

## Metodi quantitativi in biologia molecolare e loro applicazione nel monitoraggio della terapia antivirale nell'epatite C

O. Valentini, B. Milanesi

*Laboratori di Patologia Clinica  
Azienda Ospedaliera di Desenzano del Garda*

**Riassunto:** Con l'impiego di tecniche quantitative di biologia molecolare clinica è attualmente possibile ottenere dalla terapia antivirale per l'epatite C i massimi risultati, riducendone al minimo la durata, i costi e gli effetti collaterali. Ciò è possibile attraverso un corretto utilizzo dell'indagine diagnostica, che va effettuata a

**Summary:** *Quantitative methods in molecular biology and their application in monitoring antiviral therapy of hepatitis C.*

Through the use of molecular biology quantitative techniques it is now possible to reduce to a great extent the length, the cost and the side effects of the antiviral therapy for hepatitis C, while retaining all

L'epatite C, che a livello mondiale ha una prevalenza intorno al 3%, interessando circa 200 milioni di persone, è una comune causa di cirrosi, verso cui evolve nel 10-20% dei casi, e di carcinoma epatocellulare, nonché la più comune causa di trapianto del fegato. Nei soli Stati Uniti 12.000 decessi all'anno sono ad essa imputabili, ma si ritiene che sia una stima per difetto<sup>1,2</sup>.

Il virus responsabile, identificato alla fine degli anni '80, è un virus con genoma a RNA a singolo filamento e a polarità positiva di circa 9400 basi, appartenente alla famiglia Flaviviridae, del quale si conoscono almeno 6 genotipi, che differiscono tra loro per il 31-34% della sequenza nucleotidica.

La replicazione virale avviene con una elevata frequenza di errore; le conseguenti variazioni nella sequenza genomica sono la causa delle "quasispecie"<sup>3</sup> e conferiscono al virus una particolare attitudine ad eludere le difese immunitarie dell'ospite.

L'infezione tende ad avere un decorso cronico (nel 60-85% dei casi), mentre è meno frequente l'eliminazione spontanea del virus. La concentrazione del virus varia notevolmente nei diversi soggetti infetti, collocandosi per lo più in un intervallo compreso tra 100.000 e 10.000.000 UI/ml. La variazione temporale della viremia in uno stesso soggetto è invece più contenuta.

momenti precisi nel corso dell'iter terapeutico, nonché attraverso una corretta gestione del procedimento analitico, che richiede la conoscenza delle problematiche inerenti alla quantificazione di sequenze genomiche specifiche nei campioni biologici.

of its effectiveness. This result can be achieved by correctly monitoring at specific moments during the period of therapy and by means of a correct management of the analytical processes, which requires the knowledge of the problems concerning the quantification of specific genomic sequences in biological samples.

Gli attuali test immunoenzimatici (di terza generazione) per la ricerca degli anticorpi specifici presentano un'elevata sensibilità, tanto che un test EIA negativo è sufficiente a escludere la diagnosi di infezione cronica da HCV nella maggior parte dei casi. Pazienti emodializzati o immunodeficienti possono però presentare test immunoenzimatici falsamente negativi. In questi pazienti l'infezione può essere esclusa solo dopo aver effettuato la ricerca di HCV-RNA e aver ottenuto risultato negativo, possibilmente in almeno due determinazioni successive. La ricerca di HCV-RNA va effettuata, anche in caso di negatività per gli anticorpi specifici in soggetti immunocompetenti, quando si sospetti una recente esposizione al virus e siano trascorsi meno di 3-4 mesi dall'ipotetico evento infettivo, essendo piuttosto lungo il periodo di latenza per la risposta anticorpale.

In tutti i soggetti con positività confermata per anticorpi anti-HCV la diagnosi di infezione è comunque possibile solo attraverso la dimostrazione dell'acido nucleico virale, che risulta non rintracciabile in una percentuale non trascurabile di questi casi<sup>4,5</sup>. Per questo scopo è consigliabile utilizzare test di tipo qualitativo, con sensibilità sufficiente a evidenziare quantità pari o inferiori a 50 UI/ml (approssimativamente 100 copie genomiche / ml).

Test di tipo quantitativo sono invece necessari, in aggiunta ai test qualitativi, nel monitoraggio della terapia farmacologica dell'infezione cronica, per consentire di ottimizzare il protocollo terapeutico e ottenere dati utilizzabili a fini predittivi.

I vari test quantitativi utilizzabili forniscono risultati non del tutto sovrapponibili tra loro<sup>6,7</sup>, a causa di differenze nella sensibilità analitica, nell'intervallo di linearità della misura e nella possibilità di interferenze di vario tipo.

In mancanza di un riferimento assoluto, si è tuttavia convenuto che gli standard per la quantificazione e per i controlli di qualità vengano confrontati con uno standard internazionale<sup>8,9</sup> e che i risultati vengano espressi sempre con le stesse unità di misura (Unità Internazionali, UI).

Proprio per le differenze nei risultati ottenibili con metodi diversi è di fondamentale importanza che su un determinato paziente il monitoraggio della viremia venga condotto utilizzando sempre lo stesso metodo e, possibilmente, lo stesso laboratorio.

È necessario che il campione sia in perfetto stato di conservazione e venga analizzato oppure congelato in attesa dell'analisi preferibilmente entro le 2 ore dal prelievo.

Mentre esiste scarsa correlazione tra livello viremico e gravità o capacità di progressione della malattia, la determinazione quantitativa della viremia fornisce un'importante informazione sulla probabilità di risposta alla terapia in pazienti in corso di trattamento. Esiste una correlazione tra velocità di eliminazione del virus durante la terapia e risposta a lungo termine alla terapia stessa, come pure è stata osservata una maggior frequenza di risposta a lungo termine in pazienti con bassi livelli viremici pretrattamento, in particolare nelle infezioni sostenute dai genotipi 1, 4 e 6<sup>10</sup>.

### Metodi per la quantificazione di sequenze specifiche di acido nucleico

In prima approssimazione si possono distinguere: 1) tecniche di amplificazione della sequenza genomica bersaglio e 2) tecniche di esclusiva amplificazione del segnale. Tra le prime, meritano di essere sommariamente descritte la reazione DNA-polimerasica a catena nella sua forma classica, la reazione DNA-ligasica a catena, la PCR "real time" e la metodica NASBA, nelle versioni classica e "real time", e, tra le tecniche di amplificazione del segnale, quella che fa uso del DNA ramificato (bdNA). Le tecniche amplificative basate sulla reazione a catena della DNA-polimerasi o della DNA-ligasi utilizzano come substrato il DNA. Per poter essere amplificato con tali tecniche, il genoma a RNA di HCV deve essere prima retroscritto in cDNA, ad opera di una trascrittasi inversa. Nel caso della reazione a catena della polimerasi esiste anche la possibilità di utilizzare per

entrambe le fasi di retrotrascrizione e di amplificazione un unico enzima, come la DNA-polimerasi di *Thermus thermophilus*, in grado di esplicare, oltre all'attività polimerasica, anche quella di retroscrittasi.

### Reazione DNA-polimerasica a catena

Questo metodo<sup>11</sup> utilizza un paio di oligonucleotidi sintetici (iniziatori, o "primer"), complementari ciascuno a uno solo dei due filamenti del dsDNA bersaglio, che, con la loro estremità 3'-OH libera, fungono da innesco per la DNA-polimerasi. La regione delimitata dai due inneschi viene replicata ciclicamente in modo esponenziale. Ogni ciclo termico replicativo consta di tre fasi:

- 1) separazione dei due filamenti complementari del DNA a doppia elica a temperature > 90°C;
- 2) associazione dei due inneschi oligonucleotidici, ciascuno con il rispettivo filamento ("annealing") a 50-75°C;
- 3) sintesi, a partire da ciascun innesco, su ciascuno dei due filamenti, della catena complementare con conseguente duplicazione della regione genomica bersaglio, a 72-78°C.

In origine era necessario aggiungere la DNA-polimerasi ad ogni ciclo, a causa dell'inattivazione termica dell'enzima. La tecnica ha subito un miglioramento formidabile con l'utilizzo di una DNA-polimerasi termostabile, ottenuta dal batterio termofilo *Thermus aquaticus* e perciò indicata come *Taq*, che rimane attiva per molti cicli replicativi.

Riportando in ordinate il logaritmo della quantità di amplificato e in ascisse il numero di cicli termici si ottiene una curva di tipo sigmoide. Durante la fase logaritmica lineare della curva, in condizioni ideali, la quantità di amplificato aumenta di circa 3 logaritmi decimali (ossia di un fattore 1000) ogni 10 cicli. Superato però un certo numero di cicli, la reazione si fa sempre meno efficiente, fino a raggiungere una fase di plateau, in corrispondenza della quale non si ha più alcun incremento dell'amplificato.

Il raggiungimento della fase di plateau è imputabile ai seguenti fattori:

- 1) graduale inattivazione termica della DNA-polimerasi;
- 2) diminuzione esponenziale nel corso del processo amplificativo del rapporto molare tra la DNA-polimerasi e il suo substrato (amplificato), fino al punto che la quantità di enzima può diventare limitante;
- 3) riduzione progressiva dell'efficienza di ibridazione ("annealing") per diminuzione esponenziale del rapporto tra le concentrazioni di innesco e di amplificato; in tali condizioni l'interazione ibridativa tra filamenti complementari di amplificato diventa sempre più frequente rispetto all'analogha interazione tra innesco e amplificato;

4) degradazione del DNA ad opera dell'attività 5'-3' esonucleasica associata alla Taq DNA-polimerasi. Con le miscele di reazione normalmente utilizzate, la fase di plateau viene di norma raggiunta a causa dei fattori sopra elencati molto prima che vengano esauriti gli inneschi oligonucleotidici o i trifosfonucleotidi nella miscela stessa<sup>12</sup>.

### PCR "real time"

La PCR "in tempo reale", o PCR "a rivelazione simultanea", utilizza una strategia che consente di rivelare l'amplificato nel momento stesso in cui si forma. Questa tecnica si basa sull'impiego di sonde marcate con composti fluorescenti e sfrutta l'attività 5'-3' esonucleasica della Taq DNA-polimerasi<sup>13-21</sup>.

Esistono varie configurazioni del sistema di rivelazione. Nella configurazione più nota, la sonda, complementare a uno solo dei due filamenti di DNA della regione bersaglio in un tratto situato tra i due inneschi oligonucleotidici, è marcata alla sua estremità 5' con una molecola fluorescente (definita "reporter"), come ad es. la 6-carbossifluoresceina, oppure il suo tetracloro o esacloroderivato, e all'estremità 3' con uno smorzatore di fluorescenza (definito "quencher"), come ad es. la 6-carbossitetrametilrodamina<sup>22</sup>.

Quando la sonda è integra, l'emissione di fluorescenza da parte del "reporter" è soppressa dallo smorzatore, a causa di un effetto di risonanza che interessa l'intera catena covalente del DNA interposto, noto come F.R.E.T. (trasferimento di energia per risonanza in fluorescenza)<sup>23-25</sup>.

Durante la fase di ibridazione dei primer ai due filamenti della regione bersaglio, a uno dei due filamenti si lega anche la sonda. Nella fase di polimerizzazione, o fase di estensione, della PCR, la DNA-polimerasi, incontrando la sonda, la degrada per effetto della sua attività 5'-3' esonucleolitica, rompendo la catena covalente interposta tra "reporter" e smorzatore. Cessando così l'effetto di soppressione, si ha emissione di fluorescenza, che aumenta in modo esponenziale ad ogni ciclo amplificativo e presenta intensità direttamente proporzionale alla quantità di amplificato prodotto.

Poiché dopo un sufficiente numero di cicli amplificativi tutte le curve di amplificazione tendono a plateau, dove si perde la linearità nella lettura di tipo quantitativo, la lettura sarà tanto più lineare quanto più precocemente nel corso della reazione amplificativa sarà possibile evidenziare il prodotto amplificato. Il momento migliore per la lettura quantitativa di tipo fluorimetrico è quindi quello in cui l'intensità di fluorescenza è minima, ma discriminabile dal rumore di fondo. Quanto maggiore è la quantità iniziale di sequenza bersaglio, tanto più precocemente si raggiungerà il livello soglia per la rilevazione, ossia

tanto minore sarà il numero di cicli amplificativi necessario per raggiungere il livello di determinabilità. Il numero di cicli amplificativi necessario per raggiungere l'intensità soglia rivelabile di fluorescenza e discriminabile dal rumore di fondo viene indicato come "ciclo soglia" (Ct) e corrisponde a un numero intero o frazionario, tanto maggiore quanto minore è la quantità di sequenza bersaglio presente nel campione in analisi.

Riportando in assi cartesiani ortogonali i valori di ciclo soglia (Ct) contro il logaritmo del numero iniziale di copie si ottiene una linea retta.

Poiché nella PCR "real time" la rivelazione dell'amplificato avviene nella fase di maggiore linearità della curva amplificativa (quando l'intensità del segnale fluorescente e la quantità di amplificato prodotto sono perfettamente proporzionali), anziché in una fase vicina al plateau, l'ambito di linearità nel dosaggio risulta molto ampio e la variabilità analitica è molto bassa<sup>26-28</sup>.

L'iter analitico di quantificazione mediante PCR in tempo reale è più rapido che con la PCR classica, che prevede invece una fase di rivelazione al termine del processo amplificativo. Un limite della metodica è rappresentato dal fatto che in una stessa miscela di reazione è possibile amplificare solo poche (fino a 6) sequenze bersaglio<sup>29</sup>, poiché ogni sequenza bersaglio deve essere marcata con un fluorocromo diverso, che emetta a una lunghezza d'onda chiaramente discriminabile, affinché i segnali corrispondenti ai diversi amplificati non si sovrappongano tra loro.

### NASBA e NASBA "real time"

Il metodo NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), o TMA (Transcription Mediated Amplification) è una tecnica di amplificazione isoterica inizialmente descritta per l'RNA, ma adattabile anche al DNA, in cui si fa uso di un primer iniziale che porta legata una sequenza promotore per l'RNA-polimerasi<sup>30-35</sup>.

Il primer-promotore si lega al filamento di RNA bersaglio, consentendo a una trascrittasi inversa di sintetizzare il singolo filamento complementare di DNA. Successivamente il filamento originale di RNA viene degradato ad opera di una ribonucleasi (Rnasi H), mentre il cDNA a singolo filamento rimane intatto. A questo punto si aggiunge un secondo primer, che si lega al cDNA, consentendo la sintesi dell'elica complementare.

Il DNA così ottenuto conterrà la sequenza promotore per la RNA-polimerasi, che potrà trascriverlo in migliaia di copie di RNA complementare.

Nella metodica classica l'amplificato viene rivelato al termine del processo amplificativo, mentre nella variante "real time" la rivelazione simultanea al-

l'amplificazione viene ottenuta utilizzando sonde complementari all'amplificato aventi struttura ad ansa, o a forcina, (per parziale complementarità intramolecolare) marcate con un composto fluorescente all'estremità 5' e con uno smorzatore (quencher) universale all'estremità 3'. Poichè le due estremità 5' e 3' della sonda sono tra loro complementari e si associano a formare un tratto a doppia elica, mentre nel suo tratto centrale la molecola è costituita da un filamento a singola elica ripiegato ad ansa, il fluoroforo legato all'estremità 5' e lo smorzatore legato all'estremità 3' sono tra loro vicini, e ciò causa uno smorzamento della fluorescenza<sup>36,37</sup>. Quando la sonda trova la sua sequenza complementare sull'amplificato, il numero di legami a idrogeno che con essa può formare supera il numero dei legami a idrogeno intramolecolari; per questo motivo l'interazione tra sonda e amplificato è termodinamicamente favorita e, comportando la perdita della struttura secondaria ad ansa con conseguente allontanamento delle estremità 3' e 5', determina la rimozione dell'effetto di smorzamento, e quindi la comparsa di fluorescenza. La fluorescenza che si sviluppa è così direttamente proporzionale al numero di molecole di amplificato.

### Reazione a catena della ligasi

La reazione ligasica a catena<sup>38-42</sup> prevede l'utilizzo di 4 sonde, che a due a due delimitano sui due filamenti complementari del DNA bersaglio gli estremi della regione da amplificare. Dopo denaturazione termica della sequenza bersaglio e appaiamento delle quattro sonde a due a due sui due filamenti complementari, le sonde di ciascuna coppia, se tra loro adiacenti, vengono unite covalentemente ad opera della DNA-ligasi. Quando le sonde di ogni coppia siano invece separate tra loro, è necessaria la presenza di una DNA-polimerasi che sintetizzi la regione mancante, interposta tra le sonde, dopo di che il legame covalente può essere ripristinato dalla DNA-ligasi. Ad ogni ciclo si avrà la duplicazione della sequenza bersaglio di acido nucleico, attraverso le fasi di denaturazione termica con separazione dei filamenti complementari, associazione delle sonde ai filamenti bersaglio, sintesi dei tratti mancanti e saldatura covalente finale.

### Amplificazione del segnale con "branched DNA"

È una tecnica di dosaggio<sup>43-48</sup> che non altera la quantità di molecola bersaglio, ma la rivela direttamente attraverso una forte amplificazione del segnale. Prevede l'uso di oligodesossiribonucleotidi ramificati (bDNA), che consentono di incorporare fino a 3000 molecole di enzima su un'unica molecola bersaglio di acido nucleico, che può essere, indifferen-

temente, DNA o RNA. Non richiede la purificazione dell'acido nucleico, né le particolari precauzioni previste con le tecniche di amplificazione genomica. Vari oligonucleotidi sintetici specifici per la sequenza bersaglio sono utilizzati per la cattura di quest'ultima sulla superficie di una micropiastra (sonde di cattura). Un secondo gruppo di sonde (sonde di preamplificazione) media l'ibridazione delle sonde di DNA ramificato (sonde di amplificazione) all'acido nucleico bersaglio. Ogni sonda di DNA ramificato (bDNA) ha 15 ramificazioni, ognuna delle quali può legare varie sonde marcate con enzima (fosfatasi alcalina), dette sonde di marcatura. Da ultimo viene aggiunto un substrato chemiluminescente (diossietano) e viene misurata l'emissione luminosa, la cui intensità è direttamente proporzionale alla quantità di acido nucleico bersaglio presente nel campione.

Cinetica di formazione del prodotto nelle reazioni amplificative a catena<sup>49-53</sup>

Indicando con  $Q(0)$  la quantità iniziale di molecola bersaglio, la quantità di amplificato ottenuta dopo  $n$  cicli amplificativi è pari a:

$$Q(n) = Q(0)(1 + E)^n$$

dove  $E$  indica l'efficienza di amplificazione, che varia in funzione di  $n$ , assumendo, dopo una prima fase di relativa stabilità che si osserva nei primi cicli, valori progressivamente decrescenti, dal valore massimo iniziale (che in condizioni ottimali è prossimo a 1, ossia al 100%) fino a un valore minimo finale pari a zero. La graduale progressiva diminuzione del valore di  $E$  fino a 0 nel corso del processo amplificativo è dovuta ai fattori già ricordati (inattivazione termica dell'enzima, variazione dei rapporti molar, attività nucleasica, ecc.).

Se  $a = b$ , anche  $\log a = \log b$ , perciò:

$$\log Q(n) = \log Q(0) + n \log (1 + E)$$

Riportando in ordinate  $\log Q(n)$  e in ascisse  $n$  si ottiene una curva che, in prossimità dell'origine, è assimilabile a una retta con coefficiente angolare pari a  $\log (1 + E)$  e con intercetta  $\log Q(0)$ . Questo tratto rettilineo, che si osserva nella prima parte del processo amplificativo, corrisponde a un valore di  $E$  pressochè costante e prossimo al valore massimo iniziale. All'aumentare di  $n$ , dopo un certo numero di cicli,  $E$  incomincia a diminuire e la retta diventa una curva, la cui tangente in ogni punto presenta coefficiente angolare pari a  $\log(1 + E)$ , con  $E$  variabile e tendente a zero all'aumentare di  $n$ , fino a che, alla fine, la tangente risulta parallela all'asse delle ascis-

se, avendo coeff. ang.  $\log(1+0) = 0$ . A questo punto la curva ha assunto l'andamento di una retta parallela all'asse delle ascisse.

Si ribadisce che ciò è dovuto al decremento progressivo dell'efficienza di amplificazione E, che da un valore massimo iniziale (pari a 1, in assenza di inibitori) scende gradualmente fino a zero all'aumentare del numero dei cicli. Quando  $E = 0$  il processo di amplificazione ha termine.

L'andamento testè descritto per la curva di amplificazione risulta diverso da quello tipicamente sigmoide, o a S, osservato sperimentalmente con tecniche di rivelazione simultanea quali la "real time".

L'apparente incongruenza nella forma della curva di amplificazione quale risulta dall'espressione matematica e quale invece risulta dalla rivelazione strumentale "in tempo reale" è semplicemente dovuta al fatto che in quest'ultimo caso il sistema di rivelazione del segnale luminoso non è in grado, per il suo limite di sensibilità, di discriminare tra  $\log Q(0)$  e lo zero, come pure non è in grado di discriminare tra  $\log Q(n)$  e lo zero, fino a che  $\log Q(n)$  non superi un valore soglia rilevabile. Tutto il tratto di curva che precede tale valore soglia appare quindi, anziché una retta con intercetta  $\log Q(0)$  e coefficiente angolare  $\log(1+E)$ , una retta pressochè coincidente con l'asse delle ascisse. La curva reale e quella ottenuta con la rilevazione strumentale coincidono solo dopo che il valore soglia di rilevazione è stato raggiunto e superato.

Dopo uno stesso numero di cicli amplificativi, in particolare partendo da differenti quantità iniziali di sequenza bersaglio, le curve di amplificazione di campioni diversi si potranno trovare in fasi differenti (in fase di linearità logaritmica, piuttosto che in fase di transizione o in fase di plateau). Ciò significa che il valore medio per ciclo dell'efficienza di amplificazione sarà diverso da campione a campione, e in particolare nei campioni giunti a plateau (dove  $E = 0$ ) il valore medio di E sarà più basso che nei campioni che dopo lo stesso numero di cicli si trovano ancora nella fase di linearità logaritmica, caratterizzata da valori di E prossimi a 1. In altri termini, si avrà una sottostima dei primi, rispetto a una stima più corretta dei secondi. Se per tutti i campioni la lettura venisse fatta durante la fase di linearità logaritmica, la stima sarebbe corretta e nessuno verrebbe sottostimato, purchè però si potesse escludere la presenza di inibitori che possano diminuire il valore di E fin dal primo ciclo amplificativo, e quindi indipendentemente dalle condizioni che portano a plateau.

Dal momento che l'efficienza di reazione è variabile da campione a campione, è opportuno che lo standard a quantità nota che serve come riferimento per la quantificazione sia presente in ogni singola miscela e sia quindi uno standard interno, o competitore

re interno, piuttosto che uno standard amplificato a parte<sup>54</sup>.

Che caratteristiche deve avere un competitore interno<sup>55-57</sup>.

Il competitore interno deve essere amplificato con la stessa efficienza della sequenza bersaglio.

Se  $Q(0)$  è la quantità iniziale di sequenza bersaglio presente nel campione,  $S(0)$  la quantità iniziale di competitore (nota),  $Q(n)$  la quantità di sequenza bersaglio sintetizzata dopo n cicli di amplificazione e  $S(n)$  la quantità di competitore sintetizzato dopo n cicli di amplificazione, si ha:

$$Q(n) = Q(0) (1 + E)^n \quad \text{e} \quad S(n) = S(0) (1 + E)^n$$

$$\text{Perciò } Q(n)/S(n) = Q(0) (1 + E)^n / S(0) (1 + E)^n$$

$$\text{e quindi } Q(n)/S(n) = Q(0)/S(0)$$

purchè E abbia lo stesso valore sia per S (standard) che per Q (bersaglio): in queste condizioni dopo n cicli di amplificazione il rapporto quantitativo tra Q e S rimane uguale a quello iniziale. Il risultato è indipendente dal numero dei cicli e dalla quantità di amplificato prodotto dalla reazione. Vengono così eliminate tutte le variabili che si riflettono sull'efficienza di reazione (composizione molare della miscela di reazione, inattivazione termica della DNA-polimerasi o DNA-ligasi, presenza di inibitori, attività nucleasiche, ecc.). L'equazione finale non vale, ovviamente, se i valori di efficienza di amplificazione per standard e bersaglio sono diversi.

Per avere la stessa efficienza di amplificazione della sequenza bersaglio, il competitore deve avere caratteristiche molto simili a quest'ultima. La sua lunghezza deve differire il meno possibile da quella della sequenza bersaglio, poiché il tempo impiegato per la reazione enzimatica di polimerizzazione varia in funzione della lunghezza e ciò può tradursi in una diversa efficienza di amplificazione.

Anche la composizione in basi del competitore è importante, poiché dal rapporto tra basi puriniche e pirimidiniche dipende la temperatura di denaturazione-rinaturazione della doppia elica del competitore.

La sequenza del competitore deve essere ovviamente diversa, anche se per poche basi, da quella bersaglio, in quanto deve essere distinguibile nella fase di rivelazione. È bene tuttavia che le differenze di sequenza non riguardino le regioni complementari agli inneschi, in modo che sia possibile utilizzare gli stessi inneschi sia per il bersaglio che per il competitore: ciò rende più probabile una uguale efficienza di amplificazione. Nel caso della PCR "real time" il competitore può essere rivelato con sonde fluorescenti che emettono a una lunghezza d'onda diversa

da quella utilizzata per rivelare il DNA bersaglio<sup>58</sup>, in modo che i due segnali non si sovrappongano tra loro. Se il processo di amplificazione è preceduto da una fase di retrotrascrizione (come nel caso di HCV-RNA), il competitore interno dovrà essere utilizzato già a partire da questa fase. L'utilizzo di un competitore interno di DNA dopo la retrotrascrizione è metodologicamente scorretto e può portare a risultati altamente imprecisi, poiché anche l'efficienza della reazione di retrotrascrizione può discostarsi dai valori massimi teorici: questa variabile può essere eliminata solo retrotrascrivendo nella stessa miscela di reazione la sequenza bersaglio e un competitore interno. Affinchè sia assicurata una uguale efficienza di retrotrascrizione, la sequenza bersaglio e il competitore dovranno utilizzare lo stesso iniziatore (primer) per la trascrittasi inversa.

Nel processo analitico di determinazione quantitativa una variabile minore, ma non trascurabile, è rappresentata anche dall'efficienza di estrazione dell'acido nucleico. L'aggiunta dello standard interno a quantità nota fin dalla fase di estrazione consente di monitorare l'intero procedimento<sup>54</sup>, eliminando anche questa variabile. L'efficienza di estrazione, alta o bassa che sia, sarà la stessa per la sequenza bersaglio e per il competitore, perciò, al termine del processo estrattivo, il rapporto finale tra quantità di sequenza bersaglio e quantità di competitore sarà identico a quello iniziale, poiché, per le caratteristiche chimicofisiche del competitore, il processo di estrazione non potrà discriminare tra le due specie di acido nucleico.

È da ultimo opportuno sottolineare la necessità di effettuare tutti i controlli intesi ad accertare la corretta concentrazione, nonché la perfetta integrità del competitore.

## Terapia dell'epatite C

Il trattamento più efficace sembra essere quello con peginterferone alfa-2a o alfa-2b (rispettivamente alle dosi di 180 microgrammi o di 1,5 microgrammi/kg di peso corporeo) in un'unica somministrazione settimanale sottocutanea, in associazione con ribavirina (a dosi non inferiori a 10,6 mg/kg/die, in genere 4-6 capsule da 200 mg/die in relazione al peso corporeo). L'IFN non legato a polietilenglicole sembra avere un'efficacia inferiore. L'amantadina viene talora utilizzata in associazione a PEG-IFN o a PEG-IFN+ribavirina<sup>59-69</sup>.

## Monitoraggio della terapia

La terapia dell'epatite C è lunga (con una durata canonica di 48 settimane), costosa (svariate migliaia di euro per singolo paziente) e non scevra da numerosi e rilevanti effetti collaterali. Ciò giustifica l'impe-

gno che finora è stato prodigato nel tentativo di definire le condizioni ottimali per monitorarne l'efficacia e ridurre i costi in termini economici e di beneficio per il paziente.

Il parametro fondamentale per monitorare l'efficacia del trattamento e ottenere informazioni sulla probabilità di guarigione completa, ossia di eradicazione totale del virus, è rappresentato dall'andamento viremico nel paziente trattato.

Studi di carattere cinetico<sup>70-78</sup> hanno evidenziato che dopo un periodo di latenza di 8-10 ore dalla prima iniezione di interferone si ha una rapida diminuzione della viremia mediamente pari a 0,9 unità logaritmiche decimali (con estremi tra 0,3 e 3,0) nelle prime 24-48 ore dalla somministrazione. L'entità della diminuzione è maggiore per i genotipi 2 e 3<sup>72</sup>.

A questa prima rapida caduta esponenziale della viremia (espressione del blocco della replicazione virale operato dall'interferone<sup>61</sup> e della breve emivita di HCV in circolo, che è solo di poche ore) ne segue una più lenta e più variabile che si protrae per i giorni e le settimane successive e che sembra riflettere la cinetica di eliminazione degli epatociti infetti. Anche in questa seconda fase la diminuzione della viremia è più rapida per i genotipi 2 e 3.

È stata osservata una stretta correlazione tra la velocità di decremento della viremia nella seconda fase e la probabilità di eliminazione completa del virus ottenibile con la terapia. La risposta viremica nel corso delle prime settimane di terapia assume perciò un elevato valore predittivo circa il risultato finale del trattamento.

In un primo tempo (Consensus Development Conference del 1997)<sup>79</sup> si era giunti a sostenere l'opportunità di interrompere il trattamento terapeutico nei pazienti che risultassero ancora positivi per HCV-RNA alla 12a settimana, poiché in questi casi le probabilità di risposta a lungo termine (così viene tecnicamente indicata la guarigione, ossia l'eradicazione totale del virus) risultavano trascurabili. Con il miglioramento dei regimi terapeutici e della sensibilità dei metodi per la determinazione qualitativa di HCV-RNA, questo criterio si dimostrò non più accettabile, poiché molti pazienti positivi per HCV-RNA alla 12a settimana risultavano poi conseguire una risposta a lungo termine. Successivamente si è convenuto di spostare il termine per il monitoraggio di tipo qualitativo alla 24a settimana, indicando ancora la sospensione della terapia nei casi in cui persistesse la positività per HCV-RNA. Gli studi di cinetica della clearance virale condotti negli ultimi anni<sup>70-78, 80</sup> hanno però messo in evidenza che l'utilizzo di saggi di tipo quantitativo per HCV-RNA consente una maggiore capacità predittiva, con conseguente possibilità di interruzione della terapia a tempi più precoci nei casi destinati al fallimento terapeutico.

Nel caso dei test di tipo quantitativo, più ancora che in quelli di tipo qualitativo, ci si è imbattuti in pro-

blematiche legate alla eterogeneità dei risultati ottenibili con metodiche diverse, che hanno trovato soluzione solo in tempi relativamente recenti.

È possibile adottare criteri diversi per la definizione della risposta virologica del paziente, sia in termini di entità del decremento viremico (per es. 1, o 2, oppure 3 logaritmi decimali), sia in relazione al momento in cui tale decremento viene accertato (per es. 4a, 12a o 24a settimana). In relazione alla definizione data per tale risposta, che di solito viene indicata come "risposta virologica precoce" (RVP) per distinguerla dalla risposta a lungo termine (RLT, che è sinonimo di guarigione), si possono poi, sulla base dei risultati conseguiti nelle popolazioni studiate, misurare il valore predittivo positivo (VPP), ossia la probabilità che i pazienti con RVP sviluppino poi una RLT, e il valore predittivo negativo (VPN), ossia la probabilità che i pazienti che non presentano una RVP hanno di non sviluppare poi una RLT, cioè di non guarire. Il valore predittivo positivo di una RVP è tanto maggiore quanto più precoce è la risposta virologica stessa, perciò il VPP associato per es. a un decremento viremico pari a 2 log è maggiore se tale decremento si riferisce alla 4a piuttosto che alla 8a o 12a o 24a settimana di terapia. Alla stessa stregua, il valore predittivo positivo di una RVP accertata in un determinato momento è tanto maggiore quanto maggiore è l'entità della risposta virologica: pertanto, il VPP associato, per esempio, a una risposta virologica alla 4a settimana è maggiore se il calo viremico è pari a 3 log, piuttosto che a 2 log o a 1 log.

Il confronto tra i valori predittivi positivi e negativi ottenibili attraverso l'analisi quantitativa di HCV-RNA in vari momenti (4a, 12a e 24a settimana) nel corso dell'iter terapeutico in studi a carattere multicentrico<sup>10,80</sup> ha permesso di trarre conclusioni chiare e univoche ai fini di ottenere protocolli di monitoraggio ottimali.

In particolare sono state individuate le condizioni in cui il VPN (che costituisce il parametro più importante, poiché in base ad esso viene presa o meno la decisione di interrompere la terapia) si avvicina al 100%. Da vari studi è emerso che la mancata riduzione della viremia di almeno 100 volte (ossia 2 logaritmi decimali) alla 12a settimana di terapia sembra escludere una risposta a lungo termine con un valore predittivo negativo di oltre il 98% e giustifica la sospensione del trattamento.

A conclusioni analoghe si è giunti anche partendo da approcci diversi, che fanno riferimento a soglie viremiche assolute in corso di trattamento, anziché alla caduta relativa della viremia rispetto a quella iniziale, precedente il trattamento. Secondo Berg et al<sup>10</sup>, per esempio, la mancata riduzione della viremia sotto la soglia delle 450.000 UI/ml alla 4a settimana ha un VPN pari al 100%; nella popolazione esaminata, infatti, nessuno dei pazienti la cui viremia alla 4a settimana risultava ancora superiore a tale soglia

sviluppa in seguito una RLT. Un VPN del 100% risulta associato anche alla mancata riduzione della viremia sotto le 30.000 UI/ml alla 12a settimana. Dallo stesso studio è emerso che la percentuale di pazienti destinati a non rispondere alla terapia individuabili alla 4a settimana alla soglia viremica di 450.000 UI/ml era solo del 14,6%, mentre la percentuale di pazienti non rispondenti individuabili alla 12a settimana alla soglia di 30.000 UI/ml era decisamente più elevata, pari a oltre il 50%. La conclusione era pertanto che l'indagine virologica alla 12a settimana è più vantaggiosa di quella alla 4a settimana. È tuttavia sensato pensare che in casi particolari, laddove gli effetti collaterali della terapia antivirale sul paziente siano particolarmente rilevanti, sia lecito anticipare l'indagine viremica alla 4a settimana per individuare più precocemente i pazienti destinati a non rispondere e poter quindi interrompere la terapia con maggior anticipo.

In generale è possibile concludere che la mancata riduzione della viremia di almeno 2 log o la mancata riduzione al di sotto di 30.000 UI/ml alla 12a settimana ha un VPN superiore al 98%. Ciò consente di decidere per l'interruzione della terapia in questi casi.

Nel caso del genotipo 1 (che da solo rappresenta nelle popolazioni occidentali circa il 70% del totale dei genotipi infettanti) il VPP del calo viremico di almeno 2 log o della diminuzione al di sotto di 30.000 UI/ml alla 12a settimana è compreso tra il 57% e il 71%, mentre il VPN della mancata RVP si attesta tra il 98% e il 100%.

Nel caso dei genotipi 2 e 3 (che sommati rappresentano circa il 30% del totale dei genotipi infettanti nelle popolazioni occidentali) il VPP per lo stesso tipo di risposta virologica alla 12a settimana è compreso tra l'89% e il 94%, mentre il valore predittivo negativo della mancata risposta varia tra il 75% e il 100%.

In una discreta percentuale di casi (oltre il 20%) la terapia può essere interrotta alla 12a settimana; in relazione al genotipo, questa percentuale è vicina al 30% per i genotipi 1, 4, 6, mentre è solo di circa il 3% per i genotipi 2 e 3.

Mentre nel caso dei genotipi 1, 4, 6 si osserva, infatti, una mancata RVP alla 12a settimana in una percentuale di casi vicina al 30%, solo il 3% circa dei genotipi 2 e 3 non mostra una RVP e, come si è detto, la terapia può essere interrotta solo in questi pochi casi. Per questo motivo, mentre il rapporto tra costo e beneficio del monitoraggio terapeutico è altamente favorevole nel caso dei genotipi 1, 4, 6, ciò appare molto meno evidente nei casi di infezione da genotipi 2 e 3.

I risultati del monitoraggio consentono comunque nel loro complesso di ridurre i costi della terapia di circa il 20%, se valutati in termini puramente economici; a ciò va aggiunto il beneficio per il paziente in termini di effetti collaterali evitati con la interruzione di una terapia inefficace.

In base all'analisi dei dati finora riportati in letteratura appare proponibile uno schema di monitoraggio che preveda almeno una determinazione pretrattamento, per stabilire il livello viremico basale, e una determinazione dopo 12 settimane per valutare l'avvenuta riduzione o meno della carica virale al di sotto delle 30.000 UI/ml, ovvero un calo relativo della viremia pari ad almeno 2 logaritmi decimali. Nei casi in cui gli effetti collaterali della terapia sono particolarmente marcati il controllo alla 4a settimana consente l'interruzione della terapia se la viremia supera la soglia delle 450.000 UI/ml.

Sono destinate a entrare entro breve nell'uso clinico metodiche di tipo quantitativo a sensibilità così elevata da eliminare la dicotomia tra analisi quantitativa e qualitativa, consentendo con un'unica metodica di effettuare il monitoraggio di tipo sia quantitativo che qualitativo (quest'ultimo è richiesto per il monitoraggio al termine della terapia e dopo il termine della terapia stessa).

In definitiva, si può concludere che attraverso il monitoraggio quantitativo è possibile valutare la probabilità di risposta nella fase iniziale del trattamento e ottimizzare il protocollo terapeutico, in relazione alla risposta del singolo paziente; la forte capacità predittiva ottenibile attraverso il monitoraggio della viremia permette di offrire ai pazienti con risposta virologica precoce un incentivo a continuare la terapia e consente d'altra parte, come si è ribadito, di evitare gli effetti collaterali e gli alti costi di una terapia prolungata nei pazienti con risposta virologica inadeguata.

## Bibliografia

- National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: management of hepatitis C: June 10-12, 2002. *Hepatology* 2002; 36:S3-S20.
- Alter HJ, Seeff LB. Recovery, persistence and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin. Liver Dis.* 2000; 20:17-35.
- Polyak SJ, McArdle S, Liu SL, Sullivan DG, Chung M, Hofgartner WT, et al. Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection. *J Virol* 1998; 72:4288-96.
- Schroeter M, Feucht HH, Schaefer P, Zoellner B, Polywka S, Laufs R. Definition of false-positive reactions in screening for hepatitis C virus antibodies. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 233-4.
- Krajden M, Zhao J, Bourke C, Scalia V, Gill P, Lau W. Detection of hepatitis C virus by PCR in second generation enzyme immunoassay-seropositive blood donors by using matched pairs of fresh frozen plasma and pilot tube sera. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2191-5.
- Pembrey L, Newell ML, Tovo PA, van Drimmelen H, Quinti I, Furbini G, et al. Inter-laboratory comparison of HCV-RNA assay results: implications for multi-centre research. *J Med Virol* 2003; 69:195-201.
- Schirm J, van Loon AM, Valentine-Thon E, Klapper PE, Reid J, Cleator GM. External quality assessment program for qualitative and quantitative detection of hepatitis C virus RNA in diagnostic virology. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2973-80.
- Saldanha J, Lelie N, Heath A and the WHO Collaborative Study Group. Establishment of the first International Standard for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) assays for HCV RNA. *Vox Sang* 1999; 76:149-58.
- Saldanha J, Heath A; Collaborative Study Group. Collaborative study to calibrate hepatitis C virus genotypes 2-6 against the HCV International Standard, 96/790 (genotype 1). *Vox Sang* 2003; 84:20-7.
- Berg T, Sarrazin C, Herrmann E, Hinrichsen H, Gerlach T, Zachoval R, et al. Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology* 2003, 37:600-9.
- Mullis KB, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-50.
- Marin MG. Diagnostica di laboratorio: tecniche di amplificazione genica. Milano: Edizioni Sorbona 1999. p. 50.
- Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 2002; 30:1292-305.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' - 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:7276-80.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6:986-94.
- Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol* 1999; 17:804-7.
- Martell M, Gomez J, Esteban JI, Saulea S, Quer J, Cabot B, et al. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol* 1999; 37:327-32.
- Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccalà G, Sodayer M, Chevallier P, Mandrand B, Lotteau V, et al. Quantitation of HCV RNA using real-time PCR and fluorimetry. *J Virol Methods* 2001; 95:111-9.
- Niesters HG. Quantitation of viral load using real-time amplification technology. *Methods* 2001; 25:419-29.
- Niesters HG. Clinical virology in real time. *J Clin Virol* 2002; 25(suppl 3):3-12.
- Yang JH, Lai JP, Douglas SD, Metzger D, Zhu XH, Ho WZ. Real-time RT-PCR for quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Virol Methods* 2002; 102(1-2):119-28.
- Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4:357-62.
- Clegg RM. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol* 1992; 211:353-88.
- Selvin P. Fluorescence resonance energy transfer. *Methods Enzymol* 1995; 246:300-34.



25. Didenko V V. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET) : designs and applications. *Biotechniques* 2001; 31:1106-21.
26. Enomoto M, Nishiguchi S, Shiomi S, Tanaka M, Fukuda K, Ueda T, et al. Comparison of real-time quantitative polymerase chain reaction with three other assays for quantitation of hepatitis C virus. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16:904-9.
27. Kleiber J, Walter T, Haberhausen G, Tsang S, Babel R, Rosenstraus M. Performance characteristics of a quantitative homogeneous TaqMan RT-PCR test for HCV RNA. *J Mol Diagn* 2000; 2:158-66.
28. Kawai S, Yokosuka O, Kanda T, Imazeki F, Maru Y, Saisho H. Quantification of hepatitis C virus by TaqMan PCR: comparison with HCV amplicor monitor assay. *J Med Virol* 1999; 58:121-6.
29. Lee LG, Livak KJ, Mullah B, Graham RJ, Vinayak RS, Woudenberg TM. Seven-color, homogeneous detection of six PCR products. *Biotechniques* 1999; 27:342-9.
30. Weusten JJAM, Carpay WM, Oosterlaken TAM, van Zuijlen MCA, van de Wiel PA. Principles of quantitation of viral loads using nucleic acid sequence-based amplification in combination with homogeneous detection using molecular beacons. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:No.6e26.
31. Leone G, van Schijndel H, van Gemen B, Kramer FR, Schoen CD. Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA. *Nucleic Acids Res* 1998; 26:2150-5.
32. Deiman B, van Aartle P, Sillekens P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Mol Biotechnol* 2002; 20:163-79.
33. Damen M, Sillekens P, Cuyppers HT, Frantzen I, Melsert R. Characterization of the quantitative HCV NASBA assay. *J Virol Methods* 1999; 82:45-54.
34. Lunel F, Cresta P, Vitour D, Payan C, Dumont B, Frangeul L, et al. Comparative evaluation of hepatitis C virus RNA quantitation by branched DNA, NASBA, and monitor assays. *Hepatology* 1999; 29:528-35.
35. Weusten JJAM, Wouters PAWM, van Zuijlen MCA, van de Wiel PA. Stochastic processes defining sensitivity and variability of internally calibrated quantitative NASBA-based viral load assays. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:No.24e137.
36. Abravaya K, Huff J, Marshall R, Merchant B, Mullen C, Schneider G, et al. Molecular beacons as diagnostic tools: technology and applications. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41:468-74.
37. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 1996; 14:303-8.
38. Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:189-93.
39. Birkenmeyer LG, Mushahwar I. DNA probe amplification methods. *J Virol Methods* 1991; 35:117-26.
40. Lee H. Infectious disease testing by ligase chain reaction. *Clin Chemistry* 1993; 39:729-30.
41. Marshall RL, Laffler TG, Cerney MB, Sustachek JC, Kratochvil JD, Morgan RL. Detection of HCV RNA by the asymmetric gap ligase chain reaction. *PCR Methods Appl.* 1994; 4:80-84.
42. Hsuih TCH, Park YN, Zaretsky C, Wu F, Tyagi S, Kramer FR, et al. Novel, ligation-dependent PCR assay for detection of hepatitis C virus in serum. *J Clin Microbiol* 1996; 34:501-7.
43. Wilber JC, Urdea MS. Quantification of viral nucleic acids using branched DNA signal amplification. In: *Molecular Methods for Virus Detection*. London: Academic Press. 1996. p. 131-44.
44. Detmer J, Lagier R, Flynn J, Zayat C, Kolberg J, Collins M, et al. Accurate quantification of hepatitis C virus RNA from all genotypes by using branched-DNA technology. *J Clin Microbiol* 1996; 34:901-7.
45. Pawlotsky JM, Martinot-Peignoux M, Poveda JD, Bastie A, Le Breton V, Darthuy F, et al. Quantification of hepatitis C virus RNA by branched DNA-based signal amplification assays. *J Virol Methods* 1999; 79:227-35.
46. Ross RS, Viazov S, Sarr S, Hoffmann S, Kramer A, Roggendorf M. Quantitation of hepatitis C virus RNA by third generation branched DNA-based signal amplification assay. *J Virol Methods* 2002; 101:159-68.
47. Trimoulet P, Halfon P, Pohier E, Khiri H, Chene G, Fleury H. Evaluation of the VERSANT HCV RNA 3.0 assay for quantification of hepatitis C virus RNA in serum. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2031-36.
48. Beld M, Sentjens R, Rebers S, Weegink C, Weel J, Sol C, et al. Performance of the new Bayer VERSANT HCV RNA 3.0 assay for quantification of hepatitis C virus RNA in plasma and serum: conversion to international units and comparison with the Roche COBAS Amplicor HCV Monitor, Version 2.0 assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40:788-93.
49. Peccoud J, Jacob C. Statistical estimations of PCR amplification rate C.R. *Acad. Sci. Paris Serie I*, 1996, 322:736-68.
50. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* 1993; 11:1026-30.
51. Peccoud J, Jacob C. Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction. *Biophys J* 1996; 71:101-8.
52. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 1999; 26:112-25.
53. Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M. Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36:255-69.
54. Miyachi H, Masukawa A, Ohshima T, Fusegawa H, Hirose T, Impraim C, et al. Monitoring of inhibitors of enzymatic amplification in polymerase chain reaction and evaluation of efficacy of RNA extraction for the detection of hepatitis C virus using the internal control. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36:571-5.
55. Clementi M, Menzo S, Manzin A, Bagnarelli P. Quantitative molecular methods in virology. *Arch Virol* 1995; 140:1523-39.
56. Kaneko S, Murakami S, Onora M, Kobayashi K. Quantitation of hepatitis C virus RNA by competitive polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1992; 37:278-82.
57. Clementi M, Bagnarelli P, Manzin A, Menzo S. Competitive polymerase chain reaction and analysis

- of viral activity at the molecular level. *Genet Anal Tech Appl* 1994; 11:1-6.
58. Gruber F, Falkner FG, Dorner F, Haemmerle T. Quantitation of viral DNA by real-time PCR applying duplex amplification, internal standardization and two-colour fluorescence detection. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:2837-39.
  59. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonzales FL, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347:975-82.
  60. Castet V, Fournier C, Soulier A, Brillet R, Coste G, Larrey D, et al. Alpha interferon inhibits hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes infected in vitro. *J Virology* 2002 ; 76:8189-99.
  61. Wang C, Pflugheber J, Sumpter R Jr, Sodora DL, Hui D, Sen GC, et al. Alpha interferon induces distinct translational control programs to suppress hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2003; 77:3898-3912.
  62. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347:975-82.
  63. Baker DE. Pegylated interferon plus ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C. *Rev Gastroenterol Disord* 2003; 3:93-109.
  64. Keating GM, Curran MP. Peginterferon alpha-2a (40 kD) plus ribavirin: a review of its use in the management of chronic hepatitis C. *Drugs* 2003; 63:701-30.
  65. Manns MP, McHutchinson JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358:958-65.
  66. Berg T, Kronenberger B, Hinrichsen H, Gerlach T, Buggisch P, Herrmann E, et al. Triple therapy with amantadine in treatment-naive patients with chronic hepatitis C: a placebo-controlled trial. *Hepatology* 2003 ; 37 :1359-67.
  67. Fargion S, Bruno S, Borzio M, Battezzati PM, Bissoli F, Ceriani R, et al. Sustained response to combination therapy in patients with chronic hepatitis C who failed to respond to interferon. *J Hepatol* 2003; 38: 499-505.
  68. Weegink CJ, Sentjens RE, Beld MG, Dijkgraaf MG, Reesink HW. Chronic hepatitis C patients with a post-treatment virological relapse re-treated with an induction dose of 18 MU interferon-alpha in combination with ribavirin and amantadine: a two-arm randomized pilot study. *J Viral Hepat* 2003; 10:174-82.
  69. Cornberg M, Huppe D, Wiegand J, Felten G, Wedemeyer H, Manns MP. Treatment of chronic hepatitis C with PEG-interferon alpha-2b and ribavirin : 24 weeks of therapy are sufficient for HCV genotype 2 and 3. *Z Gastroenterol* 2003; 41:517-22.
  70. Zeuzem S. The kinetics of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001; 5 :917-30.
  71. Buti M, Sanchez-Avila F, Lurie Y, Stalgis C, Valdes A, Martell M, et al. Viral kinetics in genotype 1 chronic hepatitis C patients during therapy with 2 different doses of peginterferon alfa-2b plus ribavirin. *Hepatology* 2002; 35:930-6.
  72. Zeuzem S, Herrmann E, Lee JH, Fricke J, Neumann AU, Modi M, et al. Viral kinetics in patients with chronic hepatitis C treated with standard and peginterferon alpha-2a. *Gastroenterology* 2001; 120:1438-47.
  73. Herrmann E, Neumann AU, Schmidt JM, Zeuzem S. Hepatitis C virus Kinetics. *Antivir Ther* 2000; 5:85-90.
  74. Jessner W, Stauber R, Hackl F, Datz C, Watkins-Riedel T, Hofer H, et al. Early viral kinetics on treatment with pegylated interferon alpha-2a in chronic hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Viral Hepat* 2003; 10:37-42.
  75. Layden JE, Layden TJ, Reddy KR, Levi-Drummer R, Poulakos J, Neumann AU. First phase viral kinetic parameters as predictors of treatment response and their influence on the second phase viral decline. *J Viral Hepatitis* 2002; 9:340-5.
  76. Herrmann E, Lee JH, Marinos G, Modi M, Zeuzem S. Effect of ribavirin on hepatitis C viral kinetics in patients treated with pegylated interferon. *Hepatology* 2003; 37:1351-8.
  77. Layden TJ, Mika B, Wiley TE. Hepatitis C kinetics: mathematical modeling of viral response to therapy. *Semin Liver Dis* 2000; 20:173-83.
  78. Zeuzem S. Hepatitis C virus: kinetics and quasispecies evolution during anti-viral therapy. *Forum (Genova)* 2000 Jan-Mar 10:32-42.
  79. National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel statement: management of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26:2S-10S.
  80. Davis GL. Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36:S145-S151.