

P189

VALUTAZIONE DEL DOSAGGIO ABBOTT LCx HCV-RNA QUANTITATIVO

Malizia T.¹, Giannotti A.¹, Vanni M.¹, Lico S.¹, Avena S.¹, Comastri G.², Pulvirenti F.R.², Thamm S.³, Campa M.¹, Ceccherini-Nelli L.¹

¹Dipartimento di Patologia Sperimentale B.M.I.E., U.O. di Microbiologia Universitaria, AOUP, Pisa. Abbott Molecular Diagnostics, ²Roma, ³Wiesbaden.

Obiettivo.

Il crescente impiego di regole di interruzione della terapia basate sulla diminuzione dei livelli virali pre-trattamento, impone l'adozione di test che uniscano alla precisione un ampio range dinamico. Abbiamo valutato le prestazioni del dosaggio Abbott LCx HCV RNA Quantitativo, con range dinamico compreso tra 23 e 2.300.000 UI/mL, basato su estrazione con colonne QIAmp, RT-PCR competitiva e rilevazione automatica MEIA su analizzatore LCx (tempo totale di esecuzione di 24/48 campioni: 6/7 ore).

Metodi.

Accuratezza, precisione e linearità sono state stabilite con pannello Acrometrix (50, 500, 50.000, 500.000, 1.000.000 UI/mL) mediante 24 repliche per ogni livello (4 x 6 sessioni).

La riproducibilità è stata inoltre valutata sui controlli positivi basso ed alto (CP1 e CP2) del kit, analizzati in ogni sessione. 101 campioni di donatori di sangue, negativi per anti-HCV e HCV-RNA, sono stati impiegati per verificare la specificità. Per la correlazione sono stati analizzati 210 campioni retrospettivi selezionati dalla routine e testati con Cobas Monitor (range dinamico 600 - 500.000 UI/mL).

Risultati.

Il CV totale (log UI/mL) per il pannello era compreso tra 2,7% e 9,2% e per CP1 e CP2 era di 4,3% e 3,4% rispettivamente. La retta di regressione lineare tra valori LCx (y) e attesi (x) era $y = 1,13x - 0,48$ ($R^2 = 0,9966$). La frequenza di rilevazione a 50 UI/mL è risultata del 52% (12/23), mentre il 79% delle repliche a 1.000.000 di UI/mL, era nel range dinamico. La specificità era del 99% (100/101); l'unico campione inizialmente reattivo (26 UI/mL), era negativo alla ripetizione. 37 campioni (17,6% del totale) con risultato Monitor > 500.000 UI/mL, erano nel range dinamico di LCx, mentre solo 6 campioni (2,8%) erano > 2.300.00 con LCx e nel range con Monitor. 9 campioni < 600 UI/mL con Monitor, positivi al test qualitativo, erano dosabili con LCx (range 85-676 UI/mL).

Il coefficiente di correlazione r tra LCx e Monitor (74 risultati misurabili per entrambi) era 0,908. Nessun campione ha mostrato differenza superiore a 1 log (media Monitor-LCx = 0,03 log).

L'analisi delle differenze ha mostrato una tendenza del metodo LCx a fornire risultati più elevati per valori superiori a 5,5 log (circa 300.000 UI/mL).

Conclusioni.

Il test Abbott LCx HCV ha mostrato eccellenti precisione e linearità e una buona specificità. Il test ha correlato bene con il dosaggio di confronto, e il più ampio range dinamico si è tradotto - nella casistica analizzata - nel 19% circa in più di risultati refertabili (4% < 600 UI/mL e 15% > 500.000 UI/mL).

Sebbene basato su una RT-PCR convenzionale, il test può rappresentare un avanzamento nell'analisi di HCV-RNA, permettendo in teoria di utilizzare un unico dosaggio con duplice scopo qualitativo-quantitativo.

P190

MONITORAGGIO DI SOGGETTI CON EPATITE CRONICA DA HBV IN TERAPIA CON LAMIVUDINA: VALUTAZIONE DI DUE METODI PER LA RICERCA DI MUTAZIONI ASSOCIATE A RESISTENZA

Marcante R.; Panozzo P.; Pianalto N.; *Carlotto A.; °Colombo L.; Cavedon G.

Unità semplice di Virologia-Laboratorio Analisi O.C. SCHIO (VI)
* U.O. Malattie Infettive O.C. SCHIO
° Meridian S.r.l.

Il trattamento mediante lamivudina di soggetti con epatite cronica da HBV, se da un lato ha come iniziale effetto una rapida caduta del viral load e una normalizzazione delle transaminasi, spesso comporta la comparsa di mutanti resistenti al farmaco. Questo avviene soprattutto nei trattamenti di lunga durata anche se, nella nostra esperienza, periodi di 6-8-mesi di somministrazione del farmaco possono portare alla selezione di mutanti resistenti. Le mutazioni prevalenti sono localizzate in poche posizioni del gene della polimerasi e sono evidenziate dalle note sostituzioni aminoacidiche nei codoni 528 e 552. La frequenza e rapidità con cui tali mutazioni possono comparire rendono pertanto necessario un monitoraggio continuo della terapia mediante un utilizzo combinato di test per la determinazione del livello di viremia e la ricerca di eventuali mutazioni. In questo studio sono riportati i risultati del follow-up di 9 pazienti maschi, di età compresa tra 29 e 78 anni, in terapia con 100 mg x 2/die di lamivudina per epatite cronica da HBV. Il viral load è stato eseguito ogni due mesi dopo l'inizio del trattamento mediante il test quantitativo **affigene HBV VL (Sangtec Molecular Diagnostics)** assieme alla determinazione di altri parametri biochimici tra i quali le transaminasi. In tutti i pazienti abbiamo osservato una iniziale caduta del livello di viremia al di sotto del limite di sensibilità del metodo assieme alla normalizzazione delle transaminasi. Nei 7 pazienti in cui si è osservato un ritorno alla positività del livello di viremia è stata eseguita la ricerca di mutanti resistenti con l'impiego di due diversi metodi commerciali: **INNO-LiPA HBV DR (Innogenetics)**, basato su una reazione di ibridizzazione inversa, e **affigene HBV DE/3TC (Sangtec Molecular Diagnostics)** che utilizza una nuova tecnologia di minisequenziamento su micropiastre e rivelazione immunoenzimatica. In tutti questi pazienti è stato possibile dimostrare la presenza, con entrambi i metodi, di una o più mutazioni nei codoni 528 e 552 in presenza di livelli anche bassi di viremia e in alcuni casi con transaminasi ancora nella norma. Le mutazioni in questi pazienti sono comparse tra 6 e 12 mesi dall'inizio della terapia. Dopo sospensione della terapia si è assistito ad un rapido aumento della viremia in tutti i pazienti. I due test per la ricerca di mutanti resistenti eseguiti su campioni prelevati 3-4 mesi dopo la sospensione della terapia hanno invece fornito risultati discordanti. In tutti i campioni il test INNO-LiPA HBV DR ha evidenziato un completo ritorno al fenotipo selvaggio mentre il test affigene HBV DE/3TC rivelava ancora la presenza di fenotipo mutato in 4 di questi facendo ipotizzare una maggiore sensibilità del test affigene nel rilevare una più piccola percentuale di popolazione mutata. Entrambi i tests sono risultati determinanti, assieme al dosaggio del viral-load, nella precoce individuazione di mutanti resistenti e la loro utilità diagnostica potrebbe ulteriormente aumentare con l'impiego di nuovi farmaci (adefovir) che sembrano dare promettenti risultati nel limitare la replicazione di ceppi mutati resistenti alla lamivudina.