

Valutazione critica di una falsa negatività in un test EIA competitivo per anticorpi anti-epatite Delta virus

A. Martella, M. Martella

U.O. Patologia Clinica, S.S. Microbiologia-Virologia, Ospedale "SS. Annunziata", ASL TA, Taranto

Riassunto

Premessa. Il virus dell'epatite Delta (HDV) appartiene ad un gruppo di agenti subvirali noti come *satellites* perchè necessita del virus helper HBV per replicare il suo genoma e produrre gli antigeni di superficie. In letteratura sono stati descritti casi di falsa positività e/o negatività per HDV-Ab.

Metodi. Questo studio, con le implicazioni che ne scaturiscono, è basato sul riscontro di un fenomeno di falsa negatività osservato in un test EIA di tipo competitivo per anticorpi anti-HDV (HDV-Ab), eseguito su un campione con alta concentrazione di antigene HDV (HDV-Ag).

Risultati. Nel nostro caso abbiamo dimostrato che un'alta concentrazione di antigene circolante crea, nel test, un "fenomeno di polimerizzazione" con molti siti di legame per il coniugato e lo sviluppo di una reazione finale ad elevato segnale in densità ottica (reazione negativa atipica, con segnale in eccesso rispetto ai controlli), nonostante nel siero siano presenti anticorpi anti-HDV. L'attesa positività del campione per anticorpi anti-HDV è stata ottenuta tramite una semplice diluizione del siero in fisiologica.

Conclusioni. Abbiamo constatato, verificando il fenomeno anche su altri campioni, che una corretta risposta positiva o negativa per HDV-Ab, in presenza di concentrazioni ematiche elevate di HDV-Ag, può essere ottenuta soltanto in modo empirico diluendo i campioni, ma senza la certezza di ottenere un risultato quantitativamente del tutto accurato.

Summary

Critical evaluation of false negative results in competitive EIA tests for hepatitis Delta virus antibodies

Background. The Hepatitis Delta Virus (HDV) belongs to a group of subviral agents known as Satellites. It needs a helper virus (HBV) in order to replicate its genome and to produce surface antigens. In the literature, some authors reported false positive or negative results in anti-HDV antibodies (HDV-Ab) cases.

Methods. The present study is based on the observation of false negative cases in a competitive EIA-test for HDV-Ab, carried out on subjects with high concentrations of HDV antigen (HDV-Ag).

Results. We have shown that a high haematic concentration of the antigen creates a "polymerization phenomenon", with many binding sites for the conjugate, producing an abnormal signal characterized by a high optical density result (an atypical negative reaction), despite the presence of anti-HDV antibodies in serum. We simply obtained the expected positive results by a mere sample dilution in physiological saline solution.

Conclusions. A correct positive or negative reaction for HDV-Ab, in these atypical cases, can be obtained only in an empirical way by serum dilution. In these cases, however, the accuracy of quantitative results is uncertain.

Key-words: HDV-Ab, HDV-Ag, false negative, false positive, polymerization phenomenon.

Introduzione

Il virus dell'epatite Delta (HDV) appartiene ad un gruppo di agenti subvirali denominati *Satellites*^{1,2}. Replica il suo genoma tramite il virus helper dell'epatite B (HBV)^{3,4} e ne utilizza l'antigene di superficie (HBSAg) per assemblare il suo envelope⁵. La ribonucleoproteina dell'HDV è costituita da RNA e da copie multiple dell'unica proteina codificata dal suo genoma⁶, denominata antigene dell'epatite Delta (HDV-Ag). Si conoscono due forme di HDV-Ag, "S" and "L", codificate in egual misura⁷. L'antigene S è necessario per la replicazione mentre l'antigene L è coinvolto nell'assemblaggio virale^{8,9}.

Il genoma dell'HDV è a singola elica (negative sense)^{10,11}. La replicazione avviene nel nucleo delle cellule epatiche, in accordo con il "modello circolare"¹², tramite una RNA polimerasi dell'ospite¹³. Vengono prodotti un RNA genomico e un RNA antigenomico tramite una reazione di self-cleavage e self-ligation¹⁴. L'RNA genomico serve da stampo per la produzione di mRNA tramite una host pol. II¹⁵, mentre l'RNA antigenomico serve da stampo per la produzione del genoma del virus¹⁶.

L'HDV può essere causa di due tipi di infezione: una coinfezione HDV - HBV e una superinfezione¹⁷. La coinfezione causa un'epatite acuta che difficilmente cronicizza, mentre la superinfezione si realizza in pazienti già colpiti da epatite B e ne può peggiorare il decorso, o facilitarne la cronicizzazione, frequentemente associata alla cirrosi¹⁸, all'epatocarcinoma^{19,20} o all'epatite fulminante.

La trasmissione dell'HDV avviene principalmente per contaminazione con sangue, strumenti, siringhe o emoderivati infetti, ma non si può escludere il contagio sessuale. Negli Stati Uniti la maggior parte dei casi rilevati sono costituiti da tossicodipendenti ed emofiliaci²¹.

In Italia la prevalenza dell'infezione acuta da HDV è considerevolmente diminuita, da 1.7 casi/milione nel 1993 a 0.5 casi/milione nel 2004^{22,23}. Questi ottimi risultati sono stati ottenuti con la vaccinazione anti-HBV resa obbligatoria nel 1991 per i neonati e i bambini in età scolare: era un risultato atteso, data la "HBV dipendenza" dell'HDV, mentre gli stessi risultati non sono stati ottenuti negli Stati Uniti, dove si è seguita una politica di protezione soltanto delle classi di individui a rischio.

Contemporaneamente la vaccinazione ha ridotto l'infezione acuta da epatite B da 120 casi/milione nel 1988, a 13 casi/milione nel 2005²⁴, inoltre si è ridotto il numero dei portatori cronici dal 3% nel 1980, allo 0.9% nel 1997²⁵. Il problema attuale, in Italia è costituito dall'immigrazione. L'SSN ha verificato una prevalenza attuale intorno al 10%, con un picco al 39% negli emigrati di origine cinese; i dati sono comunque poco attendibili a causa della presenza di una larga fascia di emigrazione illegale che sfugge al controllo sanitario.

Nella provincia di Taranto, gli infettivologi limitano la richiesta di anticorpi anti-Deltavirus (HDV-Ab) e antigene del Deltavirus (HDV-Ag) ai casi di epatite cronica attiva, HBSAg/HBVDNA positiva, con contemporaneo peggioramento dei parametri biochimici²⁶. La richiesta viene inviata al nostro laboratorio dove vengono eseguiti due test EIA tradizionali per paziente nella medesima seduta: un test di tipo competitivo per la ricerca di anticorpi anti-HDV e un test per la rilevazione di HDV-Ag nel siero²⁷. E' noto che l'approccio sierologico è carente di sensibilità²⁸ e l'antigene dell'epatite Delta è raramente rilevato nel siero (in letteratura solo nel 25% dei casi di coinfezione), con l'eccezione dei casi di infezione acuta o nei casi di severa immunosoppressione²⁹.

Il decremento della prevalenza di epatiti HBV/HDV non ha stimolato i nostri clinici ad esigere dall'Azienda Sanitaria Locale l'implementazione dei test di biologia molecolare per l'HDV-RNA^{30,31}, come avviene per l'HBV, nonostante sia noto che non tutti i casi HDV-Ab positivi/HDV-Ag negativi sono realmente negativi per la presenza del virus Delta.

Nel nostro laboratorio è attualmente in fase di sperimentazione un saggio in real-time PCR, che offre un'efficiente valutazione della replicazione virale con una quantificazione del genoma sensibile e accurata e contemporaneamente abbatta l'inconveniente del carry-over^{32,33}. Il test HDV-Ag, in uso dal 2006 presso il nostro laboratorio, ha sostituito un precedente test RIA, dato che in letteratura è dimostrata la completa sovrapposizione della performance dei due metodi³⁴: in realtà, noi supponiamo che la maggior stabilità del test EIA, non soggetto a rapido decadimento delle prestazioni come il test RIA, abbia migliorato, seppur di poco, le potenzialità di evidenziare la presenza dell'antigene.

Il presente studio descrive l'osservazione ripetuta di un fenomeno di prozona verificatosi nel saggio di rivelazione degli anticorpi anti-HDV (test falsamente negativo) e nell'elaborazione logica di una semplice risoluzione.

Materiale e metodi

Pazienti

Nel periodo 2006/2008, sono stati valutati 540 campioni di siero per anticorpi anti-HDV e antigene HDV, provenienti da reparti ospedalieri e da ambulatori della provincia di Taranto.

Nel 2006 sono stati eseguiti 171 tests rilevando 39 casi HDV-Ab reattivo/HDV-Ag non reattivo e un caso HDV-Ab non reattivo/HDV-Ag reattivo.

Nel 2007 sono stati eseguiti 193 tests con 36 casi HDV-Ab reattivi /HDV-Ag non reattivi, 1 caso HDV-Ab non reattivo/HDV-Ag reattivo e 1 caso HDV-Ab reattivo/HDV-Ag debolmente reattivo.

Nel 2008 sono stati eseguiti 176 tests rilevando 37 casi HDV-Ab reattivi/HDV-Ag non reattivi, 2 casi HDV-Ab debolmente reattivi/HDV-Ag non reattivi,

e un caso HDV-Ab non reattivo/HDV-Ag debolmente reattivo.

I campioni con risultato reattivo o debolmente reattivo per l'antigene, oggetto dello studio, sono stati riprocessati senza alcuna modifica dei metodi, diluendo i campioni in fisiologica.

Strumentazione

I test sono stati eseguiti in completa automazione con metodo EIA su analizzatore Mago® Plus (Delta Biologicals, Pomezia, Italia).

Lo strumento installato presso il nostro laboratorio è collegato in modo bidirezionale con il LIS per la trasmissione dei dati (ricezione ordini, emissione risultati).

Test per la rivelazione di anticorpi anti-Deltavirus

È stato utilizzato il test EIA di tipo competitivo su piastre microtiter realizzato da Murex Biotech (Dartford, UK) e distribuito in Europa da Abbott (Weissbaden, Germania). I pozzetti sono rivestiti di anticorpi umani legati ad antigene Delta inattivato ricavato da marmotte di laboratorio. A seguito dell'aggiunta del campione, gli anticorpi, eventualmente presenti, si legano all'HDV-Ag immobilizzato e inibiscono la successiva reazione di legame del coniugato, costituito da anticorpi umani anti-HDV legati a perossidasi di rafano. Data l'eccessiva viscosità della soluzione ottenuta (campione, diluente, coniugato) è consigliabile migliorare l'omogeneità agitando la micropiastre dopo ogni fase analitica (aggiunta del campione-diluente e, successivamente del coniugato). Lo strumento provvede al lavaggio dei pozzetti e all'aggiunta del substrato. Lo sviluppo di colore nel pozzetto indica l'avvenuto legame del coniugato, ossia l'assenza di anticorpi nel siero; viceversa i campioni positivi per anticorpi producono pozzetti incolori.

Il cut-off è calcolato dividendo per 2 la somma dell'assorbanza del controllo positivo con quella media del controllo negativo. Le assorbanze dei campioni sono misurate a 450 nm, il software valuta i risultati contro cut-off e assegna a ciascun campione una stringa descrittiva "reattivo" o "non reattivo".

Test per la rivelazione di antigene del Deltavirus

Il test utilizzato è un ELISA-sandwich su piastre microtiter (Bioprobes, Milano).

I pozzetti sono rivestiti con anticorpi monoclonali (AcMo) anti HDV-Ag. Il campione viene mescolato con un detergente in grado di liberare in soluzione l'antigene dalle particelle virali che, una volta legato all'AcMo, reagisce con il coniugato. L'aggiunta del substrato produce una colorazione leggibile a 450 nm.

Il cut-off si ottiene aggiungendo 0.1 all'assorbanza media del negativo. Il software valuta le assorbanze dei campioni contro cut-off ed assegna a ciascun campione una stringa descrittiva "reattivo" o "non reattivo".

Risultati

Osservazione dei casi

Primo caso: rilevazione di un risultato negativo per anticorpi, con un valore di densità ottica (OD) eccessivamente alto rispetto al controllo negativo, in un campione in cui era evidente una notevole presenza di antigene Delta. Nella seduta, il campione ha sviluppato un valore per HDV-Ag >3.000 OD (cutoff: 0.117), e un valore negativo per HDV-Ab = 2.962 OD (cutoff: 0.491).

Da un punto di vista clinico, il paziente non risultava essere affetto da immunodepressione e pertanto era poco credibile che non avesse sviluppato anticorpi anti-HDV. Inoltre il livello di densità ottica del test HDV-Ab era talmente alto (3 volte rispetto al controllo negativo: 0.950 OD) che abbiamo subito supposto un coinvolgimento dell'antigene circolante nel sangue, durante il test. Il caso è stato classificato nel 2006 come caso "HDV-Ag reattivo, HDV-Ab indefinito per interferenza dell'antigene nel test degli anticorpi", lasciando intendere ai clinici che vi era il sospetto di una falsa negatività anticorpale.

Secondo caso: nella seduta, il campione ha sviluppato un valore per HDV-Ag = 1.661 OD (cutoff: 0.117) e un valore negativo per HDV-Ab = 1.438 OD (cutoff: 0.516). In questo caso il titolo dell'antigene circolante è più basso del caso precedente e la densità ottica manifestata nel test anticorpale è contemporaneamente più bassa, ma comunque superiore a quella del controllo negativo (1.002 OD) e in conclusione ci è parso credibile che si fosse ripetuta la situazione descritta nel primo caso.

Terzo caso: nella seduta, il campione ha fornito un risultato dubbio per HDV-Ag = 0.133 OD (cutoff: 0.132) e un valore debolmente positivo per HDV-Ab = 0.306 OD (cutoff: 0.437). Anche in questo caso, abbiamo posto il dubbio che il valore di densità ottica misurato nel test HDV-Ab potesse risentire della presenza di antigene circolante.

Quarto caso: rappresenta l'unico caso di sospetta positività all'HDV-Ag. Il campione ha fornito un valore borderline per HDV-Ag = 0.110 OD (cut off: 0.108) e un valore per HDV-Ab = 0.888 OD (cut off: 0.399), in linea con l'OD misurata sul controllo negativo (0.743) e sugli altri campioni e non eccessiva come nei casi precedentemente discussi.

Interpretazione del fenomeno descritto

L'ipotesi formulata è che l'elevata concentrazione ematica di antigene (sia libero, sia sotto forma di immunocomplesso) amplifichi la reazione in un test per la rilevazione di anticorpi anti-HDV di tipo competitivo³⁵, perché crea, artatamente, numerosi siti di legame per il coniugato (fenomeno di polimerizzazione), a causa della struttura peculiare del test competitivo impiegato³⁶⁻³⁸.

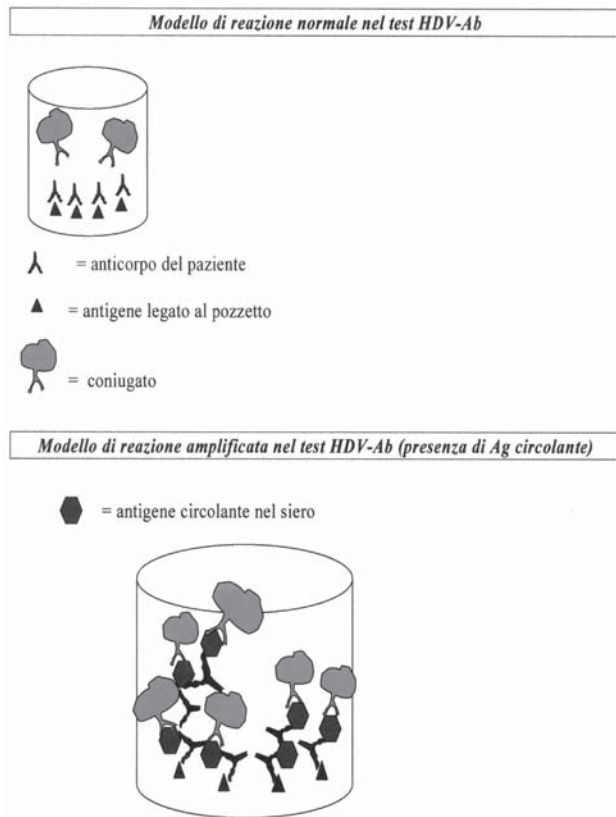


Figura 1. La dinamica competitiva fra l'anticorpo presente nel sangue e il reagente coniugato è illustrata nel modello di reazione normale. La presenza di un'elevata concentrazione ematica di antigene (circolante) favorisce una reazione di polimerizzazione che coinvolge anticorpi, antigene circolante e coniugato; risultato finale è un'abnorme consumo di substrato e il conseguente sviluppo di una densità ottica elevata, superiore al controllo negativo e alla media di tutti gli altri campioni negativi.

L'effetto finale è proprio quello di ottenere una colorazione abnorme nel campione (falso negativo), in genere superiore a quella sviluppata dal controllo negativo, pur in presenza di anticorpi.

Per maggior chiarezza, forniamo una descrizione grafica di quanto possa essere avvenuto durante il test anticorpale, secondo la nostra ipotesi, nella Figura 1.

Inoltre abbiamo scartato a priori un'altra ipotesi che poteva essere formulata quale causa del fenomeno, basata su 2 concomitanze:

- Il controllo negativo del test HDV-Ab è calibrato per reagire con una parte dell'antigene presente nel pozzetto tramite legami aspecifici, impedendo al coniugato di saturare completamente l'antigene e sviluppare una densità ottica elevata.
- Completa assenza di anticorpi e inibitori aspecifici nei due campioni di siero, da noi testati, e saturazione completa dell'antigene presente nei pozzetti del test HDV-Ab da parte del coniugato con sviluppo di una densità ottica superiore al controllo negativo.

Test di conferma

La ripetizione di questo fenomeno di falsa negatività per l'effetto prozona osservato, ci ha stimolato a tentare una semplice risoluzione: partendo dall'ipotesi che si trattasse di un eccesso di antigene circolante nel sangue, abbiamo allestito un protocollo di diluizioni in fisiologica dei campioni, in accordo con l'assunto che la concentrazione molare degli anticorpi prodotti dall'organismo sia superiore a quella dell'antigene circolante.

In tal modo le diluizioni avrebbero potuto agire, ad una determinata soglia critica, da spartiacque, ossia provocare una diminuzione dell'antigene tale da non interferire con la reazione degli anticorpi nel test HDV-Ab; nel contempo, verificare se, a tale soglia critica, il campione conservasse una concentrazione sufficiente di anticorpi per il test.

E' stata aggiunta una diluizione con controllo positivo per anticorpi quale test di controllo del saggio, poiché, se il campione fosse stato un vero negativo, il risultato finale sarebbe rimasto negativo per anticorpi nella diluizione con fisiologica e positivo (probabilmente a titolo debole) nel saggio con diluizione in controllo positivo. Di tutte le diluizioni effettuate, viene illustrata principalmente la diluizione 1:3 che ha dimostrato di essere la diluizione critica nella casistica in nostro possesso.

1° saggio: eseguito nel 1° caso.

Nel test HDV-Ag (cutoff: 0.108 OD), il campione diluito 1:3 con fisiologica ha sviluppato un titolo pari a 1.215 OD, il medesimo diluito 1:3 con controllo positivo ha sviluppato un titolo pari a 0.290 OD.

E' evidente, in questa seduta, che l'aumento di anticorpi specifici (diluizione con controllo positivo) inibisce il legame dell'HDV-Ag circolante nel sangue con gli AcMo del pozzetto, per meccanismo competitivo.

Nel test HDV-Ab (cutoff: 0.474), il campione diluito 1:3 con fisiologica ha sviluppato un titolo positivo pari a 0.095 OD, il medesimo diluito 1:3 con controllo positivo ha sviluppato un titolo negativo pari a 0.891 OD. Paradossalmente, il risultato della diluizione in fisiologica è positivo, perchè la concentrazione di antigene si è ridotta sotto quella soglia critica che permetteva il fenomeno di polimerizzazione e si è ottenuto un risultato positivo.

Più controversa appare l'interpretazione del risultato inaspettatamente negativo ottenuto diluendo con controllo positivo; ci si sarebbe atteso un altro risultato positivo come nella prova precedente.

Il rapporto molecolare che permette la polimerizzazione antigene-anticorpo, non è soggetto a legge lineare (la costante di associazione Ag-Ab è, dal punto di vista matematico, un'equazione iperbolica), pertanto è probabile che si sia ristabilito un nuovo ed inaspettato rapporto stechiometrico fra antigene e anticorpo sufficiente a mantenere la polimerizzazione delle molecole, anche se in quantità più bassa, come sembrerebbe

dimostrare la densità ottica misurata, che è all'incirca il 30% di quanto ottenuto nel test non diluito del caso n° 1.

Questa ipotesi è ulteriormente rafforzata da quanto si è osservato nel test HDV-Ag effettuato sul campione diluito con controllo positivo, dove l'assorbanza ottenuta è risultata circa il 20% di quella del campione diluito in fisiologica. Unica spiegazione plausibile è che gli anticorpi del controllo abbiano capacità reattiva verso l'antigene circolante e lo sottraggano, nel test per l'antigene, all'interazione con l'anticorpo monoclonale specifico immobilizzato sul pozzetto; viceversa nel test per gli anticorpi si formano immunocomplessi che ristabiliscono il fenomeno della polimerizzazione.

Ciò dipende dall'affinità complessiva delle due famiglie anticorpali in gioco (paziente e controllo): questa considerazione, comunque, esula dagli intendimenti di questo lavoro e richiederebbe uno studio in ambienti di biochimica specialistici.

Il test di conferma ha ottenuto il risultato atteso in modo estremamente semplice e convincente; tuttavia, occorre porre attenzione perchè il caso è stato risolto grazie all'alta concentrazione di antigene circolante, che è evento abbastanza raro.

2° saggio: eseguito nel 2° caso.

Nel test HDV-Ag (cutoff: 0.113 OD), il campione diluito 1:3 con fisiologica ha fornito un valore positivo pari a 0.564 OD; il medesimo, diluito 1:3 con controllo positivo, ha dato un valore negativo pari a 0.033 OD.

La diluizione con controllo positivo ha inibito completamente il legame con l'AcMo immobilizzato nel pozzetto, per la più bassa concentrazione dell'antigene, in linea con quanto osservato nel 1° saggio.

Nel test HDV-Ab (cutoff: 0.510 OD), il campione diluito 1:3 con fisiologica ha prodotto un valore positivo pari a 0.328 OD; il medesimo, diluito 1:3 con controllo positivo ha dato un risultato positivo pari a 0.072 OD, al contrario di quanto osservato nel 1° saggio.

Come nel caso precedente, la diluizione in fisiologica ha permesso un normale sviluppo della reazione con un titolo debolmente positivo per HDV-Ab.

Nella diluizione con controllo positivo, è evidente che la bassa concentrazione dell'antigene circolante ha permesso agli anticorpi di giocare un doppio ruolo: saturare rispettivamente l'antigene circolante ottenendo un risultato negativo nel test HDV-Ag e l'antigene immobilizzato nel pozzetto ottenendo un risultato positivo nel test HDV-AB.

La deduzione logica che scaturisce da quest'ultima osservazione è che la concentrazione anticorpale del campione sia bassa. Per confermare questa ipotesi abbiamo allestito un 3° saggio con due diluizioni del campione in fisiologica (1:5 - 1:10); in caso contrario (alta concentrazione anticorpale mascherata dal rapporto molecolare con l'antigene) la maggiore diluizione avrebbe potuto sbilanciare il rapporto a favore dell'anticor-

po, con diminuzione della densità ottica nel test HDV-Ab.

3° saggio: eseguito nel 2° caso.

Nel test HDV-Ag (cutoff: 0.136 OD), il campione diluito 1:5 con fisiologica ha sviluppato un titolo positivo pari a 0.500 OD; il medesimo, diluito 1:10 con fisiologica ha sviluppato un titolo positivo pari a 0.340 OD. Nel test HDV-Ab (cutoff: 0.564 OD), il campione diluito 1:5 con fisiologica ha sviluppato un titolo negativo pari a 0.760 OD; il medesimo, diluito 1:10 con fisiologica, ha sviluppato un titolo negativo pari a 0.755 OD. Entrambi i risultati dell'anticorpo sono negativi per eccesso di diluizione e non abbiamo ritenuto necessario procedere ad un ulteriore saggio con diluizione più bassa (1:2), poichè lo scopo di dimostrare la presenza di anticorpi anti-HDV era stato già raggiunto.

4° saggio: eseguito nel 3° caso.

Non si è ritenuto opportuno procedere ad una diluizione con controllo positivo per il risultato reattivo per anticorpi riscontrato sul campione indiluito e abbiamo allestito due diluizioni in fisiologica (1:2 e 1:3), tenendo conto dei bassi titoli per antigene ed anticorpi ottenuti. Nel test HDV-Ag (cutoff: 0.126 OD), il campione diluito 1:2 con fisiologica ha fornito un risultato negativo pari a 0.039 OD; il medesimo, diluito 1:3 con fisiologica, ha fornito un risultato negativo pari a 0.013 OD. Nel test HDV-Ab (cutoff: 0.490 OD), il campione diluito 1:2 con fisiologica ha prodotto un risultato negativo pari a 0.953 OD; il medesimo, diluito 1:3 con fisiologica, ha dato un valore negativo pari a 0.970 OD.

In ambedue i saggi l'applicazione di queste diluizioni minime è stata sufficiente a diminuire l'antigene e l'anticorpo circolanti al di sotto della soglia di misurazione dei test.

Ciò costituisce una chiara dimostrazione della reale bassa concentrazione di ambedue le molecole nel campione ed è interessante notare che in ambedue le diluizioni applicate, le densità ottiche misurate nel test HDV-Ab sono simili, perchè il coniugato si lega alla massima concentrazione possibile permessa dalle peculiari condizioni chimiche della reazione. In sintesi, l'insieme dei risultati discussi e la bassa frequenza riscontrata ci rassicura sulla rarità del fenomeno e sulla validità del metodo analitico in uso per la rilevazione degli anticorpi anti-HDV.

Nella Tabella I sono riassunti tutti i risultati relativi a questi 3 campioni.

5° saggio: eseguito sul 4° caso

In una seduta immediatamente successiva alla prima, su campione indiluito (non abbiamo escluso la probabilità di un falso risultato dubbio HDV-Ag), oltre che diluito 1:2 in fisiologica. Nel test HDV-Ag (cutoff: 0.103 OD), il campione indiluito sviluppato un titolo negativo pari a 0.012 OD; il medesimo, diluito 1:2 con fisiologica, ha fornito un risultato negativo pari a 0.077 OD.

Il saggio per HDV-Ab è stato invalidato per anomala reazione con il coniugato (forse degradato) o scarsa risposta del substrato (bassa OD su controlli e campioni), comunque non si è ritenuto necessario procedere oltre sul caso 4, avendo accertato che nella seduta precedente il test per l'antigene avesse prodotto un falso risultato dubbio, forse per un insufficiente lavaggio del pozzetto, aspetto infrequente alla nostra esperienza ma comunque possibile.

Questo 4° caso è stato classificato come non reattivo per antigene e anticorpo e costituisce la conferma opposta del fenomeno di falsa negatività dell'anticorpo, osservato in questo test di tipo competitivo. L'assenza del fenomeno ci ha fatto dubitare che vi fosse una circolazione di antigene nel siero, sia pure in bassa concentrazione e costituisce una dimostrazione indiretta della necessità di applicare il semplice algoritmo, elaborato in questo lavoro, a tutti i casi in cui vi sia un sospetto di "non concordanza" dei risultati con la dinamica di "presenza di antigene/produzione anticorpale" attesa.

Conclusioni

In letteratura sono descritti casi di falsa negatività e falsa positività nella determinazione degli anticorpi anti-HDV. Alcuni di questi studi, seppur datati, costituiscono un filone fondamentale per chi si occupa di tests per epatite Delta^{36,38,39}. Tali lavori, nati per la valutazione di kit commerciali e sperimentali (allestiti in casa dagli stessi autori), riportano soprattutto casi di "falsa positività" anticorpale. In due di questi, il fenomeno della

falsa positività viene addebitato "alla presenza di antigene circolante nel siero che interagisce con il coniugato, per saturazione di quest'ultimo"^{36,39}.

Questa ipotesi non concorda con i nostri risultati ed è probabile che scaturisca da una diversa costruzione biochimica del test (tipo di coniugato usato, concentrazione delle molecole interagenti (es. tipo di diluizione del campione), tamponi, etc., oppure da campioni prelevati nelle prime fasi di malattia con alte concentrazioni di antigene e assenza di anticorpi; quest'ultima evenienza è "rara nella naturale rarità dell'epatite Delta" ma non escludibile e per questo noi abbiamo usato anche diluizioni con il controllo positivo per anticorpi.

Nella nostra esperienza, il test Murex AntiDelta (total) EIA della ditta Abbott dimostra essere estremamente affidabile e di soffrire di falsa negatività esclusivamente in presenza di alte concentrazioni di antigene circolante, anche sotto forma di immunocomplessi.

La semplice soluzione da noi adottata è artigianale e dimostra che non vi è una soluzione precisa e matematica del problema: le diluizioni adottate possono dare differenti risultati in dipendenza del rapporto stechiometrico esistente fra le varie molecole in gioco e spetta poi all'esperienza dell'operatore "aggiustare il tiro" per ottenere un risultato credibile.

Cionondimeno, il prezzo della procedura che noi abbiamo adottato è talmente basso in termini di lavoro e materiale, da rendere conveniente la sua applicazione a qualsiasi test di tipo competitivo, per la ricerca di anticorpi, strutturato come il test della Abbott.

In conclusione, da queste osservazioni, scaturisce

Tabella I. Sono illustrati solo i primi 3 casi e le relative densità ottiche (OD) riscontrate, poiché il quarto caso si è dimostrato essere falsamente reattivo per HDV-Ag. Nei primi 2, il titolo anticorpale, abnormemente negativo, è diventato positivo dopo diluizione in fisiologica (NaCl) per rottura dell'equilibrio antigene-anticorpo che è alla base del fenomeno di polimerizzazione. Il terzo caso è la dimostrazione che una bassa concentrazione ematica di antigene non influenza il normale svolgimento della reazione nel test per gli anticorpi. La diluizione in siero di controllo positivo per anticorpi (ctr Ab Pos), utilizzata come controllo interno, interagisce nei tests in relazione proporzionale alla reale concentrazione dell'antigene e degli anticorpi del campione, con effetti talora imprevedibili.

1° caso

	indiluito	diluito1:3 NaCl	diluito1:3 inctr Ab pos
HDV-Ag (OD)	> 3.000 (pos)	1.215 (pos)	0.290 (deb pos)
HDV-Ab (OD)	2.962 (neg)	0.095 (pos!)	0.891 (neg)

2° caso

	indiluito	diluito 1:3 NaCl	diluito 1:3 in ctr Ab pos	diluito 1:5 NaCl	diluito1:10 NaCl
HDV-Ag (OD)	1.66 (pos)	0.56 (pos)	0.033 (neg)	0.50 (pos)	0.34 (pos)
HDV-Ab (OD)	1.44 (neg)	0.33 (deb. pos!)	0.072 (pos)	0.76 (neg)	0.75 (neg)

3° caso

	indiluito	diluito 1:3 NaCl	diluito 1:3 in ctr Ab pos	diluito 1:2 NaCl
HDV-Ag (OD)	0.133 (deb. pos.)	0.013 (neg)	non det.	0.039 (neg)
HDV-Ab (OD)	0.306 (deb. pos.)	0.970 (neg)	non det.	0.953 (neg)

questo semplice algoritmo: nel caso di campione HDV-Ab negativo, HDV-Ag positivo/dubbio: a) confrontare la densità ottica di HDV-Ab del campione con quella dei controlli e degli altri campioni; b) se nella media, ripetere i test per HDV-Ag e HDV-Ab per escludere una falsa positività nel test per l'antigene (se persiste la positività per HDV-Ag chiedere un nuovo campione per escludere una fase iniziale della coinfezione); c) se al di sopra della media, procedere con il test delle diluizioni (in fisiologica e controllo positivo).

Il punto b) è il più delicato e merita una riflessione, perché, come ci è successo in esperienze successive, la valutazione di "falsa positività per HDV-Ag" è semplice in caso di risultati vicini alla fascia del cutoff, spesso non riconfermati successivamente, più complessa con risultati chiaramente positivi. Oltre a chiedere correttamente un nuovo campione a distanza di 7-15 giorni, si può procedere alla fase c e tentare di ragionare sul diverso comportamento del campione diluito in fisiologica o in controllo positivo o, meglio ancora, disporre di un test PCR real-time.

La "falsa negatività" riscontrata può essere utilizzata anche quale test di conferma della presenza di HDV-Ag nel campione e, nel caso di persistente negatività per anticorpi, per sospettare un risultato falsamente positivo per l'antigene, per una cattiva performance della reazione o per la presenza di anticorpi eterofili⁴⁰.

Bibliografia

- Jenkins GM, Woelk CH, Rambaut A, Holmes EC. Testing the extent of sequence similarity among viroids, satellite RNAs, and hepatitis delta virus. *J Mol Evol* 2000; 50:98-102.
- Symons RH, Randles JW. Encapsidated circular viroid-like satellite RNAs (virusoids) of plants. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 239:81-105.
- Smedile A, Rosina F, Saracco G, Chiaberge E, Lattore W, Brunetto MR, et al. Hepatitis B virus replication modulates pathogenesis of hepatitis D virus in chronic hepatitis D. *Hepatology* 1991; 13:413-6.
- Sureau C, Moriarty AM, Thornton GB, Lanford RE. Production of infectious hepatitis delta virus in vitro and neutralization with antibodies directed against hepatitis B virus pre-S antigens. *J Virol* 1992; 66:1241-5.
- Bonino F, Hoyer W, Shih JWK, Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL. Delta hepatitis agent: structural and antigenic properties of the delta associated-particles. *Infect Immun* 1984; 43:1000-5.
- Ryu WS, Netter HJ, Bayer M, Taylor J. Ribonucleoprotein complexes of hepatitis delta virus. *J Virol* 1993; 67:3281-7.
- Moraleda G, Dingle K, Biswas P, Chang J, Zuccola H, Hogle J, et al. Interactions between hepatitis delta virus proteins. *J Virol* 2000; 74:5509-15.
- Ryu WS, Bayer M, Taylor J. Assembly of hepatitis delta virus particles. *J Virol* 1992; 66:2310-5.
- Taylor JM. Hepatitis delta Virus and its replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al., eds. *Fundamental Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 2809-18.
- Kos A, Dijkema R, Arnberg AC, Van der Meide PH, Schellekens H. The hepatitis delta (δ) virus possesses a circular RNA. *Nature* 1986; 323:558-60.
- Wang KS, Choo QL, Weiner AJ, Ou JH, Najarian C, Thayer RM, et al. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta viral genome. *Nature* 1986; 323:508-13.
- Cunha C, Monjardino J, Chang D, Krause S, Carmo Fonseca M. Localization of hepatitis delta virus RNA in the nucleus of human cells. *RNA* 1998; 4:680-93.
- Taylor JM. Cis-acting signals on the RNAs of hepatitis delta virus. *Sem Virol* 1997; 8:212-20.
- Bell P, Brazas R, Ganem D, Maul GG. Hepatitis delta virus replication generates complexes of large hepatitis delta antigen and antigenomic RNA that affiliate with and alter nuclear domain 10. *J Virol* 2000; 74:5329-36.
- Modahl LE, Macnaughton TB, Zhu N, Johnson DL, Lai MMC. RNA-dependent replication and transcription of hepatitis delta virus RNA involve distinct cellular RNA polymerases. *Mol Cell Biol* 2000; 20:6030-9.
- Taylor JM. Hepatitis delta virus. *Virology* 2006; 344:71-6.
- Gowans EJ, Bonino F. Hepatitis delta virus pathogenicity. *Prog Clin Biol Res* 1993; 382:125-30.
- Rizzetto M, Verme G, Recchia S, Bonino F, Farci P, Aricò S, et al. Chronic hepatitis in carriers of hepatitis B surface antigens, with intrahepatic expression of the delta antigen. An active and progressive disease unresponsive to immunosuppressive treatment. *Ann Intern Med* 1983; 98:437-41.
- Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, et al. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut* 2000; 46:420-6.
- Saracco G, Rosina F, Brunetto MR, Amoroso P, Caredda F, Farci P, et al. Rapidly progressive HBsAg-positive hepatitis in Italy. The role of hepatitis delta virus infection. *J Hepatol* 1987; 5:274-81.
- Alter MJ, Mast EE. The epidemiology of viral hepatitis in the United States. *Gastroenterol Clin North Am* 1994; 23:437-55.
- Mele A, Mariano A, Tosti ME, Stroffolini T, Pizzuti R, Gallo G, et al. Acute hepatitis Delta virus infection in Italy: incidence and risk factors after the introduction of the universal anti-hepatitis B vaccination campaign. *Clin Infect Dis* 2007; 44:17-24.
- Gaeta GB, Stroffolini T, Chiaramente M, Ascione T, Stornaiuolo G, Lobello S, et al. Chronic hepatitis D: a vanishing disease? An Italian multicenter study. *Hepatology* 2000; 32:824-7.
- Da Villa G, Romanò L, Sepe A, Iorio R, Paribello N, Zappa A, et al. Impact of hepatitis B vaccination in a highly endemic area of South Italy and long-term duration of anti-HBs antibody in two cohorts of vaccinated individuals. *Vaccine* 2007; 25:3133-6.
- Squarcione S, Pompa MG, Vellucci L. Morbidity from hepatitis B after introduction of nationwide immunization in Italy. *Lancet* 1997; 350:114.
- Modahl LE, Lai MM. Hepatitis delta virus: the molecular basis of laboratory diagnosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2000; 37:45-92.

27. Govindarajan S, Valinluck B, Lake-Bakkar G. Evaluation of a commercial anti-delta EIA kit for detection of antibodies to hepatitis delta virus. *Am J Clin Pathol* 1991; 95:240-1.
28. Jardi R, Buti M, Rodriguez F, Cotrina M, Allende H, Esteban R, et al. Comparative analysis of serological markers of chronic delta infection: HDVRNA, serum HDAg and anti-HD IgM. *J Virol Methods* 1994; 50:59-66.
29. Deny P, Lecot C, Jeantils V, Ovaguimian L, Krivitzky A, Brechot C. Polymerase chain reaction-based detection of hepatitis D virus genome in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Med Virol* 1993; 39:214-8.
30. Bean P. Latest discoveries on the infection and coinfection with hepat. D virus. *Am Clin Lab* 2002; 21:25-7.
31. Jardi R, Buti M, Cotrina M, Rodriguez F, Allende H, Esteban R, et al. Determination of hepatitis delta virus RNA by polymerase chain reaction in acute and chronic delta infection. *Hepatology* 1995; 21:25-9.
32. Yamashiro T, Nagayama K, Enomoto N, Watanabe H, Miyagi T, Nakasone H, et al. Quantification of the level of hepatitis delta virus RNA in serum, by real-time polymerase chain reaction - and its possible correlation with the clinical stage of liver disease. *J Infect Dis* 2004; 189: 1151-7.
33. Le Gal F, Gordien E, Affolabi D, Hanslik T, Alloui C, Dény P, et al. Quantification of hepatitis delta virus RNA in serum by consensus real-time PCR indicates different patterns of virological response to interferon therapy in chronically infected patients. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2363-9.
34. Crivelli O, Rizzetto M, Lavarini C, Smedile A, Gerin JL. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to the hepatitis B surface antigen-associated delta antigen. *J Clin Microbiol* 1981; 14:173-7.
35. Buti M, Esteban R, Roggendorf M, Fernandez J, Jardi R, Rashafer R, et al. Hepatitis D virus RNA in acute delta infection: serological profile and correlation with other markers of hepatitis D virus infection. *Hepatology* 1988; 8:1125-9.
36. Shattock AG, Morris M. Evaluation of commercial enzyme immunoassays for detection of Hepatitis Delta antigen and anti-Hepatitis Delta Virus (HDV) and immunoglobulin M anti-HDV antibodies. *J Clin Microbiol* 1991; 29:1873-6.
37. Roingeard P, Dubois F, Marcelin P, Bernuau J, Bonduelle S, Benhamou JP, et al. Persistent delta antigenaemia in chronic delta hepatitis and its relation with human immunodeficiency virus infection. *J Med Virol* 1992; 38:191-4.
38. Poisson F, Baillou A, Dubois F, Janvier B, Roingeard P, Goudeau A. Immune response to synthetic peptides of Hepatitis Delta antigen. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2343-9.
39. Bezeaud A, Rosenswajg M, Guillin MC. Evaluation of five hepatitis delta virus marker assays for detection of antigen and antibody. *J Clin Microbiol* 1989; 27:2880.
40. Klee GG. Human anti-mouse antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:921-3.