

Un programma di valutazione esterna della qualità per l'analisi del DNA tramite amplificazione con PCR

Claudio Orlando, Claudia Casini Raggi, Mario Pazzagli

Unità di Biochimica Clinica, Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Università di Firenze

ABSTRACT

An external quality assessment program for DNA analysis with PCR amplification

In contrast to the large variety of possible applications of polymerase chain reaction (PCR) technique in diagnostic laboratories, external quality assessment (EQA) programs are until now limited to only few tests with established clinical value. Considering this restriction, EQA programs should be directed towards the evaluation of analytical aspects which are common to the great majority of tests based on PCR. We have developed an EQA program for the evaluation of DNA extraction, its amplification and the analysis of products after PCR. The program presents three control levels: 1. DNA extraction (quality and quantity); 2. PCR performances (specificity and efficiency); 3. interpretation of the results after electrophoresis. The first lot of reagents was sent to 35 Italian laboratories. Of these, 16 have completed the tests required. The analysis of the data collected shows a fair homogeneity with regard to DNA extraction, but a great variability in efficiency and specificity of the amplification procedures and results analysis. These preliminary results seem to confirm the validity of the approach of this EQA program.

RIASSUNTO

Nonostante la vastità delle possibili applicazioni della polymerase chain reaction (PCR) nel laboratorio diagnostico, esistono a tutt'oggi un numero estremamente ridotto di programmi di valutazione esterna della qualità (VEQ) in questo settore e comunque sempre limitati ad esami di riconosciuto valore clinico. Considerando questa limitazione, la capacità di sviluppare programmi di controllo di qualità di questo tipo dovrebbe essere diretta alla valutazione di aspetti analitici comuni alla maggior parte delle analisi molecolari basate sull'impiego della PCR. A questo scopo abbiamo sviluppato un programma per la valutazione delle fasi di estrazione del DNA, della sua amplificazione tramite PCR e dell'analisi dei prodotti stessi di amplificazione. Il programma presenta tre livelli di controllo: 1. estrazione del DNA (qualità e quantità); 2. prestazioni della PCR (efficienza e specificità); 3. interpretazione dei risultati dopo elettroforesi. Il primo lotto di reagenti è stato inviato a 35 laboratori italiani. Di questi, 16 hanno completato le prove richieste. L'analisi dei dati mostra una sufficiente omogeneità per quanto riguarda i dati relativi all'estrazione del DNA, ma una grande variabilità nell'efficienza e specificità delle procedure di amplificazione e nell'interpretazione dei risultati. Questi dati preliminari sembrano confermare la validità di questo approccio alla valutazione esterna della qualità in questo tipo di analisi molecolare.

PREMESSA

Nel corso di questo ultimo decennio abbiamo assistito ad una larga diffusione delle tecniche di biologia molecolare nel laboratorio clinico, grazie soprattutto all'impiego di una tecnica di grande versatilità e affidabilità che consente l'amplificazione degli acidi nucleici, la *polymerase chain reaction* (PCR). Questa tecnica permette, come noto, di generare un numero elevatissimo di copie di un frammento genomico (DNA o cDNA) partendo anche da quantità limitate di estratti di acidi nucleici (DNA o RNA). Questo processo di arricchimento consente di sottoporre il campione amplificato a ulteriori fasi analitiche che ne permettono l'identificazione, la caratterizzazione e, in taluni casi, la misura. La PCR infatti, come tecnica molecolare, svolge tradizionalmente due funzioni: quella analitica, che consiste nell'identificazione della presenza/assenza di determi-

nate sequenze geniche nel campione in esame (come nel caso dell'identificazione di genomi virali, per es.); e quella preparativa, nella quale il campione amplificato serve come bersaglio per l'applicazione di ulteriori tecniche di biologia molecolare. In tal senso i prodotti della PCR possono essere sequenziati per valutarne la sequenza nucleotidica, possono essere ibridati con specifiche sonde, possono essere clonati, possono essere sottoposti a taglio con specifici enzimi di restrizione, possono essere impiegati in sistemi di analisi quantitativa, possono essere sottoposti a tecniche di screening per la ricerca di mutazioni, etc.

La PCR rappresenta in tal senso uno strumento che ha raggiunto una diffusione senza precedenti nel laboratorio clinico, indipendentemente dalla specializzazione del laboratorio stesso e dalla sua applicazione a specifici

esami diagnostici. Anche se la virologia e la genetica rappresentano il campo applicativo più ovvio di questa tecnica, la PCR è ormai diffusa in qualunque laboratorio nelle diverse discipline cliniche: oncologia, ematologia, medicina forense, parassitologia, chimica clinica, tipizzazione tissutale, etc.

Alla diffusione della PCR nel laboratorio diagnostico ha contribuito anche la disponibilità commerciale di numerosi reagenti e kit per le varie fasi analitiche, che vanno dall'estrazione degli acidi nucleici, alla retrotrascrizione dell'mRNA a cDNA, all'allestimento dei protocolli di PCR con miscele di reagenti premiscelati, fino alle varie possibili fasi di rivelazione post-PCR,

In maniera del tutto simile si è molto progredito nello sviluppo della parte strumentale, quella cioè dei termociclatori, che permettono di ottenere con grande precisione ed omogeneità le variazioni di temperatura necessarie al compimento della reazione ciclica di PCR. In alcuni casi si vedono già i primi tentativi di automazione nel settore della PCR, una premessa ovvia ma non scontata, per l'applicazione di questa tecnica su larga scala. Esistono già strumenti che sono in grado di automatizzare la fase di estrazione, allestimento ed esecuzione dell'amplificazione, senza intervento esterno e con ridotti rischi di contaminazione da parte dei prodotti di amplificazione.

Va comunque detto che al di là di questi tentativi iniziali la PCR e le tecniche ad essa correlate sono ancora in una fase 'artigianale' in cui l'esperienza e il bagaglio tecnico dell'operatore rappresentano ancora la variabile più importante per la buona riuscita del dosaggio. Un altro importante aspetto è che la variabilità di questa metodica è influenzata anche da fattori intrinseci che derivano dal tipo di campione e di materiale biologico da trattare, dall'abbondanza del target genico da identificare, ma anche da una serie di fattori imprevedibili, e soprattutto non quantificabili, che possono pesantemente interferire sulla resa e sulla specificità di questa tecnica.

Da queste e da altre ovvie considerazioni nasce quindi l'esigenza che, come in qualunque settore della diagnostica di laboratorio, anche nel laboratorio di biologia molecolare debbano essere adottati criteri di controllo di qualità interni e, quando possibile, esterni al laboratorio stesso (1).

Qualunque laboratorio di biologia molecolare ha a disposizione numerosi strumenti per la verifica delle varie fasi analitiche attraverso materiali di controllo interno. Giova ricordare come esistano semplici accorgimenti per valutare la quantità e la qualità degli acidi nucleici estratti, o come sia necessario disporre di controlli negativi e positivi nelle varie fasi di retrotrascrizione e/o amplificazione. Si deve inoltre ricorrere a metodi che confermino che i prodotti amplificati corrispondano come sequenza, e non solo come dimensioni, a quelli attesi. A tutto questo va aggiunto, come noto, un decalogo di comportamenti che riducano al minimo il rischio di contaminazione da post-amplificato, che risulta ancora oggi il maggiore problema di un laboratorio di PCR.

Per quanto riguarda invece la possibilità di accedere a sistemi di valutazione esterna della qualità, il problema si complica in maniera notevole. Nonostante la grande diffu-

sione della tecnica e degli esami diagnostici basati sulla PCR, i programmi di controllo di qualità sono limitati a pochissimi casi di riconosciuto valore clinico e di larga diffusione, come gli esami virologici e, in alcuni casi, di diagnostica genetica classica, come quelli relativi alla fibrosi cistica. Anche in questo esempio comunque, trattandosi di un esame specialistico e relativo ad una patologia a limitata diffusione, la via del controllo esterno passa attraverso un programma europeo capace di raccogliere l'adesione di un numero di utenti adeguato a rendere statisticamente valutabili i risultati del programma stesso.

Negli altri casi rimane quindi improbabile, se non impossibile, pensare a specifici programmi per esami molto specialistici, con dubbio valore clinico e affidati ancora ad una sperimentazione clinica e molecolare. La via da percorrere non può essere quindi quella di materiali esterni che valutino una procedura analitica complessa come la PCR, solo mediante la valutazione del risultato finale dell'esame.

Più praticabile, e quindi più diffusibile a tutti, è la possibilità di adottare sistemi di controllo di qualità che valutino l'efficienza e l'accuratezza delle varie fasi di un esperimento di PCR (dall'estrazione dell'acido nucleico fino alla identificazione del prodotto di amplificazione tramite gel-elettroforesi). Come già detto queste fasi sono, a grandi linee, comuni a qualunque applicazione diagnostica della PCR e quindi capaci di interessare laboratori con diverse specializzazioni e interessi clinici.

A tale scopo abbiamo sviluppato, basandoci sulla precedente esperienza della Società Tedesca di Biochimica Clinica (2), un progetto di programma di valutazione esterna della qualità (VEQ) per la valutazione dell'estrazione del DNA da sangue umano, la sua amplificazione con tecnica PCR e l'analisi dei prodotti di amplificazione tramite gel-elettroforesi.

SCHEMA DEL PROGRAMMA

Premessa

Nella prima fase del programma, sono stati svolti esperimenti atti a valutare la stabilità e la configurazione dei campioni e reagenti necessari. Come sarà descritto in dettaglio, il programma richiede l'invio di campioni di DNA pre-estratto da sangue, ma anche di campioni di sangue intero, per cui era necessario valutare la stabilità in condizioni particolari come quelle della spedizione postale.

Reagenti e campioni

Dopo questa prima fase siamo quindi arrivati alla formulazione di un protocollo di invio, in cui ciascun lotto è così composto:

1. un campione di DNA di riferimento (indicato come **Controllo**) ottenuto per estrazione da leucociti umani. Il campione può contenere, oltre al bersaglio naturale di amplificazione relativo alla coppia di primers utilizzati, una sequenza addizionale, amplificabile con la stessa coppia di primers, ma identificabile sulla base delle diverse di-

mensioni dell'amplificato stesso.

2. un campione di circa 5 ml di sangue intero con anti-coagulante convenzionale (indicato come **Campione**).

3. tre coppie di primers, pronte per l'uso, capaci di amplificare altrettanti bersagli genici (identificate come **1, 2 e 3**).

4. le istruzioni complete per allestire il protocollo di amplificazione utilizzando reagenti e strumenti per PCR presenti nel laboratorio.

Informazioni fornite all'utilizzatore

1. Concentrazione del DNA nel Controllo.
2. Temperatura di melting ottimale per ogni reazione di PCR.
3. Optimum di concentrazione di Mg^{2+} .
4. Range di dimensione di ciascun amplificato (in paia di basi).
5. Protocollo di PCR (numero di cicli, temperature, durata)
6. Quantità di Campione e Controllo da amplificare.

Operazioni da eseguire a cura dell'utilizzatore

L'utilizzatore è chiamato a eseguire:

1. estrazione del DNA dal Campione di sangue con la procedura in uso presso il proprio laboratorio.
2. stima con metodo spettrofotometrico della qualità e della quantità del DNA estratto.
3. amplificazione tramite PCR del Campione e del Controllo con ciascuna delle coppie di primers (per un totale di sei amplificati). Ogni determinazione deve essere eseguita in doppio.
4. uno dei duplicati deve essere impiegato dall'utilizzatore per il controllo dei risultati dopo gel-elettroforesi. Dovranno essere indicati per ogni esperimento il numero e le dimensioni approssimative delle bande così ottenute.
5. l'altro duplicato deve essere inviato per posta (insieme agli altri dati richiesti) al centro di raccolta dove possano essere analizzati tramite gel elettroforesi simultanea ed analisi d'immagine (3).

Analisi dei dati

Tutti i campioni così pervenuti saranno analizzati simultaneamente per:

1. verificare il numero e le dimensioni delle bande ottenute.
2. valutare, in termini quantitativi, tramite confronto dell'intensità delle bande specifiche, l'efficienza di amplificazione di ogni campione.
3. verificare la congruità di questi risultati con quanto riportato dagli utilizzatori.
4. confrontare infine i risultati dell'estrazione del DNA sul campione di sangue estratto.

Prima spedizione

Seguendo lo schema sopra riportato, è stato inviato un

primo lotto di reagenti e campioni alla fine di Maggio 1999 a 35 laboratori italiani che avevano dichiarato la loro disponibilità a partecipare a questa fase sperimentale del progetto.

RISULTATI

Dei 35 laboratori che hanno ricevuto il primo kit di controllo, 16 hanno ultimato le procedure e restituito i moduli ed i prodotti della PCR come richiesto. Riportiamo qui di seguito i risultati dei vari esperimenti.

Estrazione del DNA

La Figura I riassume i dati che i 16 laboratori hanno riportato nella quantificazione del DNA estratto dal Campione di sangue fornito. È da notare che ogni laboratorio ha condotto l'estrazione su un volume di sangue variabile, a seconda dei metodi e delle procedure normalmente utilizzate. I dati sono stati comunque riportati per ogni campione alla concentrazione di DNA estratto da 1 ml di sangue.

Nella Figura II sono riportati anche i dati relativi al rapporto spettrofotometrico 260/280 nm negli stessi campioni.

Esecuzione delle diverse amplificazioni tramite PCR

Nella Tabella 1 abbiamo riportato i dati relativi al numero delle bande elettroforetiche e loro dimensioni espresse in paia di basi (bp) così come ricavato dall'apposito questionario ottenuto dai partecipanti.

Come già precedentemente riportato, tutti i campioni pervenuti presso il nostro laboratorio sono stati analizzati simultaneamente su gel di agarosio all'1% e l'intensità delle bande elettroforetiche è stata misurata con un metodo di analisi di immagine. I dati così ottenuti per ogni gruppo di amplificati (Controllo e Campione in combinazione con tre diverse coppie di primers) sono riportati nelle Figure III-IX, congiuntamente alla valutazione densitometrica degli amplificati. Anche in questo caso abbiamo utilizzato come riferimento la media di consenso ottenuta in ogni esperimento. I dati così ottenuti sono stati mediati [(somma dei valori densitometrici)/(numero di esperimenti che hanno generato un dato misurabile)] fornendo una graduatoria dei diversi laboratori in termini di densità media, come riportato in Figura X.

CONCLUSIONI

I dati ottenuti da questo primo esperimento, sembrano indicare la fattibilità (e la necessità) di un programma di valutazione esterna della qualità per l'analisi del DNA tramite amplificazione con PCR. Seppure relativi ad un campione statistico di numerosità limitata, i risultati ottenuti indicano comunque una notevole variabilità tra i laboratori.

Tabella 1

Riepilogo dei dati relativi al numero e alle dimensioni, espresse in paia di basi, delle bande elettroforetiche ottenute dopo amplificazione, tramite PCR, del Controllo e del Campione in esame, con le tre coppie di primers fornite

LABORATORI	CONTROLLO			CAMPIONE		
	PRIMERS 1	PRIMERS 2	PRIMERS 3	PRIMERS 1	PRIMERS 2	PRIMERS 3
1	2 [330-259]*	1 [200]	1 [300]	1 [300]	1 [200]	1 [300]
2	0	1 [210]	1 [290]	1 [275]	1 [210]	1 [290]
3	2 [290-240]	1 [220]	1 [300]	1 [290]	1 [220]	1 [300]
4	1 [tra 300 e 222]	1 [220]	0	2 [350-222]	1 [220]	0
5	2 [300-235]	1 [220]	1 [300]	1 [300]	1 [220]	1 [300]
6	2 [275-225]	1 [220]	1 [280]	1 [275]	1 [220]	1 [280]
7	2 [300-240]	1 [230]	1 [290]	1 [300]	1 [230]	1 [290]
8	2 [280-220]	1 [210]	1 [310]	3 [500-280-220]	1 [210]	3 [390-350-310]
9	1 [200]	1 [250]	0	1 [280]	1 [300]	1 [300]
10	1 [240]	1 [210]	1 [280]	1-[280]	1 [210]	2-[395-280]
11	2 [280-234]	1 [200]	1 [270]	1 [280]	1 [200]	1 [270]
12	2 [280-234]	1 [210]	1 [280]	1 [280]	1 [210]	1 [280]
13	2 [300-240]	1 [200]	1 [300]	2 [300-240]	1 [200]	1 [300]
14	2 [360-320]	0	1 [360]	2 [360-320]	0	1 [360]
15	1 [276]	1 [255]	1 [295]	1 [295]	1 [255]	1 [295]
16	0	1 [200]	0	0	1 [200]	0
Valori attesi	2 [284-236]	1 [212]	1 [284]	1 [284]	1 [212]	1 [284]

*Il primo numero si riferisce al numero delle bande ottenute da ogni utilizzatore dopo separazione con gel elettroforesi, quello tra parentesi si riferisce alle dimensioni stimate per le bande ed espresse in bp

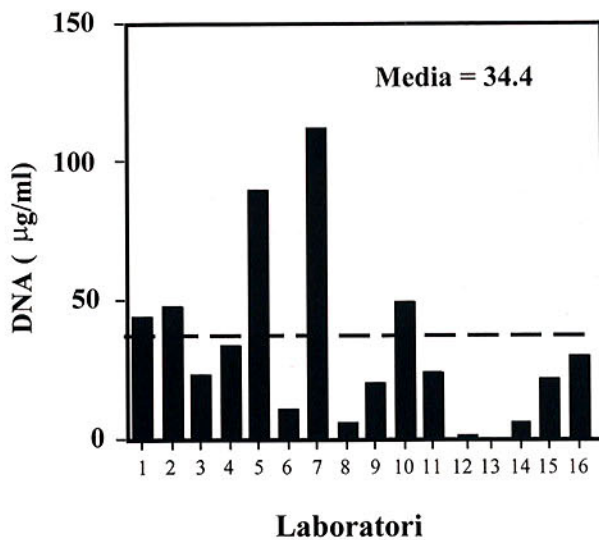


Figura I

Riepilogo dei dati relativi alla quantità di DNA estratto dal Campione di sangue. La linea tratteggiata orizzontale rappresenta la media di consenso

Le novità di questo tipo di programma, rispetto ai convenzionali programmi di VEQ in chimica clinica sono le seguenti:

- l'utilizzatore è chiamato a fornire dati oggettivi (es. la concentrazione del DNA estratto sulla base della lettura spettrofotometrica del campione), ma anche dati sogget-

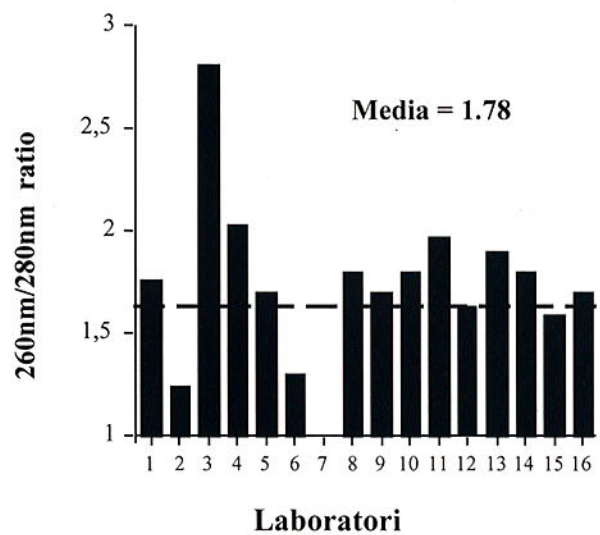


Figura II

Riepilogo dei dati relativi alla valutazione della qualità del DNA estratto dal Campione di sangue, valutato dal rapporto delle letture spettrofotometriche a 260 e 280 nm. Il laboratorio 7 non ha riportato l'informazione

tivi (es. il numero delle bande ottenute dai prodotti della PCR e loro dimensione). Va ricordato che la soggettività rappresenta in questo tipo di tecniche uno strumento di valutazione ancora molto importante e, in taluni casi,

CONTROLLO: PRIMERS 1

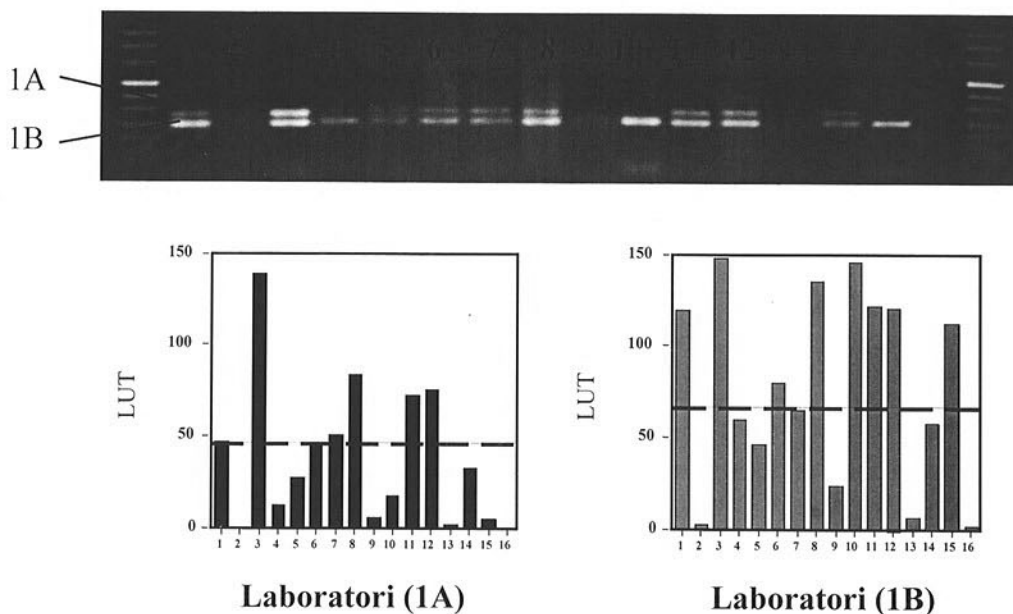


Figura III

Risultato dell'analisi elettroforetica dei prodotti di PCR ottenuti dopo amplificazione del Controllo con la coppia di Primers 1. Come evidente, in questo caso, vengono amplificati due diversi target di 284 e 236 paia di basi, rispettivamente. Nel pannello sono riportati il gel e i risultati dell'analisi densitometrica relative alle due bande [1A=284 bp e 1B=236 bp]. L'intensità di ogni banda è qui espressa in unità densitometriche arbitrarie (LUT). La linea tratteggiata orizzontale rappresenta la media di consenso

CONTROLLO: PRIMERS 1

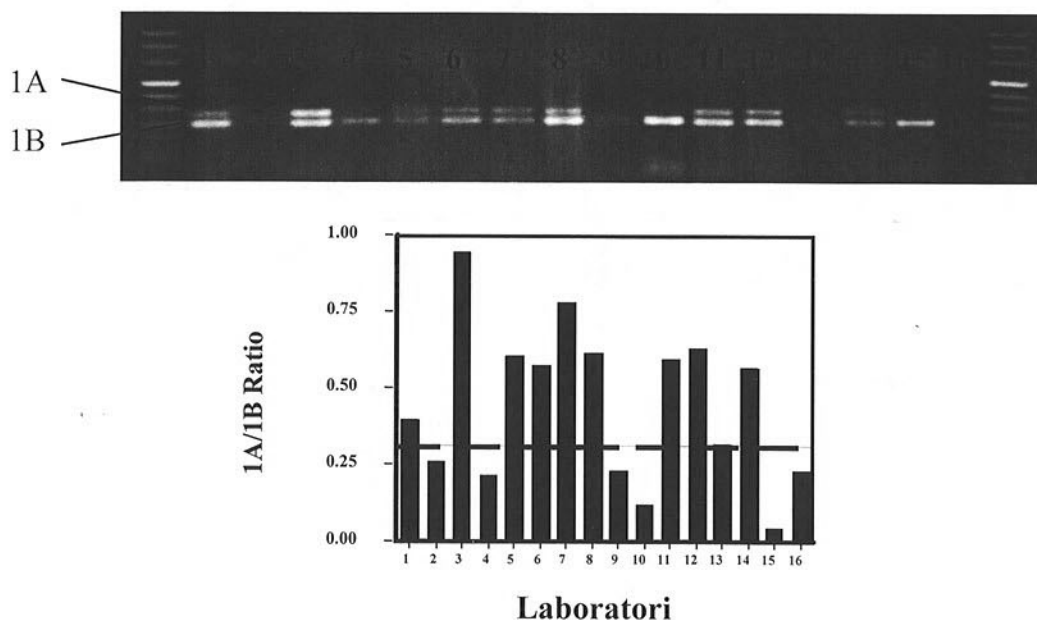


Figura IV

Risultato del rapporto densitometrico tra le bande 1A/1B, come in Figura III

CONTROLLO: PRIMERS 2

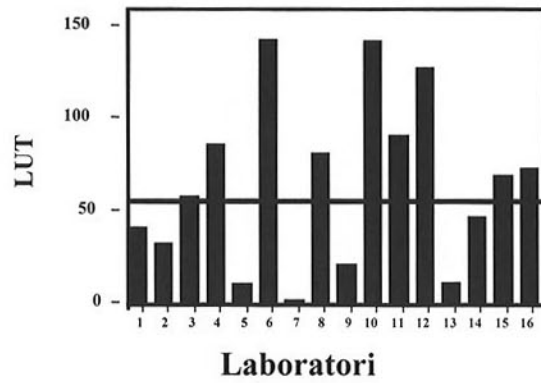
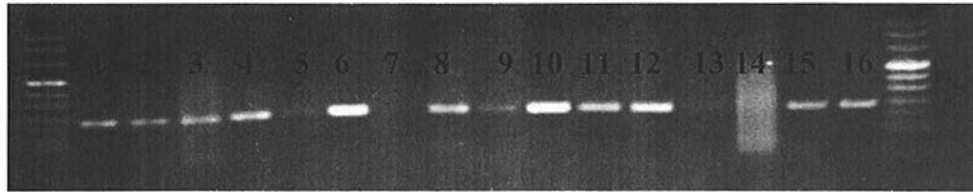


Figura V

Risultato dell'analisi elettroforetica e densitometrica dei prodotti di PCR ottenuti dopo amplificazione del Controllo con la coppia di Primers 2

CONTROLLO: PRIMERS 3

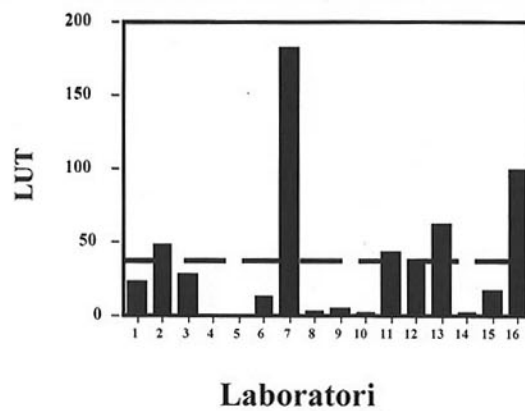


Figura VI

Risultato dell'analisi elettroforetica e densitometrica dei prodotti di PCR ottenuti dopo amplificazione del Controllo con la coppia di Primers 3

CAMPIONE: PRIMERS 1

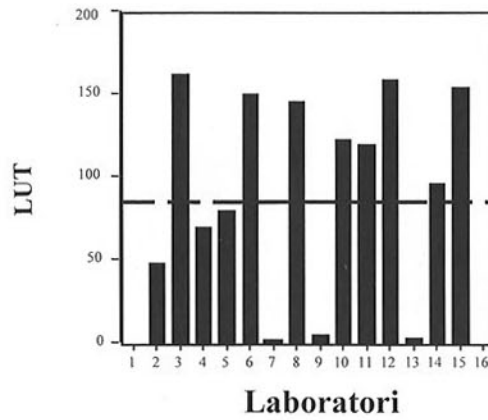
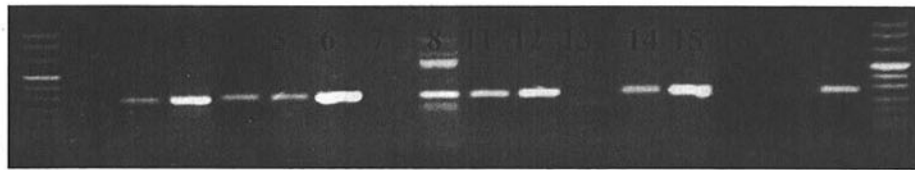


Figura VII

Risultato dell'analisi elettroforetica e densitometrica dei prodotti di PCR ottenuti dopo amplificazione del DNA estratto dal Campione di sangue con la coppia di Primers 1

CAMPIONE: PRIMERS 2

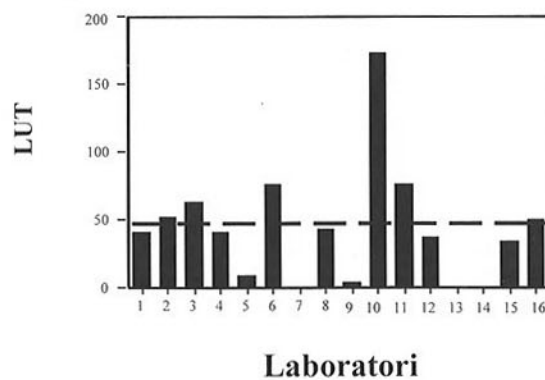
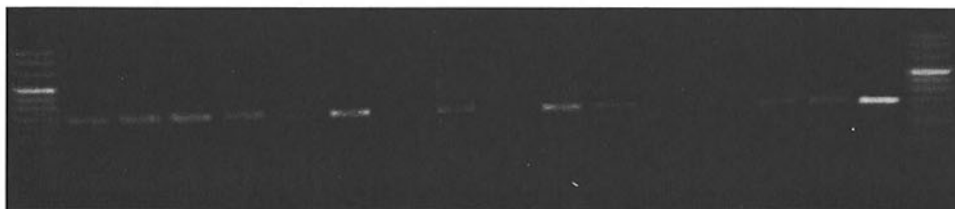


Figura VIII

Risultato dell'analisi elettroforetica e densitometrica dei prodotti di PCR ottenuti dopo amplificazione del DNA estratto dal Campione di sangue con la coppia di Primers 2

CAMPIONE: PRIMERS 3

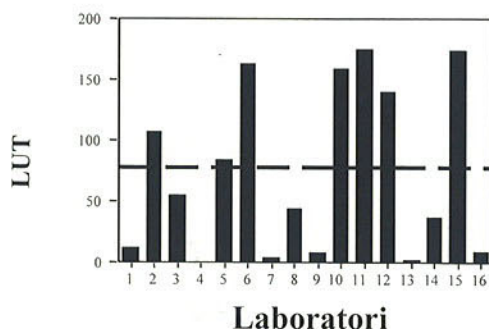
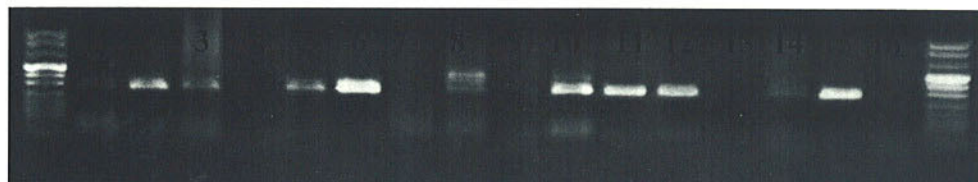


Figura IX

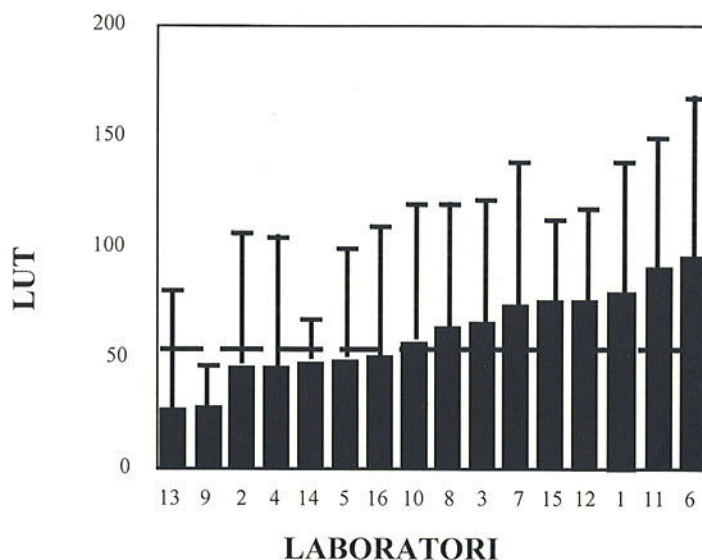


Figura X

Risultato del valore densitometrico medio per ogni laboratorio, ottenuto dalla media di tutti gli esperimenti sopra riportati

decisivo.

- l'utilizzatore è chiamato a fornire, come risultato dei suoi procedimenti, non solo un dato numerico ma anche un'aliquota del prodotto, che può essere valutato insieme a quello degli altri laboratori, in maniera da fornire un dato di confronto (media di consenso).

Quest'ultimo aspetto è sicuramente quello che presenta ancora maggiori problemi, come per esempio la garanzia della stabilità dei prodotti di PCR durante la spedizione. Infatti si assiste ad una certa discordanza (limitatamente

però a solo pochi casi) tra il dato riportato dai partecipanti e quello da noi ottenuto all'analisi simultanea di tutti i campioni.

Il tipo di analisi effettuata, relativamente alle medie di consenso dei singoli esperimenti, permette di tracciare un andamento facilmente interpretabile della variabilità dei dati ottenuti in ogni laboratorio. Il risultato globale invece, basandosi sulla media dei risultati ottenuti in 6 diversi protocolli di amplificazione, permette una stima della resa media di amplificazione.

RINGRAZIAMENTI

Il programma ha ricevuto il patrocinio della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, del CNR e della Sezione Italiana della European Ligand Assay Society.

La Polymed spa ha partecipato attivamente alla realizzazione di questa prima fase del programma.

Si ringraziano infine i seguenti laboratori che cortesemente hanno aderito a questo prima fase sperimentale (in ordine alfabetico):

- Centro Trasfusionale Marina Militare di La Spezia
- U.O. Chimica e Microscopia Clinica-Centro Rif. Regionale, Firenze
- Dasmelab, Unità Biologia Molecolare, Università Federico II, Napoli
- U.O. Bersagli Molecolari, Ist. Nazionale Tumori, Milano
- Istituto di Biologia Cellulare, Roma
- Dip Biologia Molecolare, Università di Siena
- Lab Analisi Chimico Clinico e Microbiologia, Az. Osp. San Paolo, Milano
- Lab Cardiologia Molecolare, Ospedale di Massa
- Lab di Genetica Medica, Università di Firenze

- Lab di Malattie Neurometaboliche, Ospedale Pediatrico Meyer, Firenze

- Dip di Medicina di Laboratorio, Ospedale di Padova

- Lab di Medicina Molecolare, ICGEB, Trieste

- Lab di Microbiologia e Virologia, Ospedale Forlanini, Roma

- Lab di Virologia, Policlinico di Modena
- Genedia, Lucca
- Genedia, Napoli

BIBLIOGRAFIA

1. Neumaier M, Braun A, Wagener C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. *Clin Chem* 1998;44:12-26.
2. Braun A, Deufel T, Geilenkeuser W-J, Neumaier M, Röhle G, Roscher A, Wagener C. External quality assessment of molecular biology-based methods used in laboratories of clinical chemistry and human genetics. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:231-234.
3. Orlando C, Sestini R, Zentilin L, Gelmini S, Pinzani P, Giacca M, Pazzagli M. Image analysis in quantitative PCR. An application for the measurement of c-erbB-2 amplification in DNA from human tumors. *J Biolum Chemilum* 1994;9:223-228.