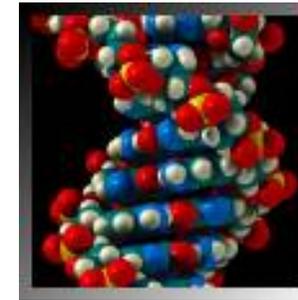


## Conclusioni:

Lo studio condotto, in conclusione, dimostra che le Tecniche di Biologia Molecolare possono trovare ampio spazio nella diagnostica, sempre che siano disponibili operatori esperti e reagenti che possano dare una efficace misura delle specifiche del sistema in uso, che abbiano caratteristiche di stabilità nel tempo ed omogeneità.

Infine l'esperienza fatta per l'allestimento del QCHCV.1, sembra dare indicazioni della fattibilità oltre che della necessità, di verifiche esterne di qualità per le tecniche di Biologia Molecolare, in cui però in un futuro prossimo si riescano a valutare le capacità quantitative delle PCR e la soggettività dell'interpretazione del risultato da parte dell'operatore, magari proponendo di restituire anche parte del prodotto della reazione, per consentire la rivalutazione contemporanea di tutte le reazioni.



## CONTROLLO DI QUALITÀ DEI SAGGI DI AMPLIFICAZIONE GENICA NEI LABORATORI DIAGNOSTICI

S. Di Biase (a), M. Brunetto (b), D. Labella (a), N. Di Pietro (a), V. Salotti (a), U. Baicchi (c), P. Palla (c) e F. Bonino (b). "Gruppo di Studio Italiano per il Controllo di Qualità sull'applicazione delle tecniche di Biologia Molecolare per la sicurezza del sangue e degli emoderivati (d)".

## Bibliografia

- SCHREIBER, G.B., Bush M.P., Kleinman S.H., et al. *The risk of transfusion-transmitted viral infections. New England Journal of Medicine* 1996, 334: 1685-1690.
- SALDANA, J., MINOR P., *Incidence of Hepatitis C virus RNA in anti-HCV-negative plasma pools and blood products. Vox Sanguinis* 1996, 70: 232-234.
- NEUMAIER, M., BRAUN, A., and WAGENER, C., *Fundamentals of quality assesment of meolecular amplification methods in clinical diagnostics. Clinical Chemistry* 1998, 44:1, 12-26.
- SALDANA, J. *Standardization, Quantification and Quality Control of Assays for HCV-RNA. Viral Hepatitis* 1999, 5 (1): 1-11.
- ORLANDO, C., CASINI RAGGI, C., PAZZAGLI, M., *Un programma di valutazione esterna della qualità per l'analisi del DNA tramite amplificazione con PCR. Biochimica Clinica* 2000, 24:2, 96-104.
- FARCI, P., SHIMODA, A., COIANA, A., DIAZ, G., PEDDIS, G., et al. *The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. Science* 2000, 288: 5464, 339-344.

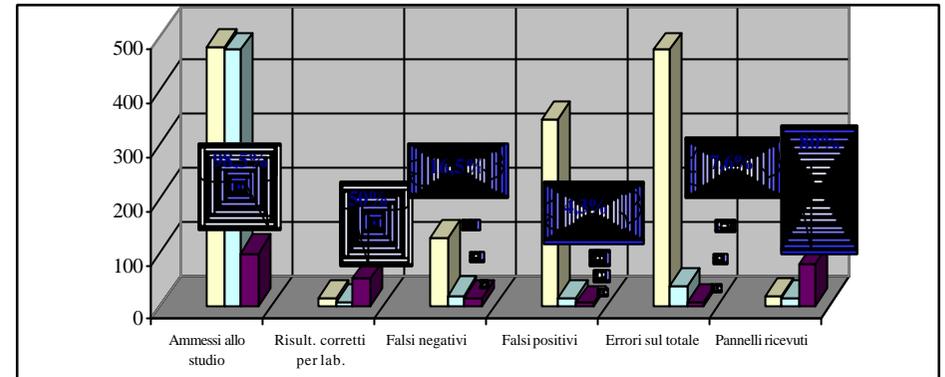
(a)GeneDia s.r.l. Lab. Ricerca e Sviluppo Trav. M Pietravalle 11, 80131 NAPOLI (b)Unità Operativa di Gastroenterologia ed Epatologia, Spedali Riuniti di Santa Chiara, PISA. (c)Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasmfusionale, Spedali Riuniti di Santa Chiara, PISA. (d) Benucci (Orto); Vicari, Scudeller (SIMT – BG); Sirchia, Della Torre (SIMT – MI); Miceli, Iudicone (CRI C.N.T.S. – ROMA); Rinaldi, Gentile (ASL Caserta/1 – Servizio Centralizzato di Biologia Molecolare); Monguzzi (SIMT – Sesto S. Giovanni MI); Rapicetta (Lab. Virologia – ISS ROMA); Cambiè (SIMT - LODI); De Biase, Quartaroli (Lab. Analisi Osp. C. Poma – MN); Massaro (AVIS – TO); Borrini, Colalillo (Trasf. Militare – La Spezia); Utech, Macri (SIMT Osp. Cardarelli - NA); Rigolin, Guerra (Lab. Analisi Arcispedale S. Anna – FE); Raffaele (SIMT – LE); Vaselli (SIMT - PD); Gessoni (SIMT – MESTRE); Colucci (Roche – BASILEA), Massaro (AVIS TO).

## Introduzione:

Nel corso dell'ultimo decennio abbiamo assistito ad una larga diffusione delle tecniche di Biologia Molecolare per scopi di ricerca e ad una forte spinta all'introduzione di queste tecniche nella diagnostica clinica. Ciò è avvenuto grazie all'impiego di una tecnica di grande versatilità ed affidabilità che consente l'amplificazione degli acidi nucleici, la "Polimerase Chain Reaction" (PCR). Questa tecnica permette di generare un numero elevato di copie di un frammento di DNA o cDNA partendo da quantità ridotte di estratti di acidi nucleici (DNA o RNA). Il processo consistente in un sostanziale arricchimento del numero di copie del target selezionato, ci permette di sottoporre il campione in esame ad ulteriori fasi analitiche che ne consentono l'identificazione, la caratterizzazione e, in particolari condizioni di esecuzione della reazione stessa, la misura quantitativa. La PCR, infatti, svolge tradizionalmente due funzioni: quella analitica, che consiste nella definizione della presenza/assenza di determinate sequenze geniche nel campione in esame (come nel caso dell'identificazione di genomi virali, per es. HCV, HIV etc...) e quella preparativa, nella quale il campione amplificato serve come bersaglio per l'applicazione di ulteriori tecniche di biologia molecolare come la definizione della sequenza nucleotidica, il clonaggio, l'ibridazione, il taglio con enzimi di restrizione etc. La diffusione raggiunta dalle tecniche di Biologia Molecolare nel laboratorio clinico è veramente lusinghiera già allo stato attuale, per le applicazioni in virologia ed in genetica, ma se ne prospetta un sicuro incremento quando le stesse tecniche saranno più chiaramente applicabili in altre discipline cliniche come: oncologia, ematologia, medicina forense, chimica clinica, tipizzazione tissutale, etc. All'introduzione della PCR ha contribuito anche la disponibilità commerciale di numerosi reagenti e kit utilizzabili per la varie fasi analitiche, che vanno dall'estrazione degli acidi nucleici, alla retrotrascrizione dell'RNA in cDNA, all'allestimento dei protocolli di PCR con reagenti premiscelati, fino alle varie possibili fasi di rivelazione post-PCR.

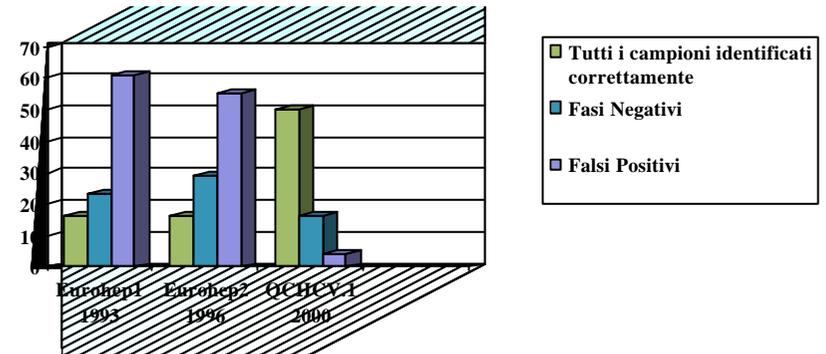
Anche la strumentazione in uso è molto progredita, sono infatti oggi disponibili termociclatori in grado di garantire grande omogeneità ed accuratezza di temperatura, oltre che velocità di esecuzione dei cicli. In alcuni casi si assiste anche a tentativi di completa automazione del sistema, con la disponibilità dei primi sistemi di estrazione automatici, che riducono l'intervento dell'operatore con la diminuzione soprattutto dei rischi di contaminazione. Va comunque detto che, nonostante il sostenuto ritmo di crescita che caratterizza l'introduzione delle applicazioni di Biologia Molecolare, la PCR e le tecniche ad essa correlate possono considerarsi ancora in una fase "artigianale" in cui l'esperienza e il bagaglio tecnico dell'operatore, i fattori intrinseci correlati alla matrice del campione ed ai materiali utilizzati per l'esecuzione delle reazioni ed una serie di fattori, purtroppo imprevedibili e non quantificabili, possono seriamente interferire sulla resa e sulla specificità della tecnica. Queste ed altre più ovvie considerazioni inducono la necessità dell'introduzione anche nel laboratorio di Biologia Molecolare, di controlli di qualità

Fig.2 –Espressione dei risultati (443 referti ammessi allo studio).



I dati riportati a confronto con i due studi comparativi condotti a livello europeo denominati Eurohep1 ed Eurohep2 mostrano un miglioramento in termini di numero complessivo di risultati corretti riscontrati (Fig.3), che dimostra un netto miglioramento della qualità dei prodotti impiegati e del loro utilizzo.

Fig. 3- QCHCV.1 versus Eurohep1 ed Eurohep2



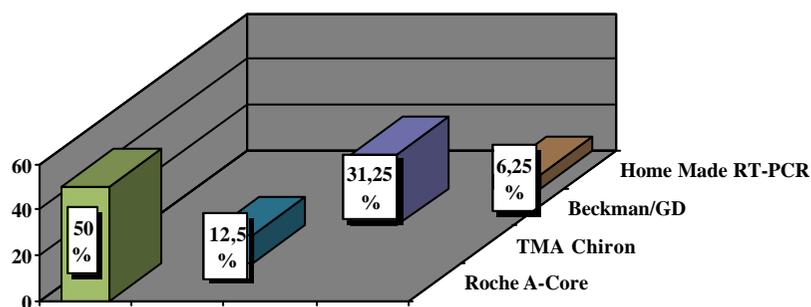
Tuttavia il punto cruciale sembra essere legato alla perdita delle basse viremie che è il problema più frequentemente riscontrato, mentre la bassa incidenza delle false positività indica una buona crescita del livello di apprendimento delle tecniche.

diluizioni sono state aliquotate in frazione da 0,5 ml, codificate e congelate a -80°C. I pannelli spediti sono stati allestiti in maniera da contenere 2 aliquote di ciascuna diluizione, accompagnate da aliquote di campioni negativi. Sono state allestite 5 serie, ciascuna composta da 6 campioni, in cui 8 campioni positivi e 22 campioni negativi erano distribuiti in maniera casuale. I pannelli predisposti sono stati spediti tramite corriere espresso in scatole di polistirolo e ghiaccio secco.

### Risultati e discussione:

Lo scopo dell'iniziativa QCHCV.1 era quello di definire la sensibilità e la specificità delle metodiche di RT-PCR attualmente in uso in centri diagnostici, per la ricerca di HCV-RNA, valutare il rischio dei falsi positivi derivanti dall'applicazione delle tecniche in uso ed infine definire un reagente di riferimento di basso contenuto viremico, che risulti omogeneamente dosabile, al fine di proporlo l'uso come controllo di sensibilità inter-laboratorio. Di 20 pannelli spediti ed arrivati a destinazione, allo stato attuale abbiamo ricevuto 16 risposte complete, pertanto i dati sono riferiti solo al 80% del totale previsto, con la distribuzione per tipologia di test riportata in Fig.1.

Fig.1 – Distribuzione risposte in funzione del tipo di metodica utilizzata.



La valutazione complessiva dei risultati ottenuti è chiaramente esposta nella Fig.2, dove vengono riportati, rispetto al numero di risultati complessivi accettati, i falsi negativi, i falsi positivi e gli errori complessivi commessi.

interni e, laddove possibile, esterni al laboratorio, come del resto per qualsiasi settore di indagine che riguardi una diagnostica di laboratorio.

Gli strumenti per allestire un controllo di qualità in terno sono a disposizione di ogni laboratorio di Biologia Molecolare che ne voglia far uso, ovvero l'inserimento di controlli negativi e positivi nelle fasi di retroscrittura ed amplificazione, l'adozione di semplici metodi di misura degli acidi nucleici, laddove possibile, per il controllo della fase di estrazione, l'introduzione di un decalogo di comportamenti degli operatori che riduca al minimo il rischio di contaminazione, che risulta ancora oggi uno dei maggiori problemi di un laboratorio di PCR. Tuttavia uno degli ostacoli maggiori alla riproducibilità dei sistemi di biologia molecolare è rappresentato dai reagenti coinvolti nella reazione, dal loro stato di conservazione e dal modo in cui questi vengono utilizzati, che determina una elevata variabilità nell'efficienza del sistema. Poiché l'obiettivo più difficile da raggiungere, soprattutto per scopi diagnostici, è quello di fornire risultati inter-laboratorio omogenei e confrontabili tra loro, diventa indispensabile poter disporre di un reagente di riferimento che sia in grado di produrre una piattaforma comune a cui riportarsi, che possa costituire il "metro" comune per l'espressione dei risultati. Tutto ciò si riporta alla verifica esterna di qualità, che rappresenta l'unico sistema per la produzione di reagenti e controlli adeguati che rispondano a tali esigenze. Viene riportato di seguito un esempio di impostazione, organizzazione, preparazione e distribuzione di un controllo di qualità legato alla determinazione di HCV-RNA in campioni biologici.

### (QCHCV.1) Un esempio di Verifica esterna di qualità:

Purtroppo l'avvio di una verifica esterna di qualità per le tecniche di Biologia Molecolare, è complicata dal fatto che tali controlli possono essere limitati a pochi casi di riconosciuto valore clinico e soprattutto ad applicazioni che godano di una adeguata diffusione. Per questo e, soprattutto per il grande interesse che le tecniche di Biologia Molecolare stanno riscontrando nei Servizi di Medicina Immunotrasfusionale, l'idea di organizzare una verifica esterna di qualità per le tecniche di biologia molecolare applicate alla diagnostica, è stata da noi indirizzata verso l'applicazione delle tecniche di biologia molecolare per la sicurezza del sangue e degli emoderivati.

Il rischio di trasmissione virale (HIV, HBV, HCV) associato alle trasfusioni di sangue, è stato negli ultimi anni notevolmente ridotto, grazie alla attenta selezione dei donatori, allo screening dei marcatori virali (sia l'antigene che l'anticorpo) ed all'uso di procedure di inattivazione virale introdotte durante la preparazione dei derivati del sangue. Tuttavia, nonostante l'adozione ormai universale di queste misure, ancora oggi sono descritte infezioni virali come conseguenza della somministrazione di sangue e dei suoi derivati. Queste infezioni occasionali sono probabilmente da attribuire a donazioni avvenute durante il periodo "finestra", che rappresenta

la fase precoce dell'infezione durante la quale i test convenzionali di screening, come la ricerca di anticorpi, risultano ancora negativi, oppure come recentemente dimostrato da Farci et al, è da considerare il fallimento della risposta immunitaria dovuta all'incremento della diversità virale nella regione ipervariabile E2 del capsido virale. Durante questo periodo i livelli di Virus circolante possono essere molto elevati e pertanto di facile riconoscimento mediante l'uso di tecniche di identificazione degli acidi nucleici (NAT) (Tabella 1).

Tabella 1

Tipo di virus	Periodo Finestra	Stima della riduzione del periodo finestra con l'introduzione dei NAT
HCV	82 gg	59 gg
HBV	56 gg	25 gg
HIV	22 gg	12 gg

Da Schreiber et al. 1996

Il maggior beneficio che si può trarre dall'introduzione dei test NAT è rappresentato, quindi, dalla riduzione del periodo finestra relativo all'HCV. Inoltre, le NAT in uso per la ricerca di HCV sono certamente quelle più all'avanguardia in questo momento, oltre che quelle più comunemente già utilizzate in molti Centri Trasfusionali. Già dal 1995 infatti, numerosi gruppi di lavoro si sono attivati per la standardizzazione delle tecniche di amplificazione genomica sul sangue e sui suoi derivati. Utilizzando i test NAT non sempre è possibile ottenere il massimo della sensibilità, mentre è facile ottenere risultati di falsa positività a causa delle problematiche di contaminazione in cui si può cadere, se non vengono adottate adeguate misure preventive. Prima che i dosaggi NAT possano essere utilizzati su base routinaria per lo screening dell'HCV-RNA, le metodologie necessitano di una fase di standardizzazione. La sensibilità e la specificità dei dosaggi può variare tra diversi laboratori. Questa variabilità è stata ben illustrata dai primi due studi internazionali collaborativi condotti in Europa, da cui appare che solo il 16% dei laboratori ha fornito risultati privi di errori (Tabella. 2). Circa un terzo dei partecipanti ha avuto seri problemi nella corretta rivelazione dell'HCV-RNA.

Tabella 2

Studio condotto	Risultati corretti	Errore sulle basse viremie	Errori di falsa positività
Eurohep I (31 laboratori)	5 laboratori (16%)	7 laboratori (23%)	19 laboratori (61%)
Eurohep II 86 laboratori 136 set di dati	22 set dati (16%)	39 set dati (29%)	75 set dati (55%)

Da Zaaijer et al., 1993 e Damen et al., 1996

La standardizzazione dei test NAT può essere raggiunta solo mediante l'utilizzo di reagenti di riferimento comunemente accettati in tutti i dosaggi. Allo scopo sono stati preparati pannelli di campioni di plasma a diverse viremie, ottenuti per diluizione seriale di un unico campione di soggetto HCV-RNA positivo HCV-Ab negativo. I partecipanti sono i Servizi di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Produttori di derivati del sangue e Produttori di Kit utilizzati per diagnostica. Un reagente di riferimento sarà poi preparato, basandosi sui risultati di un tale studio, equivalente alla più alta diluizione del campione rivelata da tutti i partecipanti allo studio collaborativo. Lo standard potrà essere poi incluso in ogni seduta di lavoro al fine di validarne i risultati ottenuti.

### Preparazione dei pannelli di controllo qualità:

La preparazione dei pannelli di campioni oggetto dello studio, è stata eseguita secondo il seguente schema: su 4 unità di plasma provenienti da 4 donatori diversi, viene eseguita la ricerca anticorpi anti-HCV ed Anti-HIV, la ricerca di HbsAg ed il dosaggio di ALT/AST. I campioni vengono inoltre sottoposti alla ricerca qualitativa di HCV-RNA ed HIV-RNA. Tutti i dosaggi sono risultati negativi, e in particolare per l'HCV-RNA il diluente è risultato NEGATIVO con un sistema di RT-PCR applicato in grado di rivelare 95% di positività con un cut-off di 200 genomi/ml di HCV-RNA (corrispondenti a 50 U.I. calcolate con il nostro fattore di conversione pari a 4 genomi = 1 U.I.).

Un campione di siero appartenente ad un soggetto non reattivo per HbsAg e anti HIV, antiHCV negativo e positivo per HCV-RNA con viremia pari a  $3,1 \times 10^6$  genomi/ml e genotipo 1b, viene utilizzato per produrre i campioni a diversa concentrazione di HCV-RNA. La viremia è stata determinata mediante RT-PCR di diluizioni successive del campione, confrontate con lo standard di riferimento Accurun 305, prodotto dalla Boston Biomedica, la procedura è stata ripetuta dieci volte. Sullo stesso campione sono state eseguite 5 determinazioni di viremia con il metodo branched DNA (Quantiplex HCV ver. 2.0- Chiron). La media dei valori ottenuti esprime la viremia sopra riportata. Il campione è stato diluito successivamente, per produrre le concentrazioni riportate in tabella 3.

Tab.3- Titolo teorico di HCV-RNA nei pool preparati.

TITOLO HCV-RNA	Copie/ml
ALTO	$3 \times 10^5$
MEDIO	$3 \times 10^4$
BASSO 1	$3 \times 10^3$
BASSO 2	$3 \times 10^2$
Non Dosabile	3

Durante la preparazione i campioni erano tenuti in ghiaccio ed in agitazione continua. Le