

A multicenter evaluation of the Abbott RealTime HCV genotype II assay

Marco Ciotti¹, Fulvia Milano², Mosè Favarato³, Federico Chiodo⁴, Francesco Renato Pulvirenti⁵, Carlo Federico Perno¹

¹ Laboratorio di Virologia Molecolare, Policlinico Tor Vergata, Roma

² Laboratorio di Microbiologia, Ospedale S. Andrea, Vercelli

³ U.O. Biologia Molecolare ULSS 13, Mirano

⁴ Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Ospedale Ca' Granda Niguarda, Milano

⁵ Abbott Molecular, Roma

Key words: HCV, genotype, real-time PCR

Valutazione multicentrica di un nuovo dosaggio in real-time per la determinazione del genotipo HCV

SUMMARY

Viral genotype is an important determinant of the therapeutic outcome of the chronic hepatitis C and is useful in clinical practice to determine the duration of treatment. While the viral type shows a clear association with therapeutic success, there is currently no evidence to that effect for HCV subtype, whose value is thus confined to epidemiological studies. The Abbott RealTime HCV Genotype II assay, through the use of Minor Groove Binder probes (MGB) is able to distinguish genotypes 1 to 6 (target 5'-UTR region) and subtypes 1a and 1b (NS5B region). In four different Italian centers a comparison between the Abbott RealTime HCV Genotype II assay and the Versant HCV Genotype 2.0 (LiPA) has been performed. A total of 143 non selected samples with the request of HCV genotyping have been analysed. 141/143 samples (98.6%) have provided reportable results with both tests (2 indeterminates with LiPA). Concordance at the type level was 96.5% (136/141). Considering the 136 concordant samples, the distribution was as follows: type 1 = 61 (44.9%), 2 = 36 (26.5%), 3 = 21 (15.4%), 4 = 17 (12.5%) 5 = 1 (0.7%). Both assays assigned subtype in 56/61 (91.8%) samples of genotype 1 (3 and 2 samples only provided the type for LiPA and Abbott, respectively) and 50/56 (89.3%) had concordant subtype. It is worth to note that 4 of the 5 samples with discordant subtype Abbott 1a/LiPA 1b came from the only center that used for LiPA the 5'-UTR amplicon, losing the benefit of the core region which has been introduced in the version 2 of the test to improve the accuracy in distinguishing between 1a and 1b. There was only one discordant sample at type level (Abbott 4, LiPA 1b) which after sequencing and phylogenetic analysis was resolved as type 4. Four mixed infections were detected, 3 with the Abbott test (two 1a+4 and one 1b+3) and 1 with the LiPA test (1a+3). In all cases the comparison test showed a single genotype 1 infection. The new Abbott RealTime HCV Genotype II assay showed a high correlation with the Versant HCV Genotype 2.0 assay (LiPA). The automation platform m2000 system (Abbott), together with objective interpretation and digital archiving results may be particularly advantageous for the laboratory.

Il genotipo virale è un importante determinante virologico degli esiti della terapia dell'epatite cronica C ed è utile nella pratica clinica per stabilire la durata del trattamento. Mentre il tipo virale mostra una chiara associazione con il successo terapeutico, non vi sono al momento evidenze in tal senso per il sottotipo, la cui utilità rimane dunque confinata a studi di natura epidemiologica. Il dosaggio Abbott RealTime HCV Genotype II, mediante l'uso di sonde MGB (Minor Groove Binder) è in grado di distinguere i genotipi da 1 a 6 (regione target 5'-UTR) e i sottotipi 1a e 1b (regione NS5B) (Figura I, II e III). Abbiamo effettuato in quattro differenti centri italiani un confronto tra il test Abbott RealTime e il test Versant HCV Genotype 2.0 (LiPA)

La tecnologia MGB consente di utilizzare probes corti che tollerano meno i mismatches e quindi in grado di rilevare cambiamenti di una singola base. La combinazione dei pro-

bes Taqman con MGB è utile per i test che richiedono elevata specificità e potere discriminatorio.

Reporter	Primer e probe		
	A	B	C
FAM	ALL HCV 5' UTR	GT 2 + 2v 5' UTR	GT 5 5' UTR
VIC	GT 1a NS5b	GT 1b NS5b	GT 4 5' UTR
NED	GT 3 + 3v 5' UTR	GT 1 5' UTR	GT 6 5' UTR
Quasar 670	Controllo interno	Controllo interno	Controllo interno
ROX	Passive Reference	Passive Reference	Passive Reference

Configurazione reagenti test Abbott RealTime HCV Genotype II

Strumenti	Completa automazione con m2000sp e m2000rt
Configurazione del kit	1 x 24 test/kit
Tecnologia	Real-time PCR (MGB-TaqMan Probes)
Sensibilità	< 500 IU/mL (0,5 mL) o < 1.250 IU/mL (0,2 mL)
Specificità	100%
Regioni Target	5' UTR e NS5b
Rilevazione dei genotipi	1a (NS5b), 1b (NS5b), 1, 2, 3, 4, 5, 6
Tipo di campione	Siero, Plasma (ACD-A, CPD, K-EDTA, Na-EDTA)
Volume iniziale	0,5 mL o 0,2 mL
Controllo interno	Armored RNA (co-estratto) (gene idrossipiruvato reductasi di <i>curcubita pepo</i>)
Controlli esterni	Controllo Negativo e Controllo Positivo (5.000 IU/ml di GT 1 e GT 4 armored RNA in plasma umano negativo)
Controllo della contaminazione	Reazione di PCR in fase omogenea con lettura in piastra sigillata + UNG

Caratteristiche test Abbott RealTime HCV Genotype II

Sono stati analizzati in totale 143 campioni non selezionati afferenti ai centri con la richiesta di genotipizzazione HCV.

141/143 campioni (98.6%) hanno fornito un risultato riportabile per entrambi i test (2 indeterminati con LiPA). La concordanza a livello di tipo è stata del 96.5% (136/141). Considerando i 136 concordanti, la distribuzione era la seguente: tipo 1=61(44.9%); 2=36(26.5%); 3=21(15.4%); 4=17(12.5%); 5=1(0.7%). Entrambi i dosaggi assegnavano il sottotipo in 56/61(91.8%) campioni di genotipo 1 (3 e 2 campioni fornivano solo il tipo per Abbott e LiPA rispettivamente) e 50/56 (89.3%) avevano sottotipo concordante. Degno di nota che 4 dei 5 campioni con sottotipo discordante Abbott 1a/LiPA 1b provenivano dall'unico centro che ha impiegato

Corresponding author: Marco Ciotti

Laboratory of Molecular Virology, Foundation Polyclinic Tor Vergata,
Viale Oxford 81-00133 Rome, Italy - Tel.: +39 06 20902087; Fax: +39 06 20902078;
E-mail: marco.ciotti@ptvonline.it

per il LiPA un amplificato 5'-UTR, perdendo il beneficio della regione core, appositamente introdotta nella versione 2 del test per migliorarne l'accuratezza nella distinzione tra 1a e 1b. Vi era un solo campione discordante a livello di tipo (Abbott 4, LiPA 1b) che dopo sequenziamento e analisi filogenetica mostrava un "cluster" di tipo 4. Sono state evidenziate 4 infezioni miste, 3 con il test Abbott (due 1a+4 e una 1b+3) e 1 con il test LiPA (1a+3a). In tutti i casi il test di confronto mostrava una mono-infezione con il corrispondente genotipo 1.

Il nuovo dosaggio Abbott RealTime HCV Genotype II ha mostrato un'elevata concordanza con il test Versant HCV Genotype 2.0 (LiPA). L'automazione sulla piattaforma m2000 System (Abbott), unitamente all'interpretazione oggettiva

e all'archiviazione digitale dei risultati possono risultare particolarmente vantaggiose per il laboratorio.

		Versant HCV Genotype 2.0 LiPA									
		1	1a	1b	2	3	4	1a+3a	5	IND	TOT
ABBOTT RealTime HCV GI II	1			3							3
	1a	2	17	5				1			25
	1b		1	33							35
	2				36						37
	3					21					21
	4			1			17				18
	5								1		1
	1b+3			1							1
	1a+4		2								2
	TOT	2	20	43	36	21	17	1	1	2	143

Confronto dei risultati LiPA e Abbott

BIBLIOGRAFIA

1. Hnatyszyn HJ. Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antivir Ther*. 2005; 10: 1-11.
2. Bouchardeau F, Cantaloube JF, Chevaliez S, et al. Improvement of hepatitis C virus (HCV) genotype determination with the new version of the Inno-LiPA HCV Assay. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1140-5.
3. Kuiken C, Simmonds P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol Biol* 2009; 510: 33-53.