and Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by High-Resolution Melting Analysis[∇]

Danny C. T. Ong,¹ Wing-Cheong Yam,² Gilman K. H. Siu,² and Ann S. G. Lee^{1,3*}

Division of Medical Sciences, National Cancer Centre, Singapore 169610, Republic of Singapore¹; Department of Microbiology, Li Ka Shing Faculty of Medicine, the University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong Special Administrative Region, China²; and Department of Microbiology, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore 117597, Republic of Singapore³

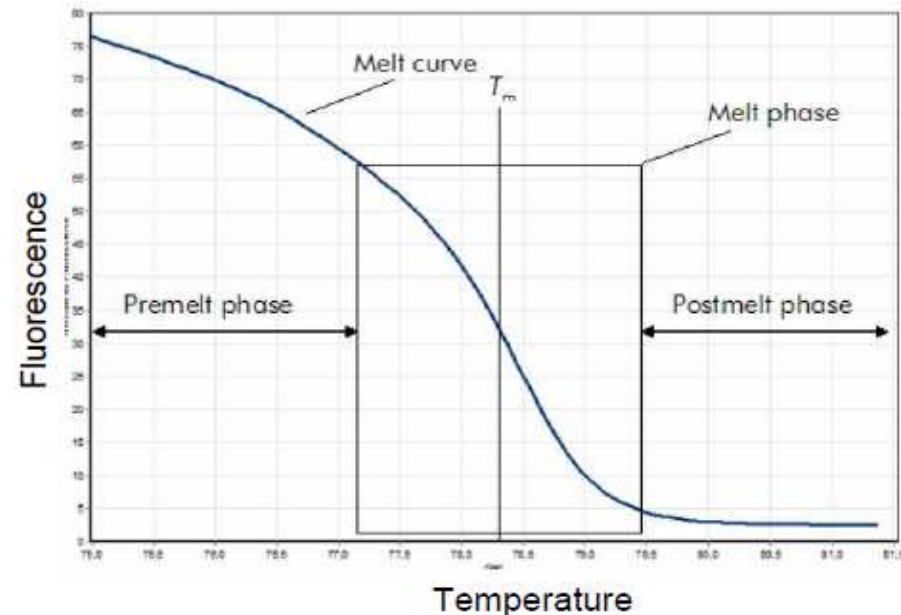
Received 9 October 2009/Returned for modification 22 December 2009/Accepted 10 February 2010

We have developed a high-resolution melting (HRM) assay to scan for mutations in the *rpoB*, *inhA*, *ahpC*, and *katG* genes and/or promoter regions for the detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. For assay development, 23 drug-resistant isolates of *M. tuberculosis* having 29 different mutations, together with 40 drug-susceptible isolates, were utilized. All 29 mutations were accurately detected by our assay. We further validated the assay with a series of 59 samples tested in a blind manner. All sequence alterations that were within the regions targeted by the HRM assay were correctly identified. Compared against results of DNA sequencing, the sensitivity and specificity of our HRM assay were 100%. For the blinded samples, the specificities and sensitivities were 89.3% and 100%, respectively, for detecting rifampin resistance and 98.1% and 83.3%, respectively, for detecting isoniazid resistance, as isolates with mutations in regions not encompassed by our assay were not detected. A C-to-T sequence alteration at position -15 of the *ahpC* regulatory region, which was previously reported to be associated with isoniazid resistance, may possibly be a polymorphism, as it was detected in an isoniazid-susceptible *M. tuberculosis* isolate. HRM is a rapid, accurate, simple, closed-tube, and low-cost method. It is thus an ideal assay to be used in countries with a high prevalence of drug-resistant *M. tuberculosis* and where cost-effectiveness is essential. As a mutation-scanning assay for detecting drug-resistant *M. tuberculosis*, it can potentially lead to better treatment outcomes resulting from earlier treatment with the appropriate antibiotics.

Fax +01 / 3138 1234

Che cosa è l'analisi di Melt ad alta risoluzione (HRM)?

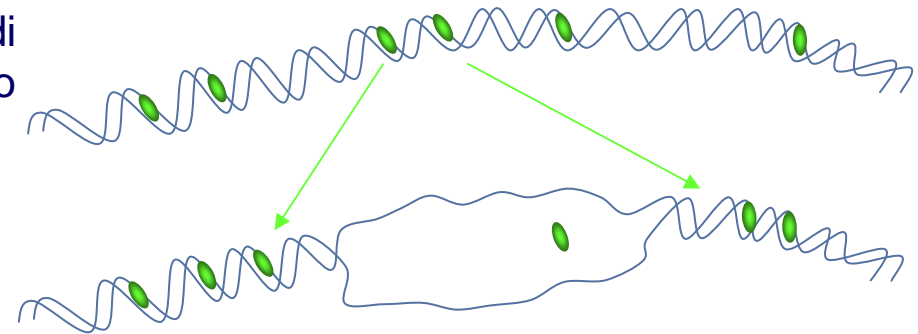
- La High Resolution Melt (HRM) è un'estensione della precedente analisi di dissociazione del DNA.
 - È un'analisi post-PCR, nello stesso tubo, che caratterizza campioni di DNA sulla base del comportamento dissociativo dsDNA-ssDNA all'aumentare della T° .
- Permette di studiare piccole differenze di sequenza, basandosi sulle modificazioni che queste provocano sulla Temperatura di Melt, seguendo la dissociazione del doppio filamento durante il passaggio da una temperatura minore ad una maggiore
- Uno strumento capace di eseguire una HRM raccoglie i segnali di fluorescenza con un'estrema precisione ottica e termica rispetto ai metodi tradizionali



Chimiche, intercalanti

Il SYBR[™] Green I è tossico per le reazioni di PCR quindi le concentrazioni utilizzate sono molto basse

Siti non saturati permettono al fluorescente di ridistribuirsi quando inizia la reazione di melting

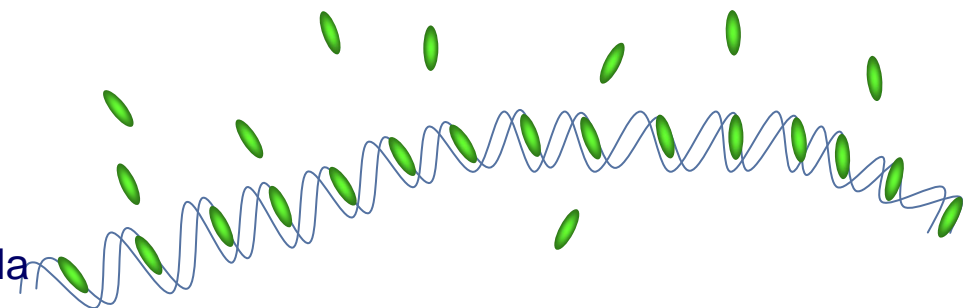


SYBR[®] Green I

La tecnologia del fluorescenti “saturanti” per l’HRM -LCGreen[™] I, EVA Green, Syto 9

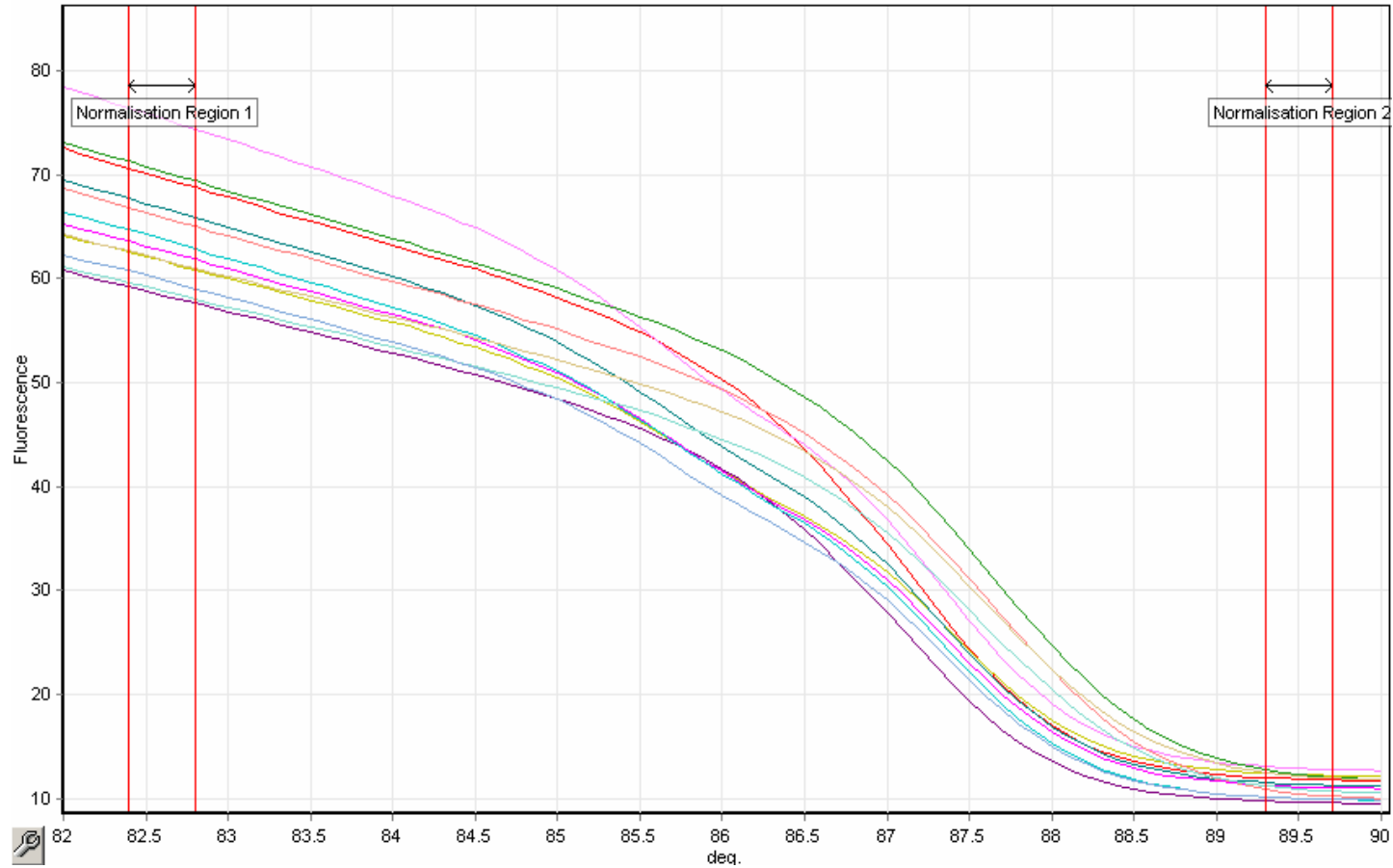
I fluorescenti saturanti sono meno tossici quindi possono essere utilizzati in concentrazione maggiore consentendo la saturazione di tutti i siti

Ipotesi: la saturazione elimina la possibilità che il fluorescente si ridistribuisca durante la melt

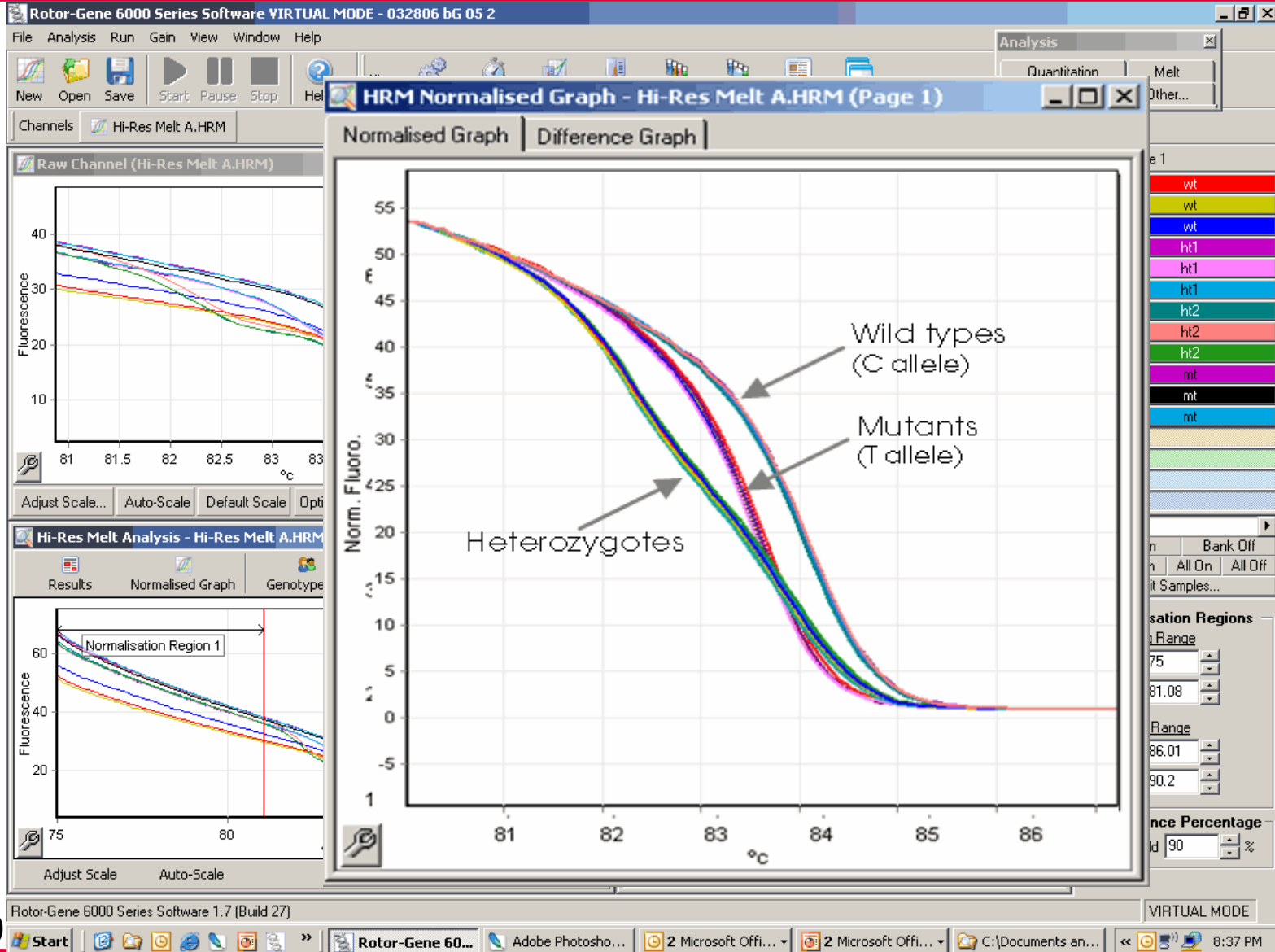


LC Green[™] I

- ❑ Non tutti gli strumenti per PCR real time possono eseguire una HRM.....
- ❑ Per eseguire questa analisi, uno strumento deve possedere:
 - **Alta intensità e sensibilità ottica**: per poter rilevare anche piccoli cambiamenti nella fluorescenza emessa.
 - **Un controllo della temperatura molto preciso**: per permettere piccoli incrementi di temperatura (aumentare la risoluzione).
 - **Uniformità di temperatura vicino alla perfezione**
 - **Alta velocità di acquisizione dei dati.**
- ❑ L'utilizzo di uno strumento che possiede queste caratteristiche non solo permette di eseguire analisi di HRM, ma assicura l'ottima qualità strumentale anche per le classiche reazioni di PCR Real Time!



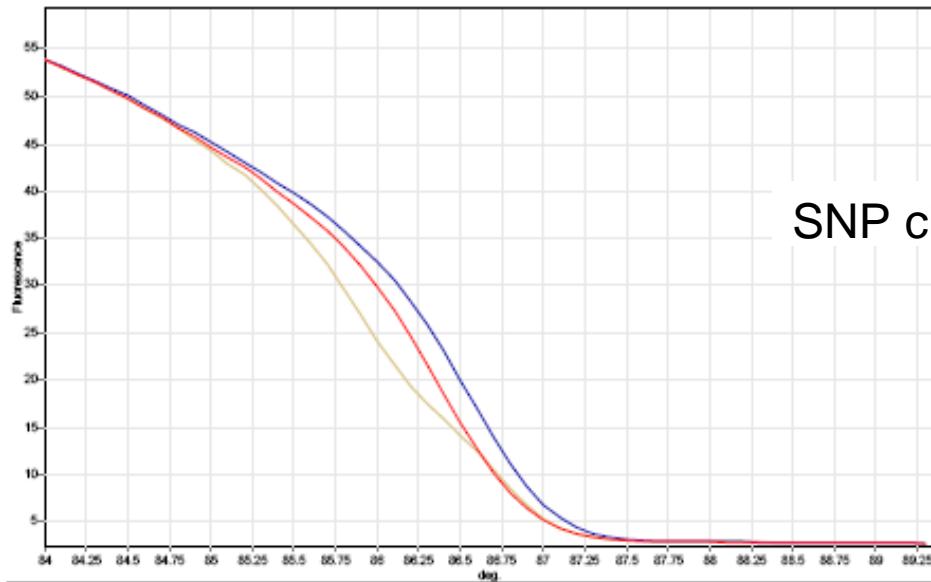
- ⊕ **Curve di melt normalizzate**—selezionando le regioni lineari prima e dopo la transizione di melt
- ⊕ **Due regioni definite**—superiore 100%DNA a doppia elica/ inferiore DNA a singolo filamento



- ACTN3 C-T (R577X)
- 10 replicates
- 40 cycle fast (< 40 min).

Genotipizzazione degli SNPs di classe 4

SNP Class	Base Change	Typical Tm Shift	Rarity (in humans)
1	C/T and G/A	Large >0.5°C	64%
2	C/A and G/T		20%
	C/G	↓ Very Small <0.2°C	9%
	A/T		7%



SNP classes as described by Venter *et al* 2002

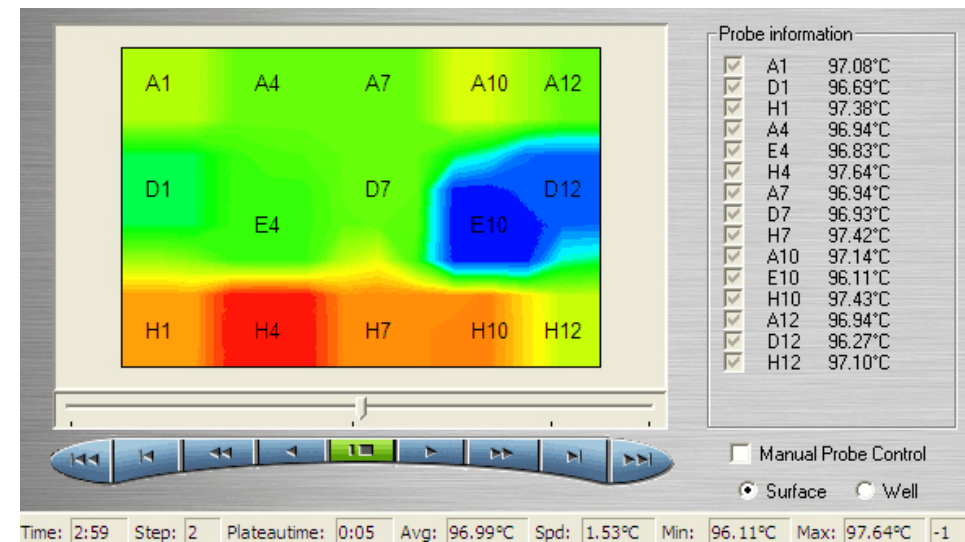
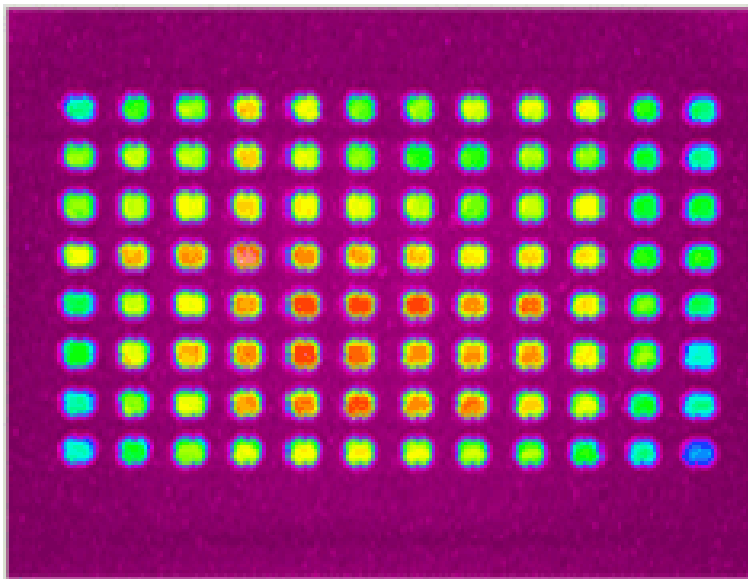
Example of a class 4 SNP on the Rotor Gene (MCT A1470T)
 The rarest and most difficult SNP to discriminate.

CHE COSA INFLUISCE SULL'HRM?

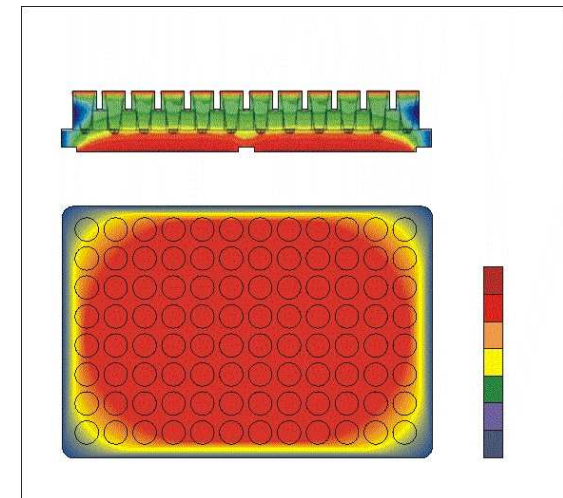
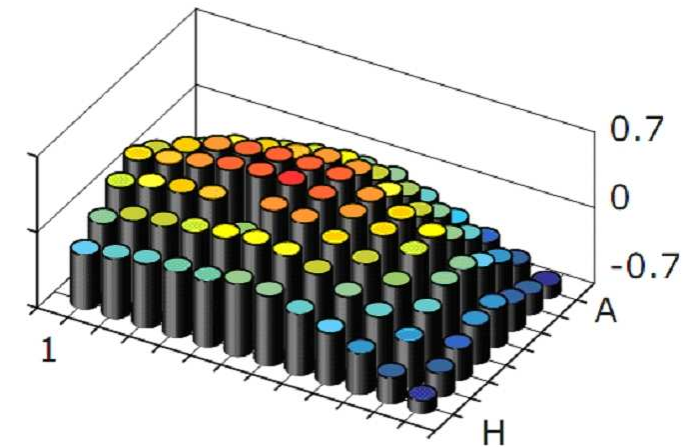


Tre i parametri principali.....

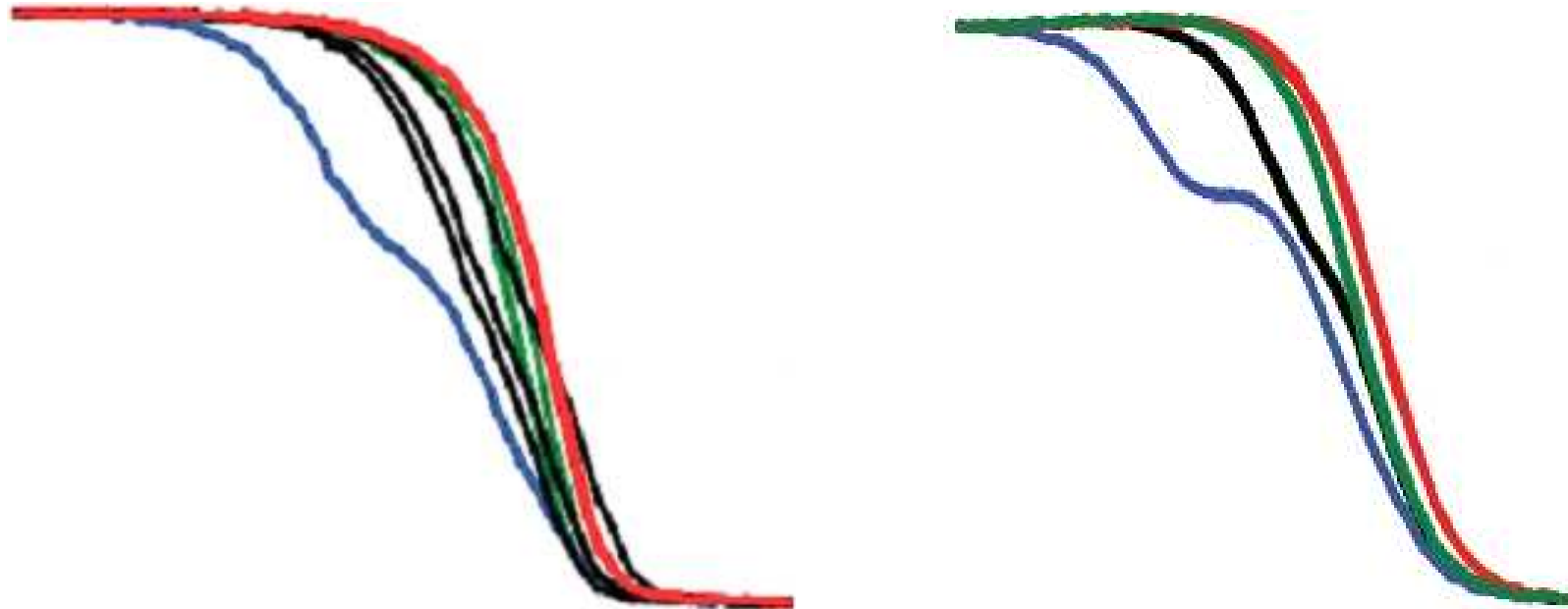
- ❑ Due sono le caratteristiche principali che uno strumento deve possedere per poter fare HRM:
 - **UNIFORMITA' DI TEMPERATURA**
 - **UNIFORMITA' DI ECCITAZIONE**



- ❑ Il Rotor Gene Q risulta essere il miglior candidato perché:
 - ✓ La temperatura tra le diverse provette nel rotore, può variare al massimo di $0,01^{\circ}\text{C}$. Il blocco Peltier porta ad una differenza anche di alcuni $^{\circ}\text{C}$ tra diversi pozzetti.
 - ✓ Stessa temperatura sul tappo e sul fondo della provetta.
 - ✓ Utilizzo di led invece che lampade alogene
 - ✓ Percorso della luce identico per tutte le provette (sistema ottico in posizione fissa)
 - ✓ Luce e fotomoltiplicatore a 90°C .



Le conseguenze di una strumentazione imprecisa e non uniforme



Normalized melting curves of two different instruments.

Herrman et al., 2007, Clinical Chemistry 53, No. 8

- ❑ **Analizzare frammenti di DNA brevi < a 250 pb:**

Frammenti più lunghi sono comunque analizzabili ma con minore risoluzione. Questo perchè la variazione di una singola base incide molto di più sulla T_m di un frammento di 100pb che su di uno di 500pb.

- ❑ **Analizzare un singolo prodotto puro:**

Campioni contaminati con artefatti post amplificazione come primer dimers o prodotti non specifici possono rendere i risultati di HRM difficili da interpretare.

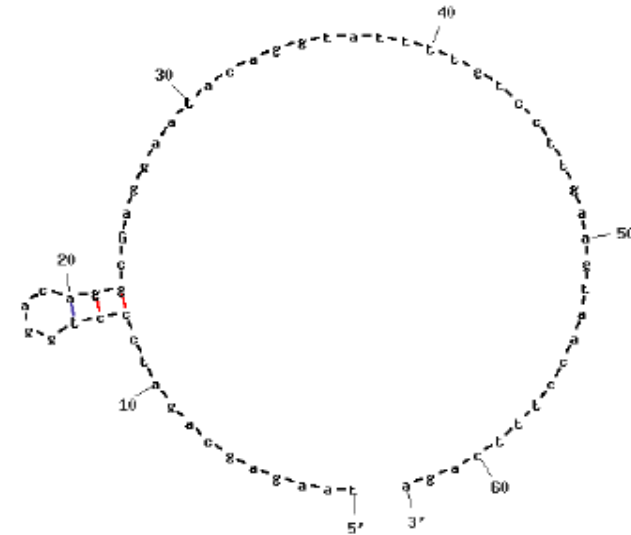
- ❑ **Utilizzare templatato a sufficienza prima dell'amplificazione:**

Valutare la qualità dell'amplificato, controllando che tutte le curve terminino più o meno allo stesso valore di fluorescenza ed abbiano un andamento simile. Valutare i C_t dei diversi campioni controllando che questi siano simili tra loro e che non abbiano $C_t > 30$. Eseguire una comparative quantitation accertandosi che l'efficienza della reazione sia per tutti superiore a 1,4. Campioni che non posseggono queste caratteristiche vanno esclusi dall'analisi.

- ❑ **Range di temperatura di analisi HRM:**

Impostare un range di HRM di 10 °C centrato sulla T_m osservata.

- Durante il set up della reazione è importante verificare:
 - Possibilità di strutture secondarie
 - Percentuale GC del DNA target
 - Omogeneità della concentrazione di DNA amplificato tra i diversi campioni
 - Possibilità di formazione di dimeri di primer



$$dG = 1,221^{\circ}A$$



III° Parametro: Precisione dell'operatore e della strumentazione accessoria

- ❑ L'HRM è una metodica altamente sensibile
- ❑ Piccole variazioni nel setup della reazioni possono determinare cambiamenti importanti nei risultati.
 - Errori di pipettamento
 - Errori degli strumenti accessori (es. pipette starate)
 - Errori nella conservazione dei reagenti
 - Reagentario non appropriato.



Vantaggi dell'HRM

- ❑ Economica rispetto alle altre tecniche di genotipizzazione come sequenziamento e tipizzazione basata sull'uso delle sonde
- ❑ Veloce e sensibile: un elevato numero di campioni in tempi brevi
- ❑ Semplice e pratica: può essere realizzata in ogni laboratorio in cui si trovi un RGQ!
- ❑ Non richiede la riapertura delle provette: rapidi cicli di PCR seguiti dall'analisi HRM
- ❑ Il campione non viene 'consumato' ma può essere utilizzato in analisi successive (es.sequenziamento)
- ❑ Una gamma di applicazioni illimitata



Vir

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 2010, p. 1047–1054
0095-1137/10/\$12.00 doi:10.1128/JCM.02036-09
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 48, No. 4

Research
Detection
in culture
surveillance
Etiology
and Molecular

Address: 1
Email: Est
Sancho@l
* Correspo

Published:
Virology Jou
This article

C
L
B
T
m
B
sc
ti
S
S
R
P
It
d
A
ci
6
Ir
ti
R

Rapid Detection of Rifampicin- and Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by High-Resolution Melting Analysis[∇]

Danny C. T. Ong,¹ Wing-Cheong Yam,² Gilman K. H. Siu,² and Ann S. G. Lee^{1,3*}

Division of Medical Sciences, National Cancer Centre, Singapore 169610, Republic of Singapore¹; Department of Microbiology, Li Ka Shing Faculty of Medicine, the University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong Special Administrative Region, China²; and Department of Microbiology, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore 117597, Republic of Singapore³

Received 9 October 2009/Returned for modification 22 December 2009/Accepted 10 February 2010

We have developed a high-resolution melting (HRM) assay to scan for mutations in the *rpoB*, *inhA*, *ahpC*, and *katG* genes and/or promoter regions for the detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. For assay development, 23 drug-resistant isolates of *M. tuberculosis* having 29 different mutations, together with 40 drug-susceptible isolates, were utilized. All 29 mutations were accurately detected by our assay. We further validated the assay with a series of 59 samples tested in a blind manner. All sequence alterations that were within the regions targeted by the HRM assay were correctly identified. Compared against results of DNA sequencing, the sensitivity and specificity of our HRM assay were 100%. For the blinded samples, the specificities and sensitivities were 89.3% and 100%, respectively, for detecting rifampin resistance and 98.1% and 83.3%, respectively, for detecting isoniazid resistance, as isolates with mutations in regions not encompassed by our assay were not detected. A C-to-T sequence alteration at position -15 of the *ahpC* regulatory region, which was previously reported to be associated with isoniazid resistance, may possibly be a polymorphism, as it was detected in an isoniazid-susceptible *M. tuberculosis* isolate. HRM is a rapid, accurate, simple, closed-tube, and low-cost method. It is thus an ideal assay to be used in countries with a high prevalence of drug-resistant *M. tuberculosis* and where cost-effectiveness is essential. As a mutation-scanning assay for detecting drug-resistant *M. tuberculosis*, it can potentially lead to better treatment outcomes resulting from earlier treatment with the appropriate antibiotics.

Fax +01 / 3158 1534



Analisi di Melt ad alta risoluzione delle regioni ripetute spa dello *Staphilococcus aureus*

La regione X ipervariabile della proteina A (spa) stafilococcica è utilizzata solitamente per la genotipizzazione tramite sequenziamento a singolo locus di *Staphilococcus aureus*

Questo locus contiene una struttura complessa ripetuta che si pensa sia soggetta a 'slipped-strand-mispairing' e ricombinazione. Inoltre il dominio extracellulare della proteina A è soggetto a sorveglianza immunitaria che si pensa possa far aumentare la sua velocità di evoluzione.

Di conseguenza esistono 2366 tipologie di spa (Ridom SpaServer database).

«nonostante la tecnologia del sequenziamento sia molto efficace, metodi di genotipizzazione non basati sul sequenziamento sembrano altrettanto vantaggiosi»... «in particolare le piattaforme di PCR Real Time consentono la genotipizzazione in singolo step e in tubo chiuso e possono essere condotte parallelamente alla diagnosi, possono inoltre indagare classi differenti di polimorfismi genici..»

«queste caratteristiche possono costituire vantaggi reali per i laboratori di microbiologia»



In breve...

Inizialmente l'analisi HRM è stata condotta su 22 sequenze spa conosciute, provenienti da 44 ceppi MRSA isolati per questo studio.

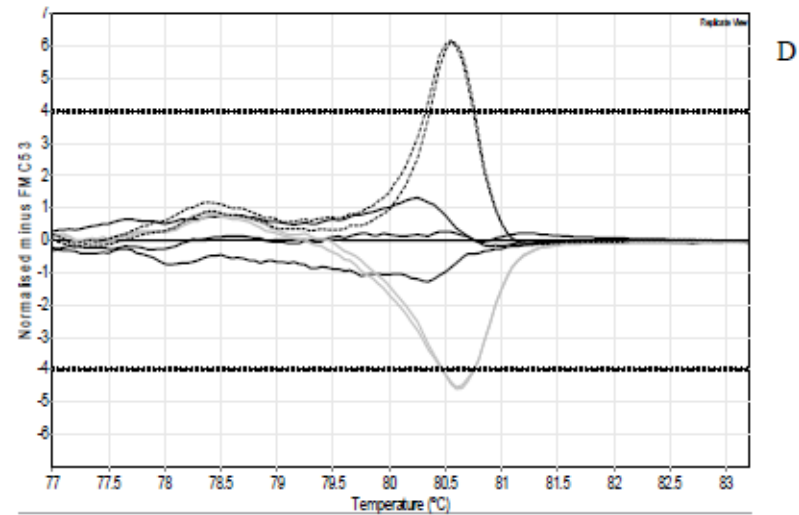
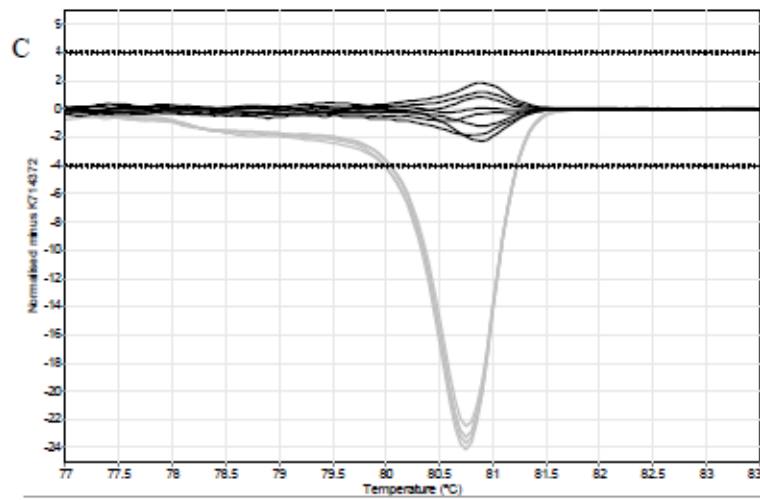
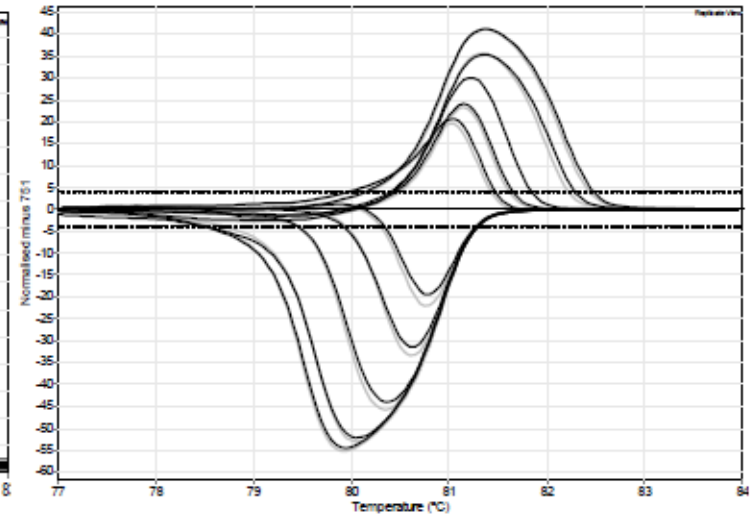
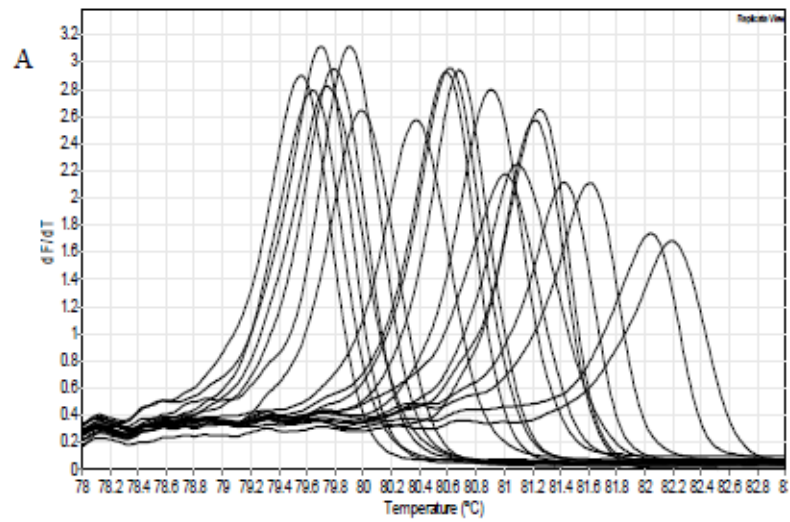
Per valutare rigorosamente la capacità discriminatoria dell'HRM, il gruppo includeva isolamenti multipli con 'tipologia di sequenza multilocus' identiche MLST o profili di SNP derivati da MLST poichè si pensa che abbiano sequenze molto simili tra loro.

Le 22 sequenze di spa includevano 5 tipi nuovi:

3 con nuove combinazioni di unità ripetute note

2 con unità ripetute non note (nuove)

«Tutte le sequenze analizzate differivano tra loro di una singola base, in modo da testare rigorosamente l'analisi»



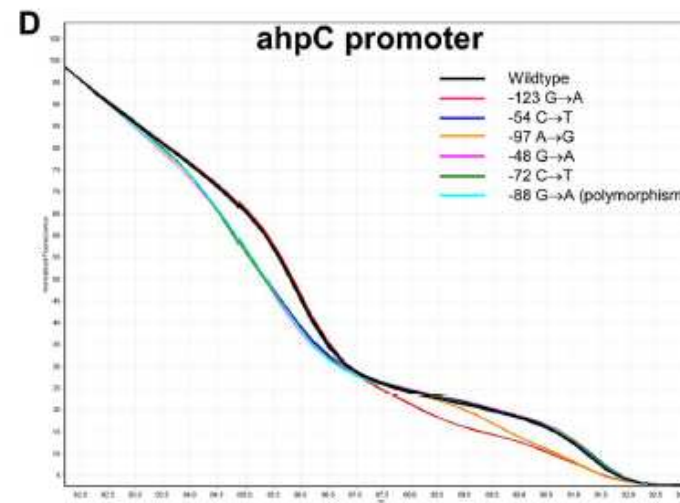
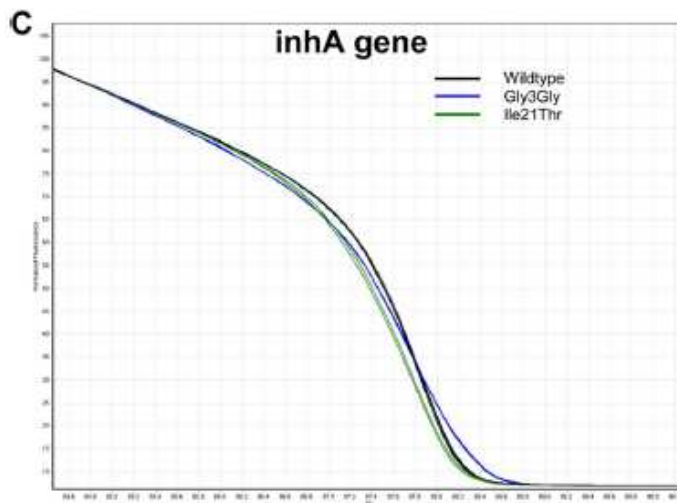
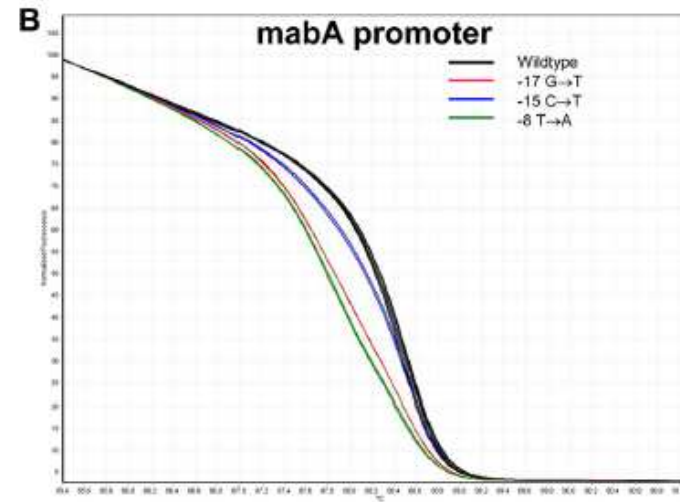
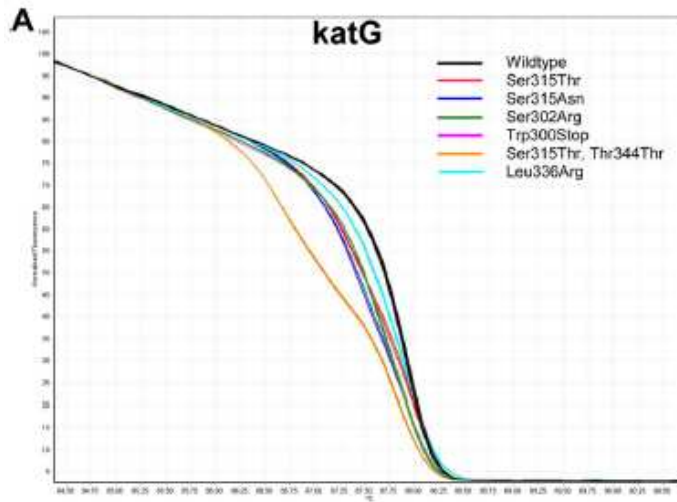


Detection rapida della resistenza alla Rifampicina e all'Isoniazide di *Mycobacterium tuberculosis*

- « Il test tramite analisi HRM è stato sviluppato per identificare le mutazioni nei geni *rpoB*, *inhA*, *ahpC*, e *KatG* e/o loro promotori per la detection della resistenza del *Mycobacterium tuberculosis* alla Rifampicina e Isoniazide.
- « Per la realizzazione del test sono stati utilizzati 23 isolamenti di *M.tuberculosis* resistenti al farmaco con 29 mutazioni diverse, e 40 isolamenti farmaco sensibili.»
- «Tutte le 29 mutazioni sono state rilevate dal test.»
- « Comparete con i risultati di sequenziamento del DNA, lesensibilità e specificità del test HRM sono risultate del 100%»

Vol. 48, 2010

HRM FOR RIF AND INH RESISTANCE DETECTION 1051



GRAZIE PER L'ATTENZIONE