

Notiziario

dell'Istituto Superiore di Sanità

Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità e Responsabile scientifico: Giuseppe Vicari

Direttore responsabile: Vilma Alberani; Redazione: Gabriella Bucossi, Paola De Castro Pietrangeli, Franco Timitilli
Composizione, Stampa e Distribuzione: Patrizia Mochi, Massimo Corbo

Redazione, Amministrazione e Stampa: Istituto Superiore di Sanità, Servizio per le attività editoriali, Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma
Tel. (06) 49901 - Telex 610071 ISTSAN I - Telegr. ISTISAN - 00161 Roma - Telefax (06) 4469938

Iscritto al n. 475/88 del 16 settembre 1988. Registro Stampa Tribunale di Roma
© Istituto Superiore di Sanità 1996

Diagnostica molecolare nell'infezione da virus dell'epatite C: applicazioni nella pratica clinica

A cura di Maria Rapicetta



utilizzazione di metodi efficienti per il rilevamento virale e anticorpale è di fondamentale importanza per l'identificazione e il trattamento delle infezioni virali. La recente messa a punto e parziale standardizzazione di metodi basati su tecniche di biologia molecolare ha fornito nuovi strumenti diagnostici sia nel campo delle malattie genetiche che delle malattie infettive.

Questo argomento, per quel che concerne la diagnosi dell'infezione da virus dell'epatite di tipo C (HCV), è stato trattato nella commissione dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato: "Tecnologie molecolari nella diagnostica delle epatopatie".

Le procedure tecniche, oggetto di questo rapporto e relative all'applicazione di metodi di amplificazione genica (PCR) per il rilevamento di HCV-RNA, sono state elaborate da questa commissione e, in particolare, da: *Alfredo Alberti, Francesco Bianchi,*

Ferruccio Bonino, Maurizia Brunetto, Elisabetta Cariani, Patrizia Farci, Carlo Ferrari, Massimo Levrero, Mario Mondelli, Patrizia Pontisso, Gabriele Pozzato, Giovanni Raimondo, Maria Rapicetta, Maria Grazia Rumi, Teresa Santantonio, Antonella Smedile, Gloria Taliani, Erica Villa, Anna Linda Zignego.

Introduzione

L'applicazione di tecnologie molecolari è stata di cruciale importanza per l'identificazione dell'HCV, agente eziologico della maggior parte delle epatiti precedentemente classificate come di tipo non-A, non-B.

L'approccio sperimentale utilizzato si è basato sul sequenziamento successivo di geni parzialmente sovrapposti, dopo l'identificazione del 1° frammento genico codificante per una proteina specificamente immunoreattiva.

Con la produzione di antigeni specifici, per sintesi

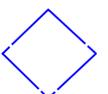
diretta o per espressione genica, e la loro utilizzazione in saggi immunoenzimatici è stato possibile definire i livelli di prevalenza anticorpale in larghe indagini di popolazione, ed è stato possibile stabilire la diffusione globale di tale infezione, che presenta uno spettro di distribuzione geografica analogo a quello del virus dell'epatite B.

L'infezione da HCV ha notevole impatto, a livello sanitario, in Italia per la presenza di un ampio serbatoio di individui "carriers", che costituiscono una potenziale fonte di infezione e, al tempo stesso, rappresentano una potenziale fascia di pazienti a rischio per l'insorgenza delle gravi sindromi associate all'infezione da HCV e, in modo particolare, di cirrosi ed epatocarcinoma.

Le metodologie di diagnosi dell'infezione da HCV includono, analogamente alle altre infezioni virali, metodi di rilevamento anticorpale e virale. Non sono tuttavia a tutt'oggi disponibili metodi

affidabili di rilevamento della particella virale e dei suoi antigeni. Il rilevamento dell'acido nucleico virale costituisce pertanto, in questo caso, un valido approccio alternativo. Tale rilevamento è possibile con varie metodologie tra cui i metodi di ibridazione molecolare e i metodi di amplificazione genica.

L'introduzione della reazione polimerasica a catena (PCR) ha condotto ad un enorme incremento della sensibilità nella determinazione degli acidi nucleici, permettendo di rilevare anche poche molecole di DNA o RNA. Questa metodologia viene correntemente utilizzata per la dimostrazione dell'RNA dell'HCV (HCV-RNA), in quanto i bassi livelli sierici di virus rendono impossibile la sua individuazione mediante semplice ibridizzazione diretta. Se, da una parte, tale approccio rappresenta un potentissimo strumento diagnostico, dall'altra è necessario con-



siderare che, in via teorica, l'altissima sensibilità della PCR può portare alla rilevazione di quantità infinitesimali di virus il cui significato clinico e patogenetico resta tuttora da definire. Inoltre, sono insorte alcune problematiche, con la routinaria applicazione di tale metodica, relativamente alla sua affidabilità e riproducibilità. Tali argomenti sono, attualmente, oggetto di valutazioni che coinvolgono alcuni aspetti della standardizzazione delle metodiche applicabili per diagnosi, anche ai fini della confrontabilità dei risultati.

Il gruppo di studio della Società Italiana per lo Studio del Fegato ha inteso stilare un documento tecnico che è frutto di numerosi confronti, su metodologie applicate e risultati ottenuti, nei laboratori che da alcuni anni si occupano attivamente della diagnosi dell'infezione da HCV.

Tali confronti si inseriscono in un contesto che, anche a livello internazionale, pone l'accento sulla necessità di valutazioni della qualità dei servizi diagnostici prestati, ai fini della prevenzione e cura delle infezioni virali. Ci si propone, pertanto, di approfondire ulteriormente questo tema, in altre occasioni di incontro, presso l'Istituto Superiore di Sanità, specificamente dedicate all'omogeneizzazione dei protocolli diagnostici dell'infezione da virus dell'epatite C.

Principi generali

Il principio su cui si basano le tecniche di biologia molecolare applicate alla dia-

gnostica delle infezioni virali è rappresentato dall'ibridizzazione molecolare che si fonda sulla proprietà degli acidi nucleici di apparirsi mediante un legame chimico altamente specifico fra sequenze nucleotidiche complementari con la formazione di una doppia elica.

L'innalzamento della temperatura causa la rottura dei ponti idrogeno che tengono unite le due sequenze complementari e libera le singole eliche che possono ricongiungersi (o ibridizzare) non appena la temperatura ritorna ai valori iniziali. La reazione di ibridizzazione fra una molecola di acido nucleico (analita) e la sonda nucleotidica definita "probe" (complementare all'intera sequenza della molecola o a sue porzioni), marcata con radioisotopi o altri traccianti, è altamente specifica.

Nel caso dei virus epatitici la diagnostica molecolare è finalizzata alla ricerca degli acidi nucleici virali nel siero, allo scopo di dimostrare l'eventuale presenza di viremia. La sensibilità delle tecniche di ibridizzazione, limitata a circa 10^5 - 10^6 genomi, risulta sufficiente per la determinazione della viremia in corso di infezione da virus dell'epatite B (HBV) e delta (HDV).

Con l'introduzione della reazione polimerasica a catena (PCR) la sensibilità nella determinazione degli acidi nucleici è aumentata enormemente, permettendo di rilevare anche poche molecole di DNA o RNA. La tecnica sfrutta la proprietà di DNA polimerasi termo-resistenti, quali la "Taq polimerasi" del batterio *Thermophilus aquaticus*, che mantengono la loro attività

enzimatica anche ad elevate temperature. L'enzima catalizza l'amplificazione della porzione di genoma virale compresa fra 2 sequenze oligonucleotidiche che fungono da "primers" e sono complementari a 2 brevi tratti dell'acido nucleico bersaglio. Tale sequenza viene ad essere riprodotta con cinetica esponenziale grazie al fatto che, dopo ogni ciclo, gli stessi prodotti di amplificazione fungono da substrato per i cicli successivi.

Problemi tecnici legati all'esecuzione della PCR

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. E' evidente che quanto più piccolo è il numero di molecole di acido nucleico che si vuole mettere in evidenza e quanto più alto è il livello di sensibilità che si deve raggiungere, tanto maggiori sono i problemi di standardizzazione delle tecniche e, soprattutto, tanto più grave è il rischio di contaminazioni. Infatti, l'enorme numero di molecole generate mediante PCR può facilmente, in modo proporzionale al numero di cicli impiegati e alle 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 diffu-



sione nell'ambiente di materiale biologico contenente le stesse sequenze di acido nucleico che si vogliono amplificare (contaminazione ambientale).

Non vasottovalutato, d'altra parte, il problema di *risultati falsi negativi* dovuti all'utilizzo di protocolli non adeguati o a una scorretta esecuzione del test. Particolare importanza rivestono la preparazione e conservazione del campione, il metodo di estrazione dell'acido nucleico, la scelta dei "primers" e delle condizioni ottimali per il loro specifico utilizzo, le modalità di rivelazione dei prodotti di amplificazione in relazione al tipo di protocollo utilizzato. 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 un'attenta e rigorosa osservanza delle regole necessarie a garantire risultati ripetibili e confrontabili (Appendice 1).

Significato della ricerca dell'HCV-RNA mediante PCR nella pratica clinica

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 è di per sé una prova assoluta della respon-

sabilità 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.

In tale contesto, la determinazione dell'HCV-RNA non fornisce solitamente alcun elemento aggiuntivo per la definizione di epatite cronica da HCV e la gestione del paziente (screening familiare, tempi del monitoraggio e scelte terapeutiche). L'eventuale negatività dell'HCV-RNA in un paziente con epatite cronica anti-HCV positiva, reperto peraltro non frequente e legato verosimilmente a livelli

5

Tabella 1. - Determinazione HCV-RNA: attuali indicazioni

A. Pazienti anti-HCV negativi

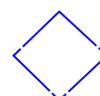
1. *Immunocompromessi con transaminasi elevate ed esclusione di altre cause note di epatopatia*: in tali soggetti la comparsa di anti-HCV può essere ritardata o assente; pertanto, la dimostrazione diretta dell'acido nucleico può costituire l'unico strumento diagnostico per evidenziare l'infezione virale, 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 test 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. *Trattati con interferone con transaminasi costantemente normali per oltre un anno dopo il completamento della terapia*: il risultato del test consente di valutare se oltre alla remissione biochimica si è anche ottenuta la negativizzazione della viremia.

C. Soggetti con profilo sierologico dubbio

1. *Positività di tipo "indeterminato" con i test di "immunoblotting"* (positività isolate per anticorpi diretti contro un singolo antigene).
2. *Risultati discordanti ai test ELISA*.



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 della patologia associata in alcune categorie di pazienti *anti-HCV negativi* (immuno-compromessi con transaminasi elevate ed esclusione di altre cause note di epatopatia; pazienti con crioglobulinemia mista; pazienti con epatite acuta ad etiologia sconosciuta) o per la gestione di *particolari situazioni cliniche in pazienti anti-HCV positivi* (pazienti con transaminasi persistentemente normali, figli di madre con infezione da HCV) (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, anche se il risultato non influenza sostanzialmente le decisioni cliniche. La positività dell'HCV-RNA non rappresenta un criterio per la diagnosi etiologica differenziale tra epatiti croniche da HCV e epatiti croniche di tipo autoimmune in caso di *positività associata di anticorpi anti-HCV e autoanticorpi non-organo specifici*. Infine, ancora oggetto di discussione sono gli schemi da adottare per il monitoraggio della viremia HCV nelle *fasi pre- e post-trapianto di fegato*; problema questo, comunque, riservato ai centri specialistici interessati.

Il significato e l'utilità della determinazione della viremia HCV mediante PCR qualitativa nei *pazienti con epatite cronica da HCV sottoposti a terapia con interferone* resta ancora da definire. Allo stato at-

tuale delle conoscenze si può affermare che non vi è correlazione assoluta tra risposta al trattamento in termini biochimici e negativizzazione dell'HCV-RNA sierico. D'altro canto, un risultato negativo della PCR non permette di prevedere l'evoluzione ulteriore dell'attività di malattia nei pazienti che rispondono al trattamento, anche se la persistente negativizzazione dell'HCV-RNA (12°-24° mese post-trattamento) si accompagna di solito ad una evoluzione favorevole della malattia.

La determinazione della viremia può risultare utile anche nei *soggetti con profilo sierologico dubbio* per identificare coloro che presentano replicazione virale in atto.

L'introduzione e la validazione di metodiche addizionali per la *determinazione quantitativa della viremia* (Appendice 2) e la *caratterizzazione del genotipo virale infettante* (Appendice 3), rappresentano obiettivi importanti che potranno concorrere al miglioramento delle nostre conoscenze sull'infezione da HCV.

La possibilità di *quantificare i livelli di viremia* potrebbe permettere: a) di definire sottogruppi di pazienti che differiscono per la storia naturale della malattia o per la sensibilità al trattamento antivirale; b) di monitorare l'efficacia del trattamento con interferone e, possibilmente, di ottimizzarlo nel singolo paziente. Tuttavia, anche se numerose osservazioni suggeriscono che elevati livelli di viremia siano statisticamente associati ad una minore risposta al trattamento con interferone, la scarsa disponibilità di tecniche adeguatamente standardizzate e/o comparabili per la loro sensibilità (Appendice 2) costituisce un notevole limite per la valutazio-

ne dei risultati e la diffusione della quantificazione dell'HCV-RNA. *Prima di procedere ad un uso allargato di tali metodiche è auspicabile una loro utilizzazione nello studio di casistiche selezionate, al fine di precisarne le possibili applicazioni.*

Per quanto riguarda la *caratterizzazione del genotipo virale infettante*, pur persistendo una notevole eterogeneità nelle metodiche utilizzate (Appendice 3), numerosi studi indicano l'esistenza di una buona correlazione tra risposta al trattamento e genotipo. Attualmente non vi sono, invece, indicazioni sufficienti per ritenere utile la determinazione del genotipo ai fini della diagnosi e della valutazione della prognosi della malattia epatica o del grado di infettività del paziente.

E' opportuno sottolineare come la correlazione fra livelli di viremia, genotipo virale e risposta terapeutica derivi per il momento da studi per lo più retrospettivi su popolazioni più o meno ampie di pazienti e necessiti di ulteriori conferme. Né la determinazione del genotipo, né la viremia quantitativa possono essere considerati oggi gli unici criteri predittivi nel singolo paziente e non devono essere utilizzati, quindi, per modificare la decisione di indirizzare o meno un paziente con epatite cronica di tipo C alla terapia o l'adozione di uno schema terapeutico piuttosto di un altro. Tuttavia, sia la valutazione della viremia quantitativa sia la determinazione del genotipo virale rappresentano validi candidati ad entrare in studi prospettici volti ad identificare indici predittivi di risposta.



Appendice 1

Regole da adottare nell'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 retrotrascrizione
- preparazione del mix di PCR

Strumentazione:

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

NB: In quest'area l'operatore dovrà sempre indossare un camice apposito.

Area 2

Attività PCR:

- estrazione dei campioni
- innesco delle reazioni di retrotrascrizione
- dispensazione del DNA o del cDNA nel mix di reazione PCR

Strumentazione:

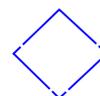
- cappa chimica
- centrifuga refrigerata per tubi "eppendorf"
- blocco termostato
- bagno termostato
- vortex
- set di pipette

NB: E' opportuno utilizzare set di pipette distinti per tali procedure.

Area 3

Attività PCR:

- amplificazione dei campioni



- innesco 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'innesco 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 nelle aree 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 pressoché inevitabilmente contaminato da aerosol contenenti DNA con conseguente cross-contaminazione. A scopo preventivo possono essere utilizzate *pipette a spazzamento 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:

1) 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);

2) riporre sempre il materiale da utilizzare (puntali, tubi "eppendorf", tubi per amplificazione, ecc.) in contenitori a chiusura ermetica ed autoclavabili o comunque in spazi chiusi per evitare l'esposizione alla polvere;

3) 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 termostati, contenitori per il ghiaccio, le superfici esterne dei frigoriferi, le maniglie delle porte, ecc.) 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*.

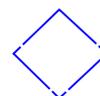
m) Organizzare la pulizia del laboratorio (ad eccezione di banconi e apparecchiature di pertinenza dell'operatore) al fine di evitare che questa possa divenire fonte ed occasione di diffusione degli amplificati.

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 l'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.



Appendice 2

Determinazione quantitativa dell'HCV-RNA

Metodologia

Le tecniche attualmente disponibili, se adeguatamente utilizzate, possono permettere la quantificazione dei livelli viremici di HCV. A seconda della tecnica utilizzata e della sua sensibilità, variano i range di viremia nell'ambito dei quali la metodica è adeguata per linearità e riproducibilità dei risultati. Ne consegue che tecniche differenti possono essere non completamente confrontabili e non dare risultati sovrapponibili. Inoltre, l'elevata eterogeneità del genoma di HCV può influenzare le tecniche di quantificazione in quanto l'efficienza di amplificazione può variare a seconda del genotipo virale infettante. In futuro sarà importante raggiungere un'adeguata standardizzazione delle metodiche mediante l'utilizzo di pannelli che comprendano i diversi genotipi virali.

Le tecniche più utilizzate per la quantificazione dell'HCV-RNA sono basate sull'amplificazione del substrato (PCR quantitativa) o sull'amplificazione del segnale (bDNA).

1) *Amplificazione del substrato (PCR quantitativa)*. I punti essenziali da considerare per ottenere la standardizzazione di una tecnica di PCR quantitativa sono: i) la *preparazione dell'acido nucleico* e ii) il *processo di amplificazione* vero e proprio.

i) La *preparazione dell'acido nucleico* (estrazione) costituisce una fase particolarmente delicata, in quanto nessuna delle numerose tecniche disponibili attualmente garantisce un'assoluta riproducibilità dell'efficienza di estrazione.

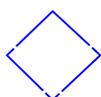
ii) Dal momento che l'*amplificazione* è, almeno nella sua fase iniziale, un processo esponenziale, ogni piccola variazione a livello di una delle variabili influenzanti il processo (concentrazione dei "primers", della polimerasi, dei dNTP; numero e lunghezza dei cicli) può condizionare la quantità di prodotto finale. Ai fini di superare questo limite e rendere possibile una standardizzazione del processo è stato introdotto l'utilizzo di un controllo interno nella fase di estrazione e in quella di amplificazione.

Per *controllo interno* si intende una sequenza nucleotidica omologa alla sequenza in esame nelle porzioni esterne che vengono riconosciute dai "primers", ma differente nella porzione interna per la presenza di un sito di restrizione, di un'inserzione, di una delezione, o di variazioni di sequenza che possano essere discriminate mediante ibridazione con una sonda specifica. In questo modo i prodotti di amplificazione derivati dalla sequenza bersaglio e dal controllo interno possono essere distinti mediante elettroforesi su gel, preceduta o meno da digestione con l'enzima di restrizione che permette di differenziare bersaglio e controllo, oppure mediante ibridazione differenziale con sonde specifiche.

Come *controllo esterno* si utilizzano generalmente diluizioni scalari di quantità note della sequenza bersaglio dell'amplificazione.

Le modalità più frequentemente utilizzate per la quantificazione mediante PCR sono: a) l'utilizzo di un *controllo interno in concentrazioni scalari (PCR competitiva)*; b) l'utilizzo di un *controllo interno in quantità costante*, come controllo di estrazione e di efficienza di amplificazione; c) l'utilizzo di un *controllo esterno* per la costruzione di una curva di riferimento.

a) Nella *PCR competitiva* la sequenza in esame viene amplificata insieme ad una sequenza nucleotidica che funge da controllo interno e che possiede elevata omologia con la sequenza in esame. Nella reazione di co-amplificazione si avrà competizione fra sequenza bersaglio e controllo interno: utilizzando concentrazioni scalari note del controllo interno (ciascuna amplificata separatamente con il campione in esame) sarà possibile identificare la quantità dell'acido nucleico presente nel campione. Questa corrisponderà alla quantità di controllo interno che verrà amplificata in modo equivalente al campione in esame.



Con questa metodica il numero di cicli utilizzati per l'amplificazione non è più critico per garantire la quantizzazione del campione. Tuttavia, il principale fattore che limita un esteso utilizzo di tale tecnica è la necessità di amplificare ogni campione con più diluizioni del controllo interno, aumentando il numero di reazioni che devono essere eseguite per ottenere una singola quantizzazione, con rilevanti ripercussioni in termini di costi ed aumento del rischio di contaminazione.

b) Nel *controllo di estrazione-amplificazione* il controllo interno viene utilizzato ad un'unica concentrazione costante, creando condizioni di amplificazione a livello delle quali non si genera competizione fra sequenza in esame e controllo interno.

Diluizioni scalari del prodotto di amplificazione ottenuto (contenente sia sequenze del campione che del controllo), ibridizzato con sonde specifiche per ciascuna delle due molecole, permetteranno di estrapolare la quantità di sequenze virali presenti nel campione.

c) L'impiego di un *controllo esterno* consente una *valutazione semiquantitativa* delle sequenze virali presenti nel campione. Infatti, questa metodologia non permette di verificare l'efficienza di estrazione e di amplificazione, ma si limita a confrontare i risultati dell'amplificazione del campione in esame con una curva di riferimento, costituita da diluizioni di una quantità nota di standard sottoposte ai medesimi cicli di PCR. In tal caso l'amplificazione dovrà essere mantenuta nella fase esponenziale attraverso una limitazione del numero dei cicli ed evitando di utilizzare una "nested" PCR. Ai fini di garantire un'adeguata sensibilità si procederà alla rivelazione del prodotto di amplificazione grazie ad ibridizzazione con sonda marcata.

Il risultato ottenuto non consente una vera quantificazione, ma la definizione del range viremico presente nel campione. E' possibile raggiungere una soddisfacente riproducibilità della metodica all'interno del singolo laboratorio, pur restando difficile la sua standardizzazione fra laboratori diversi.

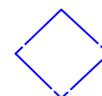
2) *Amplificazione del segnale (bDNA)*. La tecnica di amplificazione del segnale proposta per l'HCV utilizza una molecola sintetica di *DNA ramificato* (branched DNA, bDNA) che permette di aumentare enormemente il numero di siti di legame riconosciuti dal sistema enzimatico di rivelazione. Le sequenze virali presenti nel campione non sono sottoposte ad amplificazione enzimatica ma sono fissate ad un supporto solido sfruttando la loro capacità di ibridizzare con una prima sonda HCV-specifica. L'ibridizzazione successiva con una sequenza virale incorporata all'interno del bDNA permette la rivelazione enzimatica della reazione stessa.

In tale tecnologia la fase di *purificazione dell'acido nucleico* è relativamente *semplice* e garantisce una soddisfacente ripetibilità. Inoltre, il principio su cui si basa il bDNA rende piuttosto *modesto il rischio di contaminazioni*.

Il principale limite al suo utilizzo in ambito clinico è il livello di sensibilità che non va al di sotto delle 10^4 - 10^5 molecole. La tecnica attualmente disponibile per la quantizzazione dell'HCV-RNA è in grado di evidenziare fino a 350,000 molecole/ml. Tuttavia, il test risulta meno sensibile quando il virus infettante è di genotipo 2 o 3, risultando in questo caso necessario moltiplicare i valori di viremia ottenuti per un fattore di correzione. Per i livelli viremici compresi fra 10^5 - 10^7 molecole/ml la capacità di quantizzazione è lineare e la ripetibilità buona. Un risultato negativo non potrà quindi escludere la presenza di HCV-RNA che andrà ricercato con una tecnica più sensibile.

Significato clinico

Numerosi studi suggeriscono che bassi livelli di viremia prima del trattamento sono statisticamente associati ad una migliore risposta all'interferone. Tuttavia, in considerazione della scarsa disponibilità di tecniche standardizzate e/o comparabili per la quantificazione dei livelli di viremia, non è possibile trarre conclusioni definitive e suggerirne un uso clinico allargato.



Appendice 3

I genotipi di 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. La divergenza è maggiore nelle regioni variabili ma si riflette anche sulle sequenze altamente conservate. 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%.

Inizialmente, l'esistenza di queste diverse forme virali è stata descritta da diversi gruppi di ricerca, ciascuno dei quali aveva attribuito una propria nomenclatura (vedi Tabella). Il Gruppo internazionale che ha riunito esponenti di tutti i gruppi di ricerca ha recentemente elaborato una proposta unitaria che prevede l'adozione della classificazione proposta da Simmonds, nella quale i vari isolati vengono raggruppati in base alla distanza filogenetica.

Metodologia

Dal punto di vista metodologico esistono vari sistemi che possono essere utilizzati per definire il genotipo virale. E' stato dimostrato che 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.

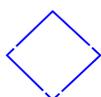
Va ricordato che più una regione è conservata, più facilmente essa risulta amplificabile; tuttavia, un eccessivo livello di conservazione potrebbe rendere impossibile distinguere i sottotipi virali. Alla luce di queste considerazioni, le regioni "core", NS5 ed E1 si sono dimostrate adeguate per la caratterizzazione genotipica e la distinzione dei rispettivi sottotipi virali fino ad ora noti. Tuttavia, l'analisi della regione 5' non codificante (5' NCR), pur non permettendo una definizione attendibile dei sottotipi, può essere utile per l'identificazione dei principali genotipi e garantire un'ottima sensibilità del protocollo di amplificazione.

L'analisi di sequenza, sia dopo clonazione che diretta, 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.

5

Classificazione del genotipo di HCV secondo Simmonds, in confronto alle nomenclature precedentemente proposte

Simmonds	Enomoto	Okamoto	Chiron	Tisminetzki
1a	K-PT	I	I	1
1b	K-1	II	II	1
1c	nc	nc	nc	nc
2a	K-2a	III	III	2
2b	K-2b	IV	III	2
2c	nc	nc	III	nc
3a	nc	V	IV	3
3b	nc	VI	IV	nc
4	nc	nc	nc	nc
5a	nc	nc	V	nc
6a	nc	nc	nc	nc



1) *Amplificazione con "primers" tipo-specifici.* Questo sistema, proposto inizialmente da Okamoto, prevede una prima amplificazione della regione "core" con "primers" universalmente validi e una seconda con "primers" tipo-specifici, disegnati in modo che i prodotti amplificati diano origine a frammenti di ampiezza diversa per ciascun genotipo, visualizzabili mediante corsa elettroforetica.

Questo metodo ha portato a un frequente riscontro di infezioni con più genotipi a causa di cross-reazioni; tale problema è stato in gran parte risolto più di recente con l'utilizzo di nuovi set di "primers" tipo-specifici.

2) *Digestione con endonucleasi di restrizione e studio del polimorfismo dei frammenti di restrizione (RFLP).* Gli amplificati vengono digeriti con enzimi di restrizione e la visualizzazione dei prodotti avviene mediante elettroforesi su gel. I genotipi vengono identificati in base alla mappa genomica. Talora sono richieste più digestioni con diversi enzimi per differenziare i singoli genotipi, se esistono siti di riconoscimento comuni.

3) *Ibridizzazione con sonde genotipo-specifiche.* Si basa sull'ibridizzazione degli amplificati con sonde genotipo-specifiche, marcate o, alternativamente, adese alla fase solida; in quest'ultimo caso gli amplificati dovranno essere visualizzati con traccianti radioattivi o non radioattivi. E' adatto come test di screening, specie se è studiata la regione 5'NCR.

4) *Valutazione del sierotipo virale.* A differenza degli altri metodi che caratterizzano direttamente la sequenza nucleotidica virale, la valutazione del sierotipo si basa sullo studio della risposta anticorpale tipo-specifica diretta contro le sequenze aminoacidiche della regione NS4 e della regione "core" di HCV. Tale approccio rende possibile, quindi, l'identificazione del tipo virale anche in soggetti con livelli bassi o indosabili di virus (ciò può avere rilevanza, ad esempio, in studi epidemiologici), ma non permette di distinguere una risposta anticorpale anamnesticca da una dovuta ad infezione in corso. Un vantaggio tecnico è quello di non utilizzare metodiche di biologia molecolare e di richiedere esclusivamente l'equipaggiamento per tecniche immunometriche. Va sottolineato, infine, come l'efficienza del metodo appaia relativamente più bassa rispetto alla tipizzazione molecolare.

Distribuzione epidemiologica

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 negli Stati Uniti. Nel bacino mediterraneo è di frequente riscontro l'infezione da sottotipo 1b, seguita dal genotipo 2. In Oriente prevale l'infezione da tipo 1 (sottotipo 1b) e da tipo 2, mentre il tipo 3 è stato descritto in particolare in Thailandia e Singapore. L'infezione dovuta al tipo 4 è caratteristicamente presente in Egitto e nel Medio Oriente, mentre i tipi 5 e 6 sono stati identificati rispettivamente in Sud Africa e ad Honk Kong. Studi retrospettivi e prospettici 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.

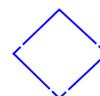
Significato clinico

Numerosi studi sono stati condotti in paesi occidentali e orientali, descrivendo come l'infezione da tipo 1b si associ più frequentemente a forme gravi di malattia quali la cirrosi e 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.

Sono di recente emerse segnalazioni che il genotipo 2 prevale nei soggetti asintomatici con transaminasi normali; tuttavia, queste osservazioni necessitano di ulteriori conferme.

Nelle nostre aree geografiche l'infezione da genotipo 3 è caratteristica dei pazienti giovani, spesso con un'anamnesi positiva per uso di sostanze stupefacenti.

Per quanto riguarda la risposta alla terapia con interferone, i dati finora disponibili sembrano indicare una maggiore responsività a lungo termine del genotipo 3 (> 70%), seguito dal genotipo 2 (circa 50%), mentre l'infezione da genotipo 1 sarebbe più resistente al trattamento. A conferma di una diversa sensibilità all'interferone dei differenti genotipi è stata suggerita anche una dose-dipendenza dell'efficacia terapeutica a seconda del tipo di virus infettante.



Bibliografia essenziale

Principi generali della PCR:

- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, **155**: 335-350.

Problemi tecnici:

- *PCR protocols. A guide to methods and applications.* (1990). Edited by M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White. San Diego (Ca, USA), Academic Press. 482 p.

- White, T.J., Madej, R., Persing, D.H. (1992). The polymerase chain reaction: clinical applications. *Adv. Clin. Chem.*, **29**: 161-196.

Significato nella pratica clinica:

- Brechot, C. (1993). Polymerase chain reaction for the diagnosis of hepatitis B and C viral hepatitis. *J. Hepatol.*, **17** (Suppl. 3): S35-S41.

Metodiche di determinazione quantitativa dell'HCV-RNA:

- Clementi, M., Menzo, S., Bagnarelli, P., Manzin, A., Valza, A., Valdo, P.E. (1993). Quantitative PCR and RT-PCR in virology. *PCR Methods and Applications*, **2**: 191-196.

- Sninsky, J.J., Kwok, S. (1993). The application of quantitative polymerase chain reaction to therapeutic monitoring. *AIDS*, **7** (Suppl. 2): 529-534.

- Davis, G.L., Lau, J.Y.N., Urdea, M.S., Neuwald, P.D., Wilber, J.C., Lindsay, K., Perrillo, R.P., Albrecht, J. (1994). Quantitative detection of hepatitis C virus RNA with a solid-phase signal amplification method: definition of optimal conditions for specimen collection and clinical application in interferon-treated patients. *Hepatology*, **19**: 1337-1341.

- Lau, J.Y.N., Simmonds, P., Urdea, M.S. (1995). Implications of variations of conserved regions of hepatitis genome. *Lancet*, **346**: 425-426.

Genotipi:

- Simmonds, P., Alberti, A., Alter, H.J. (1994). A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*, **19**: 1321-1324.

- Simmonds, P. (1995). Variability of hepatitis C virus. *Hepatology*, **21**: 570-583.

Genotipi e viremia come fattori predittivi:

- Davis, G.L. (1994). Prediction of response to interferon treatment of chronic hepatitis C. *J. Hepatol.*, **21**: 1-3.



Si ringraziano per il loro contributo:

P. Almasio, M. Bernardi, L. Bolondi, L. Capocaccia, N. Caporaso, M. Chiaramonte, A. Craxi, 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, O. Riggio, M. Toti, G. Verme

