

SVILUPPO DI UN TEST DIAGNOSTICO PER IL SEQUENZIAMENTO DEL GENOMA VIRALE DI HCMV (UL97) PER LA RICERCA DI MUTAZIONI LEGATE A GANCICLOVIR-RESISTENZA

F. Sidoti¹, M. Peradotto¹, G. Bianco¹, S. Brossa¹, C. Balloco¹, A. Curtoni¹, C. Costa¹, R. Cavallo¹

¹SC Microbiologia e Virologia U, Azienda Ospedaliera Universitaria Città della Salute e della Scienza di Torino

INTRODUZIONE

L'infezione da Citomegalovirus umano (HCMV) costituisce una tra le principali cause di morbidità e mortalità nei soggetti immunocompromessi, tra cui i pazienti sottoposti a trapianto, con frequenza di infezione primaria o riattivazione di infezione latente del 50-75% nel primo anno post-trapianto. I farmaci antivirali hanno migliorato le possibilità terapeutiche e la prognosi in caso di infezioni gravi; è noto che in circa il 5-10% dei casi di infezione da HCMV, la terapia con ganciclovir (GCV) o valganciclovir (VGCV) può fallire per l'insorgenza di mutazioni sul gene UL97 di HCMV. Lo scopo del presente studio è lo sviluppo di un test diagnostico per identificare le mutazioni associate a GCV-resistenza sul gene UL97 di HCMV. Tale test sarà successivamente applicato all'analisi della frequenza e della comparsa temporale di mutazioni associate a farmaco-resistenza in campioni clinici di pazienti trapiantati, raccolti presso la SC Microbiologia e Virologia U, AOU Città della Salute e della Scienza di Torino.

METODI

Le mutazioni associate a resistenza nel gene UL97 sono state ricercate mediante sequenziamento del DNA virale con metodo Sanger, previa amplificazione: una prima amplificazione locus-specifica per la regione di UL97 interessata da mutazioni seguita dall'amplificazione con didesossiterminatori per la fase di sequenziamento. I primers sono stati disegnati utilizzando il software Primer-BLAST (NCBI). La sensibilità del saggio è stata testata su diluizioni seriali del ceppo HCMV Merlin. La specificità della metodica è stata verificata tramite l'analisi dei pannelli QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics, CMVDR14, CMVDR15). Infine, sono stati analizzati, in via preliminare, tre campioni clinici di pazienti sottoposti a trapianto di organo solido.

RISULTATI

Il test diagnostico ha dimostrato un limite di sensibilità pari a 10.000 copie di HCMV DNA/mL di sangue ed una buona specificità, rilevando tutte le mutazioni presenti in 8/9 campioni QCMD. Inoltre, in 2/3 pazienti sono state identificate mutazioni associate a GCV-resistenza. In dettaglio, l'analisi delle sequenze ha mostrato la presenza di mutazione A594V e M460I in due pazienti distinti.

CONCLUSIONI

Il test permetterà un'analisi rapida, sensibile e specifica per la ricerca di sottopopolazioni virali GCV-resistenti, con ricadute positive sulla scelta terapeutica e sulla prognosi di infezioni gravi da CMV. L'analisi su un numero maggiore di pazienti permetterà anche di ottenere dati epidemiologici circa la frequenza e la comparsa temporale di mutazioni associate a GCV-resistenza, permettendo un confronto fra i pazienti afferenti alla SC Microbiologia e Virologia U, AOU Città della Salute e della Scienza di Torino e pazienti di altre realtà italiane ed internazionali descritte in letteratura.