

Genotyping og RNA-kvantitering av hepatitt C-virus

Sammendrag

Genotyping og kvantitering av hepatitt C-virus (HCV) har betydning for vurdering av prognose og behandling. Vi presenterer resultater av undersøkelse av 144 pasienter i et toårs materiale fra Haukeland Universitetssykehus og redegjør for usikkerhet knyttet til kvantiteringsmetoden. Leger som behandler pasienter med hepatitt C, bør kjenne presisjonsnivået for den anvendte metode.

Engelsk sammendrag finnes i artikkelen på www.tidsskriftet.no

Helge Myrnel

helge.myrnel@haukeland.no

Torgunn Kursetgjerde*

Avdeling for mikrobiologi og immunologi
Haukeland Universitetssykehus
5021 Bergen

* Nåværende adresse:

Avdeling for kreftbehandling og medisinsk fysikk

Pasienter infisert med genotype 1 av hepatitt C-virus bør behandles i 48 uker med pegylert interferon og ribavirin, uavhengig av virusmengde. Kvantitering anbefales likevel før behandlingsstart og etter 12 ukers behandling hos pasienter med genotype 1 (1). Fall i virusmengde på $\geq 2 \log_{10}$ indikerer høy sannsynlighet for vedvarende behandlingseffekt, mens en mindre reduksjon av virusmengden tyder på dårlig effekt, og seponering bør vurderes (2).

Flere metoder er tilgjengelige for måling av RNA-mengde, både målampifiserings-teknikker og signalampifisering. Virusmengden anslås ved å sammenlikne prøveresultatet med en intern standard. Hver metode har sin egen HCV-RNA-standard av varierende lengde og sekvens utviklet av produsenten. Resultatene av de forskjellige metoder er derfor ikke sammenliknbare, men angis oftest likevel med samme benevning – kopier eller ekvivalenter per ml. Denne manglende standardiseringen medfører en begrensning i anvendeligheten av RNA-kvantitering. For å løse dette problemet har WHO utarbeidet en standard (WHO Interna-

tional Standard) som kan brukes til å kalibrere metodene slik at de gir sammenliknbare resultater i internasjonale enheter (International Units per milliliter –IU/ml) (3).

I tillegg er metodenes presisjonsnivå slik at variasjoner i resultatet med en og samme metode på $< 0,5 \log_{10}$ ikke kan anses som signifikante endringer (4). Et måleresultat på for eksempel 500 000 IU/ml vil med en måleusikkerhet på $\pm 0,5 \log$ innebære at sann verdi kan ligge mellom 160 000 og 1 600 000 IU/ml.

Ved Avdeling for mikrobiologi og immunologi, Haukeland Universitetssykehus, har vi utført kvantitering og genotyping av HCV-RNA siden desember 1999. Her presenteres våre funn og erfaringer fra årene 2000 og 2001.

Materiale og metode

Fra januar 2000 til desember 2001 undersøkte vi blodprøver fra 144 pasienter som ledd i utredning før behandling. Serum eller EDTA-plasma ble fraseparert innen seks timer etter prøvetaking og oppbevart ved -70°C frem til undersøkelsen.

HCV-RNA-kvantitering ble gjort med polymerasekjedereaksjon (HCV Monitor v2.0, Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA) etter produsentens anvisninger. Metoden angis av produsenten å ha et lineært område fra 600 IU/ml til 500 000 IU/ml.

Genotyping ble utført på det amplifiserte produktet med en probehybridiseringsmetode (INNO-LiPA HCV II, Innogenetics, Ghent, Belgia) etter produsentens anvisninger.

Resultater

58 av 144 pasienter (40 %) hadde genotype 1. 40 av disse (69 %) hadde genotype 1a. Ni pasienter (6 %) hadde genotype 2 og 77 pasienter (53 %) hadde genotype 3.

22 pasienter (38 %) hadde et resultat forenlig med høy virusmengde ($> 500\,000$ IU/ml) og 24 (41 %) et resultat i området mellom 160 000 IU/ml og 500 000 IU/ml, altså innenfor målemetodens variasjonsområde. 12 pasienter (21 %) hadde en signifikant lavere virusmengde ($< 160\,000$ IU/ml).

Diskusjon

Fordelingen av de tre hovedgenotypene i vårt materiale stemmer godt med tidligere funn i Norge, der Bell og medarbeidere fant type 1 hos 35 %, type 2 hos 13 % og type 3 hos 50 % av 116 pasienter med kronisk hepatitt C (5).

24 pasienter (41 %) hadde en virusmengde på mellom 500 000 IU/ml og 160 000 IU/

ml, altså innenfor variasjonsområdet på $0,5 \log_{10}$. Dersom kravet til $\geq 2 \log_{10}$ -fall i virusmengde etter 12 ukers behandling skal danne grunnlag for vurdering av fortsatt behandling eller seponering, bør denne måleusikkerheten tas med i betraktningen. En pasient med virusmengde på 500 000 IU/ml før behandling kan ha en sann verdi ned mot 160 000 IU/ml. Et $2 \log_{10}$ -fall i virusmengde vil si en verdi på 5 000 IU/ml. Gitt metodens usikkerhetsområde kan en slik sann verdi gi resultater fra 600 IU/ml (nedre grense for lineært område) og opp til 16 000 IU/ml. Dette vil innebære at et målt fall i virusmengde fra 160 000 til 16 000 IU/ml likevel kan være signifikant, fordi de sanne verdiene kan ligge på henholdsvis 500 000 og 5 000 IU/ml.

Gjentatte målinger vil kunne snevre inn det usikre området en del, men dette er uhensiktsmessig fordi undersøkelsen er kostbar og tidkrevende. Metodenes nøyaktighet blir stadig bedre, men det bør som et minimum regnes med en variasjonsbredde på $0,2\text{--}0,3 \log_{10}$. Med metodenes nåværende presisjonsnivå bør kravet til $\geq 2 \log_{10}$ fall i virusmengde etter 12 ukers behandling neppe tolkes for absolutt ved vurdering av prognosen for behandlingsrespons hos den enkelte pasient.

Konklusjon

Kvantitering bør standardiseres og angis i IU/ml for å muliggjøre sammenlikning av resultater fremkommet etter forskjellige målemetoder. Kravet til $\geq 2 \log_{10}$ fall i virusmengde etter 12 ukers behandling bør være veiledende, men må tolkes i relasjon til måleusikkerhet. Leger med behandlingsansvar for pasienter med kronisk hepatitt C bør være fortrolig med de anvendte kvantiteringsmetodene og deres begrensninger.

Litteratur

1. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncalves FL et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 975–82.
2. National Institutes of Health consensus development conference statement. Management of hepatitis C: 2002. 10.–12. juni 2002. www.consensus.nih.gov (24.2.2003).
3. 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.
4. Pawlotsky J-M, Bouvier-Alias M, Hezode C, Darthuy F, Remire J, Dhumeaux D. Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. *Hepatology* 2000; 32: 654–9.
5. Bell H, Hellum K, Harthug S, Mæland A, Ritland S, Myrvang B et al. Prevalence of hepatitis C genotypes among patients with chronic hepatitis C in Norway. *Scand J Infect Dis* 1996; 28: 357–9.