

TIPIZZAZIONE DEI GENOTIPI 1-7 DEL VIRUS DELL'EPATITE C (HCV): SVILUPPO DI UN NUOVO TEST MOLECOLARE

K. Bortolozzo¹, A. Renesto¹, E. Vicari⁴, A. Gani¹, I. Zancan³, M. Santantonio¹, R. Costacurta¹, D. Paladin¹, L. Cavalletto², L. Chemello²

¹AB ANALITICA srl, Via Svizzera 16, 35127 Padova, Italia

²Dipartimento di Medicina-DIMED, Ospedale Universitario di Padova, Italia

³Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova, Italia

⁴GeneticLab, Via Corte Ferrighi, 16/B, 36025 Noventa Vicentina (VI), Italia

INTRODUZIONE

La genotipizzazione di HCV, anche con l'avvento degli antivirali di nuova generazione, permane un'informazione essenziale per una più efficiente gestione clinica della terapia.

Nell'ambito del presente studio sono state verificate le prestazioni di un nuovo dispositivo diagnostico RT-PCR/Reverse Line Blot (RLB) per la tipizzazione di HCV (AMPLIQUALITY HCV TYPE PLUS, AB ANALITICA). Il dispositivo assicura una accurata assegnazione dei genotipi HCV 1 e 6 (sottotipi c-v) e dei sottotipi virali HCV 1a e 1b, grazie all'utilizzo di due regioni target (5'UTR e CORE) e all'ausilio di un software dedicato all'interpretazione dei risultati. La presenza di un controllo interno ad RNA (IC RNA) offre utili indicazioni sulla qualità dell'RNA estratto e su eventuali fenomeni di inibizione della reazione di retrotrascrizione.

METODI

Il lavoro è stato condotto su 172 campioni di siero e plasma di pazienti HCV positivi e su 155 campioni HCV negativi. L'estrazione dell'RNA è stata eseguita sulla stazione automatizzata GENEQUALITY X-120 utilizzando il kit GENEQUALITY X-120 PATHOGEN (AB ANALITICA) ed aggiungendo a ciascun campione l'IC-RNA nella fase iniziale di lisi. L'RNA estratto è stato utilizzato per la determinazione del genotipo virale mediante retrotrascrizione delle regioni 5'UTR e CORE e loro successiva tipizzazione RLB; in parallelo tutti i campioni positivi sono stati sequenziati nella regione NS5b. Costrutti sintetici sono stati impiegati per valutare le performance di specificità analitica di genotipi rari come i sottotipi HCV 7a, 6c, 6l, 6n, 6d e 6e. Infine, il possibile effetto sul test di sostanze interferenti è stato testato sia per sostanze endogene (lipidi, bilirubina, emoglobina) che per i farmaci (Peg-IFN e Ribavirina).

RISULTATI

La capacità del test di assegnare esattamente il genotipo è stata valutata sulla base dei risultati del sequenziamento della regione NS5b ed è risultata del 100%. Separatamente è stata analizzata la capacità di identificare correttamente i sottotipi a e b del genotipo HCV 1, che è risultata pari al 99%. Non è stata rilevata alcuna interferenza da parte delle sostanze endogene e dei farmaci presi in esame.

CONCLUSIONI

Il kit AMPLIQUALITY HCV TYPE PLUS possiede sensibilità e specificità idonee al suo utilizzo nella pratica diagnostica, per la tipizzazione dei genotipi 1-7 di HCV e per la corretta assegnazione dei sottotipi a e b del genotipo HCV 1. La presenza di un controllo interno ad RNA risulta un utile strumento per il monitoraggio della presenza di eventuali inibitori nell'estratto. La caratterizzazione genotipica si può dimostrare molto utile nella scelta più costo/efficace dei nuovi farmaci antivirali da impiegare per il trattamento dell'epatite C.