

VALUTAZIONE DI UN NUOVO SAGGIO PER LA QUANTIFICAZIONE DELL'HBV-DNA INTRAEPATICO TOTALE IN PAZIENTI CON INFEZIONE CRONICA DA HBV

R. Salpini¹, L. Piermatteo¹, V. Svicher¹, U. Gill², F. Stazi³, T. Guenci³, P.T. Kennedy², C.F. Perno¹, M. Ciotti³

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale e Chirurgia, Università di Roma Tor Vergata, Roma, Italia

²Hepatology, Centre for Immunobiology, Blizard Institute, Barts and The London SMD, QMUL, London, United Kingdom

³Laboratorio di Virologia Molecolare, Policlinico Tor Vergata, Roma

INTRODUZIONE

Attualmente non sono disponibili test standardizzati per la quantificazione dell'HBV-DNA intraepatico, parametro clinico importante per definire l'entità dell'infezione a livello epatico. L'obiettivo dello studio è stata la messa a punto di un test quantitativo per la misurazione intraepatica dell'HBV DNA totale mediante una modifica del test COBAS®Ampliprep/COBAS®TaqMan HBV, v2.0 (Roche).

METODI

L'HBV-DNA è stato estratto da 10 mg di biopsia epatica mediante DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen). Per validare la metodica è stato usato il plasmide pAM6 (ATCC®45020D™) alle concentrazioni di 6.3 log UI, 5.3 log UI, 4.3 log UI, 3.3 log UI, 2.3 log UI, 1.3 log UI e 5 UI e diluizioni seriali di HBV DNA tra 6 log UI ed 1 log UI di un paziente di riferimento. L'HBV-DNA intraepatico è stato quantificato in 50 biopsie, ottenute da pazienti con epatite cronica B HBeAg -, HBV-DNA sierico mediano (IQR) di 3.7 (2.6-5.0) log UI/ml e diversi genotipi di HBV [D (52%), C (28%), A (10%), B (6%) ed E (4%)]. Sia gli standard che l'HBV intraepatico sono stati quantificati utilizzando un protocollo modificato del test COBAS: 10 µL di standard o DNA estratto sono stati diluiti in 790 µL di siero negativo per raggiungere il volume richiesto dallo strumento ed amplificati in triplicato in due corse separate. Tutte le concentrazioni di HBV DNA intraepatico totale sono state convertite in UI/mg di tessuto epatico, considerando la quantità di tessuto epatico (10 mg), il volume di eluizione (100 µL), e la quantità di estratto (10 µL) utilizzati per la quantificazione.

RISULTATI

Sia per lo standard che per il paziente di riferimento è stata osservata un'ottima corrispondenza lineare tra valori attesi ed ottenuti (rispettivamente $R^2=0.994$, $R^2=0.962$), indicativa di una buona accuratezza e riproducibilità del metodo. La differenza tra il valore medio di HBV DNA dei tre diversi esperimenti ed il valore atteso è stato sempre <0.2 log UI per il plasmide e <0.5 log UI/mg per il paziente di riferimento. La riproducibilità inter-test analizzata in due corse separate è risultata elevata, con differenze tra i valori ottenuti mai >0.3 log UI. La concentrazione plasmidica più bassa (5 UI) è risultata rilevabile (<20 UI) in 2/4 casi mentre per il paziente di riferimento, il limite inferiore testato (1 log UI/mg) è stato sempre rilevato (<20 UI/mg) in 6 diverse misurazioni.

Nelle 50 biopsie epatiche analizzate in duplicato, l'HBV DNA è stato rilevato in tutti i campioni a concentrazioni comprese tra 1.7 log (UI/mg) e 5.4 log (UI/mg), con deviazione standard mediana (IQR) di 0.06 (0.02-0.09), dimostrando buona linearità e riproducibilità del test. Si è inoltre osservata un'ottima correlazione positiva tra i livelli di HBV-DNA sierico ed intraepatico ($Rho=0.59$, $p<0.001$).

CONCLUSIONI

Il protocollo modificato del test COBAS® Ampliprep/ COBAS® TaqMan HBV, v2.0 si è dimostrato altamente sensibile e riproducibile con promettenti applicazioni in ambito clinico. Sarà interessante studiare il valore predittivo di questo test nei pazienti con epatite cronica B a più elevato rischio di epatocarcinoma e valutare la sua capacità di rilevare livelli di replicazione intraepatica residua nei pazienti con viremia sierica non rilevabile.