

FULL PAPERS /LAVORI ORIGINALI

Determinazione quantitativa di HCV-RNA: valutazione comparativa dei saggi Abbott Real-Time e Versant bDNA v.3

Aldo Manzin¹, Katia Marinelli², Manuela Vecchi², Paola Sestilli², F. Renato Pulvirenti³

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Sezione di Microbiologia Medica, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari

²SOD Virologia, Azienda Ospedaliera-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona, Ancona,

³Abbott Molecular, Roma

Key words: HCV, Real-Time, RT-PCR, bDNA, quantitative, viremia

Comparison of Abbott Real-Time PCR with branched DNA-Based assays for HCV-RNA quantitation.

SUMMARY

Hepatitis C virus (HCV) RNA measurement before, during and after antiviral therapy has become an essential tool in the management of interferon-based treatment of HCV-related infections. Conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) has been largely used to obtain quantitative data, but laborious, time-consuming post-PCR handling steps are required to gain valuable results. Real time (RT) PCR now provides advantages over end-point (EP) PCR due to its improved rapidity, sensitivity, reproducibility and the reduced risk of carry-over contamination, and has now proven itself to be valuable for the more precise monitoring of viral load kinetics and assessing antiviral response. The Abbott Real-Time HCV-RNA is a recently introduced assay for the automated processing of clinical samples and HCV-RNA quantitation: its basic technology relies on use of fluorescent linear probes (dynamic range using 0.5 ml as input target= $12 \cdot 10^8$ IU/mL) and a hybridization/detection step at low temperature (35°C), which allows target mismatches to be tolerated.

To determine the clinical application of the Abbott Real-Time assay and defining its correlation with the Bayer Versant bDNA v.3 assay, 68 consecutive samples from unselected HCV-infected patients were retrospectively analysed with RT and the results obtained using the two tests compared. A good correlation was found between RT-PCR and bDNA: 97% of samples tested had a result within a 0.5 log HCV IU/mL difference (bias=0.15 log), whereas 6 samples negative with bDNA gave positive results with Abbott RT (range, 1.89-3.07 log IU/mL) and "in-house" qualitative RT-PCR assays.

INTRODUZIONE

La determinazione quantitativa della viremia nei soggetti con infezione da virus dell'epatite C (HCV) è uno strumento indispensabile per la valutazione dell'efficacia della terapia antivirale ed il monitoraggio del paziente in trattamento (7, 8, 26). I valori di HCV-RNA rilevati prima e durante il trattamento di combinazione con interferone pegilato e ribavirina costituiscono parametri indispensabili per indirizzare la decisione terapeutica, in particolare nei pazienti con infezione da genotipi 1, 4 e 6 (6, 9, 11). In questi soggetti livelli basali di viremia maggiori di 30.000 UI/mL ed una riduzione dei valori riscontrati dopo 12 settimane di trattamento inferiore a 2 log rispetto ai valori iniziali sono considerati predittivi di fallimento virologico e costituiscono una indicazione ad interrompere precocemente la terapia (13, 24, 26). Nel caso di pazienti con infezione da genotipo 2 o 3 i valori pretrattamento ed una precoce riduzione della viremia già dopo 4 settimane

di terapia sono considerati altamente predittivi di risposta virologica alla terapia di combinazione (14). Infine, osservazioni recenti suggeriscono come altrettanto critico sia riuscire a stabilire parametri quantitativi per la valutazione della risposta virologica al trattamento con farmaci ad azione diretta su specifici target virali, come gli inibitori delle proteasi e della polimerasi (12, 20, 21).

Negli ultimi anni sono stati sviluppati sistemi home-made e commerciali per la rilevazione e quantificazione della viremia di HCV, e fatti tentativi per uniformare e standardizzare le diverse metodiche (4, 15, 18): in questo ambito l'espressione dei valori in unità di misura internazionali (UI) ha in qualche modo contribuito a rendere comparabili i risultati ottenuti con i diversi sistemi; tuttavia, dal momento che lo standard utilizzato viene misurato prendendo come riferimento il solo genotipo 1, sono ancora necessari studi per valutare le prestazioni dei diversi sistemi nella

quantificazione corretta di tutti i genotipi virali (16, 18).

I sistemi quantitativi del commercio ad oggi utilizzati si basano sulla tecnologia dell'amplificazione del bersaglio mediante trascrizione inversa e amplificazione (RT-PCR quantitativa e reverse-mediated amplification, TMA), ovvero sulla tecnologia di amplificazione del segnale (tecnica del DNA ramificato, bDNA) (1, 2, 4, 17, 22). Tali sistemi presentano tuttavia livelli di sensibilità e range di linearità differenti, che ne limitano l'impiego esteso per gli scopi su esposti, e costringono ad artifici tecnici che richiedono spesso laboriose manipolazioni post-amplificazione, ovvero l'ulteriore analisi dei campioni altamente viremici dopo opportune diluizioni, e l'impiego di tecniche di PCR qualitativa per ottenere livelli di sensibilità più elevati e idonei a stabilire con certezza l'esclusione della persistenza di quantità minime residue di virus circolante e valutare l'eradicazione dell'infezione (16). Inoltre, i sistemi attualmente disponibili in commercio sono in genere difficilmente automatizzabili e non esistono evidenze certe sulle prestazioni garantite nella quantificazione dei diversi genotipi.

Le metodologie di amplificazione e rilevazione in real-time hanno avuto uno sviluppo notevole in tempi recenti: il loro impiego nella quantificazione degli acidi nucleici va affermandosi come metodologia alternativa alle tecniche di amplificazione convenzionale, che hanno nella rilevazione all'end-point e nella difficoltà di automazione e standardizzazione il limite principale per una loro estesa applicazione; inoltre, le metodologie di amplificazione tradizionali hanno un range dinamico stretto, non superiore a 3-4 log₁₀, insufficiente per quantificare in maniera precisa campioni altamente viremici. I sistemi in real-time consentono di raggiungere livelli di sensibilità almeno paragonabili a quelli ottenuti dalle tecniche tradizionali di tipo qualitativo, di ottenere risultati quantitativi precisi lungo un range dinamico molto ampio, di semplificare le procedure e di ridurre i tempi di esecuzione, fornendo risultati affidabili e riproducibili; di abbattere i rischi di contaminazione, non prevedendo una fase di post-amplificazione; hanno inoltre il vantaggio di essere completamente automatizzabili (10, 23). Ancora non completamente risolte sono tuttavia le problematiche relative alla standardizzazione delle metodiche oggi disponibili (19, 25).

In questo studio sono state confrontate le prestazioni del saggio Abbott Real-Time HCV-RNA e quelle del sistema bDNA della ditta Bayer (Versant bDNA v.3), con i quali è stata analizzata retrospettivamente una serie di campioni clinici ottenuti da pazienti non selezionati afferenti al

Servizio diagnostico di Virologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ancona e già analizzati con il sistema Bayer, da tempo consolidato nella routine diagnostica del Laboratorio.

MATERIALI E METODI

Pazienti e campioni

Lo studio è stato condotto su 68 campioni retrospettivi prelevati da pazienti con infezione da HCV, già testati con il sistema b-DNA v.3 della ditta Bayer; aliquote di plasma (0.2 mL) purificato da sangue intero, che erano state conservate a -80°C subito dopo il prelievo e la prima determinazione, sono state utilizzate per la purificazione degli acidi nucleici e analisi con Abbott Real-Time HCV-RNA.

Purificazione degli acidi nucleici

I campioni sono stati purificati mediante una tecnologia di estrazione degli acidi nucleici che si basa sull'utilizzo di microparticelle magnetiche di ossido ferrico (Fe₂O₃, Magmite) a forma di ago, con grandezza mediana di 28 micron, in grado, dopo la lisi del campione con isotiocianato di guanidina e Tween 80, di catturare per affinità gli acidi nucleici presenti. Dopo ripetuti lavaggi, l'RNA purificato viene rilasciato dalle particelle in virtù di una variazione ionica del mezzo, ottenuta con una prima incubazione con tampone fosfato e una seconda incubazione con H₂O. L'eluato e la mix di amplificazione/rilevazione vengono dispensati automaticamente in micropiastra da 96 pozzetti, pronta per l'amplificazione e la rilevazione in real-time sul cycler Abbott *m2000rt*.

Amplificazione/Rilevazione

Il principio del metodo Abbott Real-Time HCV prevede inizialmente la retrotrascrizione dell'RNA target e del controllo interno (idrossipiruvato riduttasi di *Cucurbita pepo*) ad opera dell'enzima termostabile DNA polimerasi rTth. La sequenza bersaglio è situata nella regione conservata 5'-UTR del genoma di HCV. I primer sono stati selezionati in modo da ibridare con il minor numero possibile di mismatches tra i genotipi 1-6 di HCV. Le sonde HCV e IC sono oligonucleotidi di DNA a singolo filamento (short linear probe), che recano alle estremità 5' e 3' rispettivamente il quencher ed il reporter. In assenza delle sequenze bersaglio HCV o IC, quencher e reporter rimangono prossimi per la condizione di avvolgimento casuale (random coiling) in cui la sonda si trova in soluzione. In presenza del prodotto di amplificazione, l'ibridazione della sonda con le sequenze complementari allontana il fluoroforo dal quencher, permettendo l'emissione e la rilevazione della fluorescenza. La chimica della reazione è di

tipo prevalentemente non esonucleasico, consentendo l'introduzione di uno step di ibridizzazione e lettura a 35°C. A questa temperatura l'ibridizzazione del probe con la sequenza target avviene anche in presenza di eventuali mismatches presenti nella regione di annealing del probe. Le sonde HCV e IC sono marcate con fluorofori diversi, rendendo possibile ad ogni ciclo la rilevazione contemporanea di entrambi i prodotti di amplificazione.

Il ciclo di amplificazione, nel quale il segnale fluorescente viene rilevato dallo strumento Abbott *m2000rt*, è proporzionale al logaritmo della concentrazione di HCV RNA presente nel campione originale. Le prestazioni analitiche del dosaggio, stabilite in seguito a studi di validazione preliminari, sono quelle qui riferite

- a) una sensibilità analitica (frequenza di rilevazione al 95% stimata mediante analisi probit di almeno 54 replicati per livello) pari a 10.5 UI/mL (i.c. al 95%: 8.6-14.0 UI/mL) per la procedura da 0.5 mL e di 23.8 IU/mL (i.c. al 95%: 17.4-59.7 UI/mL) per la procedura da 0.2 mL;
- b) linearità da 12 e 30 UI/mL (rispettivamente per le procedure da 0.5 e 0.2 mL) fino ad almeno 10 UI/mL, verificata secondo le linee guida NCCLS EP6-A;
- c) precisione inter-saggio compresa tra 0.04 e 0.09 Deviazioni Standard (log UI/mL) misurata su un pannello di campioni a concentrazione compresa tra 1.96 e 8.05 log UI/mL;
- d) specificità del 100% (112/112 campioni HCV sieronegativi; i.c. al 95%: 96.76-100.00%)
- e) eguale quantificazione dei genotipi 1-6 di HCV, verificata su un totale di 75 campioni.

RISULTATI

Sono stati analizzati con Abbott Real-Time HCV (volume iniziale 0.2 mL), 68 campioni retrospettivi da pazienti con infezione da HCV, già testati con bDNA v.3.

30 campioni sono risultati inferiori al limite di sensibilità di entrambi i test (615 UI/mL per bDNA e 30 UI/mL per Abbott Real-Time), mentre 32 presentavano risultato quantificabile per entrambi i test (Tabella 1). Inoltre, 6 campioni sono risultati quantificabili con Abbott Real-time e negativi con b-DNA, e tutti positivi con un dosaggio home-made qualitativo ad elevata sensibilità (nested RT-PCR) (Tabella 2). I valori quantitativi forniti da Abbott Real-time su questi 6 campioni (78, 83, 206, 438, 513, 1170 UI/mL) erano tutti coerenti, ad eccezione di uno, con il limite di sensibilità del test bDNA (615 UI/mL) (Tabella 1).

Dei 30 campioni negativi con b-DNA ed inferiori a 30 UI/mL con il test Abbott, 4 sono stati quelli per i quali Abbott Real-time indicava la presenza di target virale (<30 UI/mL, "target detected") ed il test qualitativo home-made forniva un risultato positivo.

Per i 32 campioni con valore compreso nel range dinamico di entrambi i test, il coefficiente di correlazione *r* è stato pari a 0.990 (Figura I). La retta di regressione lineare tra i due metodi aveva equazione log Abbott = 0.9978, log bDNA + 0.1544. In accordo con la regressione lineare, l'analisi di Bland-Altman mostrava una differenza media (Abbott - b-DNA) di 0.14 log UI/mL (deviazione standard = 0.16 log UI/mL), costante lungo tutto il range di valori (figura II).

Il 96.9% (31/32) dei campioni ha mostrato una dif-

Tabella 1. Confronto tra i risultati ottenuti con i test Abbott Real-Time (volume iniziale 0,2 mL, range 30-10⁸ UI/mL) e bDNA in 68 pazienti HCV-positivi

	bDNA v3 (UI/mL)			Totale
	< 615	615-7,69x10 ⁶	>7,69x10 ⁶	
Abbott real-time (UI/mL)				
Not detected	26	0	0	26
<30, detected	4	32	0	36
30-10 ⁸	6	0	0	0
<10 ⁸	0	0	0	0
Totale	36	32	0	68

Tabella 2. Campioni con risultato discordante tra i due saggi

ID	Abbott UI/mL	Abbott log UI/mL	b-DNA UI/mL	b-DNA Log UI/mL	Nested RT-PCR
42/315	513	2.71	<615	<2.79	POS
40/100	78	1.89	<615	<2.79	POS
32/146	83	1.92	<615	<2.79	POS
31/187	206	2.31	<615	<2.79	POS
30/430	438	2.64	<615	<2.79	POS
37/328	1.170	3.07	<615	<2.79	POS

ferenza inferiore a 0.5 log UI/mL (differenza di 3 volte), mentre nell'84% dei casi la differenza era inferiore a 0.3 log (differenza di 2 volte).

Una analisi condotta sui valori di Ct (ciclo soglia) ottenuto sul controllo interno rilevato in ogni campione calibratore e controllo (N=95), ha mostrato un valore medio di 20.25 con Deviazione Standard pari a 0.395 e CV% di 1.95. Nessun valore risultava al di fuori del range 19.25 – 21.25 (valore medio +/- 1 Ct) (dati non mostrati).

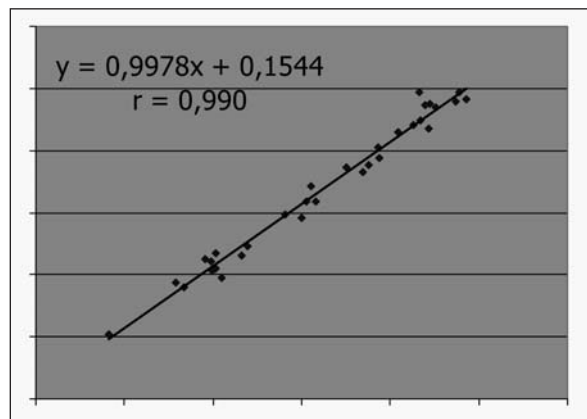


Figura I. Correlazione tra i due metodi

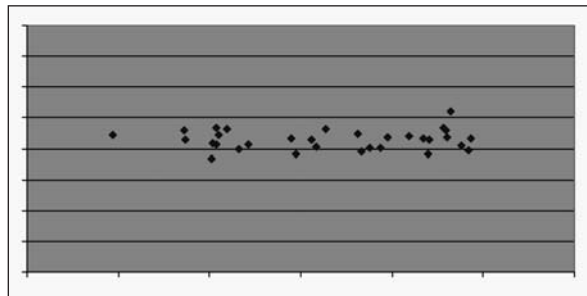


Figura II. Test di Bland-Altman (log UI/mL) per analisi delle differenze tra test Abbott e test bDNA v3 (valore medio = 0.14; deviazione standard = 0.16)

DISCUSSIONE

La valutazione della presenza dell'HCV-RNA e la quantificazione della viremia nei soggetti con epatite da HCV sono oggi strumenti indispensabili per la corretta gestione dei pazienti infettati, in particolare di coloro che sono elegibili alla terapia antivirale (6, 10). Numerose metodologie che si avvalgono delle più moderne tecniche biomolecolari sono state nel corso degli anni sviluppate da diversi gruppi di ricerca nazionali e internazionali e dalle industrie produttrici di sistemi diagnostici e rese disponibili per lo studio della dinamica dell'infezione e la valutazione della cinetica di risposta virologica alla terapia (1, 2, 4, 5, 10, 13, 15, 23, 26): l'affinamento di tali tecniche ed una maggiore affidabilità in termini di precisione e riproducibilità dei risultati quantitativi permettono oggi una gestione migliore del paziente ed un

monitoraggio delle terapie tali da consentire di ridurre i tempi di trattamento necessari per l'eradicazione dell'infezione, ovvero di decidere sulla sospensione della terapia qualora vi siano evidenze dell'inefficacia della stessa. L'introduzione delle metodiche di real-time PCR hanno in questo ambito fornito un grosso contributo: esse infatti sono in grado di garantire indubbi vantaggi rispetto alle metodiche convenzionali di amplificazione, quali una più corretta valutazione quantitativa sia per valori minimi che per valori molto elevati di carica virale, garantita dall'esteso range dinamico di amplificazione; una sensibilità e specificità migliorate rispetto alle tecniche di amplificazione convenzionale; una riduzione della complessità analitica e soprattutto dei tempi di esecuzione e refertazione; la possibilità di poter automatizzare tutte le fasi analitiche, dall'estrazione degli acidi nucleici fino alla rilevazione dei risultati, senza problemi di contaminazione, in quanto le piattaforme sono completamente chiuse e consentono di processare contemporaneamente un numero consistente di campioni senza dover intervenire manualmente nel passaggio da una fase all'altra della lavorazione (3, 4, 5, 10, 16, 22, 23).

Il dosaggio Abbott Real-Time HCV-RNA si avvale della più moderna tecnologia di amplificazione e quantificazione e sfrutta le potenzialità della purificazione dell'RNA mediante estrazione automatica da diverse matrici biologiche (sangue, siero, plasma). Inoltre, il sistema, che solo di recente è stato introdotto in commercio, presenta indubbi vantaggi dovuti al nuovo e originale disegno dei probes in conformazione lineare e alla chimica non esonucleasica del test che consente, attraverso una tappa di ibridizzazione/lettura posta a 35°C, di quantificare correttamente target con "mismatches" nella regione di ibridizzazione del probe, offrendo una salvaguardia in più nei confronti della diversità genetica, garantendo quindi prestazioni analoghe in termini di efficienza di amplificazione e di corretta quantificazione per tutti i diversi genotipi di HCV rilevati.

Il dosaggio Abbott Real-Time ha mostrato una eccellente correlazione con il test b-DNA v.3. L'espressione dei risultati in UI ha permesso, nonostante il differente principio dei test, di ottenere risultati confrontabili (differenza media=0.16 log). Il risultato è di rilievo, se si considera che il metodo bDNA è calibrato originariamente in copie (o genomi-equivalenti) e viene fornito un fattore di conversione in UI/mL (in pratica le Unità Internazionali sono derivate dall'analisi dello Standard Internazionale come campione), mentre il metodo Abbott è tarato direttamente in UI/mL.

Per quanto riguarda il confronto dei dati quantita-

tivi sui diversi genotipi rilevati, nel nostro caso i campioni non erano stati selezionati per questo scopo e solo l'analisi retrospettiva ha consentito di confrontare i risultati quantitativi ottenuti con le due metodiche sui diversi genotipi, analisi che ha confermato la concordanza tra i due saggi (dati non mostrati).

Come atteso, fatta salva la specificità del dosaggio, sono stati rilevati 6 campioni con livelli viremici bassi (confermati con saggio RT-PCR qualitativo), determinati solo con test in real-time, di cui 5 con risultato <615 UI/mL ed uno con valore di 1170 UI/mL, prossimo al limite della soglia di rilevazione del metodo.

Più interessanti, a nostro avviso, sono i dati riguardanti quattro campioni che il test Abbott, pur rilevando come <30 UI/mL, ha segnalato comunque come "target detected": si tratta di risultati riguardanti un numero esiguo di campioni, comunque confermati positivi con il metodo qualitativo home-made, e quindi allo stato attuale non è consentito fare alcun tipo di estrapolazione. Tuttavia, seppure da un punto di vista puramente formale, il dato apre ad una problematica in discussione e tuttora largamente irrisolta: se cioè, fatti salvi i dati sulla specificità dei metodi, i saggi quantitativi in real-time non possano a tutti gli effetti essere utilizzati come test "qualitativi" e, come tali, sostituire le metodiche convenzionali di amplificazione nella valutazione della assenza di viremia rilevabile nei soggetti non trattati e della clearance virale nei pazienti in corso di trattamento o che hanno terminato la terapia. Per tali situazioni vengono definite da tutte le linee guida e conferenze di consenso soglie di sensibilità analitica dei saggi qualitativi (<50 UI/mL) di fatto superiori a quelle dei test quantitativi oggi disponibili: questi potrebbero quindi garantire una performance migliore anche sotto questo profilo e rappresentare un indubbio vantaggio anche in termini di costo-benefici, oltre che sotto il profilo strettamente analitico. È però indispensabile, a nostro avviso, che vengano condotti preliminarmente studi sia sulla "significatività clinica" di valori <50 UI/mL ottenuti con metodiche real-time, in particolare sulla predittività della risposta virologica a lungo termine, nonché verificate le prestazioni in termini di specificità dei sistemi per valori al di sotto della soglia di sensibilità "dichiarata" dalle ditte fornitrici.

BIBLIOGRAFIA

1. Beld MR, Sentjes R, Rebers S, et al. Performance of the new Bayer VERSANT HCV RNA 3.0 assay for quantitation of hepatitis C virus RNA in plasma and serum: conversion to international units and comparison with the Roche COBAS Amplicor HCV Monitor, version 2.0, assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 788-93.
2. Bertuzis R, Hardie A, Hottentraeger B, et al. Clinical performance of the LCx HCV RNA quantitative assay. *J Virol Methods* 2005; 123: 171-8.
3. Beuselink K, van Ranst M, van Eldere J. Automated extraction of viral-pathogen RNA and DNA for high-throughput quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2005 Nov; 43: 5541-6.
4. Caliendo AM, Valsamakis A, Zhou Y, et al. Multilaboratory comparison of hepatitis C virus viral load assays. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1726-32.
5. Carriere M, Pene V, Breiman A, et al. A novel, sensitive, and specific RT-PCR technique for quantitation of hepatitis C virus replication. *J Med Virol* 2007; 79: 155-60.
6. Davis GL, Wong JB, McHutchinson JG, Manns MP, Harvey J, Albrecht J. Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 2003; 38: 645-52.
7. Davis GL. Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S145-51.
8. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 975-82.
9. Hadziyannis SJ, Sette H, Morgan TR, et al. Peginterferon-alfa2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. A randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004; 140: 346-55.
10. Halfon P, Bourliere M, Penaranda G, Khiri H, Ouzan D. Real-time PCR assays for hepatitis C virus (HCV) RNA quantitation are adequate for clinical management of patients with chronic HCV infection. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2507-11.
11. Halfon P, Penaranda G, Bourliere M, Khiri H, Maseyeff MF, Ouzan D. Assessment of early virological response to antiviral therapy by comparing four assays for HCV RNA quantitation using the international unit standard: implications for clinical management of patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2006; 78: 208-15.
12. Hinrichsen H, Benhamou Y, Wedemeyer H, et al. Short-term antiviral efficacy of BILN 2061, a hepatitis C virus serine protease inhibitor, in hepatitis C genotype 1 patients. *Gastroenterology* 2004; 127: 1347-55.
13. Layden JE, Layden TJ, Reddy KR, Levy-Drummer RS, Poulakos J, Neumann AU. First phase viral kinetic parameters as predictors of treatment response and their influence on the second phase viral decline. *J Viral Hepat* 2002; 9: 340-5.
14. Mangia A, Santoro R, Minerva N, et al. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med* 2005; 352: 2609-17.
15. Manzin A, Bagnarelli P, Menzo S, et al. Quantitation of hepatitis C virus genome molecules in plasma samples. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1939-44.
16. Morishima C, Chung M, Ng K, Brambilla DJ, Gretch DR. Strengths and limitations of commercial tests for hepatitis C virus RNA quantification. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 421-5.
17. Morishima C, Morgan TR, Everhart JE, et al. HCV RNA detection by TMA during the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis (Halt-C) trial. *Hepatology* 2006; 44: 360-7.
18. Pawlotsky JM, Bouvier-Alias M, Hezode C, Darthuy F, Remire J, Dhumeaux D. Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. *Hepatology* 2000; 32:

- 654-9.
19. Pisani G, Cristiano K, Wirz M, Bisso GM, Gentili G. Overestimation of the hepatitis C virus RNA content of reference preparations by the AMPLICOR HCV monitor test, version 2.0. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4765-7.
 20. Reesink HW, Zeuzem S, Weegink CJ, et al. Initial results of a phase 1b multiple dose study of VX950, a hepatitis C virus protease inhibitor. *Gastroenterology* 2005; 128 (Suppl. 2): 527A.
 21. Reiser M, Hinrichsen H, Benhamou JP, et al. Antiviral efficacy of NS3-serine protease inhibitor BILN-2061 in patients with chronic genotype 2 and 3 hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41: 832-5.
 22. Ross RS, Viazov S, Sarr S, Hoffmann S, Kramer A, Roggendorf M. Quantitation of hepatitis C virus RNA by third generation branched DNA-based signal amplification assay. *J Virol Methods* 2002; 101: 159-68.
 23. Sarrazin C, Gartner BC, Sizmann D, et al. Comparison of conventional PCR with Real-Time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 729-37.
 24. Schinkel J, Kroes AC, Wagtmans MJ, Lamers CB, van Hoek B. Monitoring response during a randomised controlled trial of escalating interferon dose for chronic hepatitis C infection: predictive value of quantitative and qualitative HCV RNA assays. *J Clin Virol* 2001; 22: 61-71.
 25. Shiffman ML, Ferreira-Gonzalez A, Reddy KR, et al. Comparison of three commercially available assays for HCV RNA using the international unit standard: implications for management of patients with chronic hepatitis C virus infection in clinical practice. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1159-66.
 26. Zeuzem S, Herrmann E, Lee JH, et al. Viral kinetics in patients with chronic hepatitis C treated with standard or peginterferon alpha2a. *Gastroenterology* 2001; 120: 1438-47.

I dati riportati nel lavoro sono stati presentati parzialmente in forma di poster al XXXV Congresso Nazionale AMCLI, Torino 19-22 Settembre 2006

Aldo Manzin

Servizio di Microbiologia Clinica,
Policlinico Universitario
Università di Cagliari,
Presidio di Monserrato
Strada Statale 554 - bivio Sestu,
09042 Cagliari
Tel.: 070 5109 6350 - Fax: 070 675 8482
E-mail: aldomanzin@pacs.unica.it