P198

Virologia

GESTIONE TERAPEUTICA DEL PAZIENTE HIV POSITIVO: MESSA A PUNTO DI UN METODO IN REAL TIME PCR PER LA QUANTIFICAZIONE DEL DNA VIRALE

A. Renesto [1], S. Mason [1], A. Gani [1], N. Paccagnella [1], F. Canducci [2]
[1]*AB ANALITICA srl, Via Svizzera 16, 35127 Padova, Italia*
[2]*Università degli Studi dell'Insubria, Varese, Italia*

INTRODUZIONE

La quantificazione del DNA provirale dell'HIV nei linfomonociti periferici è riconosciuta essere un parametro fondamentale per la gestione terapeutica del paziente, ma la sua applicazione nella routine diagnostica è ritardata dalla mancanza di sistemi standardizzati disponibili in formulazioni commerciali. Tuttavia le informazioni terapeutiche legate alla quantificazione di HIV DNA sono molteplici. Cariche elevate di HIV DNA sono state associate ad una progressione clinica della patologia molto più rapida ed al fallimento virologico in pazienti che iniziano la terapia antiretrovirale combinata (cART). Viceversa, bassi livelli di HIV DNA durante la cART correlano con la conta di linfociti T CD4+ e con bassi livelli di viremia residua. Pertanto, la valutazione dei livelli di HIV DNA prima e durante la terapia antiretrovirale può essere un valido strumento per il monitoraggio dell'efficacia del trattamento. Inoltre, la carica basale di HIV DNA può essere considerata anche un marcatore indipendente del rebound virologico in pazienti che passano da una terapia a base di inibitori della proteasi ad una basata su inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa.
Scopo di questo studio è stata la messa a punto di un metodo di quantificazione, in Real time PCR, del DNA provirale di HIV, in grado di soddisfare i requisiti di sensibilità e specificità analitica richiesti per il suo utilizzo in campo diagnostico.

METODI

La scelta delle regioni nucleotidiche su cui basare il disegno di primer e probe specifici per la quantificazione dell'acido nucleico virale è stata effettuata utilizzando un approccio di allineamento multiplo su un totale di 3500 sequenze, depositate nel database di riferimento (http://www.hiv.lanl.gov/), che ha consentito di individuare la regione virale LTR quale migliore candidata. Tale regione genica permette di identificare tutti i sottotipi maggiormente diffusi in Europa, appartenenti al gruppo M di HIV 1. La specificità analitica del saggio disegnato è stata determinata, oltre che in silico, anche su campioni sintetici contenenti le sequenze nucleotidiche specifiche per i vari sottotipi. La sensibilità analitica è stata verificata quantificando diluizioni seriali del clone plasmidico HIV-1 NL4-3 e della linea cellulare 8E5 (NIH AIDS reagents program). Come metodo di confronto è stato utilizzato il saggio in PCR Real time Generic HIV DNA CELL (Biocentric).

RISULTATI

I test effettuati, sia in silico che in vitro, hanno dimostrato che le sequenze nucleotidiche selezionate per il disegno di primer e probe sono in grado di identificare i sottotipi A, B, C, G, AE, AG di HIV 1, gruppo M. La sensibilità analitica del sistema è risultata essere di 10 copie/reazione, sia con l'utilizzo del clone plasmidico HIV-1 NL4-3 che della linea cellulare 8E5.

CONCLUSIONI

Grazie al cospicuo database di sequenze virali consultate per il design, il saggio messo a punto risulta avere una elevata specificità analitica, identificando tutti i sottotipi virali HIV 1 del gruppo M. Il limite di detection, pari a 10 copie di genoma virale/reazione, soddisfa i requisiti di sensibilità analitica richiesti per il monitoraggio terapeutico. Il prototipo del dispositivo diagnostico andrà incontro ad una estensiva fase di validazione su campioni selezionati di pazienti HIV positivi, per verificarne le prestazioni cliniche.