

# La diagnosi microbiologica per HCV e proposta di una flow-chart diagnostica

---

**Danila Bassetti, MD**

Microbiologia e Virologia

Struttura Semplice Sierologia Autoimmunità

Ospedale S.Chiera Trento

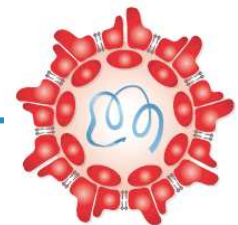


Trento, 14 ottobre 2011

# Quesiti del Clinico al Laboratorio

---

- C'è o c'è stata infezione?
- C'è replicazione virale?
- C'è epatopatia?
- Quale genotipo di virus è coinvolto?
- Ci sono elementi predittori di risposta alla terapia?
- Ci sono segni di trasmissione “verticale”?
- C'è risposta alla terapia antivirale?
- C'è rischio di infezione in donazioni sangue, organi?



# EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection

European Association for the Study of the Liver <sup>1</sup>

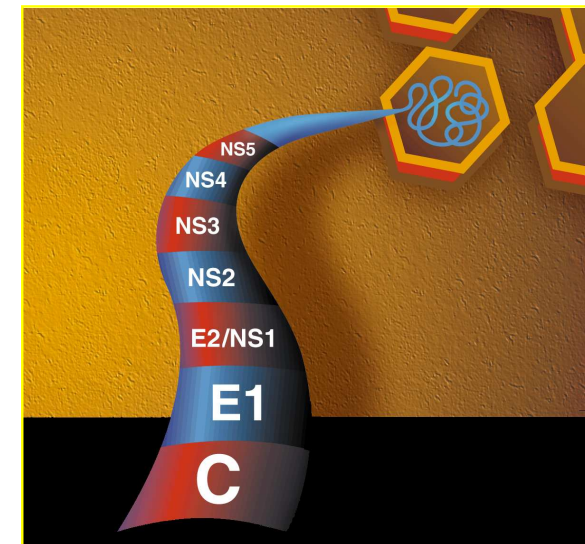


## JOURNAL OF HEPATOLOGY

Journal of Hepatology 2011 vol. 55 | 245–264

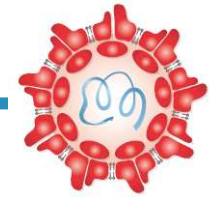
The HCV CPG Panel has considered the following questions:

- How should acute and chronic hepatitis C be diagnosed?
- What are the goals and endpoints of treatment?
- What are the results of current therapies and the predictors of response?
- How should patients be assessed before therapy?
- What are the contra-indications to therapy?
- Who should be treated?
- What first-line treatment should be prescribed?
- How should treatment be managed?
- How should treatment be tailored to the virological response?
- How can success rates of SoC be improved?
- How should patients with SVR be followed?
- What should be offered to non-sustained responders to SoC?
- How should patients with severe liver disease be treated?
- How should special groups of patients be treated?
- How should we treat patients with acute hepatitis C?
- How should untreated patients and non-sustained responders be followed?
- What are the perspectives of new treatments?



# Clinico e Laboratorio

---



## Quesiti clinici

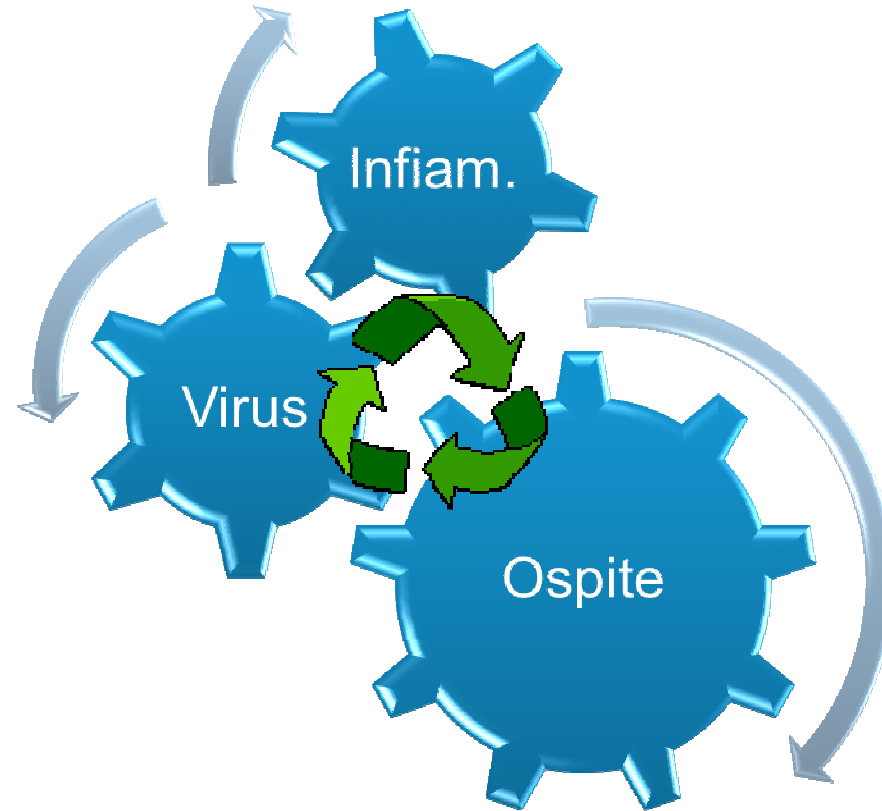
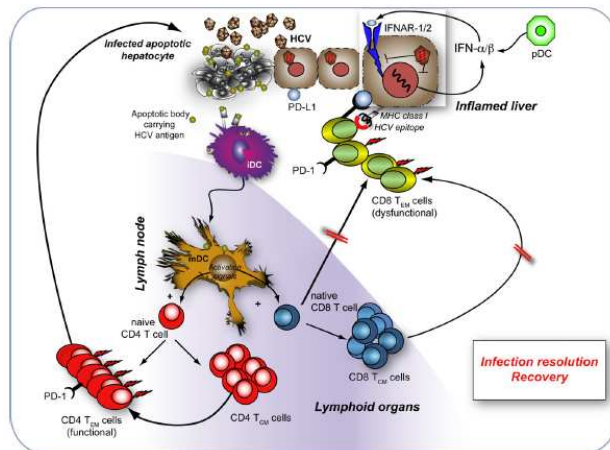
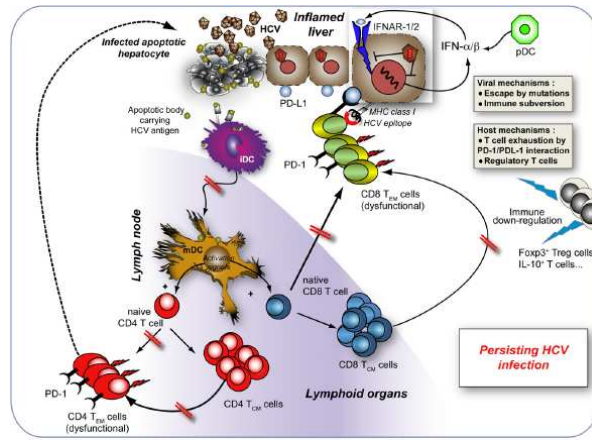
- Esposizione
- Infezione
- Malattia
- Replicazione
- Trasmissione

## Finalità clinica

- ◆ Diagnosi
- ◆ Prognosi
- ◆ Monitoraggio
- ◆ Prevenzione



# Hepatitis C virus infection: A **“liaison a trois”** amongst the virus, the host, and chronic low-level inflammation for human survival



# Interazione Virus Epatite ed Ospite

---



**Carica virale**

**Genotipo**

**Coinfezioni**



**OSPITE**



**Immunocompetenza**

**Età**

**Gravidanza**

**Patologie  
concomitanti**

**Mutazioni**

**Donazioni**

---

## Diagnostica **indiretta** (Ab dipendente)

- Antigeni ricombinanti
- Antigeni sintetici



## Diagnostica epatiti virali

## Diagnostica **diretta** (Ab indipendente)

- Ricerca Ag virali
  - Rilevamento acidi nucleici
-

# Microbiologia e HCV

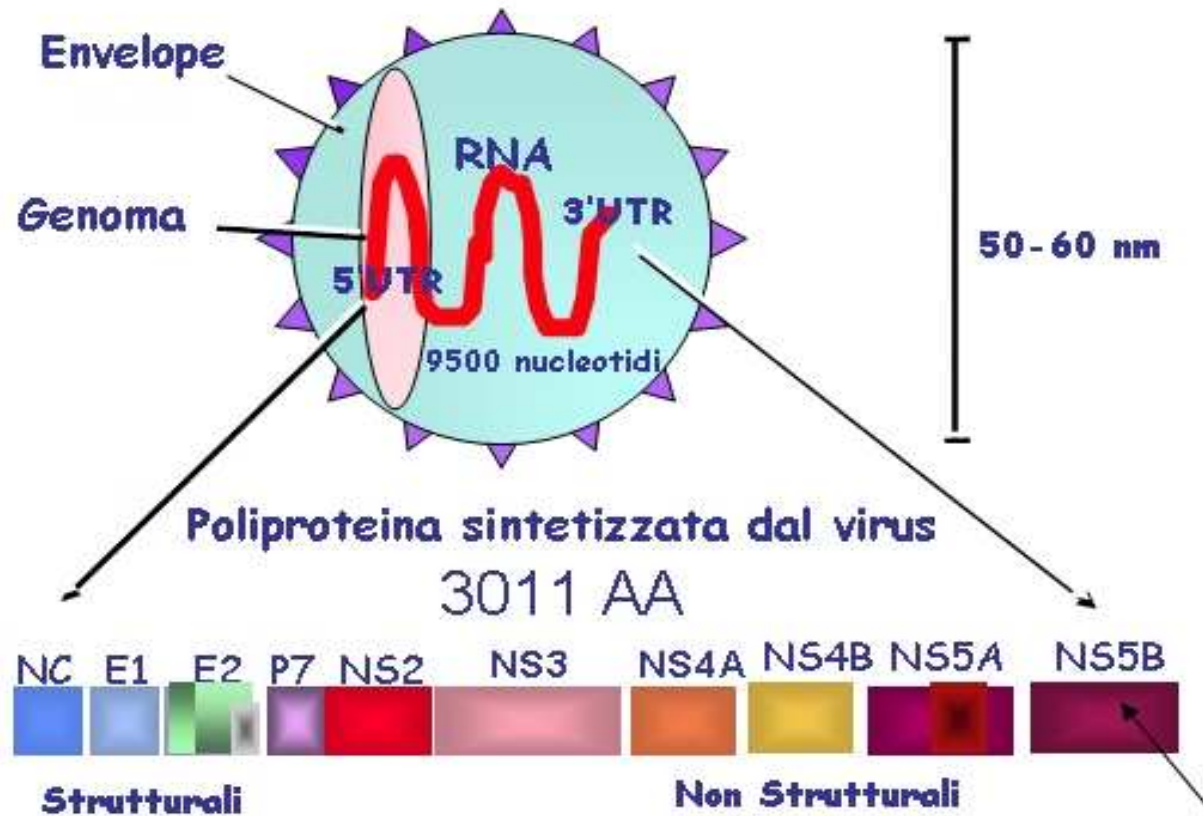
---

- Ruolo della Sierologia e della Biologia Molecolare
- “Novità” che possono essere applicate in una *flow-chart* nella *routine* di Laboratorio?





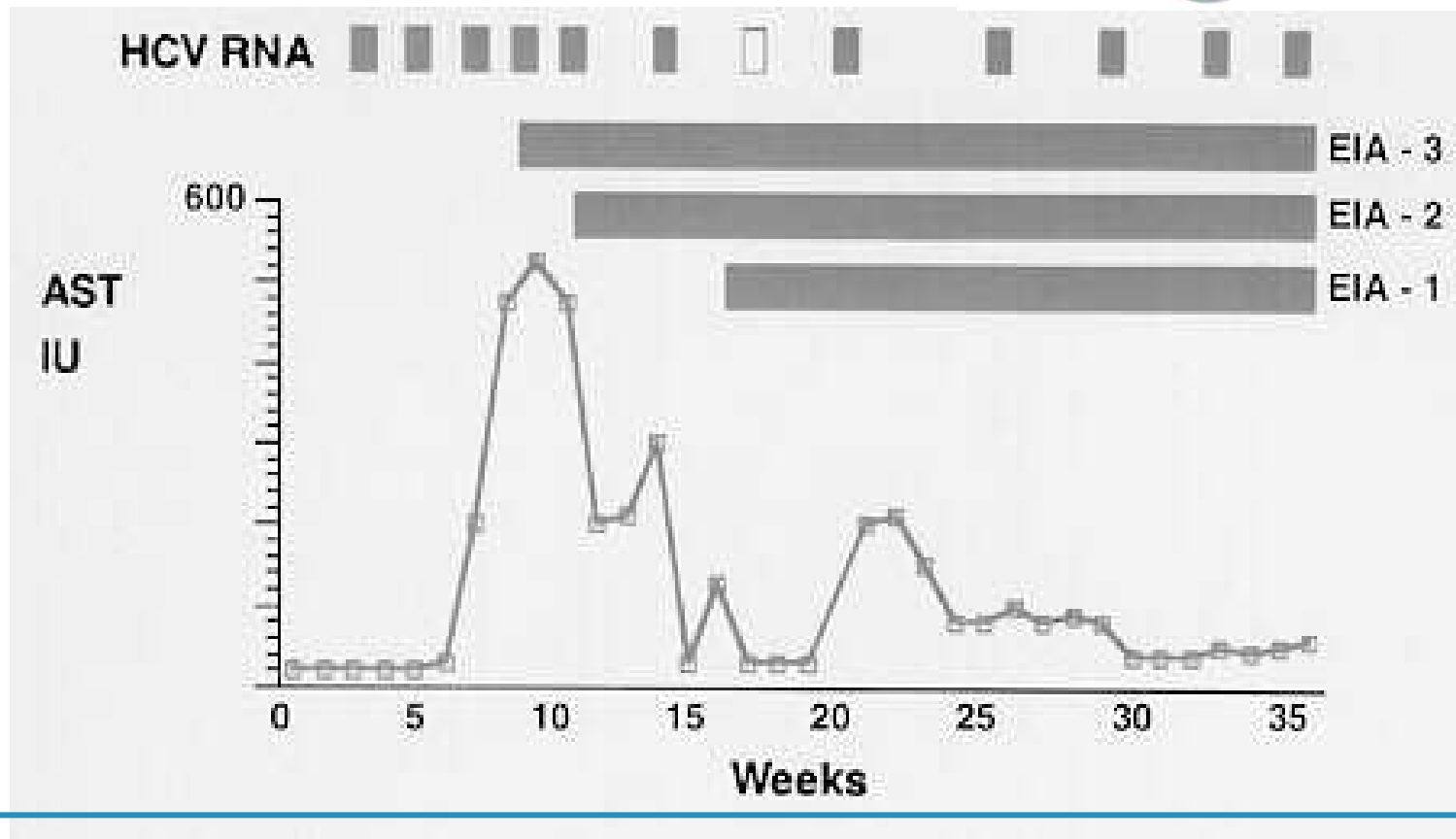
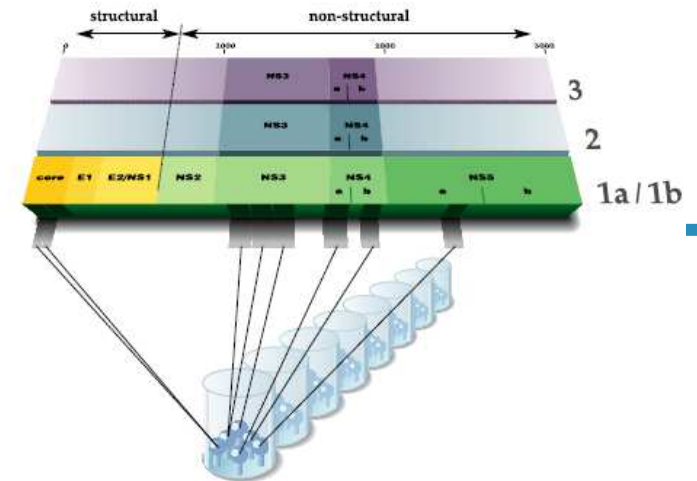
# Virus Epatite C



Mutazioni del genoma durante la replicazione virale con formazione di varianti virali definite *QUASISPECIE*

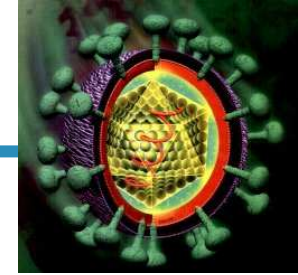


# Evoluzione EIAs per HCV-Ab



# HCV: diagnosi sierologica

---



**Presenza nel siero di anticorpi anti-HCV**

**anti-HCV positivo = infezione**

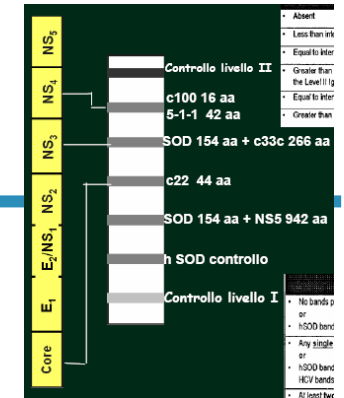
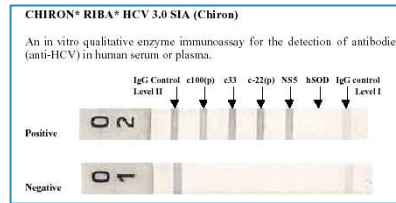
**Test di screening (ELISA III generazione):**

- antigene ricombinante strutturale del core (c22-3)**
- 2 antigeni che derivano da regioni non strutturali NS3/NS4 (c33c, c100-3, c200)**
- NS5**

**→ 60% genoma → possibilità di identificare gli anticorpi entro 50 giorni dalla infezione**

---

# HCV diagnosi sierologica-RIBA



**Ab anti-c22:** sono i primi a comparire e gli ultimi a scomparire nei pazienti guariti

**Ab anti-E1 e anti-E2:** compaiono più tardi e scompaiono prima, la loro diminuzione è un fattore prognostico favorevole

**Ab anti NS3 o anti c-33:** seguono la comparsa e precedono la scomparsa degli anti c-22, rari in ID

**Ab anti c-100:** la riduzione o scomparsa è fattore predittivo di guarigione

# Diffusione test di screening USA

---



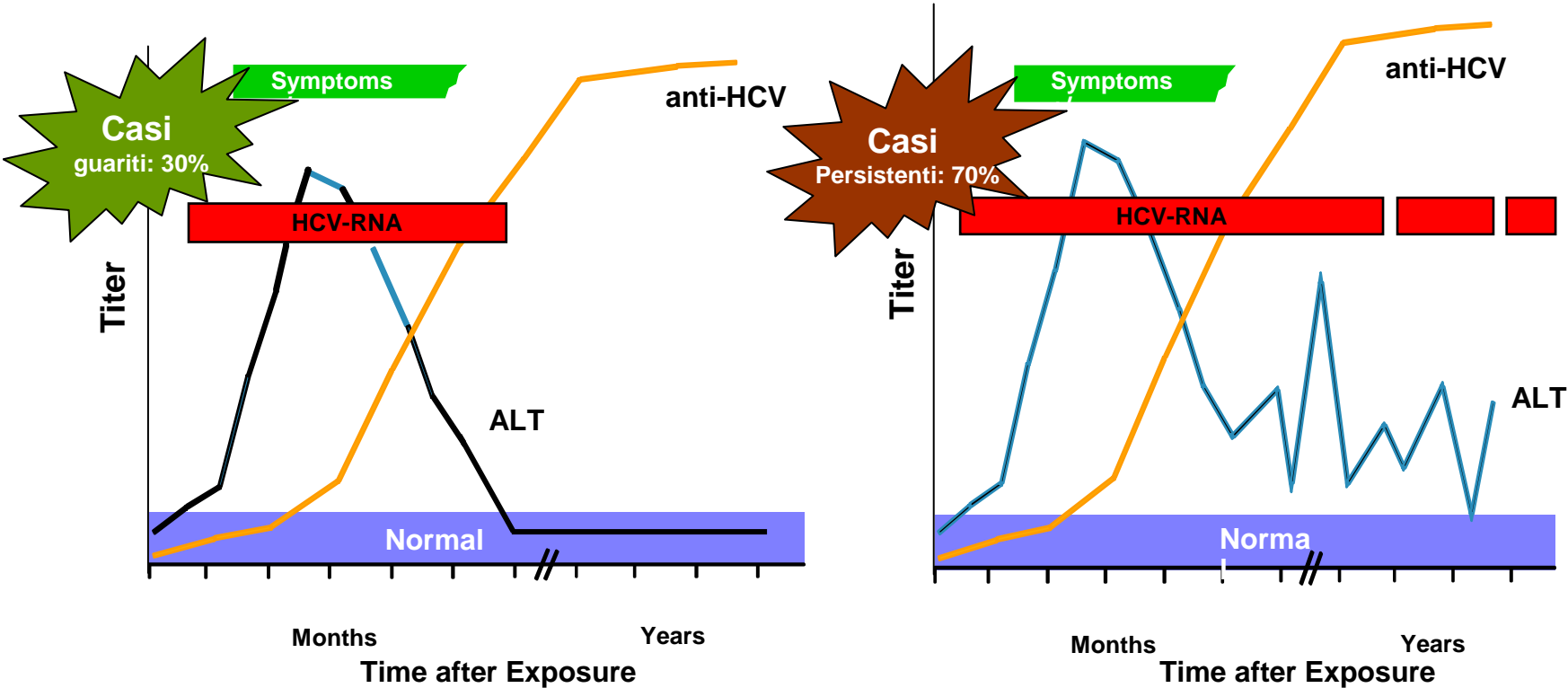
**1 in 33  
baby boomers  
have hepatitis C.  
Do you?**



# Infezione da HCV: Patterns Sierologici

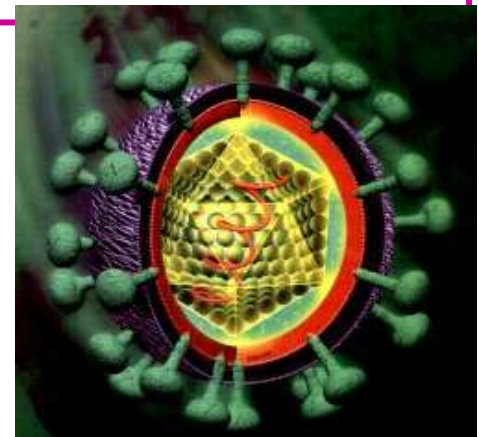
Infezione acuta con guarigione

Infezione acuta con conseguente infezione cronica



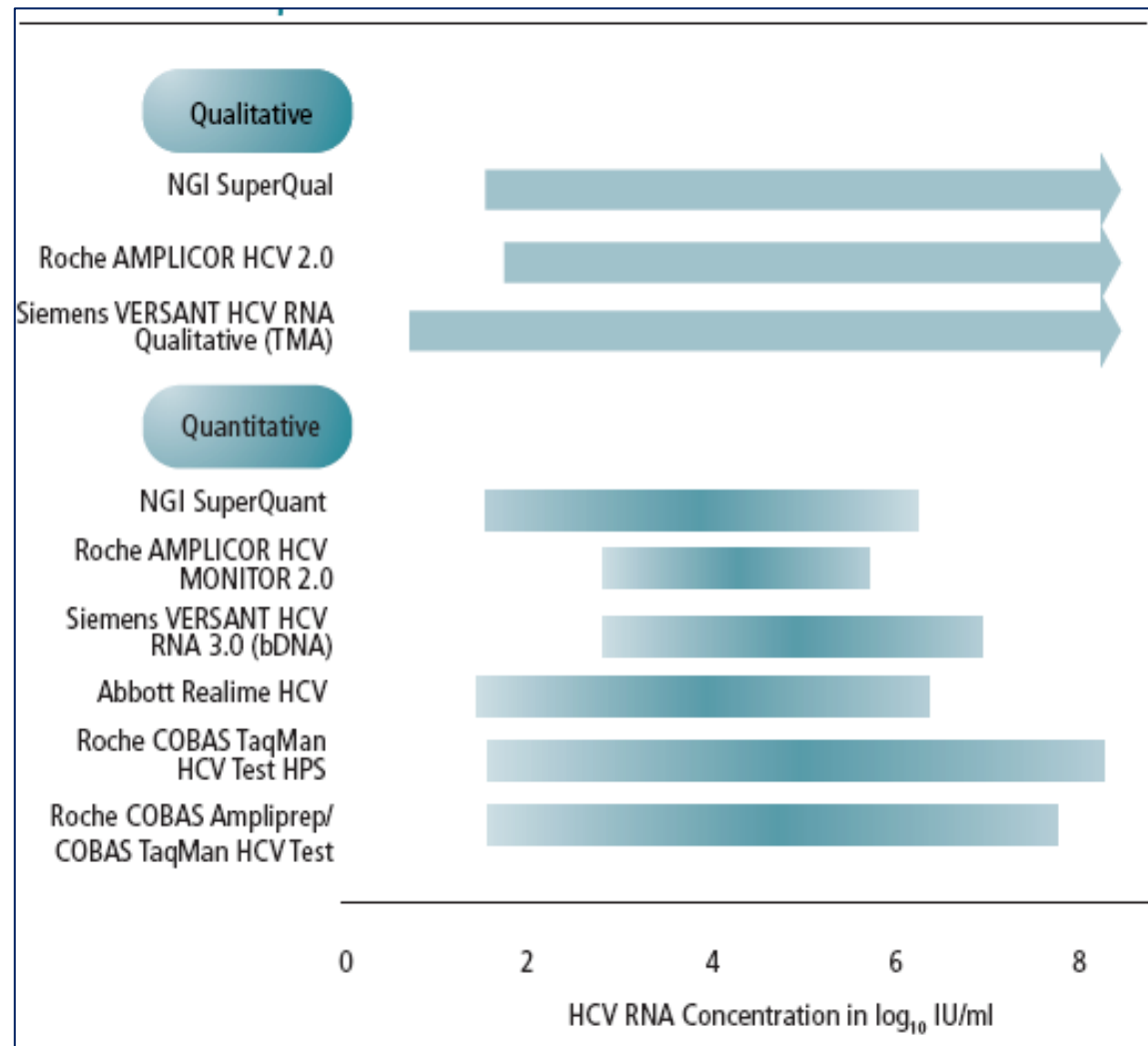
## HCV e Biologia Molecolare

- (HCV-RNA qualitativo)
- HCV-RNA quantitativo (“viral load”)
- Genotipizzazione





# Kit HCV-RNA: sensibilità e ranges dinamici



# Molecular Diagnostics of Hepatitis C Virus Infection

## A Systematic Review

JAMA, February 21, 2007—Vol 297, No. 7

**Table 2.** Characteristics of Available Nucleic Acid Tests for Hepatitis C Virus

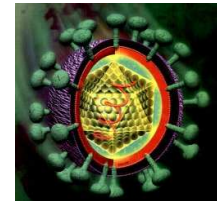
Assay	Method	Lower Limit of Detection or Range, IU/mL	Used to Confirm Viremia	Role in HCV Therapeutic Monitoring*
<b>Qualitative tests</b>				
Ultra-Qual	RT-PCR	40	Yes (blood donation screening)	NA
AMPLICOR (v2.0)	RT-PCR	50	Yes	Determination of rapid and sustained virological response
Ampliscreen (v2.0)	RT-PCR	50	Yes (blood donation screening)	NA
Procleix HIV-1/HCV assay	TMA‡	5	Yes (blood and organ donation screening)	NA
Versant	TMA	5	Yes	Determination of rapid and sustained virological response
<b>Quantitative tests</b>				
SuperQuant	RT-PCR	40-2 million	No	Determination of pretreatment levels and early virological response
Monitor (v2.0)	RT-PCR	500-500 000	No	Determination of pretreatment levels and early virological response
Quantiplex bDNA (v3.0)	Branched-chain amplification	615-7.7 million	No	Determination of pretreatment levels and early virological response
TaqMan real-time PCR	RT-PCR	10-100 million	Yes	Determination of pretreatment levels, rapid, early, and sustained virological response

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; NA, not applicable; PCR, polymerase chain reaction; RT, reverse transcription; TMA, transcription mediated amplification.

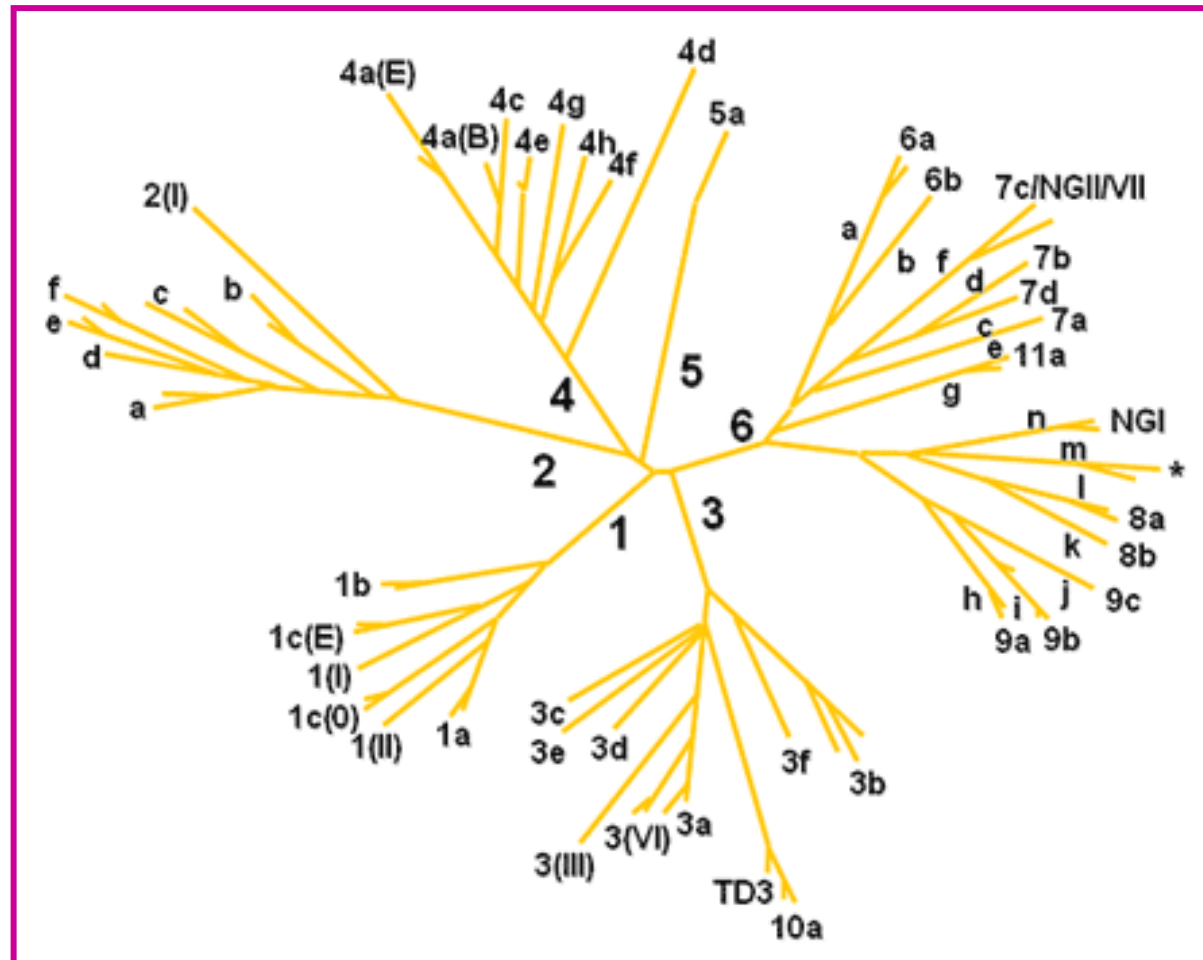
\*Pretreatment viral load is predictive of successful therapy; rapid virological response refers to undetectable HCV RNA after 4 weeks of treatment; early virological response, HCV RNA levels have declined by more than 2 log<sub>10</sub> after 12 weeks of treatment; sustained virological response, an undetectable HCV RNA level 24 weeks after treatment cessation.

# Biologia Molecolare ed Epatite C acuta

- ❑ Generalmente non necessaria
- ❑ Utile nella identificazione di:
  - fasi pre-sierologiche epatite
  - immunodepressi
  - trasmissione verticale (monitoraggio neonato 0,3,12 mesi)
  - rischi “minimi” in attività trasfusionale o donazione organi/tessuti

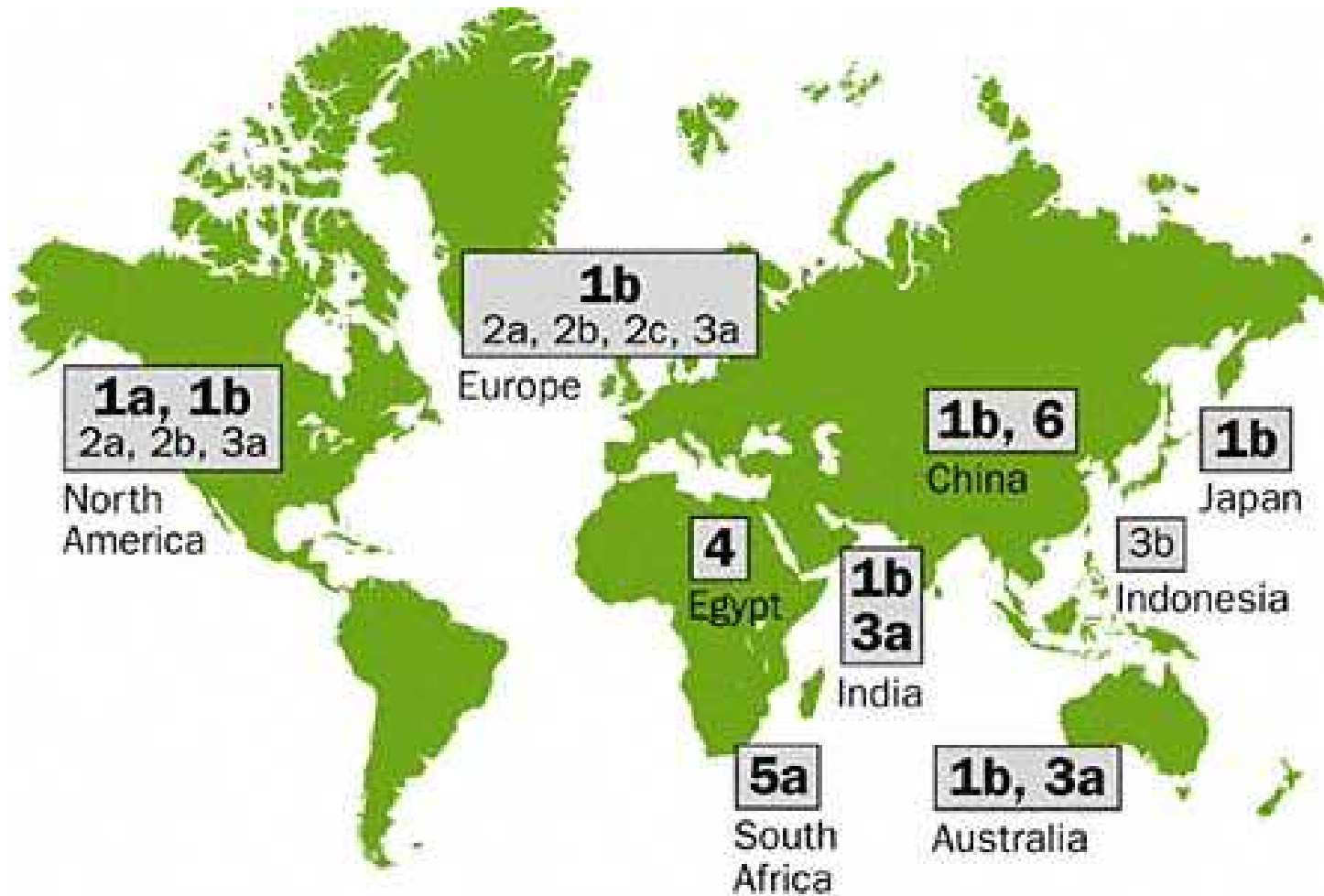


# HCV genotipi



# Distribuzione geografica genotipi HCV

---



# Genotipo e risposta alla terapia

---

- ❑ I genotipi 1 (a,b) e 4 presentano una minore risposta alla terapia
  - ❑ “*Viral load baseline*” e genotipo sono i due principali **predittori** indipendenti di risposta sostenuta alla terapia (SVR)
  - ❑ Sono previsti schemi posologici differenziati tra genotipi (dose e durata terapia)
  - ❑ Tuttavia pazienti con lo stesso genotipo e con gli stessi livelli di viremia basale hanno differenti risposte alla terapia → anche altri fattori condizionano la risposta alla terapia (insulinoresistenza, mutazione IL28R per IFN  $\lambda$ )
-

## How to use virological tools for optimal management of chronic hepatitis C

Stéphane Chevaliez and Jean-Michel Pawlotsky

Department of Virology & INSERM U841, French National Reference Center for Viral Hepatitis B, C and delta, Hôpital Henri Mondor, Université Paris 12, Créteil, France

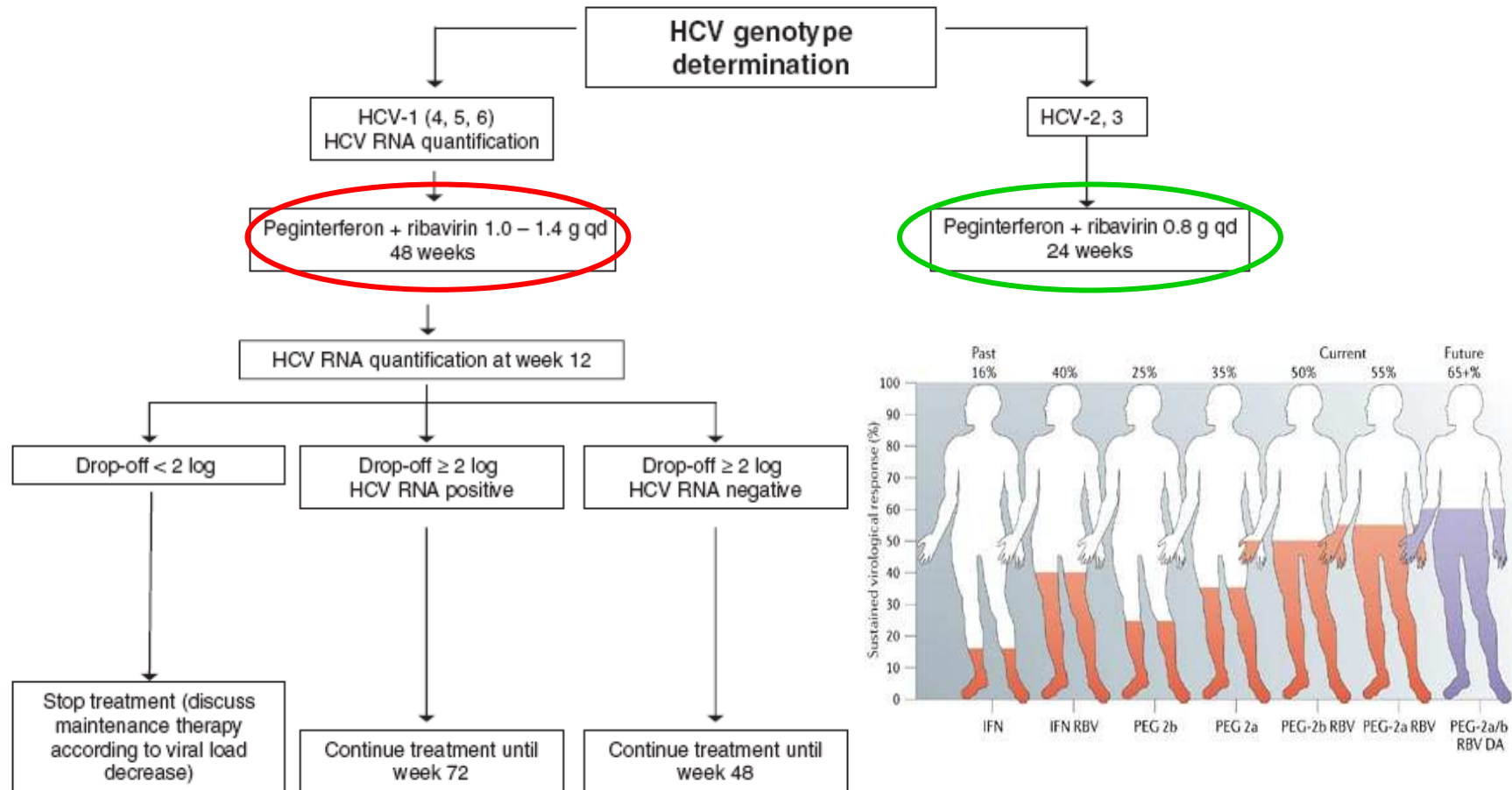
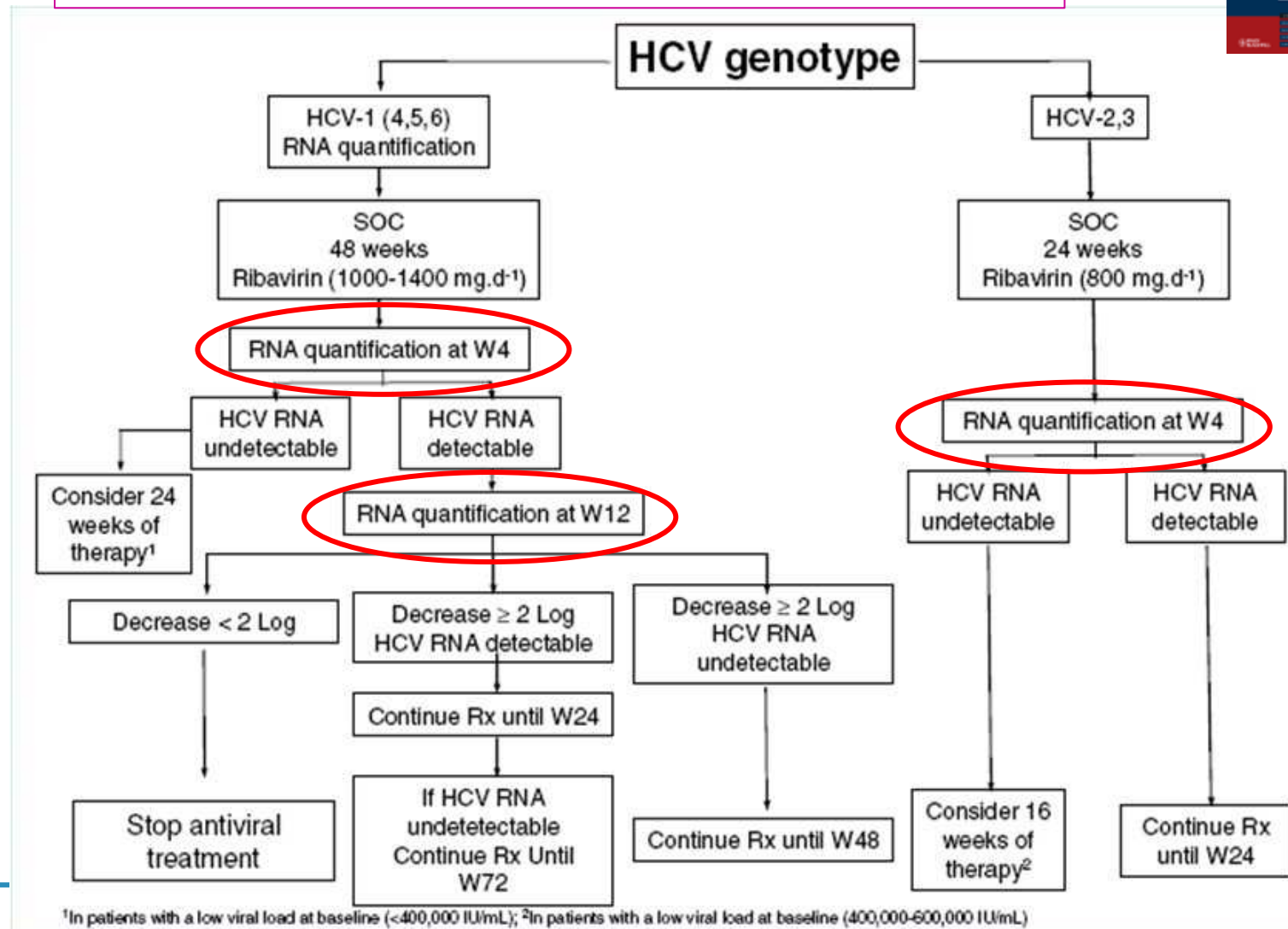
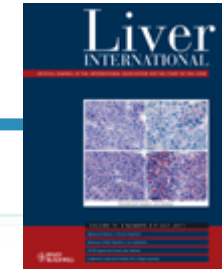


Fig. 2. Algorithms for the use of hepatitis C virus (HCV) virological tools in the treatment of chronic hepatitis C, according to the HCV genotype.

## How to use virological tools for optimal management of chronic hepatitis C

Stéphane Chevaliez and Jean-Michel Pawlotsky

Department of Virology & INSERM U841, French National Reference Center for Viral Hepatitis B, C and delta, Hôpital Henri Mondor, Université Paris 12, Créteil, France





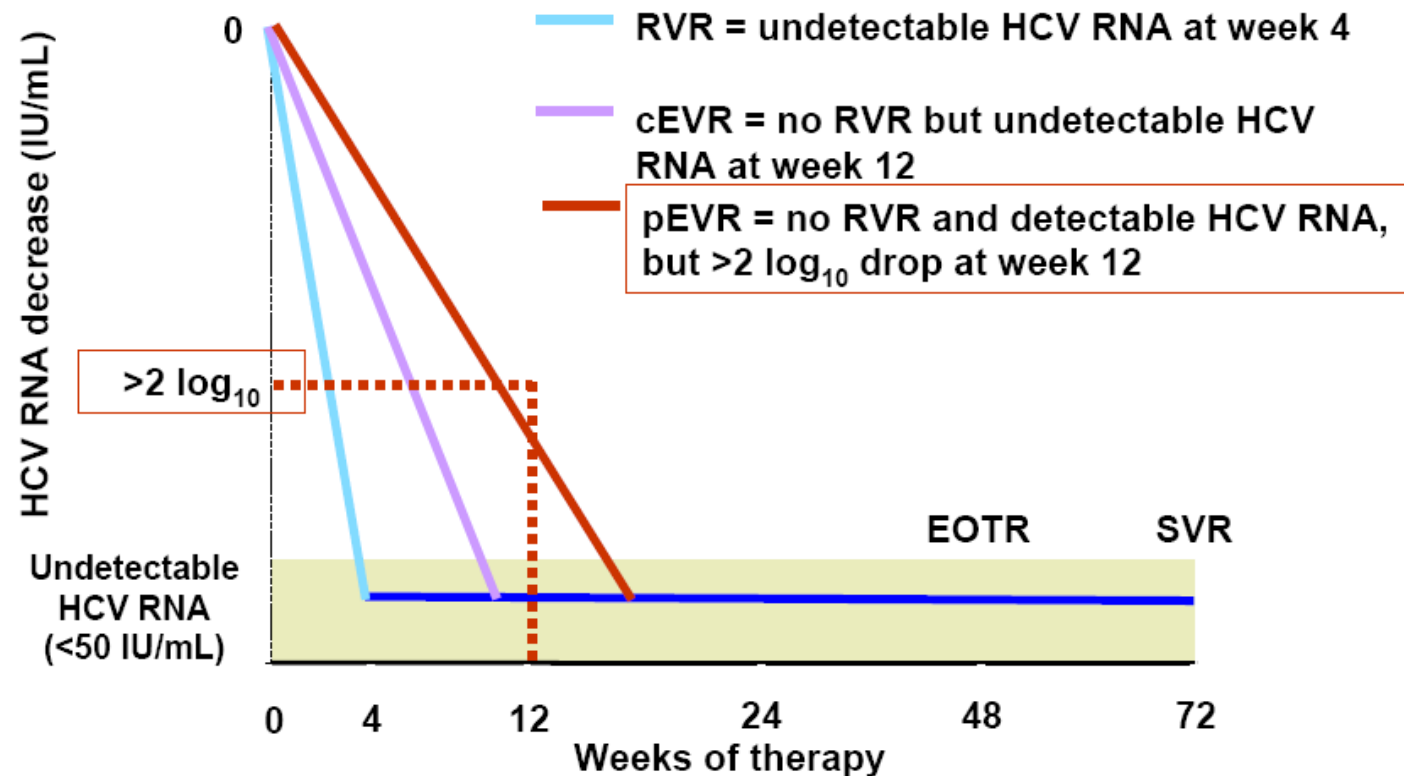
# Risposta virologica alla terapia:

---

## HCV-RNA

- **RVR**: negativo a 4 settimane di terapia
  - **EVR**: completa → negativo a 12 sett.  
parziale → calo  $> 2 \log_{10}$  a 12 sett.
  - **NR**:  $< 2 \log_{10}$  da valori base a 12 sett.
  - **non-vRVR**: calo  $< 0.8 \log_{10}$  a 48 ore  
predittività negativa per SVR
  - **SVR**: negatività a 6 mesi da fine terapia
-

## Definizione della risposta virologica alla 4 e 12 settimana di terapia



RVR = rapid virological response; cEVR = complete early virological response; pEVR = partial early virological response.



Contents lists available at ScienceDirect

Antiviral Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/antiviral](http://www.elsevier.com/locate/antiviral)



Short communication

Rapid prediction of sustained virological response in patients chronically infected with HCV by evaluation of RNA decay 48 h after the start of treatment with pegylated interferon and ribavirin

Giustino Parruti<sup>a,\*</sup>, Ennio Polilli<sup>a</sup>, Federica Sozio<sup>a</sup>, Valeria Cento<sup>b</sup>, Alessandro Pieri<sup>a</sup>, Francesco Di Masi<sup>a</sup>, Fabio Mercurio<sup>b</sup>, Monica Tontodonati<sup>a</sup>, Elena Mazzotta<sup>a</sup>, Francesca Ceccherini-Silberstein<sup>b</sup>, Lamberto Manzoli<sup>c</sup>, Carlo Federico Perno<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Infectious Disease Unit, Pescara General Hospital, Via Fonte Romana, 8 - 65124 Pescara, Italy

<sup>b</sup> Department of Experimental Medicine, University of Rome "Tor Vergata", Rome, Italy

<sup>c</sup> Section of Epidemiology and Public Health, University of Chieti, Italy

Nell'analisi multivariata il decadimento rapido della viremia HCV a 48h è risultato predittore più potente di SVR rispetto a viremia basale, genotipo ed incompleta aderenza

# Test diagnostici per HCV

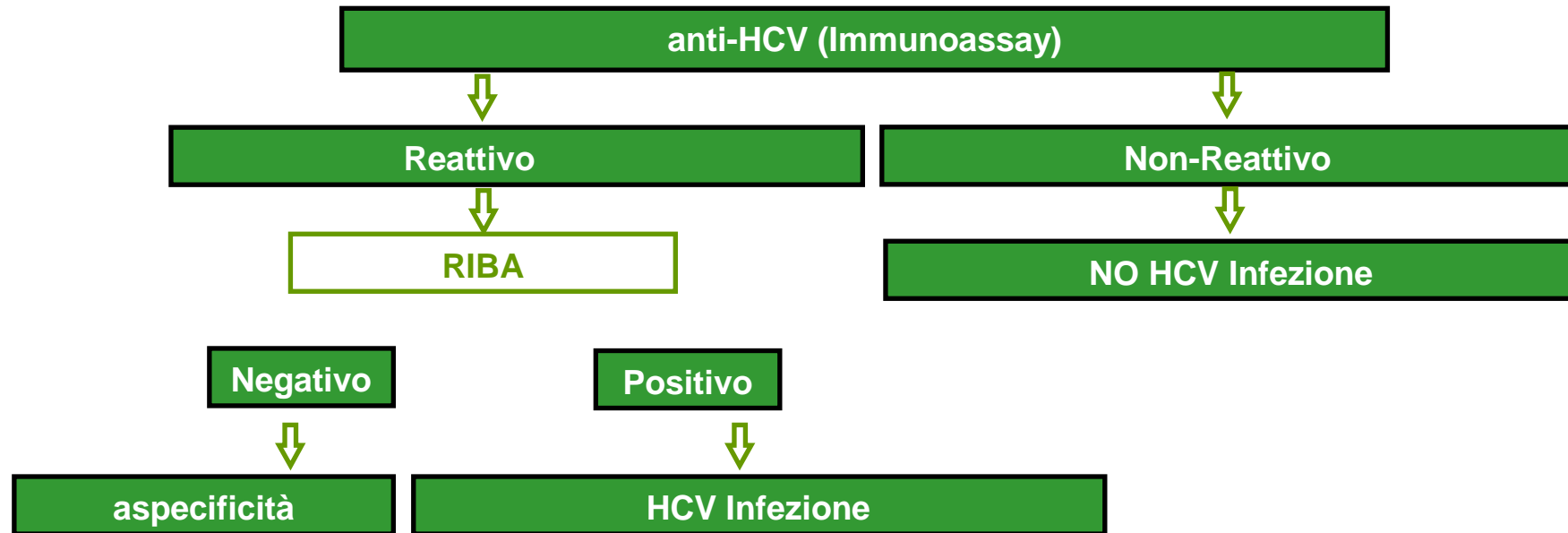
(CDC, MMWR 52;RR -3, 7

Febbr.2003)

Test	Applicazione	Commento
HCV-Ab (EIA)	Test di screening. Indica infezione attiva o pregressa, ma non è in grado di distinguere tra forma acuta, cronica o risolta	Sensibilità 97%
HCV-Ab (RIBA)	Test di conferma, da eseguire nei casi di debole positività del test EIA	
HCV-RNA (PCR)	Rileva la presenza di RNA virale nel sangue. Utile per il monitoraggio della terapia e come criterio di predittività di risposta alla terapia stessa	Positivo dopo 1-2 sett. dal contagio
Genotipizzazione	Identifica 6 genotipi virali e più di 90 sottotipi. Utile per stabilire durata e posologia della terapia verso i vari genotipi	Il genotipo 1 è il più frequente, sia in EU che negli USA, presenta come il genotipo 4 probabilità più bassa di risposta alla terapia

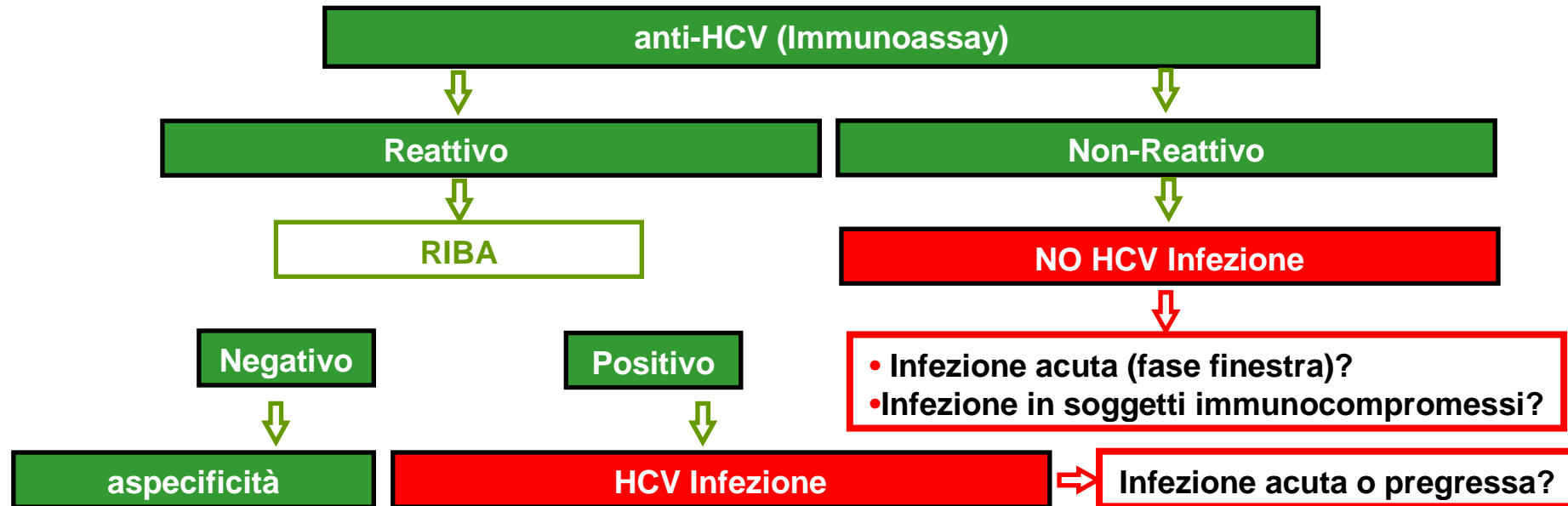
# Infezione da HCV: Diagnosi sierologica di routine

---

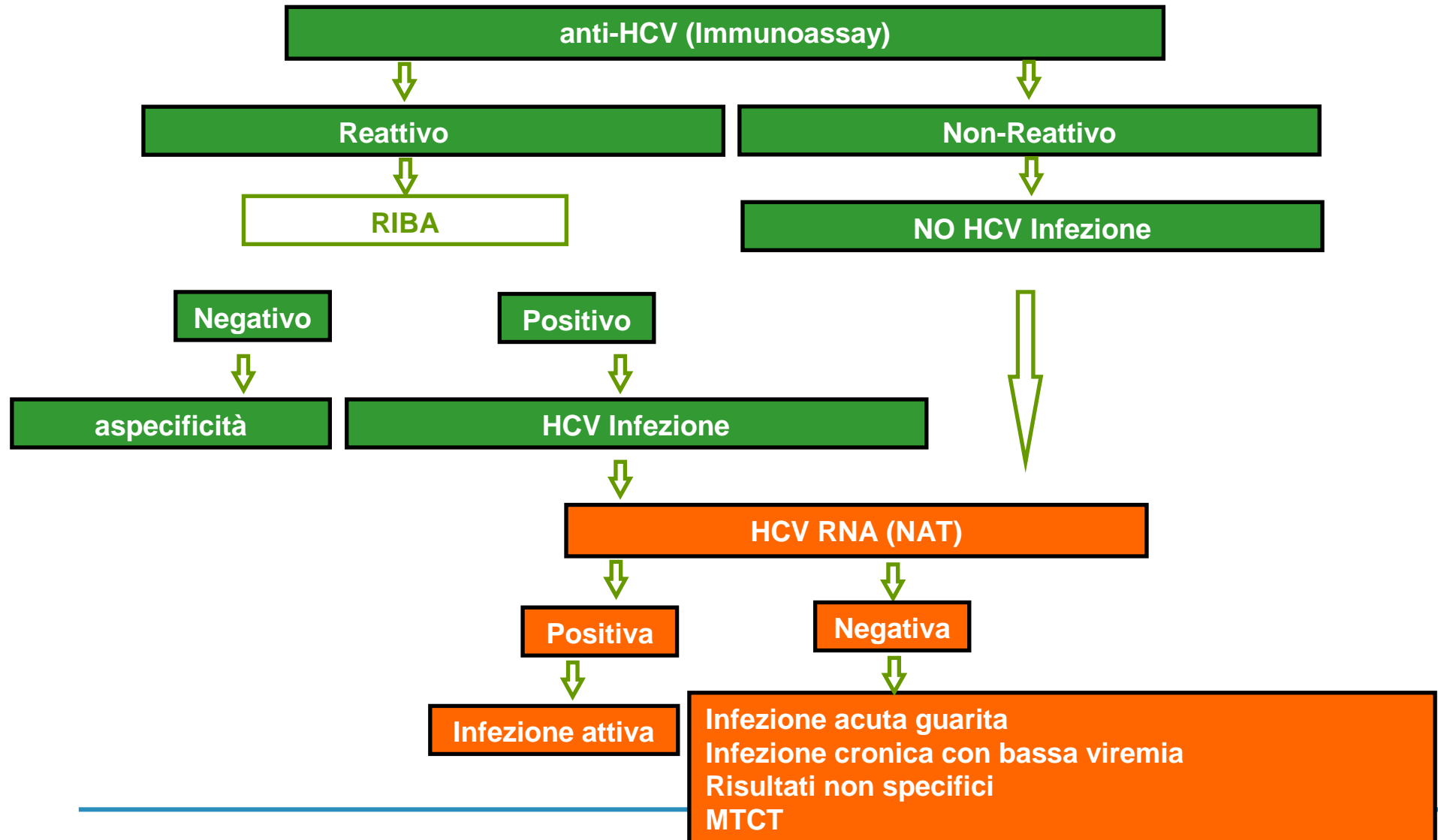


# Limiti della diagnosi sierologica di routine

---

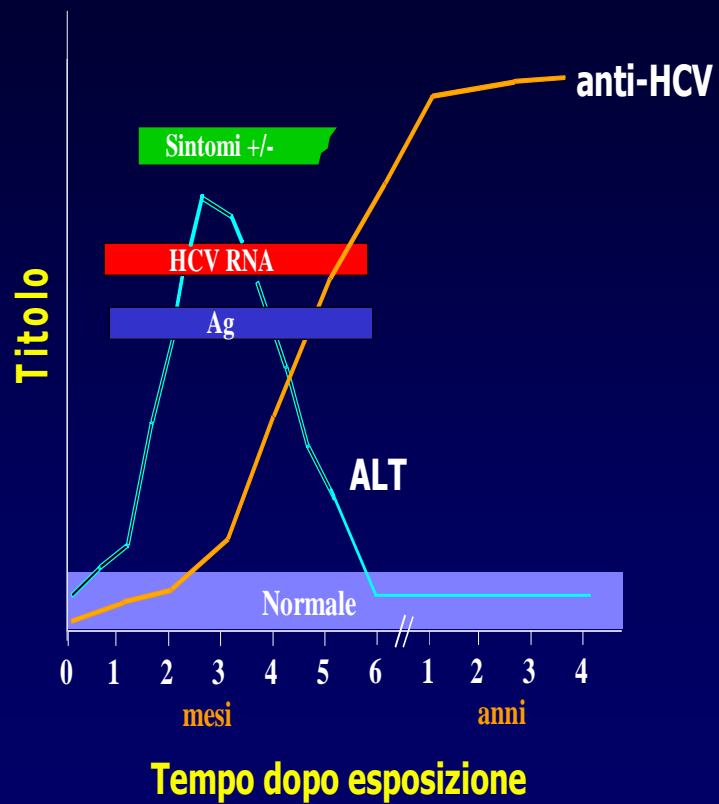


# Diagnosi sierologica e molecolare di routine

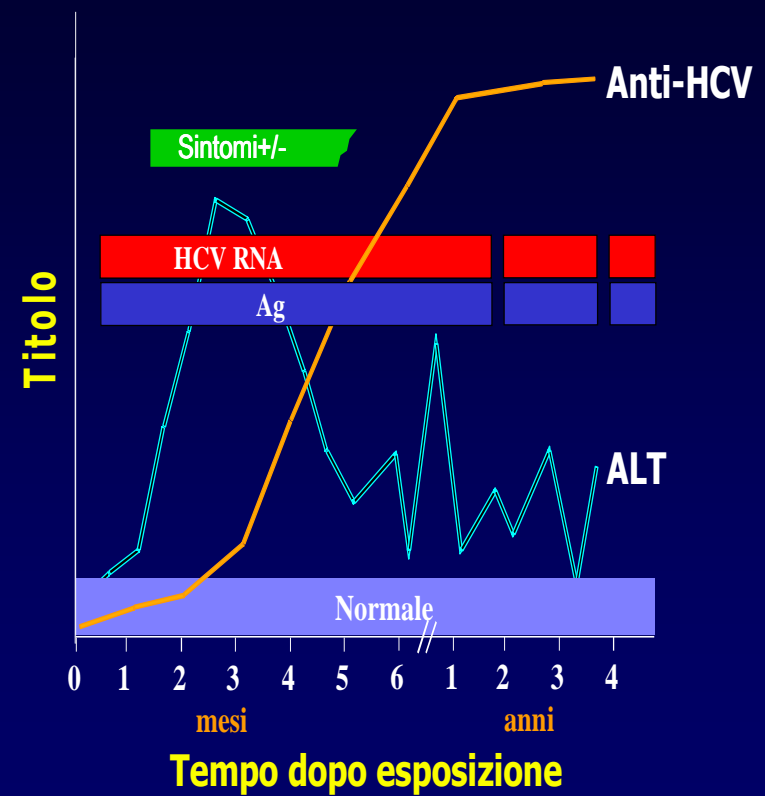


# Marcatori di Infezione da HCV

## Epatite acuta che guarisce

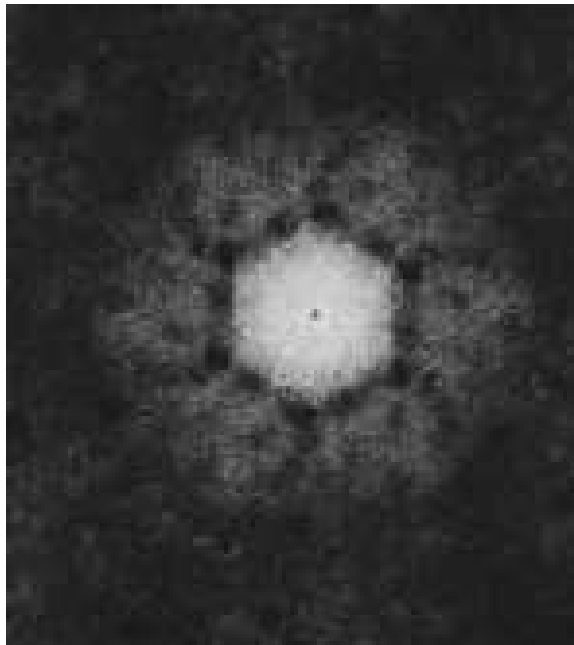


## Epatite acuta che cronicizza





# HCV CORE Ag



❑ **“Virioni” HCV** da pazienti anti-HCV negativi con “viral load” molto elevato:

✓ 1 capsid = 240 capsomeri

✓ 1 capsomero = proteina di 190 kD, quindi  $4,56 \times 10^6$  D per capsid

❑ **Core Ag:**

✓ Basico, lipofilo, variabile, assoc. membrane

✓ Macrocomplessi con proteine. Lipidi e anticorpi

✓ Non prodotto in eccesso, stabile in plasma/siero

✓ Rapporto teorico tra HCV-RNA e antigene Core: 43.000 UI RNA / pg Ag

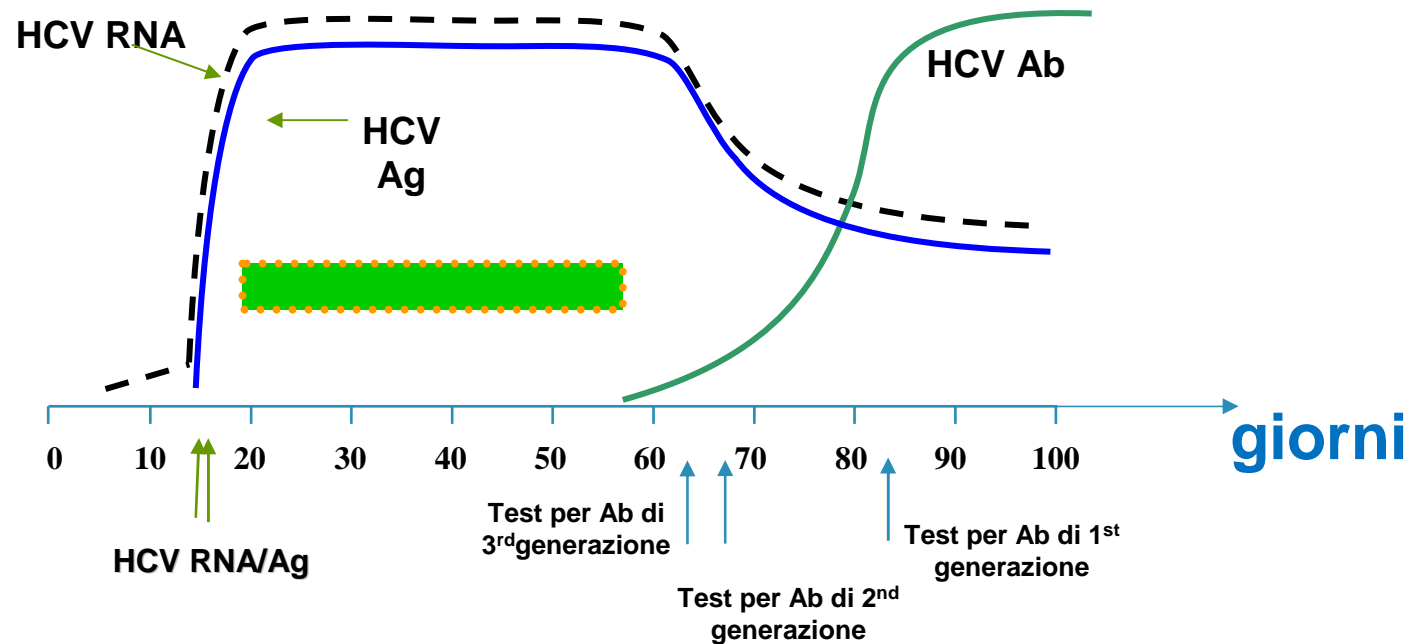
Valore medio ottenuto su 197 campioni da 23 pazienti con epatite cronica C trattati con IFN: 7.900 UI di HCV RNA per pg di Core Ag

Strutture antigeniche “RNA-free” (lisi delle cellule infette, complessi con Ab)



*M. Kaito et al, Med Mol Morphol 2006*

# HCV Ag riduce il periodo finestra.....



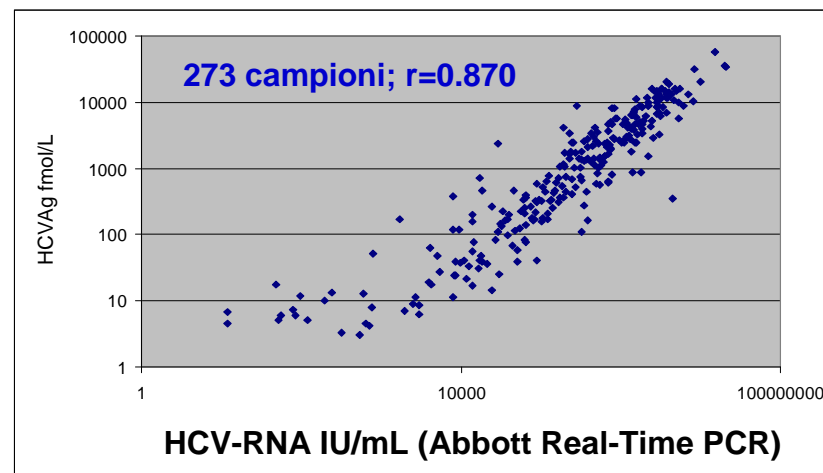
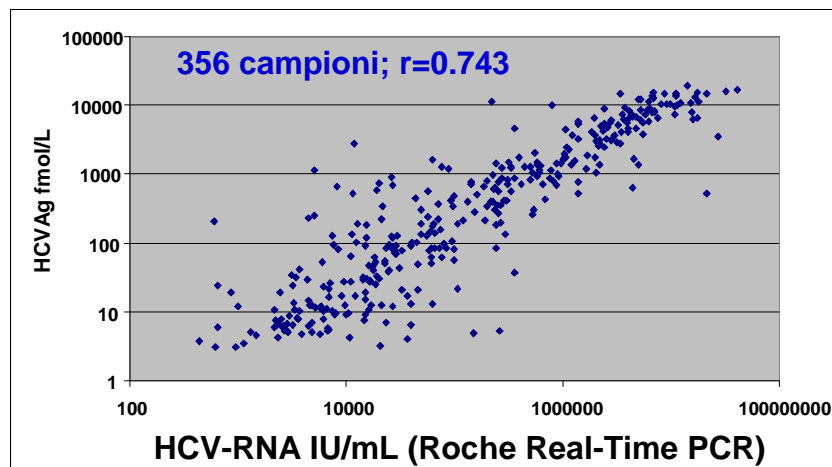
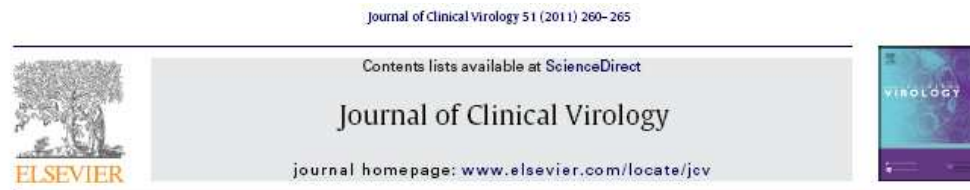
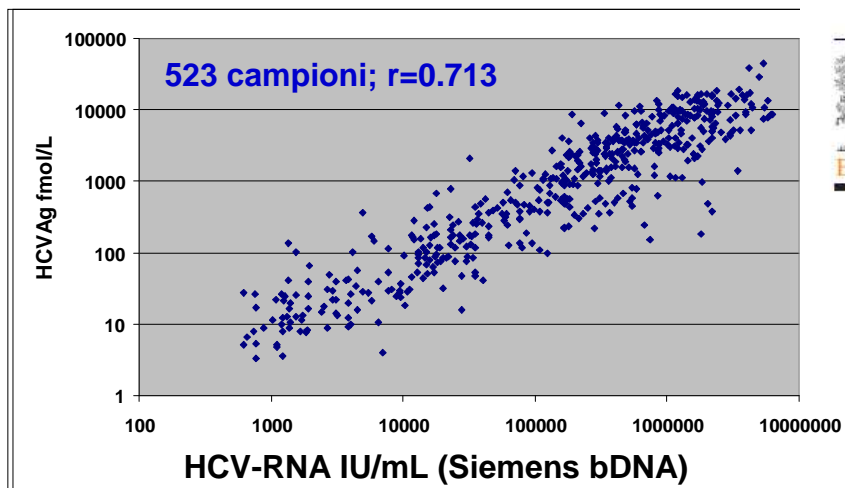
Il test HCV Ag è quindi di ausilio:

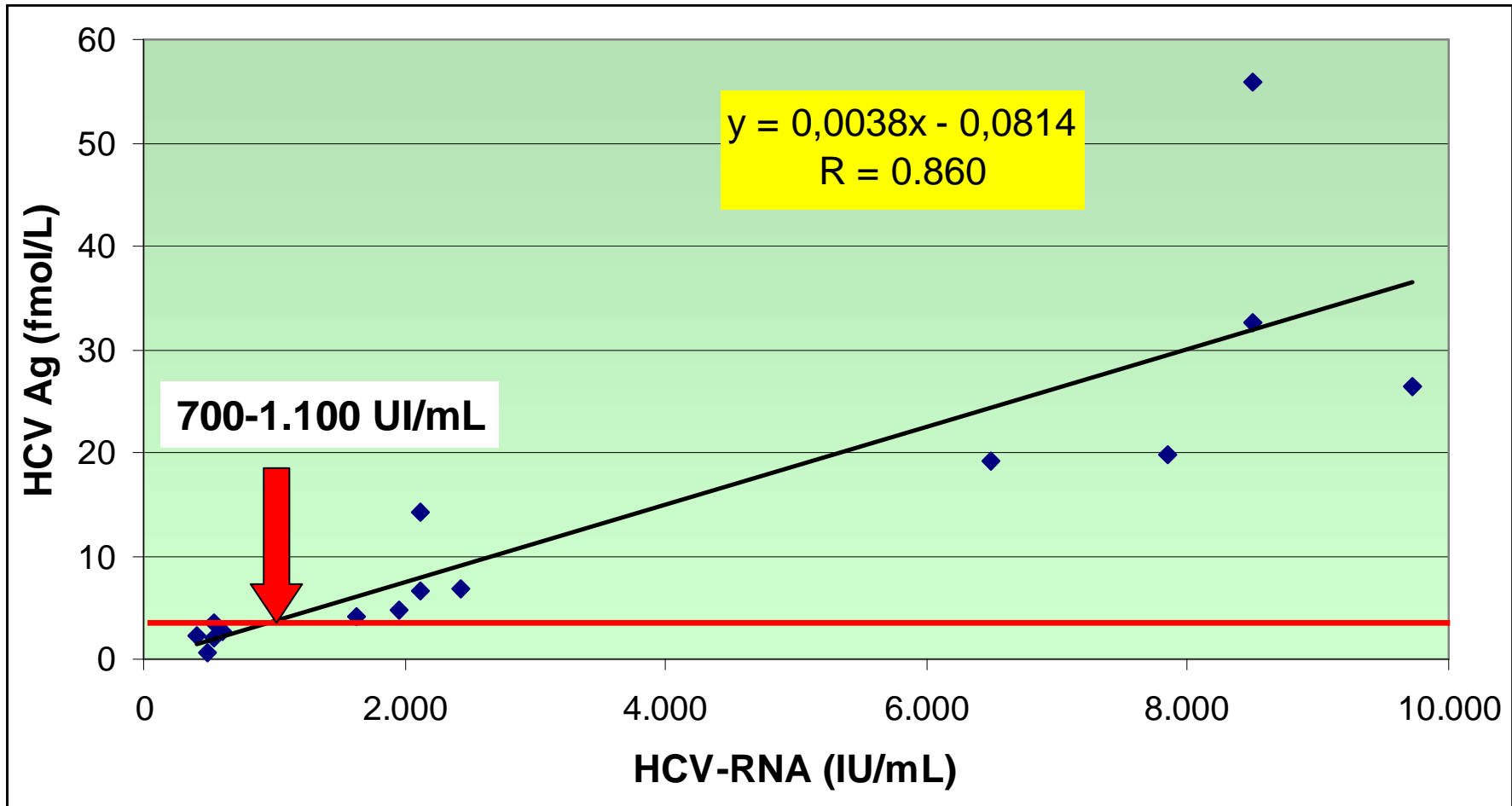
- nello screening di pazienti ad alto rischio (es. dializzati, emofiliaci o malati immunocompromessi)
- nella diagnosi di una sospetta infezione da HCV

# Correlazione tra HCV-RNA e HCV Ag

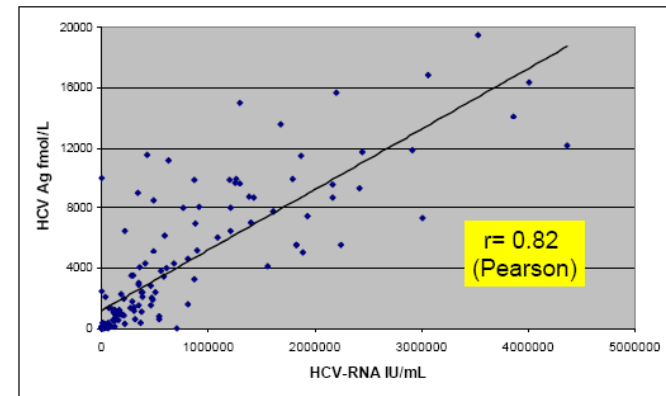
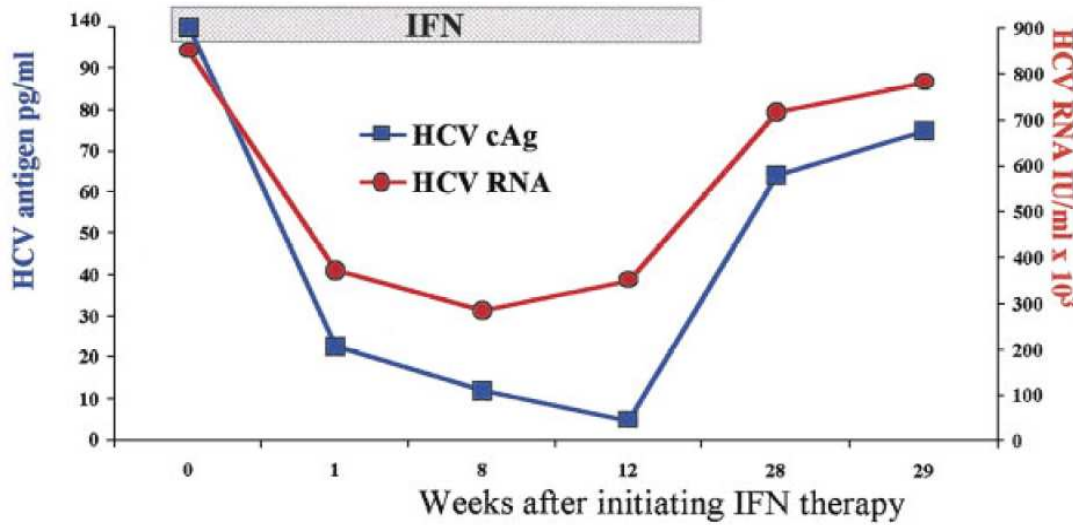
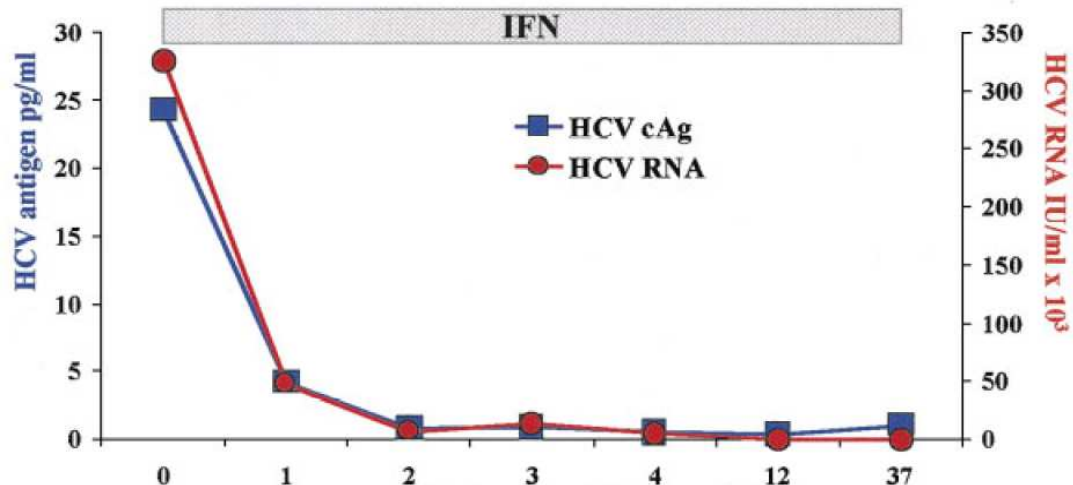
Hepatitis C virus core antigen: Analytical performances, correlation with viremia and potential applications of a quantitative, automated immunoassay

MC Medici et al.







# HCV Ag: monitoraggio terapia



ARCHITECT HCV Ag: 0,06 pg/mL / 500 UI/mL of HCV-RNA

# HCV Ag: Bibliografia

Journal of Clinical Virology JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 2010, p. 1161–1168 Vol. 48, No. 4  
0095-1137/10/\$12.00 doi:10.1128/JCM.01640-09  
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.



## Analytical Performance Characteristics and Clinical Utility of a Novel Assay for Total Hepatitis C Virus Core Antigen Quantification<sup>∇</sup>

R. S. Ross,<sup>1\*</sup> S. Viazov,<sup>1</sup> S. Salloum,<sup>1</sup> P. Hilgard,<sup>2</sup> G. Gerken,<sup>2</sup> and M. Roggendorf<sup>1</sup>

*Institute of Virology, National Reference Centre for Hepatitis C, Essen University Hospital, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany,<sup>1</sup> and Department of Gastroenterology and Hepatology, Essen University Hospital, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany<sup>2</sup>*

Performance and clinical utility of a new sensitive and specific HCV-core antigen assay for quantitative determination

Ingmar Mederacke<sup>a</sup>, Heiko Kaori Morota<sup>a,\*</sup>, Ryo Fujina Regina Raupach<sup>a</sup>, Karsten Haruhisa Saegusa<sup>b</sup>, Katsun

Journal of Clinical Virology 48 (2010) 18–21

*Intervirology*

Intervirology  
DOI: 10.1155



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jcv](http://www.elsevier.com/locate/jcv)



## Quantitative Determination of Hepatitis C Core Antigen Monitoring for Chronic

Analytical evaluation of HCV core antigen and interest for HCV screening in haemodialysis patients

Giovanna A. Moscato<sup>a</sup> Gianluigi Giannelli

Ombretta Marsi<sup>a</sup> Isabella Guarducci<sup>a</sup> Irène Marcel Miedouge<sup>a,\*</sup>, Karine Saune<sup>a,b</sup>, Nassim Kamar<sup>b,c</sup>, Martine Rieu<sup>a</sup>, Salvatore Antonaci<sup>b</sup> Alfonso Capria<sup>d</sup> Lionel Rostaing<sup>b,c</sup>, Jacques Izopet<sup>a,b</sup>

# HCV Ag: utilità clinica

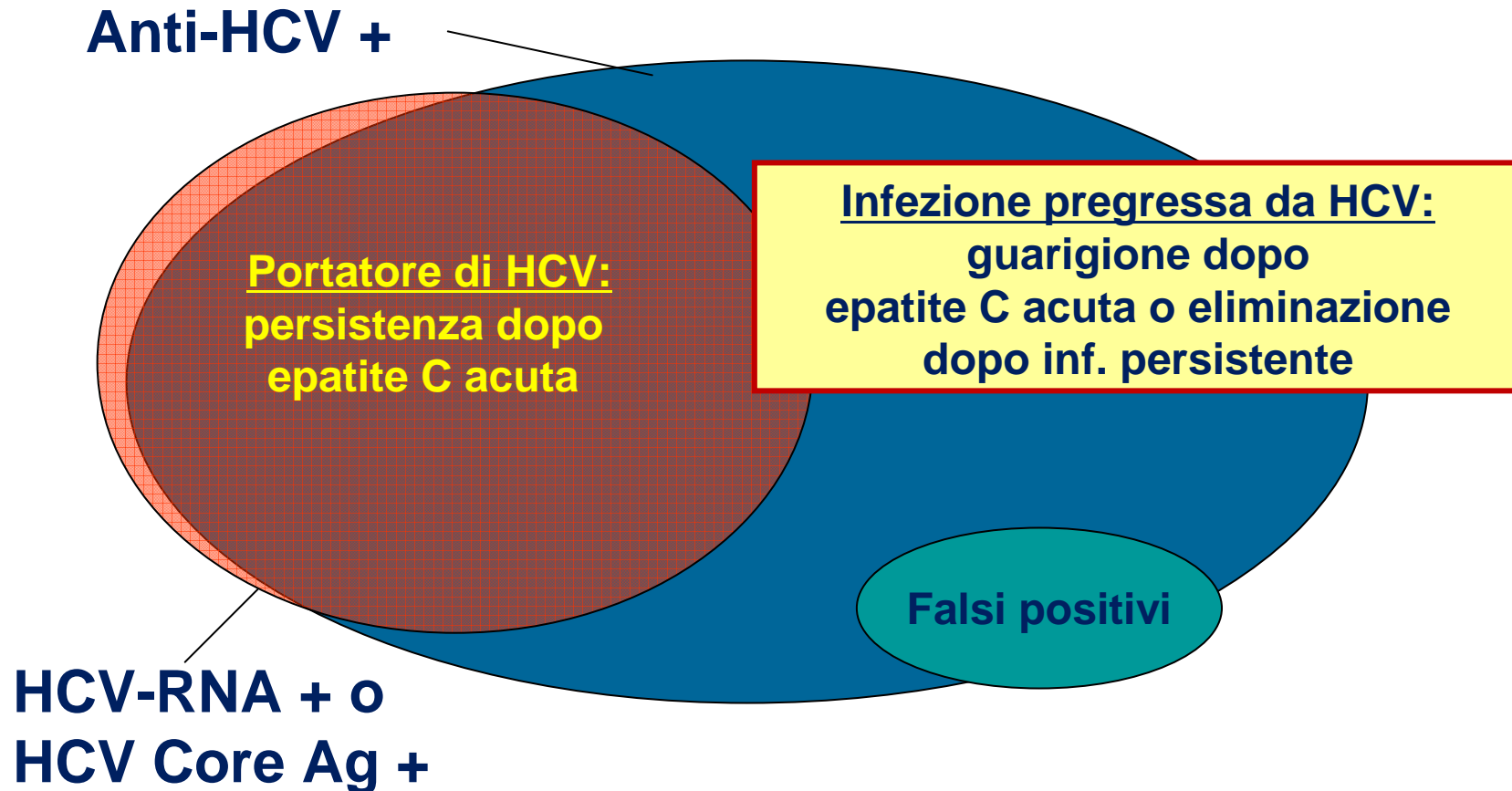
---

1. **Diagnosi precoce** in individui (ancora) anti-HCV negativi ma con un forte sospetto di infezione
2. **Screening di individui ad alto rischio per l'infezione da HCV** (es. IDUs, dializzati)
3. **Sorveglianza** dei pazienti immunocompromessi (es. AIDS, trapiantati)
4. Valutazione rapida (“**reflex**” test) su campioni positivi per anti-HCV per differenziare un'**infezione attiva da una pregressa**
5. **Conferma dello stato di HCV-positivo** nei casi di reattività Ab dubbia (reflex test)
6. **Follow-up** dei pazienti con **infezione cronica** non trattata
7. **Monitoraggio e follow-up della terapia antivirale** (complementare a HCV-RNA con “timing” differente)
8. **Valutazione** dei nuovi farmaci?



# Infezione da HCV: panoramica di insiemi...

---





# Markers HCV e significato

---



- ◆ HCV-Ab
- ◆ HCV-RNA
- ◆ HCV Core
- ◆ HCV genotipo
- ◆ HCV-Ab IgM



**Esposizione**



**Replicazione**



**Infezione**



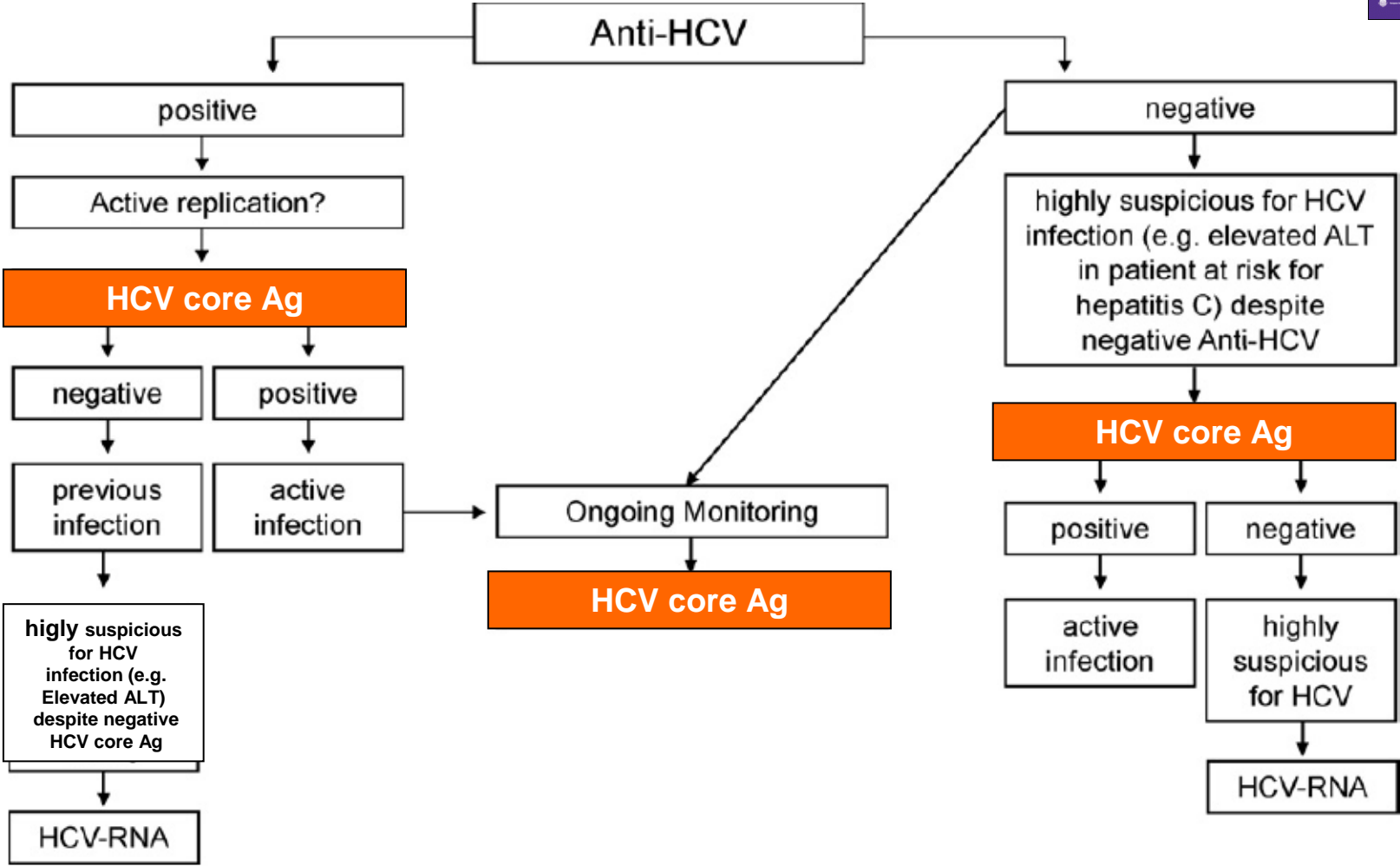
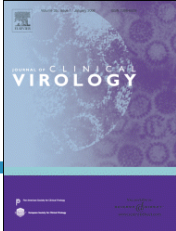
**Prognosi**



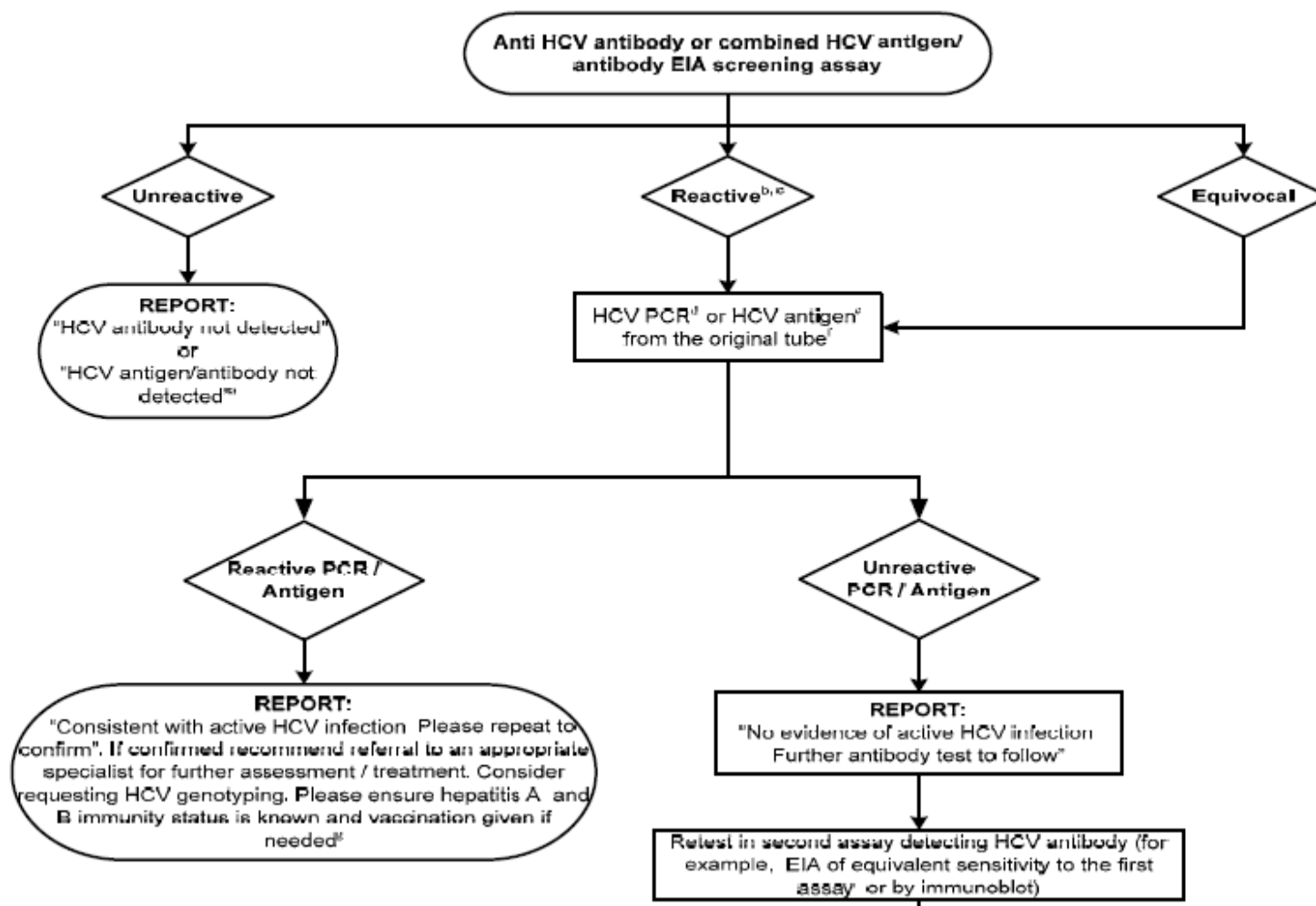
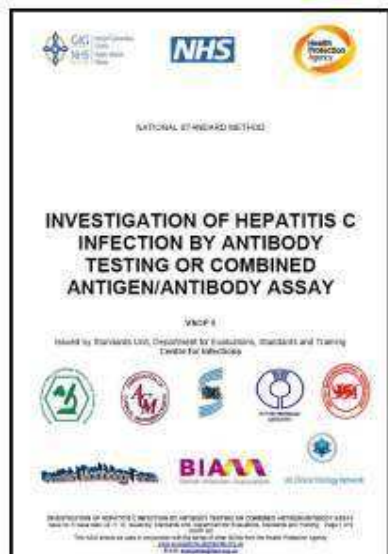
**Malattia**

---

# Infezione da HCV: un nuovo algoritmo?

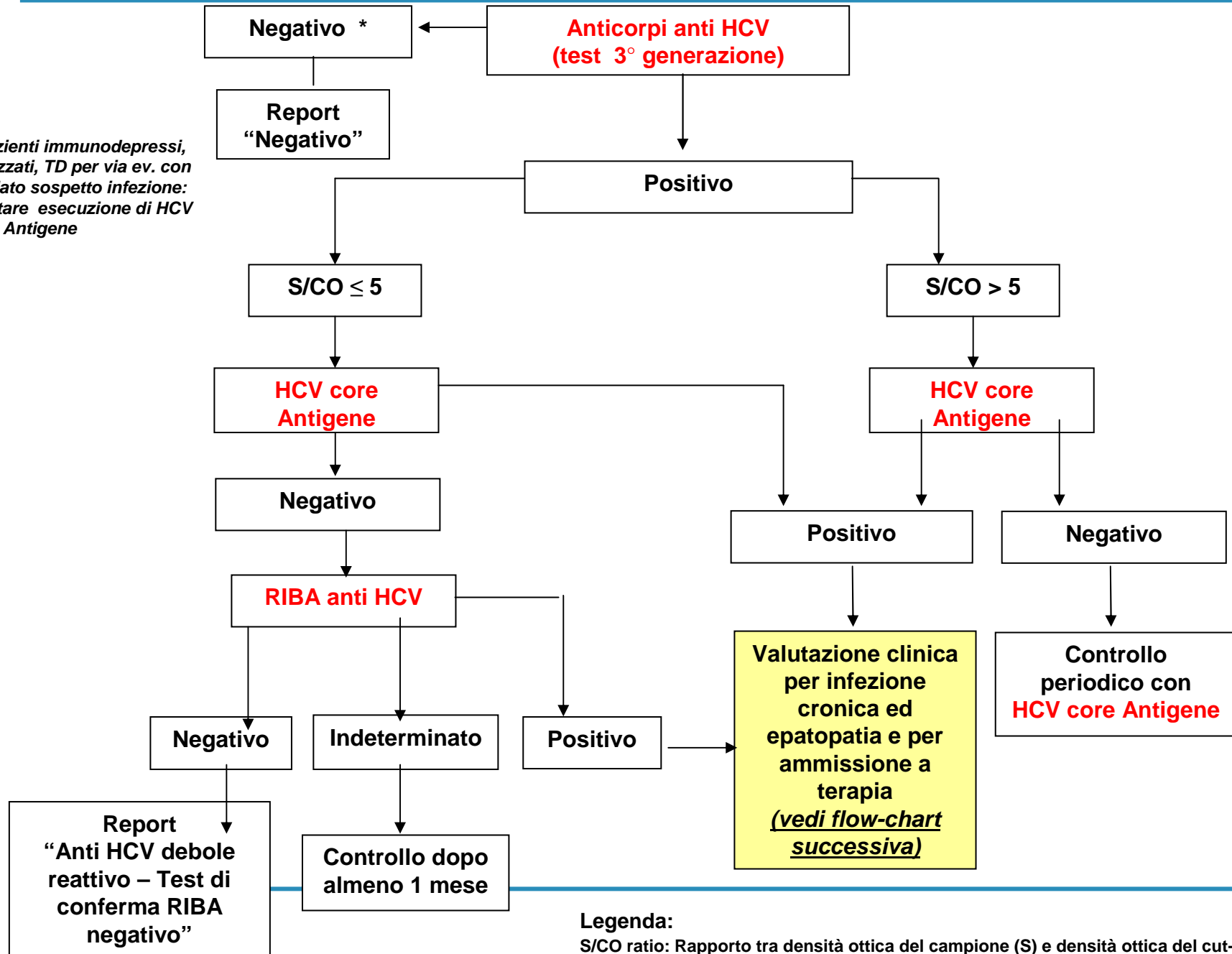


# UK: Linee Guida per la diagnosi di infezione da HCV

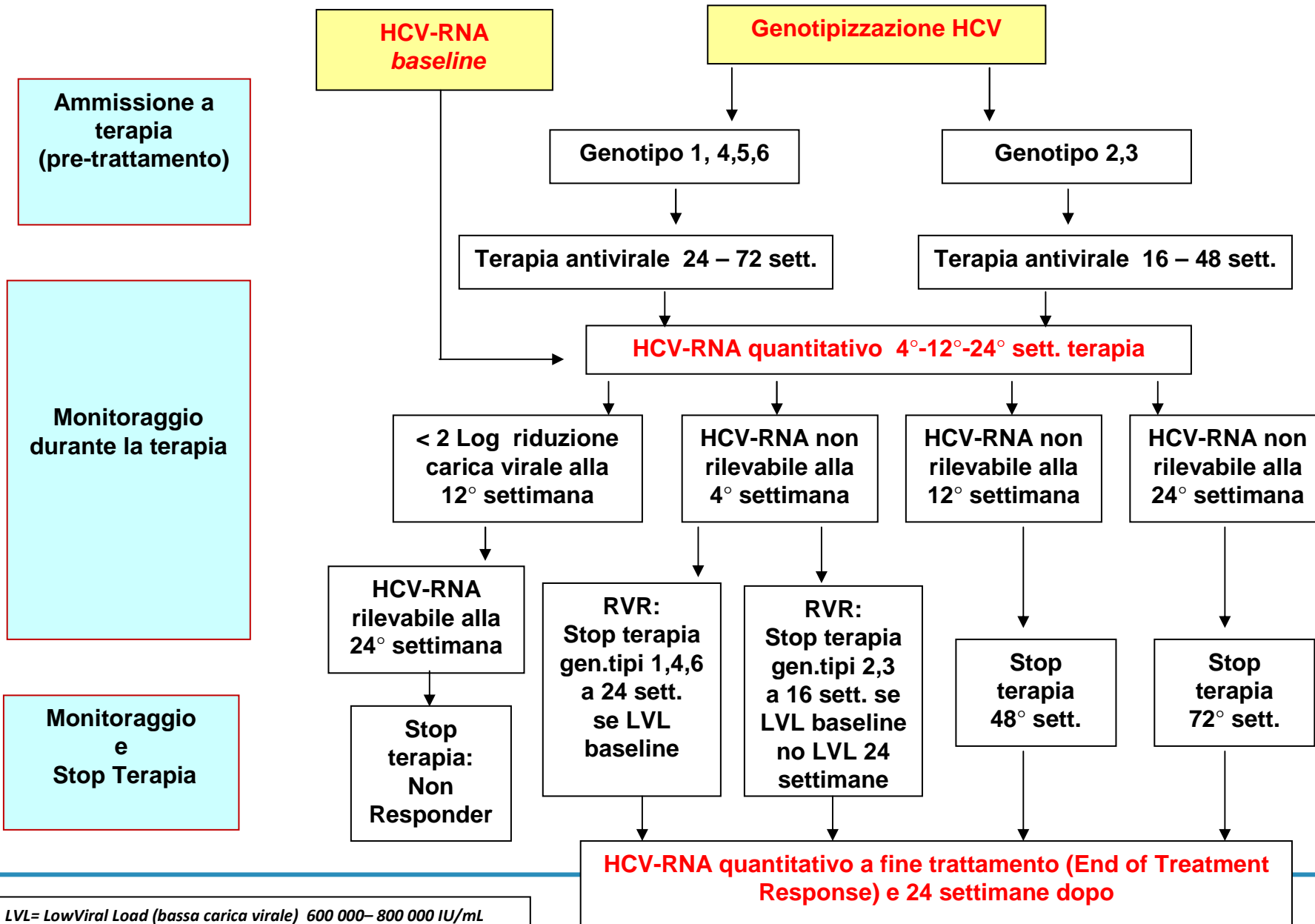


## Algoritmo diagnostico HCV - APSS Trento

\* Pazienti immunodepressi, dializzati, TD per via ev. con fondato sospetto infezione: valutare esecuzione di HCV core Antigene



# Flow-chart Terapia Epatite C - APSS Trento



## Tariffario esami specifici HBV e HCV

**HCV-ab: € 9,66**

**RIBA: € 76,75**

**HCV-Ag: € 23,0**

**HCV-RNA: € 77,47 \***

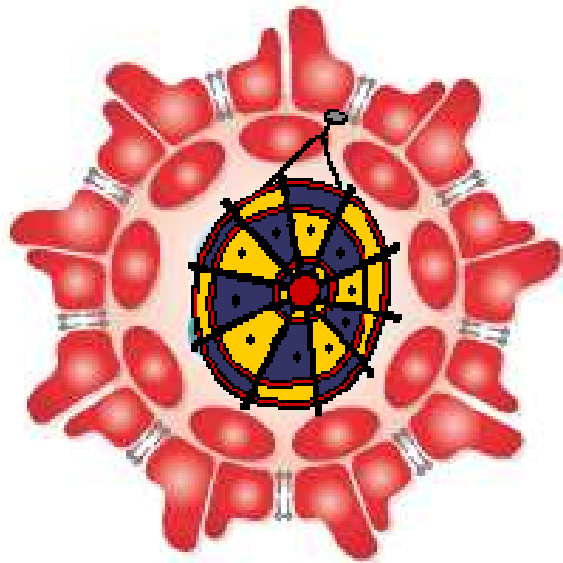
**Genotipo HCV: € 77,47 \***



\* sottostimati rispetto al costo effettivo

# HCV: un obiettivo da “centrare” con un lavoro di squadra multidisciplinare

---



**Grazie dell'attenzione**

---





ERROR: undefined  
OFFENDING COMMAND: La

STACK:

```
(9)  
/Title  
( )  
/Subject  
(D:20120507131126+02'00')  
/ModDate  
( )  
/Keywords  
(PDFCreator Version 0.9.5)  
/Creator  
(D:20120507131126+02'00')  
/CreationDate  
(5317841)  
/Author  
-mark-
```