

## FULL PAPERS /LAVORI ORIGINALI

# Real-time PCR per HBV DNA: valutazione del nuovo sistema automatizzato COBAS AMPLIPREP™/COBAS TAQMAN™ HBV

**Tiziano Allice<sup>1\*</sup>, Francesco Cerutti<sup>1</sup>, Fabrizia Pittaluga<sup>1</sup>, Silvia Varetto<sup>1</sup>, Silvia Gabella<sup>1</sup>, Alfredo Marzano<sup>2</sup>, Alessandro Franchello<sup>2</sup>, Valeria Ghisetti<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>S.C. Microbiologia, Ospedale Molinette, Azienda Ospedaliera San Giovanni Battista di Torino

<sup>2</sup>Dipartimento di Gastroenterologia e Centro dei Trapianti di fegato, Ospedale Molinette, Azienda Ospedaliera San Giovanni Battista di Torino

**Key words:** HBV, Real-time PCR, quantification

**Evaluation of the new automated Real-time PCR assay COBAS AMPLIPREP™/COBAS TAQMAN™ for HBV DNA quantification**

### ABSTRACT

Success of antiviral therapy for chronic hepatitis B is supported by highly sensitive PCR-based assays for Hepatitis B virus (HBV) DNA. Nucleic acid extraction from biologic specimens is technically demanding and reliable PCR results depend on it. Performances of the fully automatic system COBAS AmpliPrep™/COBAS TaqMan™ 48 (CAP/CTM) (Roche, Branchburg, NJ) for HBV DNA extraction and real-time PCR quantification were assessed and compared with the end-point PCR COBAS AMPLICOR HBV Monitor (CAHBM, Roche). Analytical evaluation with a proficiency panel showed that CAP/CTM quantitated HBV DNA levels in one single run over a wide dynamic range (7 logs) with a close correlation between expected and observed values ( $r=0.976$ , interassay variability below 5%). Clinical evaluation as tested with samples from 92 HBsAg-positive patients, demonstrated excellent correlation with CAHBM ( $r=0.966$ , mean difference in quantitation:  $0.36 \log_{10}$  IU/ml). CAP/CTM detected 10% more viremic patients and longer period of residual viremia in those on therapy. In lamivudine (LAM)-resistant patients, reduction of HBV DNA after 12 months of Adefovir (ADF) was higher in the combination (LAM+ADF) schedule than in ADF monotherapy (5.1 vs. 3.5 logs) suggesting a benefit in continuing LAM. In conclusion, CAP/CTM can improve the management of HBV infection, the assessment of antiviral therapy and drug resistance, supporting further insights in the emerging area of drug resistance.

### INTRODUZIONE

L'infezione da virus dell'epatite B (HBV) è una delle principali cause di epatite cronica. Nel mondo circa 2 miliardi di persone sono infettate da HBV e più di 350 milioni hanno un'infezione persistente e cronica (22), grazie all'esistenza dello stato di portatore asintomatico del virus. I portatori di HBV presentano un alto rischio di sviluppare importanti sequele quali cirrosi epatica e carcinoma epatocellulare, che, in paesi a moderata prevalenza di infezioni da HBV, come l'Italia, sono responsabili di circa il 25% delle indicazioni al trapianto di fegato (15). Recenti progressi della terapia antivirale, basata sullo sviluppo di potenti analoghi nucleot(s)idici, hanno migliorato notevolmente la gestione del paziente con epatite cronica da virus dell'epatite B e di quelli avviati al trapianto per cirrosi scompensata, incrementando la possibilità di prevenire la reinfezione e la recidiva virale nel post-trapianto.

I test molecolari per il monitoraggio della carica virale di HBV (HBV DNA) permettono la defini-

zione dell'attività dell'infezione del virus epatitico contribuendo alla selezione dei pazienti da sottoporre a trattamento; inoltre il loro utilizzo risulta essere fondamentale per la definizione dell'efficacia della terapia e per l'individuazione della farmacoresistenza del virus (20, 22).

Sono disponibili in commercio diversi saggi per HBV DNA basati sulla reazione di Polymerase Chain Reaction (PCR). Tra questi, quelli di più recente introduzione sono in grado di quantificare nella fase esponenziale della reazione di amplificazione (real-time PCR) e non come le tecniche end-point PCR nella fase di plateau, presentando perciò una maggiore sensibilità associata ad un più ampio range dinamico (2, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 16, 17, 19, 23). Nei test molecolari risulta fondamentale e particolarmente delicata la fase di preparazione dei campioni in quanto passaggio particolarmente influente nella affidabilità del risultato finale e in cui è maggiore la possibilità di contaminazione; ciò giustifica la disponibilità sempre maggiore di reagenti pronti all'uso e di sistemi

semi o completamente automatici per l'esecuzione di questa procedura.

È di recente introduzione un sistema totalmente automatizzato, COBAS AmpliPrep™/COBAS TaqMan™ HBV (CAP/CTM HBV) (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ), per la ricerca quantitativa di HBV DNA, che consiste di due piattaforme integrate: COBAS AmpliPrep™ per l'estrazione automatizzata di acidi nucleici da campioni di plasma e COBAS TaqMan™ 48 per l'amplificazione di HBV mediante real-time PCR con tecnologia TaqMan (5, 19). Rispetto ad altri saggi basati sulla reazione di real-time PCR, questo sistema presenta uno standard interno valido sia per la quantizzazione virale sia per il monitoraggio dell'efficienza dell'intero processo e un sistema per la prevenzione di contaminazione da carry-over (Amperase). Il sistema CAP/CTM, adattabile a serie di numerosi campioni, si è dimostrato in grado di quantizzare il virus dell'epatite B in modo indipendente dal genotipo virale (5, 14, 19).

In questo studio sono state valutate le caratteristiche analitiche e cliniche del sistema CAP/CTM per HBV DNA e confrontate con il saggio convenzionale di riferimento basato sul metodo di end-point PCR, COBAS AMPLICOR HBV Monitor™ (CAHBM) (Roche Molecular Systems, Inc, Branchburg, NJ), in uso da tempo nel nostro Centro. La sensibilità analitica e la precisione sono state stimate analizzando un pannello di plasmidi a concentrazione nota di HBV DNA, mentre la correlazione e le differenze nella quantizzazione del DNA sono state determinate su campioni derivanti da pazienti con epatite cronica da HBV, con particolare attenzione alla cinetica di HBV DNA nei pazienti sottoposti a terapia con antivirali singoli e in combinazione.

## MATERIALI E METODI

**Valutazione analitica.** La valutazione del saggio è stata eseguita analizzando un pannello di HBV DNA formato da 12 campioni con concentrazioni da  $2$  a  $10^9$  unità internazionali (UI) per ml (AcroMetrix, Benicia, CA). Ogni standard è stato testato in tre prove eseguite in giorni differenti, ed è stato valutato il coefficiente di variazione (CV%) interassay.

**Valutazione clinica.** Ottantuno campioni di plasma derivati da 81 pazienti HBsAg-positivi, HBeAg negativi/anti-HBe-positivi con epatite cronica HBV-correlata, sono stati sottoposti alla ricerca di HBV DNA mediante metodo quantitativo di routine CAHBM(,) e mediante il sistema CAP/CTM. I test sono stati effettuati parallelamente su campioni conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Il confronto tra le due metodiche è stato effettuato considerando inoltre un secondo gruppo di campioni di plasma provenienti da 11 pazienti**

**HbsAg-positivi (10 anti-HBe positivi, 1 HBeAg positivo) con epatite HBV-correlata, che nel corso della terapia avevano sviluppato resistenza alla lamivudina (LAM) e quindi sottoposti a terapia antivirale con lamivudina associata ad adefovir (ADF) (5 pazienti) oppure solamente con ADF (6 pazienti). I pazienti sono stati seguiti per un periodo medio di 542 giorni (377,974 giorni) dopo l'introduzione dell'antivirale ADF, e la viremia è stata valutata ogni 3 mesi per un totale di 71 campioni di plasma analizzati.**

**Test molecolari per HBV DNA.**

**COBAS AmpliPrep™/COBAS TaqMan™ HBV (CAP/CTM HBV).** CAP/CTM HBV è un sistema costituito da due piattaforme: la prima, per l'estrazione automatizzata degli acidi nucleici, basata sull'affinità degli stessi per il gel di silice adeso a biglie magnetiche, la seconda piattaforma, per l'amplificazione e quantizzazione del virus dell'epatite B, utilizza una real-time PCR con tecnologia TaqMan e primers specifici per la regione pre-core/core di HBV. Il DNA viene estratto a partire da  $1050\ \mu\text{l}$  di plasma; durante l'estrazione si ha l'aggiunta di uno standard interno di quantizzazione (internal quantitation standard, QS) che è costituito da un costrutto non infettivo contenente frammenti di sequenze virali leganti i primers specifici per HBV(,) ma con un probe di identificazione diverso da quello per HBV. Dopo eluizione del DNA ad alta temperatura ( $80^{\circ}\text{C}$ ), un braccio robotizzato carica l'acido nucleico in microprovette che contengono la master mix di PCR, preparata per ogni campione dallo stesso braccio robotizzato. Segue l'amplificazione mediante real-time PCR in saggio multiplex di HBV e del QS. I risultati sono espressi in unità internazionali per ml (UI/ml) con un fattore di conversione di 5.82 copie per 1 UI. La prevenzione della contaminazione da carry-over e l'integrità del campione sono garantiti dall'uso del sistema Amperase basato sull'incorporazione di uracil-N-glycosilasi e deossitridina-trifosfato (dUTP) nella mix di amplificazione (12). La sensibilità di CAP/CTM è di 12 UI/ml con un range dinamico pari a 54,  $1.1 \times 10^8$  UI/ml ed il sistema è disegnato per l'estrazione di 24 campioni di plasma in circa 2 ore (5, 17).

**COBAS AMPLICOR HBV Monitor (CAHBM).** COBAS AmpliPrep™ HBV Monitor System è un test per la quantizzazione di HBV DNA mediante end-point PCR. Il sistema richiede l'estrazione manuale del DNA virale a partire da  $100\ \mu\text{l}$  di plasma e la coamplificazione di una regione del gene pre-core/core di HBV e di uno standard di quantizzazione interno (QS) aggiunto in concentrazione nota nella fase di estrazione. La sensibilità del sistema è di 200 copie/ml ( $\sim 74$  UI/ml, fattore di conversione pari a 2.7 copie/UI) con un range lineare fino a 200.000 copie/ml. I campioni al di sopra del limite

superiore del range dinamico devono essere ritestati nella diluizione 1:100.

**Mutazioni di HBV (geni mutanti della polimerasi).** I ceppi di HBV lamivudina-resistenti sono stati identificati con un saggio di reverse hybridization line probe assay (INNO-LIPA, Innogenetics, Ghent, Belgio) dopo aver amplificato con primers specifici i domini B e C del gene della polimerasi virale.

**Markers sierologici dell'infezione da HBV.** La sierologia di HBV è stata effettuata mediante il metodo ChLIA (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL USA).

**Analisi statistica.** La media, la deviazione standard e il coefficiente di variazione sono stati calcolati usando test statistici convenzionali. La correlazione tra CAP/CTM e CAHBM è stata valutata con analisi di regressione lineare e le differenze medie nella quantizzazione con il grafico di Bland-Altman. I valori di HBV DNA sono stati espressi come log<sub>10</sub> UI/ml.

**RISULTATI**

**Validazione analitica.** Per la validazione analitica è stato testato un pannello di 12 standard con concentrazioni di HBV DNA da 2 a 10<sup>9</sup> UI/ml. Un singolo campione per ogni standard è stato analizzato in tre giorni successivi con CAP/CTM per determinare la variazione interassay. E' stata osservata una eccellente correlazione (r= 0.976; 95%, intervallo di confidenza (CI) = 0.915,0.993) tra i valori osservati e quelli attesi, come si può osservare nella Figura I. Gli standard con valori inferiori a 12 UI/ml (N=3, corrispondenti a 2, 10 e 11 UI/ml) sono risultati negativi in tutti gli esperimenti realizzati. I coefficienti di variazione interassay ottenuti per gli standard 38 UI, 95 UI, 1.9x10<sup>2</sup> UI, 1.9x10<sup>3</sup> UI, 1.9x10<sup>4</sup> UI, 1.9x10<sup>5</sup> UI, 1.9x10<sup>6</sup> UI, 1.9x10<sup>7</sup> UI e 1.9x10<sup>8</sup> UI, erano, rispettivamente, 3.3%, 11%, 2.7%, 0%, 2.2%, 1%, 0.9%, 0.7 e 0%.

**Valutazione clinica e confronto dei sistemi.**

Sono stati analizzati 81 campioni provenienti da 81 pazienti con epatite cronica HBV-correlata, di cui 34 HBV DNA positivi e 47 HBV DNA negativi con il metodo di riferimento CAHBM. Il 90% dei campioni è risultato concordante (34 campioni concordanti positivi e 39 negativi). CAP/CTM ha identificato la presenza del DNA virale in 8 campioni risultati negativi con il test CAHBM (valori di HBV DNA da 0.3 a 2.5 log<sub>10</sub> UI/ml per CAP/CTM), come si può osservare nella Tabella 1. La correlazione tra i due test nella quantizzazione di HBV DNA è risultata eccellente (r=0.966, 95% CI = 0.9487,0.9786). L'analisi delle differenze medie di quantizzazione per determinati valori viremici ha dimostrato che la differenza media tra i due test (log<sub>10</sub> UI/ml CAHBM - log<sub>10</sub> UI/ml CAP/CTM) era di 0.36 ± 0.43 log<sub>10</sub> UI/ml (media

± DS) (Figura II). Le differenze sono risultate ancora più contenute (0.1 ± 0.4 log<sub>10</sub> UI/ml, media ± DS) se considerate nel range dinamico di CAHBM (200,200.000 copie/ml).

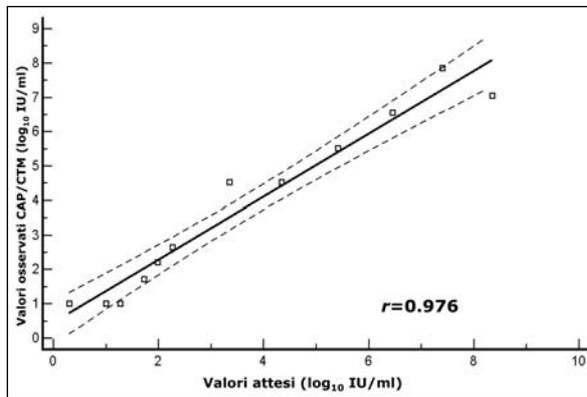
Nel secondo gruppo di studio costituito da campioni di plasma provenienti da 11 pazienti HBsAg-positivi che avevano sviluppato resistenza alla lamivudina, la carica virale è stata misurata con entrambe le metodiche a partire dalla somministrazione di ADF (valore basale) e successivamente dopo 6, 9 e 12 mesi (Tabella 2). Nei pazienti in terapia di associazione LAM+ADF (n=5) si è verificata una marcata riduzione dei livelli di HBV DNA nell'arco di 12 mesi di trattamento: 3.5 log<sub>10</sub> UI/ml al 6° mese, 3.7 log<sub>10</sub> al 9° e 5.1 log<sub>10</sub> al 12° mese. Nel gruppo sottoposto a monoterapia con ADF (6 pazienti), la riduzione media di HBV DNA è stata più contenuta: 3.0 log<sub>10</sub> al 6° mese, 3.6 al 9° mese e solo 3.1 log<sub>10</sub> al 12°mese. Questo dato suggerisce una maggior efficacia della terapia di associazione (introduzione di ADF con mantenimento della lamivudina) rispetto alla somministrazione singola di un nuovo antivirale; in presenza di ceppi resistenti, la terapia basata sulla combinazione di più farmaci, determina una più forte barriera genetica rispetto alla monoterapia. Al 12° mese, con CAP/CTM, i livelli di HBV DNA risultavano negativi in 8 su 11 pazienti (10/11 con CAHBM). Tre pazienti, di cui due in terapia combinata LAM+ADF e uno in monoterapia con ADF, erano ancora HBV DNA positivi (valori di HBV DNA: 2.5, 2.3 e 3.9 log<sub>10</sub> UI/ml, rispettivamente). CAP/CTM ha quindi identificato livelli residui di HBV DNA per un periodo più lungo rispetto a CAHBM e in un numero maggiore di pazienti.

**Tabella 1.** Confronto tra CAP/CTM e COBAS AMPLICOR HBV Monitor (CAHBM) per la ricerca di HBV DNA in un gruppo di 81 campioni di plasma da 81 pazienti HbsAg-positivi

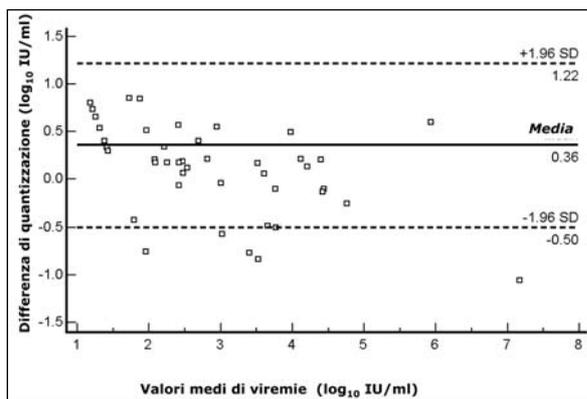
CAP/CTM (num. campioni)	COBAS AMPLICOR MONITOR (num. di campioni)	
	Positivi	Negativi
Positivi	34	8
Negativi	0	39
Totale	34	47

**Tabella 2.** Valutazione della caduta di HBV DNA (log<sub>10</sub> UI/ml) in pazienti con resistenza a lamivudina e trattati quindi con terapia di associazione (LAM+ADF, 5 pazienti) o monoterapia (ADF, 6 pazienti). La caduta viremica è stata considerata dal momento in cui il trattamento ha visto l'aggiunta di ADF o la sostituzione di LAM con ADF.

Mesi di terapia	Caduta di HBV DNA (log <sub>10</sub> UI/ml)	
	Terapia di associazione (LAM+ADF, 5 pazienti)	Monoterapia ADF, 6 pazienti
6	3.5	3.0
9	3.7	3.6
12	5.1	3.1



**Figura I.** Correlazione tra valori osservati con CAP/CTM ed attesi mediante analisi di un pannello di standard a concentrazione nota compresa tra 2 e  $10^9$  UI/ml (Acrometrix, Benicia, CA).



**Figura II.** Analisi mediante grafico di Bland-Altman delle differenze medie di quantizzazione di HBV DNA tra CAHBM e CAP/CTM per valori medi di viremia, su 81 campioni di plasma.

## DISCUSSIONE

La ricerca e quantizzazione di HBV DNA mediante test molecolari ad alta sensibilità e riproducibilità è il metodo più affidabile per il monitoraggio dell'efficacia del trattamento antivirale e dello sviluppo di ceppi resistenti ai farmaci. Infatti, il livello di HBV DNA è sia un importante indicatore di replicazione virale sia un fattore prognostico fondamentale per lo sviluppo del carcinoma epatocellulare (1, 22).

Le tecniche di quantizzazione di HBV DNA basate sulla end-point PCR hanno un range dinamico limitato, normalmente entro 4 logs, che pone problemi per la quantizzazione dei livelli medio-alti di viremia (7, 13). La tecnica di real-time PCR, disegnata in modo tale da quantizzare l'acido nucleico durante la fase esponenziale della reazione di PCR, permette di identificare e quantizzare l'acido nucleico in modo più preciso e affidabile e in un range dinamico più ampio, fino a 7-8 logs. L'affidabilità dei risultati dei test molecolari dipende principalmente dall'estrazione degli acidi nucleici dai campioni biologici (4, 9, 19). Sempre maggiore risulta essere la necessità di

standardizzare tale fase attraverso l'utilizzo di procedure automatizzate che garantiscano una quantizzazione degli acidi nucleici accurata e riproducibile, fattore indispensabile per l'applicazione clinica del dato di laboratorio.

I saggi di real-time PCR per HBV DNA disegnati su procedure di estrazione manuali, semi-automatizzate o automatizzate adatte per piccole serie di campioni, hanno dimostrato una eccellente correlazione con i sistemi di end-point PCR tradizionale (2, 6, 8, 11, 13, 16, 17). La piattaforma di real-time PCR COBAS TaqMan™ 48 per HBV DNA è stata a sua volta sperimentata con sistemi di estrazione manuali e semi-automatizzati (MagNA™ Pure per piccole serie e sistemi di estrazione generica come High Pure System Viral Nucleic Acid), risultando molto sensibile e riproducibile (4, 8, 19). Recentemente è stato allestito il sistema integrato COBAS Ampliprep™/Cobas TaqMan 48 per grandi serie, ma i dati clinici disponibili sono ancora molto pochi e la valutazione fatta nel nostro Centro è una delle prime e più complete dal punto di vista clinico (5, 14, 19).

La validazione analitica di CAP/CTM, eseguita con un pannello di sieri di HBV a concentrazione nota, ha dimostrato che CAP/CTM quantizza accuratamente livelli di HBV DNA in un ampio range dinamico (7 logs), con una buona correlazione tra valori attesi e valori osservati e una bassa variabilità interassay (coefficiente di correlazione inferiore al 5%). Rispetto a CAHBM, CAP/CTM permette di quantizzare HBV DNA in maniera precisa ed accurata fino a concentrazioni anche superiori a  $10^8$  UI/ml. Questa è una caratteristica importante dal momento che i campioni di pazienti infetti ma non sottoposti a trattamento, sono spesso caratterizzati da alti livelli di viremia, e devono essere diluiti se quantizzati utilizzando il sistema end-point PCR tradizionale. Il sistema CAP/CTM presenta una sensibilità di 12 UI/ml caratteristica che porta un notevole miglioramento rispetto alla metodica di end-point PCR (74 UI/ml) (5, 19).

La valutazione delle differenze di quantizzazione nei campioni clinici ha dimostrato che CAP/CTM ha una eccellente correlazione con CAHBM, confermando precedenti osservazioni basate però sull'applicazione e il confronto della sola piattaforma di real-time PCR Cobas TaqMan 48 associata a differenti sistemi di estrazione (4, 5, 9, 19). Le differenze medie di quantizzazione tra i due sistemi sono risultate inferiori a  $\pm 0,5$  UI/ml e anche minori, se si considerano solo i campioni con valori all'interno del range dinamico del sistema end-point PCR. Una differenza tra metodi quantitativi di  $\pm 0,5$  UI/ml è considerata clinicamente accettabile dal momento che cambiamenti dei

livelli di HBV DNA, significativi di risposta virologica precoce o di sviluppo di ceppi farmaco-resistenti, sono generalmente basati su una differenza di circa 1 log (18).

Nei pazienti con epatite B cronica sottoposti a terapia, CAP/CTM è risultato più sensibile di CAHBM, rilevando circa un 10% in più di pazienti viremici, ad un anno di terapia. L'elevata sensibilità di questa metodica è un fattore molto importante in particolare per i pazienti sottoposti a terapia in cui i bassi livelli di viremia assumono sempre maggior significato clinico per una corretta definizione della risposta e per l'identificazione dei ceppi farmaco-resistenti (1, 3, 21, 22).

In questo gruppo di pazienti, al 12° mese di terapia con ADF, il 72% dei soggetti è risultato essere al di sotto del limite inferiore di sensibilità di CAP/CTM (contro il 90% con CAHBM). È stato quindi rilevato un periodo di viremia residua più lungo, evento che permette di migliorare il management del paziente, nella direzione di una migliore definizione della risposta terapeutica, una maggiore personalizzazione dello schema di trattamento e una più precoce identificazione di ceppi farmaco-resistenti (3, 20, 21).

In conclusione, la piattaforma automatizzata CAP/CTM per il dosaggio di HBV DNA da plasma, è altamente sensibile e riproducibile, permette una quantizzazione rapida e accurata dei livelli di HBV DNA in un ampio range dinamico, e risulta adattabile a grandi serie analitiche. Questo sistema contribuisce in modo significativo alla standardizzazione delle procedure molecolari di laboratorio per la quantizzazione degli acidi nucleici virali e, sul versante clinico, al miglioramento della gestione del paziente con epatite acuta e cronica da HBV, in particolare per quanto riguarda la definizione dei pazienti da avviare al trattamento, il monitoraggio della terapia antivirale e l'individuazione precoce della farmaco-resistenza.

## BIBLIOGRAFIA

- Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, et al. REVEAL-HBV Study Group. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295: 65-73.
- Chen RW, Piiparinen H, Seppanen M, Koskela P, Sarna S, Lappalainen M. Real-time PCR for detection and quantitation of hepatitis B virus DNA. *J Med Virol* 2001; 65: 250-256.
- Fung SK, Chae HB, Fontana RJ, Conjeevaram H, Marrero J, Oberhelman K, et al. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2006; 44: 283-90.
- Gordillo RM, Gutierrez J, Casal M. Evaluation of the COBAS TaqMan 48 real-time PCR system for quantitation of hepatitis B virus DNA. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 3504-3507.
- Hochberger S, Althof D, de Schrott RG, Nachbaur N, Rock H, Leying H. Fully automated quantitation of Hepatitis B virus (HBV) DNA in human plasma by the COBAS((R)) AmpliPrep/COBAS((R)) TaqMan((R)) System. *J Clin Virol* 2006; 35: 373-380.
- Ide T, Kumashiro R, Koga Y, Tanaka E, Hino T, Hisamochi A, et al. A real-time quantitative polymerase chain reaction method for hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B treated with lamivudine. *Am. J Gastroenterol* 2003; 98: 2048-2051
- Kohmoto M, Enomoto M, Yano Y, Otani S, Minamitani S, Tamori A, et al. Detection of serum hepatitis B virus DNA by real-time quantitative polymerase chain reaction (TaqMan PCR) during lamivudine treatment: comparison with three other assays. *Hepato Res* 2003; 26: 125-133.
- Leb V, Stocher M, Valentine-Thon E, Holz G, Kessler H, Stekel H, et al. Fully automated, internally controlled quantification of hepatitis B Virus DNA by real-time PCR by use of the MagNA Pure LC and LightCycler instruments. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 585-590.
- Lindh M, Hannoun C. Dynamic range and reproducibility of hepatitis B virus (HBV) DNA detection and quantification by Cobas TaqMan HBV, a real-time semiautomated assay. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4251-4254.
- Loeb KR, Jerome KR, Goddard J, Huang M, Cent A, Corey L. High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan fluorogenic detection system. *Hepatology* 2000; 32: 626-629.
- Lole KS, Arankalle VA. Quantitation of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using internal amplification control and dual TaqMan MGB probes. *J Virol Methods* 2006; 135: 83-90.
- Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 1990; 93: 125-128.
- Mukaide M, Tanaka Y, Katayose S, Tano H, Murata M, Hikata M, et al. Development of real-time detection direct test for hepatitis B virus and comparison with two commercial tests using the WHO international standard. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1264-1271.
- Ronsin C, Pillet A, Bali C, Denoyel GA. Evaluation of the COBAS AmpliPrep-total nucleic acid isolation-COBAS TaqMan hepatitis B virus (HBV) quantitative test and comparison to the VERSANT HBV DNA 3.0 assay. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1390-9.
- Salizzoni M, Cerutti E, Romagnoli R, Lupo F, Franchello A, Zamboni F, et al. The first one thousand liver transplants in Turin: a single-center experience in Italy. *Transpl Int* 2005; 18: 1328-1335.
- Stelzl E, Muller Z, Marth E, Kessler HH. Rapid quantification of hepatitis B virus DNA by automated sample preparation and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2445-2449.
- Sum SS, Wong DK, Yuen MF, Yuan HJ, Yu J, Lai CL, et al. Real-time PCR assay using molecular beacon for quantitation of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3438-3440.
- van der Eijk AA, Niesters HG, Hansen BE, Heijntink RA, Janssen HL, Schalm SW, et al. Quantitative HBV DNA levels as an early predictor of nonresponse in chronic HBe-antigen positive hepatitis B patients treated with interferon-alpha. *J Viral Hepat* 2006; 13:

- 96-103.
19. Weiss J, Wu H, Farrenkopf B, Schultz T, Song G, Shah S, et al. Real time TaqMan PCR detection and quantitation of HBV genotypes A-G with the use of an internal quantitation standard. *J Clin Virol* 2004; 30: 86-93.
  20. Werle B, Cinquin K, Marcellin P, Pol S, Maynard M, Trepo C, et al. Evolution of hepatitis B viral load and viral genome sequence during adefovir dipivoxil therapy. *J Viral Hepat* 2004; 11: 74-83.
  21. Yeon JE, Yoo W, Hong SP, Chang YJ, Yu SK, Kim JH, et al. Resistance to adefovir dipivoxil (ADV) in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients treated with ADV. *Gut* 2006; 55: 1488-1495.
  22. Yim HJ, Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology* 2006; 43: S173-181.
  23. Zhao JR, Bai YJ, Zhang QH, Wan Y, Li D, Yan XJ. Detection of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using TaqMan-MGB probe technology. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 508-510.

**Tiziano Alice**  
Laboratorio di Microbiologia,  
Ospedale Molinette, Azienda Ospedaliera San  
Giovanni Battista di Torino,  
Corso Bramante 88 - 10126 Torino, Italia  
Tel.: 011 6334371 - Fax: 011 6335194  
E-mail: [tizall@yahoo.it](mailto:tizall@yahoo.it)