

Effetto della manipolazione e della conservazione dei campioni ematici sulla stabilità di HBV-DNA, HCV-RNA e HIV-RNA. Impatto nel procedimento di qualificazione biologica delle unità ematiche

G. Gessoni¹, P. Barin², E. Orlandini¹, C. Di Natale², S. Valverde¹,
A. Giacomini¹, N. Arreghini², G. De Fusco², M. Fezzi², C. Rossi², F. Antico¹,
F. Manoni¹, P. Legovini³, G. Marchiori²

¹Regione Veneto, A-ULS 14 "Chioggia" Dipartimento di Patologia Clinica

²Regione Veneto, A-ULS 12 "Veneziana" Servizio Trasfusionale

³Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Matematica

Premesse: In ambito trasfusionale l'introduzione dei test in biologia molecolare (NAT) per la ricerca di HBV-DNA, HCV-RNA e HIV-RNA nei processi di qualificazione biologica delle unità ematiche presenta alcune criticità. In primo luogo l'opportunità di operare su mini-pool, in secondo luogo la necessità di conservare i campioni a +4 °C. Gli autori hanno quindi cercato di valutare l'impatto di queste condizioni sull'operatività dei test NAT in ambito trasfusionale.

Metodi: Sono stati valutati i seguenti parametri: distribuzione del viral-load in soggetti non trattati, stabilità degli acidi nucleici alla conservazione a +4 °C, stabilità degli acidi nucleici sottoposti a ripetuti cicli di congelamento e scongelamento, robustezza del test alla cross-contaminazione, definizione del detection-limit al 90%. I test quantitativi sono stati condotti utilizzando i kit Cobas Amplicor HBV Monitor, Cobas Amplicor HCV Monitor, Cobas Amplicor HIV Monitor; i test qualitativi sono stati condotti utilizzando i kit Ampliscreen HBV, Ampliscreen HCV 2.0, Ampliscreen HIV 1.5, tutti prodotti dalla ditta Roche.

Risultati: La distribuzione dei valori di viremia in

soggetti non in terapia è risultata assai ampia e con valori in accordo con quanto atteso. HBV si è dimostrato assai stabile alla conservazione a +4 °C anche sino a 168 ore, mentre per HCV e HIV si osservava un calo del viral-load più marcato. Per tutti e tre i virus la conservazione a +4 °C fino a 72 ore non sembra comportare significative cadute nella viremia. Notevoli diminuzioni del viral-load si sono osservate dopo cinque rapidi cicli di congelamento e scongelamento. Tutti i test si sono dimostrati assai robusti alla cross-contaminazione. Il detection-limit è stato individuato a 8 U/mL per HBV, 21 U/mL per HCV e 27 copie/mL per HIV.

Conclusioni: Le modalità di manipolazione e conservazione dei campioni comunemente adottate nelle strutture trasfusionali sono compatibili con l'introduzione dei test NAT nel procedimento di qualificazione biologica delle unità ematiche. I campioni di sangue intero in EDTA possono essere conservati sino a 72 ore a +4 °C. I test attualmente disponibili si sono dimostrati resistenti alla cross contaminazione. Il detection limit al 90%, nella nostra esperienza si è situato a 8 U7MI per HBV-DNA, 21 u/mL per HCV-RNA e 27 copie/mL per HIV-RNA

Background: *Effects of handling and storage of blood samples on the stability of HBV-DNA, HCV-RNA and HIV-RNA. Impact on the procedures of biological qualification of blood units*

The introduction of nucleic amplification techniques (NAT) for HBV-DNA, HCV-RNA and HIV-RNA in the biological qualification of blood units poses some problems. First, the opportunity to operate on

mini-pools, and second, the need of sample storage at +4 °C. The aim of this study was to evaluate the critical aspects related to the introduction of NAT testing in a transfusional setting.

Methods: The following parameters were evaluated: distribution of viral-load in untreated subjects, stability of nucleic acids during storage at +4 °C, stability of nucleic acids after repeated cycles of freez-

ing and defrosting, robustness to cross-contamination, definition of the detection-limit (90%). Quantitative tests were performed by using the Cobas Amplicor HBV Monitor, Cobas Amplicor HCV Monitor, and Cobas Amplicor HIV Monitor kits, and the qualitative tests using the Ampliscreen HBV, Ampliscreen HCV 2.0 and Ampliscreen HIV 1,5 kits. All kits were supplied by Roche Molecular System (Branchburg, NJ).

Results: Viral load in untreated subjects showed wide variation for HBV, HCV and HIV. HBV demonstrated a higher stability to storage at +4 °C up to 168 hours, while for HCV and HIV a higher decrease in viral-load was observed. For all three viruses, storage at +4 °C up to 72 hours did not seem to cause a meaningful fall in viral-load.

Introduzione

L'introduzione dei test d'amplificazione degli acidi nucleici (NAT test) nelle procedure di qualificazione biologica delle unità ematiche trova il suo razionale nell'opportunità di ridurre ulteriormente il rischio di trasmettere un'infezione da HBV, HCV o HIV per via trasfusionale. Infatti gran parte del rischio residuo è attribuibile alla possibilità di trasfondere un'unità prelevata da un donatore in fase di finestra sierologica, ricoprendo gli errori di laboratorio le varianti virali e le sier conversionsi atipiche, un ruolo del tutto marginale¹.

Attualmente la normativa Italiana impone lo screening per HCV-RNA su tutte le unità raccolte a scopo trasfusionale, tale screening deve essere effettuato utilizzando uno dei due test registrati dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS)².

Il test Roche utilizza una metodica in polymerase chain reaction (PCR) su mini-pool formati da un massimo di 24 campioni. Il test Chiron utilizza una metodica su singolo campione basata su un differente processo chiamato Transmission Mediated Amplification (TMA). Entrambi i test prevedono l'uso di controlli positivi e negativi nonché l'utilizzo di un controllo interno, aggiunto in ogni tubo (in singolo o mini-pool) consistente in una sequenza di acido nucleico che viene amplificata con le sequenze bersaglio. Questo accorgimento permette di valutare, per ogni singolo tubo, la specificità del risultato negativo³. Per entrambi i metodi è disponibile, oltre a quello per HCV-RNA, anche il test per la ricerca di HIV-1 RNA, mentre il test per la rilevazione di HBV-DNA è in fase di valutazione.

Nel caso si ritenesse opportuna l'introduzione di questi due test aggiuntivi sarà necessario considerare come, utilizzando la metodica PCR Roche, dopo una fase comune che comprenderà le operazioni di pooling (automatizzata), arricchimento mediante ul-

Remarkable lessening of the viral-load was observed after five cycles of freezing and defrosting. All tests showed a good robustness to cross-contamination. The detection-limit (90%) was 8 U/mL for HBV, 21 U/mL for HCV and 27 copies/mL for HIV.

Conclusions: Procedures usually adopted in the transfusional setting in handling and storage of blood samples, fit for application of NAT testing. EDTA-anticoagulated whole blood samples may be stored up to 72 hours to +4 °C. The tests showed a good robustness to cross-contamination. In our experience NAT tests for biological qualification of blood units have a low detection-limit (90%): 8 U/mL for HBV, 21 U/mL for HCV and 27 copies/mL for HIV-1.

tra centrifugazione ed estrazione (manuale) comune a HBV, HCV ed HIV-1 si dovrà procedere alle fasi di amplificazione e di rilevazione automatizzate e separate per ciascuno dei tre virus. Nel caso il laboratorio abbia adottato la metodica TMA Chiron, che prevede una fase di aggiunta dei reattivi automatizzata e una fase di amplificazione e di rilevazione manuali, non si avranno modificazioni di rilievo nella procedura operativa ma si otterrà un risultato unico per tutti e tre i virus testati.

La scelta del nostro laboratorio è stata quella di adottare la metodologia in PCR visto che avevamo maturato una discreta esperienza con questa metodica nella diagnostica infettivologica. Questa scelta non è stata scervra dalla necessità di effettuare alcune considerazioni preliminari. L'approccio del laboratorio di biologia molecolare è assai differente se si tratta di effettuare test su pazienti o finalizzati alla qualificazione biologica delle unità ematiche. Nel primo caso si lavora su campioni singoli che vengono rapidamente inviati al laboratorio ove, se il test non viene eseguito in tempi brevi, si provvederà a separare il plasma, aliquotarlo, conservarlo a -80 °C. Nel secondo caso si lavora su mini-pool composti da un numero variabile di campioni (sino a 24) che vengono raccolti in sedi anche assai distanti dal laboratorio ove giungono spesso parecchie ore dopo il prelievo. Al laboratorio afferiscono moltissimi campioni, per cui nel caso il test non venga eseguito immediatamente, non è ipotizzabile procedere alla separazione dei campioni e all'allestimento di aliquote da congelare.

Abbiamo quindi ritenuto indispensabile, prima dell'introduzione di questi test, effettuare alcune valutazioni tese ad analizzare alcuni aspetti in cui avevamo ritenuto di poter identificare delle criticità. In primo luogo la distribuzione della viremia in soggetti non in terapia antivirale, in secondo luogo la stabilità degli acidi nucleici alla conservazione a +4 °C o di fronte a ripetuti cicli di congelamento e scongelamento.

mento. Per finire abbiamo ritenuto opportuno valutare la performance analitica del nostro laboratorio nell'utilizzo dei test abilitati ad essere usati nella qualificazione biologica delle unità ematiche.

Materiali e Metodi

Valutazione della distribuzione della viremia in soggetti non in terapia.

Al fine di valutare la distribuzione dei valori di viremia in soggetti non trattati abbiamo valutato 28 pazienti positivi per HBV-DNA con infezione cronica (solo 2 HBeAg positivi e 3 HBsAg negativi); 110 pazienti positivi per HCV-RNA, con infezione cronica, tutti anti-HCV positivi; 25 pazienti con infezione da HIV-1, tutti anti-HIV positivi. La determinazione quantitativa della viremia è stata effettuata come descritto di seguito.

Valutazione della stabilità degli acidi nucleici alla conservazione a +4 °C.

Sei campioni di sangue intero anticoagulato con EDTA raccolto in provette sottovuoto senza separatore sono stati conservati a +4 °C. Dei campioni di plasma sono stati prelevati al tempo 0, dopo 24, 48, 72 e 168 ore di conservazione per HCV-RNA ed HIV-RNA; al tempo 0, dopo 24, 72 e 168 ore per HBV-DNA. Tali aliquote sono state conservate in provette sterili "RNAsi free" a -80 °C sino al momento di effettuare i dosaggi. La stabilità degli acidi nucleici è stata valutata mediante dosaggio quantitativo degli stessi come descritto di seguito.

Valutazione della stabilità degli acidi nucleici ai cambiamenti di stato.

Per ciascuno dei tre virus presi in esame, HBV, HCV e HIV-1, una aliquota dei sei campioni considerati in precedenza è stata congelata a -80 °C e scongelata in un termostato ad acqua a +37 °C e quindi ricongelata. Il procedimento è stato ripetuto per cinque volte in rapida successione. La stabilità degli acidi nucleici è stata valutata mediante dosaggio quantitativo degli stessi come descritto di seguito.

Valutazione della robustezza alla cross contaminazione.

Questa fase dello studio è stata condotta utilizzando uno schema a campioni alternati con un positivo ad alto titolo in tutti i pozzetti dispari e un controllo negativo in tutti i pozzetti pari. Sono stati valutati 12 campioni positivi e 12 campioni negativi per HBV e HIV-1, mentre per HCV sono stati considerati 24 campioni positivi e 24 negativi. Come campione negativo è stato utilizzato il plasma umano normale (NHP) fornito dalla ditta Roche⁴. Come campioni positivi abbiamo utilizzato i seguenti sieri: per HBV il siero di controllo BBI Accurun A 325-5773, viral-load di 7 log (Boston Biomedica, West Bridgewater,

MA); per HCV lo standard HCV-HC, viral-load 4 log fornito dal Laboratorio di Immunologia dell'ISS; per HIV-1 il siero di controllo BBI Accurun A 305-400, viral-load 5 log (Boston Biomedica).

Valutazione del detection-limit.

Per ciascuno dei tre virus presi in esame abbiamo utilizzato un siero con concentrazione certificata di acidi nucleici; diluendo opportunamente tali sieri in NHP abbiamo ottenuto una soluzione di lavoro con un viral-load di 3 log. In una prima fase a partire da questa soluzione di lavoro abbiamo effettuato delle diluizioni logaritmiche con un viral-load di 3 log, 2 log, 1 log, 0 log; ciascuno di questi punti è stato testato in triplicato al fine di valutare l'ambito logaritmico di negativizzazione del test. Una volta individuato l'ambito logaritmico di negativizzazione dei test si è proceduto ad una diluizione a fattore 2 al fine di ottenere una valutazione accurata del detection-limit; in questo caso ciascun punto è stato testato in quattro serie in triplicato, disponendo alla fine di 12 determinazioni per ciascun punto considerato⁴. I sieri utilizzati sono stati i seguenti: standard HBV 0501 (viral load 3.699 espresso in U/mL) per HBV-DNA fornito dal Laboratorio di Immunologia dell'ISS; standard HCV 0498 (viral load 3.2304 espresso in U/mL) per HCV-RNA fornito dal Laboratorio di Immunologia dell'ISS; siero Accurun BBI A315-300 (viral-load 3.6021 espresso in copie/mL) (Boston Biomedica).

Metodi di dosaggio.

In una prima fase abbiamo effettuato una valutazione quantitativa degli acidi nucleici che è stata condotta utilizzando metodiche commerciali fornite dalla ditta Roche (Roche Molecular Diagnostics, Branchburg, NJ): Cobas Amplicor Monitor HBV per il dosaggio di HBV-DNA; Cobas Amplicor Monitor HCV per il dosaggio di HCV-RNA e Cobas Amplicor Monitor HIV1 per il dosaggio di HIV-1 RNA.

Tutte queste metodiche sono state effettuate seguendo le specifiche del produttore; tutti i campioni sono stati sottoposti ad una fase di estrazione manuale seguita da una fase di amplificazione-rivelazione automatizzata su strumentazione dedicata (Cobas Amplicor - Roche). Nel caso in cui il viral-load avesse ecceduto la linearità del metodo si procedeva ad una nuova determinazione su campione dopo adeguata diluizione (3 log per HCV e HIV, 4 log per HBV)⁵⁻⁷.

In una seconda fase abbiamo valutato la performance ottenuta nel nostro laboratorio utilizzando i kit messi a disposizione dalla ditta Roche per essere utilizzati nella qualificazione biologica delle unità ematiche: Cobas Ampliscreen HBV, Cobas Ampliscreen HCV 2.0 e Cobas Ampliscreen HIV-1 1.5.

Tutte queste metodiche sono state effettuate seguendo le specifiche del produttore, tutti i campioni sono stati allestiti in aliquote da 1 mL simulando un mini-pool, sottoposti ad ultra centrifugazione di una ora

seguita da una fase di estrazione manuale seguita da una fase di amplificazione e rivelazione automatizzata su strumentazione dedicata (Cobas Amplicor).

Valutazione dei risultati.

Abbiamo considerato come significativa una diminuzione del viral-load pari a 0.3 unità logaritmiche pari ad una dimezzamento della viremia⁸⁻¹⁰.

Per la valutazione del detection limit abbiamo utiliz-

zati il metodo dei Probit al fine di valutare quale fosse la minima concentrazione di acido nucleico rilevabile nel 90% delle sedute analitiche¹¹⁻¹².

Risultati

Valutazione della distribuzione della viremia in soggetti non in terapia.

Per HBV il viral-load era compreso tra 3.468 e 7.534 log, con una media di 6.604 log. Per HCV il viral-load era compreso tra 4.079 e 7.398 log, con una media di 6.255 log. Per HIV-1 il viral-load era compreso tra 2.755 e 6.699 log, con una media di 4.677 log. La distribuzione percentuale dei valori di viral-load è riportata nella tabella I.

Valutazione della stabilità degli acidi nucleici alla conservazione a +4 °C.

Per HBV la diminuzione del viral-load dopo 168 ore di conservazione a +4 °C variava tra 0.028 e 0.480 log, media 0.148 log. Il campione E presentava una diminuzione del viral-load superiore a 0.3 log. Per HCV la diminuzione del viral-load dopo 168 ore di conservazione a +4 °C variava tra 0.338 e 0.862 log, media 0.477 log. Tutti i campioni presentavano una diminuzione del viral-load superiore a 0.3 log. Per HIV-1 la diminuzione del viral-load dopo 168

Tabella I: distribuzione percentuale dei viral-load in pazienti non trattati.

| Viral-Load (log 10) | HBV (28 pazienti) | HCV (110 pazienti) | HIV-1 (25 pazienti) |
|---------------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| < 1.999 | 0% | 0% | 0% |
| 2.000 – 2.999 | 0% | 0% | 20% |
| 3.000 – 3.999 | 7% | 0% | 16% |
| 4.000 – 4.999 | 14% | 5% | 52% |
| 5.000 – 5.999 | 14% | 37% | 6% |
| 6.000 – 6.999 | 33% | 49% | 6% |
| > 7.000 | 32% | 9% | 0% |

Per ciascuno dei tre virus considerati è stata riportata la distribuzione dei viral-load rilevati in pazienti non in terapia espresso come logaritmo in base 10 delle viremie rilevate. Per HBV ed HIV-1 il valore esprime il numero di copie/mL, per HCV il valore esprime il numero di unità/mL.

Tabella II: effetto della conservazione a +4°C.

| CAMPIONE | TEMPO 0 | DOPO 24 h | DOPO 48 h | DOPO 72 h | DOPO 168 h | DIFFERENZA T0-T168 |
|------------------|---------|-----------|-----------|-----------|------------|--------------------|
| HBV-DNA | | | | | | |
| A | 3.501 | 3.556 | - | 3.468 | 3.401 | 0.100 |
| B | 4.494 | 4.477 | - | 4.456 | 4.407 | 0.087 |
| C | 4.623 | 4.705 | - | 4.605 | 4.515 | 0.108 |
| D | 4.686 | 4.711 | - | 4.682 | 4.658 | 0.028 |
| E* | 5.599 | 5.425 | - | 5.375 | 5.111 | 0.488 |
| F | 5.667 | 5.779 | - | 5.654 | 5.591 | 0.076 |
| HCV-RNA | | | | | | |
| G* | 4.079 | 4.131 | 3.978 | 3.929 | 3.699 | 0.380 |
| H* | 4.477 | 4.518 | 4.276 | 4.146 | 4.041 | 0.436 |
| I* | 5.633 | 5.756 | 5.756 | 5.591 | 5.301 | 0.332 |
| L* | 5.741 | 5.634 | 5.598 | 5.301 | 5.255 | 0.486 |
| M* | 6.322 | 6.352 | 6.255 | 6.097 | 5.954 | 0.368 |
| N* | 6.699 | 6.517 | 6.399 | 6.256 | 5.837 | 0.862 |
| HIV-1 RNA | | | | | | |
| O* | 4.239 | 3.999 | 4.012 | 3.989 | 3.756 | 0.483 |
| P | 4.381 | 4.431 | 4.358 | 4.231 | 4.176 | 0.205 |
| Q* | 4.556 | 4.379 | 4.297 | 4.301 | 4.204 | 0.352 |
| R* | 4.568 | 4.589 | 4.356 | 4.327 | 4.255 | 0.313 |
| S* | 4.857 | 4.889 | 4.598 | 4.398 | 4.381 | 0.476 |
| T | 4.964 | 4.999 | 4.899 | 4.875 | 4.778 | 0.186 |

Per ciascuno dei tre virus considerati il viral-load rilevato è stato espresso come logaritmo in base 10 delle viremie rilevate. Per HBV ed HIV-1 il valore esprime il numero di copie/mL, per HCV il valore esprime il numero di unità/mL.

Per ciascuno dei tre virus considerati abbiamo valutato il viral-load al tempo 0 ed in seguito ad intervalli di tempo prefissati durante la conservazione a +4°C e cioè dopo 24 ore, dopo 48 ore (solo per i HCV e HIV-1), dopo 72 e 168 ore (per HBV, HCV e HIV-1).

I campioni contrassegnati dall'asterisco sono quelli in cui si è rilevata una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$) tra il viral-load rilevato al tempo 0 e dopo 168 ore di conservazione a +4°C. Le caselle con lo sfondo in grigio indicano i campioni in cui la differenza tra viral-load determinato e quello al tempo 0 differiscono di almeno 0.3 log.

ore di conservazione variava tra 0.186 e 0.483 log, media 0.336 log. I campioni O, Q, R e S presentavano una diminuzione del viral-load superiore a 0.3 log. Questi risultati sono riportati nella tabella II.

Valutazione della stabilità degli acidi nucleici ai cambiamenti di stato.

Per HBV la diminuzione del viral-load dopo cinque cicli rapidi di congelamento e scongelamento variava tra 0.055 e 0.336 log, media 0.174 log. Il campione B presentava una diminuzione del viral-load superiore a 0.3 log.

Per HCV la diminuzione del viral-load dopo cinque cicli rapidi di congelamento e scongelamento variava tra 0.788 e 1.254 log, media 0.871 log. Tutti i campioni presentavano una diminuzione del viral-load superiore a 0.3 log.

Per HIV-1 la diminuzione del viral-load dopo cinque cicli rapidi di congelamento e scongelamento variava tra 0.261 e 1.180 log, media 0.623 log. Tutti i campioni presentavano una diminuzione del viral-load superiore a 0.3 log. Questi risultati sono riportati nella tabella III.

Valutazione della robustezza alla cross contaminazione.

Tutti i campioni attesi positivi sono stati ritrovati positivi per HBV, HCV e HIV-1; dei ventiquattro campioni attesi negativi per HCV uno è stato ritrovato positivo, tutti i campioni attesi negativi per HBV e HIV sono stati trovati negativi. Il risultato è comunque assai soddisfacente avendo ritrovato una sola cross contaminazione su 96 determinazioni (1.04%).

Valutazione del detection-limit.

Nella fase di valutazione preliminare con curve di diluizioni logaritmiche a base 10 si sono ottenuti i seguenti risultati: per HBV-DNA sono risultati positivi tutti i campioni con viral-load pari a 1 log e negativi tutti i campioni con viral-load pari a 0 log; per HCV-RNA sono risultati positivi tutti i campioni con viral-load pari a 2 log e negativi tutti i campioni con viral-load pari a 1 log; per HIV-1 RNA sono risultati positivi tutti i campioni con viral-load pari a 2 log e negativi tutti i campioni con viral-load pari a 1 log. Per HBV si procedeva a testare come descritto una curva definita dai seguenti punti 1 log, (10 copie/mL), 0.699 log (5 copie/mL), 0.379 log (2.5 copie/mL); il detection-limit al 90% calcolato con il metodo dei Probit risultava 0.903 log (8 U/mL). Per HCV si procedeva a testare come descritto una curva definita dai seguenti punti 2 log, (100 U/mL), 1.699 log (50 U/mL), 1.379 log (25 U/mL), 1.079 log (12 U/mL); il detection-limit al 90% calcolato con il metodo dei Probit risultava 1.322 log (21 U/mL). Per HIV-1 si procedeva a testare come descritto una curva definita dai seguenti punti 2 log, (100 copie/mL), 1.699 log (50 copie/mL), 1.379 log (25 copie/mL), 1.079 log (12 copie/mL); il detection-limit al 90% calcolato con il metodo dei Probit risultava 1.431 log (27 copie/mL).

Tabella III: Effetto dei cicli di congelamento e scongelamento.

| Campione | Tempo 0 | Dopo 6 cicli | Differenza |
|------------------|---------|--------------|------------|
| HBV-DNA | | | |
| A | 3.501 | 3.342 | 0.159 |
| B* | 4.494 | 4.158 | 0.336 |
| C | 4.623 | 4.439 | 0.184 |
| D | 4.686 | 4.631 | 0.055 |
| E | 5.599 | 5.411 | 0.188 |
| F | 5.667 | 5.544 | 0.123 |
| HCV-RNA | | | |
| G | 4.079 | 3.059 | 1.020 |
| H | 4.477 | 3.223 | 1.254 |
| I | 5.633 | 4.844 | 0.789 |
| L | 5.741 | 4.707 | 1.034 |
| M | 6.322 | 5.501 | 0.821 |
| N | 6.699 | 5.694 | 1.005 |
| HIV-1 RNA | | | |
| O* | 4.239 | 3.059 | 1.180 |
| P* | 4.381 | 3.223 | 1.158 |
| Q* | 4.556 | 4.044 | 0.512 |
| R | 4.568 | 4.307 | 0.261 |
| S* | 4.857 | 4.501 | 0.356 |
| T* | 4.964 | 4.694 | 0.270 |

Per ciascuno dei tre virus considerati il viral-load rilevato è stato espresso come logaritmo in base 10 delle viremie rilevate. Per HBV ed HIV-1 il valore esprime il numero di copie/mL, per HCV il valore esprime il numero di unità/mL.

Per ciascuno dei tre virus considerati abbiamo valutato il viral-load al tempo 0 e dopo cinque rapidi cicli di congelamento scongelamento.

I campioni contrassegnati dall'asterisco sono quelli in cui si è rilevata una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$) tra il viral-load rilevato al tempo 0 e dopo cinque cicli di scongelamento e congelamento. Le caselle con lo sfondo in grigio indicano i campioni in cui la differenza tra viral-load determinato e quello al tempo 0 differiscono di almeno 0.3 log.

Discussione

La introduzione dei test NAT in ambito trasfusionale, nei procedimenti di qualificazione biologica delle unità ematiche pone alcune problematiche peculiari. Infatti la articolazione delle strutture trasfusionali prevede di norma una ampia dispersione territoriale della raccolta delle unità ematiche che vengono inviate per la lavorazione e la qualificazione biologica presso laboratori centralizzati talvolta in ambito sopra provinciale, le cosiddette aree vaste. Dal punto di vista operativo questo significa che i campioni per il test NAT, una volta prelevati, sono destinati a restare per un periodo di tempo variabile, ma di norma attorno alle due ore, a temperatura ambiente, prima di essere refrigerati a +4 °C durante il trasporto. Una volta arrivati in laboratorio i campioni, nel caso non fosse possibile effettuare immediatamente il test andranno stoccati, come sangue intero, a +4 °C non essendo proponibile, a causa del gran numero di campioni, l'allestimento di aliquote di plasma da conservare congelato. Si può ritenere che questo tipo di conservazione venga prolungato sino ad un massimo di 72 ore, per i campioni raccolti il venerdì e testati lunedì

mattina.

La valutazione del viral-load in pazienti non in terapia è stata condotta per valutare i livelli di viremia riscontrabili nella nostra area al fine anche, di riconsiderare, se il caso, le dimensioni dei mini-pool da adottare. Per HBV il viral-load, valutato in 28 soggetti, è risultato compreso tra 3.468 e 7.534 log, con una media di 6.604 log; questo risultato è in buon accordo con quanto riportato in letteratura per soggetti HBeAg negativi. Nella nostra serie vi erano due soli soggetti HBeAg positivi di cui uno di etnia Thai¹³. Sembra importante rilevare come a fianco di soggetti con viremia estremamente elevata coesista una minoranza di soggetti con infezione cronica caratterizzati da viral-load assai bassi sotto 4 log^{14,15}. Per HCV il viral-load, valutato in 110 soggetti non trattati è risultato compreso tra 4.079 e 7.398 log, con una media di 6.255 log, anche in questo caso la distribuzione osservata nella nostra casistica appare in discreto accordo con quanto riportato in letteratura^{15,16}, nonostante le ampie fluttuazioni osservate nei valori di viral-load non si osservava nessun campione con viral-load inferiore a 4 log. Per HIV-1 il viral-load, valutato in 25 soggetti non in terapia è risultato compreso tra 2.755 e 6.699 log, con una media di 4.677 log; anche in questo caso la distribuzione del viral-load è stata quella attesa con presenza di soggetti con viremia assai bassa a fianco di pazienti con elevatissima carica virale^{15,17}.

La valutazione della stabilità di HBV-DNA, HCV-RNA e HIV-RNA è stata condotta al fine di valutare l'impatto dello stoccaggio a +4 °C sulla affidabilità dei risultati forniti dai test NAT nella particolare realtà operativa delle Strutture Trasfusionali. Dopo 24 ore di conservazione a +4 °C, in una percentuale variabile di campioni: 3/6 per HBV, 4/6 per HCV e 4/6 per HIV si è rilevato un modesto aumento apparente del viral-load mentre nei rimanenti il viral-load risultava leggermente diminuito, peraltro sempre in modo non significativo, infatti la variazione era compresa tra - 0.240 e + 0.123 log. Il paradosso di osservare un apparente aumento della viremia dopo 24 ore di conservazione è del resto ben descritto in letteratura sebbene ancora non spiegato in maniera soddisfacente¹⁸. Dopo 72 ore di stoccaggio si cominciano a notare le prime diminuzioni significative di viral-load in alcuni campioni: 0/6 per HBV, 2/6 per HCV e 1/6 per HIV-1. Dopo 168 ore a +4 °C la diminuzione del viral-load tra i campioni HBV-DNA positivi era compresa tra 0.028 e 0.488 log, pari ad una diminuzione della viremia dal 5 al 65%; solo uno dei sei campioni comunque presentava una diminuzione statisticamente significativa del viral-load (0.488 log); in questo caso si trattava di un campione HBeAg positivo ottenuto da un paziente di etnia Thai. Tutti i campioni HCV-RNA positivi presentavano una diminuzione significativa del viral-load: da 0.322 a 0.862 log pari ad un calo percentuale della viremia compreso tra il 50 e l'85%.

Tra i campioni positivi per HIV-RNA 4/6 dimostravano una significativa diminuzione del viral-load che risultava compresa tra 0.186 e 0.483 log, pari ad un calo percentuale della viremia compreso tra il 35 ed il 45%. Quindi dei tre virus considerati quello che si è dimostrato più resistente nelle condizioni di stoccaggio descritte è stato HBV, seguito da HIV-1 mentre HCV si è dimostrato il più sensibile alla conservazione a +4 °C. Questi risultati sono in buon accordo con quanto riportato in letteratura¹⁹⁻²¹.

Tutti e tre i virus considerati sono risultati sensibili alle ripetute e rapide procedure di congelamento e scongelamento. Infatti nei sei campioni positivi per HBV-DNA si osservava una diminuzione del viral-load compresa tra 0.055 e 0.336 log, pari ad una diminuzione della viremia compresa tra il 10 e il 55%. Anche in questo caso solo uno dei campioni considerati dimostrava una diminuzione significativa del viral-load (0.336 log). Tra i sei campioni HCV positivi si osservava una diminuzione del viral-load compresa tra 0.789 e 1.254 log pari ad una diminuzione della viremia compresa tra l'80 ed il 94%. Tutti i campioni dimostravano una significativa diminuzione del viral-load. Tra i sei campioni HIV-RNA positivi si osservava una diminuzione del viral-load compresa tra 0.260 e 1.180 log, pari ad una diminuzione della viremia compresa tra il 30 e il 90%. Quattro campioni dimostravano una diminuzione significativa del viral-load. Anche nel caso dei cambiamenti di stato HCV e HIV, i due virus a RNA, si sono dimostrati più labili di HBV^{22,23}.

Tutte le prove condotte sino a questo punto erano tese alla valutazione di alcune variabili dipendenti dalla biologia dei virus considerati e alla stabilità dei loro acidi nucleici a determinati stress quali la prolungata conservazione a +4 °C in sangue intero anticoagulato con EDTA o ai repentini e rapidi cambiamenti di stato del plasma. Per questo scopo sono stati utilizzati dei metodi di dosaggio quantitativi messi a punto per la valutazione dei pazienti e disegnati per operare su singoli campioni. Tali variabili sono state considerate di interesse preminente in ambito trasfusionale ove è inevitabile lo stoccaggio più o meno prolungato dei campioni di sangue intero a +4 °C prima della esecuzione dei test NAT e ove, in caso si renda necessario ripetere una determinazione su di un mini-pool o sui singoli campioni che lo compongono, sarà giocoforza accedere alle aliquote di back-up allestite in fase di pooling e conservate a -80°C. In base ai risultati ottenuti nel nostro studio e corroborati dai dati disponibili nella letteratura più recente possiamo ritenere che HBV, HCV e HIV siano relativamente stabili durante la conservazione a +4 °C e che possano essere conservati come sangue intero a questa temperatura sino a 72 ore senza particolari cadute nel viral-load. Periodi di conservazione più prolungati sembrano possibili per HBV e forse HIV mentre appaiono sconsigliabili per HCV che si è dimostrato, nelle condizioni sperimentali de-

scritte, il più labile dei tre virus considerati. In caso sia necessario conservare i campioni per oltre 72 ore appare quindi necessario ricorrere al congelamento almeno a -80°C o allestendo delle aliquote in provette secondarie o utilizzando provette madre con gel di separazione in grado di impedire il rimescolamento dei campioni ed il passaggio dell'emoglobina liberata dalla emolisi in fase di congelamento al sovrantante, ad esempio tubi PTT della ditta Becton Dickinson (BD, Franklin Lakes, NJ) o della ditta Greiner (Greiner Holding, Kremmunster, Germania)²⁴. In ogni caso è necessario evitare di congelare e scongelare ripetutamente i campioni per evitare, anche in questo caso, significativi cali del viral-load. Sembra quindi consigliabile la pratica, peraltro assai diffusa in ambito trasfusionale, di allestire in fase di pooling, delle aliquote di back-up in piastre microtiter da conservare congelate a -80°C sino alla conclusione delle procedure di validazione in maniera tale da poter disporre di campioni conservati in maniera corretta in caso fosse necessario testare i singoli componenti di un mini-pool, ad esempio per ricercare un campione reattivo.

Nelle prove che seguono abbiamo invece utilizzato i kit della serie Ampliscreen, disegnati e autorizzati specificatamente per l'utilizzo con pool di campioni in ambito trasfusionale. La valutazione delle robustezza alla cross-contaminazione e la determinazione del detection-limit hanno solo lo scopo di valutare la performance analitica del nostro laboratorio nell'esecuzione di questi particolari test NAT e quindi di validare la qualità del risultato ottenuto. Infatti è ovvio che la validazione dei metodi diagnostici come tali è compito estremamente indaginoso che deve essere condotto dal produttore prima e da enti certificatori: ad esempio Paul Erlich Institute (PEI) o ISS in una fase preliminare alla commercializzazione.

I tre kit esaminati, nella nostra realtà operativa, si sono dimostrati assai resistenti alla cross-contaminazione. Infatti utilizzando l'usuale schema di testare in posizioni alternate dei campioni negativi e dei campioni positivi ad alto titolo (viral-load 7 log per HBV, 4 log per HCV e 5 log per HIV) solo 1 dei 96 campioni ha dato un risultato diverso da quanto atteso. Ad ottenere questo buon risultato hanno contribuito sia le caratteristiche costruttive del kit che alcuni accorgimenti operativi adottati nel nostro laboratorio. Tra i primi va ricordato il sistema enzimatico di controllo della cross contaminazione da amplificati, tra i secondi vanno annoverati l'utilizzo di due cappe a flusso laminare, una delle quali dedicata esclusivamente alla preparazione della master-mix e l'abitudine di trattare tutti gli ambienti del laboratorio NAT con raggi UV.

La valutazione del detection-limit al 90% è stata condotta come illustrato ottenendo i seguenti risultati: per HBV il detection-limit al 90% si collocava a 8 U/mL, all'interno di quanto recentemente ritrovato

da altri autori (6 U/ml, Moretti E, comunicazione personale 2003; 10 U/mL, Miceli M, comunicazione personale 2003). Per HCV il detection-limit al 90% calcolato con il metodo dei Probit risultava 1.322 log (21 U/mL) e 1.431 log (27 copie/mL) per HIV-1; tali dati appaiono in buon accordo con quanto riportato in letteratura²⁵⁻²⁷.

I test NAT da utilizzarsi nella qualificazione biologica delle unità ematiche su mini-pool di campioni devono permettere di identificare come positivo, almeno nel 90% delle sedute analitiche, un mini-pool contaminato con una unità contenente 1.000 (3 log) copie virali (per HBV, HCV o HIV-1) oppure ritrovare positivo nel 90% dei casi un mini-pool con un viral load di $2 \log^{2,4,11,12}$. I test sono registrati per essere utilizzati su mini-pool formati da un massimo di 24 unità, pertanto la sensibilità nominale dichiarata dal costruttore è di 50 copie (1.699 log) ed è sufficiente a garantire quanto richiesto dalla normativa. Tuttavia abbiamo ritenuto indispensabile valutare la performance analitica del nostro laboratorio ottenendo dei valori che per HCV e HIV-1 erano circa la metà rispetto alla sensibilità analitica dichiarata e, ancora più lusinghieri, per HBV.

I tre virus interessati dallo screening NAT presentano una cinetica nell'ospite immunocompetente, quale di norma è il donatore di sangue, assai diversa tra loro. HBV ha una cinetica assai lenta con un tempo medio di replicazione di circa 100 ore²⁸. La viremia in fase di epatite acuta è assai elevata (oltre 6-7 log) e anche nei portatori cronici di HBsAg positivi per HBV-DNA il viral-load è assai elevato ($> 6 \log$ per i soggetti HBeAg negativi, $> 7 \log$ per i soggetti HBeAg positivi). Esistono peraltro soggetti HBsAg negativi, con incostante positività per gli anti-HBc IgG ed eventualmente per le IgG anti-HBs che possono presentare una persistente infezione da HBV con valori di viremia assai bassi, anche sotto i 3 log 29. HCV ha una rapida replicazione in fase libera, cioè prima della risposta anticorpale assai rapida, con un tempo di raddoppio di circa 5-10 ore e valori di viral-load in rapida crescita che si mantengono superiori ai 5 log. Sono descritti dei soggetti con basse viremie per periodi anche prolungati nel tempo ma sempre con viral-load superiore a 3 log, anche se si tratta di casi eccezionali³⁰. HIV-1 ha una fase di replicazione relativamente rapida con tempo di raddoppio del viral-load in fase libera di 10 ore. Sono descritti dei soggetti con basse viremie, di norma superiori a 3 log, ma si tratta comunque di casi sporadici³¹⁻³².

In un sistema a risorse limitate non si può prescindere da una valutazione dei costi comportati dalla introduzione del NAT-testing nei processi di qualificazione biologica delle unità ematiche. Da una serie di simulazioni condotte presso il Centro Regionale di Coordinamento e Compensazione della Regione Veneto si evince che, per una massa di 25-30.000 unità/anno, il solo test per HCV-RNA comporti una

spesa di 18 euro ad unità che diventano 24 con l'aggiunta del test per HIV-RNA per arrivare a 29 euro ad unità con la ricerca anche di HBV-DNA.

Da dati ottenuti nel corso del presente studio risulta evidente come i test NAT basati sulla tecnica PCR proposti per la qualificazione delle unità ematiche sono robusti e sensibili, in grado di garantire la corretta identificazione di campioni positivi, anche con viremie insolitamente ridotte, se utilizzati in mini-pool da 24 unità. Infatti il viral-load rilevabile, per una unità contaminante uno di tali mini-pool, va da 2.283 log (192 copie/mL) per HBV a 2.702 log (504 copie/mL) per HCV, sino a 2.811 log (648 copie/mL) per HIV-1. Inoltre i tre virus si sono dimostrati stabili durante la conservazione a +4 °C sino a 72 ore nel sangue intero anticoagulato con EDTA. Si può quindi ritenere che sia possibile conservare i campioni raccolti venerdì mattina, ma che non sia stato possibile testare in giornata, sino al lunedì mattina, senza rischi di decadimento di HBV-DNA, HCV-RNA o HIV-RNA. In ogni caso va ricordato che l'introduzione dei test NAT nella qualificazione biologica delle unità ematiche è senza alcun dubbio in grado di ridurre il rischio di una infezione post trasfusionale da HBV, HCV o HIV-1 ma certo non è in grado di azzerarlo; si ritiene infatti che la dose infettante al 50% sia 10 copie/unità per HBV e HCV e 1000 copie/unità per HIV-1³³. E' evidente che nessuno dei test attualmente disponibili è in grado di rilevare cariche virali così esigue in quanto con le metodiche attualmente disponibili è possibile individuare unità presentanti un viral-load complessivo di 4.936 log per HBV (86.400 U/unità), 5.355 log per HCV (226.800 U/unità), 5.464 log per HIV-1 (291.600 copie/unità). Si ritiene che, allo stato attuale delle conoscenze epidemiologiche e della tecnologia disponibile, visto che la vigente normativa prevede l'esecuzione dei test per la ricerca di HCV-RNA nella qualificazione biologica delle unità ematiche, sia logico completare il cammino iniziato mediante l'adozione di test NAT sia per HIV che per HBV. In effetti presso il nostro Laboratorio il test NAT per HBV-DNA è stato introdotto nelle procedure di qualificazione biologica delle unità ematiche, a fianco dei test per HCV-RNA e HIV-RNA.

Bibliografia

1. Busch M, Kleinman S. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion transmitted infectious disease. *Transfusion* 2000; 40: 143-59.
2. Decreto del Ministero Italiano della Salute 29 Marzo 1999.
3. Krajden M, Ziermann R, Khan A, Mak A, Leung K, Hendricks D, et al. Qualitative detection of Hepatitis C Virus RNA; Comparison of analytical sensitivity, clinical performance and workflow of the Cobas Amplicor HCV test version 2.0 and the HCV-RNA Transcription-Mediated Amplification qualitative assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2903-7.
4. Guidelines for validation of Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT). European Pharmacopeia, 3th Edition, December 1996.
5. Noborg U, Gusdal A, Pisa E, Hedrum A, Lindh M. Automated quantitative analysis of Hepatitis B Virus DNA by using the Cobas Amplicor HBV Monitor test. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2793-7.
6. Stelzl E, Kormann-Köement A, Haas J, Daghofer E, Santner B, Marth E, et al. Evaluation of an automated sample preparation protocol for quantitative detection of Hepatitis C Virus RNA. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1447-50.
7. Lew J, Reichelderfer P, Fowler M, Bremer J, Carrol R, Cassol S, et al. Determination of levels of Human Immunodeficiency Virus type I RNA in plasma: Reassessment of parameters affecting assay outcome. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1471-79.
8. Lopez V, Bourne E, Lutz M, Condreay L. Assessment of the Cobas Amplicor HBV Monitor test for the quantification of serum Hepatitis B Virus DNA levels. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1972-76.
9. Alfonso A, Didier J, Plouvier E, Falissard B, Ferey M, Bogard M, et al. Performance of an automated system for quantification of Hepatitis C Virus RNA. *J Virol Methods* 2000; 86: 55-60.
10. Dickover R, Herman S, Saggio K, Wafer D, Dillon M, Bryson Y. Optimization of specimen handling procedures for accurate quantitation of levels of Human Immunodeficiency Virus RNA in plasma by reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1070-73.
11. 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. Rapporti ISTISAN 2000/06.
12. Guidelines for validation of Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) for the detection of Hepatitis C Virus (HCV) RNA in plasma pools. Council of Europe PA/PH/OMCL (98) 22 PROP.
13. Marin I, Poljak M, Seme K, Meglic-Volkar J, Maticic M, Lesnicar G, Brinovec V. Comparative evaluation of semiautomatic COBAS AMPLICOR Hepatitis B Virus (HBV) MONITOR test and manual microwell plate-based AMPLICOR HBV MONITOR test. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 758-61.
14. Chu C, Hussain M, Lok A. Quantitative serum HBV-DNA levels during different stage of chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 2002; 36: 1408-15.
15. Berger A, Branner J, Doerr H, Weber B. Quantification of viral load: clinical relevance for human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Intervirology* 1998; 41: 24-34.
16. Manzin A, Solforosi L, Bianchi D, Gabrielli A, Giostra F, Bruno S, Clementi M. Viral load in samples from Hepatitis C Virus (HCV) infected patients with various clinical conditions. *Res Virol* 1995; 146: 279-84.
17. Griffith B, Rigsby M, Garner R, Gordon M, Chako T. Comparison of the Amplicor HIV-1 Monitor test and the nucleic acid sequence based amplification assay for quantitation of Human Immunodeficiency Virus RNA in plasma, serum, and plasma subjected to freeze-thaw cycles. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3288-91.
18. Grant P, Kitchen A, Barbara J, Hewitt P, Sims C, Garson J, Tedder R. Effects of handling and storage of blood on the stability of Hepatitis C Virus RNA: Implications for NAT testing in Transfusion Medicine.

- Vox Sanguinis 2000; 78: 137-42.
19. Sebire K, McGravin K, Land S, Birch C. Stability of Human Immunodeficiency Virus RNA as measured by a commercial PCR based assay. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 493-8.
 20. Krajden M, Comandor L, Rifkin O, Grigonew A, Minor J, Kapke G. Assessment of Hepatitis C Virus DNA stability in serum by the Chiron Quantiplex Branched DNA assay. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 382-6.
 21. Cardoso M, Koerner K, Hinz W, Lenz C, Schawandt A, Kubanek B. Hepatitis C Virus stability: the issue! *Vox Sanguinis* 1999; 76: 124-7.
 22. Krajden M, Minor J, Rifkin O, Coamdor L. Effect of multiple freeze-thaw cycles on Hepatitis B Virus DNA and Hepatitis C Virus RNA quantification measured with Branched DNA technology. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1683-6.
 23. Ginocchio C, Wang X, Kaplan M, Mulligan G, Witt D, Romano J, Cronin M, Carrol R. Effects of specimen collection, processing and storage conditions on stability of Human Immunodeficiency Virus type 1 RNA levels in plasma. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2886-93.
 24. Kessler H, Stelzl E, Raggam R, Haas J, Kirrchmeir F, Hegenbarth K, Daghhofer E, Santner B, Marth E, Stauber R. Effects of storage ant type of blood collection tubes on Hepatitis C Virus level in whole blood. *J Clin Microbiol*; 2001; 35: 1788-90.
 25. Sun R, Jayakar H, Mendoza Mwisbeski M, Iszczyszyn W, Dragon E. Experience with PCR screening. *Dev Biol Stand* 2000; 102: 81-91.
 26. Sun R, Schilling W, Jayakar H, Ku J, Wang J, Rosenstrauss M, et al. Simultaneous extraction of Hepatitis C Virus (HCV), Hepatitis B Virus (HBV) and HIV-1 from plasma and detection of HCV-RNA by a reverse transcriptase polymerase chain reaction assay designed for screening pooled units of donated blood. *Transfusion* 1999; 39: 1111-9.
 27. Yang Y, Lamendola M, Mendoza M, Xu D, Nguyen M, Yeh S, et al. Performance characteristics of the Cobas Ampliscreen HIV-1 test, version 1.5, an assay designed for screening plasma mini-pool, *Transfusion* 2001; 41: 643-51.
 28. Whalley S, Murray J, Brown D, Webster G, Emary V, Dusheiko G, et al. Kinetics of acute B virus infection in humans. *J Exp Med* 2001; 193: 847-54.
 29. Noborg U, Gusdal A, Horal P, Lindg M. Levels of viremia in subjects with serological markers of past or chronic Hepatitis B Virus infection. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 249-52.
 30. Garcia-Retortillo M, Fornis X, Feliu A, Moitinho E, Costa J, Navasa M, et al. Hepatitis C Virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 2002; 35: 680-7.
 31. Little S, McLean A, Spina A, Richman D, Havlir D. Viral dynamics of acute HIV-1 infection. *J Exp Med* 1999; 6: 841-50.
 32. Garcia F, Vidal C, Gatell J, Miro J, Soriano A, Pumarola T. Viral-load in asymptomatic patients with CD4* lymphocyte counts above 500x10⁶/L. *AIDS* 1997; 11: 53-7.
 33. Weusten J, van Drimmelen H, Lelie P. Mathematics modelling of the risk of HBV, HCV and HIV transmission by window phase donation not detected by NAT. *Transfusion* 2002; 42: 537-48.