

DIAGNOSTICA MOLECOLARE
NELL'INFEZIONE DA VIRUS
DELL'EPATITE C:

Applicazioni nella Pratica Clinica



a cura della Commissione "Tecnologie Molecolari nella Diagnostica delle Epatopatie"
dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato

Redatto da:

*Maurizia Brunetto, Elisabetta Cariani, Carlo Ferrari, Massimo Levrero,
Patrizia Pontisso, Giovanni Raimondo.*



INDICE

| | |
|---|-----------|
| DIAGNOSI DA INFEZIONE DA HCV | 61 |
| Utilità clinica dei test molecolari | 61 |
| Determinazione qualitativa di HCV RNA | 61 |
| DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI HCV RNA | 64 |
| DETERMINAZIONE DEL GENOTIPO HCV | 65 |
| Appendice1 - REGOLE DA ADOTTARE NELLA ESECUZIONE DELLA PCR | 66 |
| 1) Suddivisione delle aree di lavoro | 66 |
| 2) Comportamenti dell'operatore | 68 |
| 3) Organizzazione del lavoro e delle attività di supporto | 68 |
| 4) Scelta dei controlli positivi e negativi | 70 |
| BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE | 71 |

DIAGNOSI DI INFEZIONE DA HCV

La diagnosi di infezione da HCV si basa sulla determinazione di anticorpi diretti contro antigeni virali e sulla ricerca dell'RNA genomico dell'HCV.

La rilevazione di antigeni virali per mezzo di tests sierologici e' ostacolata dal fatto che si trovano in circolo sotto forma di "immunocomplessi" che essi vengono a formare con gli anticorpi specifici. E' stato recentemente proposto un test che consente la determinazione dell'antigene core di HCV nella fase precoce dell'infezione, antecedente alla comparsa di anticorpi anti-HCV. Tale test, permettendo di individuare l'infezione da HCV durante la "fase finestra" di 8-12 settimane che precede la sierconversione, potrebbe consentire di ottimizzare l'efficacia dello screening delle trasfusioni di sangue. E' inoltre allo studio la formulazione del saggio che, previa dissociazione dei complessi immuni, permetta di rilevare l'antigene core anche nelle fasi ulteriori dell'infezione.

I test immunoenzimatici (ELISA) per la determinazione di anticorpi anti-HCV hanno elevata sensibilita' e specificita', tuttavia possono dare luogo a risultati falsamente positivi nelle popolazioni a basso rischio, quali i donatori di sangue. Pertanto nello screening delle donazioni di sangue i campioni che risultano positivi o dubbi ai test ELISA vengono generalmente rivalutati mediante saggi supplementari di conferma (immunoblot). Tale procedura non si rende necessaria nel caso di risultati positivi ottenuti nelle popolazioni a rischio e nei soggetti con evidenza clinica di epatopatia, in cui i test ELISA hanno un elevatissimo livello di specificita'. Nell'ambito di questi gruppi di pazienti, gli eventuali campioni con risultato dubbio al test ELISA possono essere sottoposti alla ricerca dell'RNA virale con test di biologia molecolare quali la reazione polimerasica a catena (PCR).

Utilità clinica dei test molecolari

Determinazione qualitativa di HCV RNA

- Metodo

La determinazione dell'HCV RNA viene effettuata mediante amplificazione genica (PCR), una metodica che permette, dopo trascrizione inversa dell'RNA a cDNA, di riprodurre le sequenze virali con cinetica esponenziale. La peculiare sensibilità della PCR rende assolutamente necessaria l'adozione di regole e precauzioni atte ad evitare il problema delle contaminazioni, potenzialmente responsabili di risultati falsamente positivi. Infatti, l'enorme numero di molecole generate mediante PCR può facilmente, in modo proporzionale al numero di cicli impiegati e delle manipolazioni da effettuare, contaminare le successive amplificazioni ingenerando falsi positivi. Inoltre, al rischio legato ai prodotti di amplificazione (fenomeno del "carry over") va aggiunto quello di contaminazioni da imputare alla diffusione nell'ambiente di materiale biologico contenente le stesse sequenze di acido nucleico che si vogliono amplificare (contaminazione ambientale). Non va sottovalutato, d'altra parte, il problema di risultati falsi negativi dovuti all'utilizzo di protocolli non adeguati o a una scorretta esecuzione del test. Per ottenere risultati attendibili riveste particolare importanza la fase pre-analitica: il siero deve essere separato nel piu' breve tempo possibile con materiale sterile monouso e immediatamente congelato a -20°C o a -80°C. E' necessario evitare cicli ripetuti di scongelamento e ricongelamento che potrebbero causare la degradazione dell'acido nucleico.

Negli ultimi anni lo sviluppo di metodiche standardizzate e parzialmente automatizzate ha contribuito a migliorare la riproducibilita' e la specificita' della determinazione dell'HCV RNA, anche se l'adozione di

tali metodiche non e' di per se' sufficiente a garantire l'attendibilita' del risultato. Va inoltre sottolineato che le diverse metodiche per la determinazione dell'HCV RNA possono avere soglie di sensibilita' non sovrapponibili e che, pertanto, il tipo di test utilizzato e le sue caratteristiche analitiche sono nozioni indispensabili per la valutazione clinica del risultato. Considerando nell'insieme tutti questi fattori, risulta evidente la complessità della metodica, la cui esecuzione dovrà essere quindi riservata a laboratori ed operatori che siano in grado di assicurare la attenta e rigorosa osservanza delle regole necessarie a garantire risultati ripetibili e confrontabili (appendice 1).

- Significato clinico

La positività di un test PCR per la ricerca di HCV-RNA nel siero è indicativa della presenza di viremia HCV e, verosimilmente, di replicazione del virus, ma non fornisce, trattandosi di un test eminentemente qualitativo, alcuna informazione sui livelli di virus circolante. D'altro canto la dimostrazione della presenza di HCV-RNA non prova in maniera esclusiva la responsabilità causale dell'HCV nel determinismo della malattia epatica associata, né dà alcuna informazione sulla gravità o sullo stadio della malattia stessa. In nessun caso la determinazione dell'HCV-RNA può sostituirsi alla valutazione istologica della biopsia epatica. La positività di HCV RNA, insieme al contesto clinico, biochimico ed istologico, costituisce uno dei parametri in base ai quali orientare le scelte terapeutiche.

D'altra parte la negatività dell'HCV-RNA in un paziente con epatite cronica anti-HCV positiva, reperto non frequente e legato verosimilmente a livelli minimi di virus in circolo, non consente di escludere un'infezione attiva da HCV.

La valutazione della viremia può fornire informazioni utili per la definizione etiologica in alcune categorie di pazienti anti-HCV negativi o per la gestione di particolari situazioni cliniche in pazienti anti-HCV positivi. La determinazione della viremia può risultare utile anche nei soggetti con profilo sierologico dubbio per identificare coloro che presentano replicazione virale in atto (Tabella 1).

Nei pazienti anti-HCV positivi con epatite cronica e associazione di marcatori di infezione da HBV e/o HDV, la ricerca di HCV RNA può essere utile per identificare la presenza di viremia HCV, in considerazione della possibile esistenza di meccanismi di interferenza virale. In pazienti positivi per anti-HCV con autoanticorpi non-organo specifici l'HCV RNA costituisce un parametro che può orientare la scelta terapeutica. La negativizzazione della viremia associata a livelli di transaminasi nella norma a 6-12 mesi dalla sospensione del trattamento antivirale rappresenta il criterio per la definizione di risposta sostenuta. La determinazione della viremia durante il trattamento può fornire un elemento prognostico per definire la possibilità di risposta a lungo termine; i tempi di monitoraggio terapeutico debbono essere valutati in funzione dello schema di trattamento adottato e della sensibilità del test utilizzato.

Infine, il monitoraggio della viremia HCV nelle fasi pre- e post-trapianto di fegato costituisce un problema riservato ai centri specialistici interessati.

Tabella 1

DETERMINAZIONE QUALITATIVA DELL'HCV-RNA: ATTUALI INDICAZIONI**A. Pazienti anti-HCV negativi**

1. Immunocompromessi con transaminasi elevate ed esclusione di altre cause note di epatopatia: in tali soggetti la comparsa di anti-HCV può essere ritardata o assente; pertanto, la dimostrazione diretta dell'acido nucleico può costituire l'unico strumento diagnostico per evidenziare l'infezione virale, non essendo possibile per HCV la dimostrazione di antigeni virali sierici.
2. Con crioglobulinemia mista essenziale: tale patologia si associa, con elevatissima frequenza, ad infezione da HCV; gli anticorpi possono essere concentrati nel crioprecipitato e pertanto non essere rilevabili.
3. Con epatite acuta ad etiologia sconosciuta: la determinazione di HCV-RNA permette una diagnosi etiologica nelle fasi precoci di infezione quando gli anticorpi anti-HCV non sono ancora dimostrabili; da segnalare che con l'introduzione di tests ELISA sempre più sensibili la reale utilità pratica della PCR in tale situazione tende a ridursi sempre di più.

B. Pazienti anti-HCV positivi

1. Con transaminasi persistentemente normali: per identificare le infezioni in atto (HCV-RNA positivo) rispetto alle probabili infezioni pregresse (HCV-RNA persistentemente negativo).
2. Figli di madre con infezione da HCV: dal momento che gli anticorpi anti-HCV vengono trasmessi passivamente dalla madre al feto, nel corso del primo anno di vita la diagnosi di trasmissione verticale può essere posta solo attraverso la determinazione dell'HCV-RNA.
3. Pazienti con cause multiple di danno epatico (coinfezioni, epatopatie autoimmuni etc.).
4. Pazienti trattati con antivirali: la negativizzazione di HCV RNA rappresenta il criterio per la definizione di risposta al trattamento.

C. Soggetti con profilo sierologico dubbio

1. Risultati dubbi o discordanti ai test ELISA.
2. Positività di tipo "indeterminato" con i test di "immunoblotting" (positività isolate per anticorpi diretti contro un singolo antigene) nelle popolazioni a basso rischio (donatori) .

Determinazione quantitativa di HCV RNA

- Metodi

Le metodiche più utilizzate per la quantificazione dell'HCV-RNA sono basate sull'amplificazione del substrato (PCR quantitativa) o sull'amplificazione del segnale (bDNA). A queste tecniche si affiancano TMA (transcription-mediated amplification) e NASBA (nucleic acid sequence-based amplification), di recente introduzione. E' in fase di studio la possibilità di ottenere la quantificazione dell'acido nucleico in corso di PCR (PCR real-time), metodica che potrebbe permettere un minor rischio di contaminazioni ed un più esteso range di quantificazione.

Le metodiche quantitative per HCV RNA attualmente disponibili hanno sensibilità almeno 10 volte inferiore (1 log copie di RNA) rispetto alle metodiche qualitative. Inoltre, a seconda della tecnica quantitativa utilizzata e della sua sensibilità, variano gli intervalli di viremia nell'ambito dei quali la metodica è adeguata per linearità e riproducibilità dei risultati. Ne consegue che tecniche differenti possono essere non confrontabili e non dare risultati sovrapponibili. Date queste premesse appare evidente che la conoscenza del tipo di test utilizzato e delle sue caratteristiche analitiche è indispensabile per l'interpretazione clinica del risultato. La standardizzazione delle metodiche per la quantificazione dell'HCV RNA rappresenta un obiettivo importante per l'utilizzo di questo parametro nella pratica clinica. La preparazione di "standards" adeguati a questo fine è in via di sviluppo da parte di organismi internazionali e l'utilizzo di Unità Internazionali di riferimento per esprimere la carica virale sta sostituendo i precedenti parametri nelle metodiche di valutazione della viremia attualmente disponibili.

- Significato clinico

Dati i diversi limiti di sensibilità, le indicazioni precedentemente esposte per la determinazione qualitativa dell'HCV RNA non possono essere estese alle metodiche quantitative. L'interesse clinico della quantificazione dell'HCV RNA è legato alla relazione, messa in evidenza da numerosi studi, tra entità della viremia e probabilità di risposta al trattamento antivirale. Il livello di viremia pre-trattamento non rappresenta tuttavia l'unico fattore predittivo per l'esito dello stesso e non deve essere utilizzato per modificare la decisione di indirizzare o meno un paziente con epatite cronica di tipo C alla terapia. Anche se la quantificazione dell'HCV RNA in corso di terapia ha permesso di approfondire le conoscenze sulla cinetica virale, non sono emerse a tutt'oggi indicazioni specifiche per l'uso clinico delle metodiche quantitative durante il trattamento. I livelli di HCV RNA non sembrano correlati alla potenziale infettività nel paziente non immunocompromesso; le uniche segnalazioni di un rapporto tra livelli viremici medi più elevati e maggior rischio di infezione riguardano la trasmissione verticale da madri con doppia infezione HCV/HIV. Inoltre, non è stata messa in evidenza alcuna relazione tra livelli viremici e gravità del danno epatico o potenziale evolutivo della malattia.

Determinazione del genotipo HCV

Il confronto delle sequenze di numerosi isolati di HCV ha permesso di dimostrare l'esistenza di gruppi di virus, definiti genotipi, che presentano un livello di divergenza tra le loro sequenze genomiche pari al 35% circa. Sino ad ora sono stati identificati 6 genotipi virali principali che, a loro volta, si suddividono in sottogruppi, definiti sottotipi, che mostrano livelli di divergenza delle loro sequenze inferiori rispetto ai genotipi e pari a circa il 20%.

- Metodi

Ciascun tipo virale possiede variazioni nucleotidiche caratteristiche, mantenute a livello dell'intera sequenza, per cui risulta sufficiente studiare una singola regione genomica per assegnare l'appartenenza genotipica. L'analisi di sequenza costituisce il "gold standard" per il riconoscimento del genotipo virale. Varie tecniche sono state tuttavia sviluppate per rendere più semplice e veloce la determinazione del genotipo.

Le metodiche più utilizzate si basano sull'ibridizzazione con sonde genotipo-specifiche, di cui sono disponibili formati commerciali. E' possibile inoltre effettuare la caratterizzazione genotipica con metodiche basate sull'amplificazione con primers tipo-specifici o dopo digestione con endonucleasi di restrizione e studio del polimorfismo dei frammenti di restrizione (RFLP).

Nonostante i tentativi di allestire tests sierologici di tipo immunometrico per la definizione del sierotipo virale, di più facile gestione laboratoristica, al momento attuale le tecniche molecolari costituiscono l'approccio più valido per la definizione del tipo virale.

- Significato clinico

Studi epidemiologici su pazienti con epatopatia cronica da virus C hanno dimostrato che i genotipi 1, 2 e, in misura minore 3, sono quelli maggiormente diffusi in Europa e Stati Uniti. Nel bacino mediterraneo è di frequente riscontro l'infezione da sottotipo 1b, seguita dal genotipo 2. Studi retrospettivi e prospettivi hanno dimostrato che in Italia l'infezione da parte dei genotipi 1, 2 e 3 copre oltre il 95% dei casi di infezione da HCV.

L'infezione da tipo 1b si assocerebbe più frequentemente a forme gravi di malattia quali la cirrosi ed il tumore. Tuttavia, non è ancora definito se questo riscontro sia legato ad una maggior aggressività del virus stesso o piuttosto a un effetto "coorte", legato ad una maggior durata di infezione associata al genotipo 1b.

Nelle nostre aree geografiche l'infezione da genotipo 3 è caratteristica dei pazienti giovani, spesso con un'anamnesi positiva per uso di sostanze stupefacenti. In alcuni contesti epidemiologici, nei portatori asintomatici di infezione prevale il genotipo 2, benchè tale genotipo sia comunque anche responsabile di forme evolutive, clinicamente indistinguibili da quelle riscontrate in pazienti infettati con genotipo 1 e 3.

Per quanto riguarda la risposta alla terapia antivirale, sia con interferone che con l'associazione di interferone/ribavirina, il genotipo virale infettante costituisce uno dei principali parametri che ne influenzano il risultato: vi è concordanza nell'attribuire una maggiore responsività a lungo termine al genotipo 3 e al genotipo 2, mentre l'infezione da genotipo 1 si è dimostrata più resistente al trattamento.

Appendice 1

REGOLE DA ADOTTARE NELLA ESECUZIONE DELLA PCR

Un corretto utilizzo della tecnica di amplificazione degli acidi nucleici richiede, come già precedentemente accennato, l'uso di specifici accorgimenti per minimizzare da una parte il rischio di contaminazioni e dall'altra quello di falsi negativi dovuti alla degradazione dell'acido nucleico nei campioni da testare. La necessità di introdurre la tecnologia PCR in un laboratorio già condizionato dalle preesistenti attività implica assai spesso una parziale riorganizzazione del lavoro che, pur tenendo conto delle particolari esigenze della PCR, non interferisca eccessivamente con lo svolgimento delle altre attività. Si tratterà quindi di mediare di volta in volta tra l'idea del "laboratorio PCR ideale" e le condizioni logistiche di ciascuna realtà.

Segue una esemplificazione di come in un laboratorio indirizzato prevalentemente alla ricerca clinica o alla diagnostica clinica avanzata (quindi con la necessità di utilizzare tecnologie di biologia molecolare e/o immunologiche su casistiche numericamente considerevoli) possa essere in concreto organizzata l'attività.

Vanno discussi in particolare 4 aspetti:

- la suddivisione delle aree di lavoro
- i comportamenti dell'operatore
- l'organizzazione del lavoro e delle attività di supporto
- la scelta dei controlli positivi e negativi

1) Suddivisione delle aree di lavoro

Nel laboratorio vanno individuate 4 aree di lavoro, delle quali tre sono destinate, anche se non in modo esclusivo, alla esecuzione dei test di PCR. Le aree di lavoro 1, 2 e 3 possono essere intese come ambienti distinti oppure come "aree" o zone dello stesso ambiente, fisicamente separate. L'area 4 deve comunque essere localizzata necessariamente in un ambiente diverso.

Area 1

- Attività PCR:**
- preparazione dei reagenti e loro suddivisione in aliquote
 - conservazione in freezer o in frigo di aliquote e scorte
 - preparazione del mix di retroscrittura
 - preparazione del mix di PCR

Strumentazione:

- microcentrifuga
- freezer/frigorifero
- set di pipette
- eventuale cappa UV

N.B. In quest'area l'operatore dovrà sempre indossare un camice apposito.



Area 2

- Attività PCR:**
- estrazione dei campioni
 - innescò delle reazioni di retrotrascrizione
 - dispensazione del DNA o del cDNA nel mix di reazione PCR

Strumentazione:

- cappa chimica
- centrifuga refrigerata per tubi eppendorf
- blocco termostato
- bagno termostato
- vortex
- set di pipette

N.B. E' opportuno utilizzare set di pipette distinti per tali procedure.

Area 3

- Attività PCR:**
- amplificazione dei campioni
 - innescò del secondo ciclo di PCR nel caso di reazioni nested

NB. In quest'area si deve prevedere, in aggiunta al thermal cycler, una zona protetta in cui effettuare l'innescò delle reazioni nested.

Strumentazione:

- thermal cycler(s)
- set di pipette per innescare la reazione nested
- eventuale cappa UV

Area 4

- Attività PCR:**
- corsa dei gel di agarosio per la verifica o per il trasferimento
 - trasferimento su nylon/nitrocellulosa
 - preparazione spot su filtro
 - rivelazione colorimetrica

Strumentazione:

- apparati per elettroforesi
- apparato per spot
- apparato per fotografia dei gel
- frigorifero
- set di pipette
- forno a microonde
- spettrofotometro
- lavatori di piastre

NB. E' in quest'area che andrebbero effettuate tutte le manipolazioni degli amplificati, quali digestioni con enzimi di restrizione, sequenziamento, tecniche di genotipizzazione.

2) Comportamenti dell'operatore

- a) I trasferimenti dell'operatore dovrebbero svolgersi secondo il seguente flusso:
area 1 → area 2 → area 3 → area 4

Va evitato il ritorno nelle aree 1 e 2 dopo aver lavorato nelle aree 3 e 4. Ciò comporta che l'operatore dovrà riporre e riordinare tutto il materiale usato nell'area 1 e 2 prima di recarsi nelle aree 3 e 4. Inoltre, dovrà portare nelle aree 3 e 4 tutto il materiale da utilizzare in seguito e dovrà, per evitare la necessità di rientrare nelle aree 1 o 2, controllare che aliquote sufficienti di tutti i reagenti necessari siano pronte nelle aree 3 e 4.

- b) Usare guanti di lattice monouso; cambiarli frequentemente e per lo meno ogni volta che si accede (o si ritorna) all'area 1. Il frequente ricambio dei guanti riduce le possibilità di trasferimento del DNA amplificabile dalle aree contaminate e fra i campioni.

3) Organizzazione del lavoro e delle attività di supporto

Oltre ai principali aspetti operativi già considerati vanno altresì ricordati i seguenti punti:

- a) L'introduzione di tale tecnologia ha reso evidente l'esigenza di individuare aree di lavoro e modalità di distribuzione del materiale per il lavoro (ad es. pipette), non tanto in funzione del singolo operatore, quanto in funzione del tipo di lavoro svolto (ad es. individuazione dell'area di lavoro per l'estrazione degli acidi nucleici dai campioni in esame). In ciascuna delle aree di lavoro è opportuno utilizzare pipette, puntali e accessori differenti specificamente destinati.
- b) Utilizzare materiale a perdere e, al fine di minimizzare il rischio di dispersione accidentale di reagenti o amplificati preferire provette con tappi a scatto che non oppongano resistenza all'apertura per evitare di schizzare il liquido in esse contenuto. Comunque, prima di ogni apertura può essere utile una brevissima centrifugazione in microcentrifuga (5 secondi) per avere tutto il liquido al fondo della provetta.
- c) Il canale interno delle pipette rimane pressochè inevitabilmente contaminato da aerosol contenenti DNA con conseguente cross-contaminazione. A scopo preventivo possono essere utilizzate pipette a spiazzamento positivo con puntali monouso o puntali con filtro incorporato.
- d) E' consigliabile, per ridurre il numero di campionamenti e quindi il rischio di contaminazione durante gli stessi, preparare numerose aliquote di ciascuno dei reagenti. La preparazione delle aliquote e la loro conservazione deve essere effettuata in un'area non contaminata da prodotti di amplificazione. Se si procede alla produzione autonoma degli oligonucleotidi da utilizzare per l'amplificazione, questi devono essere sintetizzati e purificati in un ambiente libero da prodotti di amplificazione. E' consigliabile registrare sempre il lotto di origine delle aliquote conservate, allo scopo di poter risalire più facilmente alle eventuali fonti di contaminazione.

- e) Particolari precauzioni devono essere adottate ancor prima di iniziare le procedure sperimentali direttamente connesse alla PCR e cioè al momento del prelievo e della preparazione dei campioni biologici da testare (ad es. sieraggio entro due ore dal prelievo con pipette e materiali monouso; conservazione in aliquote a -20°C o preferibilmente a -70°C).
- f) Mescolare i reagenti per la PCR in anticipo in una soluzione "premix" (nel caso di kit commerciali tale mix può essere fornito già pronto) che successivamente può essere dispensata nelle provette di reazione ove sarà aggiunto anche il DNA da amplificare. In questo modo vengono ridotti al minimo i trasferimenti dei campioni e le conseguenti possibilità di contaminazione sporadica.
- g) Aggiungere il DNA o il cDNA sempre al termine della fase di preparazione della reazione PCR. Allo scopo di ridurre al minimo le possibilità di trasferimento accidentale di DNA durante la manipolazione dei reagenti, componenti come i dNTP, gli oligonucleotidi, il tampone, l'enzima e l'olio minerale devono essere aggiunti prima del campione di DNA da amplificare. In tal modo sono minimizzate le possibili cross-contaminazioni.
- h) Nel caso di metodiche che non utilizzano kit commerciali è assolutamente indispensabile limitare a non più di 10 il numero di campioni trattati in ogni seduta. Anche nell'utilizzazione di kit commerciali andrebbe standardizzato e possibilmente limitato il numero di campioni da analizzare in ogni dosaggio.
- i) E' opportuno lavorare in condizioni di pulizia ai fini non solo di limitare la diffusione dell'amplificato, ma anche di evitare di perdere l'acido nucleico per l'esposizione ad agenti degradanti. A tal fine sarà utile:
- autoclavare l'acqua deionizzata e le soluzioni che possono essere autoclavate senza che ne siano modificate le prestazioni. Devono essere autoclavati anche i puntali e le provette da microcentrifuga. Non autoclavare i dNTP e le DNA polimerasi termostabili (Taq o altro);
 - riporre sempre il materiale da utilizzare (puntali, tubi eppendorf, tubi per amplificazione etc.) in contenitori a chiusura ermetica ed autoclavabili o comunque in spazi chiusi per evitare l'esposizione alla polvere;
 - pulire regolarmente tutte le apparecchiature che comunque possono venire in contatto con i campioni, i reagenti o gli amplificati (centrifughe, apparecchi per il vuoto, bagnetti termostatici, contenitori per il ghiaccio, superfici esterne dei frigoriferi, maniglie delle porte etc.) con HCl 1M, NaOH 1N o candeggina al 10%. Se si osservano gel di agarosio con amplificati su trans-illuminatore UV questo va ricoperto con un nuovo foglio di pellicola trasparente per ogni singolo gel osservato.
- l) E' consigliabile mettere in opera un efficace sistema di controllo delle scorte di materiale d'uso e di reagenti (ad es. un registro in cui venga cancellato il materiale che passa all'uso corrente) al fine di evitare interruzioni dell'attività o "soluzioni d'emergenza" con utilizzazione di reagenti o materiali non destinati alla PCR e di cui non è garantita la conservazione e/o l'utilizzazione in condizioni PCR.
- m) Organizzare la pulizia del laboratorio (ad eccezione di banconi e apparecchiature di pertinenza dell'operatore) al fine di evitare che questa possa divenire fonte ed occasione di diffusione degli amplificati.



4) Scelta dei controlli positivi e negativi

In ogni esperimento va previsto sempre almeno un campione senza l'aggiunta di DNA, quale controllo di contaminazione dei reagenti utilizzati nel singolo esperimento di amplificazione. E' consigliabile che uno di tali controlli "non DNA" venga assemblato per ultimo, dopo gli altri tubi di reazione, al fine di avere un controllo che rifletta l'insieme delle manipolazioni effettuate nel singolo esperimento o gruppo di dosaggi.

Oltre al controllo negativo di reazione contenente solo i reagenti dell'esperimento, aggiungere sempre almeno un campione biologico certamente negativo (ideale sarebbe aggiungerne uno ogni 4-5 campioni da esaminare) ed almeno uno certamente positivo, da considerare quali controlli dell'efficienza delle procedure di estrazione degli acidi nucleici e, nel caso di cDNA-PCR, della tappa di retrotrascrizione. Può essere utile includere, sempre nel caso di una cDNA-PCR, anche un campione in cui non viene aggiunto l'enzima trascrittasi inversa, quale ulteriore controllo per una eventuale contaminazione con DNA amplificati.

Anche se i suggerimenti proposti riducono i rischi di errore non è comunque possibile eliminare in modo assoluto la eventualità di contaminazioni sporadiche o di errori dell'operatore. Può essere utile a tal fine che periodicamente un certo numero di campioni selezionati casualmente venga riesaminato da un secondo operatore e ciò anche nel caso si utilizzino kit commerciali.



BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- White TJ, Madej R, Persing DH. The polymerase chain reaction: clinical applications. *Advances in Clinical Chemistry* 29:161-196, 1992.
- PCR protocols. A guide to methods and applications. Edited by Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ.
- Brechot C. Polymerase chain reaction for the diagnosis of hepatitis B and C viral hepatitis. *J Hepatol* 17 (suppl.3) S35-41, 1993.
- Davis GL. Prediction of response to interferon treatment of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 21:1-3, 1994.
- Gretch D, de la Rosa C, Carithers R, et al. Assessment of hepatitis C viremia using molecular amplification technologies: correlations and clinical implications. *Ann Int Med* 1995;123:285-296.
- Simmonds P, Alberti A, Alter HJ. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 19:321-324, 1994.
- Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995;21:570-582.
- Bukh J, Miller R, Purcell R. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995;15:41-63.
- EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. *J Hepatol* 1999;30:956-961.
- Salanha J, Lelie N, Heath A and the WHO Collaborative Study Group. Establishment of the first International Standard for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) assay for HCV RNA. *Vox Sanguinis* 1999; 76:149-158.
- Saldanha J, Heath A, Lelie N, Pisani G, et al. Calibration of HCV working reagents for NAT assays against the HCV international standards. The Collaborative Study Group. *Vox Sanguinis* 2000;78 (4):217-224.
- Pawlotsky JM, Bouvier-Allas M, Hezode C, Darthuy F, et al. Standardization of Hepatitis C virus RNA quantification. *Hepatology* 2000;32:654-659.
- Martinot-Peignoux M, Boyer N, Le Breton V, Le Guludec G, et al. A new step toward standardization of serum hepatitis C virus RNA quantification in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000;31:726-729.
- Gretch D. Standardization of hepatitis C virus RNA quantification: advances and unfinished business. *Hepatology* 2000;31:788-789.



La Commissione ringrazia inoltre per il loro contributo:

**P. Almasio, M. Bernardi, L. Bolondi, L. Capocaccia, N. Caporaso, M. Chiaramonte,
A. Craxì, F. Dammacco, S. De Mitri, F. Fiaccadori, A. Floreani, A. Francavilla, G. Gasbarrini,
P. Gentilini, G. Giusti, G.C. Icardi, G. Ideo, D. Infantolino, S. Magrin, F. Manenti,
S. Milani, R. Naccarato, L. Pagliaro, G. Pastore, A. Picciotto, M. Pirisi, E. Pisi, G. Pozzato,
M. Rapicetta, O. Riggio, T. Santantonio, M. Toti, G. Verme.**