

# Il controllo di qualità nell'impiego della PCR applicata alla determinazione qualitativa dell'HCV-RNA

Giuseppe Giuliani, Lorenzo Drago, Paola Musardo, Maria Rita Gismondo

Laboratorio di Microbiologia, Azienda Ospedaliera - Polo Universitario "Ospedale Luigi Sacco" Milano

## Quality Assessment for Qualitative Detection of Hepatitis C Virus RNA

**Key Words:** Standardization, Quality assessment, Quality control, HCV-RNA.

### SUMMARY

Detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in samples of plasma/serum has become an essential part of the diagnosis and management of HCV-infected patients. Qualitative HCV-RNA tests are used to identify acute HCV infections as well as chronic HCV carriers. In recent years, a variety of commercial and non commercial test systems have been developed for this purpose. Each of these methods is calibrated with proprietary standards and exhibits its own sensitivity (detection limit) and specificity. Obviously, laboratories performing HCV-RNA test should report accurate and reliable results regardless of the type of assay used. Where commercial kits are used for part of or the complete analytical procedure, documented validation points already covered by the kit manufacturer can substitute for the validation by the user. Nevertheless, the performance of the kit with respect to its intended use has to be demonstrated by the user. One of the best ways to assess the performance of individual laboratories for validation of qualitative HCV-RNA test is to determine:

1. **Specificity.** In order to validate the specificity of the analytical procedure, at least 100 HCV-RNA-negative plasma pools should be tested and shown to be non-reactive.
2. **Positive cut-off point (detection limit/sensitivity).** The positive cut-off point (as defined in the Ph Eur General Method 2.6.21) is the minimum number of the target sequences per volume sample which can be detected in 95% of test runs. A dilution series of a working reagent or reference material, which has been calibrated against the WHO HCV International Standard (96/790), should be tested on different days to examine variation between test runs. At least 3 independent dilution series should be tested with a sufficient number of replicates at each dilution to give a total number of 24 test results for each dilution to enable a statistical analysis of the results;
3. **Robustness.** To demonstrate robustness, at least 20 HCV-RNA negative plasma pools (selected at random) and spiked with HCV-RNA to a final concentration of 3 times the previously determined 95% cut-off value should be tested and found positive;
4. **Cross-contamination error.** Cross-contamination prevention should be demonstrated by the accurate detection of a panel of at least 20 samples consisting of alternate samples of negative plasma pools and negative plasma pools spiked with high concentrations of HCV (at least 102 x the 95% cut-off value or at least 10<sup>4</sup> IU/ml).

### INTRODUZIONE

La rivelazione dell'RNA del virus dell'epatite C (HCV-RNA), in campioni di plasma o di siero, riveste un particolare essenziale nella diagnosi e nel management di pazienti infetti dal virus dell'epatite C (HCV). Nel corso di quest'ultimo decennio si è assistito ad una larga diffusione delle tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (NAT) applicate alla diagnosi ed al monitoraggio dell'infezione da HCV, grazie soprattutto all'impiego di una tecnica di grande versatilità ed affidabilità: la *polymerase chain reaction* (PCR).

I test qualitativi per la ricerca dell'HCV-RNA sono utilizzati al fine di identificare l'infezione acuta, lo stato di portatore cronico da HCV e per la sicurezza virologica dei prodotti del sangue.

In quest'ultimo caso, successivamente alle raccomandazioni suggerite dalla "Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP/BWP/390/97)" il Ministro della Salute ha

stabilito che a far data dal 1 luglio 1999 soltanto i lotti dei prodotti del sangue derivanti da pool di plasma testati e risultati non reattivi per HCV-RNA (mediante NAT) possono essere rilasciati ed utilizzati. Negli anni recenti, la ricerca industriale ha progettato ed introdotto sul mercato, a garanzia della qualità e sicurezza per l'utilizzatore, una moltitudine di kit ciascuno dei quali è calibrato con standard appropriati ed esibiscono i propri valori di specificità, sensibilità e robustezza in ottemperanza alle specifiche tecniche comuni per i dispositivi medico-diagnostici *in vitro* ed ai requisiti supplementari per le tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (NAT) (Decreto Legislativo 8 settembre 2000, n. 332 in attuazione della direttiva 98/79/CE del Parlamento europeo e del Consiglio). Laddove kit commerciali vengono utilizzati in parte o per la completa procedura analitica NAT, le performance dichiarate dallo stesso kit devono essere dimostrate e validate dall'utilizzatore in

modo tale da poter garantire la reale qualità dei risultati analitici in termini di specificità, sensibilità, robustezza ed errore da cross-contaminazione. Questo studio si propone come raccomandazione alla buona pratica di laboratorio ed al controllo di qualità da applicare alla determinazione qualitativa dell'HCV-RNA e più in generale alle determinazioni qualitative per la ricerca di genomi virali.

## MATERIALI E METODI

**Preparazioni di riferimento HCV-RNA:** sono state utilizzate 2 preparazioni HCV-RNA lotto *ISS 0498* e lotto *ISS HC* del Laboratorio di Immunologia dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), Roma. HCV-RNA ISS 0498 è una preparazione liquida contenente HCV-RNA di genotipo 1 alla quale, in seguito ad uno studio collaborativo internazionale, è stata attribuita un titolo di 1700 U.I./ml. HCV-RNA ISS HC è una preparazione liquida contenente HCV-RNA di genotipo 1 con un titolo stimato di 10.000 – 20.000 U.I./ml.

**Kit commerciale validato:** tutte le determinazioni sono state eseguite con il kit cobas Ampliscreen™ HCV Test, v.2.0 (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA).

**Specificità:** la validazione della specificità è stata condotta allestendo 100 pool di plasma HCV-RNA negativi e testati in 5 sedute analitiche di 20 pool ciascuna.

**Sensibilità (detection limit o cut-off):** al fine di determinare il punto di cut-off positivo, sono state allestite 5 serie indipendenti di diluizioni alle concentrazioni finali di 150 U.I (30 pool), 100 U.I. (30 pool), 50 U.I (30 pool), 32 U.I (30 pool) e 10 U.I (30 pool) per ml.

**Robustezza:** al fine di valutare la robustezza del kit cobas Ampliscreen™ HCV Test, v.2.0 (Roche Diagnostics) abbiamo eseguito 4 sedute analitiche di un pannello di 10 pool di plasma HCV-RNA/anti-HCV negativi portati alla concentrazione finale 3x cut-off.

**Errore da cross-contaminazione:** al fine di valutare l'errore da cross-contaminazione abbiamo eseguito 5 sedute analitiche di un pannello di 20 pool di plasma (10 pool negativi e 10 pool fortemente positivi alla concentrazione di 1.000 – 2.000 U.I./ml) lavorando alternativamente 1 pool positi-

vo e 1 pool negativo. Sono state eseguite 100 determinazioni, 50 per ognuno dei 2 operatori. I pool di plasma positivi sono stati ottenuti utilizzando il lotto HCV-RNA ISS HC.

**Potenzialità di cross-contaminazione degli steps della fase di estrazione alcolica di HCV-RNA:** l'estrazione alcolica di HCV-RNA si compone dei seguenti step: 1) lisi delle particelle virali con isotiocianato di guanidina/ditiotreitolo/glicogeno; 2) precipitazione degli acidi nucleici con isopropanolo; 3) concentrazione e visualizzazione degli acidi nucleici con etanolo al 70%; 4) risospensione del pellet nel diluente (tampone Tris/HC). Durante l'esecuzione manuale degli step (1-4) si possono verificare differenti inconvenienti. Quello che assume maggiore importanza è la cross-contaminazione. Scopo di questo esperimento è studiare la potenzialità critica di cross-contaminazione di ogni "single step" della fase di estrazione, da noi identificati come Punti Critici di Controllo (*Critical Control Point* – CCP), per poter formulare ed adoperare possibili criteri di prevenzione. A tal fine abbiamo utilizzato lo Standard di Riferimento ad alta concentrazione (*ISS-HC*) come campione da destinare, durante gli step di estrazione, alla contaminazione di un pannello di 9 provette test (3 per ogni carica infettante) per ciascun CCP qui di seguito descritto:

### CCPI - Step della lisi delle particelle virali

Campioni	Descrizione
I	ISS HC dopo ultracentrifugazione e trascorsi 10' dall'aggiunta del Reagente di Lisi (RL)
2-3-4	3 provette di 100µl NHP/600µl RL + 5µl da campione I
5-6-7	3 provette di 100µl NHP/600µl RL + 10µl da campione I
8-9-10	3 provette di 100µl NHP/600µl RL + 20µl da campione I

### CCP2 - Step della precipitazione degli acidi nucleici

Campioni	Descrizione
I	ISS HC dopo centrifugazione con isopropanolo
11-12-13	3 provette di 1400µl isopropanolo + 25µl da campione I
14-15-16	3 provette di 1400µl isopropanolo + 100µl da campione I
17-18-19	3 provette di 1400µl isopropanolo + 200µl da campione I

### CCP3 - Step della concentrazione e visualizzazione degli acidi nucleici

Campioni	Descrizione
I	ISS HC dopo centrifugazione con etanolo 70%
20-21-22	3 provette di 1000µl etanolo + 25µl da campione I
23-24-25	3 provette di 1000µl etanolo + 100µl da campione I
26-27-28	3 provette di 1000µl etanolo + 200µl da campione I

### CCP4 - Step della risospensione degli acidi nucleici

Campioni	Descrizione
I	ISS HC dopo rottura del pellet nel diluente
29-30-31	3 provette di 200µl diluente + 5µl da campione I
32-33-34	3 provette di 200µl diluente + 10µl da campione I
35-36-37	3 provette di 200µl diluente + 20µl da campione I

## RISULTATI

### 1. Specificità

I risultati degli esperimenti di specificità sono rappresentati nella tabella 1. Per ciascuna serie indipendente di esperimenti viene indicato il numero dei risultati negativi *versus* il numero totale dei test arruolati. Inoltre, viene indicata la percentuale di negatività sul totale dei test effettuati.

**Tabella 1.**

	1ª seduta 20 pool-	2ª seduta 20 pool-	3ª seduta 20 pool-	4ª seduta 20 pool-	5ª seduta 20 pool-
Operatore A	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
Operatore B	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
Totale pool (%)	20/20 (100)	20/20 (100)	20/20 (100)	20/20 (100)	20/20 (100)

### 2. Sensibilità (*Detection Limit – Cut-off*)

Il riassunto dei dati della valutazione della *Detection Limit* sono rappresentati nella tabella 2. Per ciascuna diluizione e serie indipendente di esperimenti viene indicato il numero dei risultati positivi *versus* il numero totale dei test arruolati. Inoltre, per ogni diluizione, viene indicata la percentuale di positività sul totale dei test effettuati.

**Tabella 2.**

Seduta analitica	150 UI/ml	100 UI/ml	50 UI/ml	32 UI/ml	10 UI/ml
n.1	10/10	10/10	10/10	10/10	4/10
n.2	10/10	10/10	10/10	9/10	5/10
n.3	10/10	10/10	10/10	10/10	5/10
Totale(%)	30/30 (100)	30/30 (100)	30/30 (100)	29/30 (96,6)	7/30 (46,6)

### 3. Robustezza

I risultati degli esperimenti di robustezza sono rappresentati nella tabella 3. Per ciascuna serie indipendente di esperimenti viene indicato il numero dei risultati positivi *versus* il numero totale dei test arruolati. Inoltre, viene indicata la percentuale di positività sul totale dei test effettuati.

**Tabella 4.**

	1ª seduta		2ª seduta		3ª seduta		4ª seduta		5ª seduta	
	pool +	pool -	pool +	pool -						
Operatore A	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5
Operatore B	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Totale pool (%)	10/10 100	9/10 99								

**Tabella 5A. CCPI - Step della lisi delle particelle virali**

Campioni	Descrizione	Esito campioni		
2-3-4	3 provette di 100µl NHP/600µl RL + 5µl da campione I*	+	+	+
5-6-7	3 provette di 100µl NHP/600µl RL + 10µl da campione I*	+	+	+
8-9-10	3 provette di 100µl NHP/600µl RL + 20µl da campione I*	+	+	+

\*Campione I = ISS HC dopo ultracentrifugazione e trascorsi 10' dall'aggiunta del lisante (RL)

**Tabella 3.**

IU/ml	150 3 x cut-off
Seduta analitica n.1	10/10
Seduta analitica n.2	10/10
Seduta analitica n.3	10/10
Seduta analitica n.4	10/10
Totale (%)	40/40 (100)

### 4. Cross-contaminazione

I risultati della cross-contaminazione sono rappresentati nella tabella 4. Sono state eseguite 5 sedute analitiche di un pannello di 20 pool di plasma (10 pool alla concentrazione di 1.000-2.000 IU/ml e 10 pool negativi) lavorando alternativamente un pool positivo ed un pool negativo. Sono state eseguite 100 determinazioni, 50 per ognuno dei 2 operatori. Per ciascuna serie indipendente di esperimenti viene indicato il numero dei risultati positivi/negativi *versus* il numero totale dei test arruolati. Inoltre, per ogni seduta, viene indicata la percentuale di positività/negatività sul totale dei test effettuati.

### 5. Potenzialità di cross-contaminazione degli step della fase di estrazione

I risultati della potenzialità critica di cross-contaminazione di ogni "single step" della fase di estrazione sono rappresentati nella tabella 5 (A-D).

## DISCUSSIONE E CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Assicurare la qualità delle tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (NAT) nella diagnostica virologica significa implementare all'interno del laboratorio un Programma di Controllo di Qualità in grado di valutare attentamente le performance di procedure NAT già in uso e, al contempo, nell'ottica dell'evoluzione rapida delle tecnologie,

**Tabella 5B.** CCP2 - Step della precipitazione degli acidi nucleici

Campioni	Descrizione	Esito campioni		
11-12-13	3 provette di 1400µl isopropanolo +25µl da campione I <sup>†</sup>	+	-	-
14-15-16	3 provette di 1400µl isopropanolo + 100µl da campione I <sup>†</sup>	+	+	+
17-18-19	3 provette di 1400µl isopropanolo + 200µl da campione I <sup>†</sup>	+	+	+

<sup>†</sup>Campione I = ISS HC dopo centrifugazione con isopropanolo

**Tabella 5C.** CCP3 - Step della concentrazione e visualizzazione degli acidi nucleici

Campioni	Descrizione	Esito campioni		
20-21-22	3 provette di 1000µl etanolo +25µl da campione I <sup>°</sup>	-	-	-
23-24-25	3 provette di 1000µl etanolo + 100µl da campione I <sup>°</sup>	-	-	-
26-27-28	3 provette di 1000µl etanolo + 200µl da campione I <sup>°</sup>	-	-	-

<sup>°</sup>Campione I = ISS HC dopo centrifugazione con etanolo 70%

**Tabella 5D.** CCP4 - Step della risospensione degli acidi nucleici

Campioni	Descrizione	Esito campioni		
29-30-31	3 provette di 200µl diluente + 5µl da campione I <sup>†</sup>	+	+	+
32-33-34	3 provette di 200µl diluente + 10µl da campione I <sup>†</sup>	+	+	+
35-36-37	3 provette di 200µl diluente + 20µl da campione I <sup>†</sup>	+	+	+

<sup>†</sup>Campione I = ISS HC dopo risospensione del pellet nel diluente

adottare una procedura di valutazione delle nuove tecniche diagnostiche NAT in campo virologico. La rilevazione nel plasma o siero dell'HCV-RNA rappresenta un elemento cruciale nel management del paziente con infezione da HCV, pertanto, lo scopo primario di una valutazione di qualità è quello di determinare se un laboratorio è capace di fornire risultati accurati ed affidabili, non quello di stabilire se è in grado o meno di eseguire adeguatamente un determinato test diagnostico.

La standardizzazione del test HCV-RNA si è resa necessaria per assicurare l'accuratezza dei differenti metodi NAT utilizzati e per facilitare il confronto dei risultati di studi che utilizzano tecnologie diversificate. Le differenti tecnologie avevano prodotto diverse unità di misura per HCV-RNA che complicavano l'interpretazione dei livelli di viremia ed il confronto con i livelli di sensibilità sia delle tecniche qualitative che quantitative. Lo Standard Internazionale WHO HCV-96/790 prodotto dal National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC) ha rappresentato il risultato di uno studio collaborativo per stabilire uno standard comune contro cui poter calibrare tutti i test HCV-RNA.

L'accuratezza di un test è determinato dal confronto con il test diagnostico "gold standard" combinato ai dati clinici. I parametri utilizzati per descrivere l'accuratezza di un test diagnostico sono la specificità, la sensibilità, la robustezza e l'errore da cross-contaminazione espressi in percentuale.

La specificità di una procedura analitica NAT è la capacità di rilevare inequivocabilmente l'acido nucleico target in presenza di altri componenti dei quali è conosciuta la presenza. La specificità di una procedura analitica NAT è dipendente dalla scelta dei primers, dalla scelta dei probes (per l'a-

nalisi del prodotto finale) e dalle condizioni di stringenza del test (per gli step di amplificazione e detection). Al fine di validare la specificità di una procedura analitica NAT, almeno 100 pool di plasma HCV-RNA negativi dovrebbero essere testati e risultare tutti negativi.

La sensibilità o detection limit o punto di cut-off positivo (come definito nelle linee Ph Eur General Method 2. 6. 21) è il numero minimo di sequenze target per volume di campione che può essere rivelato nel 95% dei test eseguiti. Il punto di cut-off positivo è influenzato dalla distribuzione dei genomi virali all'interno di ciascun campione da testare e da fattori come l'efficienza enzimatica, a tal punto da farlo risultare differente dal valore 95% nelle diverse sedute analitiche. Sebbene tutti i kit commerciali per HCV-RNA riportino il valore di cut-off è importante che ciascun laboratorio determini il proprio livello di cut-off (detection limit). Al fine di determinare il punto di cut-off positivo, una serie di diluizioni di un reagente di lavoro o materiale di riferimento, calibrati contro lo Standard Internazionale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (96/790), dovrebbero essere testate in differenti giornate al fine di esaminare le variazioni tra le diverse sedute analitiche. Almeno 3 serie indipendenti di diluizioni dovrebbero essere testate con un numero sufficiente di replicati per avere un numero totale di 24 risultati per ogni diluizione al fine di permettere un'analisi statistica dei risultati. Per esempio, un laboratorio potrebbe testare, in differenti giornate: 3 serie di diluizioni con 8 replicati per ciascuna diluizione; 4 serie di diluizioni con 6 replicati per ciascuna diluizione; 6 serie di diluizioni con 4 replicati per ciascuna diluizione. Inoltre, per rendere gestibili le serie di diluizioni da testare dovrebbe essere effettuato un test preliminare

(usando, per esempio, le diluizioni logaritmiche del campione da testare) al fine di ottenere un primo, orientativo valore di detection limit (es. la più alta diluizione che risulta positiva). Il range delle diluizioni può essere allora scelto intorno al pre-determinato valore di cut-off utilizzando, per esempio, un fattore di diluizione di 0.5 logaritmi o meno ed un campione di plasma negativo come matrice di diluizione. La concentrazione di HCV-RNA rivelata nel 95% dei test eseguiti può essere calcolata utilizzando un'appropriate valutazione statistica. Questi risultati potrebbero anche essere utili a rendere evidenti le variazioni intra-analisi e giornaliere di una procedura analitica.

La robustezza è la capacità di una procedura analitica di dare un risultato che sia quanto più vicino al valore atteso. Esprime quindi i concetti di affidabilità di una tecnologia e di attendibilità dei risultati che ne conseguono. I metodi che utilizzano la tecnologia NAT risentono di diversi fattori come ad es. la concentrazione di reagenti ( $MgCl_2$ , primers o dNTP<sub>s</sub>), cicli di amplificazione, sistemi di rivelazione che possono tutti inficiare la robustezza del metodo. Per tale motivo la robustezza viene valutata nella fase di sviluppo di un metodo NAT. Inoltre, la robustezza è un parametro che risente anche di piccole e deliberate variazioni dei parametri del metodo, come ad esempio le variazioni fisiologiche da operatore a operatore, in termini di efficienza di estrazione, che si possono realizzare nella fase manuale di estrazione degli acidi nucleici. Per chi utilizza una metodica NAT consolidata e commercializzata sotto forma di kit la robustezza può assumere un certo significato in termini di valutazione delle performance del kit fornito. In questo caso la robustezza del metodo dovrebbe essere dimostrata saggiando almeno 20 pool di plasma HCV-RNA negativi portati alla concentrazione finale di 3 x cut-off, testarli e trovarli tutti positivi. Alcuni problemi potrebbero sorgere con metodi NAT che utilizzano la fase iniziale di ultracentrifugazione prima della fase di estrazione dell'RNA virale. In questo caso la robustezza dovrebbe essere valutata testando un pannello di 20 pool di plasma negativi per HCV-RNA, negativi per anticorpi anti-HCV e portati alla concentrazione finale di 3 x cut-off, testarli e trovarli tutti positivi.

L'errore da contaminazione: l'estrema sensibilità della PCR, in grado di generare una quantità enorme di copie di acido nucleico target, rappresenta, paradossalmente, il maggiore problema per la sua applicazione, soprattutto a fini diagnostici. Infatti, il saggio è pericolosamente sensibile alla presenza nell'ambiente, sugli strumenti o sull'operatore stesso di molecole target provenienti da amplificazioni precedenti. Se si considera che il prodotto

di una PCR contiene generalmente  $10^{11}$  -  $10^{12}$  molecole di acido nucleico amplificato in un volume di 100 $\mu$ l, quantità minime di prodotto, come 10<sup>-7</sup> $\mu$ l, conterranno  $10^3$  molecole di prodotto di amplificazione. La semplice apertura di una provetta contenente il campione amplificato può, quindi, creare un aerosol, che rende l'ambiente circostante inutilizzabile per l'allestimento di una nuova reazione. Questo tipo di contaminazione, detta da "carry-over", ovvero derivante da amplificazioni precedenti, rappresentava la causa più frequente di errore prima dell'introduzione dei sistemi enzimatici (es. l'uracil-N-glicosilasi - UNG o amperase) di prevenzione del fenomeno "carry-over". Inoltre, se si considera che una normale seduta analitica per HCV-RNA si compone, in cieco, di campioni negativi e campioni positivi si comprende come, ad oggi, la causa principale di errore è rappresentata dal fatto che piccolissime quantità di campioni positivi possono contaminare (cross-contaminazione) campioni in sequenza negativi con il grave rischio di validare risultati falsamente positivi. L'errore da cross-contaminazione può essere dimostrato attraverso la rivelazione di un pannello di almeno 20 campioni facendo lavorare agli operatori, alternativamente, campioni negativi e campioni con una elevata concentrazione di HCV-RNA (es.  $10^3$  x 95% cut-off oppure almeno  $10^4$ UI/ml).

Concludendo, la nostra esperienza ha dimostrato le ottime performance diagnostiche del kit in utilizzo in termini di specificità, sensibilità e robustezza. Inoltre, gli esperimenti di detection limit hanno rilevato, nel nostro laboratorio, un livello di sensibilità pari a 32UI/ml.

Per poter formulare ed adoperare possibili criteri di prevenzione da cross-contaminazione della fase di estrazione alcolica dell'RNA virale, abbiamo condotto in parallelo una serie di esperimenti atti a rivelare la potenzialità critica di cross-contaminazione di ogni "single step" da noi identificati come Punti Critici di Controllo (*Critical Control Point*, CCP1-CCP4). I dati ottenuti dimostrano come gli step della lisi delle particelle virali (CCP1) e della risospensione degli acidi nucleici (CCP4) sono, come era prevedibile, particolarmente critici avendo espresso una forte potenzialità di contaminazione, in quanto tutti i campioni arruolati e testati in triplicato sono risultati positivi. In pratica, sono sufficienti piccolissime quantità di reagenti di lavoro - es. 5 $\mu$ l di reagente di lisi di un campione positivo (CCP1) oppure, 5 $\mu$ l di diluente dello stesso campione (CCP4) - a contaminare campioni in sequenza potenzialmente negativi. Ancora più prevedibili sono stati i risultati di tutti i campioni arruolati, e testati in triplicato, dello step della concentrazio-

ne e visualizzazione degli acidi nucleici dopo centrifugazione con alcol etilico al 70% (CCP3). La negatività di tutti i risultati dimostra la potenzialità di contaminazione quasi nulla di questo step. Sorprendentemente, lo step della precipitazione degli acidi nucleici con isopropanolo (CCP2) ha riservato dei risultati inattesi. 25µl del sovrantante isopropanolo si è dimostrato in grado di contaminare nel 33% dei casi e, quantità superiori (100µl e 200µl) nel 100% dei casi. Questi risultati dimostrano che, nella fase di precipitazione degli acidi nucleici, bisogna prestare particolare attenzione alla manipolazione del sovrantante isopropanolo in quanto non tutte le particelle virali si depositano nel fondo della provetta contrariamente a quanto dimostrato nella fase di centrifugazione e concentrazione degli acidi nucleici con alcol etilico (CCP3).

In conclusione, è bene tenere presente che l'accuratezza e l'attendibilità della PCR in ambito diagnostico, nonostante le semplificazioni metodologiche introdotte dalla ricerca industriale e la facilità di lettura del risultato, non è legata soltanto alla corretta valutazione della singola reazione di amplificazione ma, è vincolata dal suo inserimento in una complessa ed articolata routine diagnostica e dall'esecuzione da parte di personale competente ed esperto.

\*\*\*\*\*

***“Sometimes a good idea comes to you when you are not looking for it” Kary Mullis 1990***

*simile ad un esplosivo laboratorio di idee, un metodo sorprendentemente semplice, nato perché imprevisto, fatato dalle miniature delle sue componenti in una orchestra magistralmente diretta da una sorgente di calore, la PCR ha sfidato l'autorità della scienza dogmatica mostrando nelle pagine del tempo come vive, lavora e fa divertire le menti.*

**G. Giuliani 2004**

## BIBLIOGRAFIA

1. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) 1997. Plasma-derived medicinal products. The introduction of genomic amplification technology (GAT) for the detection of hepatitis C virus RNA in plasma pools. CPMP/BWP/390/97.
2. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) 1997. The introduction of nucleic acid amplification technology (NAT) for the detection of hepatitis C virus in plasma pools. CPMP/BWP/269/95. London: CPMP; 1997.
3. Damen M, Zaaijer H, Reesink H, et al. International collaborative study on the second Eurohep HCV-RNA reference panel. J Virol Methods 1996; 58: 175-85.
4. Decreto del Ministro della Sanità (29 marzo 1999).
5. Decreto Legislativo 8 settembre 2000, n.332 in attuazione della direttiva 98/79/CE del Parlamento europeo e del Consiglio.
6. General Methods 2. 6. 21: Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT). European Pharmacopeia, 3<sup>rd</sup> Edition, December 1996.
7. Gentili G, Cristiano K, Pisani G, Bisso GM, Miceli M, Wirz M and National Collaborative Study Group. Collaborative study for the calibration of a new Italian HCV RNA reference preparation against the international standard. Ann Ist Super Sanità 2003; 39(2): 183-7.
8. Gentili G, Pisani G, Bisso G, Cristiano K, Wirz M, Mele C and the EQA participants. Hepatitis C virus testing of plasma pools by nucleic acid amplification technology: external quality assessment. Vox Sang 2001; 81: 143-7.
9. Guidelines for validation of nucleic acid amplification technology (NAT) for the detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in plasma pools. (PA/PH/OMCL (98), DEF). European Network of Official Medicines Control Laboratories. Council of Europe, January 1999.
10. Neumaier M, Braun A, Wagener C for the International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division Committee on Molecular Biology Techniques. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. Clinical Chemistry 1998; 44 (1): 12-26.
11. Niesters H. Standardization and quality control in molecular diagnostics. Expert Rev Mol Diagn 2001; 1(2): 129-31.
12. Pisani G, Cristiano K, Wirz M, Bisso GM, Gentili G and the EQA participants. Further evidence on the high proficiency of laboratories involved in plasma pool testing for HCV RNA by nucleic acid amplification technology. Vox Sang 2002; 2: 211-2.
13. Pisani G, Mele C, Bisso G, Wirz M, Gentili G. Nucleic acid amplification technology (NAT) for the detection of hepatitis C virus (HCV) in plasma pools. Validation Report. 2000; 11 p. Rapporti ISTISAN 00/6.
14. Saldanha J, Heath A, Lelie N, Lisani G, Nubling M, Yu M, and the Collaborative Study Group. Calibration of HCV working reagents for NAT assays against the HCV International Standard. Vox Sang 2000; 78: 217-24.
15. Saldanha J, Lelie N, Heath A and the WHO collaborative study group. Establishment of the first International Standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV-RNA. Vox Sang 1999; 76: 149-58.

16. Saldanha J, Minor P. Collaborative study to assess the suitability of an HCV-RNA reference sample for detection of HCV-RNA in plasma pools by PCR. *Vox Sang* 1996; 70: 148-51.
16. Saldanha J. Standardization: a progress report. *Biologicals* 1999; 27: 285-9.
17. The European Department for the Quality of Medicines. Human plasma for fractionation (2000: 0853). In: *European Pharmacopoeia*. 3<sup>rd</sup> ed. (Supplement 2000). Strasbourg (France): Council of Europe; 2000; 801-2.
18. Zaaijer H, Cuypers H, Reesink H, Winkel I, Gerken G, Lelie P. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 1993; 341: 722-4.

**Giuseppe Giuliani**  
Ospedale Luigi Sacco di Milano  
Laboratorio di Microbiologia  
Tel.: 02 39042589  
E-mail: [qualita.microbiologia@hsacco.it](mailto:qualita.microbiologia@hsacco.it)