

118

CONFRONTO TRA SISTEMI DIAGNOSTICI MOLECOLARI PER LA DEFINIZIONE DELLA VIRAL LOAD DI HCV: COBAS AMPLICOR MONITOR HCV 2.0, VERSANT B-DNA HCV 3.0, E COBAS TAQMAN HCV

Ravanini P.¹, Milano F.², Caviglia F.³, Grossini E.¹, Nicosia A.M.¹, Crobu M.G.¹, Cagliano M.¹, Cusaro C.¹

¹Azienda "Ospedale Maggiore della Carità" - Novara
- Laboratorio Microbiologia e Virologia
²P.O. Sant'Andrea - Vercelli - Laboratorio di Microbiologia

Introduzione. La viremia di HCV-RNA è un parametro importante per impostazione e monitoraggio della terapia. Il dosaggio della viremia viene effettuato con metodi di PCR quantitativa end-point, di Branched-DNA, e nuovi metodi in PCR Real-Time. La definizione dello standard internazionale in U.I. ha avuto lo scopo di permettere la comparazione tra i risultati ottenuti dai differenti tests e di utilizzare i risultati di viremia indipendentemente dal test.

Metodi. In questo lavoro abbiamo verificato la possibilità di ottenere risultati comparabili con differenti tests, mediante due studi di confronto. Il primo ha confrontato i tests Versant HCV 3.0 e Cobas Monitor HCV 2.0, su 44 campioni con differenti genotipi. Il secondo ha confrontato i tests Versant HCV 3.0 e Cobas TaqMan HCV (70 campioni).

Risultati. Nel primo studio la media delle differenze ha fornito un valore di 1,22. Nel secondo confronto i valori forniti da Cobas TaqMan sono in media superiori di 7,39 volte rispetto a Versant HCV. I casi con differenza >0.5 Log nel primo confronto sono 5/44 (11%), mentre nel secondo sono 60/70 (86%).

Nel primo studio vi è ottima corrispondenza per i casi di genotipo 1 (ratio 0,99), mentre la differenza è più evidente per altri genotipi (genotipo 2: ratio 1,86 - genotipo 3: 1,46 - genotipo 4: 0,79). Nel secondo confronto, l'unico genotipo con differenze accettabili (<0.5 Log) è il genotipo 4, con differenza media di 2,0 volte. Gli altri genotipi presentano differenze non accettabili (genotipo 1: ratio 7,87; genotipo 2: 6,30; genotipo 3: 13,11).

Conclusioni. Vi sono quindi importanti differenze tra risultati ottenuti con i metodi Versant HCV e Cobas TaqMan (nell'86% differenze non accettabili). Le differenze risultano minori nel confronto tra Versant HCV e Cobas Monitor. Persistono inoltre importanti differenze di dosaggio a seconda del genotipo, maggiori nel secondo confronto. E' quindi peggiorata la possibilità di confronto dei risultati. I metodi b-DNA e Cobas Monitor sono più correlati tra loro e allo standard internazionale; mentre il sistema di Real-Time presenta differenze maggiori. La standardizzazione dei nuovi metodi non sembra quindi ancora conclusa. Riteniamo che vada ripresa per i metodi Real-Time, che per ora non sembrano confrontabili con altri sistemi standardizzati.

119

DIAGNOSI E TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DELL'HPV

Rimini E., Solinas M.L., Pinna A., Marogna M., Rubattu L.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche ASL I - Sassari,
Via Monte Grappa 82, 07100 Sassari

Introduzione. Nelle donne la persistenza di infezione da HPV ad alto rischio aumenta la probabilità di sviluppare carcinoma cervicale; pertanto è utile un test di biologia molecolare che identifichi precocemente tali virus anche in soggetti asintomatici. Abbiamo testato campioni di cellule cervicali provenienti da donne con e senza sintomi, con un test di amplificazione per la rilevazione dell'HPV ad alto rischio e successiva genotipizzazione per HPV a basso, medio e alto rischio.

Materiali e metodi. Sono stati analizzati 96 campioni di cellule cervicali, raccolte in terreno liquido (Thin-prep). I campioni sono stati processati con il test "Amplicor HPV" (Roche) che amplifica il DNA bersaglio, utilizzando primers specifici per la regione polimorfica del gene L1 dell'HPV ad alto rischio (amplicone da 165 bp). Nella miscela di reazione sono inoltre presenti primers per l'amplificazione del gene della β -globina umana (amplicone da 268 bp) per fornire un controllo su idoneità, estrazione ed amplificazione delle cellule. Al termine della reazione, il DNA viene denaturato e successivamente ibridato con sonde oligonucleotidiche infine rivelato colorimetricamente su piastra.

I campioni di DNA estratti sono stati in seguito genotipizzati col test "Linear Array HPV Genotyping Test" (Roche). Il test permette di identificare 37 genotipi virali HPV a basso, medio ed alto rischio.

Risultati. Il 25% dei campioni è risultato positivo per HPV ad alto rischio ed ha confermato alla successiva genotipizzazione; un campione, negativo alla PCR per HPV ad alto rischio, è risultato positivo alla genotipizzazione per HPV a basso rischio (genotipi virali: 40 e 62).

Successivamente si è visto che la paziente presentava sintomi clinici.

Conclusioni. Dai dati preliminari, si evince che il test in biologia molecolare è sensibile, specifico e non invasivo per determinare la presenza di un'infezione cervicale attiva sostenuta da HPV. I risultati ottenuti erano in accordo con la diagnosi clinica.

Il prelievo in terreno liquido permette di conservare i campioni per diverse settimane, offrendo la possibilità di ripetizioni o analisi aggiuntive.

Inoltre la tipizzazione dell'HPV in soggetti citologicamente negativi può ridefinire gli intervalli di screening.

L'impiego di questo test in biologia molecolare è ancora utilizzato in specifici ambiti; un impiego come test di screening primario richiederebbe l'utilizzo di procedure automatizzate, standardizzate e di costo contenuto. Una maggiore diffusione ed automazione spinta di queste tecniche molecolari probabilmente porterà in tempi brevi ad un rapporto costo-efficacia sostenibile.