

Test di amplificazione degli acidi nucleici virali: un nuovo approccio allo *screening* delle malattie trasmissibili con la terapia trasfusionale

Michelina Miceli, Angela Candido

Centro Nazionale Trasfusione Sangue, Roma

The progresses in the field of blood safety made the blood components and the plasmaderivative products safer than in the past. However, transmission of viruses by blood transfusion still occurs.

This is mostly due to the diagnostic window period during which an infected donor may harbour large amounts of highly infectious viruses without developing symptoms or detectable antigen and antibody concentrations. This risk is higher for plasma products than for labile blood components because of the large dimension of the pools used for manufacturing. In the last two years, the Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) evaluated that nucleic acid amplification technology (NAT) for the detection of viral nucleic acid reached a development such to be considered as an another step in continuously evolving process of assuring the quality of plasma-derived medicinal products.

So, CPMP issued the Recommendation 390/97, which points out that from 1st July 1999 only batches derived from pools tested and found non-reactive for HCV-RNA by NAT can be released on the market. This Recommendation has got worldwide an impact on commercial plasma fractionators as well as on the Transfusion Services on the basis of ethical point of view linked to the release of labile blood components when all manufactured plasma have been tested for HCV-RNA.

Feasibility studies are going on in most of the European Countries in order to examine the various problems, in terms of organization and cost-benefit, for the implementation of HCV-RNA testing for routine purposes.

Parole chiave: *screening* unità di sangue, HCV, NAT.

Key words: blood screening, HCV, NAT.

Introduzione

La sicurezza dei prodotti impiegati nella terapia trasfusionale è essenzialmente basata sull'accuratezza della selezione del donatore e sulla sensibilità dei test di *screening* eseguiti sulle unità raccolte per i virus rilevanti in campo trasfusionale. Sebbene negli ultimi anni sia stata raggiunta una notevole riduzione del rischio di trasmissione di malattie ad eziologia virale mediante terapia trasfusionale, il problema della sicurezza del sangue richiede sempre una attenta e continua considerazione. Il rischio residuo di trasmissione durante le fasi precoci d'infezione (periodo finestra) è stato stimato in Europa, in uno studio su 4.000.000 di donatori, pari a 1:48.000 per HCV, 1:65.000 per HBV e 1:1.000.000 per HIV¹ e in USA 1:493.000 per HIV, 1:103.000 per HCV e 1:63.000 per HBV². Queste stime rappresentano la probabilità che una unità di sangue trasfondibile possa, comunque, risultare infetta perché prelevata durante il periodo asintomatico dell'infezione e in assenza di marcatori virali specifici rilevabili con i test immunoenzimatici di *screening* attualmente in uso.

Il virus dell'epatite C è considerato il principale agente eziologico responsabile del 90-95 % dei casi di epatite non-A, non-B post-trasfusionale; ciò è da attribuire, soprattutto, ad un periodo finestra piuttosto lungo (circa 75 giorni) e ad una prevalenza del virus piuttosto elevata nel nostro Paese³. La determinazione della sequenza genomica del virus dell'epatite C, ha consentito la costruzione di test diagnostici per la rilevazione degli anticorpi verso tale virus. Dai test immunoenzimatici anti-HCV di prima generazione, che impiegavano come antigene la proteina ricombinante c-100 derivante dalla regione NS4 del genoma virale, si è passati ai test di seconda generazione, che erano in grado di riconoscere gli anticorpi diretti contro il *core* e la regione non strutturale NS3. Con i test immunoenzimatici di terza generazione, insieme ad una migliore ricostruzione

Corrispondenza:
Dott.ssa Michelina Miceli
Centro Nazionale Trasfusione Sangue - Croce Rossa Italiana
Via B. Ramazzini, 15
00151 Roma

antigenica, si è aggiunta anche la possibilità di ricercare gli anticorpi contro la regione non strutturale NS5⁴. I test di conferma completano oggi l'indagine definendo e quantificando gli anticorpi verso gli antigeni specifici strutturali e non del virus⁵⁻⁷. Una notevole limitazione fino ad oggi è stata rappresentata dalla difficoltà di costruire un test in grado di rilevare gli antigeni del virus HCV, test che sono invece disponibili per i virus HIV (p24) e HBV (HBsAg). Vi sono stati recenti sviluppi in tal senso e test per la rilevazione di HCV-Ag sono attualmente in fase di sperimentazione. Le tecniche immunoenzimatiche e di *immunoblot*, pur essendo dotate di elevata sensibilità e specificità, presentano dei limiti che sono propri della diagnosi di tipo indiretto, cioè basata sulla rilevazione di anticorpi specifici e non direttamente di marcatori virali.

La risposta anticorpale è, infatti, un evento successivo al momento dell'infezione primaria ed è, inoltre, estremamente variabile; una infezione da HCV può, quindi, sfuggire allo *screening* di una unità di sangue prelevata a un donatore che si trovi nel periodo finestra asintomatico. La disponibilità di test che consentano la rilevazione diretta del virus, in particolare del genoma virale, potrebbe, quindi, consentire una sensibile riduzione del rischio residuo, aumentando la sicurezza del sangue e dei suoi derivati con indiscutibili vantaggi per il donatore/ricevente e per la collettività in genere. Le nuove conoscenze in campo scientifico hanno consentito in questi ultimi anni lo sviluppo di tecnologie avanzate che aprono la possibilità a un nuovo e più moderno approccio allo *screening* dei virus per le unità di sangue ed emoderivati destinati a terapia trasfusionale. Lo sviluppo di tecniche di biologia molecolare e, in particolare, l'amplificazione degli acidi nucleici (*Nucleic Acid Amplification Technology*: NAT) si è mostrata nel tempo uno strumento prezioso sia nel campo della ricerca che in quello della diagnostica⁸⁻¹⁰. La potenzialità di questo approccio nel campo dello *screening* di agenti infettanti e, in particolare dei virus, si sta rivelando con lo sviluppo di diverse tecniche molecolari, che offrono contemporaneamente il vantaggio di una rilevazione diretta del virus e di una sensibilità più elevata di quella dei metodi immunoenzimatici.

Tecniche per l'identificazione del genoma virale

La caratterizzazione del genoma dell'HCV e delle sue varianti maggiori ha permesso di identificare, all'interno della sequenza di 9.400 nucleotidi, una zona non tradotta e altamente conservata nella regione 5' (5' UTR). L'identificazione di tale sequenza in campioni biologici è stata resa possibile grazie a metodiche di amplificazione del DNA complementare (cDNA), retrotrascritto dalla

sequenza di RNA virale 5'UTR, tramite reazione a catena mediata dalla polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Questa regione di circa 300 nucleotidi rappresenta quindi il *target* da amplificare per la ricerca del genoma di HCV. Pur utilizzando tecnologie diverse, ogni metodo per l'identificazione del genoma virale è basato su tre passaggi essenziali:

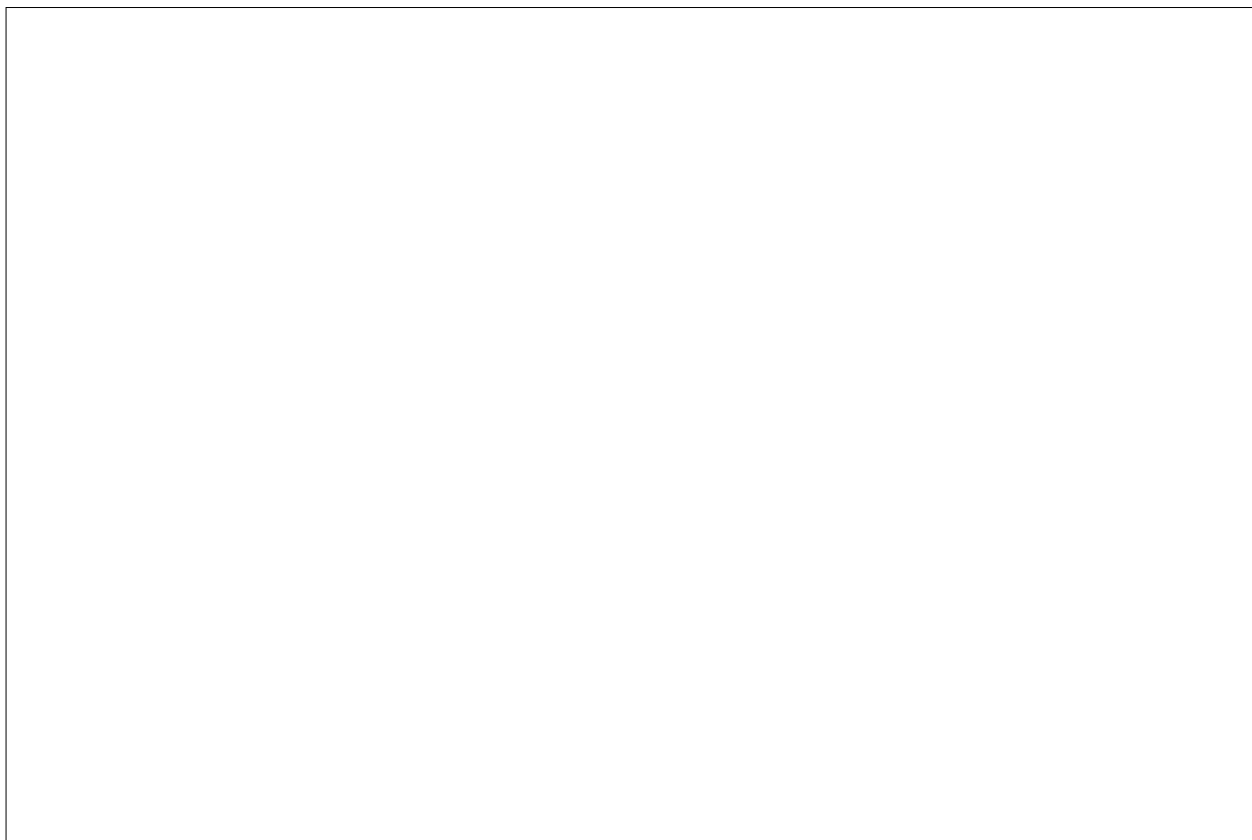
- 1- estrazione degli acidi nucleici,
- 2- amplificazione,
- 3- rilevazione.

Estrazione degli acidi nucleici

Questa prima fase del processo è molto importante, in quanto l'efficienza di amplificazione di un tratto di genoma è legata alla purezza del campione che viene utilizzato per l'amplificazione. Proteine e sostanze presenti nel campione interagiscono con l'enzima Taq polimerasi responsabile della neo-sintesi del frammento di acido nucleico da amplificare, riducendo di molto l'efficienza dell'amplificazione stessa. Pertanto, una buona amplificazione è anche il risultato di una buona estrazione degli acidi nucleici che consente di avere un prodotto di partenza il più puro possibile. Il primo passaggio da eseguire nella fase di estrazione è la lisi delle particelle virali, con liberazione degli acidi nucleici in soluzione, mediante l'uso di guanidina isotiocianato (GuSCN) o proteinasi K e detergenti quali SDS, TRITON, EDTA. Molti dei kit in commercio prevedono l'aggiunta al campione di un tampone di lisi che contiene GuSCN e detergenti necessari a rompere le cellule con liberazione di virus eventualmente presenti, a inattivare i virus stessi e a stabilizzare gli acidi nucleici con la distruzione degli enzimi RNA-asi e DNA-asi. L'estrazione degli acidi nucleici può essere eseguita in "fase liquida" o in "fase solida". Nel primo caso, l'estrazione viene eseguita in soluzione acquosa e gli acidi nucleici sono purificati da sostanze inibitrici, quali le proteine, mediante passaggi successivi. Il metodo più utilizzato è l'estrazione con fenolo-cloroformio che consente di separare molto bene gli acidi nucleici dalle proteine. Successivamente, gli acidi nucleici vengono estratti dalla fase acquosa attraverso una precipitazione con alcool che, disidratandoli, ne consente la precipitazione.

L'estrazione in fase solida prevede, dopo la lisi, la cattura degli acidi nucleici da parte di resine o di biglie magnetiche in grado di legare sia RNA che DNA. Tutta la fase di purificazione avviene, quindi, mantenendo gli acidi nucleici legati alla resina o alle biglie.

Lo *step* finale prevede l'aggiunta di una soluzione di eluizione che stacca gli acidi nucleici dal supporto solido liberandoli in soluzione, pronti per la fase successiva di amplificazione.

Figura 1: amplificazione del DNA mediante reazione polimerasica a catena

Le tecniche di estrazione consentono di estrarre dal campione o gli acidi nucleici complessivamente (DNA e RNA) oppure, in maniera selettiva, DNA o RNA. Nel caso di RNA il gradiente di Cloruro di Cesio consente l'estrazione di RNA totale, mentre le colonnine oligo-dT (Timidina) consentono di separare gli RNA messaggero.

Amplificazione

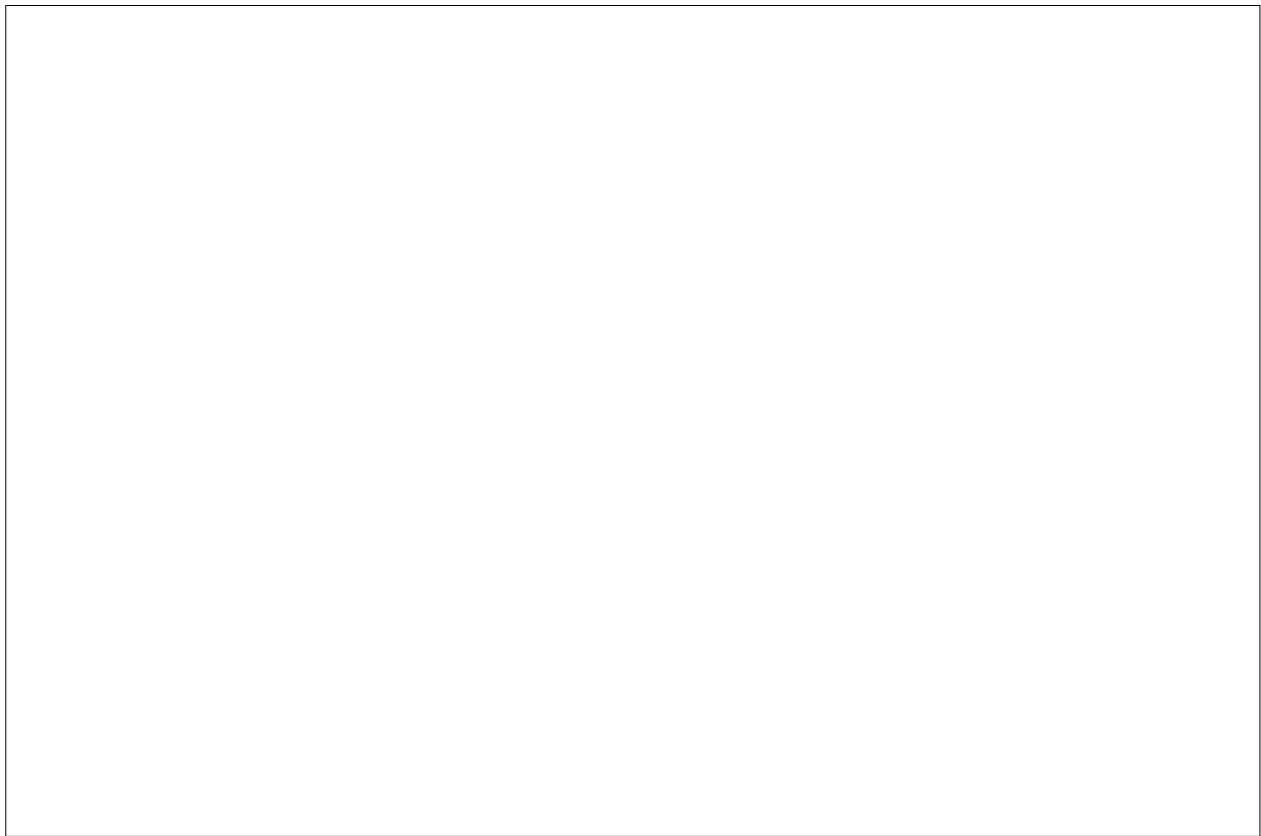
L'amplificazione degli acidi nucleici consiste nel riprodurre, con aumento esponenziale, una specifica sequenza di DNA o RNA (una singola molecola può essere amplificata milioni di volte) in tempi rapidi ed in maniera riproducibile. La prima tecnica messa a punto ed utilizzata, soprattutto nel campo della ricerca, è stata la reazione a catena mediata dalla polimerasi o PCR, ed è quella che a tutt'oggi trova ancora la più ampia applicazione.

La metodica PCR prevede l'utilizzo dell'enzima DNA polimerasi, di *primers* e deossinucleotidi trifosfati (dNTP). Per quanto concerne la DNA polimerasi, nei primi esperimenti di PCR veniva utilizzato come enzima il frammento di Klenow di DNA polimerasi di *E.coli*. Questa proteina doveva essere aggiunta manualmente al termine di ogni ciclo, perché, essendo termolabile, veniva inattivata

dalle alte temperature. Nel 1988 la polimerasi di *E.coli* è stata sostituita dalla DNA polimerasi isolata dal batterio *Thermus aquaticus* (Taq polimerasi) che è termostabile e resiste ad incubazioni fino a 95 °C. L'impiego della Taq polimerasi ha, quindi, consentito la completa automazione della procedura di amplificazione. Con il termine di *primers* si intendono oligonucleotidi complementari agli opposti filamenti di DNA e delimitanti il tratto di genoma che si vuole amplificare; essi, legandosi alla sequenza specifica mediante legami idrogeno, espongono un gruppo 3'OH alla DNA polimerasi consentendo in tal modo l'azione catalitica dell'enzima. I dNTP sono di fatto "i mattoni" che consentono la neosintesi di filamenti complementari al tratto di DNA individuato dai *primers*. Nel dettaglio, la PCR prevede quale materiale di partenza un segmento di DNA.

La reazione inizia (Figura 1) con la denaturazione termica del doppio filamento di DNA, cui segue il raffreddamento della soluzione per consentire la fase di *annealing* dei *primers*; questi ultimi, essendo di dimensioni ridotte e in elevata concentrazione, si legano alle sequenze complementari rispettivamente sui due filamenti di DNA, impedendone la riassociazione. Il complesso *primers*/DNA costituisce il punto di innesco della Taq polimerasi, che consente l'estensione del filamento complementare di DNA,

Figura 2: amplificazione di RNA basata sulla sequenza dell'acido nucleico



aggiungendo i dNTP presenti nella miscela di reazione ai *primers* già legati. Ciascuno dei filamenti neosintetizzati sarà complementare al DNA *target*. A seguito di un ulteriore aumento della temperatura, gli ibridi costituiti dal filamento del DNA e da quello neosintetizzato vengono nuovamente denaturati, fornendo così due catene addizionali di DNA stampo per un successivo ciclo di ibridazione con i *primers*. In genere, la PCR prevede la ripetizione del ciclo da venti a quaranta volte.

La successiva evoluzione della tecnica PCR è stata la sua applicazione anche all'analisi dell'RNA (RT-PCR). In questo caso, l'RNA deve essere previamente sottoposto ad una retrotrascrizione ad opera di una DNA polimerasi RNA dipendente (trascrittasi inversa) per ottenere una copia di cDNA che, a sua volta, entra nel processo di amplificazione secondo lo schema descritto. Il maggior problema nello studio dell'RNA è rappresentato dalla possibilità di contaminazione con la ribonucleasi (RNA-asi), enzima che può degradare l'RNA. Le RNA-asi sono molto stabili e diffuse ubiquitariamente, non solo nel campione biologico ma anche nelle secrezioni corporee (ad esempio le mani sono una grande fonte di RNA-asi). È, quindi, necessario adottare alcune precauzioni dirette a creare condizioni di lavoro cosiddette *RNA-asi-free*. A questo scopo,

è essenziale l'organizzazione dell'ambiente in cui si lavora, la manualità degli operatori, le procedure operative e il materiale che viene utilizzato. Il grande vantaggio della PCR è l'aumento della sensibilità, poiché, ad ogni ciclo di amplificazione, la sequenza di acido nucleico *target* presente nel campione in esame e delimitata dai *primers* viene teoricamente raddoppiata.

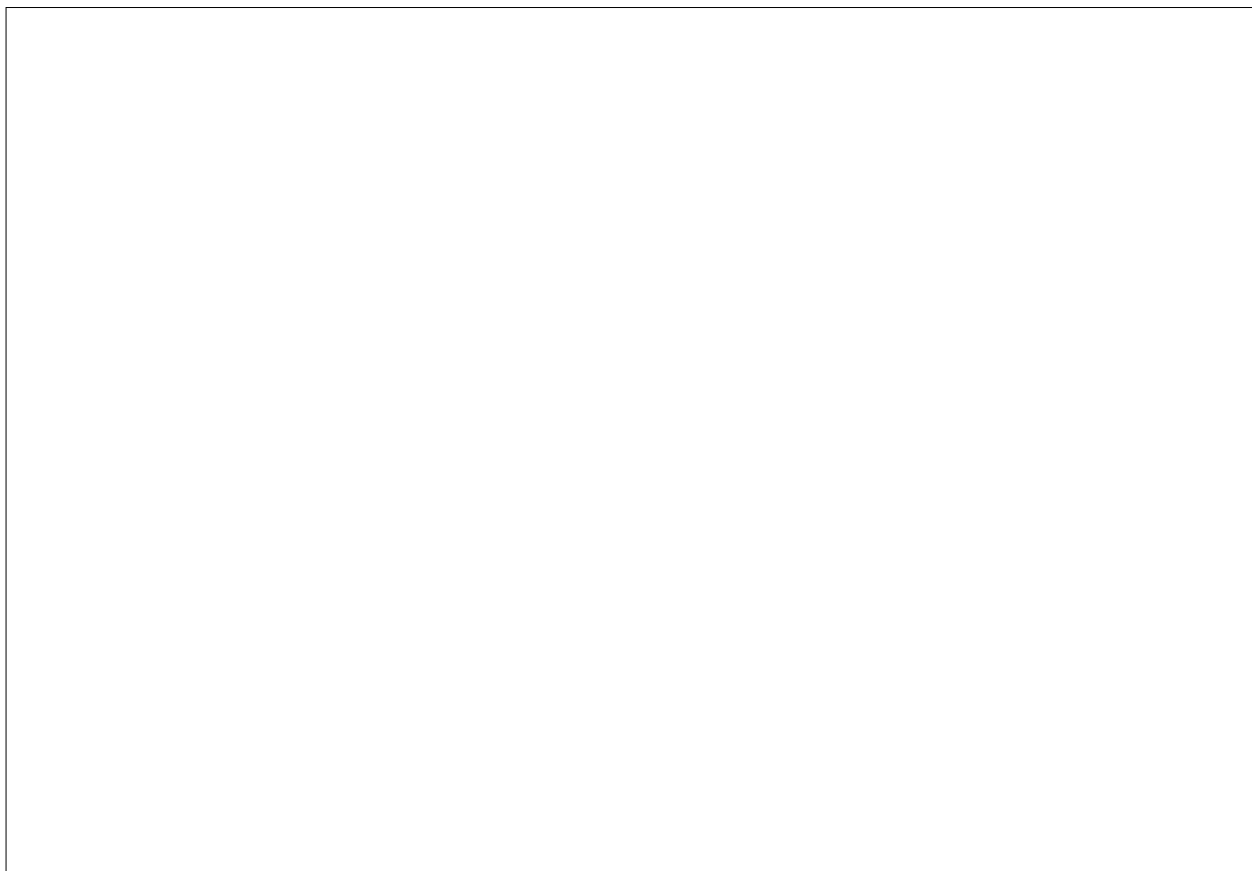
Rilevazione

In questo *step* finale vengono rilevati i prodotti generati durante la fase di amplificazione.

La rilevazione, a seconda degli obiettivi che si vogliono raggiungere, può essere: qualitativa o quantitativa. La rilevazione qualitativa consente di mettere in evidenza soltanto la presenza o meno del prodotto di amplificazione senza rilevare la quantità effettiva. Fra i diversi metodi di rilevazione qualitativa vi sono:

- a- elettroforesi, *Southern blotting*, *Northern blotting*,
- b- test immunoenzimatici con denaturazione degli ampliconi e ibridazione su micropozzetti,
- c- test in chemiluminescenza ed elettrochemiluminescenza (ECL).

I metodi di rilevazione quantitativa consentono di

Figura 3: amplificazione di RNA mediata dalla trascrizione

evidenziare il numero di copie di acido nucleico presenti nel campione. In generale, i metodi quantitativi prevedono l'aggiunta al singolo campione di uno o più calibratori specifici con un numero noto di copie. Il/i calibratore/i segue, dunque, tutte le fasi dell'intero processo, preparazione del campione, amplificazione, ibridazione e rilevazione insieme al campione da testare. I livelli di acido nucleico bersaglio presente nei campioni testati vengono determinati confrontando il "segnale" del *target* con il segnale dello standard di quantizzazione di ogni campione.

Pertanto, l'impiego dei calibratori consente di rilevare effetti di inibizione, di controllare il processo di amplificazione e di quantizzare l'acido nucleico eventualmente presente nel campione in esame.

Sviluppo delle tecniche di amplificazione

Dopo l'introduzione della PCR sono state sviluppate altre tecniche di amplificazione degli acidi nucleici, quali: l'amplificazione basata sulla sequenza dell'acido nucleico (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*, NASBA),

l'amplificazione mediata dalla trascrizione (*Transcription Mediated Amplification*, TMA) e l'amplificazione del segnale (*branched DNA*: bDNA).

Il metodo **NASBA** si basa sul trasferimento dell'informazione genetica caratteristico del meccanismo di replicazione dei retrovirus.

La reazione di amplificazione avviene in maniera isotermica a 41 °C, eliminando così la necessità di apparecchiature termocicliche. La tecnica di amplificazione utilizza come *target* di partenza l'RNA.

Il processo di amplificazione è riassunto in figura 2.

Il prodotto dell'amplificazione mediante NASBA è quindi un RNA a singolo filamento "antisenso" (3'-5') che deriva dalla amplificazione di circa 10^6 - 10^9 volte la sequenza originale^{11,12}.

Il metodo **TMA** utilizza due *primers* e due enzimi, RNA polimerasi e trascrittasi inversa. Uno dei *primers* contiene una sequenza promotore per la RNA polimerasi (Figura 3). È un processo autocatalitico che avviene a temperatura costante¹³. Il **bDNA** è un sistema alternativo che si basa sull'amplificazione del segnale invece che sull'amplificazione dell'acido nucleico.

Si ha il legame di cosiddette molecole "segnale" (ad esempio, fosfatasi alcalina) direttamente alla sequenza da identificare, in modo da creare una struttura a DNA ramificato (*branched DNA*).

Il segnale ottenuto alla fine della reazione è proporzionale alla quantità di DNA *target* presente nel campione. Questa tecnica viene molto usata per la quantificazione sia di DNA che di RNA.

Le tecniche di amplificazione degli acidi nucleici e lo *screening* di virus per le malattie trasmissibili

Lo sviluppo nel tempo delle diverse tecniche di biologia molecolare descritte ha consentito, da una parte, la standardizzazione delle metodiche e la semplificazione delle procedure operative, dall'altra, la loro automazione che, sebbene ancora parziale, può consentire oggi più facilmente che in passato la loro applicazione in attività di routine che prevedono la lavorazione di un numero elevato di campioni.

In campo trasfusionale, l'introduzione della ricerca dei genomi virali mediante l'uso di NAT nello *screening* delle malattie trasmissibili può consentire la riduzione del "periodo finestra" come già indicato da diversi Autori¹⁴⁻¹⁶. Tale riduzione è particolarmente rilevante per HCV (Tabella I).

Inoltre, l'elevata sensibilità dei test attualmente disponibili può consentire la loro applicazione non necessariamente al test su singolo campione ma anche a

Tabella I: riduzione del periodo di "fase finestra" per le infezioni da HIV, HBV e HCV mediante il test di amplificazione degli acidi nucleici virali

Virus	Test Sierologici	NAT
HIV	22	14
HBV	56	31
HCV	80	21

pool costituiti da campioni diversi. Oltre allo sviluppo tecnologico, un impulso determinante a considerare l'ipotesi di un approccio molecolare allo *screening* delle unità di sangue è stato dato dalla Raccomandazione 390/97 emessa dall'EMEA/CPMP (*European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Human Medicines Evaluation Unit/Committee for Proprietary Medicinal Products*). La Raccomandazione suggerisce che: "dal 1° luglio 1999 soltanto i lotti di emoderivati ottenuti da pool di plasma risultati non reattivi per HCV-RNA mediante tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (NAT) testati con metodi

validati per sensibilità e specificità possono essere rilasciati sul mercato"¹⁷. In Italia il DM 29 marzo 1999 ha recepito il contenuto della Raccomandazione per cui, oggi, i pool di plasma destinati alla produzione di plasmaderivati sono testati per HCV-RNA mediante NAT. Se da una parte il rischio di trasmissione di HCV è più elevato nel caso degli emoderivati prodotti da pool di plasma di elevate dimensioni (2.000 litri), d'altra parte è da considerare che gli emocomponenti di pronto impiego non sono sottoposti a *steps* di inattivazione virale.

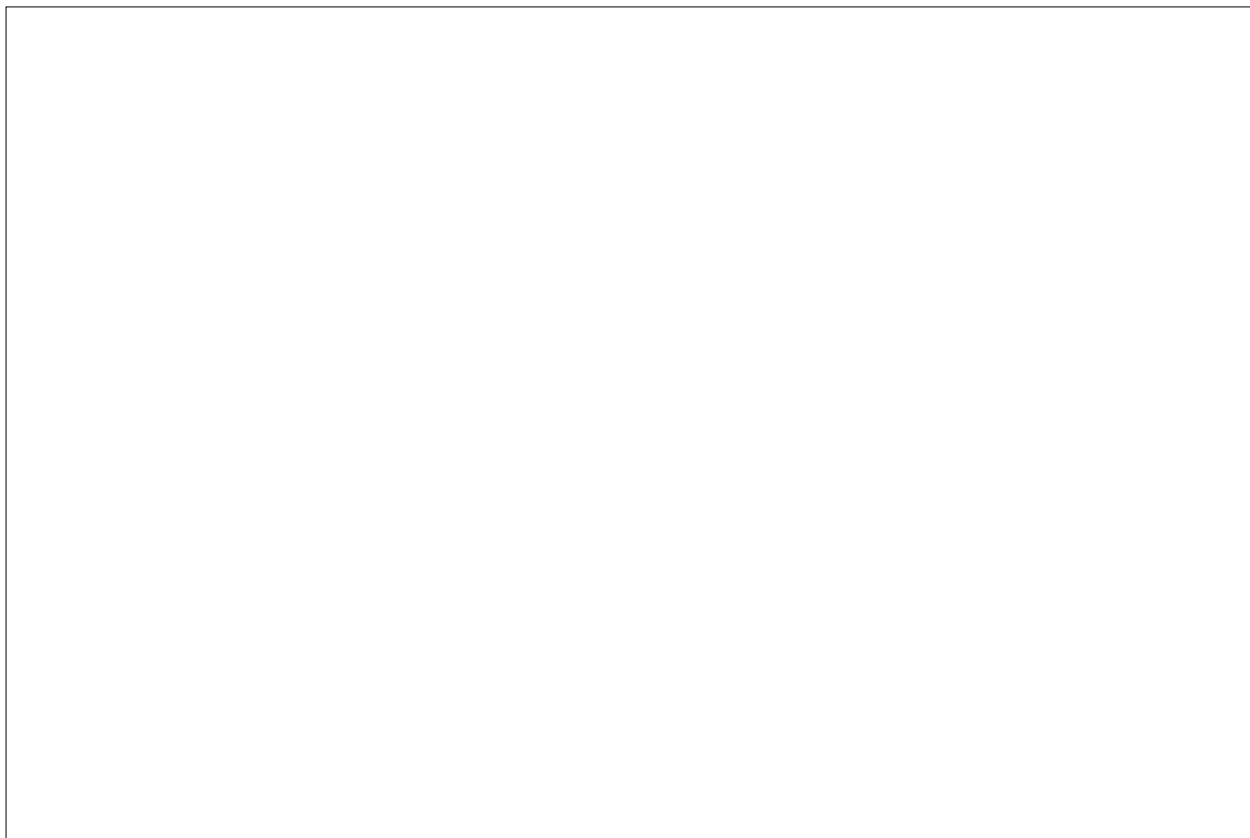
Emerge chiaramente che, sia da un punto di vista etico che medico-legale, gli operatori dei Servizi Trasfusionali sono, di fatto, coinvolti dalla applicazione del DM 29 marzo 1999. Sarebbe, infatti, di difficile gestione il caso di una accertata positività per HCV-RNA in unità di plasma componente un pool destinato alla produzione di emoderivati i cui corrispondenti emocomponenti labili siano già stati trasfusi. Non sarebbe forse più ragionevole introdurre la ricerca di HCV-RNA direttamente nello *screening* delle unità di sangue, garantendo emocomponenti di pronto impiego e plasma per frazionamento più sicuri?

In Germania, l'applicazione della Raccomandazione 390/97 è stata anticipata al mese di aprile 1999 ed estesa anche agli emocomponenti di pronto impiego, concentrati piastrinici ed eritrocitari (deliberazione PEI: Federal Gazette n.63; 4.4.1997, p.4477); è stato anche realizzato uno studio di fattibilità ed efficacia dell'applicazione delle procedure NAT nello *screening* delle unità di sangue, i cui risultati sono stati pubblicati recentemente¹⁸. Altri studi di fattibilità sono già in corso in numerosi altri paesi in Europa che stanno, di fatto, valutando l'opportunità di introdurre obbligatoriamente il test NAT nello *screening* delle unità di sangue eseguito su mini-pool¹⁹⁻²².

Esecuzione dei test su mini-pool di plasma da parte dei Servizi Trasfusionali per i prodotti labili: quali problemi?

Diverse problematiche emergono nel considerare l'introduzione delle metodiche NAT nelle strutture trasfusionali. Innanzitutto, gli attuali costi dello *screening* mediante NAT sono ancora molto elevati; inoltre, il test è solo parzialmente automatizzato e richiede, pertanto, strutture e spazi adeguati, esperienza e formazione degli operatori. Considerata l'elevata sensibilità della metodologia NAT e l'elevata carica di genomi di HCV nella fase precoce dell'infezione, un approccio che consente in parte di limitare l'incidenza dei costi è l'uso di pool di plasma di 20-30 campioni. La diluizione del singolo campione nel pool non

Figura 4: flusso di lavoro relativo alla esecuzione su plasma-pool di un test di amplificazione degli acidi nucleici virali applicato alla validazione biologica dell'unità di sangue



costituisce, infatti, un limite alla rivelazione di HCV-RNA. Pool costituiti da numeri ben più elevati di campioni sono stati impiegati nelle industrie di plasma derivati o in banche del sangue che lavorano numerosi campioni al giorno^{23,24}.

L'uso di pool presenta, inoltre, il vantaggio di diluire sostanze inibitrici eventualmente presenti nel singolo campione, limitando i rischi di campioni falsi negativi.

Nella nostra realtà trasfusionale, plasma-pool di dimensioni limitate meglio corrispondono all'esigenza di non bloccare numerose unità di sangue in caso di pool positivo. L'impiego di preparatori forniti di apposito software di gestione del pool consentono di operare secondo un processo controllato di preparazione e tracciabilità del pool. Il vantaggio di applicare le metodiche NAT al test di mini-pool risiede, tuttavia, nella possibilità di analizzare un numero sufficientemente elevato di campioni quotidianamente. Ne consegue l'opportunità di centralizzare l'esecuzione del test presso servizi trasfusionali dotati di strutture adeguatamente organizzate allo scopo.

La centralizzazione, se da una parte offre il vantaggio di un'economia di scala e di una standardizzazione delle procedure con maggiori garanzie in termini di risultati affidabili, d'altra parte pone i problemi relativi alla organizzazione di una rete di trasporto dei campioni. Di

fatto, oggi sono disponibili diverse organizzazioni di trasporti in grado di rispondere all'esigenza di inviare campioni conservati a temperature controllate (nel nostro caso 4 °C), in tempi brevi e con costi accettabili. Un altro aspetto di rilievo è il tempo necessario per il rilascio dei risultati al fine di garantire l'utilizzazione degli emocomponenti a più breve emivita, quali le piastrine. Le metodiche oggi disponibili consentono di eseguire il test in un tempo complessivo di 5-6 ore, compatibile, quindi, a fronte di un'efficiente organizzazione di raccolta campioni e invio dei risultati, con il rilascio delle unità entro un massimo di 24 ore (Figura 4).

Validazione della procedura analitica: le Linee Guida

Per consentire l'introduzione delle metodiche NAT nelle industrie produttrici di plasmaderivati l'*European Department for the Quality of Medicines* (EDQM), al quale fanno capo sia il *Network* degli OMCLs (Laboratori Ufficiali di Controllo) sia la Farmacopea Europea, ha sentito l'esigenza di costituire un gruppo di esperti che elaborasse

le Linee-Guida relative alla validazione di queste metodiche (PA/PH/OMCL/98,22, *Guidelines for validation of Nucleic Acid Amplification Technology, NAT, for the detection of hepatitis C virus RNA in plasma-pools*).

Il documento fornisce uno schema preciso del protocollo di validazione di un metodo per la rilevazione dell'HCV-RNA indicando i parametri essenziali da definire:

- la *specificità*, intesa come la capacità di rilevare inequivocabilmente l'acido nucleico bersaglio in presenza di altri componenti;
- il *limite di rilevazione*, inteso come quantità minima di acido nucleico in grado di essere rilevata in un campione;
- la *robustezza*, intesa come la capacità della procedura di restare inalterata nonostante piccoli cambiamenti nei parametri di reazione;
- la *cross-contaminazione*, intesa come l'affidabilità nel sottoporre a indagine campioni positivi e negativi senza contaminare quest'ultimi, producendo falsi risultati positivi.

La specificità e la robustezza della metodica nel caso di impiego di test commerciali sono, di fatto, già valutati dalla stessa ditta produttrice del test. Tuttavia, una conferma della specificità può essere effettuata testando almeno 100 plasma pool già risultati negativi e utilizzando una tecnica diversa da quella in fase di validazione. Inoltre, l'uso di appositi pannelli può consentire anche di verificare se la metodica utilizzata sia in grado di rilevare i diversi genotipi dell'HCV.

Il parametro che, invece, è essenziale definire è il limite di rilevazione o *cut-off*, che, come indicato dalla Farmacopea, è il numero minimo di sequenze *target* rilevabili nel 95% dei test eseguiti. Diluizioni seriali di uno standard, il WHO o una preparazione calibrata contro lo standard del WHO, devono essere testate in sedute analitiche diverse per un totale di 24 repliche per ciascuna diluizione. Il *cut-off* deve essere calcolato mediante opportuna analisi statistica (analisi dei *probit*).

La validazione degli operatori è un altro aspetto da considerare. A questo scopo è opportuno validare ogni operatore, sia utilizzando dei pannelli di *proficiency* sia facendo testare a ciascun operatore 8 replicati di un campione contenente una concentrazione di HCV-RNA pari a tre volte il *cut-off*. La garanzia e affidabilità dei risultati, una volta validata la procedura, dipendono da una buona pratica di laboratorio e da una efficiente organizzazione del laboratorio, che garantisca i requisiti minimi per operare nel settore della biologia molecolare, cioè prevedendo aree separate per la preparazione del campione (area di pre-amplificazione) e per la successiva amplificazione e rilevazione (area di post-amplificazione).

Il problema degli standard

L'utilizzo di preparati positivi a titolo noto è necessario per determinare la sensibilità dei metodi NAT applicati alla ricerca dei genomi virali nel plasma. Il NIBSC (*National Institute for Biological Standards and Control*, Hertfordshire - United Kingdom) ha condotto dal 1995 numerosi studi collaborativi allo scopo di rendere disponibili degli "standard" per i maggiori virus rilevanti in campo trasfusionale. Lo studio collaborativo per la standardizzazione di HCV-RNA condotto dal NIBSC ha utilizzato, quale campione di origine, una unità di plasma HCV-RNA positiva di genotipo 3 contenente circa 4.000 genomi equivalenti/mL (valutati mediante *bDNA assay*) diluita 1:1.000 in un criosupernatante negativo per HCV-RNA. Sulla base dei risultati ottenuti, una delle preparazioni è stata scelta come riferimento internazionale WHO (96/790, concentrazione di 5×10^5 genomi equivalenti/mL definita con *bDNA*), cui è stata arbitrariamente assegnata una concentrazione di 10^5 UI/mL²⁵. Dal 1997, anno in cui è stato prodotto lo standard del WHO, numerose altre preparazioni, definite *working reagents*, sono state preparate e calibrate rispetto allo standard internazionale quali: *NIBSC reagent 96/586*; *PEI HCV*; *ISS HCV-RNA reagent 0498*; *CBER/FDA HCV-RNA*; *CLB Pelispy run control*. Questi standard possono essere utilizzati per i protocolli di validazione delle metodiche NAT e come campioni di controllo delle singole sedute analitiche. A questo proposito è, infatti, da sottolineare che la normativa europea (CPMP/BWP 390/97) raccomanda di inserire in ogni seduta analitica un *run control* ad una concentrazione di 100 UI/mL, quale controllo dell'intero processo insieme ai controlli interni forniti nei kit, che consentono di monitorare le diverse fasi di estrazione, amplificazione e rivelazione di ogni singolo campione analizzato.

I parametri di validazione dei risultati devono infatti essere accuratamente definiti sulla base dei risultati non solo dei controlli positivo e negativo presenti nei kit impiegati, ma anche sulla base del *run control* e dei controlli interni alla reazione del singolo campione, che consentono di monitorare le diverse fasi di estrazione, amplificazione e rivelazione dell'acido nucleico.

Prospettive future

La Raccomandazione 390/97 ha segnato l'introduzione nello *screening* delle unità di sangue dei test molecolari. Come in passato per i test immunoenzimatici, i test di amplificazione degli acidi nucleici aprono oggi una nuova era tecnologica nel campo della sicurezza dei prodotti

destinati a terapia trasfusionale. L'impatto di questa nuova tecnologia è al momento di difficile valutazione, sia da un punto di vista scientifico che economico e organizzativo. Certamente le metodiche NAT oggi applicate alla rilevazione di HCV-RNA saranno entro breve tempo estese anche ad altri virus quali HIV e HBV^{26,27}. Sono già stati sviluppati multi-test che consentono l'estrazione contemporanea dell'RNA dei virus HIV e HCV e la loro specifica amplificazione e rilevazione.

Per l'HBV l'approccio è più complesso, considerati i sottotipi e le numerose varianti di questo virus²⁸, come anche la concentrazione di copie di HBV-DNA notevolmente inferiore, durante le fasi precoci dell'infezione, rispetto a quella di HCV-RNA. Ciò nonostante, test molecolari per la rilevazione di HBV-DNA sono già in fase avanzata di sperimentazione. La metodologia NAT troverà inoltre applicazione anche per altri virus rilevanti o emergenti in campo trasfusionale quali l'HTLV, il PVB19²⁹, il CMV³⁰, l'HHV-8, il TTV, ecc. Per questi virus, considerata la prevalenza o il grado di patogenicità o la non accertata trasmissione per via ematica, non è giustificato uno *screening* di base dei donatori. Tuttavia, alcuni di questi virus possono acquistare un significato clinico importante in riceventi particolari, quali pazienti immunocompromessi e/o sottoposti a trapianto.

La validazione dei prodotti per la terapia trasfusionale di questi pazienti potrà essere mirata con appositi protocolli di ricerca del genoma (piuttosto che degli anticorpi) di questi virus, al fine di evitare il rischio di complicazioni post-trasfusionali che potrebbero risultare anche fatali per il ricevente. Un nuovo approccio alla validazione biologica ma forse anche alla selezione del donatore, al *counseling*, al significato dei test di conferma, tutte problematiche che saranno nel futuro influenzate dall'impiego delle metodiche NAT ai fini dello *screening*.

Riassunto

Sebbene negli ultimi anni sia stata raggiunta una notevole riduzione del rischio di trasmissione di malattie ad eziologia virale mediante il sangue o i suoi derivati, siamo ancora distanti dall'ipotetico "rischio zero". Tra le diverse strategie per la prevenzione delle malattie trasmissibili, l'attenzione si è recentemente concentrata sulle tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (NAT). La ricerca dei genomi virali è la tecnica più sensibile attualmente a disposizione, offrendo contemporaneamente il vantaggio di una rilevazione diretta del virus e di una sensibilità più elevata rispetto ai test attualmente in uso. Il suo impiego per lo screening delle unità di sangue

comporterebbe una significativa riduzione del "periodo finestra", soprattutto per l'infezione da HCV. Con questa premessa, l'EMEA/CPMP ha emesso la Raccomandazione 390/97 suggerendo che dal 1 luglio 1999 soltanto i lotti di emoderivati ottenuti da pool di plasma testati e risultati non reattivi per HCV-RNA potevano essere rilasciati sul mercato.

In Germania, l'applicazione della Raccomandazione è stata anticipata al 1 aprile 1999 ed estesa anche allo screening di concentrati di emazie e piastrine. L'introduzione della ricerca di HCV-RNA mediante metodiche NAT in pool di plasma destinati alla lavorazione pone infatti problemi di natura etica e medico-legale rispetto alla validazione biologica degli emocomponenti di pronto impiego.

Pertanto, nella maggior parte dei Paesi Europei, sono in corso studi di fattibilità finalizzati ad esaminare le diverse problematiche sia di carattere organizzativo che economico, connesse all'introduzione di questa nuova tecnologia nello screening delle unità di sangue.

Bibliografia

- 1) CM Nubling, R Seitz, J Lower: *Application of Nucleic Acid Amplification Techniques for blood donation screening*. *Transfus Med*, **25**, 86, 1998.
- 2) GB Schreiber, MP Busch, SH Kleinman, JJ Korelitz: *The risk of transfusion-transmitted viral infections*. *New Engl J Med*, **26**, 1685, 1996.
- 3) C L van der Poel, HT Cuypers, HW Reesink: *Hepatitis C virus six years on*. *Lancet*, **344**, 1475, 1994.
- 4) C Rosa, S Osborne, F Garetto et al.: *Epitope mapping of the NS4 and NS5 gene products of hepatitis C virus and the use of a chimeric NS4-NS5 synthetic peptide for serodiagnosis*. *J Virol Methods*, **55**, 219, 1995.
- 5) H De Beenhouwer, H Verhaert, H Claeys, C Vermylen: *Confirmation of hepatitis C virus positive blood donors by immunoblotting and polymerase chain reaction*. *Vox Sang*, **63**, 198, 1992.
- 6) E Dussaix, N Charnaux, P Laurent-Puig et al.: *Analysis of sera indeterminate by Ortho-HCV RIBA-2 by using three confirmatory assays for anti-hepatitis C virus antibody*. *J Clin Microbiol*, **32**, 2071, 1994.
- 7) HW Reesink, CP Engelfriet: *What are the consequences of indeterminate results in confirmatory test for antibodies against transmissible viruses ?* *Vox Sang*, **73**, 97, 1997.
- 8) JAJ Barbara, JA Garon: *Polymerase Chain Reaction and transfusion microbiology*. *Vox Sang*, **64**, 73, 1993.
- 9) K Muller-Breitkreutz, SA Baylis, JP Allain: *Nucleic Acid Amplification tests for the detection of blood-borne viruses*. *Vox Sang*, **76**, 194, 1999.
- 10) JP Levrud: *Some new techniques for RNA or DNA analysis of interest for immunologists*. *Res Immunol*, **149**, 119, 1998.

- 11) R Boom, CJA Sol, MMM Salimans et al.: *Rapid and simple method for purification of nucleic acid*. J Clin Microbiol, **28**, 495, 1990.
- 12) HTM Cuypers, PN Lelie: *Introducing Nucleic Acid Amplification technologies in the Bloodbank: the use of Nuclisens silica method for isolation of HCV-RNA from minipools*. The Safety of the Blood Supply Preparing for the Next Century, XXVth Congress ISBT, June 27th-July 2nd 1998, Oslo, Norway.
- 13) SH McDonough, C Giachetti, Y Yang et al.: *High throughput assay for the simultaneous or separate detection of human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis type C virus (HCV)*. Transfus Med, **25**, 164, 1998.
- 14) HH Lee, JP Allain: *Genomic screening for blood-borne viruses in transfusion settings*. Vox Sang, **74** (Suppl 2), 119, 1998.
- 15) WK Roth, M Weber, E Seifried: *Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus, and HIV-1 in a blood-bank setting*. Lancet, **353**, 359, 1999.
- 16) P Flanagan, J Barbara: *PCR testing of plasma pools: from concept to reality*. Transf Med Reviews, **13**, 164, 1999.
- 17) PM Rogers, J Saldanha, JP Allain: *Report of EPFA/NIBSC Workshop "Nucleic Acid Amplification Tests (NAT) for the detection of blood-borne viruses" held on 31 October 1996 in Amsterdam, The Netherlands*. Vox Sang, **72**, 199, 1997.
- 18) F Barin: *Routine PCR screening of blood*. Lancet, **353**, 1799, 1999.
- 19) S Yerly, M Pedrocchi, L Perrin: *The use of polymerase chain reaction in plasma pools for the concomitant detection of hepatitis C virus and HIV type 1 RNA*. Transfusion, **38**, 908, 1998.
- 20) P Flanagan, T Snape: *Nucleic acid technology (NAT) testing and the transfusion service: a rationale for the implementation of minipool testing*. Transfusion Med, **8**, 9, 1998.
- 21) HW Reesink, CP Engelfriet: *Consequences of Nucleic acid Amplification Testing for blood transfusion centres*. Vox Sang, **74**, 263, 1998.
- 22) J Petrik, P Hewitt, J Barbara, JP Allain: *Large-scale HCV-RNA screening in first-time blood donors: the first step towards genomic screening of blood donation*. Vox Sang, **76**, 159, 1999.
- 23) JJ Lefrère, J Coste, C Defer et al.: *Screening blood donation for viral genomes: multicenter study of real time simulation using pooled samples on the model of hepatitis C virus RNA detection*. Transfusion, **38**, 915, 1998.
- 24) J Mortimer: *Intersecting pools and their potential application in testing donated blood for viral genomes*. Vox Sang, **73**, 93, 1997.
- 25) J Saldanha, N Lelie, A Heath: *Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assay for HCV-RNA. WHO collaborative study Group*. Vox Sang, **76**, 149, 1999.
- 26) MS Cardoso, K Koerner, B Kubanek: *Minipool screening by nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus and HIV: preliminary results*. Transfusion, **38**, 905, 1998.
- 27) JM Pawlotsky, A Bastie, I Lonjon et al: *What technique should be used for routine detection and quantification of HBV-DNA in clinical samples?* J Virol Methods, **65**, 245, 1997.
- 28) G de Stasio: *Rischio residuo da trasfusione alla fine degli anni novanta*. La Trasf del Sangue, **43**, 269, 1998.
- 29) J Saldanha, P Minor: *Collaborative study to assess the suitability of a proposed working reagent for human Parvovirus B19 DNA detection in plasma-pools by gene amplification techniques*. Vox Sang, **73**, 207, 1997.
- 30) S Larsson, C Soderberg-Nauclér, FZ Wang E Moller: *Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time*. Transfusion, **38**, 271, 1998.