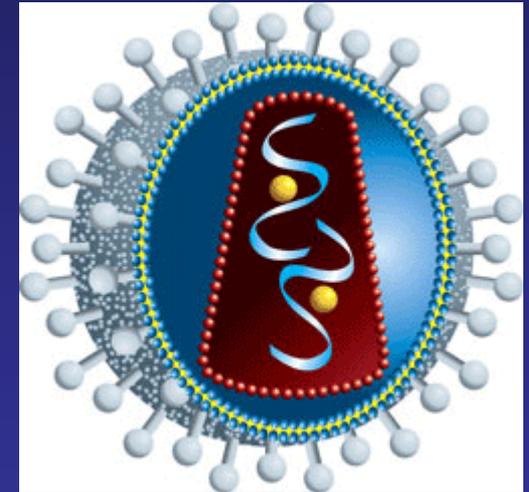




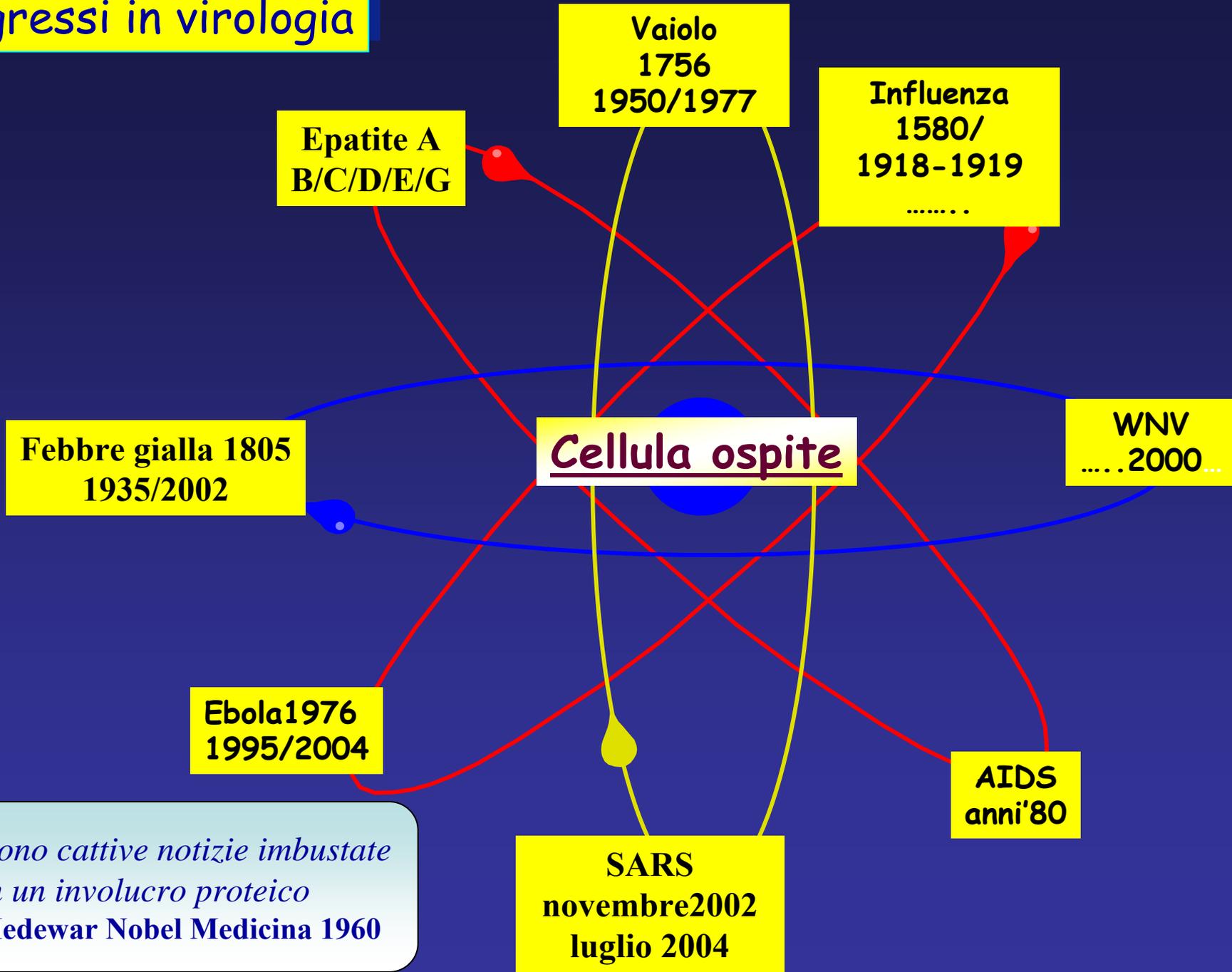
APPROCCI INNOVATIVI ED INTEGRATI PER LA RIDUZIONE DEL RISCHIO TRASFUSIONALE

Innovazioni diagnostiche per l'infezione da HCV

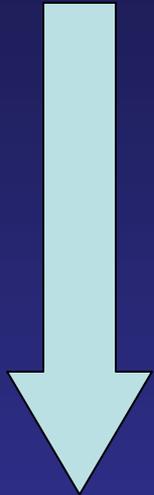


**Michelina Miceli
SIMT A.O. S. Camillo-Forlanini**

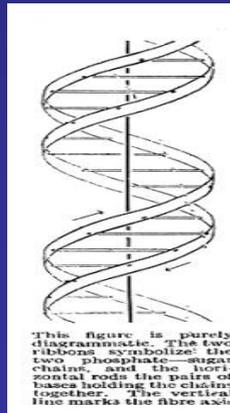
Progressi in virologia



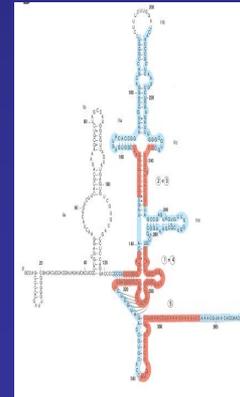
Progressi in virologia



- eziologia virale le più antiche infezioni dell'uomo
- dati storiografici, clinici, epidemiologici
- focolai d'origine
- vie di trasmissione
- rotte, serbatoi



DNA
doppia
elica



RNA
singolo
filamento

Progressi in virologia

Epidemia → Stimolo alla ricerca ⇒ risultati ↓
applicazioni diagnostiche e terapeutiche



Isolamento virale

microscopia elettronica

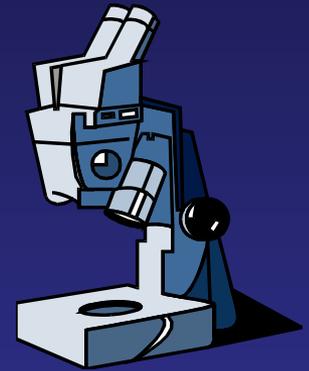
ultracentrifugazione

elettroforesi degli acidi nucleici e delle proteine

la cristallografia a raggi x

l'impiego di anticorpi monoclonali

la reazione polimerasica a catena



Successo della medicina

⇒ identificazione

⇒ trattamento

⇒ prevenzione

⇒ **eradicazione**





Successo delle difese “umane”

**Infezione ⇒ identificazione ⇒ attivazione
⇒ risposta ⇒ eradicazione ⇒ immunità**

Successo dei virus

- **Evoluzione della virulenza**
- **Cronicizzazione**
- **Comparsa di nuove infezioni**
- **Varianti virali**



*In condizioni avverse sopravvive non
il più forte ma chi sa adattarsi meglio*
Charles Darwin



MUTAZIONI VIRALI

Si verificano in modo naturale nel
corso dei cicli di replicazione

Producono progenie numerose
da un singolo genoma

Nei virus ad alto turn-over

Sistemi di correzione?

✘ Non esistono nei virus a RNA

✘ Sono insufficienti nei virus a DNA

Replicazione degli
acidi nucleici



Errori



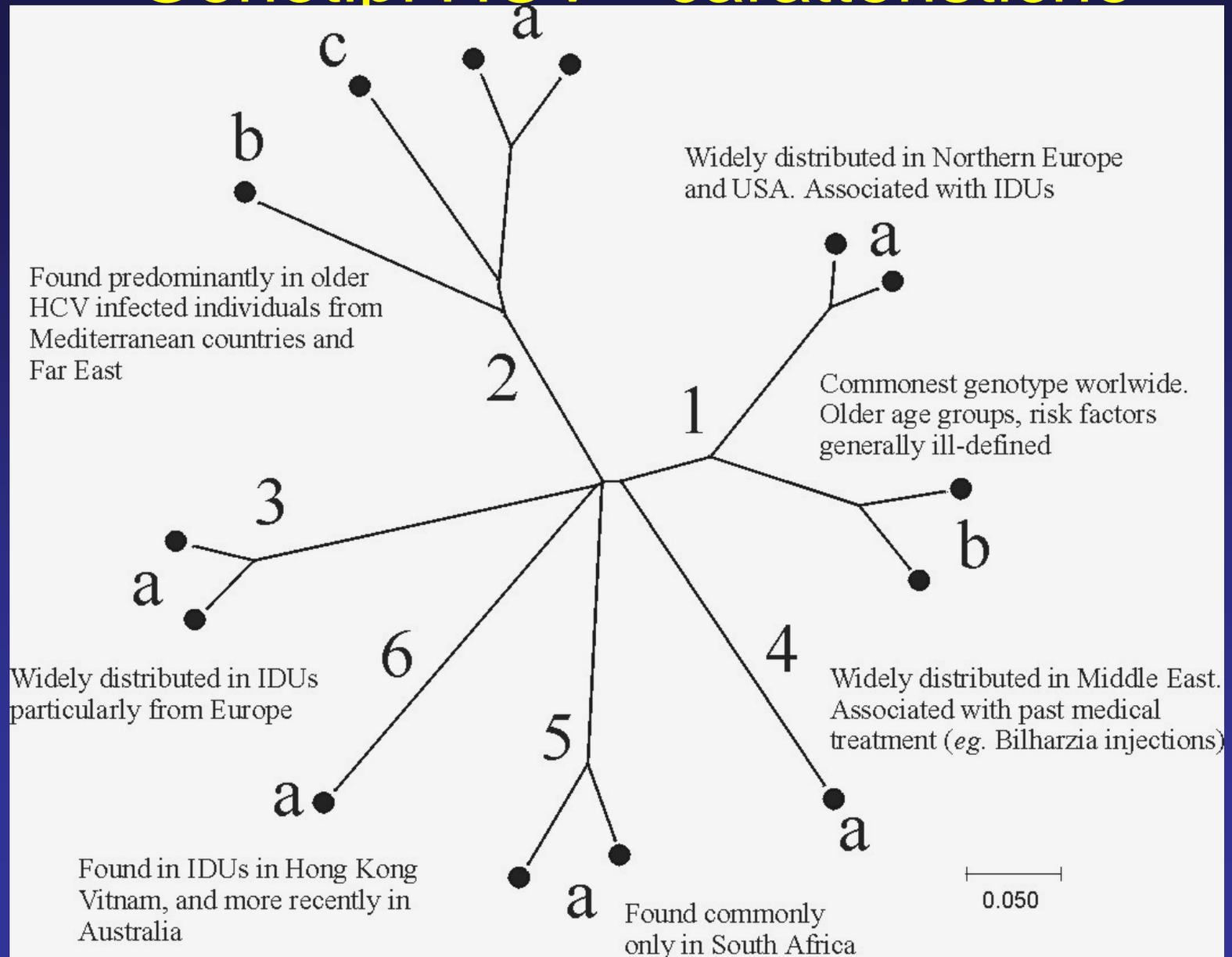
Mutazioni



Varianti / Ceppi mutati

Quasispecie

Genotipi HCV - caratteristiche



Genotipi HCV - distribuzione

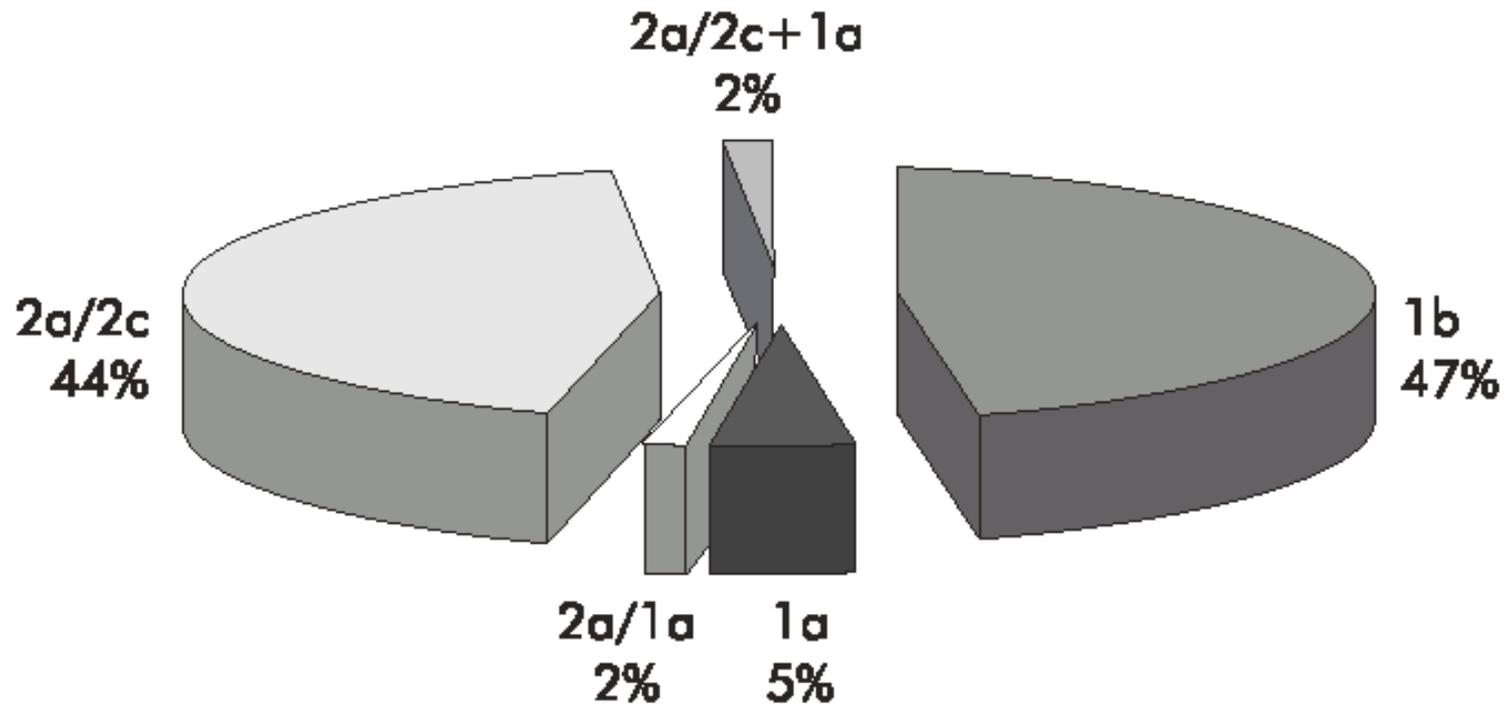


Figure 4 Distribution of genotypes in hepatitis C virus-RNA positive subjects.

↘ Prevalenza mondiale stimata del 2.3%

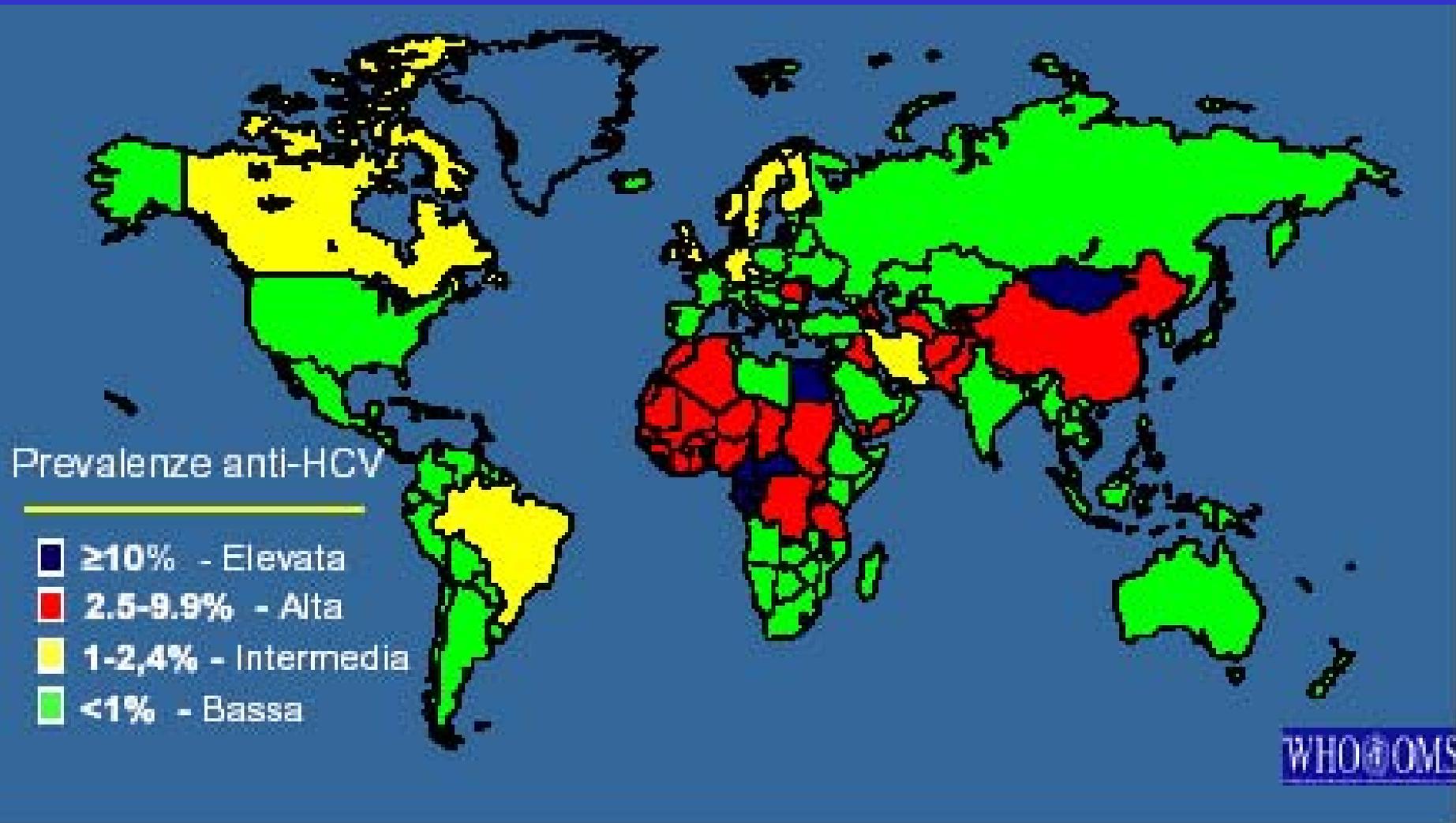
↘ OMS stima circa 150 milioni di persone infette

↘ Causa maggiore di patologie croniche del fegato

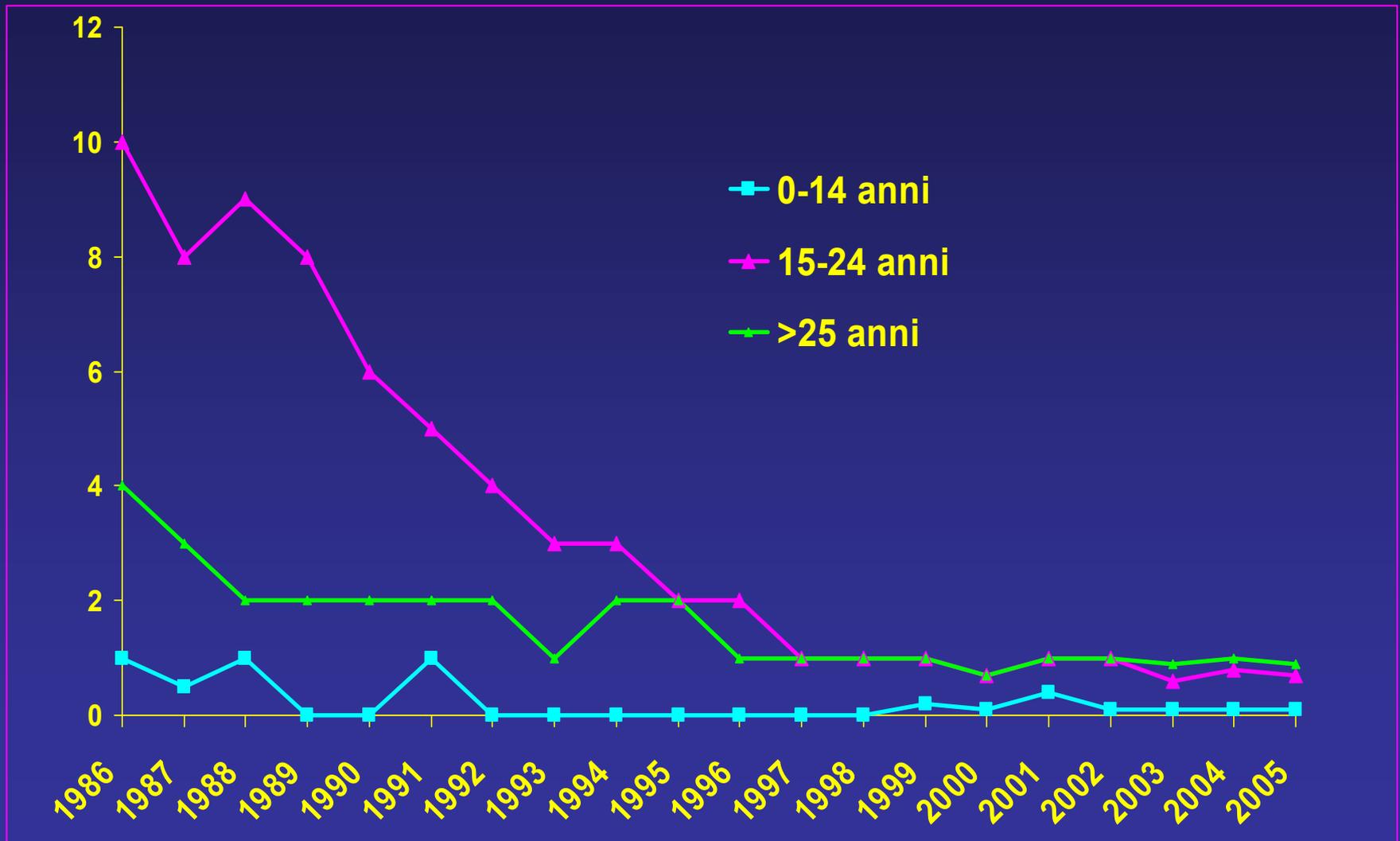
↘ Principale causa di trapianto

↘ Riduzione nei paesi industrializzati negli ultimi 20 anni

↘ Mancanza di una vaccinazione efficace



Incidenza di Epatite Acuta nA-nB in Italia per Età SEIEVA 1986-2005. Tassi per 100.000



Prevalenza di infezione cronica da HCV in Italia

Popolazione generale Età

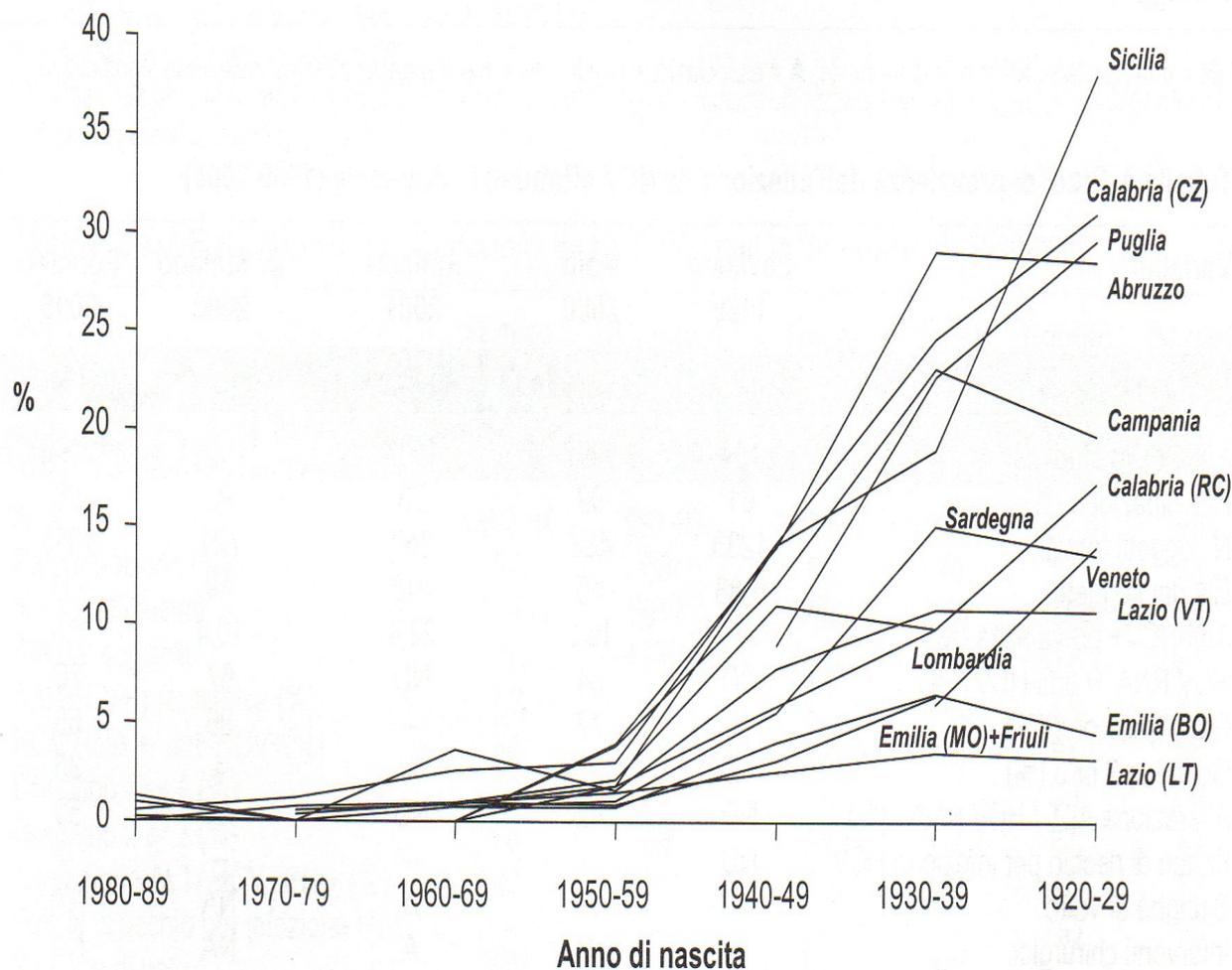
>5% nati tra il 1940-1949

>3% nati prima del 1940

<1.5 nati tra il 1950-1959

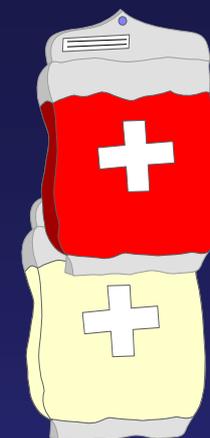
Sottogruppi ad alta prevalenza >10%

- Uso di droghe
- Emodializzati
- Emofilici
- Emotrasfusi e trapiantati





AUTODONAZIONI 2010



1500

26 POS
1,73%

15 IND
1%

- 6 nati 1930-40
- 13 40-50
- 5 50-60
- 1 1964 Ucraina
- 1 1989 Egitto

- 5 nati 1930-40
- 6 40-50
- 3 50-60
- 1 ≥1961

Donazioni 2010

21.648

(S. CAMILLO- IFO- OSTIA)



8 HCV-Ab POS



7 NAT POS

0,037%

Età 39-58 anni (4 stranieri)

2009

6 HCV Ab POS 5 NAT POS

0,033%

Età 35-48 anni (2 stranieri)

2008

10 HCV Ab POS 4 NAT POS

0,055%

Età 22-50 anni (3 stranieri)



**ATTIVITA' di
DIAGNOSTICA**

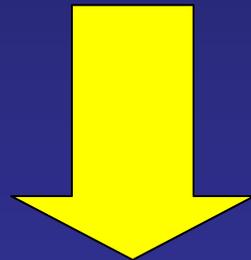
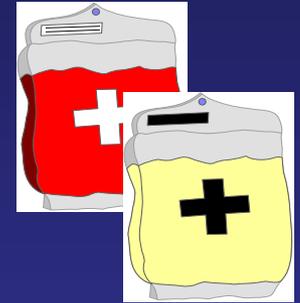
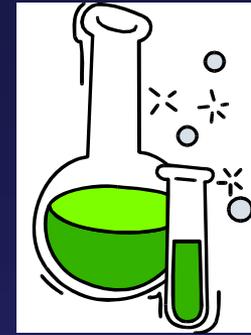
**DIAGNOSI
DI UNA
INFEZIONE
VIRALE
SINTOMATICA**

**ATTIVITA' di
SCREENING**

**SCREENING
DI UNA
INFEZIONE
VIRALE
ASINTOMATICA
O PRECOCE**

Lo screening infettivologico rappresenta la strategia cardine nella prevenzione delle malattie trasmissibili con la trasfusione e presuppone:

- la **scelta di tecnologie avanzate**, sensibili e specifiche
- gestione del **risultato** adeguata alla meta analitica del test stesso



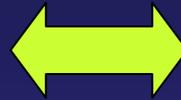
GARANTIRE ATTRAVERSO LA
VALIDAZIONE BIOLOGICA DEI
PRODOTTI DEL SANGUE
L'ASSENZA DI RISCHI INFETTIVI



EVOLUZIONE dello SCREENING

**Aumento di
sensibilità dei test**

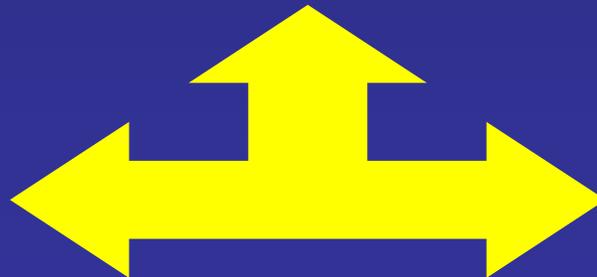
**Aumento della
specificità dei test**



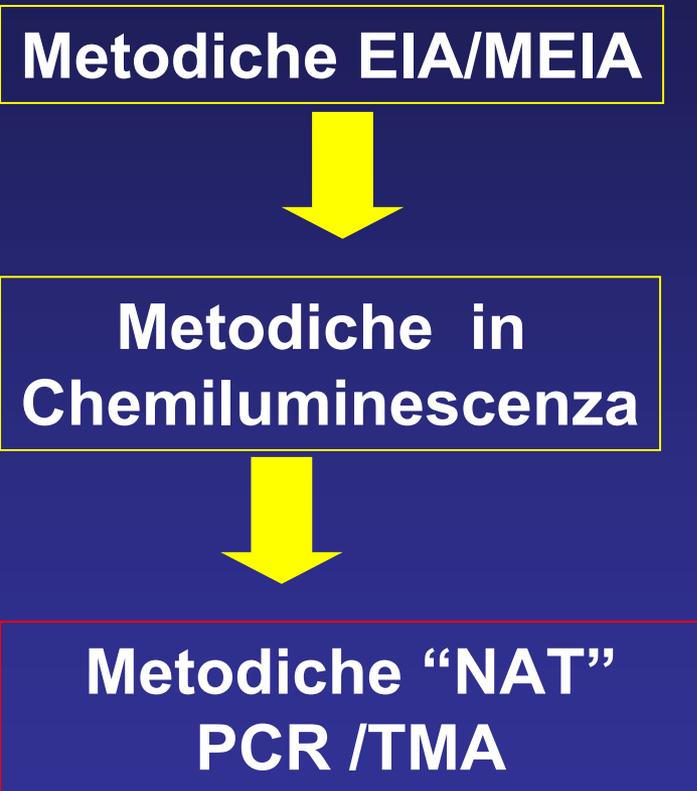
**Struttura
dei test**

**Anticorpi
Monoclonali**

**Proteine
Ricombinanti
Peptidi sintetici**



Evoluzione dei test di screening



Test sierologici

ANTICORPI
1a, 2°, 3a generazione

ANTIGENI
1a ,2a generazione

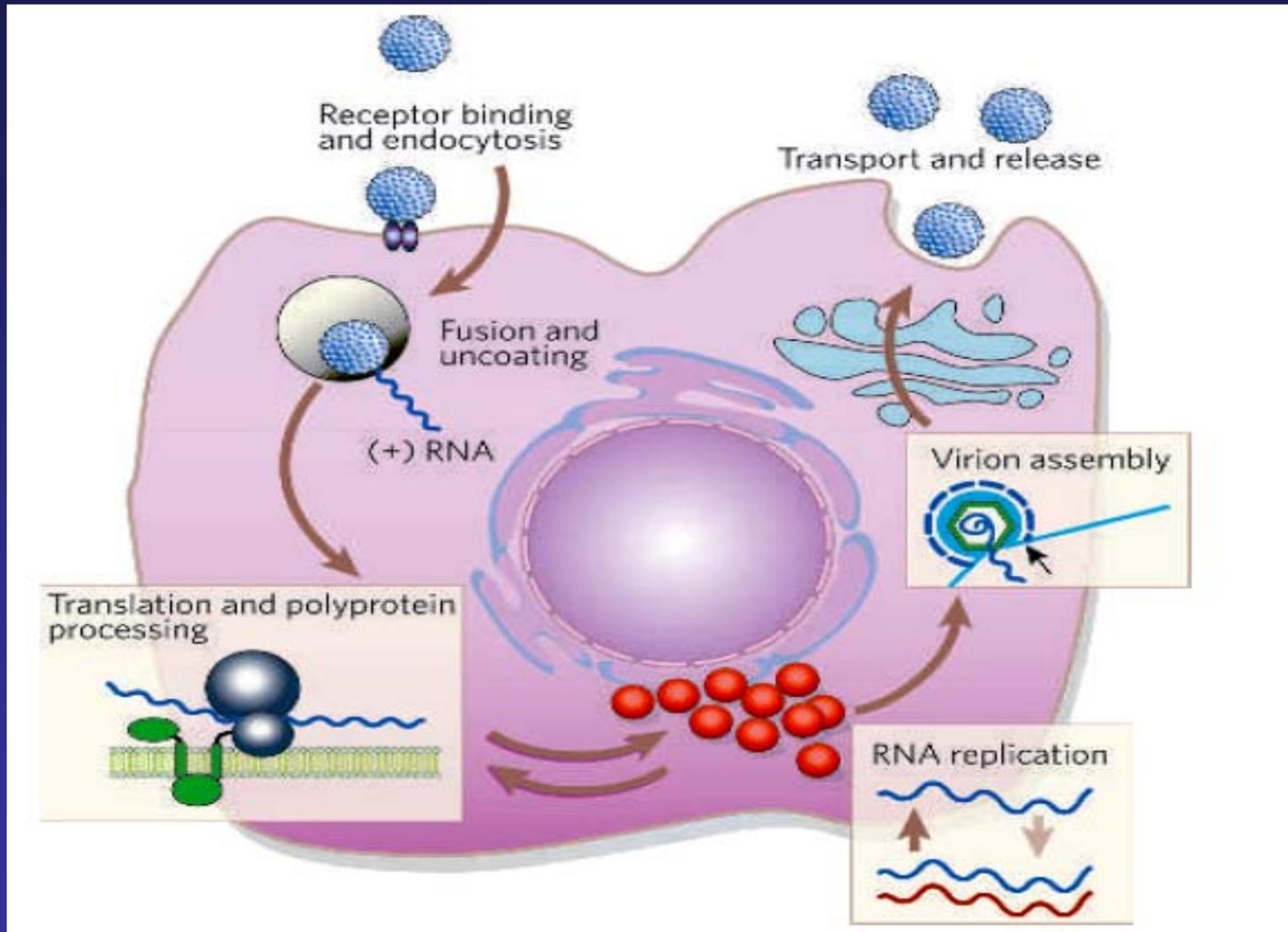
ANTIGENI-ANTICORPI

ANTIGENI
3a generazione

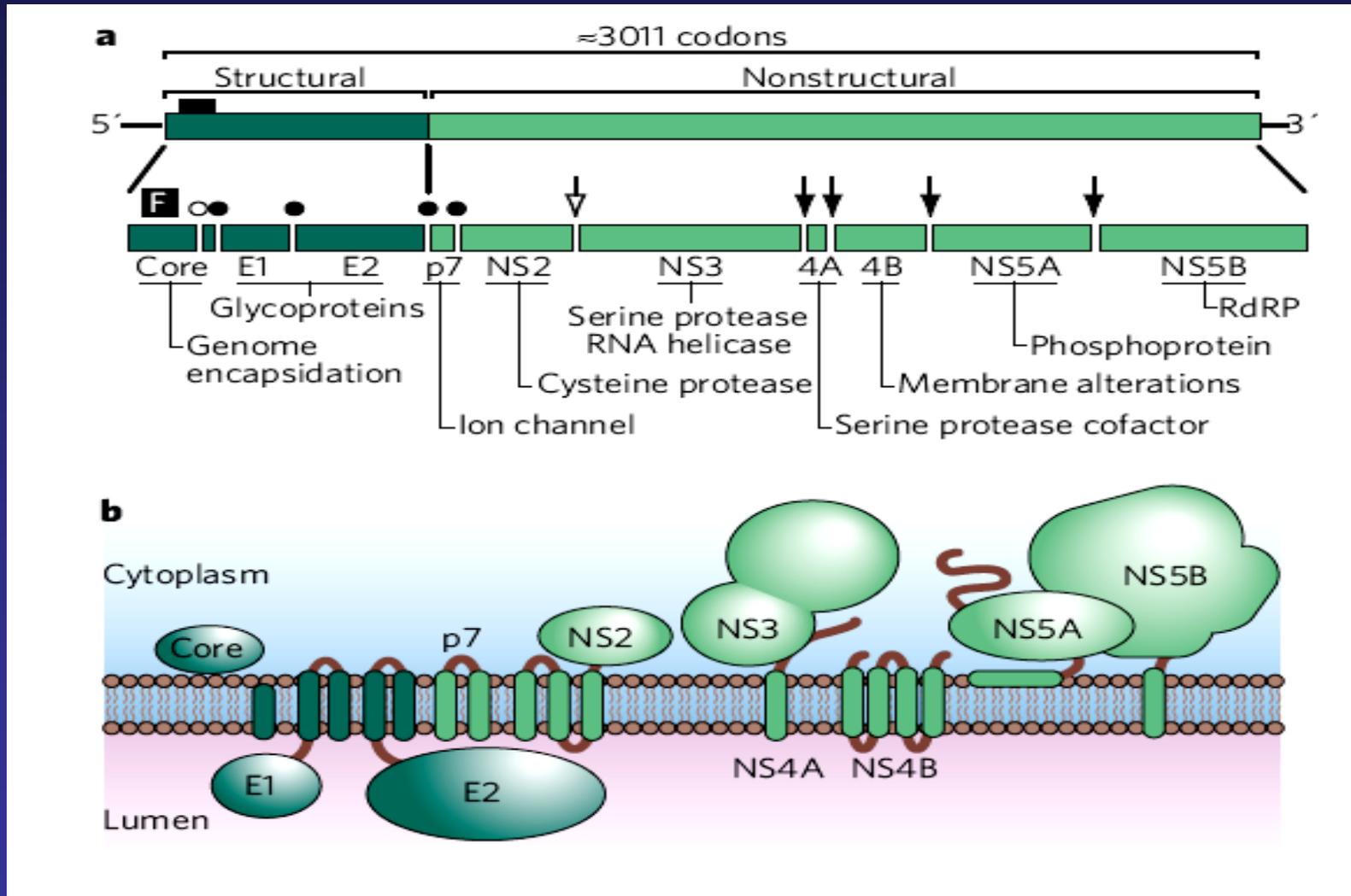
Test molecolari

bDNA PCR
LCR TMA
NASBA
Qualitativi
Quantitativi
Ampliscreen
Procleix Ultrio-
Tigris TMA
S201-. Multiplex
RT PCR

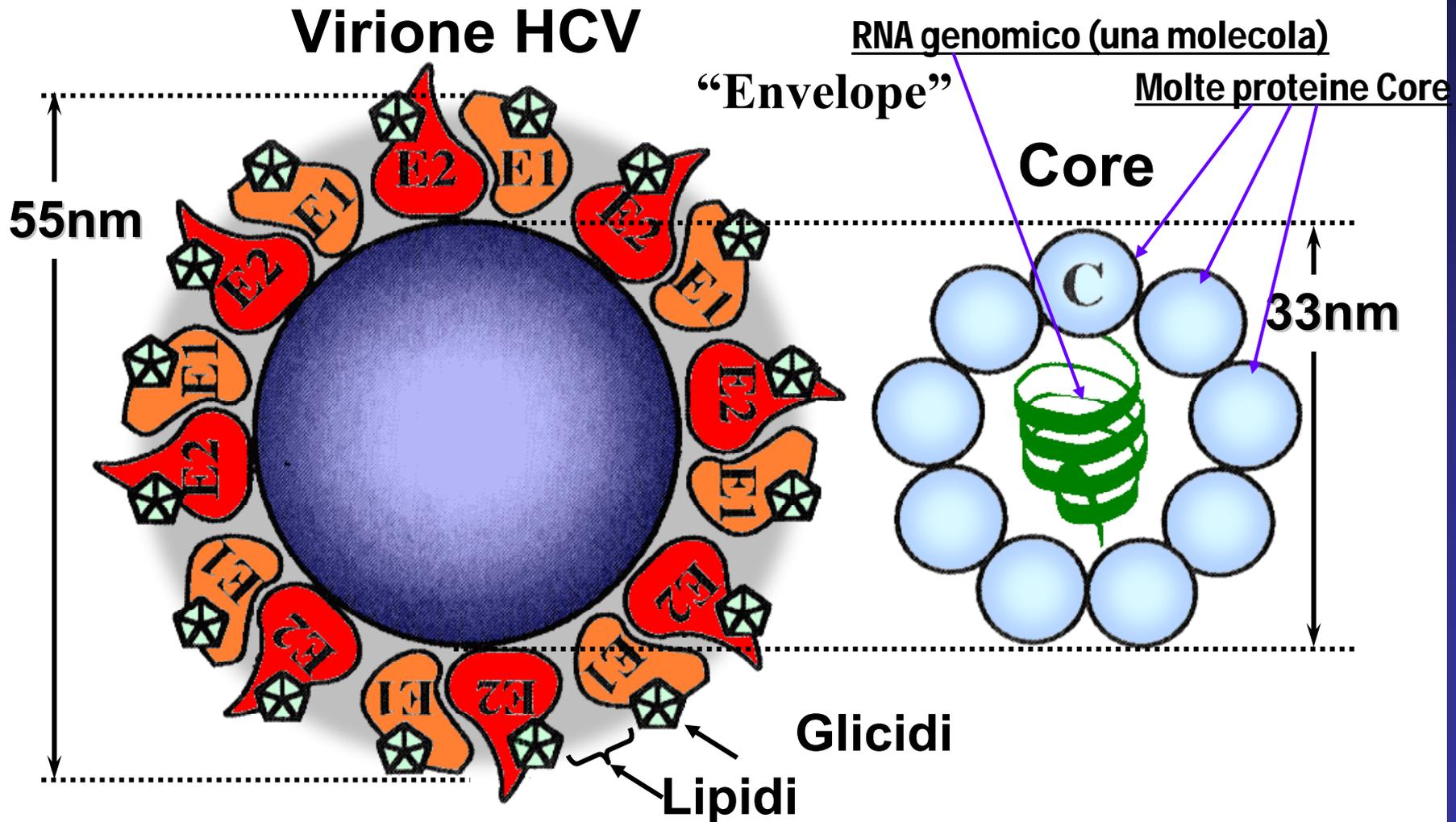
HCV: meccanismo di replicazione



HCV: genoma e proteine



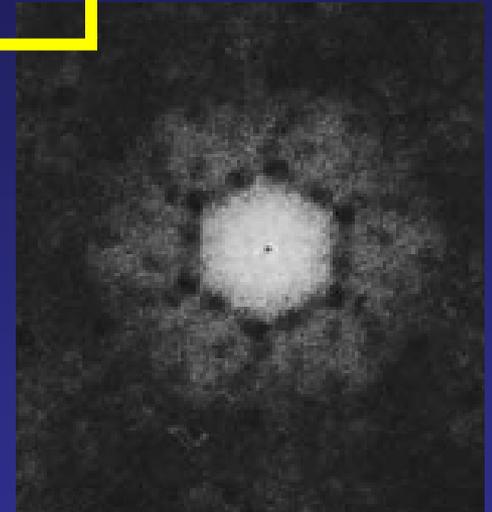
L'antigene Core di HCV



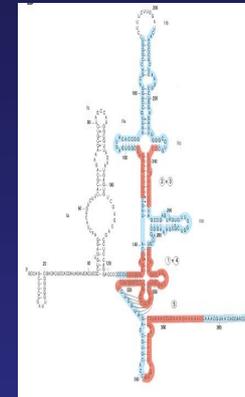
HCV: virioni, RNA e antigene Core

“**Virioni**” HCV da pazienti con carica virale elevatissima e negativi per Ab:
38-40 nm

- **1 Capside** = 240 capsomeri
1 capsomero = proteina di 190 kD, e quindi $4,56 \times 10^6$ D per capside
- **Core Ag**: basico, lipofilo, variabile
- **Associazione** con membrane biologiche
- **Macrocomplessi** con proteine, lipidi e anticorpi
- Non prodotto in eccesso, stabile nel plasma



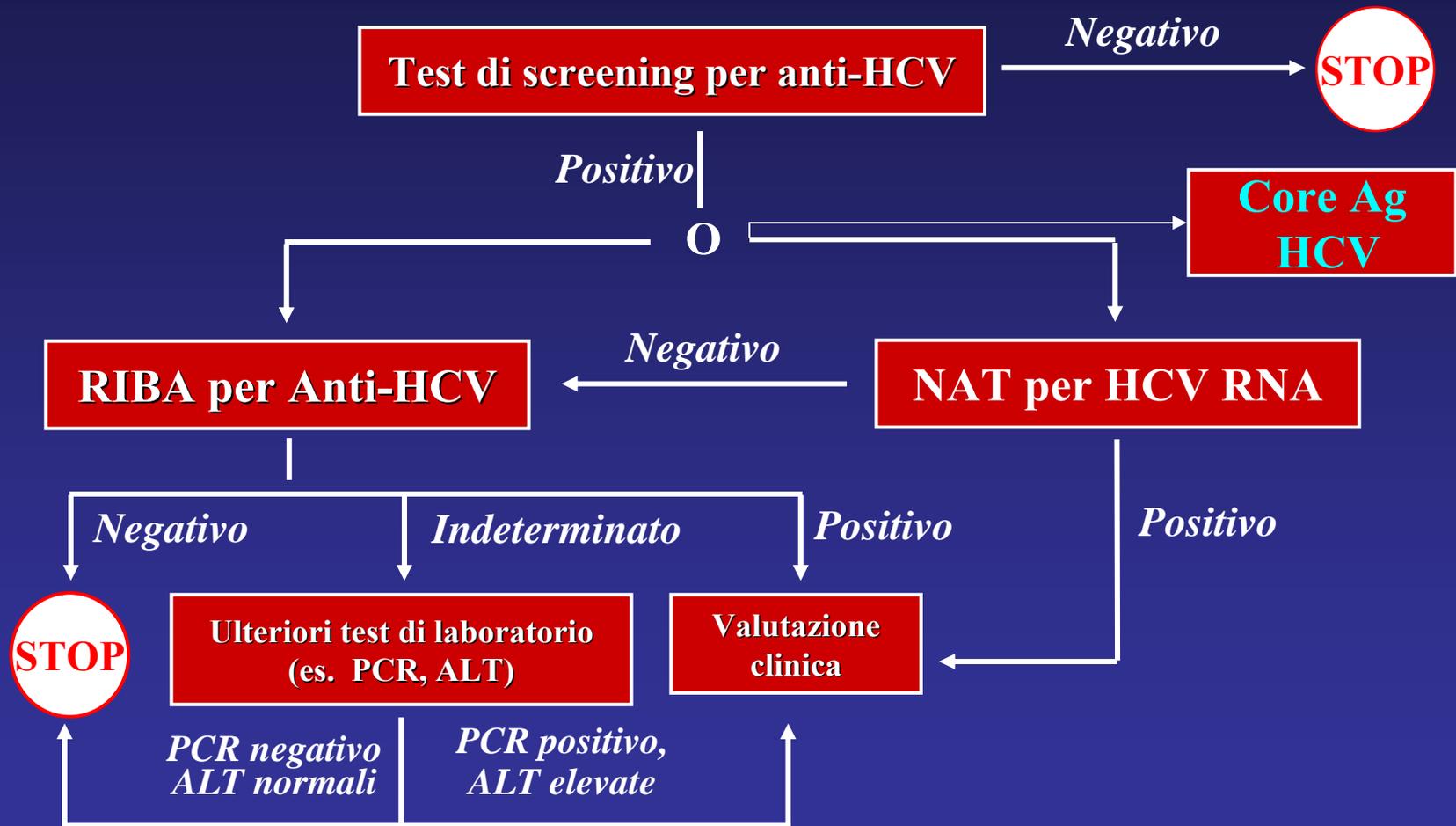
Tempo di raddoppio della carica virale in vivo



S.H. Kleinman, M.P. Busch. J. Clin Virol 2006; 36 Suppl 1:S23-9.

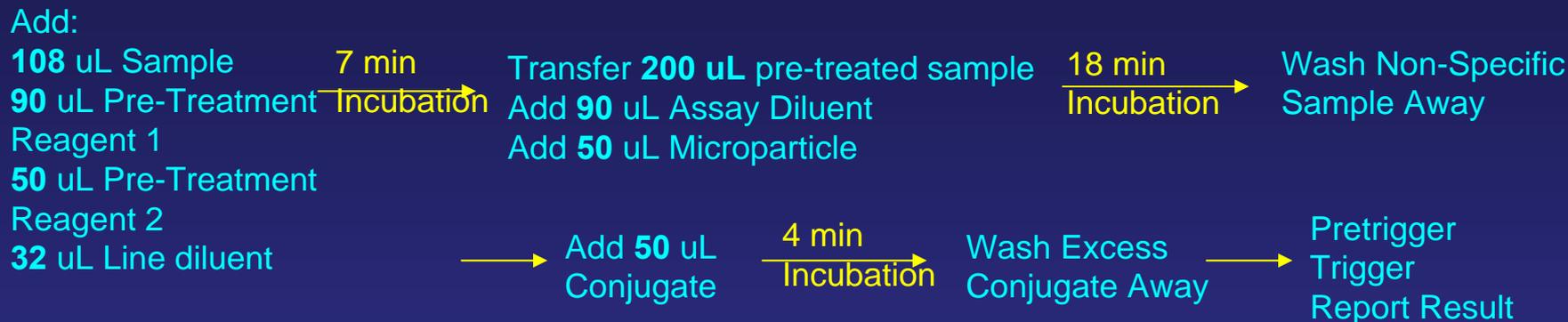
FASE FINESTRA

Algoritmo suggerito per la diagnosi di infezione da HCV in asintomatici





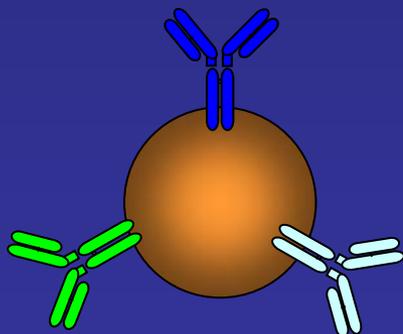
Determinazione quantitativa dell'antigene "core" di HCV protocollo del dosaggio



Obiettivi del pretrattamento:

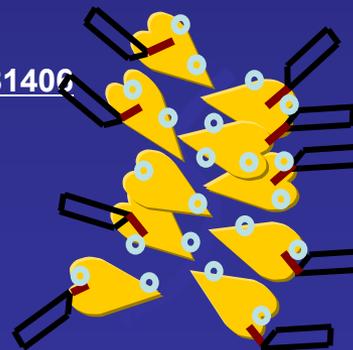
- Dissociare HCVAg dagli anticorpi
- Lisare le particelle virali per esporre HCV Ag
- Inattivare gli anticorpi

Unità di misura fmol/L



Microparticle (Co-coating, Code 81400 Styrene)

- c11-3 Monoclonal antibody
- c11-7 Monoclonal antibody
- AOT-3 Monoclonal antibody

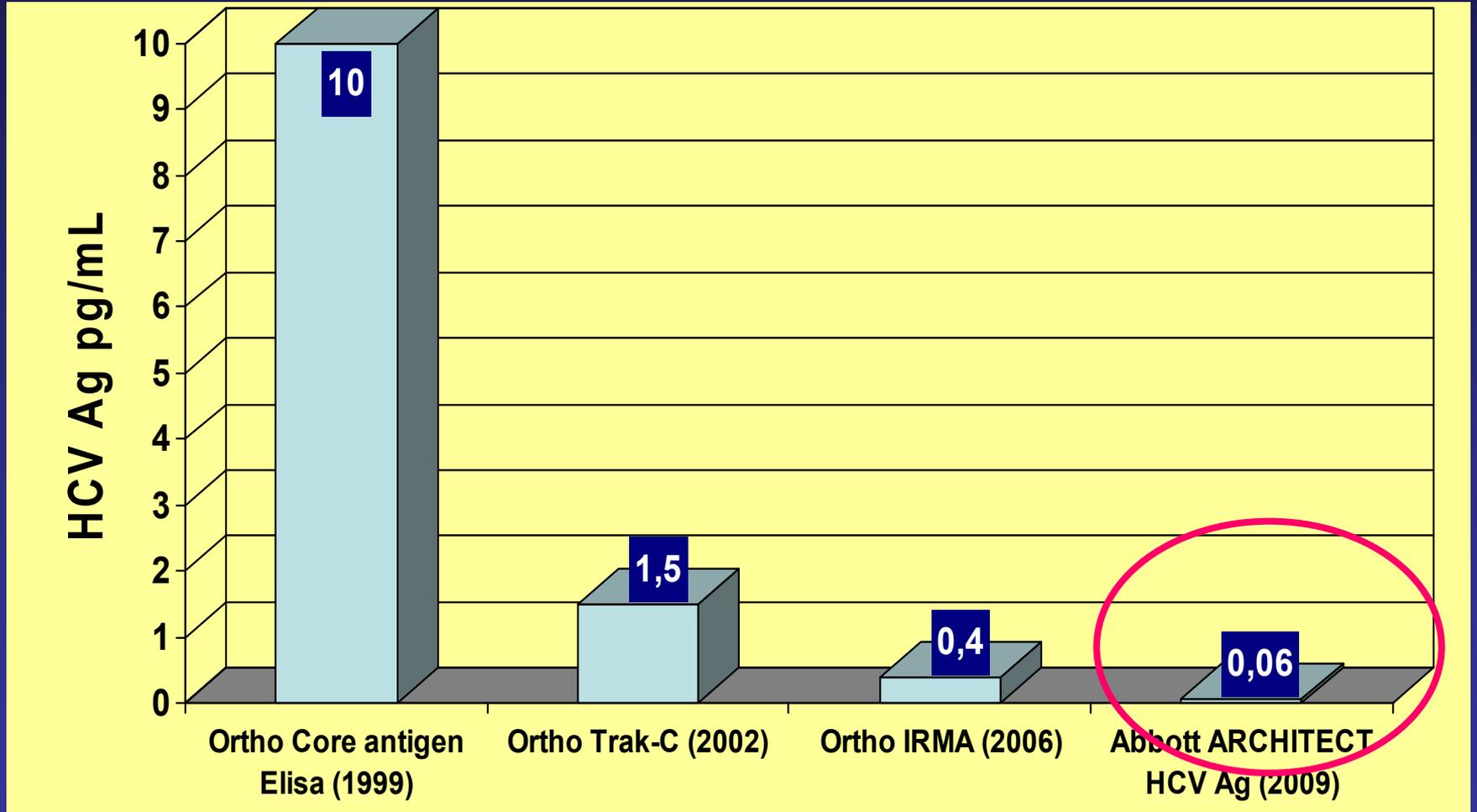


Conjugate (Dextran BSA - SPSP Acridinium Ester - Fab')

- c11-9 Fab' Monoclonal antibody
- c11-14 Fab' Monoclonal antibody

**7 minuti di pretrattamento e 18 minuti per il dosaggio
 cadenza analitica 100 test/ora**

Test per HCV Ag: sensibilità (pg/mL)



HCV: virioni, RNA e antigeni Core

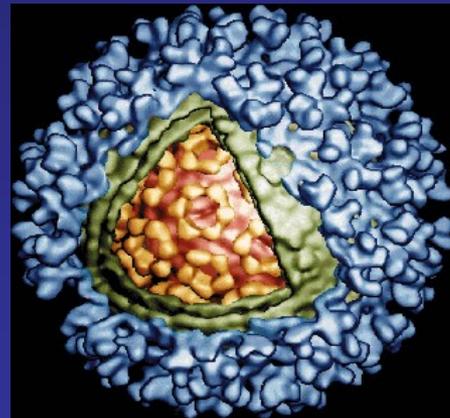
(G. Schuettler et al, J Clin Microbiol 2004; 42: 1977-1981)

Rapporto **teorico** tra HCV-RNA e Core Ag:

43.000 UI RNA / pg Ag

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

Valore **medio ottenuto** in
197 pazienti in terapia :
7.900 UI/pg Ag



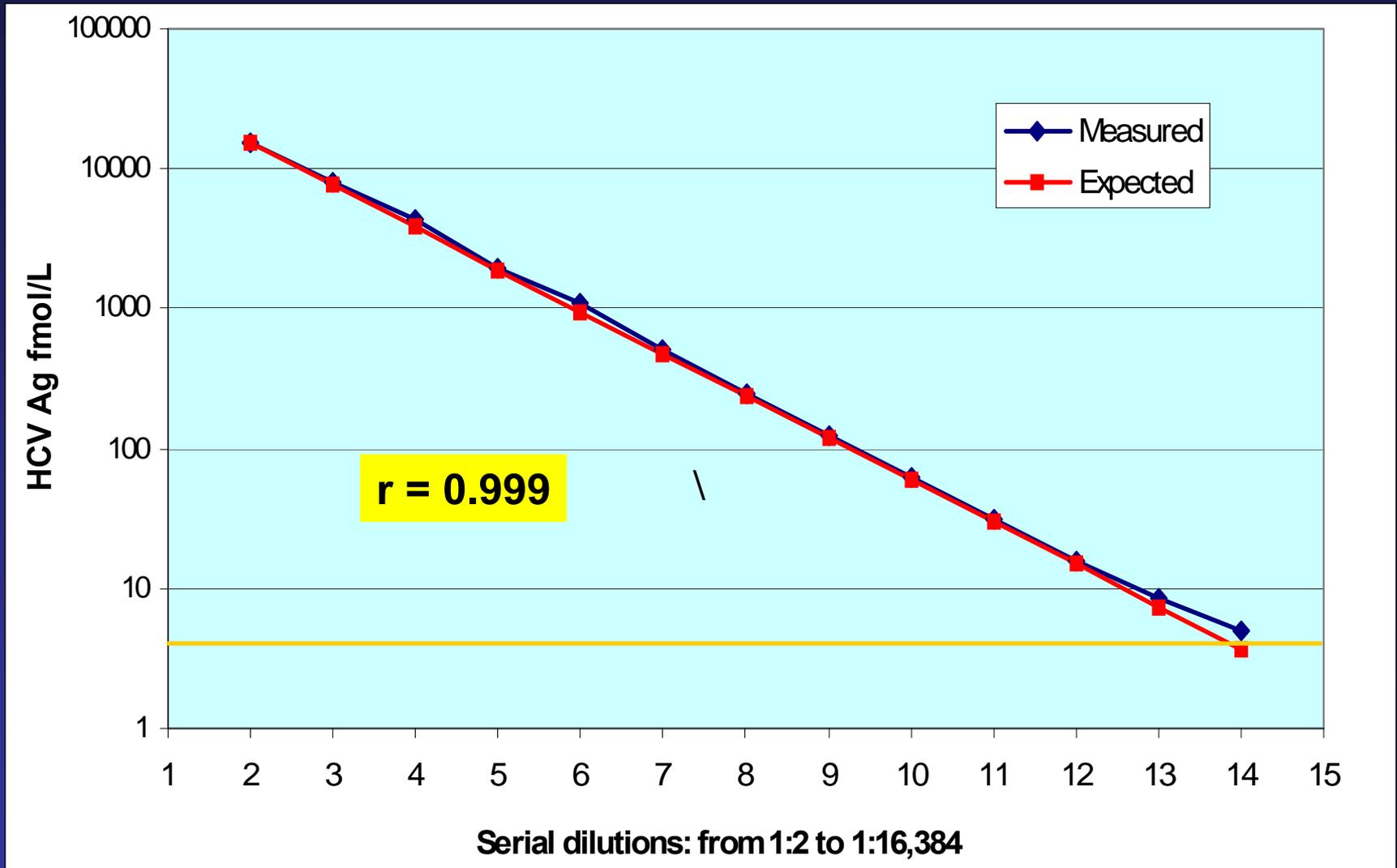
ARCHITECT
HCV Ag:
0,06 pg/mL,

**valore teorico di corrispondenza:
500-1.000 UI/mL di HCV-RNA**

MATERIALI

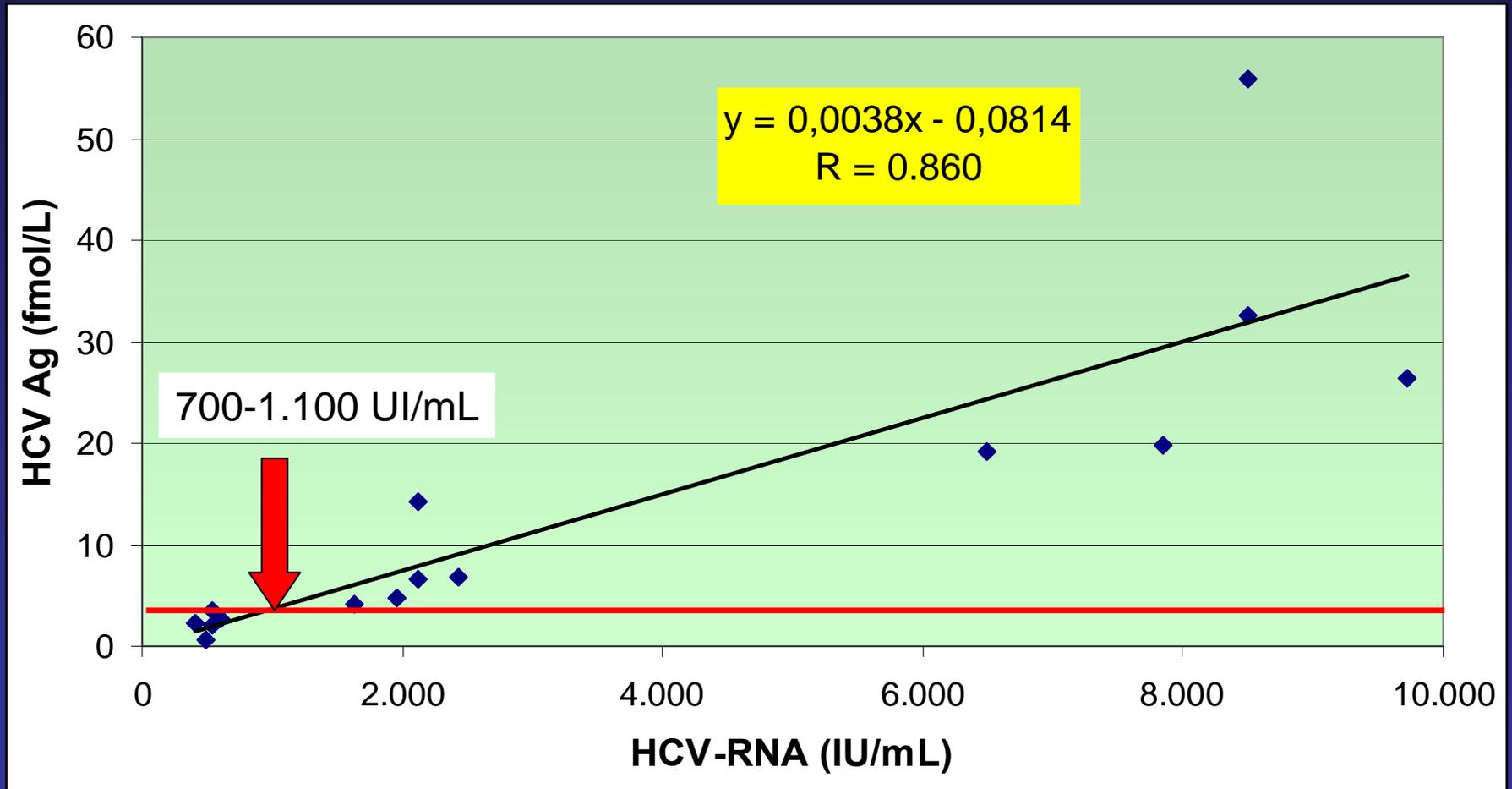
- ▶ **1 Standard di riferimento WHO per HCV-RNA 96/790**
- ▶ **3 pannelli di sieroconversione Bio Clinical Partners
6227- 6222- 6225**
- ▶ **1 pannello di sieroconversione naturale**
- ▶ **54 campioni di Pz in trattamento (Microbiologia
S. Camillo e Epatologia Osp. S.Marino)**
- ▶ **Campioni Positivi e indeterminati della sieroteca**

Linearità:diluizioni di un campione positivo

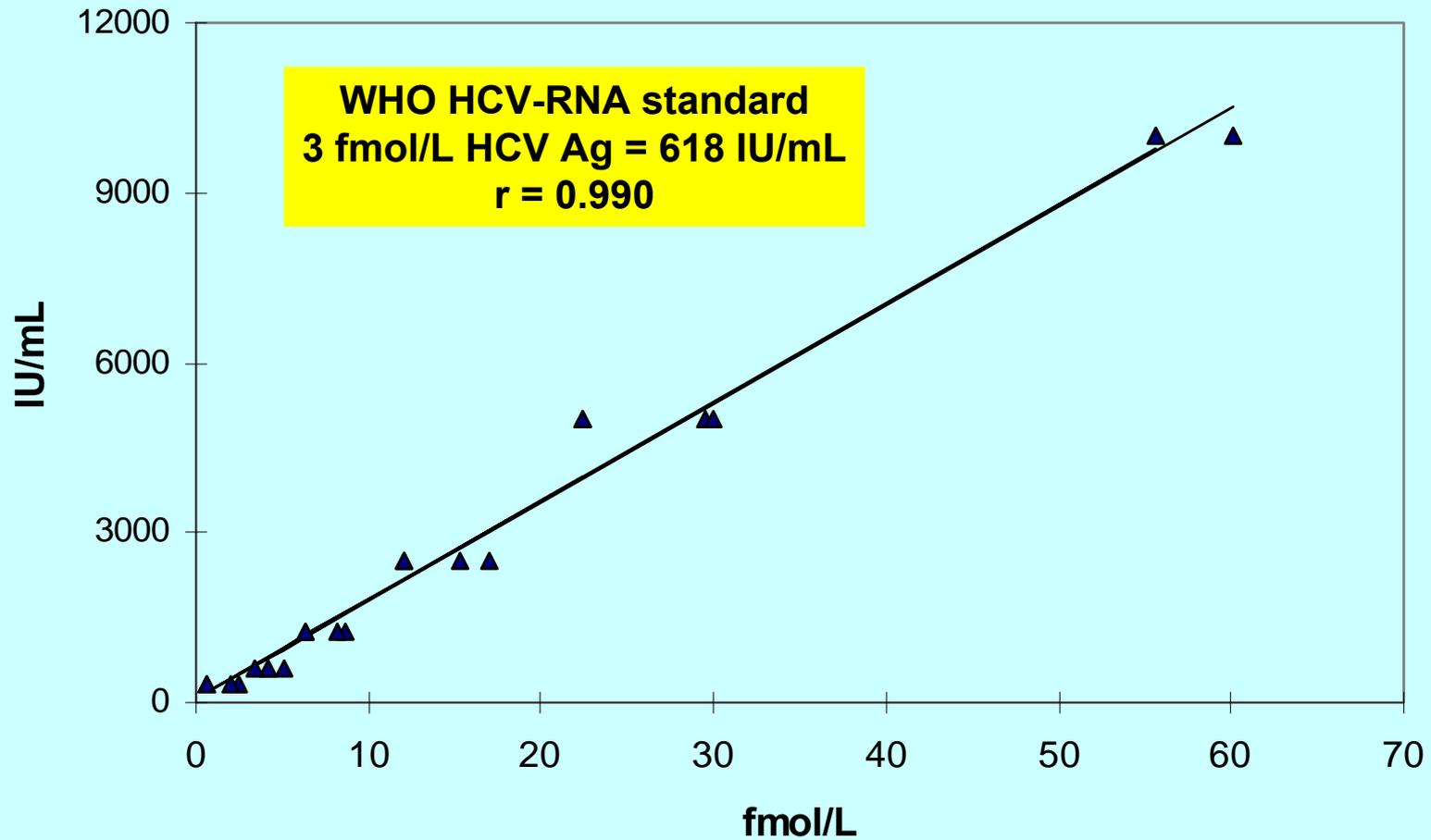


HCV Ag: sensibilità rispetto a HCV-RNA

regressione lineare su diluizioni seriali

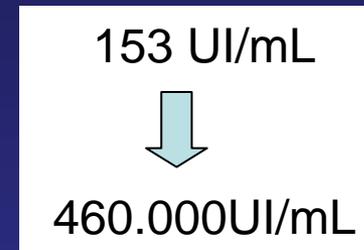


DETECTION LIMIT



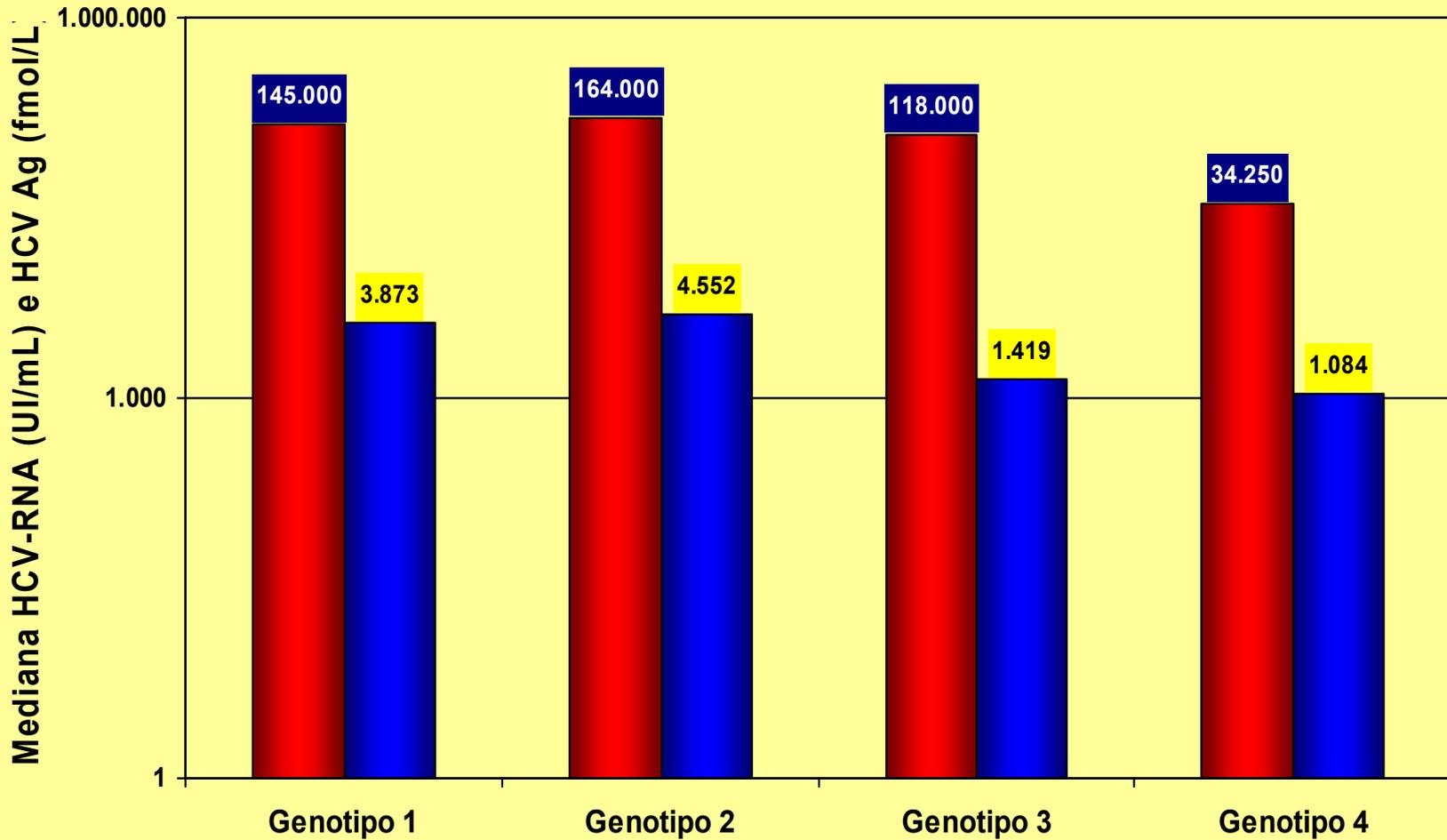
HCV-RNA e ARCHITECT HCV Ag

- 50 campioni ottenuti da pazienti in terapia
- Diversi genotipi
 - 13 genotipo 1/1a/1b
 - 9 genotipo 2a/2c
 - 19 genotipo 3/3a
 - 8 genotipo 4, 1 genotipo 5
- Tutti positivi per HCV Ag
(da 9 a >20,000 fmol/L)



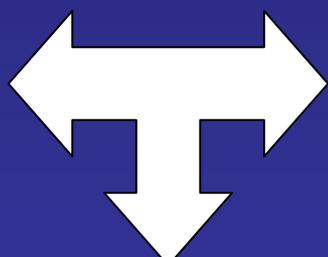
1 NEG  153 UI/mL HCV-RNA

HCV-RNA e ARCHITECT HCV Ag



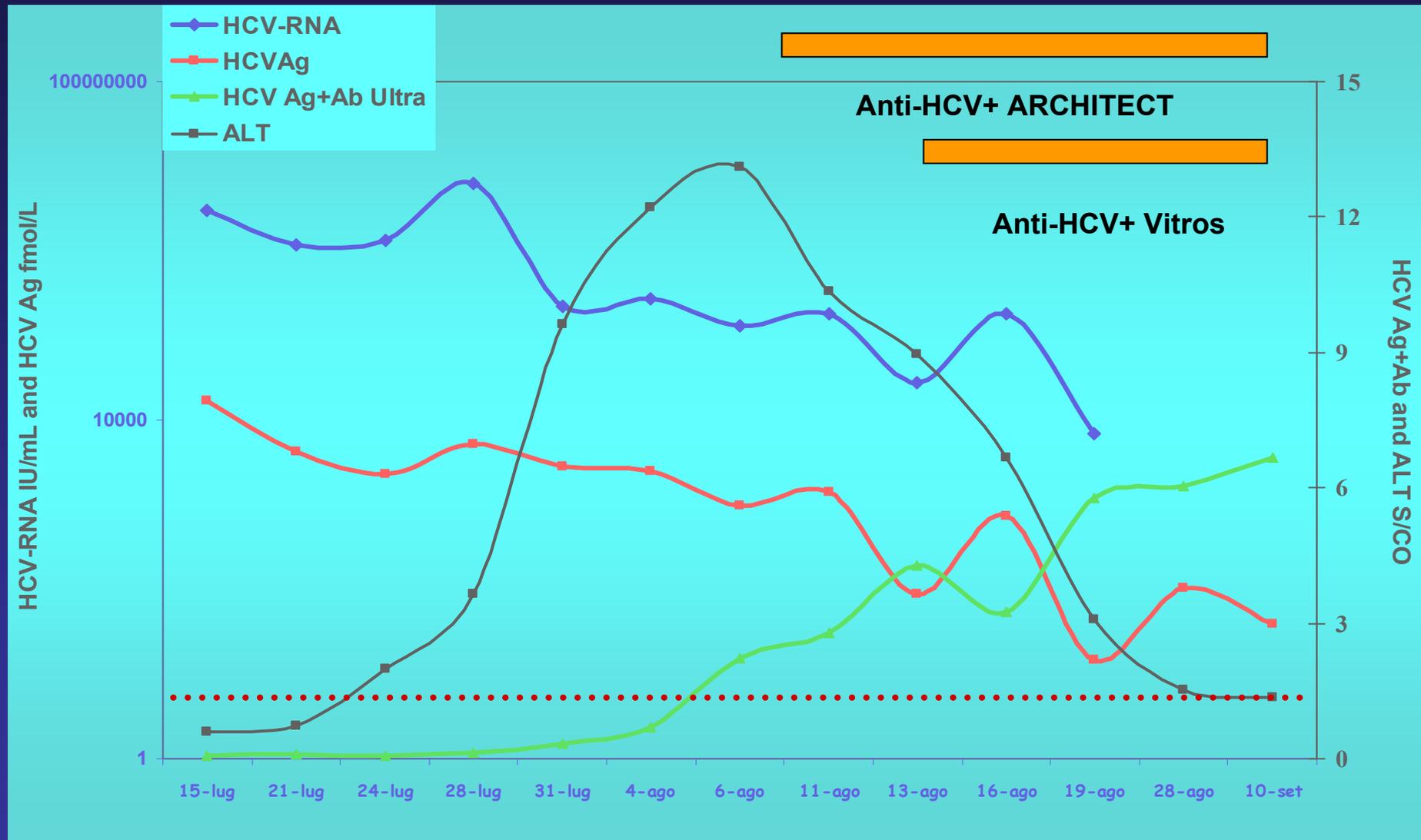
Campioni Pazienti in trattamento Epatologia Osp. Marino

PCR RT	HCV Core Ag	S/CO
275 UI/mL	6,46 fmol/L	2,15
17017	49,61	16,53
27727	82,31	27,43
73581	183,12	61,04



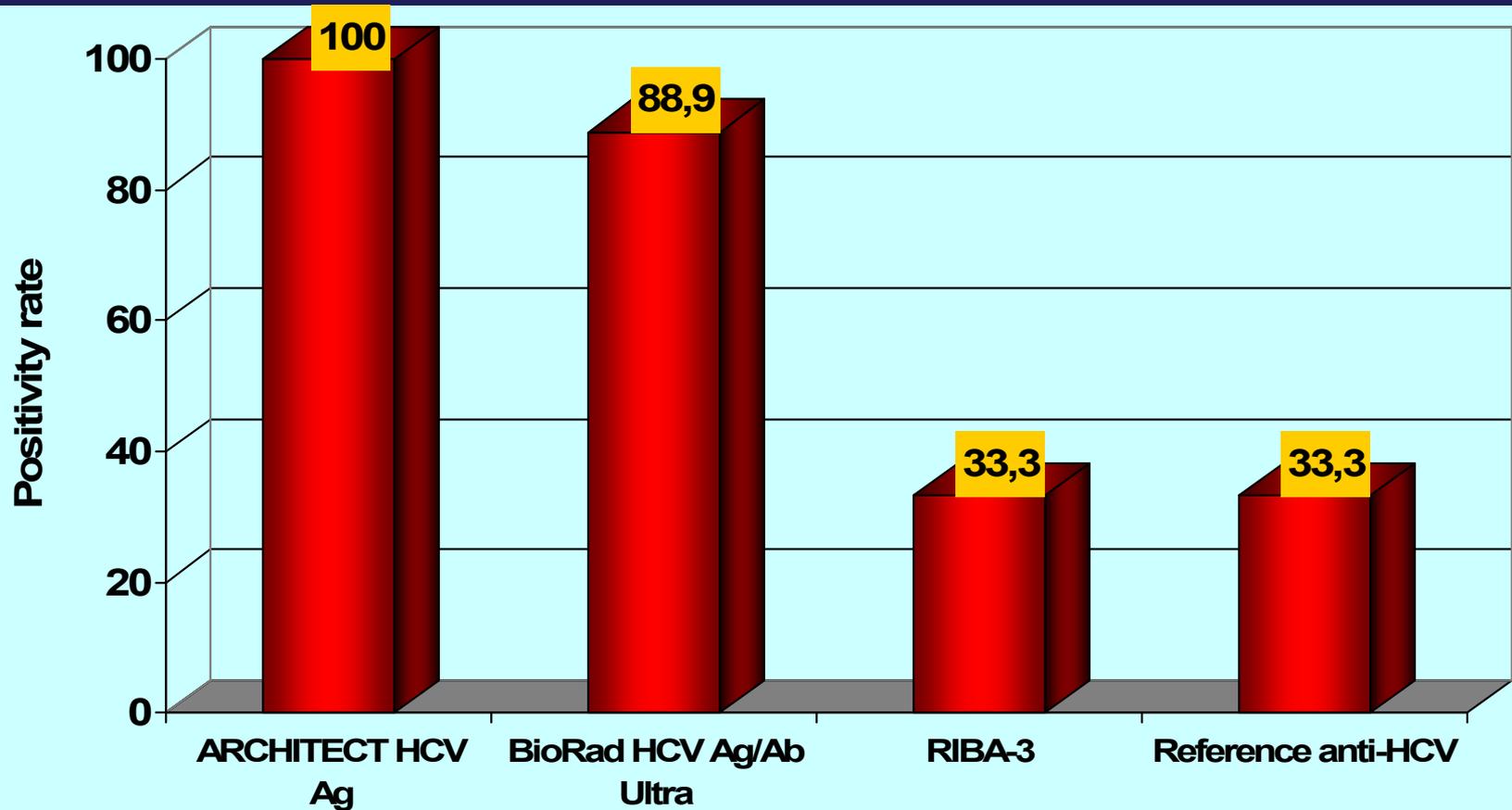
UI/mL/fmol/L
360

GENOTIPO 3



SIEROCONVERSIONE NATURALE SIMT PISA 13 campioni

Frequenza di risultati reattivi di campioni HCV-RNA positivi in tre pannelli di sieroconversione



Pannello di sieroconversione

Panel BCP 6222

Sample ID	Days	ARCHITECT HCV Ag fml/L	BIORAD HCV Ag/Ab Ultra S/CO	RIBA	HCV-RNA (PCR)	Reference anti-HCV
6222-1	0	1,73	0,16	neg	neg	0,59
6222-2	2	1,59	0,141	neg	neg	0,59
6222-3	17	4329,57	1,138	neg	pos	0,6
6222-4	19	>20000,00	2,616	neg	pos	0,53
6222-5	24	18674,82	4,26	neg	pos	0,57
6222-6	26	15954,67	4,284	neg	pos	0,57
6222-7	36	16938,03	6,137	c22+, C33+	pos	0,66
6222-8	40	17124,04	6,428	c22+, C33+	pos	1,08

Pannello di sieroconversione

Panel BCP 6225

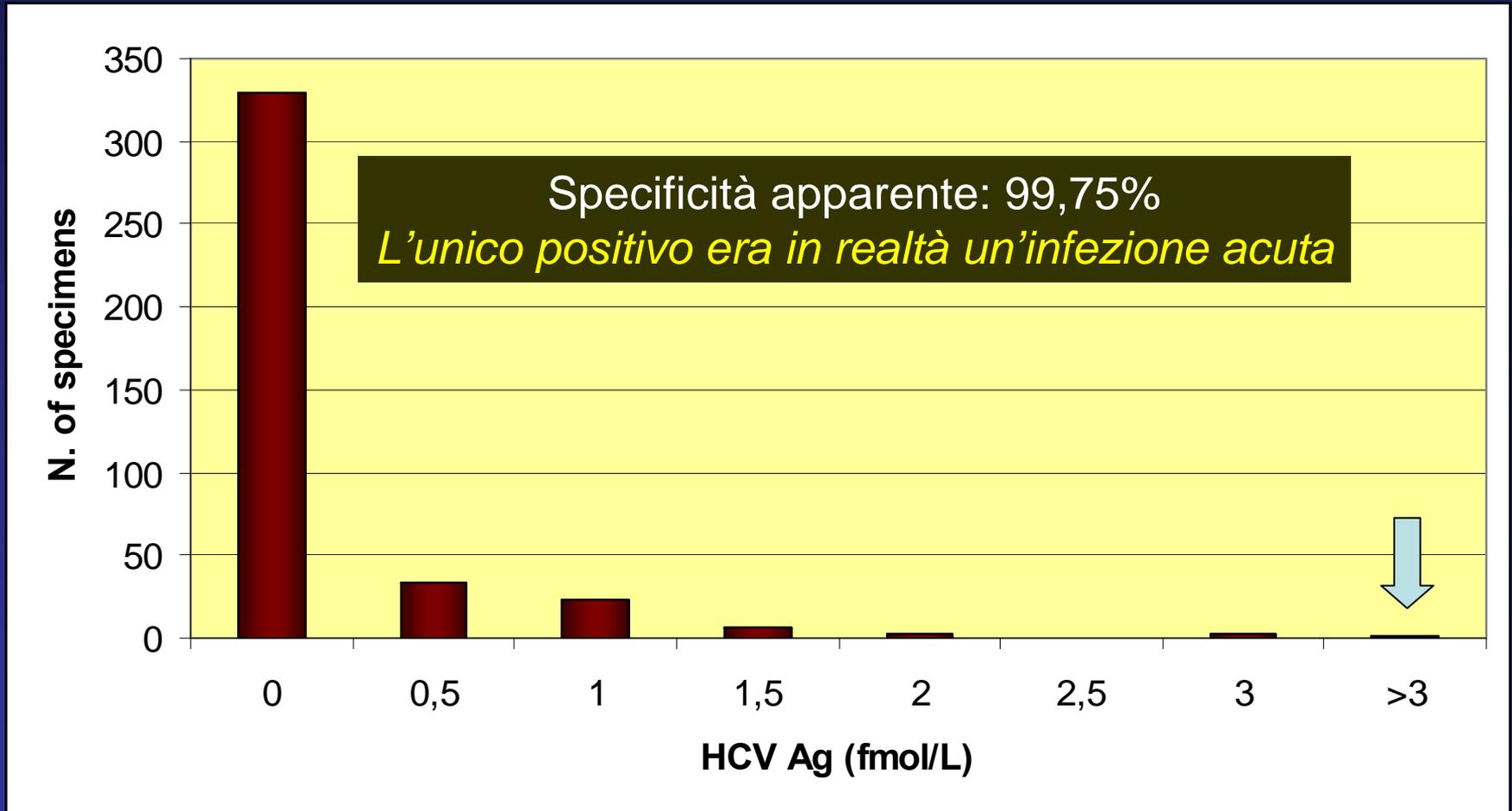
Sample ID	Days	ARCHITECT HCV Ag fmol/L	BIORAD HCV Ag/Ab Ultra S/CO	RIBA	HCV-RNA (PCR)	Reference anti-HCV
6225-1	0	1,38	0,152	neg	neg	0,47
6225-2	3	0,07	0,144	neg	neg	0,48
6225-3	7	0	0,117	neg	neg	0,5
6225-4	12	0	0,125	neg	neg	0,46
6225-5	14	0,01	0,125	neg	neg	0,42
6225-6	19	0	0,125	neg	neg	0,45
6225-7	25	0	0,139	neg	neg	0,46
6225-8	28	0	0,12	neg	neg	0,51
6225-9	32	0	0,117	neg	neg	0,47
6225-10	35	0	0,128	neg	neg	0,7
6225-11	39	0	0,122	neg	neg	0,65
6225-12	45	1506,92	0,375	neg	pos	0,77
6225-13	47	5157,17	0,954	neg	pos	0,65
6225-14	52	4029,68	1,236	neg	pos	0,59
6225-15	56	4315,47	1,304	neg	pos	0,53
6225-16	60	15565,17	3,198	neg	pos	0,55
6225-17	73	1643	3,407	neg	pos	0,97
6225-18	78	755,69	3,654	C33+	pos	3,51
6225-19	80	711,3	3,961	C33+	pos	5,76

Pannello di sieroconversione

Panel BCP6227

Sample	Days	ARCHITECT HCV Ag fnd/L	BIORAD HCV Ag/Ab Ultra S/CO	RIBA	HCV RNA (PCR)	Reference anti-HCV
6227-1	0	2,08	0,122	neg	neg	0,63
6227-2	22	1,11	0,125	neg	neg	0,63
6227-3	24	0,35	0,133	neg	neg	0,52
6227-4	42	1769,21	0,462	neg	pos	0,56
6227-5	46	45581,1	1,671	neg	pos	0,53
6227-6	74	9906,08	5,216	c100+	pos	1,75
6227-7	76	9740,06	5,099	c100+	pos	1,64

HCV Core Ag: specificità su 398 campioni anti-HCV negativi





SCREENING NAT-HCV 2001-2009

17.666.000

35 HCV-RNA POS

HCVAb NEGATIVI

1:504.000



19 ALT >

17 HCV-RNA POS

HCVAb NEGATIVI

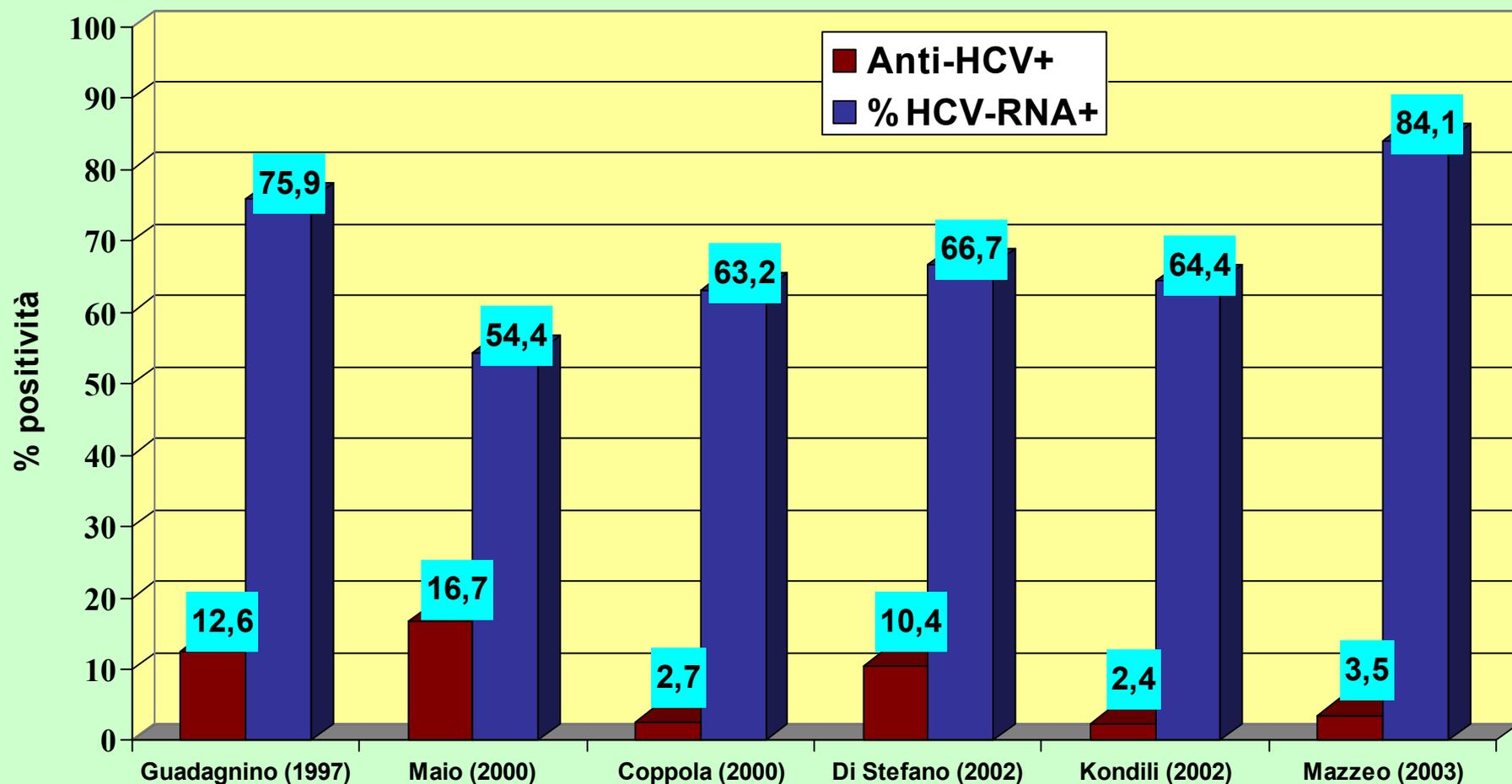
1:909.000

Rischio residuo 2008



$0,1 \times 10^6$

HCV in Italia (popolazione aperta): alcuni studi



HCV Ag in popolazioni ad alto rischio (IDUs)

238 IDUs
(2007-2008)

124 Anti-HCV+
87 HCV-RNA+ (70,2%)

73 positivi HCV Ag+
6/14 neg > 2fmol/L
v.l. in HCV Ag- : <9.000 UI/mL

114 Anti-HCV-
9 HCV-RNA+ (7,9%)

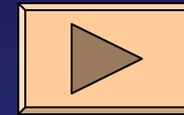
9 positivi per HCV Ag
(v.l. 9.000 - 34 mil. UI/mL)

7 sieroconversioni
2 no Ab dopo 6 mesi

Diagnosi infettivologica

Percorso naturale classico delle infezioni

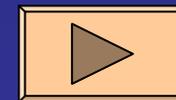
- ✓ Esposizione all'agente
- ✓ Infezione conclamata
- ✓ Patogenesi
- ✓ Malattia



S
I
N
T
O
M
I

Diversa espressione delle infezioni

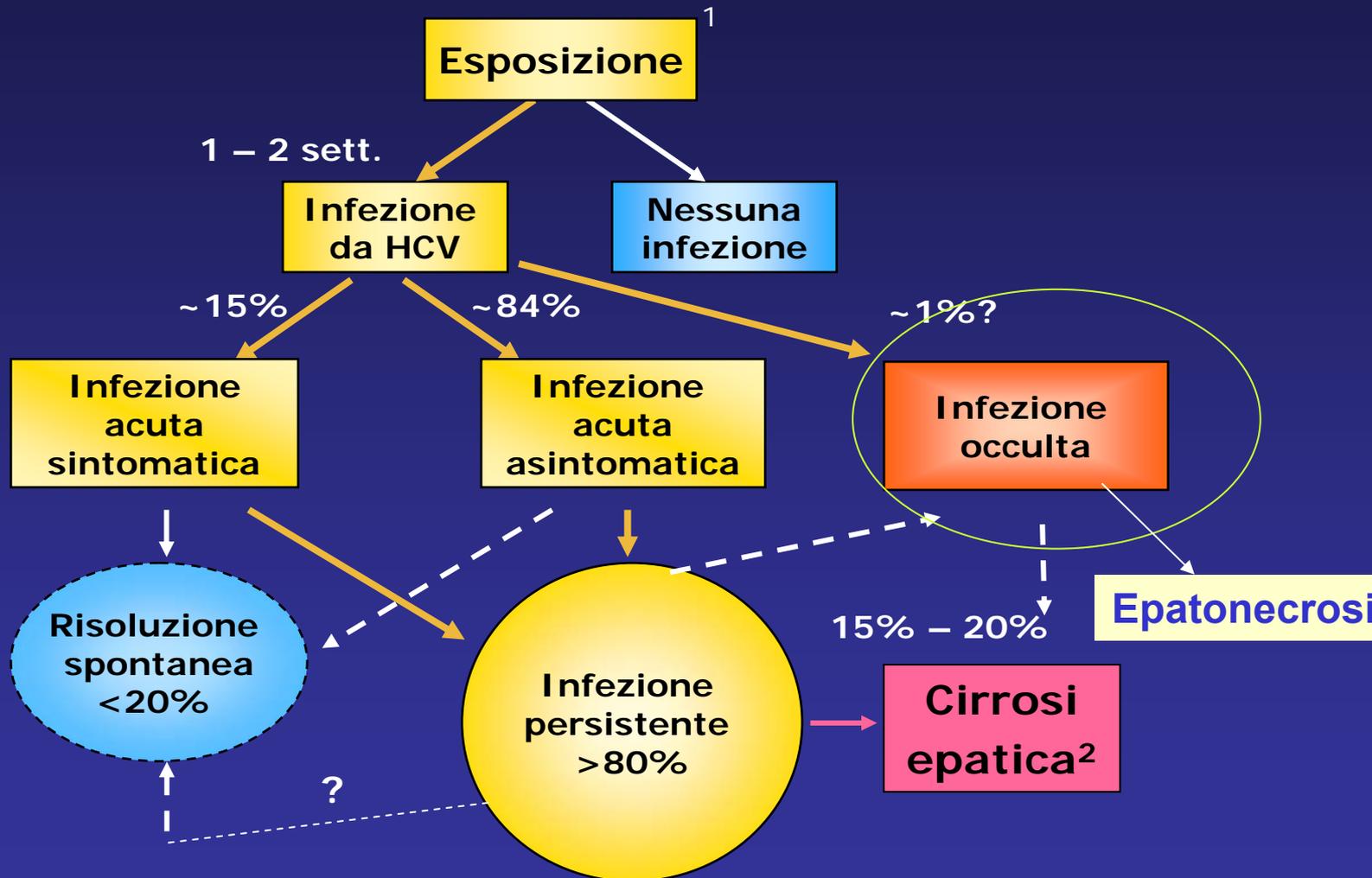
- ✓ Esposizione all'agente
- ✓ Infezione latente
- ✓ Lento o lieve danno patogenetico
- ✓ Espressione tardiva della malattia



ASSENZA
DI
SINTOMI



Infezione da HCV: esiti



High incidence of hepatitis C virus reinfection within a cohort of injecting drug users

J. M. Micallef,¹ V. Macdonald,² M. Jauncey,¹ J. Amin,¹ W. Rawlinson,³ I. van Beek,² J. M. Kaldor,¹ P. A. White⁴ and G. J. Dore¹ ¹National Centre in HIV Epidemiology and Clinical Research, The University of New

Virological and Epitope Evolution of HCV Infection from Acute Hepatitis C to Subsequent Episodes of HCV-Related Acute Liver Cell Necrosis

E. Sagnelli, C. Argentini, D. Genovese, M. Pisaturo, N. Coppola, S. Taffon, C. Sagnelli, M. Rapicetta

Occult hepatitis B virus and hepatitis C virus infections

Vicente Carreño*, Javier Bartolomé, Inmaculada Castillo and Juan Antonio Quiroga

Diagnosis of Occult Hepatitis C Without the Need for a Liver Biopsy

Inmaculada Castillo,¹ Javier Bartolomé,¹ Juan Antonio Quiroga,¹ Guillermina Barril,^{1,2} and Vicente Carreño^{1*}

Detection of Hepatitis C Virus (HCV) RNA in the Liver of Healthy, Anti-HCV Antibody-Positive, Serum HCV RNA-Negative Patients with Normal Alanine Aminotransferase Levels

Vicente Carreño, Margarita Pardo, Juan Manuel López-Alcorocho, Elena Rodríguez-Iñigo, Javier Bartolomé, and Inmaculada Castillo

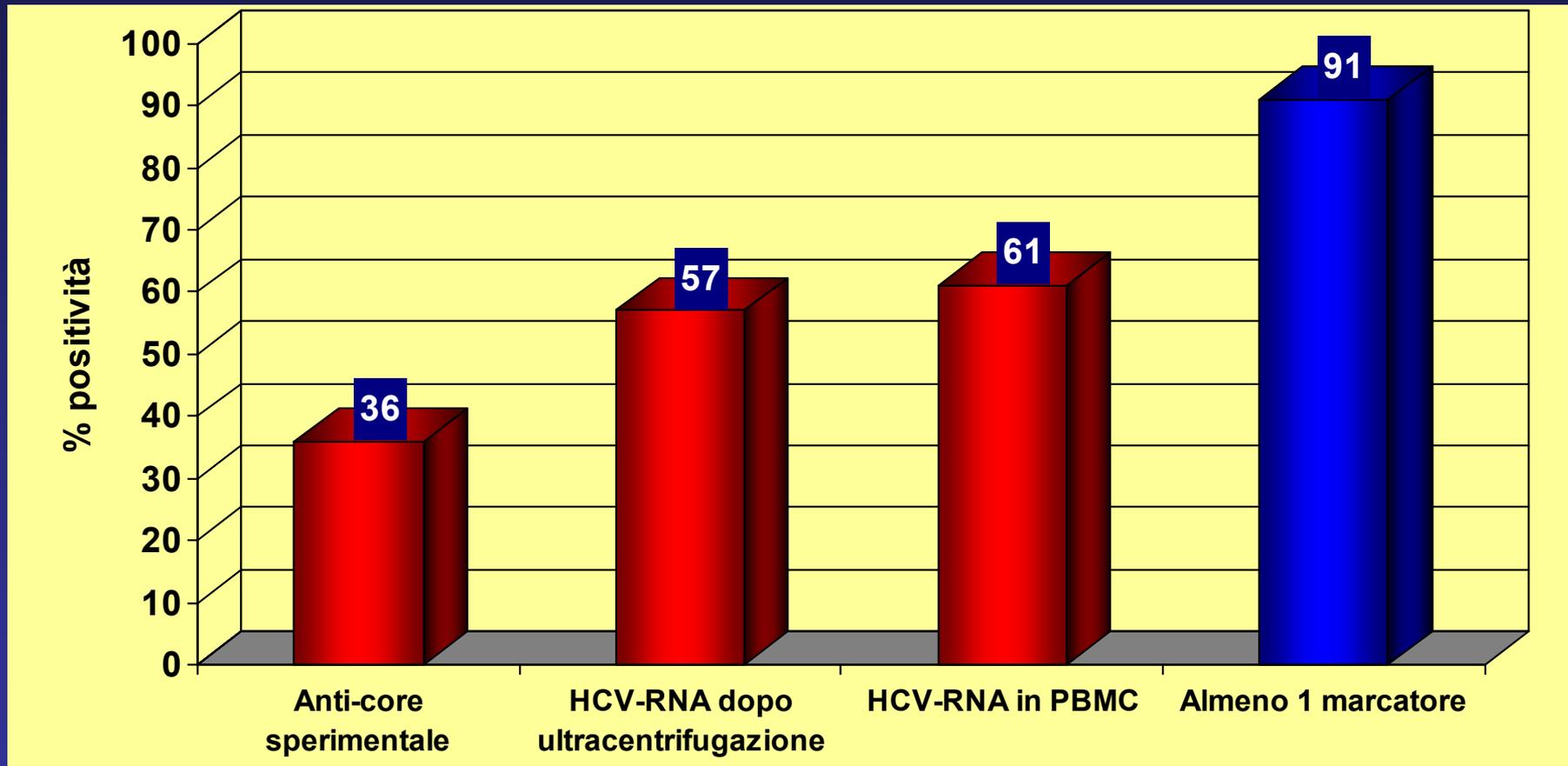
Frequent HCV reinfection and superinfection in a cohort of injecting drug users in Amsterdam[☆]

Thijs J.W. van de Laar^{1,3,*}, Richard Molenkamp², Charlotte van den Berg^{1,3}, Janke Schinkel², Marcel G.H.M. Beld², Maria Prins^{1,3}, Roel A. Coutinho^{1,3,4}, Sylvia M. Bruisten^{1,3}

Epatite C occulta:

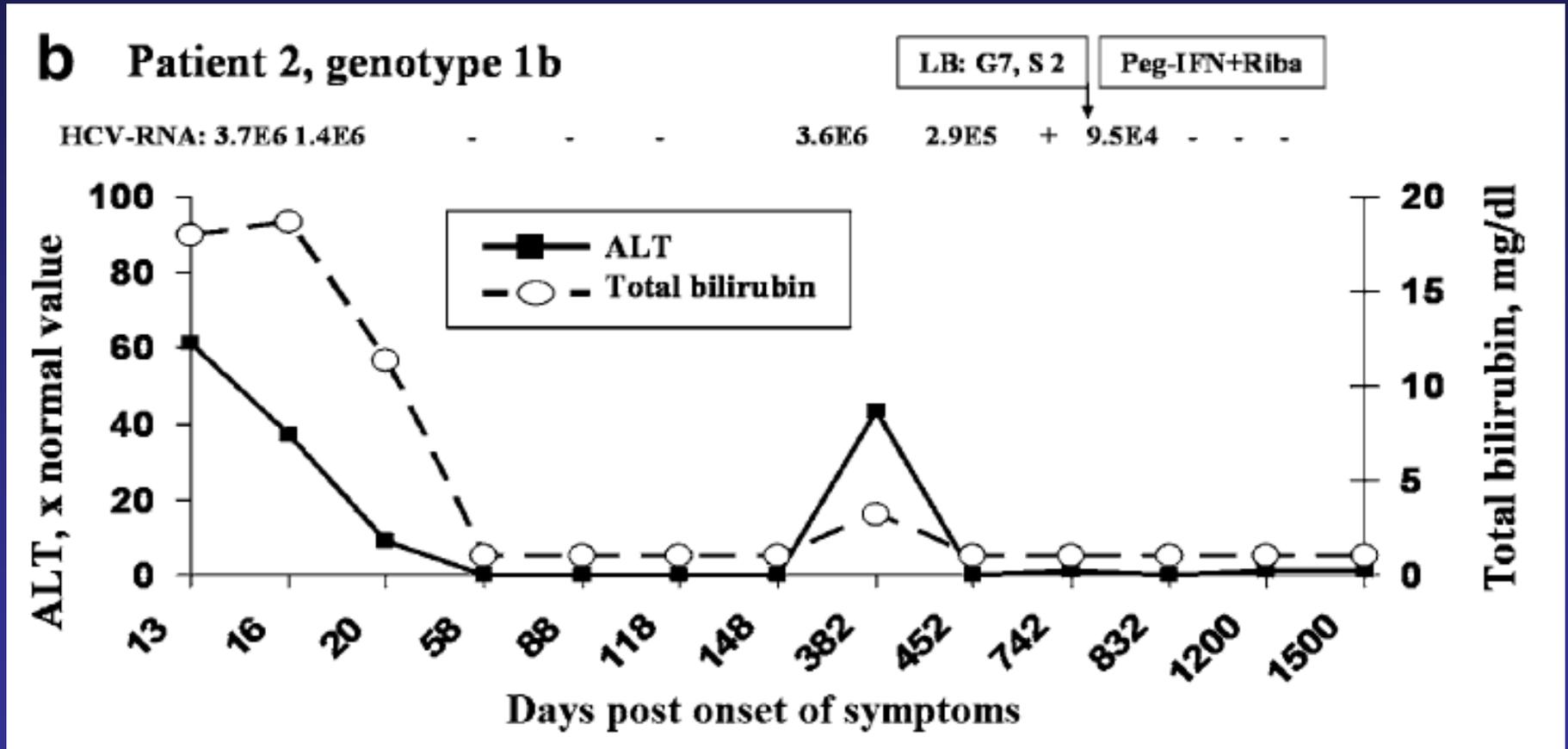
Presenza di HCV-RNA nel fegato e nelle cellule mononucleate del sangue periferico in assenza di HCV-RNA rilevabile nel siero

Diagnosi in 122 casi di infezione occulta da HCV



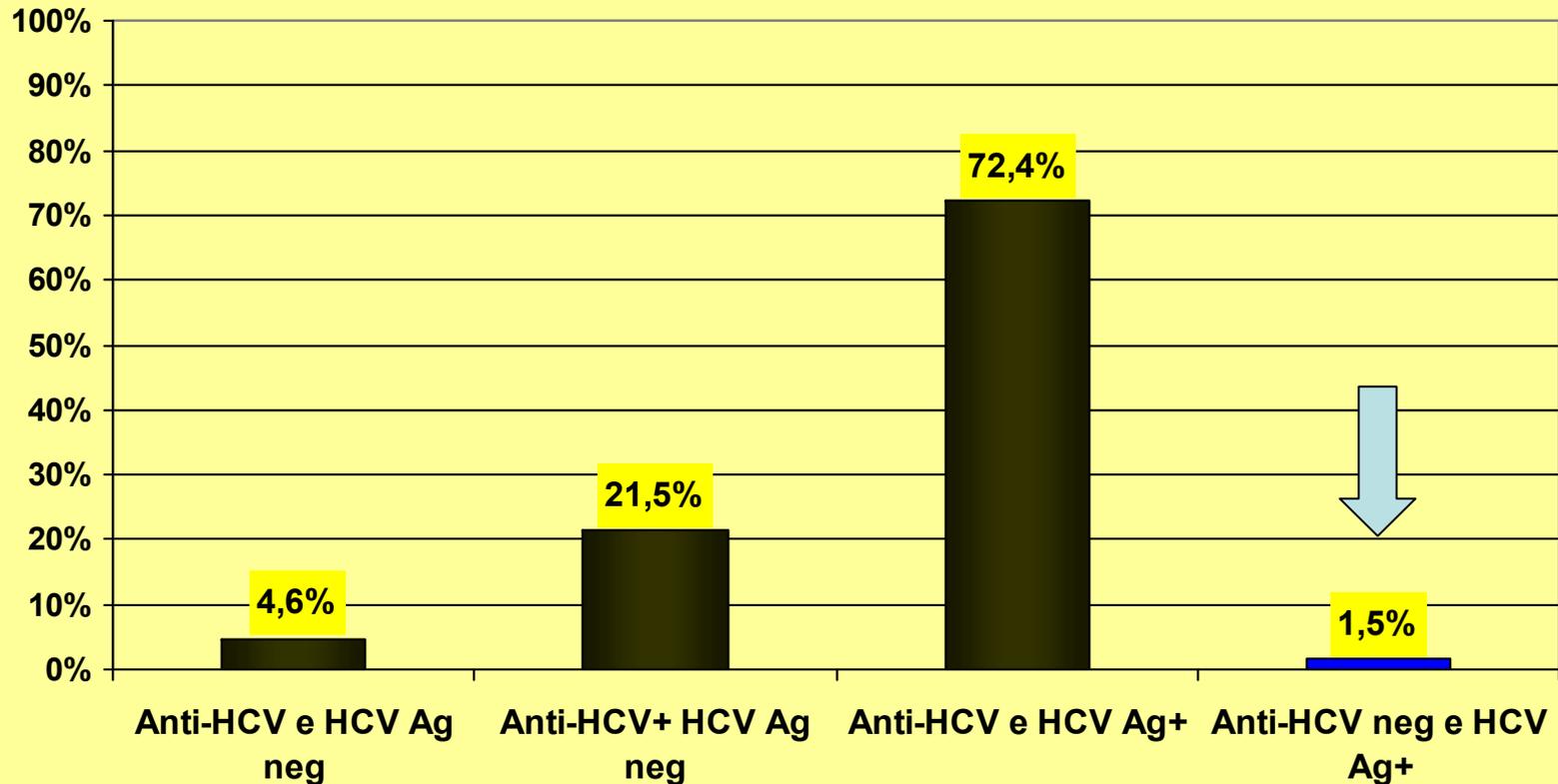
Da: Castillo I. et al, J Med Virol 2010; 81: 1554-1559

Riattivazione di un'infezione occulta da HCV



Da: Sagnelli E. et al, *Infection* 2009; 37: 344-348

HCV Ag in popolazioni ad alto rischio (65 pazienti dializzati)



Test di screening HCV Sierologico + Molecolare

**INFEZIONE
ATTIVA**



HCV-RNA Pos
HCV-Ab Pos
Core Ag Pos

**INFEZIONE IN
FASE FINESTRA**



HCV-RNA Pos
CoreAg Pos/Neg
HCV-Ab Neg

**INFEZIONE
OCCULTA**

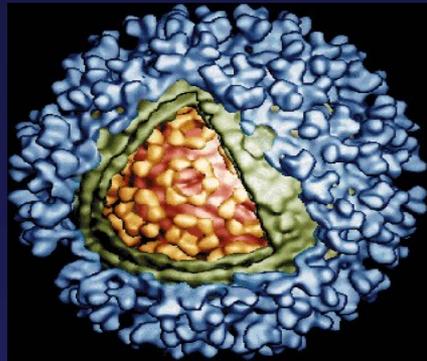


**HCV-RNA /CoreAg
non rilevabile nel siero**
HCV-Ab Pos/ Neg
**HCV-RNA CoreAg
rilevabile fegato e PBMC**

INFEZIONE PREGRESSA?
**MEMORIA
IMMUNOLOGICA?**
INFEZIONE LATENTE?
VARIANTI.....



HCV-RNA Neg
HCV CoreAg Neg
HCV-Ab Pos/BL



ARCHITECT HCV AG

Eccellente correlazione
HCV-RNA/HCV Ag

Test ad elevata
Sensibilità
Specificità
Precisione

Test sierologico
↓
Referto 37 minuti

La presenza di Ab
non riduce l'efficienza
della rilevazione
quantitativa dell'Ag

Rileva correttamente
i diversi genotipi

Utilità di un test per HCV Core Ag

- **Valutazione rapida (“reflex”) dell’infezione attiva da HCV in soggetti positivi per anti-HCV**
- **Diagnosi precoce in pazienti anti-HCV negativi**
- **Sorveglianza di pazienti immunocompromessi e/o ad alto rischio (dializzati, TD)**
- **Follow-up delle infezioni croniche**
- **Monitoraggio e follow-up della terapia antivirale (complementare a HCV-RNA, nuovi farmaci)**

Utilità di un test per HCV Core Ag

- **Test read-use per le aree in via di sviluppo associato alla ricerca di HCV-Ab**
- **Test rapido per validazioni in urgenza**
- **Test “da campo” per impieghi laboratoristici in emergenze**
- **Test addizionale per la sicurezza della criopreservazione di cellule staminali autologhe**

Sanderson Haldane

Le malattie infettive rappresentano la principale forza selettiva dell'evoluzione della specie umana

Considerato che

- Le malattie infettive rappresentano la seconda causa di morte nel mondo
- Che le specie microbiche costituiscono il 60% della biomassa del pianeta
- Che sono in continua evoluzione
- Che la maggior parte delle infezioni emergenti e riemergenti è causata da patogeni già esistenti che sfruttano il vantaggio selettivo delle condizioni ambientali

Ne consegue che

La guerra dell'uomo ai virus è destinata a durare nel tempo e il successo della medicina non può che scaturire dalla evoluzione della ricerca, dalla diffusione delle conoscenze e

soprattutto dalla **prevenzione**



**Grazie per
l'attenzione**